



Università degli Studi di Genova

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

**LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE**

TESI SPERIMENTALE DI LAUREA

Nuove 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazolo-6-
carbossammidi quali potenziali agenti antinfiammatori e
antitumorali

Relatore: Prof.ssa Chiara Brullo *Chiara Brullo*

Correlatore: Prof.ssa Maria Grazia Signorello *Maria Grazia Signorello*

Candidato: Giulia Mezzotero

Anno accademico: 2020/2021

1. Introduzione

1.1 p38MAPK: struttura e attività.

Le MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) sono enzimi largamente presenti nell'organismo e coinvolti in numerosi processi fisiologici e patologici. In dettaglio sono serina-treonina chinasi che, fosforilano i loro substrati a livello di tali amminoacidi quando sono seguiti da un residuo di prolina [1].

Nonostante mantengano il 60-70% di omologia sequenziale, è possibile identificare vari tipi di MAPKs, che si differenziano, oltre che per il loro peso molecolare, a livello del loop di attivazione. La prima classificazione suddivide le MAPKs in convenzionali ed atipiche; nel primo gruppo rientrano ERK1/2, JNK e p38, mentre nel secondo ERK3/4 e NLK [1, 2].

In particolare, p38 rappresenta un target farmacologico molto interessante, essendo una proteina coinvolta in varie risposte cellulari come la modifica dell'espressione genica, il controllo della mitosi, della motilità, della sopravvivenza, dell'apoptosi e del differenziamento cellulare.

La struttura di p38 è caratterizzata da due catene separate dal sito catalitico: nel dominio N-terminale è presente una tasca di legame per l'ATP, mentre nel dominio C-terminale si trova un residuo catalitico importante per il trasferimento del gruppo fosfato al substrato [3].

Sono state identificate quattro isoforme dell'enzima:

- 1) p38 α , considerata ubiquitaria, presente in cervello, fegato, muscoli, intestino e varie ghiandole;
- 2) p38 β , isolata nel cervello;
- 3) p38 γ , espressa soprattutto nel muscolo scheletrico;
- 4) p38 δ , tipica di pancreas, intestino tenue e testicoli.

p38 α e p38 β hanno un'omologia del 75%, mentre p38 γ e p38 δ , del 70%. Inoltre, p38 α e β si distinguono dalle altre due per la sensibilità ad alcuni inibitori, come SB203580 (Figura 1A), molecola a struttura piridinil imidazolica, che blocca l'ingresso dell'ATP nella tasca di legame.

La Thr106, presente nella tasca di p38 α e p38 β , interagisce con un atomo di fluoro e permette l'ingresso dell'inibitore; al corretto orientamento dell'inibitore concorrono anche l'His107 e la Leu108 (Figura 1B). Nella tasca di p38 γ e p38 δ SB203580 non riesce ad esplicare la sua azione in quanto al posto della treonina si trova una metionina che impedisce il legame della molecola. Tali differenze, unite al diverso pattern di espressione hanno portato a ipotizzare l'esistenza di funzioni specifiche per le due sottocategorie [1].

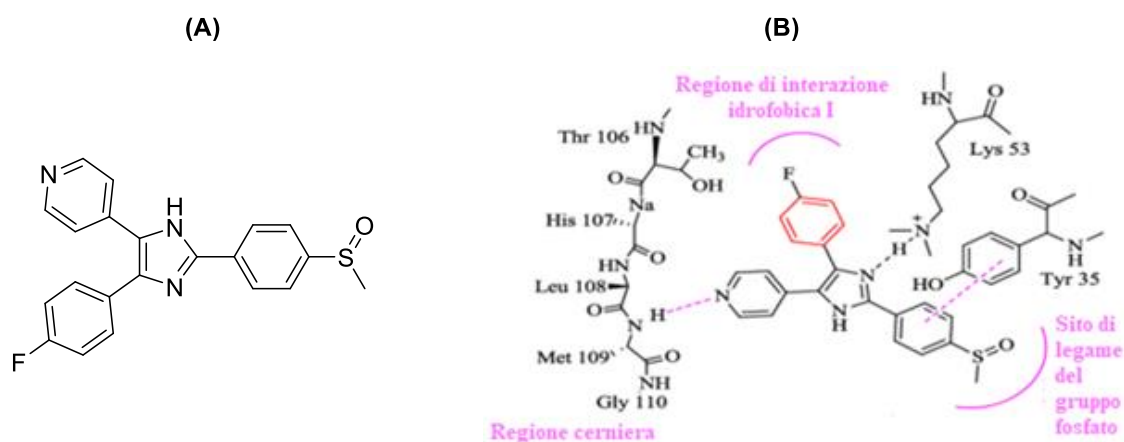


Figura 1: (A) Formula di struttura di SB203580. (B) Rappresentazione delle sue interazioni nel sito di legame.

L'attivazione di p38 è correlata alla stimolazione di recettori associati a proteine G, recettori per i fattori di crescita e per le citochine e recettori in grado di rilevare condizioni di stress ambientale (stress ossidativo, ipossia, radiazioni UV, iperosmolarità, etc.) e di genotossicità.

In seguito, la risposta intracellulare si manifesta tramite l'azione sequenziale di più chinasi: le MAPKKK, attivate per fosforilazione o per interazione con proteine leganti il GTP appartenenti alla famiglia Ras/Rho, fosforilano, su residui di serina e treonina, le MAPKK (in particolare MKK3 e MKK6), che agiscono su p38 attuando una doppia fosforilazione sul dominio treonina-glicina-tirosina, presente nel loop di attivazione. Tale modifica di p38 genera un

cambio conformazionale, che altera la disposizione dei domini N- e C-terminale, rendendo il sito catalitico più accessibile per il substrato e aumentando di conseguenza l'attività enzimatica (Figura 2).

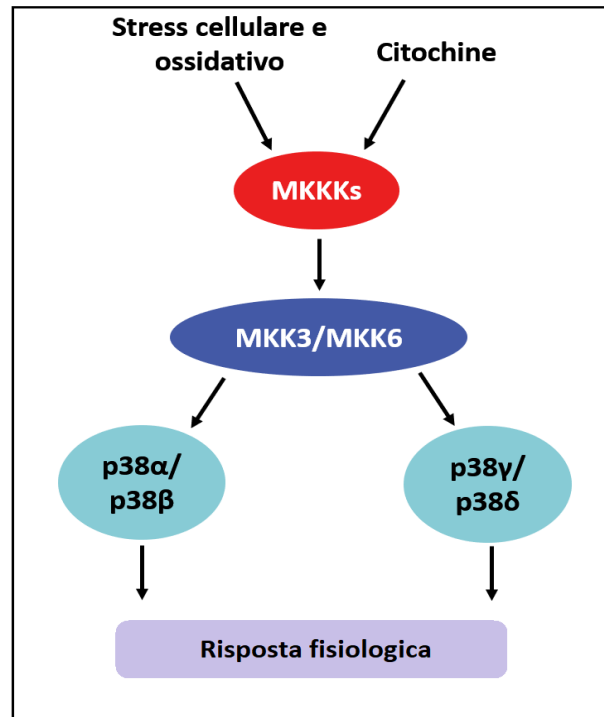


Figura 2: Pathway di attivazione di p38.

Studi presenti in letteratura [1,4] riportano però anche meccanismi di attivazione indipendenti da MKK: è stato osservato che p38 può subire un'auto-fosforilazione in seguito all'interazione con TAB-1. Tale proteina è un substrato di p38 e, una volta fosforilata, può legarsi a TAK-1, un MAPKKK, inibendola, attuando un meccanismo a feedback negativo a monte del pathway [1, 4].

Dopo aver esplicato la sua azione, l'inattivazione di p38 è messa in atto tramite delle fosfatasi, come PP2C, una serina e treonina fosfatasi, e PTP (protein tyrosin phosphatase).

