

INTRODUZIONE

La "farmacogenomica" e la "farmacogenetica" sono due discipline che impiegano le conoscenze sul genoma umano, l'una per promuovere la scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci, l'altra per studiare il ruolo che il genotipo può svolgere nelle differenze individuali delle risposte ai farmaci. Infatti la somministrazione di un farmaco può produrre effetti molto variabili tra un individuo e un altro sia in termini di efficacia che di reazioni avverse (Roses, 2000).

Gli effetti di un farmaco sull'organismo sono influenzati da un certo numero di geni che codificano per enzimi metabolici, trasportatori e recettori (Givens e Watkins, 2003). Il profilo genetico di un individuo può quindi condizionare sia la sua risposta terapeutica al farmaco che la sua tollerabilità. A causa della peculiarità del tratto genetico individuale, per molti farmaci la maggior parte degli individui mostra un miglioramento dello stato patologico senza sviluppare effetti avversi di particolare rilievo. Altri, invece, non rispondono in maniera soddisfacente alla terapia farmacologica, oppure sviluppano tossicità gravi, tali da richiedere l'interruzione del trattamento (Zhou et al., 2008).

Per un determinato gene è possibile l'esistenza di alleli in grado di codificare per forme molecolari differenti della stessa proteina. Alcune variazioni alleliche sono "silenti", ovvero non condizionano in maniera significativa la funzione del prodotto genico (polimorfismi sinonimi), mentre altre modificano la densità di espressione della proteina codificata, determinando alterazioni clinicamente rilevanti nell'attività dei farmaci che interagiscono con la proteina modificata (polimorfismi regolatori). La frequenza con cui gli alleli di un gene

sono presenti in una popolazione può variare sensibilmente nelle diverse etnie e perciò è necessaria una certa cautela nell'estrapolazione dei dati derivanti da studi di farmacogenomica o farmacogenetica svolti in popolazioni diverse (Ilgelman–Sundberg, 2001). Le variazioni alleliche presenti in una popolazione con una frequenza uguale o superiore all'1% vengono classificate come "polimorfismi", mentre variazioni meno frequenti vengono classificate come "alterazioni genetiche rare" (Saito, 2008).

Sebbene il genoma degli individui sia identico per il 99,9%, la differenza dello 0,1% è in grado di dare luogo a 3 milioni di polimorfismi. Alcuni di questi non sembrano provocare conseguenze evidenti sul fenotipo, mentre altri alterano l'espressione e/o la funzione di proteine e determinano la comparsa di fenotipi che possono influenzare la manifestazione di particolari patologie o condizionare la risposta ai farmaci. L'interpretazione del loro significato risulta quindi di primaria importanza per l'individualizzazione e la personalizzazione delle terapie farmacologiche (Saito, 2008).

I determinanti genetici della risposta a un farmaco possono influenzare il suo profilo farmacodinamico e/o farmacocinetico. Le variazioni relative al profilo farmacodinamico possono determinare una mancanza di risposta del bersaglio molecolare in presenza di concentrazioni terapeutiche del farmaco. Queste variazioni possono dipendere da polimorfismi a carico di geni che codificano per trasportatori, recettori, enzimi e altre proteine coinvolte nel meccanismo di azione del farmaco, o dei geni che influenzano significativamente la progressione della malattia.

La farmacocinetica studia i processi che il farmaco subisce ad opera dell'organismo durante le fasi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione. La variazione del profilo genetico nei singoli pazienti può rendere conto di differenze inter-individuali significative potenzialmente in tutte le fasi della farmacocinetica; queste differenze possono modulare la disponibilità del farmaco in corrispondenza dei suoi siti cellulari di azione, condizionandone sia le attività terapeutiche che la tollerabilità (Zhou et al., 2008).

La farmacogenetica e la farmacogenomica si occupano pertanto dello studio dei polimorfismi genetici nell'ottica di individuare la terapia farmacologica più adatta per il singolo paziente sulla base del corredo genetico individuale, aumentando in questo modo la probabilità che il farmaco risulti più efficace e allo stesso tempo meno tossico (Ilgelman-Sundberg, 2001). Un esempio clinicamente importante è rappresentato dal polimorfismo presente nella regione promotore del gene che codifica per il trasportatore della 5-HT (SERT, SLC6A4). Questo polimorfismo denominato 5HTTLPR, è caratterizzato dalla presenza o dall'assenza di un tratto di 43 bp che dà origine a 2 varianti alleliche, una lunga (L) e una corta (S) che possono condizionare l'attività trascrizionale del gene SLC6A4. La presenza dell'allele S è stata associata ad una maggiore suscettibilità dell'insorgenza di depressione (Caspi et al. 2003) e ad una riduzione della risposta terapeutica al trattamento con farmaci inibitori della ricaptazione di serotonina (SSRI) (Pollock et al., 2000; Arias et al, 2003).

SISTEMA SEROTONINERGICO

1. Serotonina

La 5-idrossitriptamina o serotonina (5-HT) è un mediatore largamente distribuito in natura nei tessuti sia animali che vegetali. Nell'uomo la 5-HT è stata ritrovata nelle piastrine, nell'intestino e nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico. Nei mammiferi la mucosa intestinale è il tessuto con la più alta concentrazione di 5-HT e a questo livello più del 90% è presente nelle cellule enterocromaffini (EC) (De Ponti, 2004).

1.1. Biosintesi

Nell'organismo umano la 5-HT viene sintetizzata per il 90% circa dalle cellule EC del tratto gastrointestinale e per il rimanente 10% dai neuroni serotoninergici localizzati nel nucleo del rafe e nel tronco dell'encefalo (Jonnakuty e Gragnoli, 2008). La sintesi di 5-HT, mostrata in figura 1.1, avviene a partire dall'aminoacido aromatico L-triptofano, che viene assunto con la dieta. L'aminoacido viene inizialmente idrossilato sulla posizione 5 dell'anello indolico ad opera dell'enzima triptofano 5-idrossilasi, e infine decarbossilato mediante una reazione catalizzata dalla decarbossilasi specifica per gli aminoacidi aromatici (Mohammad-Zadeh, 2008).

Una volta sintetizzata, la 5-HT viene immagazzinata in granuli o vescicole dove è complessata con adenosina trifosfato (ATP). L'applicazione di stimoli adeguati (nervosi o chimico-fisici) può indurre la liberazione del mediatore. Le cellule EC presentano granuli secretori elettron-densi che

occupano la base delle cellule e liberano il proprio contenuto principalmente nei siti interstiziali, attraverso la membrana basolaterale. I neuroni serotoninergici presentano le vescicole all'estremità del terminale assonico e liberano 5-HT nel vallo sinaptico (Mohammad-Zadeh, 2008, Spiller, 2008).

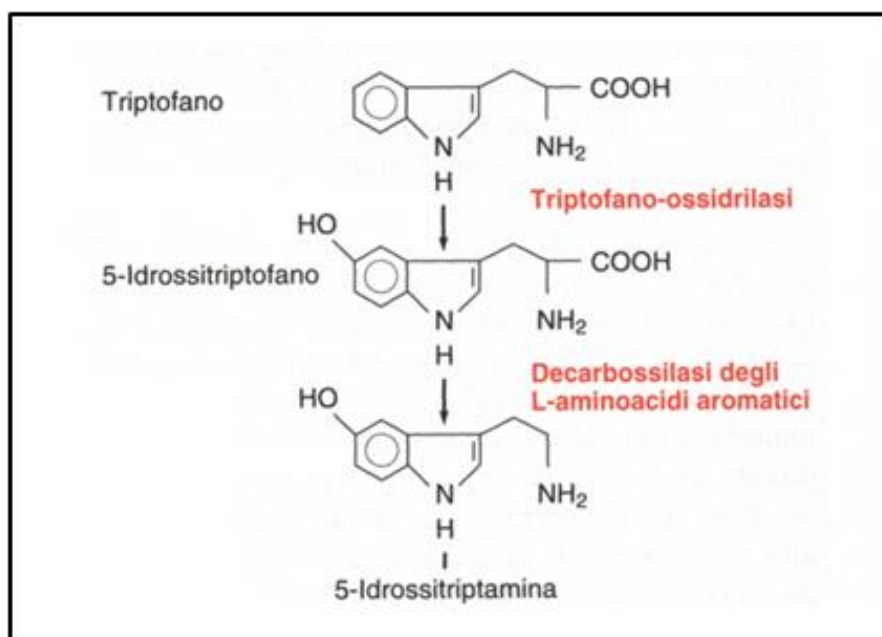


Figura 1.1 Biosintesi di 5-HT

1.2. Liberazione dalle cellule enterocromaffini

Le cellule EC, una popolazione di cellule entero-endocrine localizzate nell'epitelio che riveste il lume del tratto gastrointestinale, sono capaci di sintetizzare e liberare 5-HT. Queste cellule sono sensibili a stimoli meccanici o fisici, ai quali rispondono liberando 5-HT che contribuisce a generare riflessi motori e secretori nel tratto digerente (De Ponti, 2004).

L'aumento della concentrazione dello ione calcio (Ca^{2+}) all'interno delle cellule EC provoca la fusione delle vescicole contenenti 5-HT con la membrana citoplasmatica e la conseguente liberazione di 5-HT nell'interstizio. L'incremento

intracellulare di Ca^{2+} può avvenire grazie all'ingresso del catione dall'esterno, tramite i canali voltaggio-dipendenti di tipo L, o per la sua mobilitazione nel citoplasma dai depositi intracellulari (Rackè et al., 1996; Gershon e Tack, 2007).

La liberazione di 5-HT da parte delle cellule EC è regolata da diversi neurotrasmettitori tramite attivazione dei recettori localizzati sulla membrana cellulare:

- i recettori muscarinici M_3 facilitano la liberazione di 5-HT;
- i recettori nicotinici N stimolano la liberazione di 5-HT nel suino, mentre studi su specie diverse (coniglio e cane) hanno dimostrato che questi effetti sono mediati indirettamente attraverso l'attivazione dei recettori muscarinici M_1 ;
- i recettori β -adrenergici localizzati sulle cellule EC potenziano la secrezione di 5-HT tramite attivazione dell'adenilato ciclasi;
- i recettori H_3 dell'istamina inibiscono la secrezione di 5-HT dall'intestino tenue del maiale;
- i recettori del GABA inibiscono la liberazione di 5-HT;
- i recettori purinergici A_2 e P_{2y} mediano gli effetti inibitori di adenosina e ATP sulla secrezione di 5-HT;
- i recettori della somatostatina inibiscono la liberazione di 5-HT nell'intestino tenue del coniglio, probabilmente attraverso l'inibizione dell'adenilato ciclasi;
- il polipeptide vasoattivo intestinale (VIP) inibisce la liberazione di 5-HT;

- il recettore serotoninergico 5-HT₃ è un autorecettore presente sulla membrana delle cellule EC e promuove la liberazione di 5-HT dall'intestino tenue della cavia;
- il recettore serotoninergico 5-HT₄ inibisce la liberazione di 5-HT (Rackè et al., 1996; Fayyaz e Lackner, 2008).

1. 3. Metabolismo

La 5-HT, una volta secreta dalle vescicole, viene allontanata dal sito di liberazione mediante ricaptazione all'interno del terminale sinaptico o delle piastrine o degli enterociti grazie a un trasportatore specifico, denominato SERT.

In seguito alla ricaptazione, la 5-HT viene re-immagazzinata in vescicole secretorie, oppure entra in contatto con enzimi che la degradano. La principale via catabolica (figura 1.2) è quella mediata dalle monoammino ossidasi (MAO). Questi enzimi catalizzano una reazione che produce 5-idrossindolo-acetaldeide. Questo prodotto intermedio, per azione dell'enzima aldeide deidrogenasi, viene ossidato ad acido 5-idrossindolacetico. L'enzima MAO presenta 2 isoforme: MAO-A e MAO-B. MAO-A è specifico per 5-HT, noradrenalina e tiramina e risulta maggiormente espresso nei neuroni. L'isoenzima MAO-B è prevalentemente periferico (Shih, 1991). In alternativa, 5-idrossindolo acetaldeide può subire una riduzione mediante una reazione catalizzata dall'enzima aldeide reduttasi che la trasforma in 5-idrossitriptofolo. I prodotti finali, giunti nel flusso ematico, vengono eliminati dall'organismo mediante escrezione renale.

