

Sostanze ad attività anticolinesterasica*

Palmer Taylor

La funzione di interruzione dell'attività dell'acetilcolina (ACh) svolta dall'acetilcolinesterasi (AChE) a livello di diverse sinapsi nervose colinergiche e dei rispettivi organi effettori o siti post-sinaptici è stata discussa nel Capitolo 8. I farmaci che inibiscono l'azione dell'AChE sono chiamati anticolinesterasici (anti-ChE). Essi provocano l'accumulo di ACh in prossimità delle terminazioni nervose colinergiche e quindi sono potenzialmente capaci di produrre effetti simili a quelli di un'eccessiva stimolazione dei recettori colinergici nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico. Data l'estesa distribuzione dei recettori colinergici nelle varie specie animali, non è sorprendente che gli anti-ChE abbiano avuto una vasta applicazione come agenti tossici, sia come insetticidi e pesticidi agricoli sia come "gas nervini" per la guerra chimica. Tuttavia, diversi composti di questa classe sono ampiamente usati come agenti terapeutici; altri, in grado di superare la barriera ematoencefalica, sono stati approvati o sono in sperimentazione clinica per la terapia della malattia di Alzheimer.

Nel periodo precedente la Seconda Guerra Mondiale, erano generalmente conosciuti soltanto gli agenti anti-ChE "reversibili", il cui prototipo è la fisostigmina. Poco prima della Seconda Guerra Mondiale e nel corso della stessa fu sviluppata una nuova classe di composti altamente tossici, detti organofosfati; questi furono dapprima utilizzati in agricoltura, come insetticidi, e più tardi nell'industria bellica come armi chimiche. L'elevata tossicità di questi composti è dovuta all'inattivazione "irreversibile" dell'AChE, che ne comporta la prolungata inibizione. Poiché le attività farmacologiche dei composti anti-ChE, sia reversibili sia irreversibili, sono qualitativamente simili, esse verranno discusse di seguito unitariamente. Le interazioni degli agenti anti-ChE con altri farmaci che agiscono in corrispondenza delle sinapsi del sistema nervoso autonomo e a livello delle giunzioni neuromuscolari sono descritte nei Capitoli 9 e 11.

Cenni storici. La fisostigmina, detta anche *eserina*, è un alcaloide ottenuto dalla fava del Calabar, il seme maturo secco del *Physostigma venenosum*, una pianta perenne che cresce nell'Africa occidentale tropicale. La fava del Calabar veniva usata dalle tribù native dell'Africa occidentale come "pozione rituale" nei riti di stregoneria, in cui la colpa veniva "provata" dalla morte causata dal veleno, l'in-

nocenza dalla sopravvivenza dopo l'ingestione di un seme. L'alcaloide puro fu isolato da Jobst e Hesse nel 1864 e chiamato fisostigmina. Il primo utilizzo terapeutico della sostanza risale al 1877, da parte di Laqueur, per il trattamento del glaucoma, che rimane ancora oggi uno degli usi più comuni del farmaco. Studi sulla storia della fisostigmina sono stati compiuti da Karczmar (1970) e Holmstedt (2000).

Dopo che la ricerca di base ebbe chiarito i fondamenti chimici dell'azione della fisostigmina, i ricercatori iniziarono una serie di studi sistematici su esteri aromatici sostituiti di acidi alchil-carbamidici. La neostigmina entrò nell'uso terapeutico nel 1931 in virtù delle sue proprietà stimolanti sul tratto intestinale e solo in seguito fu scoperta la sua efficacia nella terapia sintomatica della miastenia gravis.

È interessante ricordare che la prima relazione sulla sintesi di un anti-ChE organofosforico a elevato potenziale, il tetraetil-pirofosfato (*tetraethyl-pyrophosphate*, TEPP), fu pubblicata da Clermont nel 1854. Ancora più sorprendente è il fatto che l'Autore sopravvisse e riuscì a descrivere il sapore della sostanza, alcune gocce della quale avrebbero dovuto essere letali. Gli studi moderni sui composti organofosforici iniziarono a partire dal 1932, anno della pubblicazione, da parte di Lange e Krueger, della relazione sulla sintesi di dimetil- e dietil-fluorofosfati.

Dopo aver sintetizzato circa duemila composti, Schrader (1952) definì i determinanti strutturali dell'attività insetticida (in seguito riconosciuta come attività anti-ChE; vedi oltre) (Gallo e Lawryk, 1991). Un composto di questa prima serie, il parathion (un fosforotioato), divenne in seguito il più usato insetticida di questa classe. Anche il malathion, diffusamente utilizzato ancor oggi, contiene il legame P=S presente nel parathion. Prima e durante la Seconda Guerra Mondiale gli sforzi di Schrader e collaboratori furono dedicati allo sviluppo di composti per la guerra chimica. La sintesi di diversi composti molto più tossici del parathion, come il sarin, il soman e il tabun, fu tenuta segreta dal governo tedesco. Anche gli studiosi dei Paesi Alleati seguirono Lange e Krueger nel tentativo di scoprire composti potenzialmente tossici; il diisopropil-fosfluoridrato (*diisopropyl-fluorophosphate*; DFP), sintetizzato da McCombie e Saunders, fu studiato più approfonditamente da scienziati britannici e americani.

Negli anni Cinquanta fu sintetizzata una serie di carbamati aromatici che risultarono possedere una sostanziale tossicità selettiva contro gli insetti ed essere potenti agenti anti-ChE (Ecobichon, 2000).

Struttura dell'acetilcolinesterasi. L'AChE esiste in due diverse forme molecolari: semplici oligomeri omomerici di subunità catalitiche (monomeri, dimeri e tetrameri) e associazioni eteromeriche di subunità catalitiche e strutturali (Mas-soulié, 2000; Taylor et al., 2000). Le forme omomeriche si trovano nelle cellule in forma solubile, presumibilmente destinate a essere secrete o associate alla membrana esterna delle cellule attraverso l'attacco a un glicofosfolipide. Una forma eteromeriche, frequentemente riscontrabile nelle sinapsi neuronali, è un tetramero di subunità catalitiche legate tramite ponti disolfuro a una subunità, associata a un lipide, del peso di 20 000 Da e localizzata sulla superficie esterna della membrana cellulare. L'altra forma eteromeriche è composta da un tetramero di subunità catalitiche legate tramite ponti disolfuro a ciascuna delle tre catene di una subunità

* Traduzione a cura di: Daniela Necchi e Cristina Lanni.

strutturale simile al collagene. Questa specie molecolare, la cui massa molecolare è all'incirca di 10^6 Da, è associata alla lamina basale dell'area giunzionale del muscolo scheletrico.

La clonazione molecolare ha dimostrato che un singolo gene codifica per tutte le AChE dei vertebrati (Schumacher et al., 1986; Taylor et al., 2000). Da un differente riarrangiamento dell'RNA messaggero derivano diversi prodotti genici che differiscono soltanto nella sequenza carbossi-terminale, mentre la porzione del gene che codifica per il "core" catalitico dell'enzima rimane invariata. Quindi, ci si può aspettare che le AChE di ciascuna singola specie abbiano lo stesso substrato e la medesima specificità di inibizione.

Un diverso gene, correlato strutturalmente, codifica per la butirril-colinesterasi, che è sintetizzata nel fegato e si trova soprattutto nel plasma (Lockridge et al., 1987). Le colinesterasi costituiscono una superfamiglia di proteine il cui fattore strutturale comune è un ripiegamento α , β dell'idrolasi (Cygler et al., 1993). La famiglia comprende numerose esterasi, altre idrolasi che non si trovano nel sistema nervoso e, sorprendentemente, proteine senza attività idrolasica come la tiroglobulina e membri delle famiglie delle tachine e delle neurologine (Taylor et al., 2000).

La struttura tridimensionale dell'AChE dimostra la presenza del centro attivo dell'enzima in posizione centrale simmetrica a ciascuna subunità e alla base di una stretta "gola" della profondità di circa 20 Å (Bourne et al., 1995; Sussman et al., 1991). Alla base della "gola" si trovano i tre aminoacidi responsabili dell'attività catalitica: Ser203, His447 e Glu334 nei mammiferi (Fig. 10.1). Il meccanismo catalitico ricorda quello di altre idrolasi, in cui il gruppo ossidrilico della Ser è reso altamente nucleofilo attraverso un sistema di passaggio di carica che coinvolge l'anione carbossilato del Glu, l'imidazolo della His e l'ossidrile della Ser (Fig. 10.2A).

Durante l'attacco enzimatico dell'ACh, un estere con geometria trigonale, si forma un intermedio tetraedrico tra l'enzima e il substrato (vedi Fig. 10.2A) che collassa portando alla formazione di un complesso acetil-enzima con liberazione di colina. L'acetil-enzima è molto suscettibile all'idrolisi e ciò porta alla formazione di acetato ed enzima attivo (Froede e Wilson, 1971; Rosenberry, 1975).

L'AChE è uno degli enzimi più efficienti che si conoscano: una molecola di AChE è in grado di idrolizzare 6×10^5 molecole di ACh al minuto, il che comporta un tempo di turnover di 100 microsecondi.

Meccanismo d'azione degli inibitori dell'acetilcolinesterasi. Il meccanismo d'azione dei composti appartenenti alle tre classi di anti-ChE è illustrato nella Figura 10.2.

Tre distinti domini sull'AChE costituiscono i siti di legame per gli inibitori e pongono le basi per la differente specificità dell'AChE rispetto alla butirril-colinesterasi: essi sono la tasca acilica del centro reattivo, il sito per la colina dello stesso centro reattivo e il sito anionico periferico (Reiner e Radic', 2000; Taylor e Radic', 1994). Gli inibitori reversibili, come l'edrofonio e la tacrina, si legano in prossimità del sito per la colina nelle vicinanze del Trp86 e del Glu202 (Silman e Sussman, 2000) (vedi Fig. 10.2B). L'edrofonio ha una breve durata d'azione poiché la sua struttura quaternaria ne facilita l'eliminazione renale; esso si lega reversibilmente al centro attivo dell'AChE. Altri inibitori reversibili, come il donepezil, si legano con maggiore affinità al centro attivo.

Ulteriori inibitori reversibili, come il propidium e la tossina peptidica di serpente fasciculina, si legano al sito anionico periferico dell'AChE. Questo sito è localizzato al bordo della "gola" che definisce il centro attivo ed è definito da Trp286 e da Tyr72 e Tyr 124 (vedi Fig. 10.1).

I farmaci che contengono un legame carbamilestere, come la fisostigmina e la neostigmina, sono idrolizzati dall'AChE molto più lentamente rispetto all'ACh. L'amina quaternaria, neostigmina, e l'amina terziaria, fisostigmina, sono presenti come cationi a pH fisiologico. Poiché fungono da substrati alternativi all'ACh (vedi Fig. 10.2C), l'attacco da parte della serina del centro attivo porta alla formazione dell'enzima carbamitato. Il residuo carbamilico è localizzato nella tasca acilica delimitata da Phe295 e Phe 297. Rispetto all'enzima acilato, il metilcarbamitato-AChE e il dimetilcarbamitato-AChE sono molto più stabili all'idrolisi (il $t_{1/2}$ per l'idrolisi del dimetilcarbamitato-AChE è pari a 15-30 min). La segrega-

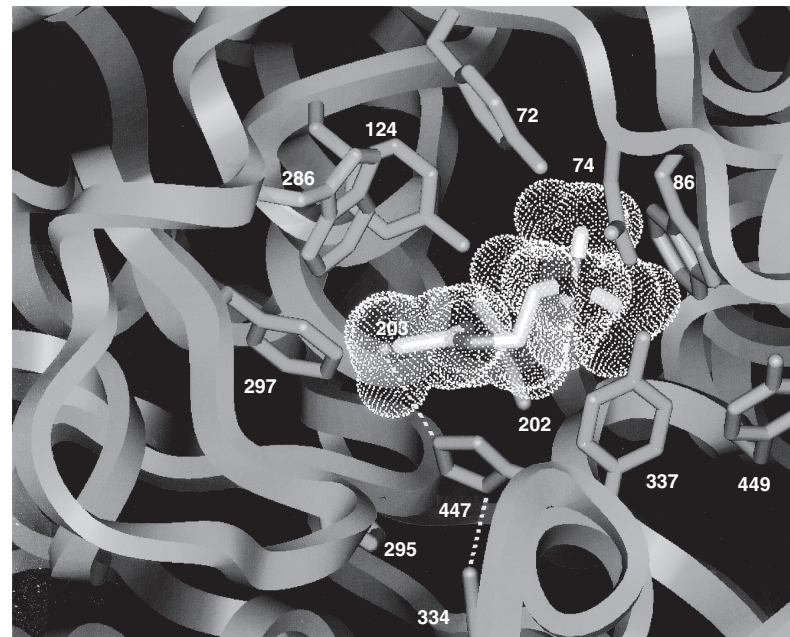


FIGURA 10.1 Centro attivo a "gola" dell'acetilcolinesterasi di mammifero. L'acetilcolina legata al centro attivo è indicata dalla struttura punteggiata che rappresenta i suoi raggi di van del Waals. È illustrata la struttura cristallina del centro attivo dell'acetilcolinesterasi di topo, che è virtualmente identica a quella dell'ACh umana (Bourne et al., 1995). Sono incluse le catene laterali: (a) della triade catalitica, Glu334, His447 e Ser203 (i legami idrogeno sono indicati dalle linee tratteggiate); (b) della tasca acilica, Phe295 e Phe297; (c) del sito secondario della colina, Trp86, Glu202 e Tyr337; (d) del sito periferico, Trp286, Tyr72, Tyr124 e Asp74. Le tirosine 337 e 449 sono distanti dal centro attivo, ma probabilmente contribuiscono alla stabilizzazione di alcuni ligandi. La triade catalitica, il sito secondario della colina e la tasca acilica sono localizzati alla base della "gola", mentre il sito periferico si trova sul bordo esterno. La "gola" è profonda 18-20 Å ed è centrosimmetrica alla subunità.