1.2 Target e ruolo fisiologico di p38.

La capacità di p38 di legare i target non dipende solo dalla presenza delle sequenze amminoacidiche corrette, ma anche dalla presenza di opportuni siti sul substrato e di domini di binding sull'enzima [1].

La sua attività enzimatica si esplica sia a livello del citoplasma che a livello del nucleo, dimostrando così che il pathway di p38 è coinvolto in vari processi cellulari, come la regolazione degli mRNA, dell'apoptosi, della degradazione proteica e l'organizzazione del citoscheletro e della cromatina.

All'interno del nucleo, p38 è in grado di fosforilare vari fattori di trascrizione, tra i quali è interessante ricordare:

- CHOP (CREB homologous protein), che è un fattore di trascrizione coinvolto nell'apoptosi;
- p53, noto regolatore del ciclo cellulare e soppressore tumorale;
- ATF2, un fattore di trascrizione attivante, di solito up-regolato nei tumori e correlato con la manifestazione di eventi neurodegenerativi [1, 3-6].

Tra i target citoplasmatici, che garantiscono l'amplificazione del segnale in un processo multistep, sono state studiate varie proteine chinasi, coinvolte nella regolazione dell'espressione genica e capaci di fosforilare altre proteine del citosol (Figura 3). MAP-KAP-K2 (MAP kinase-activated protein kinase 2 o MK2) e MAP-KAP-K3 attivano Hsp27 (heat-shock protein 27), coinvolta nella regolazione dell'apoptosi, dello sviluppo e del differenziamento cellulare, e alcuni fattori di trascrizione, tra cui SRF (serum response factor), importante per la sopravvivenza e il differenziamento cellulare [1, 3-6]. MK2 e MK3 sono in grado di intervenire anche a livello post-trascrizionale fosforilando TTP (tristetraprolina), che è capace di legare gli mRNA nelle regioni ARE (AU-rich elements, elementi ricchi di adenina e uridina) e di modificarne la traduzione [1, 3, 7].

MNK1 e MNK2 (mitogen activated protein kinase-interacting protein 1/2), substrati di p38, attivano eIF-4E (eukariotic translation initiation factor 4E), un fattore di traduzione che favorisce l'interazione tra mRNA e ribosoma e che viene sovraespresso in tumori con metastasi.

MSK1 e MSK2 (mitogen- and stress- activated kinase 1/2) agiscono fosforilando i fattori di trascrizione ATF1 (fattore di trascrizione attivante 1) e CREB (cAMP response element binding protein), correlato con la plasticità neuronale e la memoria, e alcune proteine, tra le quali rientra l'istone H3, che permette alla cromatina di assumere una conformazione rilassata e subire i processi di riparazione del DNA [1, 5, 8].

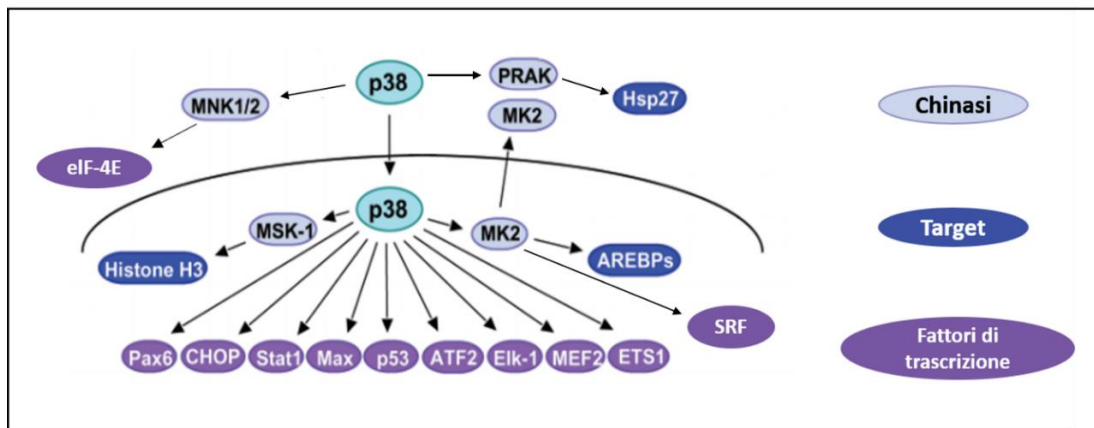


Figura 3: Schema delle principali interazioni di p38 e dei suoi bersagli.

In aggiunta, è opportuno sottolineare il ruolo di p38 nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare: è stato osservato che è in grado di controllare negativamente la progressione del ciclo cellulare tra le fasi G1/S e G2/M, attuando una down-regulation delle cicline e una up-regulation degli inibitori delle CDK [1, 7].

L'insieme delle sue funzioni fisiologiche e di regolazione hanno permesso di riconoscere in p38 un possibile target farmacologico per il trattamento di differenti patologie di natura infiammatoria e di numerosi stati tumorali.

1.3 Ruolo di p38 nell' infiammazione.

L'attivazione di p38, in particolare di p38 α , è stata correlata all'infiammazione tramite studi in vivo e in vitro, che hanno dimostrato la sua capacità di intervenire a livello trascrizionale e post-trascrizionale.

Di seguito, infatti, induce l'attività di COX-2 e regola la biosintesi di numerose citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF-gamma) che sono fondamentali nella patogenesi di malattie autoimmuni (come l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla, il morbo di Crohn), l'asma e COPD (chronic obstructive pulmonary disease), ma anche di disturbi cardiovascolari come l'aterosclerosi [1, 3, 9].

Il coinvolgimento del substrato MK-2 di p38 è stato dimostrato mediante l'uso di topi knock-out: in seguito a stimolazione con LPS, gli animali mostravano ridotta presenza di mRNA relativi a IL-6, TNF- α , INF-gamma e COX-2, suggerendo che l'azione di MK-2 fosse importante per la stabilità dei corrispondenti mRNA [3]. Successivamente, ulteriori studi hanno sottolineato che MK-2 svolge un ruolo nella sopravvivenza dell'mRNA, fosforilando le proteine AUBPs (AU-rich binding proteins) che normalmente, legato il trascritto, lo marciano per la degradazione [1, 3]. La TTP (tristetraprolina), un esempio di AUBP, è in grado di legare i residui AREs (AU-rich elements), presenti soprattutto negli mRNA che codificano per COX-2, INF-gamma, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 e IL-8; la fosforilazione da parte di MK-2 permette la dissociazione di TTP dal trascritto e di conseguenza la traduzione [3, 9]. Anche se in misura minore, tali meccanismi di regolazione genica sono stati attribuiti anche a MK-3 [1].

1.4 Ruolo di p38 nel cancro.

L'importanza di p38 come onco-soppressore o come onco-promotore, in dipendenza della localizzazione e del tipo di tumore coinvolto è ben nota da tempo.

p38 infatti è in grado di bloccare la proliferazione cellulare incontrollata, attuando una modulazione dei checkpoint di controllo del ciclo cellulare, tra le fasi G1/S e G2/M: l'enzima inibisce il proseguimento alla fase S, regolando i livelli di specifiche cicline e attivando per fosforilazione il già citato soppressore tumorale p53 [1]; allo stesso modo, p38 riesce a contribuire al mantenimento dell'integrità genica, poiché la fosforilazione di alcune fosfatasi (in particolare Cdc25B e Cdc25C), da parte di MK-2, ritarda l'ingresso nella fase successiva, permettendo la riparazione del DNA danneggiato [1]. In relazione a questo, è stato dimostrato che cellule prive di p38 α sono resistenti all'apoptosi indotta da specie reattive dell'ossigeno (ROS, reactive oxygen species) o da oncogeni in grado di produrne elevati livelli [1, 10].