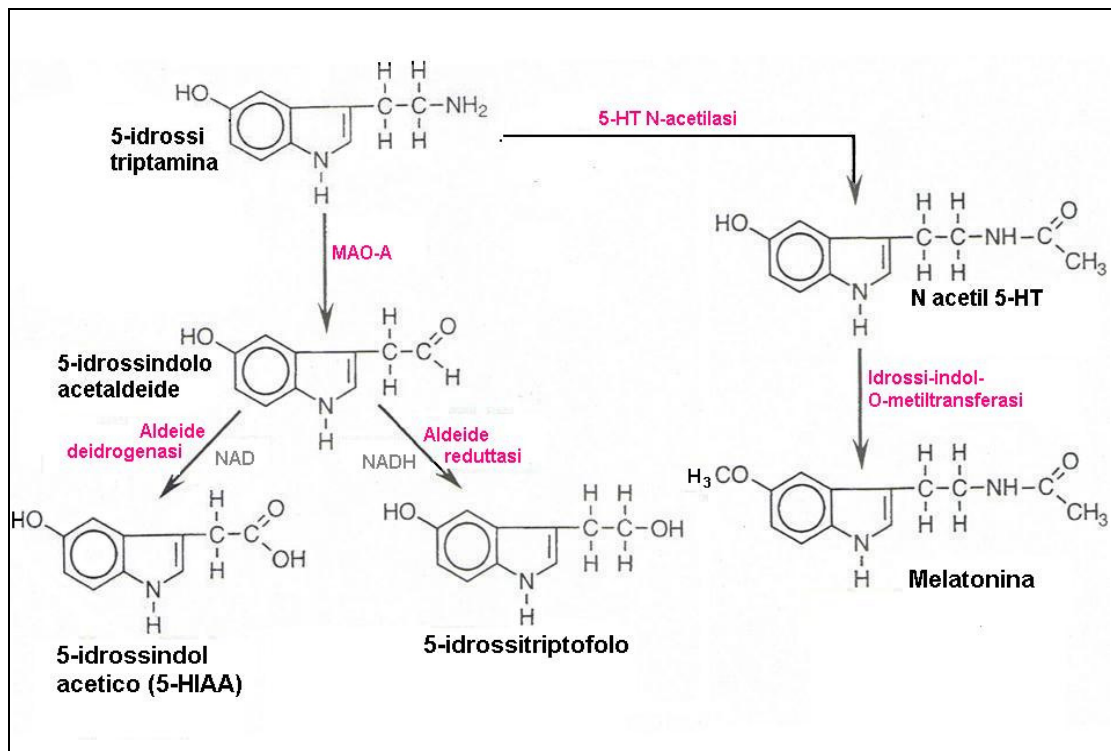


Figura 1.2 Metabolismo di 5-HT

La 5-HT che si trova nelle cellule pituitarie può seguire un'altra via metabolica (figura 1.2): l'enzima N-acetilasi forma N-acetil 5-HT, ed infine l'enzima O-metiltransferasi catalizza la tappa finale della sintesi della melatonina, ormone coinvolto nella regolazione dei ritmi circadiani (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

2. Funzioni fisiologiche

La 5-HT regola molte funzioni nell'organismo mediante l'attivazione dei suoi recettori, distribuiti in vari tessuti e suddivisi in 7 famiglie (De Ponti, 2004).

La 5-HT è un'importante regolatore di molte funzioni gastrointestinali. Essa influenza soprattutto la motilità intestinale e in particolare stimola la contrazione della muscolatura liscia e promuove la liberazione di acetilcolina (ACh), il principale neurotrasmettitore dei motoneuroni eccitatori che media le

funzioni procinetiche dell'intestino (Gershon e Tack, 2007). Una parte della 5-HT sintetizzata dalle cellule EC viene liberata nel flusso ematico, dove viene captata dalle piastrine, che non possiedono gli enzimi necessari per sintetizzarla, mediante la proteina trasportatrice SERT (Mawe et al., 2006).

A livello del sistema respiratorio 5-HT provoca, per azione diretta sulla muscolatura liscia, broncocostrizione marcata nei pazienti con tumore carcinomatoide. Tuttavia, nei soggetti sani questa azione non sembra rilevante. Nell'apparato cardiovascolare 5-HT, per azione diretta sul cuore, induce effetti inotropi e cronotropi positivi di scarsa rilevanza fisiologica (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

A livello del SNC, 5-HT attiva i chemiorecettori, causando bradicardia e ipotensione, influenza i ritmi circadiani in quanto è precursore della melatonina, stimola il centro del vomito, regola il senso della fame, regola la temperatura corporea per azione sull'ipotalamo, aumenta la sensibilità al dolore e prende parte al controllo del tono dell'umore (Jonnakuty e Gragnoli, 2008). Numerose evidenze sperimentali mostrano che la neurotrasmissione serotoninergica risulta alterata, rispetto ai soggetti sani, nei pazienti con disturbi psichiatrici quali depressione, schizofrenia, disturbi ossessivo-compulsivi, comportamento aggressivo, suicidi (Wang et al., 2002).

3. Recettori serotoninergici

La 5-HT interagisce con recettori specifici per espletare le proprie funzioni biologiche. La classificazione attuale descrive 7 famiglie di recettori: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇ (tabella 3.1). Alcune famiglie sono costituite da diversi sottotipi identificati con una lettera maiuscola di seguito al numero della famiglia, ad esempio 5-HT_{1A}. Sottotipi recettoriali diversi presentano differenze significative in termini di localizzazione e sequenze aminoacidiche, struttura proteica, sistemi di trasduzione e funzioni fisiologiche. Le famiglie recettoriali 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄₋₇ sono costituite da proteine di membrana monomeriche a 7 domini transmembrana accoppiate alla proteina G, mentre il recettore 5-HT₃ è un canale ionico. Inoltre è nota l'esistenza del recettore 5-HT_{1P} che ad oggi non è incluso nella nomenclatura IUPHAR dei recettori serotoninergici e quindi è considerato come un recettore "orfano" (Hannon e Hoyer, 2008).

La famiglia dei recettori 5-HT₁ è molto eterogenea e comprende vari sottotipi: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F} e 5-HT_{1-like}; quest'ultimo sottotipo comprende recettori appartenenti alla famiglia 5-HT₁ non ancora classificati. Dopo una prima classificazione, è stato osservato che il sottotipo 5-HT_{1C} presentava maggiori analogie di struttura e di meccanismi di trasduzione con la famiglia 5-HT₂ e per questo è stato rinominato come 5-HT_{2C} (Humphrey et al., 1993).

Tutti i sottotipi 5-HT₁ sono costituiti da un unico peptide di lunghezza variabile da 374 a 421 amminoacidi, presentano almeno il 60% di omologia a

livello dei domini transmembrana e sono accoppiati negativamente all'enzima adenilato ciclasi tramite una proteina G_i .

Tabella 3.1 Classificazione dei recettori serotoninergici

<i>FAMIGLIA</i>	<i>SOTTOTIPO</i>	<i>LOCALIZZAZIONE</i>	<i>RISPOSTA</i>	<i>AGONISTI</i>	<i>ANTAGONISTI</i>
5-HT ₁	1A	Neuroni SNC	Iperpolarizzazione neuronale, ipotensione	8-OH-DPAT ¹	metiotepina
	1B	SNC e nervi periferici	Inibizione liberazione neurotrasmettitore	5-CT ²	metiotepina
	1D	SNC	Inibizione liberazione neurotrasmettitore	sumatriptan, 5-CT	metergolina, metiotepina
	1E	SNC	Inibizione adenilato ciclasi	5-HT	-
	1F	SNC	Inibizione adenilato ciclasi	5-HT	-
	1-like	Vasi intracranici	Contrazione muscolatura liscia	sumatriptan, 5-CT	-
5-HT ₂	2A	Muscolatura liscia, piastrine, SNC, tratto gastrointestinale	Vasocostrizione, aggregazione piastrinica, broncocostrizione	α -metil-5-HT, DOI ³	ketanserina, cinanserina, pirenperone
	2B	Tratto gastrointestinale, cuore fegato, rene polmone	Contrazione dello stomaco nel ratto	α -metil-5-HT, DOI	SB200646 ⁵
	2C	Plessi coroidei del SNC	Stimolazione fosfolipasi C	α -metil-5-HT, DOI	mesulergina
5-HT ₃		Neuroni centrali e periferici	Depolarizzazione	2-metil-5-HT	ondasetron, tropisetron
5-HT ₄		Tratto gastrointestinale, SNC, cuore, vescica urinaria	Liberazione ACh nell'intestino, tachicardia, aumento cAMP nel SNC	metoclopramide, renzapride	GR113808 ⁶ , tropisetron
5-HT ₅	5A e 5B	SNC	-	5-HT	metiotepina
5-HT ₆		SNC	Attivazione adenilato ciclasi	5-HT	metiotepina
5-HT ₇		SNC, tratto gastrointestinale	Attivazione adenilato ciclasi, rilascio muscolatura liscia intestinale	5-HT	metiotepina
5-HT _{1P}		SNE	depolarizzazione lenta dei neuroni mienterici	5-HT, 5-OHIP ⁴	metisergide

1) 8 idrossi-2-(di-n-propilamino) tetralina; 2) 5-carbossiamidotriptamina; 3) 1-(2,5-dimetossi-4-iodofenil)-2-aminopropano; 4) 5-idrossiindalpine; 5) N-(1-metil-5-indolil)-N-(3-piridil)urea; 6) [1-[2-(metilsulfonil)amino]etil]-4-piperinidil]metil 1-metil 1H-indol-3-carbossilato. SNC= sistema nervoso centrale; SNE= sistema nervoso enterico; cAMP=AMP ciclico

Il recettore 5-HT_{1A} è espresso con densità elevata in molte regioni cerebrali coinvolte nella modulazione delle emozioni, quali ippocampo, setto, nuclei dorsali del rafe e amigdala (Pazos et al., 1987; Marcinkiewicz et al., 1984; Radja et al., 1991). Altre aree cerebrali dove è stata riscontrata la presenza di questo recettore sono l'ipotalamo, la neocorteccia e la sostanza gelatinosa della colonna spinale, dove sembra coinvolto nella regolazione delle propiocezioni e nelle funzioni integrative della neocorteccia.

5-HT_{1A} è un recettore post-sinaptico costituito da una catena di 421 aminoacidi a 7 domini transmembrana (Albert et al., 1990) ed è accoppiato negativamente all'enzima adenilato ciclasi (Tang e Gilman, 1991). Nelle cellule piramidali dell'ippocampo attiva la proteina Gi/Go con apertura del canale al K⁺ e iperpolarizzazione delle aree somatodendritiche (Andrade et al., 1986). Nei nuclei del rafe il recettore 5-HT_{1A} agisce come autorecettore somatodendritico inibitore (Nichols e Nichols, 2008).

Il recettore 5-HT_{1B} è stato inizialmente identificato nel ratto e osservato nel SNC (principalmente globo pallido e sostanza nera) e nel sistema cerebrovascolare dove media vasocostrizione. Successivamente, dopo aver clonato e sequenziato i recettori 5-HT_{1B} e 5-HT_{1Dβ} è stata riscontrata un'omologia del 93% delle due sequenze. Studi di binding hanno mostrato che la distribuzione dei recettori 5-HT_{1B} nel cervello di ratto è simile a quella dei recettori 5-HT_{1Dβ} nel cervello umano e il recettore 5-HT_{1Dβ} è stato rinominato 5-HT_{1B} umano (Nichols e Nichols, 2008).

Il recettore 5-HT_{1D} è distribuito nel SNC ed è presente con elevata densità nella sostanza nera, nei gangli della base, lungo la via nigrostriatale e,

in concentrazione minore, nell'ippocampo, nel rafe e nella corteccia (Waeber et al., 1990; Levy et al., 1992a; Jin et al., 1992; Weinshank et al., 1992).

Il recettore 5-HT_{1E} è espresso nelle medesime aree del recettore 5-HT_{1D} con concentrazioni diverse (Lowther et al., 1992; Beer et al., 1992), è accoppiato alla proteina G e inibisce l'enzima adenilato ciclasi (McAllister et al., 1992). Il gene del recettore 5-HT_{1E} è stato denominato AS₁ o S₃₁ e codifica per una proteina di 365 aminoacidi a 7 domini transmembrana (Levy et al., 1992b).

Il recettore 5-HT_{1F} è stato identificato a livello centrale, nei nuclei dorsali del rafe, nell'ippocampo e nella corteccia. A livello periferico è espresso nel mesentero e nell'utero. Questo recettore è una proteina di membrana di 366 aminoacidi. Attualmente sono oggetto di studio farmaci agonisti che possano essere efficaci sull'emicrania (Adham et al., 1993; Nichols e Nichols, 2008).

I recettori 5-HT_{1-like} sono simili per distribuzione e meccanismo a quelli della famiglia recettoriale 1, ma non sono stati ancora caratterizzati. Per questo vengono classificati secondo la funzione che essi mediano: inibizione della liberazione di noradrenalina dai nervi simpatici (Molderings et al., 1990); contrazione della muscolatura liscia vascolare (Bax et al., 1993).

La famiglia dei recettori 5-HT₂ mostra una collocazione più periferica rispetto alla famiglia 1 e comprende tre sottotipi denominati 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}. Questi tre sottotipi sono accoppiati alla fosfolipasi C tramite le proteine G, quali G_q e G₁₁. I recettori della famiglia 5-HT₂ sono codificati da geni con introni e sono traslati in proteine omologhe costituite da un singolo peptide di 458-471 aminoacidi (Mylecharane, 1990; Humprey et al., 1993; Foguet et al., 1992).

Il recettore 5-HT_{2A}, presente sui terminali assonici di neuroni serotoninergici centrali, risulta espresso anche sulle piastrine, dove promuove l'aggregazione, e sulla muscolatura liscia di vasi, bronchi e utero, dove induce contrazione. Questo recettore è una proteina di membrana a 7 domini transmembrana con una sequenza omologa al recettore 5-HT_{2C}.