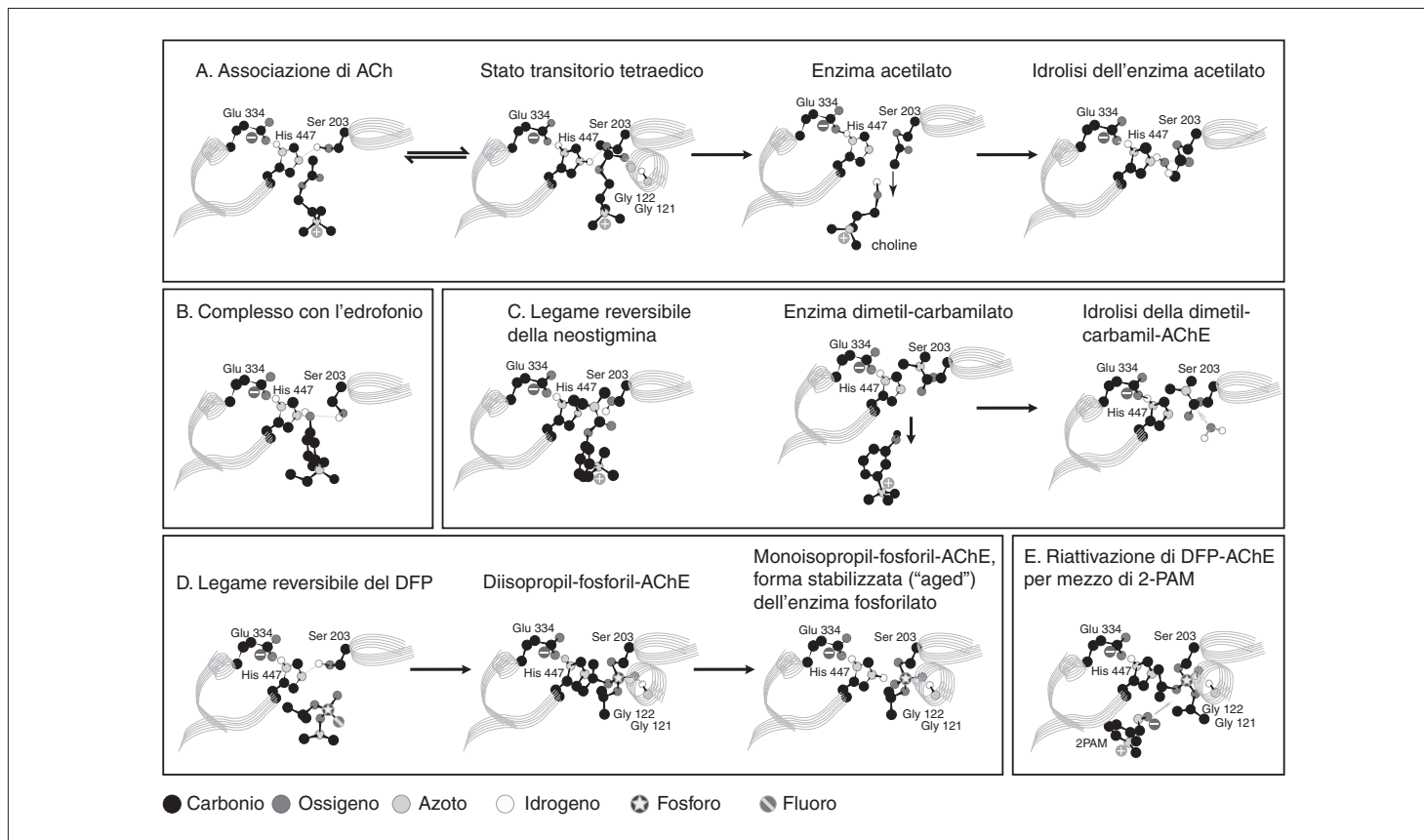


FIGURA 10.2 Passaggi coinvolti nell'idrolisi dell'acetilcolina da parte dell'acetilcolinesterasi e nell'inibizione e riattivazione dell'enzima. Sono riportati soltanto i tre residui della triade catalitica mostrata nella Figura 10.1. Le associazioni e le reazioni illustrate sono: **A.** Catalisi dell'acetilcolina (ACh): legame dell'ACh, formazione di uno stato transitorio tetraedrico, formazione dell'enzima acetilato con liberazione di colina, rapida idrolisi dell'enzima acetilato e ritorno allo stato originale. **B.** Legame reversibile e inibizione da parte dell'edrofonio. **C.** Reazione con la neostigmina e inibizione dell'AChE: legame reversibile della neostigmina, formazione dell'enzima dimetil-carbamilato. **D.** Reazione del diisopropil-fluorofosfato (DFP) e inibizione dell'AChE: legame reversibile del DFP, formazione dell'enzima diisopropil-fosforilato, formazione dell'enzima monoisopropil-fosforilato, forma stabilizzata ("aged") dell'enzima fosforilato.* L'idrolisi del diisopropil-enzima è molto lenta e non è illustrata nella figura. L'enzima monoisopropil-fosforilato "aged" è virtualmente resistente all'idrolisi e alla riattivazione. Lo stato transitorio tetraedrico dell'idrolisi dell'ACh è simile alle forme coniugate originate dagli inibitori organofosforici a configurazione tetraedrica e ne giustifica la potenza. I legami ammidici degli idrogeni da parte di Gly121 e Gly 122 stabilizzano gli ossigeni carbonilici e fosforilici. **E.** Riattivazione dell'enzima diisopropil-fosforilato da parte della pralidossima (2-PAM). L'attacco della 2-PAM al fosforo dell'enzima fosforilato dà origine a una fosfo-ossima con rigenerazione dell'enzima attivo. I passaggi individuali della reazione di fosforilazione e della reazione di ossidazione sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa (Jennings et al., 2003).
* L'enzima va incontro a un processo di "invecchiamento" (*aging*) che lo converte dopo qualche ora in una forma che non può più essere defosforilata. [N.d.C.]

zione dell'enzima nella forma carbamidata preclude pertanto a lungo la sua attività nei confronti dell'ACh. Quando somministrati per via sistemica, la durata dell'inibizione da parte degli agenti carbamidanti è di 3-4 ore.

Gli inibitori organofosforici come il diisopropil-fluorofosfato (*diisopropyl-fluorofosphate*, DFP) operano come veri emisubstrati poiché il risultante coniugato con la serina del centro attivo fosforilato o fosfonato è estremamente stabile (vedi Fig. 10.2D). Gli inibitori organofosforici presentano una configurazione tetraedrica che somiglia allo stato di transizione che si forma durante l'idrolisi degli esteri carbossilici. Come negli esteri carbossilici, l'ossigeno fosforilico si lega con l'ossigeno del centro attivo. Se il gruppo alchilico dell'enzima fosforilato è un metile o un etile, la rigenerazione spontanea dell'enzima richiede alcune ore. Se, come nel caso del DFP, i gruppi alchilici sono secondari o terziari a struttura complessa, questo rende ulteriormente stabile la forma fosforilata dell'enzima e non si osserva, di solito, alcuna rigenerazione significativa dello stesso. La stabilità dell'enzima fosforilato è incrementata ulteriormente per perdita di uno dei gruppi alchilici ("*aging*", "invecchiamento"). Pertanto, il recupero dell'attività dell'AChE richiede la sintesi di nuovo enzima.

Quindi, i termini *reversibile* e *irreversibile* vengono applicati rispettivamente ai carbamil-esteri e agli organofosforati e riflettono solo differenze quantitative nelle velocità di decarbamilazione o defosforilazione dell'enzima coniugato. Entrambe le classi di composti interagiscono covalentemente con il residuo serinico del sito attivo, essenzialmente nello stesso modo dell'ACh.

Azione sugli organi effettori. Gli effetti farmacologici tipici dei composti anti-ChE sono principalmente dovuti all'inibizione dell'idrolisi dell'ACh a livello delle terminazioni colinergiche. Il trasmettitore, pertanto, si accumula aumentando la risposta all'ACh, liberata a opera di impulsi colinergici o rilasciata spontaneamente dalle terminazioni nervose. Virtualmente, tutti gli effetti acuti dovuti a dosi moderate di organofosforici sono attribuibili a questa azione. Per esempio, la miopia oculare che si osserva in seguito a instillazione locale di DFP non è rilevabile dopo denervazione postgangliare cronica dell'occhio, poiché in tal caso non esiste più una fonte di rilascio endogeno di ACh. Le conseguenze dell'aumentata concentrazione di ACh in corrispondenza della placca motrice hanno caratteristiche peculiari per questo sito e verranno discusse più avanti.

I composti anti-ChE contenenti un'ammina terziaria, e soprattutto quelli contenenti un ammonio quaternario, possono esercitare anche un'ulteriore azione diretta su alcuni recettori colinergici. Per esempio, gli effetti della neostigmina sul midollo spinale e sulla giunzione neuromuscolare sono il risultato della sua attività anti-ChE e di una stimolazione colinergica diretta.



Chimica e relazione struttura-attività

Le correlazioni struttura-attività dei composti anti-ChE sono state ampiamente descritte nelle precedenti edizioni di questo libro. Saranno qui considerate solo le molecole di interesse terapeutico o tossicologico generale.

Inibitori non covalenti. Sebbene questi farmaci interagiscano attraverso un legame reversibile e non covalente con i siti attivi dell'AChE, essi differiscono tra loro per quanto riguarda la distribuzione corporea e l'affinità per l'enzima. L'edrofonio, un farmaco quaternario la cui attività è limitata alle sinapsi del sistema nervoso periferico, ha una moderata affinità per l'AChE. Il suo volume di distribuzione è piccolo ed esso viene rapidamente eliminato per via renale: questo spiega la sua breve durata d'azione. Al contrario, la tacrina e il donepezil (Fig. 10.3) hanno una maggiore affinità per l'AChE, sono maggiormente idrofobici e superano facilmente la barriera ematoencefalica: questo li favorisce nell'inibizione dell'AChE a livello de SNC. La loro partizione nei lipidi e l'elevata affinità per l'AChE rendono conto della lunga durata d'azione.

Inibitori "reversibili" a struttura carbamica. I farmaci di questa classe che rivestono interesse terapeutico sono mostrati nella Figura 10.3. I primi studi dimostrarono che la struttura attiva essenziale della fisostigmina era il gruppo metilcarbammato derivato da un fenolo amino-sostituito. La neostigmina, un sale di ammonio quaternario, rappresenta un composto con potenza simile, se non superiore. La piridostigmina è una variante molto simile, anch'essa impiegata nel trattamento della miastenia gravis.

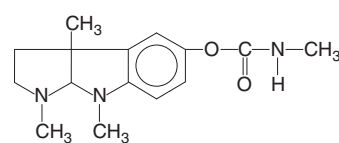
Il legame di due molecole di ammonio quaternario conferisce un'aumentata potenza e durata d'azione agli anti-ChE. Un esempio di questo tipo è costituito

dall'agente miotico demecario, che consiste essenzialmente in due molecole di neostigmina connesse da una serie di dieci gruppi metilenici. Il secondo gruppo quaternario conferisce una stabilità aggiuntiva all'interazione grazie all'associazione con una molecola aminoacidica a carica negativa, Asp74, vicino al bordo della "gola" del centro attivo dell'AChE. Inibitori a struttura carbamica con elevata solubilità nei lipidi (per es., rivastigmina), che sono in grado di superare rapidamente la barriera ematoencefalica e hanno una maggiore durata d'azione, sono già stati approvati o sono oggetto di trial clinici per il trattamento della malattia di Alzheimer (Cummings, 2004; Giacobini, 2000) (vedi Cap. 22).