Contrariamente a quanto riportato in precedenza, si è osservato che p38 è anche direttamente coinvolta nello sviluppo tumorale, oltre che nella metastatizzazione. Quando la crescita del tumore supera le capacità funzionali dei vasi sanguigni, si viene a instaurare una condizione di ipossia che richiede la creazione di nuovi vasi tramite il processo di angiogenesi (Figura 4). L'attivazione di p38, dovuta alla mancanza di ossigeno, permette la produzione e il rilascio di fattori angiogenici, come VEGF (Vascular endothelial growth factor), MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) e MMP-2 (Matrix metalloproteinase 2). Queste metalloproteasi sono correlate all'invasività e alla malignità di molti tumori con tendenza a metastatizzare, in quanto degradano le componenti della matrice extracellulare, contribuendo al rimodellamento necessario per la creazione di nuovi vasi sanguigni, e creano delle aperture dell'endotelio tramite la distruzione delle giunzioni aderenti, permettendo l'infiltrazione di cellule cancerose in nuovi distretti e quindi la successiva metastatizzazione [11].

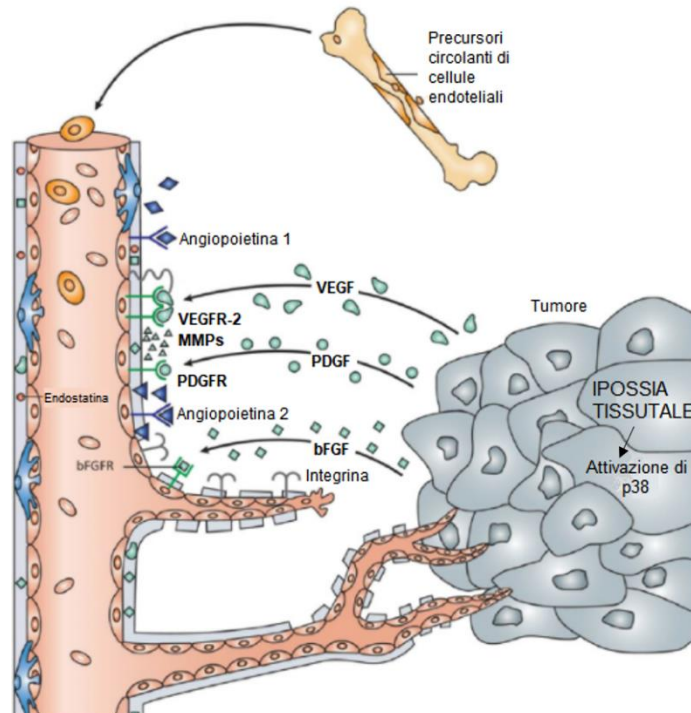


Figura 4: Promozione dell'angiogenesi in seguito all'attivazione di p38.

In aggiunta, la perdita dell'omeostasi tissutale è collegata alla modifica dell'organizzazione dell'actina, processo regolato da ERK (Extracellular signal-regulated kinase) e p38, che mantengono il sistema in equilibrio; l'eccessiva attivazione di p38, da parte dei ROS, a discapito di ERK si traduce nella manifestazione di problemi a livello dell'adesione cellula-cellula e cellula-ECM (Extracellular matrix) [10].

È opportuno sottolineare che la produzione di chemochine e citochine, indotta da p38, che come già detto partecipa attivamente all'insorgenza di stati infiammatori, contribuisce anche alla genesi tumorale [9].

1.4.1 Tumore al seno.

Nel 2020 il carcinoma della mammella è stata la neoplasia più diagnosticata, rappresentando il 14,6% di tutte le nuove diagnosi. Si tratta di un tumore molto diffuso, che mediamente colpisce il 70% delle donne intorno ai 50 anni, solitamente in corrispondenza della menopausa. Oltre alla genetica e alla familiarità, sono fattori da considerare la salute riproduttiva, lo stile di vita, l'obesità e la sedentarietà; basti pensare che negli ultimi anni un quinto dei tumori al seno è stato collegato all'abuso di alcol, ad un'alimentazione scorretta e all'inattività fisica. Tutto ciò permette di capire come nei paesi con alto indice di sviluppo l'incidenza della patologia sia maggiore e che la diffusione del cosiddetto stile di vita "occidentale" stia facendo aumentare le diagnosi anche nei paesi con indice medio-basso. Nonostante la minore incidenza tali paesi manifestano un tasso di mortalità quattro volte superiore, dovuto soprattutto alla mancanza di diagnosi precoci, screening e mezzi di prevenzione efficaci [12, 13].

A tale riguardo, p38 potrebbe risultare un target molto promettente, anche se è opportuno capire come intervenire all'interno del suo pathway per ottenere gli effetti terapeutici desiderati.

Come già citato, il ruolo di p38 come onco-soppressore è stato largamente dimostrato tramite studi in vivo: in particolare topi knock-out per Wip1, una fosfatasi in grado di disattivare p38, mostrano un ridotto sviluppo di tumori al seno e la somministrazione del già menzionato SB203580, inibitore di p38 α e p38 β , ripristina la capacità dell'animale di generare la patologia; analogamente topi che sovraesprimono Wip1 sono più soggetti alla formazione di neoplasie al seno. Inoltre, è stato rilevato che topi privi di Gadd45 α , un attivatore di p38, sono caratterizzati da una progressione tumorale accelerata.

In contrasto con tali risultati, la presenza di p38 fosforilata è stata associata a manifestazioni tumorali particolarmente invasive, che formano facilmente metastasi e sono spesso resistenti al trattamento con tamoxifene [9].

Pereira et al. [14] hanno dimostrato le potenzialità del trattamento con cisplatino e inibitori di p38 su linee cellulari derivate da pazienti affetti da cancro al seno e cancro al colon.

L'associazione di cisplatino con SB203580 oppure con PH-797804 (Figura 5), un inibitore diaril-piridinonico a struttura altamente rigida data dalla presenza dei due sostituenti metilici in 6 e 6', causa un aumento dell'apoptosi ed una diminuzione della proliferazione, effetti messi in correlazione con l'inibizione di p38, che causa un moderato aumento dei ROS e riduce la fosforilazione di Hsp27, attivando il pathway di JNK e sensibilizzando le cellule alla citotossicità indotta dal cisplatino [9, 14].

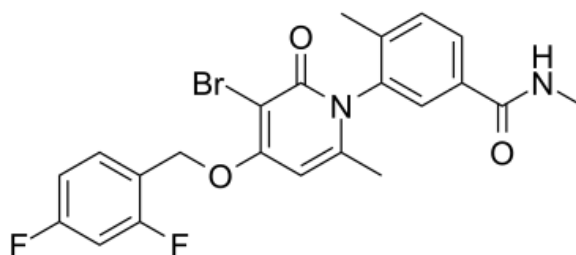


Figura 5: Struttura di PH-797804.

Inoltre, in modelli murini di cancro al seno è stato dimostrato che l'attivazione di p38 contribuisce alla formazione di metastasi polmonari, aumentando l'espressione di mediatori che promuovono la migrazione, l'infiltrazione e l'adesione cellulare, come VCMA-1, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) [9, 15].

1.4.2 Tumore polmonare.

Nel 2020, il tumore polmonare è risultato il terzo più diagnosticato, rappresentando l'11% di tutte le neoplasie. In particolare, in Italia è la prima causa di morte tra gli uomini e la terza per le donne, causando 34 mila decessi l'anno e 41 mila nuove diagnosi. Nell'ultimo decennio si è notata un'incidenza crescente nel sesso femminile, con un incremento annuo del 3,4%, dovuto principalmente a un maggiore consumo di sigarette proprio tra le donne. Nonostante il fumo sia una delle cause principali che concorrono allo sviluppo del tumore (considerato che un

fumatore rischia 14 volte di più di un non fumatore) bisogna ricordare che anche l'esposizione professionale a cancerogeni chimici, come amianto, metalli pesanti e radon, mette a rischio una buona parte della popolazione [16].