Il recettore 5-HT_{2B} venne identificato per la prima volta nel fondo dello stomaco di ratto e fu classificato come 5-HT_{1-like} (Vane et al., 1959). Studi successivi dimostrarono una maggiore omologia del gene e della proteina con la famiglia recettoriale 2 (Cohen e Wittenaur, 1987; Kursar et al., 1992) e, nel 1993, Humprey et al. lo denominarono definitivamente 5-HT_{2B}. La proteina di 460 aminoacidi viene codificata da un gene con introni (Schmuck et al., 1994) e risulta espressa maggiormente a livello periferico in tessuti di stomaco, intestino, cuore e rene (Foguet et al., 1992).

Il recettore 5-HT_{2C} è espresso principalmente sulle cellule epiteliali dei plessi coroidei (Yagaloff e Hartig, 1985), nelle pareti dei ventricoli cerebrali, nei gangli della base, nella sostanza nigra e nel globo pallido (Pazos e Palacios, 1985; Pazos et al., 1987). Burns e colleghi (1997) hanno dimostrato che la sequenza aminoacidica finale della proteina dipende dall'*editing* dell'mRNA (evento post-trascrizionale che modifica l'espressione del codice genetico a livello dell'RNA). Questo evento porta a ipotizzare l'esistenza di numerose isoforme, che presentano variazioni di almeno 3 aminoacidi nella seconda ansa intracellulare, responsabili di una maggiore o minore affinità di legame alle proteine G. È stato ipotizzato un coinvolgimento dei recettori 5-HT_{2C} in processi quali la locomozione, lo stimolo della fame e l'anoressia nervosa, la produzione

dei fluidi cerebrospinali e la liberazione dell'ormone adrenocorticotropo (Fozard e Gray, 1989, Curzon e Kennett, 1990; Lucki, 1992).

I recettori 5-HT₃ sono distribuiti su neuroni sia centrali che periferici (Yakel et al., 1988; Waeber et al., 1989; Wallis, 1989). Nel SNC la più alta densità è stata riscontrata nel complesso dorsale del nervo vago e nei nuclei spinali del trigemino, nell'area postrema, nei nuclei del tratto solitario e nella sostanza gelatinosa della colonna spinale (Hamon et al., 1989; Pratt et al., 1990). Una densità più bassa di questi recettori è stata individuata nella corteccia e in aree del sistema limbico (Palacios et al., 1991; Laporte et al., 1992). A livello periferico questi recettori sono espressi sui neuroni pre- e post-gangliari del sistema nervoso autonomo, sui neuroni sensori e su quelli del sistema nervoso enterico (Wallis, 1989; Peters et al., 1991; Wallis e Elliot, 1991).

Il recettore 5-HT₃ è un canale ionico Na⁺/K⁺. Il suo gene non presenta introni e codifica per una proteina costituita da diverse subunità (Derkach et al., 1989). Il legame con un agonista determina l'apertura del canale e quindi una rapida depolarizzazione neuronale, che a sua volta permette un rapido aumento della concentrazione del Ca⁺⁺ nel citoplasma con liberazione del neurotrasmettitore sia da neuroni centrali che periferici (Blandina et al., 1989; Galzin e Langer, 1991; Paudice e Raiteri, 1991).

L'attivazione dei recettori 5-HT₃ influenza molte funzioni fisiologiche. Nel cuore l'efficienza di contrazione può aumentare o diminuire attraverso una combinazione di effetti locali e riflessi (Saxena e Villalón, 1991). Nei vasi sanguigni media la vasodilatazione (Blauw et al., 1988; Orwin e Fozard, 1986).

A livello gastrointestinale controlla la motilità, il tono e la secrezione (Costall e Naylor, 1990; Furman e Waton, 1989). Nel SNC stimola il centro del vomito (Andrews et al., 1988; Andrews e Bhandari, 1993) e diminuisce la soglia nocicettiva (Hamon et al., 1990; Fozard, 1993).

Gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ vengono utilizzati in terapia per prevenire il vomito e la nausea durante la chemioterapia o la radioterapia. A livello centrale, gli antagonisti influenzano il comportamento, confermando il coinvolgimento di questi recettori in patologie quali psicosi, ansia e disturbi alimentari, nei processi cognitivi e nell'abuso e dipendenza da sostanze stupefacenti (Costall et al., 1989; Barnes et al., 1992).

I recettori 5-HT₄ furono scoperti nel cervello di topo e di cavia (Bockaert et al., 1992); in seguito furono individuati anche nel cuore umano (Kaumann et al. 1989, 1990) e in altre aree periferiche, quali la corticale del surrene (Lefebvre et al., 1992), le cellule muscolari e secretorie dell'apparato gastrointestinale e il soma dei neuroni mienterici. A livello centrale, la maggior concentrazione di recettori 5-HT₄ è presente nei neuroni del collicolo, nell'ippocampo e nella corteccia (Monferini et al., 1993).

Il recettore 5-HT₄ attiva l'adenilato ciclasa stimolando la produzione di AMPciclico. Nel tratto gastrointestinale l'attivazione di questi recettori media la contrazione della muscolatura liscia del colon umano (Tam et al., 1992) e facilita il riflesso peristaltico. Nel cuore, gli agonisti 5-HT₄ aumentano la forza di contrazione atriale, ma non ventricolare, poiché i recettori non sono espressi nei ventricoli (Schoemaker et al., 1993).

Gli indoli quali 5-HT, 5-MeOT e α -metil 5-HT sono agonisti potenti dei recettori 5-HT₄ (Bockaert et al., 1992; Ford e Clarke, 1993). Derivati benzamidici, quali cisapride, zacopride, renzapride, metoclopramide (Flynn et al., 1992) e derivati benzoimidazolici si comportano come agonisti parziali (Turconi et al., 1991; Bockaert et al., 1992).

La famiglia dei recettori 5-HT₅ comprende 2 sottotipi, 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}. La loro localizzazione non è ben determinata, anche se alcuni studi mostrano la presenza dell'mRNA per il sottotipo 5-HT_{5A} nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nel peduncolo pineale, nel bulbo olfattivo e nello strato granulare del cervelletto, mentre l'mRNA del sottotipo 5B è limitato al peduncolo pineale (Plassat et al., 1992). Il recettore 5-HT_{5A} inibisce l'enzima adenilato ciclastasi mentre il meccanismo di trasduzione di 5-HT_{5B} non è chiaro. Il profilo farmacologico è simile a quello della famiglia 5-HT₁ (Matthes et al., 1993; Erlander et al., 1993).

Il profilo di espressione dei recettori 5-HT₆ non è noto. L'mRNA di questi recettori è stato ritrovato in concentrazioni rilevanti a livello centrale nel corpo striato, nel tubercolo olfattivo, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo. Il gene presenta 2 introni, uno localizzato nella regione che codifica per la sequenza tra i segmenti transmembrana 5 e 6 e l'altro tra i segmenti transmembrana 6 e 7 (Ruat et al., 1993).

I recettori 5-HT₇ sono espressi a livello periferico sulla muscolatura liscia dei vasi e dell'intestino, dove sembrano mediare il rilascio muscolare nel colon umano (Prins et al., 1999) e di cavia (Tonini et al., 2005). A livello centrale i recettori 5-HT₇ sono espressi nelle regioni del talamo, dell'ipotalamo,

dell'ippocampo e della corteccia. L'espressione è diversa nelle diverse specie animali e non è ancora stata ben caratterizzata nell'uomo. La presenza di numerosi introni nel gene e la difficoltà di individuare il codone di stop hanno condotto a risultati contrastanti circa la lunghezza del peptide, composto da circa 479 amminoacidi, in quanto le varianti di splicing possono variarne la lunghezza. Il recettore attiva l'enzima adenilato ciclasi, provocando un aumento di AMP ciclico intracellulare (Nichols e Nichols, 2008).

I recettori 5-HT_{1P} sono maggiormente espressi sul soma dei neuroni mienterici del tipo II/AH dell'intestino dove mediano una depolarizzazione lenta attraverso un decremento della conduttanza del Ca⁺⁺ attivata da K⁺ (Gershon et al., 1991). Questa classe di recettori è considerata uno dei bersagli della 5-HT liberata dalle EC. Inoltre, è stata rilevata la loro presenza a livello del pancreas, del tessuto cardiaco e della cute. Studi condotti su colture cellulari di pinealociti indicano che il recettore è presente nel SNC e che influenza positivamente la produzione della melatonina (Kirchgessner et al., 1992).

4. Trasportatore della serotonina

Il trasportatore della serotonina, SERT, analogamente ai trasportatori di acido γ -aminobutirrico (GABA), prolina, creatina, betaina, glicina e alcune monoammine (dopamina, noradrenalina), appartiene alla famiglia dei neurotrasportatori Na⁺/Cl⁻-dipendenti, che agiscono come cotrasportatori ed in particolare come sinporti. Il SERT è prevalentemente correlato ai trasportatori delle catecolamine, dopamina e noradrenalina (Takeshi et al., 2002), e insieme

a questi viene classificato come trasportatore di membrana neuronale Na^+/K^+ -dipendente (Blakely et al., 1994).

L'analisi delle sequenze amminoacidiche consente di proporre per questi trasportatori un modello strutturale comune, caratterizzato dalla presenza di dodici domini transmembrana, intercalati da cinque anse intracellulari e sei extracellulari. La lunga ansa extracellulare tra il terzo e quarto dominio costituisce la regione più variabile tra i membri della famiglia e potrebbe pertanto conferire al trasportatore la specificità nei confronti dei diversi substrati.

4.1. Struttura molecolare

Il SERT è codificato da un unico gene localizzato sul cromosoma umano 17q11.2 (Lesch et al., 1993) e comprende 14 esoni; lo start codon è situato nell'esone 2; la proteina è codificata a partire dalla sequenza nucleotidica che va dall'esone 2 all'esone 14.

L'mRNA contiene una sequenza che codifica per una proteina integrale di membrana. Il SERT umano ha un'omologia del 92% con il trasportatore del ratto (Ramamoorthy et al., 1993a; Lesch et al., 1994), e del 94% con quello del topo (Chang et al., 1996).

La proteina (figura 4.1) è un peptide di 630 aminoacidi comprendente 12 segmenti transmembrana, ha un peso molecolare di 70320 Da e il suo punto isoelettrico è di 5,84. Le estremità N-terminale e C-terminale sono intracellulari e ciascun dominio transmembrana è costituito da 25 aminoacidi idrofobici (Olivier et al., 2000). La proteina integrale di membrana presenta:

- 2 siti per la N-glicosilazione (in verde nella figura 4.1) nel secondo *loop* extracellulare tra i domini transmembrana 3 e 4 (Takeshi et al., 2002);
- 3 siti intracitoplasmatici per la fosforilazione da parte della proteina chinasi AMP ciclico dipendente (PKA) (in rosa nella figura 4.1), situati nella regione N-terminale;
- 2 siti per la fosforilazione ad opera della proteina chinasi C (PKC) (in blu nella figura 4.1): uno nel segmento intracellulare tra i domini 4 e 5, e l'altro sul segmento C-terminale.

Non sono state identificate isoforme di questa proteina e, a questo proposito, nel 1993 fu dimostrato che i siti di ricaptazione di 5-HT identificati a livello piastrinico coincidevano con quelli presenti a livello neuronale (Lesch et al., 1993). Tuttavia è stato dimostrato che il gene SERT può codificare diverse varianti di mRNA (vedere paragrafo 5.1).

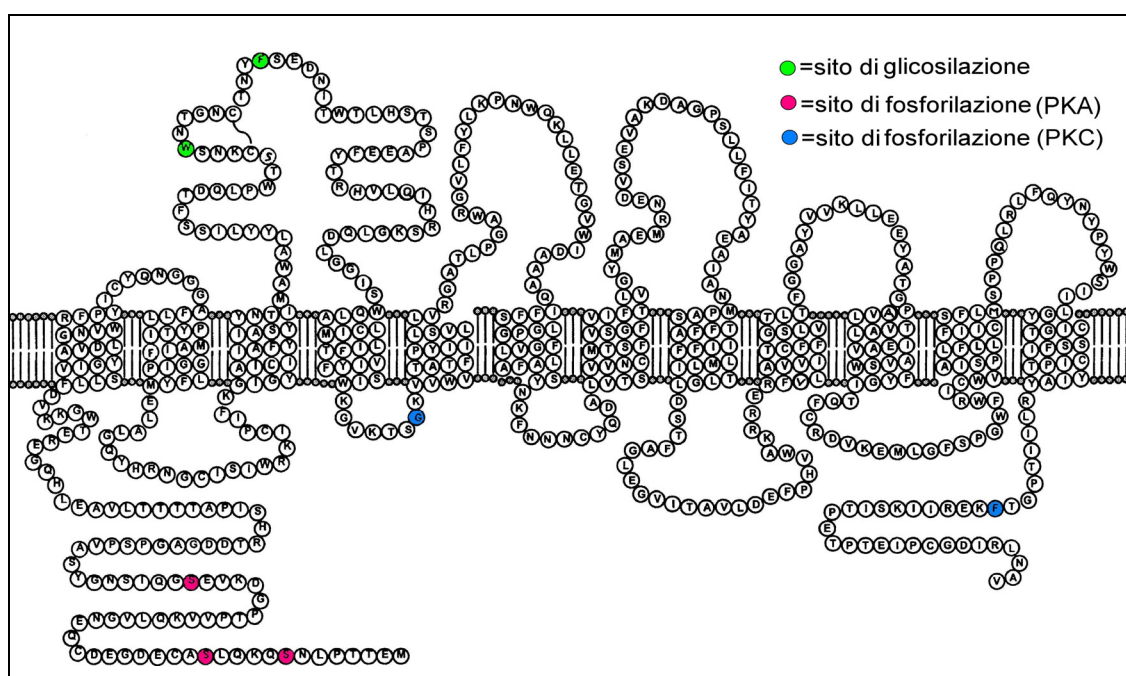


Figura 4.1 Struttura molecolare del trasportatore della serotonina (SERT)