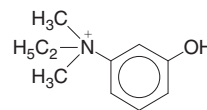
Gli insetticidi carbamati carbaril, propoxur e aldicarb, che vengono comunemente utilizzati per il giardinaggio, inibiscono l'AChE in maniera identica agli altri inibitori a struttura carbamica. I sintomi di avvelenamento sono molto simili a quelli che si riscontrano nell'avvelenamento da organofosfati (Baron, 1991; Ecobichon, 2000). Il carbaril ha una tossicità particolarmente bassa per assorbimento cutaneo; viene utilizzato in alcuni Paesi per via topica per il controllo dei pidocchi. Non tutti i carbamati utilizzati nelle formulazioni da giardino sono inibitori dell'AChE; i ditiocarbamati sono fungicidi.

Composti organofosforici. La formula generale di questa classe di inibitori della colinesterasi è presentata nella Tabella 10.1. È possibile una grandissima varietà di sostituenti. R_1 e R_2 possono essere gruppi alchilici, alcossi, arilossi, amido, mercapto o altri, mentre X, il gruppo che viene rilasciato per azione dell'enzima e che è costituito tipicamente dalla base coniugata di un acido debole, è presente come alogeno, cianuro, tiocianato, fenossi, tiofenossi, fosfato, tiocolina o gruppo carbossilico. Per maggiori approfondimenti sui composti organofosforici e la loro tossicità si rimanda alla monografia di Gallo e Lawryk (1991).

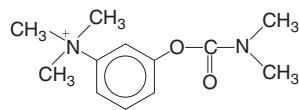
Il DFP produce un'inattivazione virtualmente irreversibile dell'AChE e di altre esterasi, tramite un processo di alchil-fosforilazione. La sua elevata liposolu-



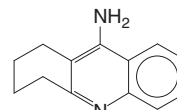
FISOSTIGMINA



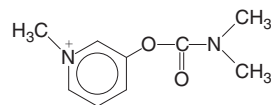
EDROFONIO



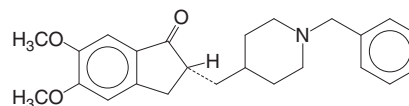
NEOSTIGMINA



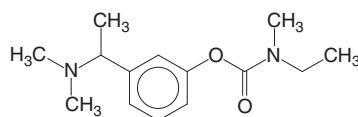
TACRINA



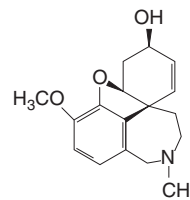
PIRIDOSTIGMINA



DONEPEZIL



RIVASTIGMINA



GALANTAMINA

FIGURA 10.3 Esempi di agenti anticolinesterasici "reversibili" impiegati in clinica.



Tabella 10.1 Classificazione chimica dei più rappresentativi composti organofosforici di particolare interesse farmacologico o tossicologico

Gruppo **A**, X = alogeno, cianuro, o tiocianato; gruppo **B**, X = tioalchil, tioaril, alcossi o arilossi; gruppo **C** = composti tionofosforici o tio-tionofosforici; gruppo **D** = composti contenenti un ammonio quaternario. R₁ può essere un gruppo alchilico (fosfonati), un gruppo alcossi (fosforati) o un gruppo alchilamino (fosforoamidati).

Gruppo	Formula di struttura	Nomi comuni, chimici e altri nomi	Commenti
A	$\begin{array}{c} i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{F} \\ \\ i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O} \end{array}$	DFP, isofluorofosfato, diisopropil-fluorofosfato	Potente inattivatore irreversibile
	$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{N} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{CN} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	Tabun Etil <i>N</i> -dimetilcianofosforamide	Gas nervino estremamente tossico
	$\begin{array}{c} i\text{-C}_3\text{H}_7\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{F} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Sarin (GB) Isopropil-metilfluorofosfonato	Gas nervino estremamente tossico
	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{-C} \text{---} \text{C} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{P} \\ \quad \quad \quad / \quad \backslash \\ \quad \quad \quad \text{O} \quad \text{F} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	Soman Pinacolil-metilfluorofosfonato	Gas nervino estremamente tossico, maggiore potenziale per l'azione irreversibile/rapido "aging"
B	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 \end{array}$	Paraoxon, E 600 <i>O,O</i> -Dietil <i>O</i> -(4-nitrofenil)-fosfato	Metabolita attivo del parathion
	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{O} \quad \text{CHCOOC}_2\text{H}_5 \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	Malaoxon <i>O,O</i> -Dimetil <i>S</i> -(1,2-dicarbossietil)-tiofosfato	Metabolita attivo del malathion
C	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{S} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 \end{array}$	Parathion <i>O,O</i> -Dietil <i>O</i> -(4-nitrofenil)-tiofosfato	Insetticida per l'agricoltura, causa di numerosi casi di avvelenamento accidentale; vietato dal 2003
	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{S} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	Diazinon, dimpilato <i>O,O</i> -Dietil <i>O</i> -(2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil)-tiofosfato	Insetticida; riservato a un uso agricolo in ambienti non residenziali
	$\begin{array}{c} \text{H}_5\text{C}_2\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{S} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_5\text{C}_2\text{O} \quad \text{C}_5\text{H}_2\text{Cl}_3\text{N} \end{array}$	Clorpirifos <i>O,O</i> -Dietil <i>O</i> -(3,5,6-tricloro-2-piridil) tiofosfato	Insetticida; riservato a un uso agricolo in ambienti non residenziali
	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{O} \quad \text{CHCOOC}_2\text{H}_5 \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	Malathion <i>O,O</i> -Dimetil <i>S</i> -(1,2-dicarbossietil) ditiofosfato	Insetticida ampiamente utilizzato grazie alla maggiore sicurezza rispetto al parathion o ad altri composti in quanto rapidamente detossificato dagli organismi superiori
D	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \\ \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array} \quad \text{I}^-$	Ecotiofato, MI-217 Dietiossifosfiniltiocolina ioduro	Derivato estremamente potente della colina; somministrato localmente nel trattamento del glaucoma; relativamente stabile in soluzioni acquose



bilità, il basso peso molecolare e la volatilità ne facilitano l'assorbimento per inalazione e per assorbimento transdermico, nonché il passaggio nel SNC. Dopo la desulfurazione, gli insetticidi comunemente in uso formano l'enzima dimetossio dietossifosforilato.

I "gas nervini" (tabun, sarin e soman) sono tra i più potenti agenti tossici sintetici conosciuti; essi sono letali in animali da laboratorio a dosi di nanogrammi. Questi agenti sono stati pericolosamente impiegati in azioni di guerra e in attacchi terroristici (Nozaki e Aikawa, 1995).

A causa della loro bassa volatilità e della scarsa stabilità in soluzione acquosa, il parathion e il metilparathion sono stati ampiamente utilizzati come insetticidi. La tossicità acuta e cronica ha posto delle limitazioni al loro utilizzo e, sia per l'uso domestico sia nel giardinaggio, in gran parte del mondo questi composti sono stati sostituiti con altri potenzialmente meno pericolosi. Essi non inibiscono l'AChE *in vitro*; il metabolita attivo è il paraoxon. L'ossigeno fosforilato necessario per la sostituzione dello zolfo è fornito principalmente dagli enzimi epatici. Questa reazione si verifica anche negli insetti, di solito con un'efficienza maggiore. Altri insetticidi con struttura tiofosfato sono ampiamente utilizzati nel giardinaggio e in agricoltura. Tra questi vi sono il *diazinon* e il *clorpirifos*. L'utilizzo di entrambi questi agenti è stato limitato perché si sono riscontrati casi di intossicazione cronica nell'animale neonato. Essi sono stati banditi dall'utilizzo domestico sia negli ambienti interni sia in quelli esterni dal 2005.

Anche il *malathion* richiede la sostituzione di un atomo di zolfo con ossigeno *in vivo*, il che conferisce resistenza ai mammiferi. Questo insetticida può essere anch'esso reso inattivo per idrolisi del legame dell'estere carbossilico da parte delle carbossilesterasi presenti nel plasma; l'attività delle carbossilesterasi nel plasma determina quindi la resistenza delle singole specie animali al malathion. La reazione di detossificazione è molto più rapida nei mammiferi e negli uccelli che negli insetti (Costa et al., 2003). In anni recenti il malathion è stato impiegato nella disinfestazione attraverso dispersione aerea di diverse zone relativamente popolate, allo scopo di controllare la diffusione del moscerino da frutta mediterranea e delle zanzare che trasmettono virus pericolosi per l'uomo, come il virus dell'encefalite del Nilo occidentale.

Casi di intossicazione acuta da malathion sono stati segnalati solo a causa di tentati suicidi o avvelenamenti volontari. La dose letale nei mammiferi è di circa 1 g/kg. L'esposizione della cute comporta un assorbimento sistemico molto basso (<10%). Il malathion è utilizzato per via topica nel trattamento della pediculosi.

Tra i composti organofosforici ad ammonio quaternario (gruppo D della Tab. 10.1), il solo ecotiofato è utilizzato in clinica (limitatamente alla somministrazione oftalmica) poiché, essendo carico positivamente, non è volatile e non attraversa facilmente la cute.

Il metrifonato è un organofosfato a basso peso molecolare che viene spontaneamente convertito nel suo estere fosforilato attivo, il dimetil 2,2-diclorovinilfosfato (*dimethyl 2,2-dichlorovinyl-phosphate*, DDVP o diclorvos). Il metrifonato e il DDVP attraversano entrambi facilmente la barriera ematoencefalica per inibire l'AChE nel SNC. Il metrifonato è stato originariamente sviluppato per il trattamento della schistosomiasi (vedi Cap. 51). La sua capacità di inibire l'AChE nel SNC e la bassa tossicità hanno portato al suo inserimento in una sperimentazione clinica per la terapia della malattia di Alzheimer (Cummings, 2004); alcuni casi di paralisi della muscolatura scheletrica, seppur verificatisi con una bassa incidenza, ne hanno limitato l'utilizzo.*

Proprietà farmacologiche

In generale, le proprietà farmacologiche di agenti anti-ChE possono essere dedotte conoscendo i siti presso i quali l'ACh è rilasciata fisiologicamente a opera degli impulsi nervosi, i livelli di attività degli stessi impulsi nervosi e le risposte dei rispettivi organi effettori all'ACh (vedi Cap. 8). Gli anti-ChE possono produrre potenzialmente i seguenti effetti:

- stimolazione delle risposte a recettori muscarinici in organi effettori autonomi;

* E arrestato lo sviluppo clinico per questa indicazione. [N.d.C.]

- stimolazione, seguita da depressione o paralisi, di tutti i gangli autonomi e dei muscoli scheletrici (azione nicotinic);
- stimolazione, con possibilità di una successiva depressione, dei recettori colinergici nel SNC.

In seguito all'assunzione di dosi tossiche o letali di anti-ChE, la maggior parte di questi effetti risulta evidente (vedi oltre). Tuttavia, in presenza di piccole dosi e in particolare alle dosi utili terapeutica, diversi fattori assumono un importante significato. In generale, composti contenenti amine quaternarie non attraversano facilmente le membrane cellulari: pertanto i composti appartenenti a questa categoria vengono poco assorbiti dalla mucosa gastrointestinale (GI) e attraverso la cute e sono esclusi dal SNC dalla barriera ematoencefalica, almeno a basse dosi. D'altra parte, questi composti agiscono preferenzialmente a livello della placca neuromuscolare del muscolo scheletrico, esercitando la loro azione sia come agenti anti-ChE sia come agonisti diretti. Essi hanno effetti di entità inferiore a livello dei siti effettori autonomi e dei gangli. Al contrario, gli agenti maggiormente liposolubili sono ben assorbiti dopo somministrazione orale, esercitano il loro effetto sulle terminazioni colinergiche sia a livello centrale sia a livello periferico e possono essere sequestrati nelle membrane lipidiche per lunghi periodi di tempo. I composti organofosforici liposolubili vengono inoltre assorbiti facilmente attraverso la cute e quelli che sono anche volatili vengono rapidamente assorbiti attraverso le membrane alveolari (Storm et al., 2000).