Il dualismo che contraddistingue il comportamento di p38 si è reso manifesto anche tramite studi riguardanti proprio lo sviluppo del tumore polmonare. Infatti, essendo p38 un onco-soppressore, risulta in grado di garantire la funzionalità e l'omeostasi dell'organo: alla delezione post-natale di p38 α consegue una up-regulation di EGFR (epidermal growth factor receptor) ed una diminuita espressione di C/EBP α , che si traducono in un'eccessiva proliferazione e in una mancata differenziazione cellulare, condizioni alla base dello sviluppo della neoplasia [9].

D'altra parte, però, sono stati riscontrati alti livelli di p38 nei campioni di tessuti tumorali sottoposti a biopsia [9]. In accordo con il ruolo di onco-promotore, è stato evidenziato che MK-2, substrato di p38, potrebbe essere un target interessante per il trattamento di tumori in cui manca l'espressione di p53, che di solito non rispondono ai classici agenti antitumorali genotossici. Assumendo un ruolo di fondamentale importanza nella sopravvivenza delle cellule in seguito al danneggiamento genico indotto da chemioterapici, la sinergica assenza di p53 e MK-2 in modelli murini rende inoltre più sensibile il tessuto neoplastico al danno indotto da cisplatino [17].

1.4.3 Tumore epatico.

Il tumore al fegato è il sesto per incidenza al mondo ed il 90% delle diagnosi è rappresentato dal carcinoma epatocellulare, che è la quarta causa di morte al mondo per neoplasia. In Europa il fattore di rischio più importante è lo stile di vita e la crescente tendenza della popolazione a sviluppare obesità; inoltre, la cirrosi epatica, dovuta all'abuso di alcol, e la steatosi epatica non

alcolica, associata a una scorretta alimentazione e ad un'attività fisica insufficiente, possono essere lo stadio antecedente la manifestazione tumorale [18].

Nella maggioranza degli studi condotti in vivo e in vitro riguardanti la cancerogenesi epatica si è evidenziata la funzione di p38 come onco-soppressore: infatti esso è risultato responsabile di un controllo inibitorio della proliferazione, attuato tramite una regolazione negativa del pathway di JNK/c-Jun [9].

In relazione a questo, lo studio del carcinoma epatocellulare (HCC) ha mostrato che topi K.O per p38 α , sottoposti a trattamento con un iniziatore tumorale quale DEN (*N*-nitroso dietilendiammina), e fenobarbital (come promotore tumorale), presentano un'eccessiva attivazione della via di JNK e conseguente proliferazione incontrollata. L'impiego di un inibitore di JNK ha invece riportato gli epatociti a proliferare in maniera normale, confermando il ruolo di controllo attribuito a p38 [19].

Una voce fuori dal coro è emersa nel 2012, quando Wang e il suo gruppo di collaboratori, analizzando 104 campioni tissutali prelevati da pazienti affetti da HCC, hanno correlato la concentrazione e l'attivazione di p38 con lo sviluppo e la grandezza assunta dalla massa tumorale [20].

Tali risultati sono stati accolti in modo controverso dalla comunità scientifica e molti hanno contestato la mancanza di dati relativi a un confronto con campioni di controllo sani [9].

1.4.4 Tumore del colon-retto.

Il tumore del colon-retto rappresenta la seconda causa di morte per cancro in Europa, con 375 mila nuove diagnosi e 170 mila morti ogni anno. Recentemente si è osservata una maggiore incidenza della patologia e in particolar modo i dati relativi alla popolazione femminile stanno gradualmente eguagliando quelli maschili, ma d'altra parte la mortalità si sta abbassando grazie

alle continue campagne di prevenzione, che in molti casi hanno permesso di effettuare una diagnosi precoce. Purtroppo, la situazione è destinata a peggiorare: alcune stime hanno evidenziato che a causa dell'emergenza di Covid-19 sono saltati 1,4 milioni di esami diagnostici e che i ritardi, che vanno da 7 a oltre 12 mesi, nei programmi di screening causeranno un aumento di decessi dell'11,9% [21].

La possibilità di utilizzare degli inibitori di p38 nel trattamento del cancro colon-rettale è un argomento largamente dibattuto. È opinione generale che un simile approccio richieda cautela, in quanto il ruolo assunto dall'enzima varia in funzione del tipo di cellula in cui viene espresso e gli effetti farmacologici prodotti possono risultare in contrasto, causando vari effetti avversi [9].

A livello dell'epitelio intestinale, p38 garantisce l'omeostasi tissutale ed è responsabile dell'effetto barriera, che protegge il lume dal contatto con patogeni e agenti tossici. A questo proposito, l'analisi di topi sottoposti a down-regolazione di p38 ha evidenziato il manifestarsi di alterazioni dell'equilibrio fisiologico dell'intestino, come l'aumento della proliferazione delle cellule epiteliali e la riduzione delle cellule caliciformi secernenti muco.

Parallelamente, una diminuita attivazione di p38 nelle cellule mieloidi comporta una riduzione della risposta infiammatoria, con minore espressione di IL-6 e minore induzione di COX-2.

L'infiammazione assume un ruolo fondamentale nella cancerogenesi e nei primi stadi di sviluppo del tumore, considerando per esempio che pazienti affetti da morbo di Crohn e colite ulcerosa sono più soggetti allo sviluppo di cancro colon-rettale rispetto al resto della popolazione [8, 22].

Il comportamento bivalente di p38 è stato ben definito da Gupta et al. [9], che, studiando la down-regolazione e l'inibizione dell'enzima in cellule tumorali e modelli in vivo, hanno riscontrato una riduzione nell'espressione di IL-6, IL-11 e STAT3, coinvolti nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule tumorali. In aggiunta, la mancata inibizione della via di JNK da parte di p38 causa un aumento dell'apoptosi, in quanto si manifesta una

ridotta produzione di proteina anti-apoptotica Mcl-1 e una maggiore produzione di proteina pro-apoptotica Bak [9, 22].

1.4.5 Tumori della pelle.

I tumori cutanei colpiscono soprattutto tra i 30 e i 60 anni e dal 2010 si è osservato un incremento nell'incidenza pari al 15% rispetto al decennio precedente. La popolazione europea è la più soggetta allo sviluppo di tali neoplasie [23].

Tra i fattori di rischio assumono fondamentale importanza la mancata protezione dalla radiazione UV e l'utilizzo di apparecchiature per l'abbronzatura artificiale. A questo proposito, nel 2020 è stato stimato che se il Nord America e l'Europa vietassero l'uso di lettini e docce solari e lampade artificiali, nel prossimo decennio si eviterebbero 448.000 casi di melanoma e 9,7 milioni di tumori cutanei, risparmiando circa 6 milioni di dollari di spese sanitarie [24].

Come discusso in precedenza, p38 è coinvolto nel controllo del ciclo cellulare; in particolare esso assicura alla cellula il tempo necessario per la riparazione del DNA: dallo studio di topi K.O per Gadd45 α , attivatore della MAPK, sono emersi ridotti livelli di p53 fosforilata e ridotta apoptosi, nonché un maggiore danno genico generato dalla radiazione UV, che si traduce in una sensibilizzazione dell'animale allo sviluppo di neoplasie cutanee [9].

Inoltre, è opportuno citare il substrato di p38, PRAK (MK-5), il cui comportamento si differenzia in funzione del momento in cui viene attivato, ma anche dalla cellula che lo esprime. Quando si trova nelle cellule epiteliali della cute sana agisce come onco-soppressore, in quanto è in grado di indurre senescenza; al contrario, a livello del tumore, nelle cellule endoteliali vasali, viene attivato dai fattori pro-angiogenici e promuove l'angiogenesi e la crescita tumorale [25].

Parallelamente, sempre nel ruolo di onco-promotore, è stato evidenziato che MK-2 è responsabile di un controllo inibitorio su p53, garantendo resistenza all'apoptosi e proliferazione incontrollata, e della produzione di mediatori infiammatori che concorrono allo sviluppo patologico [9].