4.2. Meccanismi e funzioni

I trasportatori delle monoammine sono proteine di membrana situate prevalentemente sui terminali sinaptici e hanno il compito di ricaptare il neurotrasmettitore dal vallo sinaptico extracellulare nel citoplasma del terminale assonico. Uno dei modelli più accreditati sul funzionamento molecolare di questa classe di trasportatori si basa su un meccanismo di accesso alternato, nel quale la proteina può assumere due diversi stati conformazionali. Questo processo è legato alla presenza o meno del substrato ed è accoppiato al passaggio transmembrana degli ioni sodio (Na^+), cloruro (Cl^-) e potassio (K^+) (Glatt e Reus, 2003; Murphy et al, 2004; Rudnick, 2006) (figura 4.2)

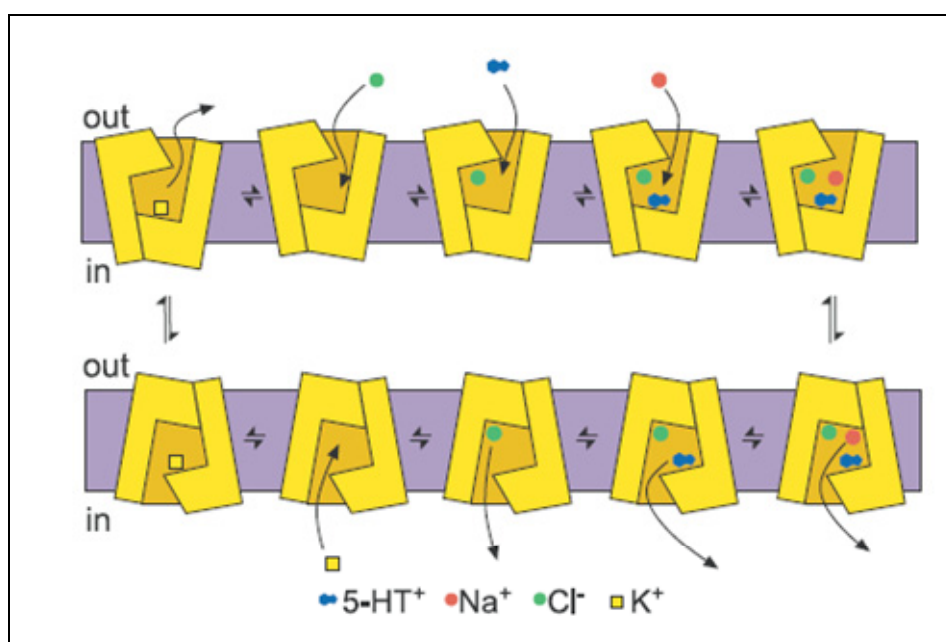


Figura 4.2 Meccanismo di trasporto della serotonina (da Rudnick, 2006)

Nel caso del SERT, la ricaptazione di 5-HT all'interno delle cellule si ritiene associata al cotrasporto di Na^+ e Cl^- e al controtrasporto di K^+ attraverso un meccanismo elettricamente neutro (Takeshi et al., 2002). Un singolo sito di

legame, accessibile dall'esterno della cellula, lega Na^+ , Cl^- e 5-HT simultaneamente, con una stechiometria di 1:1:1. Dopo la formazione del complesso quaternario avviene un cambiamento conformazionale del trasportatore; sul versante intracellulare della membrana, dove le concentrazioni di Na^+ e Cl^- sono basse, i due ioni vengono liberati, causando così una drastica riduzione dell'affinità del trasportatore per la serotonina e quindi il rilascio del mediatore all'interno della cellula (Rudnick e Clark, 1993; Rudnick, 1997, 2006). Dopo la dissociazione, rispettivamente, dello ione Na^+ , della serotonina e dello ione Cl^- , il trasportatore ritorna alla conformazione originale mediante l'intervento dello ione K^+ , che si lega al medesimo sito di legame, ed è nuovamente reso disponibile per il successivo ciclo di trasporto. (Chang, 1998; Rudnick, 1997). In questo processo un singolo sito di legame multifunzionale è quindi responsabile dei movimenti della serotonina e dei soluti attraverso la membrana; inoltre il trasporto SERT-mediato di queste sostanze dipende dal mantenimento di gradienti ionici attraverso la membrana ad opera della Na^+/K^+ ATPasi.

4.3. Meccanismi di regolazione

Il SERT è una proteina molto importante per il controllo della concentrazione extracellulare di 5-HT e, soprattutto, per lo spegnimento del segnale serotoninergico. Data l'ampia distribuzione e le molteplici funzioni mediate dal sistema serotoninergico, questo trasportatore presenta molti siti di regolazione ed è sottoposto all'azione di vari fattori per la modulazione della sua attività (Rudnick, 2006).

La N-glicosilazione del SERT sembra facilitare la ricaptazione di 5-HT perché induce un aumento dell'espressione della proteina sulla membrana plasmatica. Come accade per il trasportatore del GABA o della noradrenalina, anche il SERT, una volta glicosilato, viene traslocato sulla membrana cellulare (Qian et al., 1995; Melikian et al., 1996; Blakely et al., 1998).

La fosforilazione e defosforilazione di siti specifici del SERT svolgono un ruolo importante nel controllo della sua espressione. L'attivazione della PKC determina un decremento della ricaptazione di 5-HT, dovuto ad una internalizzazione del trasportatore. Questa *down-regulation* è caratterizzata dalla ridistribuzione del SERT dalla superficie cellulare a siti interni e non da una diminuzione dell'espressione genica. Il meccanismo e le proteine coinvolte in questi processi sono poco conosciuti. Due proteine importanti sono la proteina SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor*) sintassina 1A (Syn1A) e la protein fosfatasi 2A (PP2A) (Quick, 2003).

Syn1A è una proteina della membrana sinaptica coinvolta nel traffico e nella fusione delle vescicole e nella regolazione dei canali ionici (Sudhof, 1995; Naren et al., 1997; Bezprozvanny et al., 1995). Syn1A interagisce con il dominio citoplasmatico N-terminale del trasportatore del GABA (GAT) in modo dipendente da PKC e determina una down-regulation del GAT. Data la stretta correlazione tra GAT e SERT, anche per quest'ultimo è stato ipotizzato lo stesso meccanismo. Uno studio ha dimostrato che il dominio transmembrana 1 (TMH1) contribuisce al legame del SERT con Syn1A grazie a legami basati su interazioni idrofobiche. Esistono meccanismi sequenza-specifici per stabilizzare l'espressione del SERT nei sottodomini della membrana plasmatica e, da

evidenze ottenute nelle cellule cromaffini in vivo, questi meccanismi sembrano regolati da t-SNARE (Kannan et al., 1996). La co-localizzazione delle proteine t-SNARE e SERT, evidenziata nelle cellule cromaffini, riflette la partecipazione di questa proteina nei trasferimenti del SERT a sottodomini della membrana plasmatica o nella stabilizzazione del trasportatore una volta traslocato sulla membrana (Blakely et al., 1998).

In condizioni basali il SERT esiste come complesso con PP2A (figura 4.2). Quando il trasportatore e la proteina accessoria vengono fosforilate, PP2A si dissocia dal complesso e la concentrazione del trasportatore espresso sulla membrana cellulare diminuisce. E' stato dimostrato che l'inibitore della PP2A, acido okadaico, riduce l'attività di trasporto di 5-HT e potenzia la fosforilazione del SERT, evidenziando il fatto che l'attivazione di PKC e l'inibizione di PP2A sommano i loro effetti. E' stato ipotizzato un modello per la regolazione dell'espressione e della funzione del SERT: il trasportatore è localizzato, grazie al legame con le specifiche proteine t-SNARE sintassina o SNAP-25, in specifici sottodomini della membrana plasmatica. Questa associazione aiuta a localizzare il SERT nei siti ideali per il *reuptake* ottimale della 5-HT. Analogamente ai canali al calcio voltaggio-dipendenti, questi legami sono metastabili e vengono influenzati da protein chinasi. Una volta fosforilato, il trasportatore viene riconosciuto da Proteine Associate al Trasportatore (TAP) che ne assicurano l'endocitosi (Ferguson et al., 1996). Una volta che il SERT viene internalizzato, le TAP si dissociano e permettono l'azione di fosfatasi quali PP2A. La defosforilazione permette al SERT di riassociarsi con proteine vescicolari e di tornare sulla membrana plasmatica in forma attiva (Blakely et al., 1998). Il

substrato stesso del trasportatore, 5-HT, è coinvolto nella sua regolazione. Quando la concentrazione di 5-HT extracellulare è elevata il trasportatore non risponde alla fosforilazione mediata da PKC, non entra nel meccanismo endocitotico sopra menzionato e la concentrazione della proteina rimane elevata. L'organismo, per mantenere il controllo dell'omeostasi, impedisce una *down-regulation* del SERT quando la concentrazione di 5-HT extracellulare è elevata (Steiner et al. 2008).

Altri substrati del SERT, quali le amfetamine e la fenfluramina, hanno mostrato di inibire la fosforilazione del SERT indotta da forbole miristato acetato (PMA), attivatore di PKC. Infine i farmaci inibitori del SERT, quali, paroxetina e citalopram, gli antidepressivi triciclici e la cocaina inibiscono questo meccanismo (Robinson, 2002).

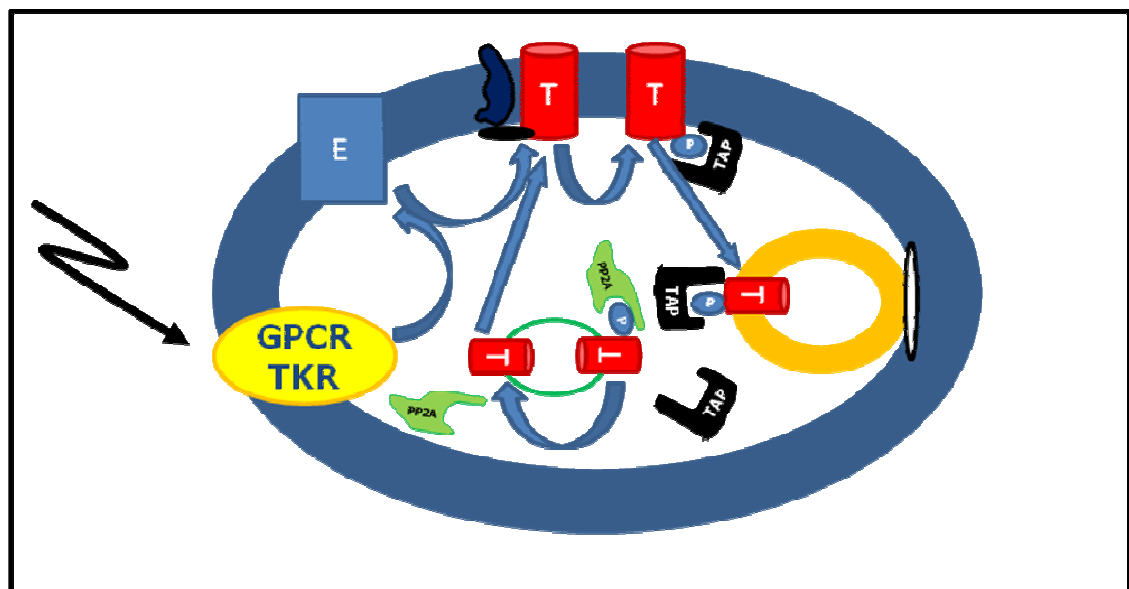


Figura 4.2 Regolazione dell'espressione del SERT sulla membrana cellulare (da Blakely et al, 1998)

4. 4. Distribuzione

Il SERT è distribuito in molteplici siti dell'organismo sia a livello centrale che periferico. Nel 1976 Gripenberg individuò questa proteina sulla membrana delle cellule mastocitarie a livello intestinale. Studi successivi l'hanno identificata sulla membrana dei neuroni serotoninergici enterici, e in alta concentrazione sulle cellule EC (Wade et al., 1996). Il SERT è stato evidenziato inoltre sulla membrana piastrinica (Rudnick, 1977; Qian et al., 1995), nel polmone (Qian et al., 1995) e nella placenta (Cool et al., 1990; Ramamoorthy et al., 1993b).

Uno studio condotto da Duncan et al. (1992) ha evidenziato che la distribuzione della proteina nell'ipotalamo, nell'ippocampo e nell'amigdala umana è simile a quella del ratto. Il trasportatore è localizzato soprattutto nei neuroni del nucleo dorsale del rafe, del nucleo basolaterale dell'amigdala e del fascio mediale del proencefalo. Inoltre un'alta densità di SERT si trova anche in molti nuclei del talamo, nell'area dorsale e dorsomediale dei nuclei dell'ipotalamo, nei nuclei del medio rafe, nella porzione reticolata della sostanza nigra e a livello del ponte nella formazione pigmentata del IV ventricolo cerebrale. Il SERT è stato identificato anche a livello dei gangli basali, dell'ippocampo, del lobo temporale, della corteccia peririnale ed entorinale e sulla corteccia frontale (Hrdina et al, 1990).