Gli effetti degli anti-ChE a livello delle cellule di organi effettori autonomi e di aree corticali e sottocorticali del SNC, dove i recettori sono per la maggior parte di tipo muscarinico, sono bloccati dall'*atropina*. Allo stesso modo, l'*atropina* blocca alcuni degli effetti eccitatori degli agenti anti-ChE a livello dei gangli autonomi, dal momento che entrambi i tipi di recettore, nicotinic e muscarinico, sono coinvolti nella neurotrasmissione a livello gangliare (vedi Cap. 11).

I siti d'azione degli agenti anti-ChE che rivestono importanza terapeutica sono il SNC, gli occhi, l'intestino e la giunzione neuromuscolare del muscolo scheletrico; ulteriori azioni di questi farmaci si possono verificare in conseguenza di un'intossicazione.

Occhio. L'applicazione di farmaci anti-ChE alla congiuntiva provoca iperemia, costrizione del muscolo sfintere pupillare intorno al margine dell'iride (miosi) e contrazione del muscolo ciliare (blocco del riflesso di accomodazione con fuoco visivo ravvicinato). La miosi compare in pochi minuti e può perdurare per diverse ore o giorni. Sebbene la pupilla sia ristretta alle dimensioni di una capocchia di spillo, essa è ancora in grado di contrarsi se esposta alla luce. Il blocco dell'accomodazione è più labile e in genere scompare prima del termine della miosi. La pressione intraoculare, se elevata, cade in conseguenza di un più facile efflusso dell'umore acqueo (vedi Cap. 64).

Tratto gastrointestinale. Nell'uomo la neostigmina stimola la contrazione gastrica e aumenta la secrezione di acido. Dopo resezione bilaterale del vago, l'effetto della neostigmina sulla motilità gastrica viene notevolmente ridotto. La porzione inferiore dell'esofago viene stimolata dalla neostigmina; in pazienti con grave acalasia e dilatazione dell'esofago il farmaco è in grado di produrre un aumento del tono e della peristalsi.

La neostigmina aumenta anche la motilità dell'intestino e in particolare del colon. L'atonìa provocata da antagonisti muscarinici o da un precedente intervento chirurgico può essere superata: le onde peristaltiche aumentano in ampiezza e fre-



quenza e quindi viene favorito il transito del contenuto intestinale. L'effetto complessivo dei farmaci anti-ChE sulla motilità intestinale rappresenta probabilmente la sommatoria di due effetti, il primo a livello delle cellule gangliari del plesso di Auerbach e il secondo nei confronti delle cellule muscolari lisce, grazie alla preservazione dell'attività dell'ACh rilasciata rispettivamente dalle fibre colinergiche pregangliari e postgangliari (vedi Cap. 46).

Giunzione neuromuscolare. La maggior parte degli effetti dei potenti farmaci anti-ChE sul muscolo scheletrico può essere spiegata sulla base dell'inibizione dell'AChE a livello della giunzione neuromuscolare. Esiste tuttavia la dimostrazione che la neostigmina e altri composti a struttura aminica quaternaria esercitano un'attività accessoria di agonisti diretti. Per esempio, l'iniezione endoarteriosa di neostigmina in un muscolo cronicamente denervato o nel quale l'AChE sia stata inattivata mediante una precedente somministrazione di DFP provoca un'immediata contrazione. Questo effetto non è invece osservabile qualora si inietti fisostigmina.

Normalmente un singolo impulso nervoso in un assone motore terminale libera sufficiente ACh per provocare una depolarizzazione locale (potenziale di placca) di ampiezza tale da far scaturire un potenziale d'azione muscolare. L'ACh rilasciata viene immediatamente idrolizzata dall'AChE, a una velocità tale che il tempo di permanenza dell'ACh entro la sinapsi tra nervo e muscolo (circa 200 μ s) è molto più breve della durata del potenziale di placca e del periodo di refrattarietà del muscolo. Perciò ogni impulso innesca una singola onda di depolarizzazione. In seguito all'inibizione dell'AChE, il tempo di permanenza dell'ACh nello spazio intersinaptico aumenta, permettendo la diffusione laterale e il legame del trasmettitore con molti recettori. La successiva stimolazione dei recettori vicini al sito di rilascio nella placca motrice provoca un prolungamento del tempo di decadimento del potenziale di placca. I quanti rilasciati dagli impulsi nervosi individuali non sono più isolati. Questa attività disorganizza il sincronismo tra la depolarizzazione della placca neuromuscolare e lo sviluppo di potenziali d'azione. Di conseguenza, si osservano eccitazione asincrona e fascicolazione delle fibre muscolari. Al raggiungimento di sufficienti livelli di inibizione dell'AChE, la depolarizzazione della placca neuromuscolare diventa predominante e ha luogo il blocco della trasmissione dovuto a depolarizzazione (vedi Cap. 11). Quando l'ACh persiste nella sinapsi, si può avere depolarizzazione del terminale dell'assone che provoca una scarica antidromica del motoneurone; questo effetto contribuisce alla fascicolazione che coinvolge l'intera unità motoria.

Gli anti-ChE contrastano l'effetto antagonista di sostanze che agiscono come bloccanti neuromuscolari competitivi. Va ricordato che la neostigmina non ha efficacia contro la paralisi del muscolo scheletrico causata dalla succinilcolina; quest'ultima, infatti, induce il blocco neuromuscolare anche attraverso la depolarizzazione, che viene piuttosto accentuata dalla neostigmina.

Azioni su altri siti. Le ghiandole secernenti che sono innervate da fibre colinergiche postgangliari comprendono le ghiandole bronchiali, salivari, lacrimali e gastriche (le cellule G dell'antro e le cellule parietali), nonché le ghiandole intestinali e le ghiandole degli acini pancreatici. A basse dosi gli anti-ChE inducono un aumento della risposta secretoria agli stimoli nervosi e a dosi elevate determinano un aumento dei livelli secretori basali.

I composti anti-ChE provocano la contrazione delle fibre muscolari lisce dei bronchioli e dell'uretere; l'uretere può manifestare un'aumentata attività peristaltica.

L'attività cardiovascolare degli anti-ChE è complessa poiché è la risultante di effetti sia pre- sia postgangliari derivanti dall'accumulo di ACh a livello del cuore e dei vasi, nonché di azioni a livello del SNC. L'effetto predominante sul cuore, derivante dall'accumulo periferico di ACh, è la bradicardia con conseguente riduzione della gittata cardiaca. Dosi elevate portano normalmente a una caduta della pressione arteriosa, spesso come conseguenza dell'effetto degli anti-ChE sui centri vasomotori bulbari nel SNC.

Gli agenti anti-ChE aumentano l'influenza vagale sul cuore. Ciò porta a un accorciamento del periodo refrattario delle fibre muscolari atriali e a un aumento

del periodo refrattario e del tempo di conduzione in corrispondenza dei nodi seno-atriale e atrio-ventricolare. A livello gangliare, l'accumulo di ACh è inizialmente in grado di eccitare i recettori nicotinici, ma ad alte dosi si instaura un blocco gangliare derivante dalla depolarizzazione persistente della membrana cellulare. L'azione eccitatoria nei confronti dei gangli parasimpatici tenderebbe a deprimere ulteriormente la ridotta gittata cardiaca, mentre l'effetto opposto sarebbe il risultato dell'azione dell'ACh su cellule gangliari simpatiche. Anche a livello dei centri vasomotori bulbari centrali e cardiaci l'ACh produce eccitazione seguita da inibizione. Tutti questi effetti sono resi ulteriormente più complessi dall'ipossiemia che deriva dall'azione broncocostrittiva e dall'aumento delle secrezioni indotte dall'ACh nel sistema respiratorio; l'ipossiemia, a sua volta, può potenziare il tono simpatico e il rilascio di adrenalina dalla midollare del surrene indotto dall'ACh. Per tutti questi motivi non è sorprendente l'osservazione di un'aumentata frequenza cardiaca in caso di intossicazione grave da sostanze ad attività anti-ChE. L'ipossiemia è probabilmente un importante fattore determinante della depressione del SNC, che si verifica dopo la somministrazione di dosi elevate di agenti anti-ChE. Gli effetti stimolanti sul SNC vengono bloccati da dosi maggiori di atropina, sebbene non completamente come accade per gli effetti muscarinici a livello dei siti effettori autonomi periferici.

Assorbimento, metabolismo ed escrezione. La fisostigmina viene facilmente assorbita dal tratto GI, dai tessuti sottocutanei e dalle mucose. L'instillazione congiuntivale del farmaco può provocare effetti sistemici se non vengono adottate misure di sicurezza (per es., pressione sull'angolo interno dell'occhio) per evitarne l'assorbimento a livello della mucosa nasale. Quando somministrata per via parenterale, la fisostigmina viene ampiamente metabolizzata nell'arco di 2-3 ore, soprattutto per idrolisi da parte delle esterasi plasmatiche; l'escrezione renale riveste un ruolo marginale nella sua eliminazione.

La neostigmina e la piridostigmina vengono scarsamente assorbite in seguito a somministrazione orale; di conseguenza, sono necessarie dosi assai maggiori di quelle richieste per la somministrazione parenterale. Mentre la dose di neostigmina efficace per somministrazione parenterale varia da 0.5 mg a 2 mg, la dose da somministrare per via orale può arrivare a 15-30 mg o più. La neostigmina e la piridostigmina sono distrutte dalle esterasi plasmatiche e gli alcoli quaternari aromatici e i composti affini sono escreti con le urine; l'emivita di questi farmaci è soltanto di 1 o 2 ore (Cohan et al., 1976).

Gli anti-ChE organofosforici che presentano il maggior rischio di tossicità sono liquidi altamente liposolubili; molti di essi hanno un'elevata tensione di vapore. I composti meno volatili, comunemente utilizzati come insetticidi in agricoltura (per es., diazinon, malathion), vengono generalmente dispersi come aerosol o come polveri adsorbite su un materiale inerte, finemente particolato. Di conseguenza, i composti sono rapidamente assorbiti attraverso la cute e le mucose in seguito al contatto con gli aerosol, attraverso i polmoni dopo inalazione e attraverso il tratto GI dopo ingestione (Storm et al., 2000).

Dopo l'assorbimento i composti organofosforici sono escreti quasi completamente come prodotti di idrolisi nelle urine. Le esterasi plasmatiche ed epatiche sono responsabili del processo di idrolisi, che porta alla formazione dei corrispondenti acidi fosforici e fosfonici. Sono coinvolti nel metabolismo anche i CYP responsabili della conversione dei tiofosfati inattivi, contenenti un legame P=S, a fosforati attivi, contenenti un gruppo P=O. Questi enzimi svolgono anche un importante ruolo nella disattivazione di altri agenti organofosforici, e differenze alleliche influenzano la velocità del metabolismo (Furlong, 2007).

Gli agenti organofosforici anti-ChE sono idrolizzati a opera di due famiglie di enzimi: le carbossilesterasi e le paraoxonasi (A-esterasi). Questi enzimi si trovano nel plasma e nel fegato e funzionano da *scavenger* per numerosi organofosforati, scindendo il



fosfoestere, l'anidride, i legami P—F o P—C—N. Le paraoxonasi sono enzimi a basso peso molecolare che richiedono calcio per la catalisi e il cui substrato naturale può essere costituito dai lattoni. Alcuni degli isoenzimi sono associati a lipoproteine ad alta densità e, oltre alla loro capacità di idrolizzare gli organofosfati, possono controllare l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità, esercitando quindi un effetto protettivo nei confronti dell'aterosclerosi (Harel et al., 2004; Mackness et al., 2004). Sono stati scoperti polimorfismi genici che regolano la specificità di substrato per gli organofosfati e la possibile suscettibilità all'aterosclerosi (Costa et al., 2003; Mackness et al., 2004). Esistono ampie variabilità nell'attività della paraoxonasi nelle diverse specie animali. Gli animali giovani sono privi di carbossilesterasi e paraoxonasi: questa osservazione può rendere conto delle variazioni della tossicità correlate con l'età descritte negli animali neonati e che si sospetta siano alla base della comparsa di tossicità nell'uomo (Padilla et al., 2004).

Le carbossilesterasi plasmatiche ed epatiche (aliesterasi) e la butirril-colinesterasi plasmatica sono inibite irreversibilmente dagli organofosfati (Lockridge e Masson, 2000); la loro azione di *scavenger* nei confronti degli organofosfati provvede a una parziale protezione dell'AChE nel sistema nervoso. Le carbossilesterasi catalizzano inoltre l'idrolisi del malathion e di altri organofosfati che contengono un legame carbossil-estere, rendendoli meno attivi o inattivandoli completamente. Poiché le carbossilesterasi sono inibite dagli organofosfati, la tossicità dovuta alla contemporanea esposizione a due insetticidi organofosforici può essere sinergica.