1.5 Ruolo di p38: malattie neurodegenerative.

1.5.1 Alzheimer.

L'Alzheimer è una malattia neurodegenerativa a sviluppo progressivo, caratterizzata da disturbi cognitivi e della memoria. Spesso viene definita una patologia multifattoriale, infatti sono state sviluppate varie ipotesi per spiegarne l'insorgenza: la presenza di placche di β amiloide, l'accumulo di aggregati neurofibrillari di proteina Tau, una condizione di neuro-infiammazione persistente e la degenerazione dei neuroni colinergici [1, 7]. Solo in Italia sono presenti 1 milione di pazienti affetti da demenza, di cui 600 mila da Alzheimer, ma ancora non esiste una terapia risolutiva.

Un'indagine del 2013 ha evidenziato che l'Italia, con il 17% di over 65, è uno dei paesi con la popolazione più vecchia in Europa, seconda solo alla Germania con il 21%. Inoltre, la stima che conta 144 anziani per 100 giovani è destinata ad aumentare e si prevede che nel 2051 il rapporto diventerà 280 a 100 [26].

Nonostante una serie continua di risultati deludenti abbia portato molte aziende farmaceutiche, come Pfizer, Johnson & Johnson ed Eli Lilly, a ridurre gli investimenti destinati all'Alzheimer, risulta evidente la necessità di continuare la ricerca per trovare nuovi target efficaci per una possibile terapia [27].

L'inibizione diretta di p38 o la modulazione del suo pathway potrebbero essere possibili target per una terapia farmacologica contro l'Alzheimer. Nello studio post-mortem dei cervelli di

alcuni pazienti e di modelli animali è stata sottolineata una elevata attivazione del pathway di p38, suggerendo che tale proteina possa svolgere un ruolo chiave nella manifestazione patologica [7, 28].

In condizioni fisiologiche la proteina Tau promuove l'assemblaggio e la stabilità dei microtubuli e regola il trasporto vescicolare a livello degli assoni. Essa viene modulata tramite il processo di fosforilazione, che impedisce l'interazione con i microtubuli e genera l'auto-aggregazione, che è il primo step nella formazione degli ammassi proteici tipici della malattia. Nei pazienti affetti da Alzheimer, dove la proteina Tau subisce una iperfosforilazione ad opera di varie chinasi, tra cui p38 e JNK, si presenta instabilità dei microtubuli e, di conseguenza, inefficiente trasporto assonale, fattori che ovviamente concorrono al successivo declino cognitivo [27].

È stato dimostrato che la β amiloide induce l'attivazione di p38, che porta a un maggiore ingresso di calcio intracellulare, una elevata produzione e accumulo di ROS e stress mitocondriale. Inoltre, l'eccessiva attivazione della via di p38 genera una up-regulation nell'espressione dei suoi target, come il fattore di trascrizione c-Jun, che causa apoptosi nelle cellule neuronali (Figura 6) [1, 7, 27].

Infine, la presenza di placche di β amiloide influenza anche l'attività di microglia e astrociti che, tramite la cascata enzimatica di p38, producono maggiori livelli di citochine e chemochine, quali IL-1 β e TNF- α [27].

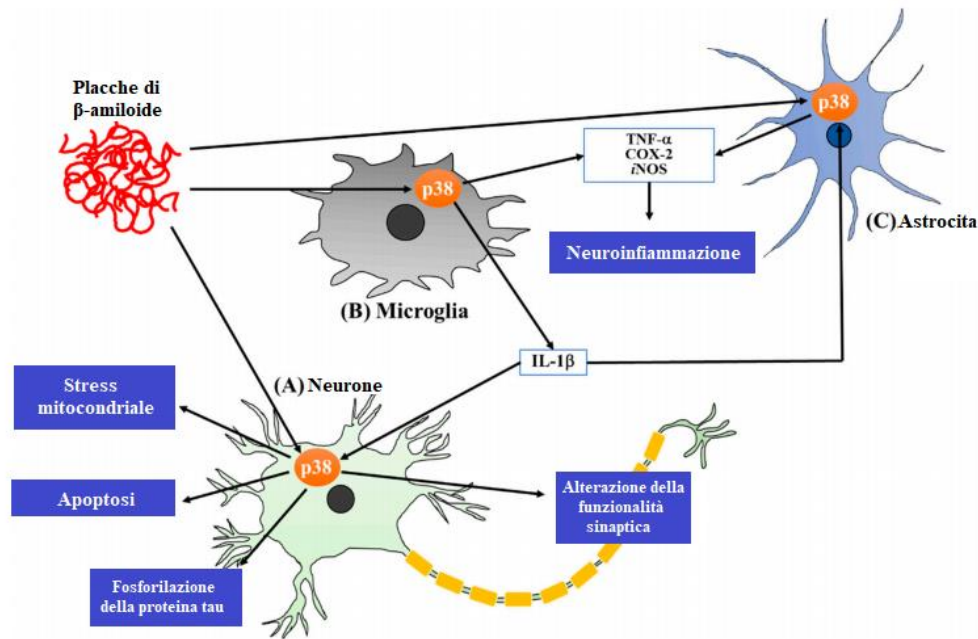


Figura 6: I diversi ruoli di p38 nella patologia di Alzheimer.

1.5.2 Morbo di Parkinson

Il Parkinson è una patologia neurodegenerativa del sistema nervoso centrale, caratterizzata da sintomi motori, come tremore a riposo, instabilità posturale, rigidità e ipocinesia, ai quali si associa spesso declino cognitivo e depressione. La sintomatologia primaria è comunemente attribuita alla perdita di neuroni dopaminergici a livello della substantia nigra e alla formazione dei corpi di Lewy, aggregati di proteine ripiegate in modo scorretto, quali α -sinucleina, tubulina e parkina [29].

L'incidenza di tale patologia è cresciuta del 50% negli ultimi 30 anni: si è passati da 2,5 milioni di pazienti al mondo nel 1990 a 6,1 milioni nel 2016 e si prevede un incremento a circa 9 milioni entro il 2030. In Italia sono 250 mila le persone affette da Parkinson e la popolazione maschile risulta più sensibile allo sviluppo della malattia, in un rapporto 3 a 2 rispetto alle donne [30, 31].

Come per molte patologie neurodegenerative, anche per il Parkinson non esistono terapie risolutive ma solo soluzioni atte a curare il più possibile la sintomatologia migliorando così la quotidianità del paziente. Ne consegue che, come già detto precedentemente per l'Alzheimer, la possibile scoperta di nuovi target risulterebbe estremamente vantaggiosa.

Molti studi hanno collegato la degenerazione dopaminergica con la presenza di elevati livelli di p38 e con l'aumentata fosforilazione dell'enzima.

p38, infatti, gioca un ruolo fondamentale nell'apoptosi dei neuroni dopaminergici, poiché è in grado di agire sui geni pro-apoptotici della famiglia Bcl-2. L'utilizzo dell'inibitore SB203580 su modelli animali di Parkinson ha mostrato una riduzione dell'apoptosi indotta dalla neurotossina MPTP, confermando l'importanza di p38 come possibile target farmacologico.

Come già affermato per l'Alzheimer, anche per il Parkinson è possibile osservare una manifestazione neuro-infiammatoria costante, dovuta all'azione di astrociti e microglia e attribuibile all'attivazione di p38 [7, 29].

2. Background della ricerca e progetto.

Il gruppo di ricerca in cui ho svolto la mia tesi sperimentale già da tempo si occupa della sintesi di molecole a struttura pirazolica **1** ed imidazo-pirazolica **2** e **3** (Figura 7), che si sono mostrate in grado di inibire la migrazione dei neutrofili (indotta sia da interleuchina 8, IL-8, che da *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina, fMLP, altro agente chemoattraente rilasciato in sede di infiammazione), processo che sta alla base di tutti i fenomeni infiammatori ed anche del processo di metastatizzazione. IL-8 infatti è altamente espressa in molti tipi di tumori e nel dettaglio svolge un ruolo fondamentale nell'angiogenesi, primo step della formazione di metastasi [32, 33, 34].