Il SERT è localizzato a livello delle giunzioni sinaptiche, su protuberanze assonali, dette varicosità, e sui corpi cellulari e somatodendridici dei neuroni cerebrali. Alcuni autori hanno evidenziato la presenza del SERT a livello perisinaptico, in prossimità del vallo; questa evidenza ha fatto ipotizzare che la

serotonina possa superare l'area del vallo sinaptico, fino a raggiungere proteine trasportatrici più distanti situate lungo l'assone (Zhou et al., 1998).

5. Il gene SERT

I trasportatori per la serotonina (SERT), la dopamina (DAT) e la noradrenalina (NET) sono proteine strutturalmente simili codificate ciascuna da un unico gene:

- SLC6A4, localizzato sul cromosoma umano 17, codifica per il SERT, a livello sia centrale che periferico (Lesch et al., 1993);
- SLC6A3, localizzato sul cromosoma umano 5, codifica per il DAT;
- SLC6A2, localizzato sul cromosoma umano 16, codifica per il NET (Glatt & Reus, 2003).

5.1. Struttura molecolare

Il gene *SERT* umano (figura 5.1) è composto da 14 esoni di 31 kb circa. Il primo segmento presenta due varianti dell'esone 1 e codifica un pre-mRNA che successivamente può subire due *splicing* alternativi, con formazione di due diverse specie molecolari di mRNA finale (Bradley and Blakely 1997). Dopo il primo introne, il gene è caratterizzato dall'alternarsi di 13 esoni e 12 introni (Colucci et al. 2008).

La sequenza esone-introne del gene SERT è estremamente simile a quella del gene *GABA T* che codifica per il trasportatore dell'acido γ -amminobutirrico. Questa evidenza concorda con l'ipotesi di un'origine

filogenetica comune nei mammiferi dei geni che codificano per i trasportatori degli aminoacidi e delle amine biogene. La sequenza del gene SLC6A4 è stata determinata e depositata nell'archivio EMBL/GenBank, con n° accesso da X76753 a X76762 (Lesch et al., 1994).

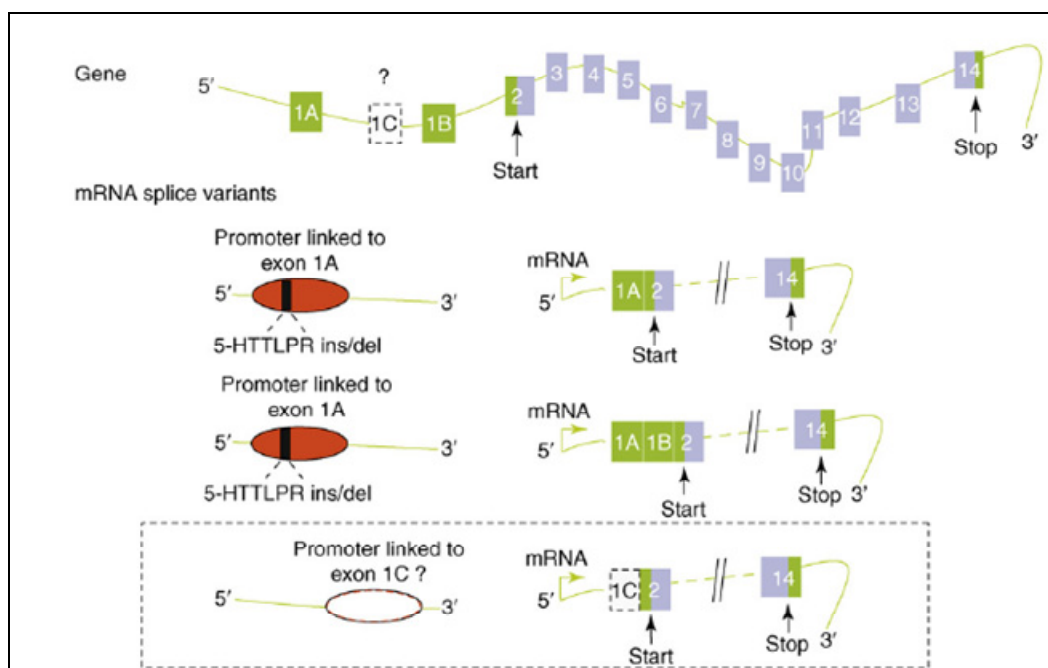


Figura 5.1: Rappresentazione schematica della struttura molecolare del gene SERT nell'uomo (da Colucci et al., 2008)

Nella regione *promoter* il gene presenta diverse sequenze importanti: l'elemento TATA, il sito di legame per la polimerasi 1A, e l'elemento responsivo all'azione di AMP ciclico, denominato CRE (Lesch et al., 1994). Il primo introne è localizzato a monte del codone d'inizio ATG situato all'interno dell'esone 2.

L'esone 1 è rappresentato da due sequenze alternative: esone 1A, costituito da 63 bp e localizzato circa 15 kb a monte dell'esone 2; esone 1B, costituito da 97 bp e localizzato circa 737 bp a monte dell'esone 2 e 14 kb a valle dell'esone 1A (figura 5.1). Sulla base di studi effettuati sul ratto e a

causa della similitudine riscontrata tra il gene *SERT* murino e quello umano, è stata ipotizzata nell'uomo l'esistenza dell'esone 1C, costituito da 101 bp e localizzato 12,3 kb a valle dell'esone 1A (figura 5.1) (Colucci et al., 2008).

Nell'uomo le varianti mRNA di splicing fino ad oggi identificate sono 2 (Bradley and Blakely, 1997), derivanti dall'assemblamento degli esoni 1A+2 o 1A+1B+2, mentre la variante 1B+2 non è mai stata identificata. Tuttavia un recente studio di Gill et al. (2008), condotto nell'intestino di soggetti umani sani, ha evidenziato l'esistenza di 3 differenti mRNA, sostenendo l'ipotesi che il gene SERT abbia la capacità di generare più di due varianti di mRNA.

Nel ratto, le varianti fino ad oggi identificate sono tre (figura 5.2), costituite dagli assemblamenti degli esoni 1A+2, 1A+1B+2, oppure 1C+2. La trascrizione delle prime 2 varianti sembra dipendere dallo stesso *promoter*, mentre la terza dipende da una sequenza *promoter* diversa. La variante di mRNA con esoni 1A+2 è espressa in modo prevalente nel SNC e nella midollare del surrene del ratto adulto, mentre risulta in concentrazione uguale all'mRNA della variante 1A+1B nello stomaco, nel cuore e nella placenta. La variante 1C è espressa in concentrazioni elevate nell'intestino ed in misura minore nel cuore (Bradley e Blakely, 1997). Data l'omologia di sequenza dell'esone 1C del ratto con una regione del gene umano situata a monte dell'esone 1B, è stata ipotizzata l'esistenza di un esone 1C anche nell'uomo. L'ipotesi, se confermata, potrebbe fornire le basi per interpretare il ruolo svolto dal SERT nella fisiologia dell'intestino umano e nella fisiopatologia di alcuni disturbi intestinali funzionali come l'IBS (Colucci et al., 2008).

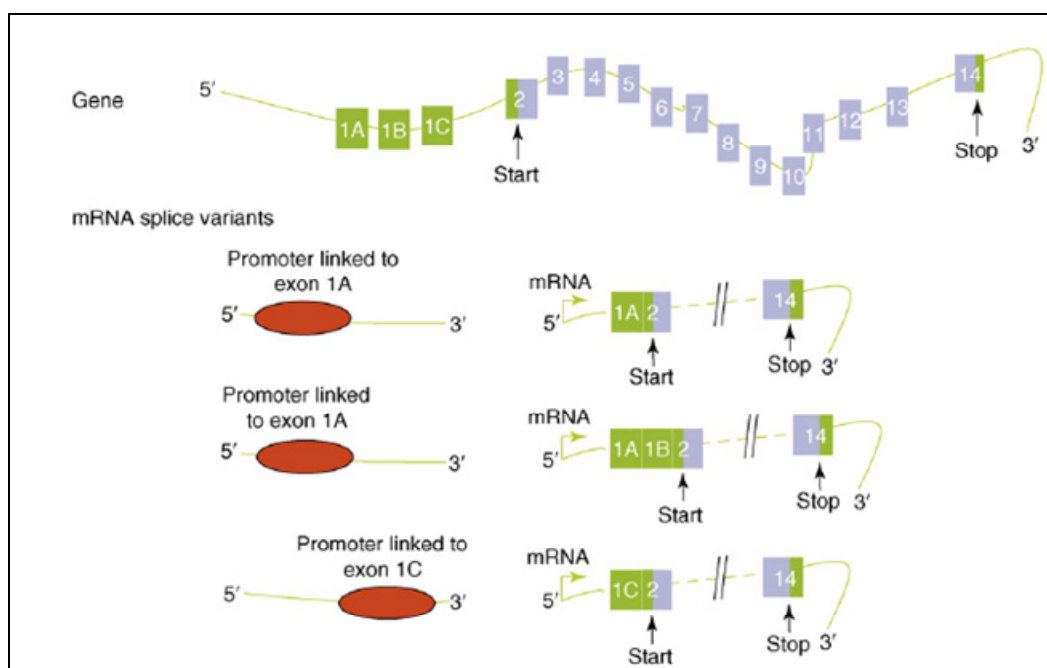


Figura 5.2: Rappresentazione schematica della struttura molecolare del gene SERT nel ratto (da Colucci et al., 2008).

Sequenze *promoter* alternative in combinazione con siti di *splicing* variabili tessuto-specifici e con differenti siti di poliadenilazione, trovati in diversi mRNA, partecipano alla regolazione dell'espressione del SERT nel ratto (Bradley e Blakely, 1997), nel topo e presumibilmente anche nell'uomo (Ozsarac et al., 2002).

5.2. Polimorfismi

Sono definiti polimorfismi piccole variazioni di basi nucleotidiche nella sequenza del DNA genomico. Dati i diversi ruoli funzionali svolti dalla 5-HT, e data l'importanza della sua ricaptazione, il gene che codifica per il *SERT* è stato

oggetto di molti studi dedicati all'identificazione e caratterizzazione dei suoi polimorfismi.

Il gene *SERT*, presenta diversi tipi di polimorfismi:

- ✓ polimorfismi con mutazione della sequenza codificante per la proteina;
- ✓ polimorfismi sinonimi;
- ✓ polimorfismi regolatori (Glatt e Reus, 2003).

Polimorfismi codificanti. Le mutazioni di questo tipo determinano la variazione del codice genetico che si traduce in un cambiamento di aminoacidi nella sequenza della proteina codificata dal gene (tabella 5.1).

Tabella 5.1 Elenco dei polimorfismi strutturali del gene *SERT*

Sequenza SLC6A4	Frequenza (%)	Aminoacidi sostituiti	Esone ^a
GATGGAGACC [A/G] ^b CGCCCTTGAA	<1	Thr/Ala	2
CCTGGTGCGG [G/C] AGATGACACA	<5	Gly/Ala	2
TTACTTCTCC [G/A] AGGACAACAT	<1	Glu/Lys	4
ATCATCCTTT [C/T] TGTCCTGCTG	<1	Ser/Phe	6
TCTCTTGGTC [C/T] GGGCTTTGGG	<1	Pro/Leu	7
CAGAGATGCC [C/A] TGGTGACCAG	<1	Leu/Met	8
TTTCTTTGCC [A/G] TCATCTTCTT	<1	Ile/Val	9
GGACATTTAA [A/C] GAGGTACGTG	<1	Lys/Asp	13
AACAGAAATT[C/T] CTTGTGGGGA	<1	Pro/Ser	14

a) Il numero dell'esone si riferisce a quello riportato in letteratura prima dell'identificazione dell'esone 1b. b) Il primo nucleotide, in parentesi, è l'allele maggiore (non mutato), il secondo, l'allele minore (mutato).

Questi cambiamenti possono determinare, a loro volta, alterazioni della funzionalità della proteina. Generalmente la frequenza di questi polimorfismi nella popolazione si mantiene inferiore all'1% (Leabman et al., 2003). Un esempio di polimorfismi codificanti è rappresentato dalle mutazioni Pro339Leu e Ile425Val che hanno mostrato di influenzare l'attività di ricaptazione del SERT, diminuendola e aumentandola rispettivamente (Murphy et al., 2008).

Polimorfismi sinonimi. Il gene *SERT* presenta un certo numero di polimorfismi a singoli nucleotidi (SNP), relativamente comuni, localizzati nella sequenza codificante, che non portano a cambiamenti di aminoacidi, ma che invece possono influenzare l'espressione della proteina trasportatrice attraverso un'alterazione di stabilità dell'mRNA o dell'efficienza del processo di traslazione (Duan et al., 2003). Questi polimorfismi, poiché potenzialmente responsabili di modificazioni funzionali, sono oggetto di studi di associazione genetica, come ad esempio con l'IBS (Yeo et al., 2004, Park et al. 2006), oppure vengono utilizzati come marcatori per studi di associazione con tratti fenotipici correlati al comportamento (Risch, 2000; Hahn et al., 2002).