Tossicologia

Gli aspetti tossicologici che riguardano i composti anti-ChE rivestono importanza pratica per il medico. Oltre ai casi di intossicazione accidentale, dovuti all'utilizzo dei composti organofosforici come insetticidi in agricoltura, questi agenti sono stati utilizzati frequentemente per mettere in atto propositi omicidi e suicidi. Le intossicazioni da organofosfati rendono conto dell'80% dei ricoveri ospedalieri per intossicazione da pesticidi. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) considera la tossicità da pesticidi come un problema su scala globale, associato a più di 200 000 morti all'anno; molti dei casi di intossicazione avvengono in Asia Sud-Orientale (Eddleston et al., 2008). L'esposizione occupazionale ha luogo più frequentemente attraverso le vie polmonare e cutanea, mentre i casi di ingestione sono più comuni in caso di avvelenamento non occupazionale.

Negli Stati Uniti l'Environmental Protection Agency (EPA), grazie alla nuova valutazione del rischio (*risk assessment*) e alle leggi per la Food Quality Protection Act del 1996, ha limitato l'utilizzo di diversi insetticidi organofosforici, inclusi il diazinon e il clorpirifos, o ne ha ristretto l'uso e vietato la commercializzazione come prodotti di consumo per la casa e il giardino. Particolare attenzione è stata posta ai bambini, poiché il loro sistema nervoso, ancora in via di sviluppo, è molto suscettibile ad alcuni di questi agenti (Eaton et al., 2008). L'ufficio dell'EPA che si occupa dei pesticidi fornisce continui aggiornamenti sugli insetticidi organofosforici e revisioni della valutazione del rischio attraverso il suo sito web (www.epa.gov/pesticides/op/).

Intossicazione acuta. Gli effetti di un'intossicazione acuta da agenti anti-ChE si manifestano attraverso segni e sintomi di tipo muscarinico e nicotinico e, tranne che per composti assai poco liposolubili, con segni riferibili al SNC (Costa, 2006). Gli effetti sistemici si manifestano entro alcuni minuti dall'esposizione inalatoria di vapori o aerosol. L'insorgenza dei sintomi è ritardata in caso di assorbimento GI o cutaneo. La durata degli effetti è determinata in gran parte dalle proprietà del composto, ovvero dalla sua solubilità lipidica, dal fatto che possa essere attivato dalla paroxo-

nasi, dalla stabilità del legame tra l'organofosfato e l'AChE e dall'eventuale "invecchiamento" dell'enzima fosforilato.

Dopo l'esposizione locale a vapori o aerosol o dopo la loro inalazione, i primi sintomi a comparire sono generalmente di tipo oculare o respiratorio. I sintomi a livello oculare sono costituiti da marcata miopia, dolore oculare, congestione congiuntivale, riduzione della vista, spasmo ciliare e dolore alle sopracciglia. In seguito a un assorbimento sistemico acuto la miopia può non essere evidente in forza di una potente scarica simpatica in risposta all'ipotensione. In aggiunta alla rinorrea e all'iperemia del tratto respiratorio superiore, gli effetti a carico dell'apparato respiratorio consistono in una sensazione di "costrizione" toracica accompagnata da respirazione affannosa, causati dalla combinazione di broncocostrizione e aumento della secrezione bronchiale. I sintomi GI sono i primi a manifestarsi dopo ingestione e comprendono anoressia, nausea e vomito, crampi addominali e diarrea. Le prime manifestazioni sintomatiche che si compaiono dopo assorbimento cutaneo di forme liquide comprendono sudorazione locale e fascicolazione muscolare nelle immediate vicinanze del punto di contatto con la sostanza. L'intossicazione grave si manifesta con intensa salivazione, rilassamento degli sfinteri intestinali e urinari, lacrimazione, sudorazione profusa, erezione del pene, bradicardia e ipotensione.

Gli effetti nicotinici a livello delle giunzioni neuromuscolari consistono generalmente in affaticabilità del muscolo e debolezza generale, contrazioni involontarie, fascicolazioni sparse e, infine, marcato senso di debolezza e paralisi. La più grave conseguenza degli effetti neuromuscolari è la paralisi dei muscoli respiratori. I topi knockout privi del gene che codifica per l'AChE possono sopravvivere in condizioni estremamente controllate e con una speciale dieta, ma manifestano continui tremori e ritardi nella crescita (Xie et al., 2000). I topi a cui sia stata selettivamente inibita l'espressione dell'AChE nel muscolo scheletrico, mantenendone però i livelli di espressione normali nel cervello e negli organi innervati dal sistema nervoso autonomo, possono riprodursi ma hanno tremori continui e una grave compromissione della forza dei muscoli scheletrici. Per contro, topi con riduzione selettiva dell'AChE del SNC, dovuta all'eliminazione degli esoni codificanti varianti di *splicing* o all'espressione di subunità funzionali a loro volta capaci di controllare l'espressione dell'enzima nel cervello, non presentano un fenotipo evidente. Il motivo è legato all'importante riduzione compensatoria della sintesi e dell'accumulo di ACh e all'adattamento delle risposte del recettore (Camp et al., 2008; Dobbertin et al., 2009). Gli studi effettuati dimostrano che i sistemi colinergici nel SNC sono capaci di adattarsi, nel corso dello sviluppo, alla diminuzione cronica della capacità di idrolisi dell'AChE.

L'ampio spettro degli effetti dell'inibizione acuta dell'AChE sul SNC comprende la presenza di stato confusionale, atassia, confusione verbale, perdita dei riflessi, respiro di Cheyne-Stokes, convulsioni generalizzate, coma e paralisi respiratoria centrale. L'azione sui centri vasomotori e su altri centri cardiovascolari del bulbo porta a ipotensione.

La morte dopo una singola esposizione acuta sopraggiunge in un tempo variabile da meno di 5 minuti e 24 ore, in funzione della dose, della via di assorbimento, delle caratteristiche intrinseche del composto e di altri fattori. Il collasso respiratorio è la principale causa di morte, ed è in genere accompagnato da una componente cardiovascolare secondaria. Sia le componenti periferiche nicotinica e muscarinica sia gli stimoli centrali contribuiscono all'instaurarsi della difficoltà respiratoria; i sintomi comprendono laringospasmo, broncocostrizione, aumento delle secrezioni tracheobronchiali e salivari, compromissione del controllo volontario del diaframma e dei muscoli intercostali e depressione respiratoria centrale. La pressione arteriosa può scendere fino a livelli allarmanti, con comparsa di aritmie cardiache. Questi effetti sono di solito il risultato di un'ipossiemia e sono reversibili qualora si intervenga con la ventilazione respiratoria assistita.

I sintomi tardivi compaiono dopo un periodo di tempo compreso tra 1 e 4 giorni e sono caratterizzati da persistente riduzione delle colinesterasi plasmatiche e da grave debolezza muscolare: l'insieme di questi sintomi viene definito *sindrome intermedia* (Lotti, 2002). Dopo un'intossicazione grave si può verificare anche una neurotossicità tardiva (vedi oltre).

Diagnosi e terapia. La diagnosi di grave intossicazione acuta da anti-ChE può essere posta facilmente in base all'anamnesi di esposizione e ai caratteristici segni e sintomi. In caso di sospetta intossicazione acuta di minore entità o di intossicazione cronica la diagnosi può essere posta senz'altro in base alla determinazione dei

* In Italia si può controllare sul sito <http://www.salute.gov.it/fitosanitari/fitosanitari.jsp>. [ultimo accesso: 10/08/2011]. [N.d.C.]



livelli di AChE nel plasma e negli eritrociti (Storm et al., 2000). Sebbene questi valori possano variare ampiamente nella popolazione normale, nel soggetto esposto essi sono normalmente molto ridotti, ben al di sotto dei valori medi normali, anche prima che i sintomi di intossicazione si rendano evidenti.

L'atropina, somministrata a dosi sufficienti (vedi oltre), antagonizza validamente gli effetti a livello dei siti recettoriali muscarinici, tra cui l'aumento della salivazione e delle secrezioni tracheo-bronchiali, la broncocostrizione e la bradicardia, e in misura moderata anche gli effetti centrali e quelli a livello dei gangli periferici. Dosi più elevate sono necessarie per ottenere una sufficiente concentrazione di atropina nel SNC. L'atropina non ha praticamente effetto sulla compromissione neuromuscolare periferica, che può essere contrastata con l'utilizzo della *pralidossima* (2-PAM), un riattivatore delle colinesterasi.

In caso di intossicazione moderata o grave da organofosforici, la dose raccomandata di pralidossima per l'adulto è di 1-2 g per infusione endovenosa nell'arco di non meno di 5 minuti. Se i sintomi di debolezza non scompaiono, oppure se si ripresentano entro 20-60 minuti, la somministrazione va ripetuta alla stessa dose. Il trattamento precoce è essenziale per assicurare che l'ossima raggiunga l'AChE fosforilata quando quest'ultima può essere ancora riattivata. Molti degli alchilfosfati sono estremamente liposolubili e, se si è verificata un'ampia ripartizione nei grassi corporei ed è necessaria una desulfurazione per l'inibizione dell'AChE, la tossicità sarà persistente e i sintomi potranno ripresentarsi dopo il trattamento iniziale. In presenza di un'intossicazione grave da agenti liposolubili è necessario continuare il trattamento con atropina e pralidossima per una settimana o più.

È importante adottare alcune misure generali di supporto, che comprendono:

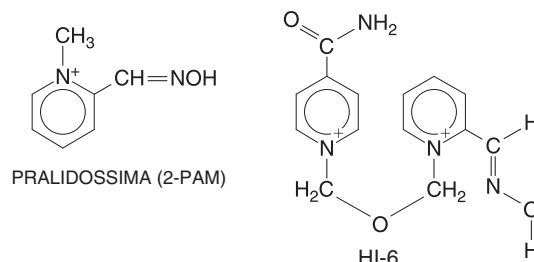
- cessazione dell'esposizione per rimozione del paziente o per applicazione di una maschera antigas (se si è costretti a rimanere nell'ambiente contaminato), rimozione e distruzione degli indumenti contaminati, lavaggio con abbondante acqua della cute o delle mucose contaminate o lavanda gastrica;
- mantenimento della pervietà delle vie aeree del paziente, anche tramite aspirazione endobronchiale;
- respirazione artificiale, con somministrazione di ossigeno se necessario;
- controllo delle convulsioni persistenti con diazepam (5-10 mg per via endovenosa);
- trattamento dello shock.

L'atropina deve essere somministrata a dosi sufficienti a permetterle di attraversare la barriera ematoencefalica. Dopo una prima iniezione di 2-4 mg endovena (se possibile, altrimenti intramuscolo), deve essere somministrata una dose di 2 mg ogni 5-10 minuti finché i sintomi muscarinici non scompaiono o finché non compaiono segni di tossicità da atropina. Il primo giorno di trattamento possono essere necessari fino a 200 mg di atropina. Un moderato livello di blocco atropinico deve essere mantenuto finché perdurano i sintomi muscarinici. I riattivatori delle colinesterasi possono essere di grande aiuto nella terapia dell'intossicazione da anti-ChE (vedi oltre), ma il loro impiego è complementare al trattamento con atropina.

Riattivatori delle colinesterasi. La rigenerazione idrolitica dell'AChE fosforilata è un processo certamente assai lento; tuttavia, alcuni composti nucleofili come le idrossilamine (NH_2OH), gli acidi idrossamici ($\text{RCONH}-\text{OH}$) e le ossime

($\text{RCH}=\text{NOH}$) riattivano l'enzima più rapidamente. Alcuni ricercatori postularono che si potesse ottenere una riattivazione selettiva dell'enzima attraverso l'utilizzo di un nucleofilo con specificità per il sito fosforilato dell'AChE; l'interazione di un azoto quaternario con il sito anionico del centro attivo dell'AChE avrebbe posto il gruppo nucleofilo in giustapposizione con il gruppo fosfato. Questo obiettivo fu raggiunto, con notevole successo, con il composto piridina-2-aldoxime metil-cloridrato (pralidossima); la riattivazione dell'AChE con questo composto avviene a una velocità 1000 volte superiore rispetto all'idrossilamina. L'ossima è orientata prossimalmente in modo da effettuare un attacco nucleofilo sul fosforo; si forma una fosforilossima che libera l'enzima rigenerato (vedi Fig. 10.2E).

Diverse ossime *bis*-quaternarie sono anche più potenti come riattivatori per gli avvelenamenti da insetticidi e da gas nervino (vedi oltre); un esempio è l'HI-6, che viene utilizzato in Europa come antidoto.