In particolare, le molecole pirazoliche **1** e gli imidazo-pirazoli **2** avevano mostrato la capacità di interferire a livello intracellulare bloccando la fosforilazione di diverse protein-chinasi quali ERK1/2, Akt and p38, sia nei neutrofili che in cellule endoteliali (HUVEC) stimulate con VEGF, fattore di crescita che svolge un ruolo fondamentale nell'innescare l'angiogenesi [35-42].

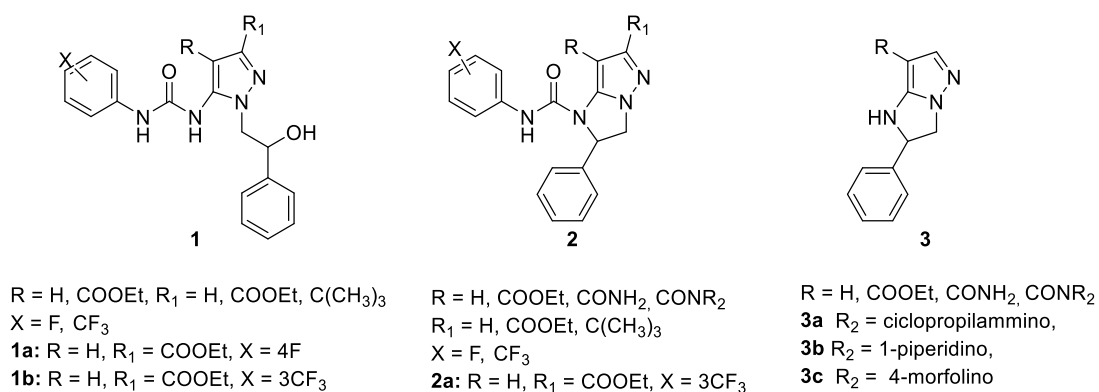


Figura 7: Struttura dei composti **1-3** precedentemente sintetizzati.

I risultati biologici avevano poi evidenziato che i composti **1a** e **1b**, portanti un gruppo carbossietilico in posizione 3 del nucleo pirazolico, ed il composto **2a**, portante lo stesso gruppo in posizione 6 di quello imidazo-pirazolico, erano quelli più attivi nel bloccare la fosforilazione

di p38. I derivati imidazo-pirazolici **3**, caratterizzati invece da un gruppo ammidico variamente ingombrato in posizione 7, erano risultati maggiormente attivi nell'inibire la chemotassi dei neutrofili; in dettaglio i composti più attivi erano risultati **3a-c** (ciclopropilammino, piperdino e 4-morfolino sostituite).

Nel complesso i risultati ottenuti hanno mostrato che alcune caratteristiche strutturali, come il tipo di sostituito e la loro posizione sullo scaffold pirazolo o imidazo-pirazolo e la perdita di flessibilità nei derivati imidazo-pirazolici rispetto a quelli pirazolici, sono fondamentali per conferire una diversa attività inibitoria verso p38, ERK1/2 o Akt. In particolare, sembra evidente che i composti portanti un sostituito in posizione 3 o 6 rispettivamente dell'anello pirazolico o imidazo-pirazolico erano maggiormente in grado di inibire la fosforilazione di p38.

Le piastrine umane contengono ERK1/2 e p38, che vengono attivati dall'azione di agonisti come la trombina. Sakurai et al. [43] e Borst et al. [44] hanno dimostrato che l'attivazione delle piastrine, ovvero la loro aggregazione, così come la formazione di trombi, sono eventi modulati dal pathway di p38. Differenti composti, tra cui in particolare dei prodotti di origine naturale, sono stati recentemente indicati come inibitori di p38 e dell'aggregazione piastrinica [45, 46]. Di conseguenza, la produzione di ROS e l'inibizione della fosforilazione di p38, entrambi collegati all'aggregazione delle piastrine, potrebbero rappresentare un buon modello biologico per testare nuovi composti e saggiarne la potenziale attività antiinfiammatoria e antitumorale. Poiché le piastrine umane sono un modello veloce e a basso costo per lo screening di composti antitumorali, antinfiammatori e antiaggreganti, su di esse già in passato sono stati testati i composti **1a**, **1b** e **3a** al fine di misurare la loro capacità di inibire l'aggregazione piastrinica, la produzione di ROS e la fosforilazione di p38. Tutti e tre i prodotti hanno mostrato diverse attività e in particolare **1a** e **3a** sono risultati i più promettenti con IC_{50} inferiore a 100 μ M per tutti e tre i parametri valutati.

Questa classe di composti, quindi, potrebbe rappresentare un buon punto di partenza per lo sviluppo di prodotti ad azione multipla, in grado di bloccare la via di trasduzione del segnale di diverse chinasi, in particolare p38, l'aggregazione piastrinica e la produzione di ROS.

Scopo della presente tesi è stata quindi la sintesi e la successiva valutazione biologica presso il laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Farmacia (DIFAR) della Prof.ssa Maria Grazia Signorello di una piccola serie di composti (**4a-e**), isosteri strutturali dei composti **3**. Essi, infatti, portano il sostituito ammidico in posizione 6 anziché in 7 dell'anello imidazopirazolico. Questa variazione strutturale è stata introdotta proprio perché, come detto sopra, nei precedenti composti **2**, quelli portanti il gruppo carbossietilico in questa posizione erano maggiormente in grado di inibire la fosforilazione di p38.

Nel dettaglio, i composti **4a-e** (Figura 8) sono caratterizzati dai sostituenti ammidici rivelatisi più attivi nei corrispondenti **3** (ciclopropilammino, piperidino e 4- morfolino), a cui poi sono stati aggiunti i sostituenti isopropilammino ed isobutilammino (molto simili al ciclopropilammino) in modo da poter trarre maggiori considerazioni struttura-attività.

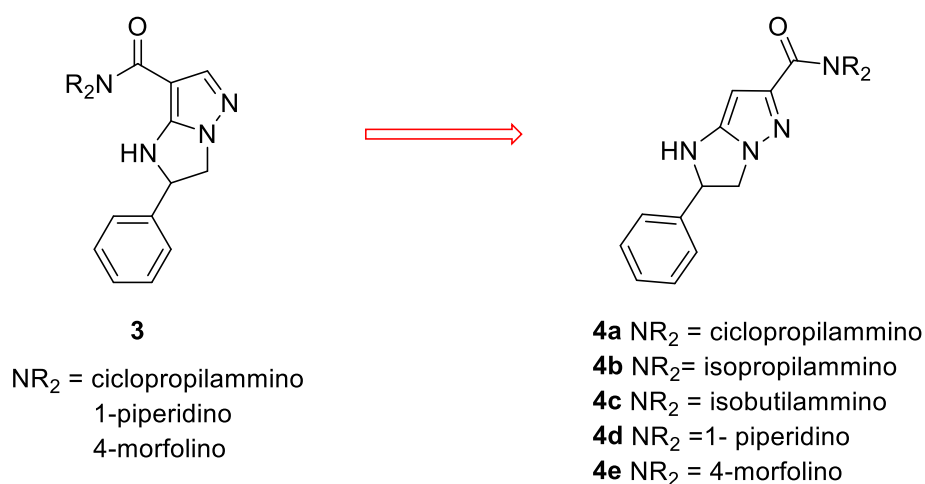


Figura 8: Struttura dei composti **4a-e** sintetizzati.

3. Discussione.

I composti **4a-e** sono stati sintetizzati come riportato nello schema 1.