Polimorfismi regolatori. Sono noti polimorfismi funzionali che regolano il livello di espressione dei geni. A differenza delle varianti descritte in precedenza, queste ultime possono essere riscontrate con maggior frequenza.

La regione *promoter* del gene *SERT* presenta una sequenza di 20-23 bp che viene ripetuta in tandem da 14 a 22 volte, questo polimorfismo è stato denominato "Serotonin Transporter Length Polymorphic Region" (5HTTLPR) (Figura 5.3). Gli alleli più frequenti contengono 14 o 16 ripetizioni e prendono il nome rispettivamente di allele corto (S) e lungo (L) 5HTTLPR. L'allele L si

comporta da allele dominante (Lesch et al., 1998; Heils et al., 1997). E' stato dimostrato che la variante L potenzia l'espressione di SERT in vitro di 3-5 volte. Infatti, l'mRNA del SERT nei linfoblasti di individui con genotipo L/L ha una concentrazione più elevata rispetto a quelli con alleli S/S o S/L (Lesch et al., 1996). La variante S è stata associata ad una ridotta trascrizione del gene SERT. Oltre ai 2 alleli predominanti L ed S, sono state identificate altre varianti con 15, 18, 19, 20, 21 o 22 ripetizioni. Tuttavia la frequenza con la quale si riscontrano questi alleli è molto bassa per cui non sono stati condotti studi di approfondimento sulle possibili conseguenze funzionali di queste varianti (Delbruck et al., 1997; Michaelovsky et al., 1999; Nakamura et al., 2000).



Figura 5.3: Rappresentazione schematica del regione promoter del gene SERT e delle varianti alleliche risultanti dal polimorfismo *5HTTLPR* (da Colucci et al., 2008).

Una delezione di 380 bp, localizzata tra 5HTTLPR e il sito d'inizio della trascrizione, poco frequente, è implicata nella variabilità dell'espressione tissutale e cellulare del SERT. Questo polimorfismo sembra coinvolto nell'espressione del SERT tramite meccanismi che agiscono in sinergia con processi di regolazione 5HTTLPR-dipendenti (Flattem et al., 2000; Mortensen et al., 1999; Lesch et al., 1999).

Un altro polimorfismo noto del gene *SERT* è costituito da un numero variabile di ripetizioni in tandem (VNTR) nell'introne 3, prima del sito di legame per la polimerasi A1. La sequenza GGCTGTGACCCGAGGTG, costituita da 17 bp, può essere ripetuta per 9 (STin2*9), 10 (STin2*10) o 12 (STin2*12) volte (tabella 5.2). La nomenclatura fa riferimento all'introne 2 perché la scoperta di questo polimorfismo è precedente alla scoperta dell'esone 1B di cui si è parlato nel paragrafo precedente, e per comodità gli studiosi hanno convenuto che rimanesse invariata (Lesch et al., 1994; Bradley et al., 1997). E' stato dimostrato che le varianti STin2 possono influire sull'attività trascrizionale del gene *SERT* negli embrioni di topi transgenici. Questa osservazione ha fatto supporre che tali varianti possano influire anche sulla trascrizione del gene *SERT* umano nel SNC sia in fase di sviluppo che nell'individuo adulto (MacKenzie et al., 1999). Gli alleli STin2*10 e STin2*12 agiscono come regolatori trascrizionali; il secondo sembra conferire una maggiore attività trascrizionale rispetto al primo (Fiskerstrand et al., 1999).

Tabella 5.2 Elenco dei polimorfismi regolatori del gene *SERT*

Polimorfismo	N° accesso GenBank	Posizione nella sequenza	Localizzazione gene <i>SERT</i>	Alleli
5HTTLPR	X76753	bp 1826-1869	Promotore	Short=S Long=L
STin2	X76754	bp 843-1012	Introne 2	9,10,12 ripetizioni

Un quarto polimorfismo è stato identificato anche nel segnale di poliadenilazione del gene *SERT*. Il possibile significato funzionale di questo polimorfismo non è stato chiarito. Tuttavia sembra che esso influenzi l'espressione del gene *SERT* interferendo con i processi di riarrangiamento post-trascrizionali (Battersby et al., 1999).

5.3. Frequenza del polimorfismo 5HTTLPR in diverse etnie

La frequenza del polimorfismo 5HTTLPR del gene *SERT* varia nelle diverse popolazioni: nello stato di Mbuti nell'Africa sub-sahariana predomina la variante allelica L, con 16 ripetizioni nella sequenza *promoter*; nella popolazione cinese sono più comuni gli alleli S (Gelernter et al., 1997). Gli studi su altre popolazioni hanno riportato distribuzioni intermedie. Nel 2001, Lotrich et al. hanno dimostrato che l'allele L è presente nell'83-89% della popolazione africana, nel 50-59% degli europei e nel 29-33% della popolazione asiatica. Il 32% della popolazione americana ed europea presenta il genotipo L/L, il 49% L/S e solo il 19% presenta il genotipo S/S (Murphy et al., 2004). Negli asiatici la frequenza del genotipo S/S risulta più del doppio rispetto alla popolazione caucasica (Delbruck et al., 1997; Gelernter et al., 1997). La distribuzione

variabile degli alleli 5HTTLPR nelle diverse popolazioni aumenta la possibilità di associazioni erranee di questo polimorfismo con varie patologie o con l'efficacia terapeutica di farmaci attivi sul sistema della 5-HT.

5.4. Polimorfismo 5-HTTLPR e stati patologici

Differenze nell'espressione e nella funzione del SERT sono state associate al comportamento aggressivo e impulsivo, ai disturbi ossessivo-compulsivi, ai disturbi bipolari, agli attacchi di panico e alla depressione (Lesch, 1996; Lotrich et al., 2001).

Il SERT è il bersaglio primario e spesso selettivo di molti farmaci antidepressivi e il gene *SERT* sembra essere coinvolto nella patogenesi dei disturbi dell'umore. Tuttavia, studi condotti sul possibile ruolo dei polimorfismi del SERT nell'insorgenza della depressione maggiore e nei disturbi bipolari hanno riportato risultati contrastanti. Per quanto riguarda i disturbi dell'umore le prime ricerche hanno individuato un'associazione positiva con i polimorfismi 5HTTLPR e STin2, mentre quelli più recenti non hanno confermato questi risultati. Una recente meta-analisi ha tuttavia confermato un'associazione del polimorfismo 5HTTLPR del SERT con il disturbo bipolare (Cho et al., 2005).

L'allele S del polimorfismo 5HTTLPR è più frequente nei pazienti che soffrono di disturbi bipolari e di disturbi dell'umore bipolari-unipolari rispetto ai controlli sani. Per il polimorfismo STin2, gli individui che presentano l'allele con 9 ripetizioni sono risultati maggiormente suscettibili alla depressione unipolare maggiore, quelli con 10 ripetizioni sono a rischio di depressione

maggiore atipica, mentre l'allele STin2*12 aumenta il rischio di incidenza dei disturbi bipolari (Ogilvie et al., 1996; Coyle et al., 2000; Kirov et al., 1999).

L'aggressività e il comportamento suicida sono stati associati a bassi livelli di trasmissione serotoninergica. Infatti gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) si sono dimostrati efficaci nel contrastare questi comportamenti (Coccaro et al., 1997; Verkes et al., 1998). Studi recenti hanno dimostrato un'associazione tra questi tipi di comportamento e il polimorfismo 5HTTLPR. In particolare la frequenza della variante allelica S è sensibilmente più elevata nei casi di suicidio rispetto al gruppo di controllo (Gorwood et al., 2000; Bellivier et al., 2000).

Dati ottenuti da studi preclinici e clinici mostrano che la 5-HT è coinvolta nella regolazione dell'ansia. Questo ha portato a studiare le associazioni tra i polimorfismi del gene *SERT* e i tratti di personalità ansiosa, con risultati contrastanti (Flory et al., 1999). Il legame tra il polimorfismo STin2 e il tratto ansioso è risultato significativo soltanto in uno studio, che evidenzia un'associazione tra la predominanza della variante allelica STin2*12 e l'ansia (Greenberg et al., 2000).

Determinazioni quantitative post-mortem sull'encefalo di individui affetti da schizofrenia hanno evidenziato una marcata diminuzione della ricaptazione di 5-HT e un'elevata concentrazione di mRNA codificante per il SERT (Naylor et al., 1996; Hernandez et al., 1997). Un altro studio ha suggerito una possibile relazione tra l'allele L di 5-HTTLPR e la psicosi schizofrenica, ma altre ricerche non hanno confermato questa associazione. La presenza dell'allele STin2*9

raddoppia il rischio di sviluppare schizofrenia paranoide (Serretti et al., 2002a; Stober et al., 1998; Tsai et al., 2000; Kaiser et al., 2001).

Pazienti affetti dalla sindrome di Alzheimer presentano un'anomalia del sistema serotoninergico. I primi tre studi effettuati sull'associazione tra i polimorfismi del SERT e la patogenesi di questa patologia evidenziarono un collegamento tra la variante S del polimorfismo 5HTTLPR e l'inizio lento della sindrome. Tuttavia, indagini eseguite successivamente non hanno confermato questi risultati (Meneses et al., 1999; Meltzer et al., 1998; Takeshi et al., 2002).

Molti studi hanno osservato una predominanza dell'allele S negli alcolisti rispetto alla popolazione normale. Ulteriori indagini hanno confermato che l'allele S è associato all'alcolismo con comportamento violento, sebbene altre ricerche non abbiano confermato questa relazione (Lotrich et al., 2001).

Individui con tratti nevrotici hanno una maggiore probabilità di diventare dipendenti dalla nicotina e maggiori difficoltà a smettere: il rapporto tra il vizio del fumo e il polimorfismo 5HTTLPR è uguale a quello esistente con i tratti nevrotici della personalità (Gilbert et al., 1995). Tuttavia Hu et al. (2000) hanno ottenuto dati che sono in parziale disaccordo con queste osservazioni e suggeriscono che individui con genotipo S/S e un carattere marcatamente nevrotico presentano un rischio elevato di diventare dipendenti e maggiori difficoltà nello smettere di fumare.

Livelli elevati di 5-HT sono stati riscontrati nel 30-50% dei pazienti autistici (Anderson et al., 1990). Gli studi che hanno indagato sui polimorfismi del gene SERT in relazione a questa patologia hanno ottenuto risultati contrastanti. Dei tre studi disponibili, due associano la patologia alla variante L,

mentre il terzo la associa alla variante S (Yirmiya et al., 2001; Maestrini et al., 1999; Persico et al., 2000).

L'ipertensione polmonare primitiva (PPH) è una patologia molto grave caratterizzata da un incremento della pressione associata a una anormale proliferazione vascolare nel sistema delle arterie polmonari. La 5-HT è un potente induttore della proliferazione delle cellule della muscolatura liscia dei vasi polmonari e il suo effetto è controllato dalla ricaptazione cellulare tramite il SERT. Individui con PPH mostrano una frequenza maggiore del genotipo L/L rispetto ai controlli, insieme con una maggiore concentrazione di mRNA del SERT, una maggiore immunoreattività della proteina SERT nel tessuto polmonare, e una maggiore ricaptazione della 5-HT nelle piastrine (Eddahibi et al., 2001).

Due studi condotti su 976 pazienti con infarto miocardico e 926 soggetti sani hanno evidenziato che l'incidenza del genotipo L/L è maggiore nei pazienti rispetto ai controlli (Fumeron et al., 2002; Coto et al., 2003). Uno studio successivo, condotto su oltre 5000 individui, ha confermato questi risultati e ha evidenziato che gli individui con il genotipo L/L sono maggiormente a rischio d'infarto (Sauer et al., 2003).

6. Modulazione farmacologica del SERT

6.1. Farmaci inibitori

I farmaci inibitori selettivi della ricaptazione della 5-HT (SSRI), in grado di inibire selettivamente il SERT, comprendono fluoxetina, fluvoxamina,

paroxetina, sertralina, citalopram ed escitalopram. Gli antidepressivi triciclici rappresentano un'altra classe di farmaci inibitori della ricaptazione della 5-HT dotati di minore selettività; fra questi clomipramina è il farmaco che mostra una maggiore affinità per il SERT (Tabella 6.1).

Tabella 6.1. Profili di affinità di alcuni farmaci attivi sul SERT

<i>Classe chimica</i>	<i>Nome</i>	SERT (K_d)
<i>Arilossipropanamina</i>	<i>Paroxetina</i>	0,125
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Clomipramina</i>	0,280
<i>Benzilamina</i>	<i>Sertralina</i>	0,293
<i>Arilossipropanamina</i>	<i>Fluoxetina</i>	0,81
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Citalopram</i>	1,16
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Imipramina</i>	1,41
<i>Antidepressivi atipici</i>	<i>Fluvoxamina</i>	2,22
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Amitriptilina</i>	4,33
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Nor₁-citalopram</i>	7,40
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Dotiepina</i>	8,33
<i>Benzilamina</i>	<i>Venlafaxina</i>	9,10
<i>Arilossipropanamina</i>	<i>Tomoxetina</i>	9,10
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Desipramina</i>	17,5
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Nortriptilina</i>	18,5
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Nor₂-citalopram</i>	24,0
<i>Arilossipropanamina</i>	<i>Norfluoxetina</i>	25,0
<i>Arilossipropanamina</i>	<i>Reboxetina</i>	58,8
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Doxepina</i>	66,7
<i>Benzilamina</i>	<i>Norsertralina</i>	76
<i>Antidepressivi atipici</i>	<i>Trazodone</i>	160
<i>Antidepressivi atipici</i>	<i>Nefazodone</i>	200
<i>Antidepressivi triciclici</i>	<i>Trimipramina</i>	1500

Nei paragrafi precedenti è stato menzionato il fatto che ad una ridotta funzionalità del SERT, riscontrabile in individui con genotipo S/S, può corrispondere un aumento del rischio di sviluppare alcune malattie psichiatriche. Questo dato sembra contrastare con l'uso terapeutico degli inibitori della

ricaptazione della 5-HT (SRI). Tuttavia, la contraddizione è solo apparente, e una possibile spiegazione può dipendere dalla complessità dei meccanismi di autoregolazione del sistema serotoninergico a livello delle sinapsi sia centrali che periferiche (Routledge and Middlemiss, 1996).