La velocità di riattivazione dell'AChE fosforilata da parte delle ossime dipende dalla possibilità di accedere alla serina inserita nel centro attivo (Wong et al., 2000). Inoltre, alcune AChE fosforilate possono subire un rapido processo di "invecchiamento" tale per cui, nell'arco di alcuni minuti o di alcune ore, esse diventano completamente resistenti ai riattivatori. Questo processo è dovuto alla perdita di un gruppo alcossi, che lascia un complesso monoalchil- o monoalcossi-fosforil-AChE molto più stabile (vedi Fig. 10.2D ed E). I composti organofosforici che contengono un gruppo alcossi terziario sono molto più propensi a "invecchiare" rispetto ai congeneri contenenti un gruppo alcossi primario o secondario. Le ossime non sono efficaci nell'antagonizzare la tossicità degli inibitori a struttura carbamica più facilmente idrolizzabili; poiché la pralidossima stessa ha una debole attività anti-ChE, non è indicata per il trattamento del sovradosaggio di neostigmina o fisostigmina o nell'avvelenamento da insetticidi come il carbaril.

Farmacologia, tossicologia ed eliminazione. La reazione di riattivazione delle ossime *in vivo* è più marcata a livello della giunzione neuromuscolare del muscolo scheletrico. In seguito a somministrazione di una dose di un composto organofosforico, tale da produrre un completo blocco della neurotrasmissione, l'iniezione endovena di un'ossima può ripristinare la risposta allo stimolo del nervo motore in pochi minuti. L'effetto antidotico è meno marcato a livello dei siti effettori autonomi, e l'ammonio quaternario ne limita l'ingresso nel SNC (Eddleston et al., 2009).

Sebbene le ossime a dosi elevate o il loro accumulo possano inibire l'AChE e causare un blocco neuromuscolare, esse dovrebbero essere somistrate fino a quando si sia certi dell'eliminazione dell'organofosfato tossico. Molti organofosfati vengono sequestrati dai lipidi e le loro forme attive vengono rilasciate lentamente. La terapia corrente per quanto riguarda l'esposizione agli organofosfati in corso di guerra o attacchi terroristici comprende la somministrazione parenterale di atropina, un'ossima (2-PAM o HI-6) e una benzodiazepina come anticonvulsivante. Le ossime e i loro metaboliti sono velocemente eliminati dal rene.

È in corso di sperimentazione un antidoto costituito da butirril-colinesterasi umana somministrata per via parenterale, al fine di eliminare l'inibitore dell'AChE dal plasma prima che raggiunga i siti tissutali periferici e centrali (Cerasoli et al., 2005). Poiché questi effetti della butirril-colinesterasi sono più stechiometrici che catalitici, sono necessarie grandi quantità dell'agente per ottenere l'effetto desiderato.

Neurotossicità ritardata da composti organofosforici. Alcuni composti organofosforici contenenti fluoro (per es., DFP, mipafox) hanno la proprietà di indurre neurotossicità ritardata, capacità peraltro condivisa con i triarilfosfati, di cui il triortocresilfosfato (*triorthocresyl phosphate*, TOCP) è il classico esempio. Questa sindrome ha ricevuto particolare attenzione dopo che fu dimostrato che il TOCP, un adulterante dello zenzero giamaicano, era stato responsabile di migliaia di casi di paralisi negli Stati Uniti al tempo del proibizionismo.



Il quadro clinico è quello di una grave polineuropatia che si manifesta inizialmente con lievi alterazioni sensitive, atassia, debolezza, affaticamento muscolare, riduzione dei riflessi tendinei e dolorabilità alla palpazione. Nei casi gravi la debolezza può progredire verso la paralisi flaccida e il deterioramento muscolare. Il recupero può richiedere diversi anni e può essere incompleto.

La tossicità che dà origine a questa polineuropatia ritardata non dipende dall'inibizione delle colinesterasi, bensì da una diversa esterasi, detta *esterasi neurotossica* (Johnson, 1993). Questo enzima ha una specificità per gli esteri idrofobici, ma il suo substrato naturale e la sua funzione rimangono sconosciuti (Glynn, 2000). Negli animali da esperimento esposti per lunghi periodi di tempo agli organofosfati sono state riscontrate anche miopatie che sfociano in lesioni necrotiche generalizzate e alterazioni nella citostruttura della placca motrice (De Bleeker et al., 1992).

Usi terapeutici

Attualmente l'utilizzo di agenti anti-AChE per disturbi a carico del sistema nervoso periferico è limitato a quattro specifiche condizioni:

- atonia della muscolatura liscia del tratto intestinale e della vescica urinaria;
- glaucoma;
- miastenia gravis;
- paralisi causata da bloccanti neuromuscolari competitivi (vedi Cap. 11).

Gli inibitori della colinesterasi a lunga durata d'azione e idrofobici sono gli unici inibitori con un'efficacia ben documentata, seppur limitata, nel trattamento dei sintomi della demenza di Alzheimer. La fisostigmina, con la sua breve durata d'azione, è utile nel trattamento dell'intossicazione da atropina e da molti farmaci con effetti collaterali anticolinergici (vedi oltre); la fisostigmina è indicata anche per la terapia dell'atassia di Friedreich e di altre forme congenite di atassia. L'edrofonio è stato utilizzato per porre fine agli attacchi di tachicardia parossistica sopraventricolare.

Agenti terapeutici disponibili. I composti descritti in questo paragrafo sono quelli comunemente usati come farmaci anti-ChE e come riattivatori delle colinesterasi. Le preparazioni farmaceutiche utilizzate solamente per indicazioni oftalmiche verranno descritte nel Capitolo 64. I dosaggi convenzionali e le vie di somministrazione sono discussi più avanti nei paragrafi riguardanti le applicazioni terapeutiche dei diversi farmaci.

Il salicilato di fisostigmina è disponibile per preparazioni iniettabili. Il solfato di fisostigmina è disponibile come pomata oftalmica o come soluzione oftalmica. La piridostigmina bromidrato è disponibile per uso orale o parenterale. Il bromuro di neostigmina è disponibile in formulazione per uso orale, mentre è commercializzato in preparazioni iniettabili per via parenterale il metilsolfato di neostigmina. Il cloruro di ambenonio è disponibile in preparazioni per uso orale. La *tacrina*, il *donepezil*, la *rivastigmina* e la *galantamina* sono stati approvati per la terapia della malattia di Alzheimer.

La pralidossima cloridrato è l'unico riattivatore dell'AChE attualmente disponibile negli Stati Uniti e può essere ottenuto in una formulazione parenterale; l'HI-6 è disponibile in diversi Paesi europei e del Vicino Oriente.

Ileo paralitico e atonia della vescica urinaria. Per il trattamento di entrambe queste condizioni solitamente si preferisce utilizzare, fra gli agenti anticolinesterasici, la neostigmina. Vengono impiegati con il medesimo scopo anche agonisti muscarinici diretti (vedi Cap. 9).

La neostigmina è utilizzata per la risoluzione della distensione addominale e della pseudo-obstruzione acuta del colon dovuta a diverse cause mediche e chirurgiche (Ponac et al., 1999). La dose di neostigmina metilsolfato, generalmente somministrata secondo necessità per iniezione sottocutanea, in caso di ileo paralitico postoperatorio è di 0.5 mg. L'attività peristaltica inizia 10-30 minuti dopo la somministrazione parenterale, mentre sono necessarie 2-4 ore perché si osservi l'effetto dopo somministrazione orale di bromuro di neostigmina (15-30 mg). Può essere necessario facilitare l'evacuazione con un clistere o l'espulsione di gas con un tubo rettale.

In presenza di disuria postoperatoria la neostigmina può venire utilizzata per trattare l'atonìa del muscolo detrusore della vescica e per ridurre l'intervallo di tempo tra l'intervento e la minzione spontanea. Il farmaco è usato alle stesse dosi e per le stesse vie utilizzate nel trattamento dell'ileo paralitico. La neostigmina non dovrebbe essere utilizzata in presenza di occlusione intestinale o vescicale, in caso di peritonite, quando la vitalità dell'intestino è dubbia o quando l'alterata funzionalità dell'intestino dipende da una malattia infiammatoria intestinale.

Glaucoma e altre indicazioni oftalmiche. Il glaucoma è una condizione patologica caratterizzata dall'aumento della pressione intraoculare che, se sufficientemente alta e persistente, può causare un danno del disco ottico presso la giunzione tra nervo ottico e retina con conseguente cecità irreversibile. Dei tre tipi di glaucoma (primario, secondario e congenito), il primario e alcuni tipi di secondario (per es., glaucoma conseguente a estrazione di cataratta) sono trattabili con farmaci anti-AChE; il tipo congenito, invece, non risponde in genere ad alcuna terapia a eccezione dell'intervento chirurgico. Il glaucoma primario può essere distinto in glaucoma ad angolo acuto (acuto congestivo) o ad angolo aperto (semplice cronico) in base alla configurazione dell'angolo della camera interna dove avviene il riassorbimento dell'umor acqueo.

Il glaucoma ad angolo acuto è quasi sempre un'emergenza medica in cui il farmaco è necessario per controllare i sintomi della fase acuta, ma in cui l'intervento chirurgico (per es., iridectomia periferica o completa) è la forma di terapia più indicata. Il glaucoma ad angolo aperto, invece, ha un'insorgenza più graduale e insidiosa e normalmente non è trattabile chirurgicamente; per questo tipo di glaucoma il controllo della pressione intraoculare può essere di norma effettuato solo mediante una terapia farmacologica.

Poiché gli agonisti colinergici e gli inibitori delle colinesterasi bloccano anche l'accomodazione e inducono miopia, quando instillati nell'occhio essi producono perdita transitoria della visione da lontano, limitazione dell'acuità visiva in condizioni di scarsa illuminazione e perdita della visione laterale. In caso di somministrazione prolungata la compromissione della visione indotta da questi agenti diminuisce. Ciò nonostante, altri farmaci privi di questi effetti collaterali, come gli antagonisti dei recettori β -adrenergici, gli analoghi delle prostaglandine o gli inibitori dell'anidrasa carbonica, sono considerati di prima scelta per la terapia locale del glaucoma ad angolo aperto (Alward, 1998), mentre gli inibitori dell'AChE sono di norma riservati alle situazioni croniche, quando i pazienti divengono refrattari agli altri farmaci. I trattamenti topici con inibitori delle colinesterasi a lunga durata d'azione, come l'ecotiofato, causano la comparsa dei sintomi caratteristici dell'inibizione sistemica. Il trattamento con ecotiofato nel glaucoma in stato avanzato può essere associato alla comparsa di cataratta (Alward, 1998).

I farmaci anti-ChE sono stati impiegati in diverse patologie a carattere oftalmologico meno comuni, tra cui l'esotropia accomodativa e la miastenia gravis limitata ai muscoli extraoculari e delle palpebre. La sindrome di Adie (o pupilla tonica) deriva dall'alterazione funzionale del corpo ciliare, forse a causa di una degenerazione nervosa locale. Basse concentrazioni di fisostigmina permettono di ridurre l'offuscamento della vista e il dolore oculare associati a questa condizione. L'uso di un farmaco anti-ChE ad azione breve, in alternativa a un farmaco miadriatico come l'atropina, è utile nei casi di adesione tra l'iride e il cristallino o la cornea. (Per una discussione completa dell'uso dei farmaci anti-ChE in terapia oftalmica si rimanda al Capitolo 64).

Miastenia gravis. La miastenia gravis è una patologia neuromuscolare caratterizzata da elevata affaticabilità dei muscoli sche-



lettrici (Drachman, 1994); si osservano frequentemente sia remissioni parziali sia aggravamenti. La somiglianza tra i sintomi della miastenia gravis e quelli dell'intossicazione da curaro negli animali suggerì a Jolly che la fisostigmina, composto in grado di antagonizzare il curaro, potesse essere un utile agente terapeutico. Trascorsero tuttavia 40 anni prima che il suggerimento di Jolly fosse sistematicamente valutato mediante sperimentazione clinica.

Il deficit che conduce alla miastenia gravis riguarda la trasmissione sinaptica alla giunzione neuromuscolare. Quando il nervo motore di un soggetto normale è stimolato elettricamente alla frequenza di 25 Hz, le risposte elettriche e meccaniche sono ben mantenute. Esiste un buon margine di sicurezza per il mantenimento della trasmissione neuromuscolare. Le risposte iniziali del paziente miastenico possono essere normali, ma decadono rapidamente in accordo con il rapido affaticamento muscolare osservato nei pazienti.