L'intermedio chiave per la preparazione dello scaffold pirazolico è il sale di potassio dell'1-ciano-3-etossi-3-ossoprop-1-en-2-olato **5**, preparato seguendo la procedura riportata in letteratura [48].

Questo sale si prepara facendo reagire acetonitrile e dietilossalato in presenza di potassio *tert*-butossido. La resa della reazione è aumentata notevolmente (98%) rispetto a quanto riportato nel metodo presente in letteratura grazie all'uso dell'etere corona 18-6 (1,4,7,10,13,16 esaossocicloottadecano) come catalizzatore.

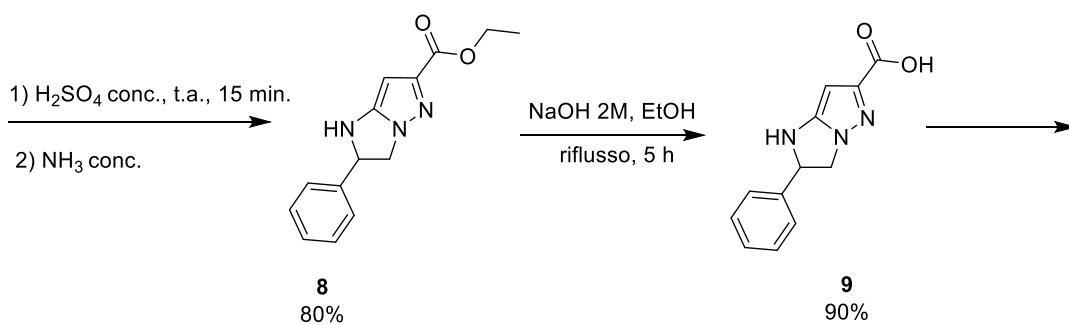
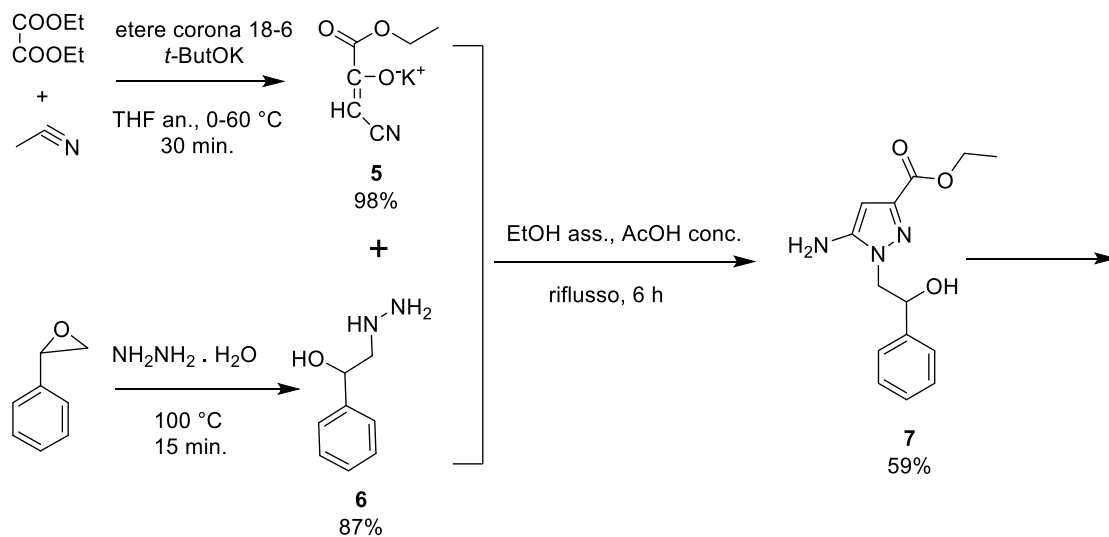
Il sale così ottenuto è stato successivamente fatto condensare con 1-fenil-2-idrazinoetanolo **6**, precedentemente preparato facendo reagire ossido di stirene con un eccesso di idrazina idrata.

Si ottiene così il 5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-3-carbossilato di etile **7** [40].

Per disidratazione con acido solforico concentrato del pirazolo **7** si ottiene lo scaffold imidazopirazolico del composto **8**, il quale viene poi idrolizzato a corrispondente acido **9**.

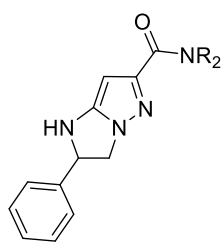
Quest'ultimo viene trasformato nelle desiderate ammidi tramite l'utilizzo di due tecniche diverse; nel dettaglio, i composti **4a**, **4d** e **4e** vengono ottenuti sciogliendo l'acido **9** in DMF anidra ed aggiungendo in sequenza e goccia a goccia difenilfosforilazide (DPPA), trietilammina (TEA) e l'opportuna ammina. La reazione viene poi scaldata a 50-60 °C per una notte. I derivati **4b** e **4c** sono invece stati preparati trattando l'acido **9**, sciolto in DCM, con 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDC) e l'opportuna ammina, in presenza di 4-(dimetilammino)piridina.

Schema 1:



Metodo A.
 ammina, TEA, DPPA, an. DMF,
 30-60 °C, 12 h

Metodo B:
 ammina, EDC, 4-(dimetilammino)piridina,
 CH₂Cl₂, 0 °C, poi t.a., 24 h



4a NR₂ = ciclopropilammino
4b NR₂ = isopropilammino
4c NR₂ = isobutilammino
4d NR₂ = piperidino
4e NR₂ = 4-morfolino

4a-e
 22-40%

4. Parte sperimentale.

Tutti i reagenti sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich s.r.l. (Milano).

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio BÜCHI M-560.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer 398, in KBr o CHCl_3 (per i solidi) o come film per gli oli.

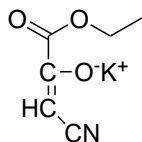
Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati in CDCl_3 deuterato o DMSO deuterato con strumento Varian-Gemini 200 usando il tetrametilsilano (TMS) come standard interno; i valori di “chemical shifts” sono riportati in ppm e le J in Hz; i segnali sono stati caratterizzati come singoletti (s), doppietti (d), tripletti (t), quasi tripletti (q t), singoletti allargati (s all) e multipletti (m).

Tutti i composti sono stati analizzati per C, H, N con un analizzatore elementare modello EA 110 della Fision-Instruments (Milano); i risultati analitici sono compresi nell'intervallo ± 0.4 rispetto ai valori teorici.

Per la purificazione dei prodotti mediante flash chromatography è stato utilizzato uno strumento Flash IsoleraOneBiotage, usando colonne SNAP ULTRA-HP SphereTM 25 μm .

Il procedere delle reazioni ed i prodotti isolati sono stati controllati mediante l'uso di TLC su Kieselgel 60 F254 (Merck) usando le opportune miscele eluenti.

Sintesi del potassio 1-ciano-3-etossi-3-ossoprop-1-en-2-olato 5.



Ad una soluzione di potassio *t*-butossido (0.34 g, 3 mmoli) in THF anidro (27 mL) ed etere corona 18-6 (0.63 g, 2.4 mmoli) viene aggiunto lentamente, mantenendo la reazione a 0 °C, dietil ossalato (0.44 g, 2.9 mmoli). Terminata l'aggiunta, la miscela viene quindi scaldata fino a 60 °C.

Successivamente si aggiunge lentamente acetonitrile (0.12 g, 3 mmoli) e la miscela viene scaldata a 60 °C per 30 minuti.

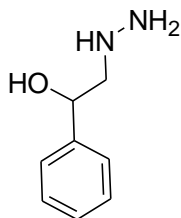
Dopo aver raffreddato a temperatura ambiente, si ottiene un solido giallo, che viene filtrato ed usato nella reazione successiva come grezzo.

Resa: 98% (let. 78% [40])

Formula molecolare: C₆H₆KNO₃

PM: 179.22

Sintesi del 1-fenil-2-idrazinoetanolo 6.