Le terapie antidepressive e dei maggiori disturbi d'ansia si basano sulla somministrazione di farmaci SSRI, SNRI (inibitori della ricaptazione di 5-HT e noradrenalina) e antidepressivi triciclici. Nei pazienti affetti da disturbi ossessivo-compulsivi o da autismo viene riscontrato un effetto benefico solo dopo la terapia con SSRI o clomipramina (McDougle et al., 1998; Blier e de Montigny, 1998).

Un'unica somministrazione di farmaci SSRI induce risposte biologiche minime, mentre è richiesto un periodo di somministrazione di 3-6 settimane affinché questi farmaci svolgano effettivamente un'azione antidepressiva ed abbiano effetti benefici contro l'ansia, gli attacchi di panico-agorafobia, la fobia sociale ed altre fobie. Una terapia più prolungata, della durata di 10-12 settimane o più, e dosi maggiori, sono necessarie per ottenere risposte terapeutiche nei disturbi ossessivo-compulsivi (Taylor, 1998; Manji, et al., 2003). I farmaci SSRI, a causa dell'incremento di stimolazione dei recettori 5-HT₃, presentano effetti collaterali a carico del sistema gastrointestinale (nausea e vomito) e del sistema sessuale (ritardo nella comparsa dell'orgasmo).

Gli antidepressivi triciclici con gruppo aminico terziario, quali amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina e trimipramina, inibiscono il trasporto mediato sia da NET che da SERT, aumentando così la concentrazione dei neurotrasmettitori monoaminergici nel vallo sinaptico. I farmaci

antidepressivi triciclici vengono somministrati principalmente per via orale e la loro biodisponibilità è bassa a causa di un notevole metabolismo di primo passaggio. Gli effetti collaterali sono molteplici e possono essere gravi. Questi farmaci inducono sonnolenza, causano effetti simpaticomimetici, quali tremori e insonnia, e il loro legame con i recettori muscarinici provoca visione offuscata, stipsi e difficoltà nella minzione. A livello cardiovascolare provocano ipotensione ortostatica, disturbi nella conduzione elettrica e aritmie cardiache. Infine questi farmaci possono causare convulsioni, aumento dell'appetito e disfunzioni sessuali (Gillman, 2007).

Il trazodone e il nefazodone sono antidepressivi atipici di seconda generazione, con struttura eterociclica, che inibiscono la ricaptazione mediata sia da SERT che da NET. Essi presentano una bassa affinità per i recettori dell'istamina H_1 , muscarinici e per i recettori α e β -adrenergici. Gli effetti collaterali comprendono sonnolenza, vertigini, insonnia, nausea e agitazione.

Le amfetamine e la cocaina interagiscono con DAT, NET e SERT con affinità diverse: la cocaina è un inibitore competitivo relativamente selettivo per DAT, le amfetamine vengono captate da DAT e NET e potenziano la liberazione dei neurotrasmettitori; la 3,4 metilendiossinmetamfetamina (detta ecstasy o MDMA) mostra il medesimo meccanismo d'azione delle amfetamine ma possiede una maggior affinità per il SERT (Glatt e Reus, 2003).

6.2. Polimorfismi del SERT e risposta ai farmaci

Sulla base di considerazioni teoriche è stata prevista una complessa interazione tra il polimorfismo del SERT e la risposta ai farmaci (Catalano,

1999). Una predisposizione genetica, sostenuta da una variazione allelica, può aumentare la suscettibilità degli individui a disturbi ansiosi e depressivi e può portare alla perdita di una risposta favorevole agli antidepressivi nei pazienti affetti da disturbi dell'umore.

L'associazione tra il polimorfismo del SERT e le risposte ai farmaci inibitori del trasportatore sono state oggetto di numerose indagini. Sette di nove studi effettuati su un totale di 877 individui riportano che i pazienti, affetti da depressione unipolare, bipolare e psicotica, con genotipo L/L rispondono meglio alla terapia antidepressiva basata sulla somministrazione di fluvoxamina, fluoxetina, paroxetina e citalopram (Nakamura et al., 1999), mentre gli altri due studi, condotti su pazienti giapponesi e coreani, riportano risultati opposti. Una spiegazione per questa discrepanza sembra dipendere dalla percentuale notevolmente bassa di genotipi L/L presenti nella popolazione asiatica presa in esame negli ultimi due studi (Serretti et al., 2002; Kim et al., 2000; Yoshida et al., 2002).

Due studi condotti su pazienti affetti da disturbi ossessivo-compulsivi non hanno evidenziato associazioni tra il polimorfismo del SERT e la risposta ai farmaci usati per la terapia, quali SSRI e clomipramina (Billett et al., 1997; Di Bella et al., 2002).

Indagini sull'associazione tra i genotipi e gli effetti avversi indotti da farmaci inibitori del SERT hanno mostrato che individui con genotipo S/S, rispetto ad individui con genotipi S/L ed L/L, lamentavano insonnia con una frequenza 3.5 volte superiore, e uno stato di forte agitazione con una frequenza 9.5 volte superiore, ma non mostravano altri effetti collaterali quali nausea o

emicrania (Perlis et al., 2003). Individui con genotipo S/S, affetti da disturbo bipolare, presentavano un'incidenza di ipomania 5.3 volte maggiore rispetto a pazienti con altri genotipi durante la terapia con farmaci inibitori del SERT (Mundo et al., 2001). Infine i tentativi di suicidio, altro controverso ma possibile effetto collaterale di questi farmaci, sembrano associati al genotipo S/S o all'allele S (Anguelova et al., 2003).

Studi condotti su bambini ricoverati per gravi disturbi di ipermotilità ai quali era stato somministrato il derivato amfetaminico metilfenidato hanno mostrato risposte clinicamente scarse nei pazienti con genotipo L/L (Seeger et al., 2001).

SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE E SISTEMA SEROTONINERGICO

1. Motilità gastrointestinale e serotonina

Il controllo delle funzioni digestive è complesso e ad esso contribuiscono la muscolatura, sia circolare che longitudinale, il sistema nervoso enterico (SNE) e il sistema nervoso centrale (SNC) attraverso l'innervazione autonoma. L'attività motoria autonoma dell'intestino è costituita da due diversi profili di attività, il complesso motorio migrante (CMM), caratterizzato da 4 fasi che si ripetono ciclicamente, che interviene nel periodo interdigestivo e aiuta a rimuovere i residui presenti nel lume intestinale, e l'attività propulsiva intestinale. Il ciclo del CMM, nell'uomo e in tutti gli animali che si nutrono in maniera intermittente, viene interrotto dalla peristalsi postprandiale, che consiste in una serie di contrazioni ripetute ad alta frequenza, 12-15 al minuto, propagate per brevi segmenti del tubo intestinale (propulsive), oppure in contrazioni irregolari o non propagate (rimescolanti). Entrambi questi cicli contrattili sono sotto il controllo dominante del SNE, il quale programma l'attività ripetitiva del CMM e coordina i movimenti peristaltici o di rimescolamento in risposta ai segnali che provengono sia da stimoli locali che dal SNC (Kunze e Furness, 1999; Mawe et al., 2006; Gershon e Tack, 2007).

Gli eventi all'interno del lume intestinale stimolano i neuroni sensoriali della mucosa attraverso la liberazione di 5-HT dalle cellule EC, determinando l'attivazione coordinata della muscolatura liscia. Questa attività è controllata dai neuroni motori del plesso mienterico, i quali ricevono stimoli sia dagli

interneuroni ascendenti che discendenti. Il neurotrasmettitore principale dei motoneuroni eccitatori è l'ACh (acetilcolina) mentre il principale mediatore di quelli inibitori è il monossido d'azoto (NO). L'attività del motoneurone primario del plesso mioenterico, che una volta eccitato induce la contrazione della muscolatura liscia attraverso la liberazione di ACh, viene inibita da neuroni non-adrenergici non-colinergici (NANC) e dopaminergici e viene facilitata da neuroni colinergici. L'attività dei neuroni modulatori viene influenzata da vari neurotrasmettitori tra i quali la 5-HT, che si trova sia nelle cellule EC della mucosa, dove agisce come ormone paracrino, che nei neuroni del plesso mioenterico, dove agisce come neurotrasmettitore e promuove l'inizio del riflesso peristaltico tramite interazione con i recettori 5-HT_{1P}, 5-HT₃ e 5-HT₄ (Pan et al., 2000; Takaki et al., 1985; Grider et al., 1996,1998; Jin et al., 1999).

Le cellule EC, che agiscono come trasduttori sensoriali (Gershon e Tack, 2007; Rackè et al., 1996), rispondono a stimoli meccanici o a nutrienti come glucosio (Kim et al., 2001; Raybould et al., 2003) e molecole di acido grasso (Fukumoto et al., 2003) con la secrezione di 5-HT all'interno della parete intestinale (Yu et al., 2001). La 5-HT liberata attiva i recettori espressi sui nervi nella lamina propria e la sua azione viene terminata mediante la sua ricaptazione da parte del SERT espresso negli enterociti (figura 1.1) (Chen et al., 1998; Chen et al., 2001; Pan et al., 2000). Una parte della 5-HT liberata dalle cellule EC, tramite interazione con i recettori 5-HT_{1P}, attiva i neuroni afferenti primari intrinseci (IPAN) sottomucosi, mentre quella liberata dalle cellule EC e dai neuroni serotoninergici attiva il recettore 5-HT₄ (Gershon e Tack, 2007).

La stimolazione dei recettori 5-HT₄ promuove la liberazione di ACh e del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) dai neuroni IPAN sottomucosi attivati (Grider et al., 1996; Jin et al., 1999). Il potenziamento della liberazione presinaptica di ACh promuove una neurotrasmissione rapida mentre la liberazione di CGRP promuove una neurotrasmissione lenta a livello dei gangli enterici (figura 1.1) (Pan et al., 1994). La neurotrasmissione lenta CGRP-dipendente è necessaria per l'espansione dell'eccitazione all'interno del plesso sottomucoso. La stimolazione dei recettori 5-HT₄ potenzia inoltre la liberazione di ACh dai neuroni motori primari che attivano direttamente la muscolatura liscia (Craig et al., 1990a).

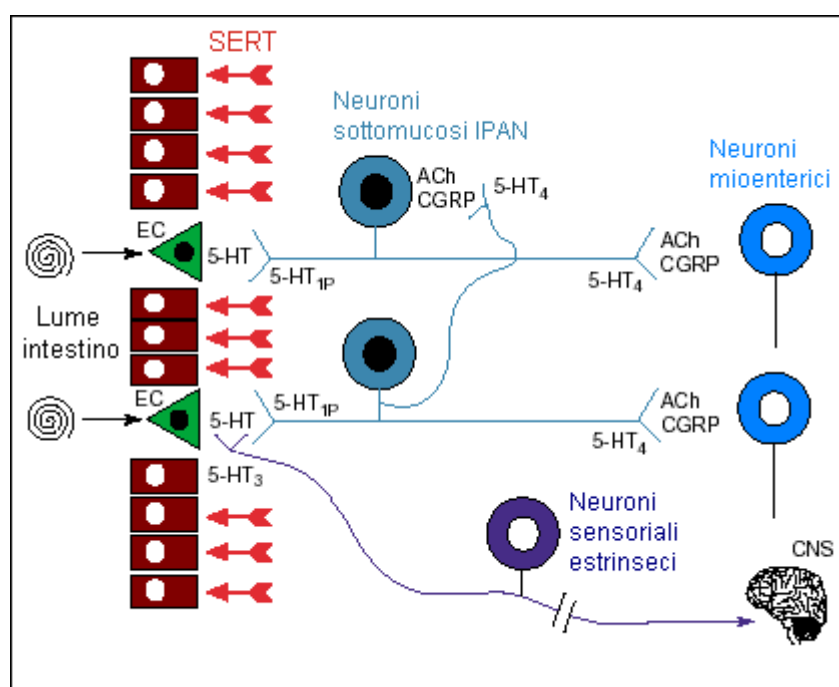


Figura 1.1 Rappresentazione schematica delle funzioni regolatorie svolte dal sistema serotoninergico nell'intestino (da Gershon e Tack, 2007)

I recettori 5-HT₃ attivano le fibre sensoriali estrinseche dei neuroni vagali e dei gangli spinali e sono responsabili della sensazione della nausea e della trasmissione dell'informazione nocicettiva al SNC. Inoltre, i recettori 5-HT₃ sono espressi a livello della mucosa intestinale nei neuroni IPAN mienterici (Bertrand et al., 2000) e all'interno del plesso enterico (Coates et al., 2003; Galligan et al., 2002) dove mediano l'insorgenza di potenziali post-sinaptici eccitatori rapidi e partecipano attivamente alla trasmissione serotoninergica nella via discendente del riflesso peristaltico intestinale (Monro et al., 2002).