L'importanza relativa di alterazioni pre- e postgiunzionali fu al centro di un sostenuto dibattito, finché Patrick e Lindstrom osservarono che conigli immunizzati con il recettore nicotinico isolato dall'*Electrophorus electricus* (lampreda) sviluppavano col tempo debolezza muscolare e difficoltà respiratorie con sintomi simili a quelli della miastenia gravis. I conigli, inoltre, mostravano una risposta che diminuiva nel tempo in seguito alla stimolazione nervosa ripetuta, una maggiore sensibilità al curaro e, in seguito alla somministrazione di agenti anti-AChE, un miglioramento sintomatologico ed elettrofisiologico della trasmissione neuromuscolare. Questo modello animale ha spinto a condurre una serie di ricerche volte a stabilire se la malattia fosse dovuta a una risposta autoimmune diretta contro i recettori dell'ACh. Anticorpi anti-recettore sono oggi identificabili nel 90% dei pazienti con miastenia gravis, anche se il quadro clinico non è correlato al titolo anticorpale (Drachman, 1994; Lindstrom, 2000). Le sequenze che costituiscono la principale regione immunogenica e la loro posizione nella struttura della subunità $\alpha 1$ del recettore sono ben definite (Lindstrom, 2008).

Il quadro che emerge è quello di una malattia causata da una risposta autoimmune diretta principalmente contro i recettori dell'ACh a livello della placca postgiunzionale. Gli anticorpi provocano una riduzione del numero dei recettori rilevabile sia con il saggio di legame dell' α -neurotossina di serpente (Fambrough et al., 1973), sia con la misurazione elettrofisiologica della sensibilità all'ACh (Drachman, 1994). Nello spazio intersinaptico compaiono immunocomplessi associati a marcate anomalie ultrastrutturali, che accelerano la degradazione dei recettori attraverso una lisi mediata dal complemento a livello della placca motrice. Una patologia correlata alla miastenia gravis e che implica una trasmissione neuromuscolare compromessa è la sindrome di Lambert-Eaton. In questo caso gli autoanticorpi sono diretti contro i canali del Ca^{2+} , che sono necessari per il rilascio presinaptico dell'ACh (Lang et al., 1998).

In un sottogruppo di soggetti, pari a circa il 10% dei pazienti con sindrome miastenica, la debolezza muscolare ha base congenita anziché autoimmune. La caratterizzazione biochimica e molecolare di questi casi ha dimostrato che in alcuni di essi la causa della sindrome clinica consiste in una mutazione del recettore per l'ACh che riduce l'affinità di legame per la stessa ACh, così come la cinetica e la durata di apertura del canale (Engel et al., 2008; Sine ed Engel, 2006). Altre mutazioni si manifestano come deficit della forma di AChE che presenta una coda simile al collagene. Come previsto, la somministrazione di agenti anti-ChE (vedi oltre) non produce miglioramenti soggettivi nella maggior parte dei pazienti con miastenia congenita, sebbene alcune delle patologie sopra descritte che colpiscono il complesso recettore-canale possano trarre giovamento dal trattamento farmacologico.

Diagnosi. Sebbene la diagnosi di miastenia gravis di origine autoimmune venga solitamente effettuata in base alla storia clinica, ai segni e ai sintomi, si pone il difficile problema della diagnosi differenziale con diverse malattie neurasteniche, infettive, endocrine, congenite, neoplastiche e neuromuscolari degenerative. Tuttavia, la miastenia gravis è l'unica affezione che può beneficiare significativamente del trattamento con farmaci anti-ChE. Il test dell'edrofonio per la valutazione della miastenia gravis viene effettuato con l'iniezione endovenosa di 2 mg di cloruro di edrofonio, seguita 45 secondi dopo da una seconda iniezione di 8 mg se la prima dose non ha avuto effetto; la risposta positiva consiste in un breve

miglioramento della forza muscolare non accompagnato da fascicolazione linguale (un sintomo normalmente presente in soggetti non miastenici).

Una dose eccessiva di un farmaco anti-ChE comporta una *crisi colinergica*. Questa condizione è caratterizzata da debolezza che deriva dalla depolarizzazione generalizzata della placca motrice; altri effetti caratteristici sono legati alla sovrastimolazione dei recettori muscarinici. La debolezza risultante dalla depolarizzazione della placca motrice può somigliare alla debolezza miastenica, che si manifesta in caso di insufficiente dosaggio del farmaco anti-ChE. La distinzione riveste un'importanza pratica evidente in quanto nel primo caso l'indicazione è la sospensione del trattamento, mentre nel secondo è la somministrazione del farmaco. Quando il test dell'edrofonio è eseguito con molta cautela, mantenendo la dose a 2 mg e assicurandosi la disponibilità immediata di attrezzature per la rianimazione, un'ulteriore riduzione della forza muscolare indica crisi colinergica, mentre un miglioramento dimostra debolezza miastenica. Se interviene una grave crisi muscarinica, deve essere immediatamente somministrato solfato di atropina alla dose di 0.4-0.6 mg o più per via endovenosa (per maggiori dettagli vedi Drachman, 1994, e Osserman et al., 1972). Il riscontro di anticorpi anti-recettore nelle biopsie muscolari o nel plasma è oggi un criterio ampiamente adottato per formulare la diagnosi.

Terapia. La piridostigmina, la neostigmina e l'ambenonio sono i farmaci anti-ChE classicamente usati nel trattamento sintomatico della miastenia gravis. Tutti sono in grado di incrementare la risposta del muscolo miastenico a impulsi nervosi ripetuti, soprattutto grazie alla conservazione dell'ACh endogena. In seguito all'inibizione dell'AChE, i recettori di una porzione più ampia della placca sono esposti a una concentrazione di ACh sufficiente a provocare l'apertura dei canali ionici e a produrre un potenziale di placca post-sinaptico.

Dopo aver posto la diagnosi di miastenia gravis, la dose orale singola ottimale di anti-ChE deve essere determinata empiricamente. Vengono effettuate misurazioni basali della forza prensile, della capacità vitale e di una serie di segni e sintomi che rispecchiano la forza di vari gruppi muscolari. Al paziente viene quindi somministrata una dose orale di piridostigmina (30-60 mg), neostigmina (7.5-15 mg) o ambenonio (2.5-5 mg). Il miglioramento della forza muscolare e di altri segni e sintomi viene registrato a diversi intervalli di tempo, finché i parametri non ritornano ai valori basali. Dopo un'ora o più allo stato basale, la somministrazione del farmaco viene ripetuta a concentrazioni da una volta a una volta e mezza superiori a quelle iniziali e vengono ripetute le stesse osservazioni. La sequenza ora descritta viene ripetuta con aumenti del 50% della dose iniziale del farmaco finché non si ottiene una risposta ottimale.

La durata d'azione di questi farmaci è tale che l'intervallo tra le dosi orali richiesto per poter mantenere la forza muscolare è solitamente di 2-4 ore per la neostigmina, 3-6 ore per la piridostigmina e 3-8 ore per l'ambenonio. Tuttavia, le dosi necessarie possono variare da un giorno all'altro; stress emotivi o fisici, infezioni in atto e mestruazioni in genere richiedono un aumento delle dosi o un aumento della frequenza di somministrazione. Vi possono essere aggravamenti o remissioni dello stato miastenico che sono imprevedibili e che richiedono un'opportuna correzione del dosaggio. La piridostigmina è disponibile in compresse a rilascio differenziato che contengono in totale 180 mg di farmaco. I primi 60 mg vengono rilasciati immediatamente, mentre i successivi 120 mg vengono rilasciati lentamente nel corso di alcune ore; questo tipo di preparazione permette di controllare i pazienti per 6-8 ore, ma la compressa dovrebbe essere assunta solo al momento di coricarsi. Gli effetti muscarinici, cardiovascolari e gastrointestinali di questi farmaci possono essere facilmente controllati dall'atropina e da altri anticolinergici (vedi Cap. 9). D'altra parte, questi farmaci anticolinergici mascherano molti degli effetti collaterali di un'eccessiva dose di un anticolinesterasico. In molti pazienti si sviluppa col tempo una tolleranza agli effetti muscarinici. Numerosi farmaci, tra cui i composti curarici, alcuni antibiotici e gli anestetici generali, interferiscono con la trasmissione neuromuscolare (vedi Cap. 11); la loro somministrazione in pazienti con miastenia gravis richiede l'aggiustamento del dosaggio del farmaco anti-ChE e altre precauzioni.

Altre misure terapeutiche sono elementi essenziali nella gestione di questa malattia. I glucocorticoidi producono un miglioramento clinico in una grande percentuale di pazienti. Tuttavia, il trattamento prolungato con steroidi comporta



un'elevata incidenza di effetti indesiderati (vedi Cap. 42). Per minimizzare gli effetti collaterali si deve diminuire gradualmente la dose di steroidi e utilizzare regimi a giorni alterni con steroidi a breve durata d'azione. L'inizio della terapia con steroidi comporta un aumento della debolezza muscolare; tuttavia, quando grazie al trattamento continuo con steroidi il paziente migliora, le dosi di farmaco anti-ChE possono essere diminuite (Drachman, 1994). Altri farmaci immunosoppressivi come l'azatioprina e la ciclosporina si sono dimostrati efficaci in alcuni casi di patologia avanzata (vedi Cap. 35).

Se la miastenia è associata alla presenza di un timoma e i sintomi non sono controllati dal trattamento con anti-ChE o steroidi, occorre considerare la possibilità di intervenire asportando chirurgicamente il timo. I rischi e benefici dell'approccio chirurgico rispetto al trattamento con anti-ChE e glucocorticoidi devono essere attentamente soppesati. Poiché il timo contiene cellule mioidi con recettori nicotinici (Schluep et al., 1987) e la maggior parte dei pazienti presenta alterazioni timiche, il timo potrebbe essere responsabile della patogenesi iniziale. Esso è anche la fonte di cellule T helper autoreattive.

In accordo con la presunta eziologia autoimmune della miastenia gravis, la plasmateresi e la terapia immunitaria hanno ottenuto buoni risultati in pazienti che erano rimasti disabili nonostante gli altri trattamenti (Drachman, 1994, 1996). Il miglioramento della forza muscolare risulta correlato alla diminuzione del titolo degli anticorpi diretti contro il recettore colinergico nicotinico.

Profilassi nell'avvelenamento da inibitori delle colinesterasi. Studi sperimentali condotti su animali da laboratorio hanno dimostrato che il pretrattamento con piridostigmina riduce la frequenza di compromissione fisica e mortalità legate all'avvelenamento da gas nervini, in particolare per quegli agenti associati a un rapido "invecchiamento" dell'enzima come il soman. Il primo caso di somministrazione su vasta scala di piridostigmina all'uomo risale al 1990 in previsione di un attacco con agenti nervini durante la prima guerra del Golfo Persico. In seguito alla somministrazione di una dose orale di 30 mg ogni 8 ore vi fu un'incidenza di effetti collaterali dell'1%, mentre solo nello 0.1% dei soggetti fu necessaria la sospensione del trattamento a causa di effetti collaterali giudicati intollerabili anche nel particolare frangente militare (Keeler et al., 1991). Il follow-up a lungo termine ha evidenziato, nei veterani della guerra del Golfo Persico che avevano assunto piridostigmina, una bassa incidenza della sindrome neurologica denominata *sindrome della guerra del Golfo Persico*. Questa sindrome è caratterizzata da difficoltà cognitive, atassia, confusione mentale, mioneuropatia, adenopatia, affaticamento muscolare e incontinenza (Haley et al., 1997; Institute of Medicine, 2003). Sebbene la piridostigmina sia stata presa in considerazione come uno dei possibili fattori causali, l'assenza della neuropatia in pazienti miastenici trattati con piridostigmina rende più verosimile l'ipotesi che la combinazione di altri agenti, compresi gli organofosfati comburi e i repellenti contro gli insetti, in associazione con la piridostigmina, abbia contribuito allo sviluppo di questa sindrome persistente. È anche difficile distinguere la tossicità chimica residua dallo stress post-traumatico che viene vissuto in seguito a un'azione di combattimento. La piridostigmina è approvata dalla FDA per la profilassi contro il soman, un organofosfato che va incontro rapidamente a un processo di stabilizzazione ("invecchiamento") dell'enzima fosforilato.

Intossicazione da farmaci anticolinergici. Oltre all'atropina e ad altri agenti muscarinici, molti altri farmaci, come le fenotiazine, gli antistaminici e gli antidepressivi triciclici, sono dotati di attività anticolinergica sia a livello centrale sia a livello periferico. La fisostigmina è potenzialmente utile per contrastare la sindrome anticolinergica a carico del SNC causata da un sovradosaggio o da una reazione inaspettata a questi farmaci (Nilsson, 1982). L'effettiva capacità della fisostigmina di antagonizzare gli effetti anticolinergici di queste sostanze è stata chiaramente documentata. Tuttavia, altri effetti tossici degli antidepressivi triciclici e delle fenotiazine (vedi Capp. 15 e 16), come il deficit di conduzione intraventricolare e le aritmie ventricolari, non sono antagonizzati dalla fisostigmina. Inoltre, il farmaco può scatenare un attacco epilettico; pertanto, è sempre opportuno soppesare il potenziale beneficio rispetto ai rischi. La dose iniziale di fisostigmina consigliata è di 2 mg per via endovenosa, con eventuali somministrazioni successive se necessario. La fisostigmina è un'ammina terziaria e pertanto, contrariamente ai farmaci anti-ChE contenenti un ammonio quaternario, attraversa la barriera ematoencefalica. L'impiego degli anti-ChE per contrastare l'effetto di bloccanti neuromuscolari competitivi è discusso nel Capitolo 11.

Malattia di Alzheimer. Nei pazienti affetti da demenza progressiva di tipo Alzheimer è stata osservata la perdita di neuroni colinergici,

soprattutto di quelli localizzati in aree sottocorticali, come il nucleo basale di Meynert (vedi Cap. 22). Perseguendo una logica simile a quella seguita per altre malattie degenerative del SNC, è stata investita una terapia volta ad aumentare le concentrazioni di neurotransmettitori colinergici nel SNC.

Nel 1993 la FDA ha approvato l'uso della tacrina (tetraidrossi-aminoacridina) nelle forme lievi e moderate della malattia di Alzheimer, ma l'elevata incidenza di aumento dei livelli di alanina aminotrasferasi (ALT) e di epatotossicità ha limitato l'utilità di questo farmaco.

In seguito è stato approvato l'uso di donepezil, che migliora le capacità cognitive dopo 21-81 settimane di trattamento (Dooley e Lamb, 2000). In studi a lungo termine il farmaco ha dimostrato di rallentare la progressione dei sintomi della malattia per periodi superiori alle 55 settimane. Gli effetti indesiderati sono per la maggior parte attribuibili a un'eccessiva stimolazione colinergica: i più frequentemente riportati sono nausea, diarrea e vomito. Il farmaco è ben tollerato quando somministrato in singola dose giornaliera. Normalmente una singola dose da 5 mg viene somministrata al momento di coricarsi; se questa dose è ben tollerata, può essere aumentata a 10 mg al giorno.

La rivastigmina, un inibitore a struttura carbamica a lunga durata d'azione, è approvata negli Stati Uniti e in Europa. Nonostante per quest'ultimo farmaco sia stato condotto un numero minore di studi, l'efficacia, la tollerabilità e gli effetti indesiderati sono risultati molto simili a quelli del donepezil (Corey-Bloom et al., 1998; Giacobini, 2000). La galantamina è un altro inibitore dell'AChE approvato dalla FDA. Questo farmaco ha uno spettro di effetti collaterali simile a quello del donepezil e della rivastigmina.

Questi tre inibitori delle colinesterasi, che hanno l'affinità e l'idrofobicità adatte per attraversare la barriera ematoencefalica e che mostrano una durata d'azione prolungata, costituiscono insieme alla memantina, attiva sul recettore degli aminoacidi eccitatori, le strategie terapeutiche correnti. Questi farmaci non modificano il decorso della patologia e non hanno effetti ben documentati sui correlati neuropatologici della malattia di Alzheimer. Tuttavia, l'insieme delle evidenze cliniche indica che essi rallentano per qualche tempo il declino delle funzioni cognitive e delle manifestazioni comportamentali (vedi Cap. 22). I sintomi associati, come per esempio la depressione, possono essere preferenzialmente ritardati (Lu et al., 2009). Gli sforzi della ricerca clinica attuale sono volti a ottenere effetti sinergici attraverso il blocco dei processi neuroinfiammatori o della neurodegenerazione e la combinazione dell'inibizione della colinesterasi con la modulazione selettiva dei recettori colinergici.

Bibliografia

- Alward WLM. Medical management of glaucoma. *N Engl J Med*, **1998**, 339:1298-1307.
- Baron RL. Carbamate insecticides. In, *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 3. (Hayes WJ Jr., Laws ER Jr., eds.) Academic Press, San Diego, **1991**, pp. 1125-1190.
- Bourne Y, Marchot P, Taylor P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculins: crystal structure of the complex. *Cell*, **1995**, 83:493-506.
- Burkhart CG. Relationship of treatment resistant head lice to the safety and efficacy of pediculicides. *Mayo Clin Proc*, **2004**, 79:661-666.
- Camp S, DeJaco A, Zhang L, et al. Acetylcholinesterase expression in muscle is specifically controlled by a promoter selective enhancer in the first intron. *J Neurosci*, **2008**, 28:2459-2470.



- Cerasoli DM, Griffiths EM, Doctor BP, et al. In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent scavenger. *Chem Biol Interactions*, **2005**, 157:158:363–365.
- Cohan SL, Pohlmann JLW, Mikszewski J, O'Doherty DS. The pharmacokinetics of pyridostigmine. *Neurology*, **1976**, 26:536–539.
- Corey-Bloom J, Anand R, Veach J. A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int J Psychopharmacol*, **1998**, 1:55–65.
- Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*, **2006**, 366:1–13.
- Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Polymorphisms of paraoxonase and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol*, **2003**, 41:37–45.
- Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **2004**, 351:56–67.
- Cyglar M, Schrag J, Sussman JL, et al. Relationship between sequence conservation and three dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci*, **1993**, 2:366–382.
- De Bleeker J, Willems J, De Reuck J, Santens P, Lison D. Histological and histochemical study of paraoxon myopathy in the rat. *Acta Neurol Belg*, **1991**, 91:255–70.
- Dobbertin A, Hrabouska A, Dembele K, et al. Targeting acetylcholinesterase in neurons: A dual processing function for the praline rich membrane anchor and the attachment domain of the catalytic subunit. *J Neurosci*, **2009**, 29:4519–4530.
- Dooley M, Lamb HM Donepezil: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*, **2000**, 16:199–226.
- Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med*, **1994**, 330:1797–1810.
- Drachman DB. Immunotherapy in neuromuscular disorders: Current and future strategies. *Muscle Nerve*, **1996**, 19:1239–1251.
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Clin Rev Toxicol*, **2008**, 38:1–125.
- Ecobichon DJ. Carbamates. In, *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, 2nd ed. (Spencer, PS, Schauburg HH, eds.) Oxford University Press, New York, **2000**.
- Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AR. Management of acute organophosphorous pesticide poisoning. *Lancet*, **2008**, 371:597–607.
- Eddleston M, Eyer P, Worek F, Juszczak E, et al. Pralidoxime in acute organophosphorus insecticide poisoning—a randomized controlled trial. *PLoS Med*, **2009**, 6: e1000104.
- Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Sine SM. Further observations in congenital myasthenic syndromes. *Ann NY Acad Sci*, **2008**, 1132:104–113.
- Fambrough DM, Drachman DB, Satyamurti S. Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. *Science*, **1973**, 182:293–295.
- Froede HC, Wilson IB. Acetylcholinesterase. In, *The Enzymes*, vol. 5. (Boyer PD, ed.) Academic Press, New York, **1971**, pp. 87–114.
- Furlong CE. Genetic variability in the cytochrome P450– paraoxonase 1 pathway for detoxication of organophosphorus compounds. *J Biochem Molec Toxicol*, **2007**, 21:197–205.
- Gallo MA, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. In, *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 2. (Hayes WJ Jr., Laws ER Jr., eds.) Academic Press, San Diego, CA, **1991**, pp. 917–1123.
- Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: From the Calabar bean to Alzheimer's therapy. In, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. (Giacobini E, ed.) Martin Dunitz, London, **2000**, pp. 181–227.
- Glynn P. Neural development and neurodegeneration: Two faces of neuropathy target esterase. *Prog Neurobiol*, **2000**, 61:61–74.
- Haley RW, Kurt TL, Hom J. Is there a Gulf War syndrome? *JAMA*, **1997**, 277:215–222.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, **2004**, 11:412–419.
- Holmstedt B. Cholinesterase inhibitors: an introduction. In, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. (Giacobini E, ed.) Martin Dunitz, London, **2000**, pp. 1–8.
- Institute of Medicine (National Academy of Science–USA). *Gulf War and Health Volume 2*, National Academies Press, Washington, DC, **2003**.
- Jennings LL, Malecki M, Komives EA, Taylor P. Direct analysis of the kinetic profiles of organophosphate-acetylcholinesterase adducts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochemistry*, **2003**, 42:11083–11091.
- Johnson MK. Symposium introduction: retrospect and prospects for neuropathy target esterase (NTE) and the delayed polyneuropathy (OPIDP) induced by some organophosphorus esters. *Chem Biol Interact*, **1993**, 87:339–346.
- Karczmar AG. History of the research with anticholinesterase agents. In, *Anticholinesterase Agents*, vol. 1, *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, section 13. (Karczmar AG, ed.) Pergamon Press, Oxford, **1970**, pp. 1–44.
- Keeler JR, Hurst CG, Dunn MA. Pyridostigmine used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. *JAMA*, **1991**, 266:693–695.
- Lang B, Waterman S, Pinto A, et al. The role of autoantibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann NY Acad Sci*, **1998**, 841:596–605.
- Lindstrom JM. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve*, **2000**, 23:453–477.
- Lindstrom JM. Myasthenia gravis and the tops and bottoms of AChRs—antigenic structure of the MIR and specific immunosuppression of EAMG using AChR cytoplasmic domains. *Ann NY Acad Sci*, **2008**, 1132:29–41.
- Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, et al. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem*, **1987**, 262:549–557.
- Lockridge O, Masson P. Pesticides and susceptible populations: People with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, **2000**, 21:113–126.
- Lotti M. Low-level exposures to organophosphorus esters and peripheral nerve function. *Muscle Nerve*, **2002**, 25:492–504.
- Lu PH, Edland SD, Teng E, et al. Donepezil delays progression of A.D. in MCI subjects with depressive symptoms. *Neurology* **2009**, 72:2115–2212.
- Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, **2004**, 15:399–404.
- Markesbery WR (ed.). *Neuropathology of Dementing Disorders*. Arnold, London, **1998**.
- Massoulié J. Molecular forms and anchoring of acetylcholinesterase. In, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. (Giacobini E, ed.) Martin Dunitz, London, **2000**, pp. 81–103.
- Nilsson E. Physostigmine treatment in various drug-induced intoxications. *Ann Clin Res*, **1982**, 14:165–172.
- Nozaki H, Aikawa N. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet*, **1995**, 346:1446–1447.
- Osserman KE, Foldes FF, Genkins G. Myasthenia gravis. In, *Neuromuscular Blocking and Stimulating Agents*, vol. 11, *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, section 14. (Cheymol J, ed.) Pergamon Press, Oxford, **1972**, pp. 561–618.
- Padilla S, Sung HJ, Moser VC. Further assessment of an in vitro screen that may help identify organophosphate insecticides that are more acutely toxic to the young. *J Toxicol Environ Health*, **2004**, 67:1477–1489.
- Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science*, **1973**, 180:871–872.
- Ponec RJ, Saunders MD, Kimmey MB. Neostigmine for the treatment of acute colonic pseudo-obstruction. *N Engl J Med*, **1999**, 341:137–141.
- Reiner E, Radic' Z. Mechanism of action of cholinesterase inhibitors. In, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. (Giacobini E, ed.) Martin Dunitz, London, **2000**, pp. 103–120.





II.72

© 978-88-08-17904-3

- Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **1975**, *43*:103–218.
- Schluep M, Wilcox N, Vincent A, *et al.* Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: An immunohistological study. *Ann Neurol*, **1987**, *22*:212–222.
- Schumacher M, Camp S, Maulet Y, *et al.* Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, **1986**, *319*:407–409.
- Silman I, Sussman JL. Structural studies on acetylcholinesterase. In, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. (Giacobini E, ed.) Martin Dunitz, London, **2000**, pp. 9–26.
- Sine SM, Engel AG. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature (London)* **2006**, *440*:448–455.
- Storm JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicology*, **2000**, *150*:1–29.

- Sussman JL, Harel M, Frolow F, *et al.* Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **1991**, *253*:872–879.
- Taylor P, Luo ZD, Camp S. The genes encoding the cholinesterases: structure, evolutionary relationships and regulation of their expression. In, *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. (Giacobini E, ed.) Martin Dunitz, London, **2000**, pp. 63–80.
- Taylor P, Radic´ Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1994**, *34*:281–320.
- Wong L, Radic´ Z, Bruggemann RJ, *et al.* Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis. *Biochemistry*, **2000**, *39*:5750–5757.
- Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, *et al.* Postnatal development delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther*, **2000**, *293*:892–902.

SEZIONE II

NEUROFARMACOLOGIA