Dopo aver espletato la sua azione sui neuroni IPAN e sui neuroni sensoriali estrinseci, la 5-HT viene ricaptata dal SERT espresso negli enterociti della mucosa. L'inibizione del SERT causa quindi un rapido potenziamento dei riflessi enterici (Wade et al., 1996) e un aumento pronunciato nel numero dei neuroni IPAN reclutati da uno stimolo di medesima potenza.

2. Sindrome dell'intestino irritabile

Il termine "sindrome dell'intestino irritabile" (IBS: *irritable bowel syndrome*) indica un insieme di alterazioni funzionali della motilità, della secrezione e della sensibilità gastrointestinale in cui il disturbo addominale e il dolore sono associati ad alterazioni delle abitudini intestinali (diarrea, costipazione o alternanza di diarrea e costipazione) o ad alterazioni dei processi di evacuazione (Videlock e Chang, 2007). Questa sindrome può manifestarsi come IBS con costipazione predominante (C-IBS), con diarrea predominante (D-IBS) oppure con alvo alternante (A-IBS).

IBS rappresenta la diagnosi più comune effettuata dai gastroenterologi (circa il 28% del totale) e colpisce una quota sostanziale, dal 10 al 20%, della popolazione adolescente e adulta in diverse regioni del mondo: Nord America, Europa, Cina e Giappone (De Ponti e Tonini, 2001; Johanson, 2004; Videlock e Chang, 2007). La sua incidenza risulta sensibilmente maggiore nei soggetti di sesso femminile, approssimativamente in rapporto di 2:1 rispetto a quelli di sesso maschile, sebbene l'entità della prevalenza sia variabile nelle diverse popolazioni (Videlock e Chang, 2007).

Per l'IBS non sono disponibili marcatori radiologici, biologici o endoscopici specifici, e la diagnosi viene quindi eseguita basandosi esclusivamente sui sintomi clinici. I criteri di Roma II, e più recentemente di Roma III, sono utilizzati per questo fine. Questi criteri valutano la presenza di dolori addominali cronici o ricorrenti e il cambiamento della frequenza e della consistenza delle feci, che risultino alterate per un periodo superiore a tre mesi in un anno in assenza di alterazioni organiche (Videlock e Chang, 2007). Un terzo degli individui affetti da questa patologia presenta la forma D-IBS e un terzo la forma C-IBS. La quota rimanente mostra sintomi alternanti non particolarmente gravi, ma lamenta dolore addominale frequente (Ragnarsson e Bodemar, 1999).

I pazienti con IBS vanno incontro a numerose visite specialistiche, e la sindrome spesso si associa a cefalea (23-45% dei casi), dolore alla schiena (27-81%), affaticamento (36-63%), dolori muscolari (29-36%) (Videlock e Chang, 2007). Nei pazienti con IBS la prevalenza di problemi psichiatrici concomitanti, quali ansia e depressione, risulta più elevata rispetto alla popolazione sana.

Fisiologicamente, il transito attraverso il colon e l'assorbimento di acqua determinano la consistenza delle feci, mentre la frequenza della defecazione dipende dal contributo di vari fattori, quali il contenuto rettale, la sensibilità rettale e il comportamento sociale e motivazionale (Azpiroz et al., 2002). Disturbi psicopatologici di natura ansiosa e/o depressiva possono quindi influenzare la gravità dei sintomi addominali nei pazienti affetti da IBS (Drossman et al., 1999).

La fisiopatologia dell'IBS e dei disturbi funzionali del tratto gastrointestinale ad essa correlati è multifattoriale e ad oggi compresa solo in parte. Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sul possibile ruolo svolto dal sistema serotoninergico nella fisiopatologia dell'IBS. Studi clinici hanno evidenziato un'alterazione della trasmissione serotoninergica in pazienti con disturbi funzionali dell'intestino, quali l'IBS, la costipazione cronica, la diarrea e la dispepsia funzionale. Alterazioni delle cellule enteroendocrine sono state osservate nella D-IBS con dolore addominale cronico (Spiller et al., 2000). Questi dati hanno portato a ipotizzare che alterazioni delle cellule EC siano implicate nella fisiopatologia dell'IBS. Il numero delle cellule EC sembra infatti ridotto in pazienti affetti da costipazione funzionale (El-Salhy et al., 1999) e differenze significative sono state osservate tra i pazienti affetti da D-IBS e C-IBS (Zhao et al., 2000; Baig et al., 2002).

La concentrazione di 5-HT riscontrata a livello della mucosa nei pazienti affetti da C-IBS e da D-IBS rispetto a quella presente nei volontari sani non risulta molto diversa, per cui è stata ipotizzata un'alterazione della sua liberazione a livello della sottomucosa (Miwa et al., 2001).

Le alterazioni della biosintesi, liberazione e ricaptazione di 5-HT potrebbero contribuire alle disfunzioni gastrointestinali e all'ipersensibilità sensoriale osservata in pazienti affetti da IBS (Hansen, 2003). La 5-HT, in seguito a stimoli locali o provenienti dal SNC, attiva infatti i circuiti neuronali enterici per dare inizio alla peristalsi e successivamente viene rimossa dallo spazio interstiziale ad opera del SERT. Una alterazione nella funzionalità di questa proteina determina un segnale serotoninergico alterato che potrebbe influenzare la sintomatologia gastrointestinale dell'IBS (Colucci et al., 2008).

Sintomi gastrointestinali e non, comunemente presenti in pazienti affetti da IBS, suggeriscono la presenza di alterazioni nelle comunicazioni tra intestino e cervello. Numerosi fattori, quali l'ansia, l'elevata incidenza di eventi psicosociali stressanti, l'aumentata risposta intestinale allo stress psichico e la risposta terapeutica a farmaci attivi sul SNC, suggeriscono un coinvolgimento del sistema limbico nella fisiopatologia dell'IBS (Merz, 2002). Infatti, mentre il SNE è indipendente dal SNC per la presenza nell'intestino dei neuroni IPAN, l'innervazione estrinseca è bidirezionale. Il SNC può, infatti, influenzare la funzione del SNE attraverso il sistema nervoso parasimpatico, e l'intestino può influenzare la funzione del SNC attraverso i neuroni sensori estrinseci, i cui corpi cellulari sono localizzati nei gangli dorsali e craniali.

La comunicazione bidirezionale può alterare le percezioni viscerali e le funzioni motorie digestive attraverso influenze del SNC sul SNE, simpatico e parasimpatico. La 5-HT è un mediatore importante nella modulazione della motilità gastrointestinale, della secrezione intestinale e della percezione del dolore, ed è coinvolta a più livelli nella comunicazione bidirezionale tra il SNC e

quello enterico. Per questi motivi è presumibile che alterazioni della trasmissione serotoninergica siano direttamente associabili a disturbi funzionali del tratto gastrointestinale e svolgano un ruolo significativo nelle alterazioni fisiopatologiche osservate nell'IBS (Baker, 2005).

I recettori serotoninergici presenti sia a livello centrale che intestinale, e che sono stati maggiormente caratterizzati negli studi che associano la 5-HT all'IBS, sono 5-HT₃ e 5-HT₄. Questi recettori sono coinvolti nella regolazione dei riflessi che controllano la motilità e la secrezione, e sembra che svolgano un ruolo importante anche nella percezione delle sensazioni gastrointestinali.

L'attivazione dei recettori 5-HT₃ e 5-HT₄ promuove il transito intestinale. Le secrezioni gastrointestinali vengono infatti modulate in maniera diretta per mezzo dei recettori 5-HT₄ negli enterociti, e in maniera indiretta per mezzo dei recettori 5-HT₃ espressi sui nervi secretori della mucosa e sulle afferenze vagali (Bardhan et al., 2000; Houghton et al., 2000).

Numerosi studi sono stati condotti con l'obiettivo di valutare l'efficacia di farmaci attivi sul sistema serotoninergico, ed in particolare sui recettori 5HT₃ e 5HT₄, nel trattamento dell'IBS e dei sintomi gastrointestinali ad essa correlati.

Il blocco del recettore 5-HT₃ con ondasetron o alosetron ritarda il transito colico sia nei pazienti affetti da D-IBS che nei controlli (Gore et al., 1990). Ondasetron aumenta la consistenza delle feci sia nei volontari sani che nei pazienti affetti da IBS e ritarda il transito attraverso il colon nei pazienti con D-IBS (Steadman et al., 1992; Goldberg et al., 1996). Alosetron, un antagonista 5-HT₃ potente e selettivo, ritarda il transito sia nei volontari sani che in individui con D-IBS (Houghton et al., 2000; Viramontes et al., 2001).

Studi condotti su modelli preclinici suggeriscono che farmaci antagonisti dei recettori 5-HT₄ possono indurre un rallentamento significativo del transito intestinale determinando un potenziale beneficio terapeutico nei pazienti affetti da D-IBS (Bharucha et al., 2000). Piboserod, un antagonista del recettore 5-HT₄, ha dimostrato effetti significativi nel trattamento della D-IBS (De Ponti e Tonini, 2001). Al contrario, gli agonisti 5-HT₄, come tegaserod e prucalopride, accelerano il transito gastrointestinale. Questi dati suggeriscono che gli antagonisti del recettore 5-HT₄ rallentano il transito intestinale mentre farmaci agonisti del recettore 5-HT₄ lo accelerano.

Una parte dei pazienti affetti da IBS mostra un'aumentata sensibilità viscerale o un'aumentata percezione della distensione intestinale. Whitehead et al. (1980) hanno dimostrato che i pazienti con IBS hanno una soglia del dolore significativamente più bassa rispetto ai controlli. Un'ipersensibilità alla distensione del colon-retto è stata osservata in individui affetti da D-IBS rispetto ai soggetti sani (Prior et al., 1990; Simrèn et al., 2001), mentre nei pazienti con C-IBS sono stati ottenuti risultati contraddittori (Slater et al., 1997; Harraf et al., 1998). Differenze significative nella soglia del dolore non sono tuttavia emerse dal confronto tra pazienti affetti da D-IBS e C-IBS (Steens et al., 2002).

La distensione intraluminale o l'irritazione promuovono la liberazione di 5-HT dalle cellule EC all'interno della mucosa. Il mediatore stimola i recettori 5-HT₃ e 5-HT₄ localizzati sui neuroni afferenti primari delle fibre vagali e splancniche, che mediano sia le risposte sensoriali che motorie. I segnali nocicettivi sono trasmessi dai visceri alle lamine specifiche del corno dorsale del midollo spinale. L'*input* sinaptico attiva neuroni di secondo ordine che portano

all'attivazione di specifiche aree cerebrali e talamiche, alla sensazione e percezione del dolore e, successivamente, a processi di valutazione e di discriminazione che avvengono a livello dei centri superiori. Le vie bulbospinali, attivate dalla nocicezione, mandano proiezioni discendenti dalla sostanza grigia periacqueduttale e dai neuroni del rafe ai neuroni nel corno dorsale, che inibiscono o facilitano il segnale nocicettivo. Le vie discendenti bulbospinali utilizzano trasmettitori serotoninergici, noradrenergici e oppioidi (Gershon e Tack, 2007).

Numerosi studi hanno dimostrato che antagonisti del recettore 5-HT₃ espresso sui neuroni post-sinaptici delle vie afferenti del sistema nervoso periferico modificano la sensazione viscerale, ma i meccanismi specifici coinvolti non sono stati chiariti (Kozlowski et al., 2000). Alosetron è stato l'unico antagonista del recettore 5-HT₃ ad essere approvato per il trattamento della D-IBS nelle donne poichè, oltre a rallentare il transito nell'intestino e nel colon, questo farmaco determina il blocco dei segnali sensoriali trasmessi dai neuroni afferenti. Tuttavia, nel 2000 alosetron è stato ritirato dal mercato americano a causa degli effetti collaterali gastrointestinali quali colite ischemica e costipazione ostinata, e successivamente reintrodotta con limitazioni sulla prescrizione (Videlock e Chang, 2007).

I recettori 5-HT₄ sembrano modulare il dolore proveniente dai visceri a livello della trasmissione nocicettiva. Studi recenti suggeriscono che tegaserod, agonista parziale del recettore 5-HT₄, inibisce direttamente le afferenze mecano-sensitive nei modelli animali, ma il meccanismo attraverso il quale il recettore 5-HT₄ o i suoi agonisti modulano la trasmissione nocicettiva non è

attualmente noto. È stato dimostrato che tegaserod induce una riduzione dose-dipendente della velocità di scarica dei neuroni spinali mecano-sensoriali nel gatto. Queste osservazioni suggeriscono che tegaserod potrebbe diminuire il dolore viscerale in pazienti con IBS. Tuttavia i dati riportati da indagini condotte sull'uomo sono insoddisfacenti. Gli autori suggeriscono che tegaserod riduce la sensibilità alla distensione rettale, ma che sono necessari ulteriori studi per confermare il ruolo degli agonisti del recettore 5-HT₄ nel controllo del dolore viscerale (Schikowski et al., 2002).