Ad idrazina idrata (30 mL, 0.6 moli) scaldata fino a 100 °C, viene aggiunto a goccia a goccia ossido di stirene (20 mL, 0.17 moli). La miscela viene mantenuta a 100 °C per 15 minuti.

L'eccesso di idrazina viene quindi rimosso mediante evaporazione a pressione ridotta (sotto cappa con cautela per non respirare vapori). L'olio che si ottiene viene purificato mediante distillazione in alto vuoto (t.eb.:155-158°C/0.6 mmHg).

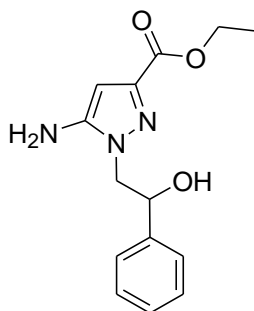
Si ottiene quindi un olio giallino che solidifica lentamente in frigo (solido ceroso bianco).

Resa: 87%

Formula molecolare: C₈H₁₂N₂O

PM: 152.20 [49]

Sintesi del 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1H-pirazolo-3-carbossilato di etile 7.



Una miscela di 1-fenil-2-idrazinoetanolo **6** (1.52 g, 10 mmoli), potassio 1-ciano-3-etossi-3-ossoprop-1-en-2-olato **5** (1.79 g, 10 mmoli) ed acido acetico glaciale (1 mL) in etanolo assoluto (10 mL) viene scaldata a riflusso per 6 ore.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, il solvente viene concentrato ed il residuo viene disciolto in acqua ed estratto con etilacetato (3 x 20 mL).

Le fasi organiche riunite sono poi lavate con una soluzione satura di NaHCO₃ (20 mL), poi con una soluzione satura di NaCl (20 mL), due volte con acqua (2 x 20 mL), seccate (MgSO₄) e svaporate a pressione ridotta.

Il grezzo viene poi purificato mediante cromatografia flash usando come eluente dietil etere.

Si ottiene un solido bianco.

Resa: 59%

Formula molecolare: C₁₄H₁₇N₃O₃

PM: 275.31

P.f.: 121–122 °C [40]

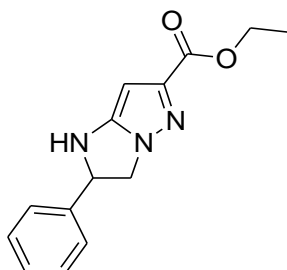
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.37 (t, $J = 7.0$, 3H, CH_3), 3.48 (s all, 3H, $\text{NH}_2 + \text{OH}$, scompare con D_2O), 4.10–4.43 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{N} + \text{CH}_2\text{O}$), 5.07–5.20 (m, 1H, CHOH), 6.03 (s, 1H, H_4), 7.24–7.45 (m, 5H, Ar).

IR (KBr): cm^{-1} 3484 (OH), 3386, 3306 (NH_2), 1727 (CO).

Analisi elementare di $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$

	C%	H%	N%
Calcolato	61.08	6.22	15.26
Trovato	61.00	6.20	15.30

Sintesi del 2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazolo-6-carbossilato di etile 8.



Il 5-amino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1H-pirazolo-3-carbossilato di etile **7** (0.27 g, 1 mmoli) viene disciolto in acido solforico (2 mL) a 0 °C e successivamente la miscela viene lasciata a temperatura ambiente per 15 minuti.

In seguito, viene aggiunta acqua ghiacciata (50 mL) e la soluzione viene neutralizzata con una soluzione di NH₃ concentrata. Il solido giallo ottenuto viene filtrato, lavato con acqua e ricristallizzato da etanolo anidro.

Si ottiene un solido bianco.

Resa: 80%

Formula molecolare: C₁₄H₁₅N₃O₂

PM: 257.29

P.f.: 128–129 °C [40]

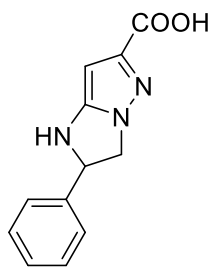
¹H-NMR (CDCl₃): 1.41 (t, *J* = 7.2, 3H, CH₃), 4.03 (q t, 1H, H₃), 4.40 (q, *J* = 7.2, 2H, CH₂O), 4.61 (q t, 1H, H₂), 4.79 (s all, 1H, NH, scompare con D₂O), 5.38 (q t, 1H, H₃), 5.98 (s, 1H, H₇), 7.27–7.52 (m, 5H, Ar).

IR (KBr): cm⁻¹ 3350–3050 (NH), 1720 (CO).

Analisi elementare di C₁₄H₁₅N₃O₂

	C%	H%	N%
Calcolato	65.36	5.88	16.33
Trovato	65.67	6.21	16.47

Sintesi dell'acido 2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazolo-6-carbossilico 9.



Una soluzione del 2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazolo-6-carbossilato di etile **8** (2.57 g, 10 mmoli) in NaOH 2 M (30 mL) viene scaldata a 120 °C per 4 ore.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si aggiunge acqua ghiacciata (100 mL) e la soluzione così ottenuta viene portata a pH = 5 con acido acetico glaciale.

Si ottiene un solido bianco che viene filtrato, lavato più volte con acqua e ricristallizzato da etanolo anidro.

Resa: 90%

Formula molecolare: C₁₂H₁₁N₃O₂

PM: 229.24

P. f.: 212-213 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3.87 (q t, 1H, H3), 4.65 (q t, 1H, H3), 5.37 (q t, 1H, H2), 5.71 (s all, 1H, scompare con D₂O), 6.61 (s, 1H, H7), 7.18-7.84 (m, 5H, Ar), 11.90 (s all, 1H, COOH, scompare con D₂O).

IR (KBr): cm⁻¹ 3390-2550 (NH + OH), 1693 (COOH).

Analisi elementare di C₁₂H₁₁N₃O₂

	C%	H%	N%
Calcolato	62.87	4.84	18.33
Trovato	62.52	4.44	18.00

Sintesi delle ammidi finali 4a, 4d e 4e.

Ad una soluzione dell'acido **9** (229 mg, 1 mmole) sciolto in DMF anidra (5 mL) vengono aggiunti a freddo e lentamente in sequenza l'opportuna ammina (2 mmoli), trietilammina (0.2 mL, 1.4 mmoli) e difenilfosforilazide (DPPA) (340 mg, 1.2 mmoli). Quindi la miscela di reazione viene scaldata a 30–60 °C per 12 ore.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si aggiunge acqua ghiacciata (20 mL) e la soluzione ottenuta viene portata a neutralità con HCl 1 M.

Si ottiene un solido che viene filtrato, lavato più volte con acqua e se necessario purificato tramite cristallizzazione da etanolo assoluto o tramite flash cromatografia, usando come eluente una miscela di CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1.

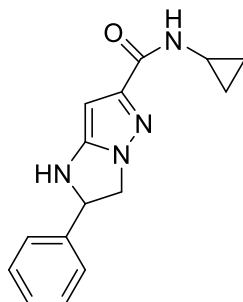
Sintesi delle ammidi finali 4b e 4c.

Ad una soluzione dell'acido **9** (229 mg, 1 mmole) sciolto in CH₂Cl₂ (5 mL), vengono aggiunti a freddo e lentamente 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDC) (209 mg, 1.3 mmoli), 4-(dimetilammino)piridina (1 punta di spatola) e l'opportuna ammina (1 mmole). La miscela di reazione viene quindi lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore.

La soluzione organica viene quindi lavata con una soluzione satura NaHCO₃ (2 x 10 mL), poi con acqua (2 x 10 mL), seccata (MgSO₄) e concentrata a pressione ridotta.

Si ottiene un olio grezzo che viene purificato tramite flash cromatografia (usando come eluente una miscela di CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1).

N-ciclopropil-2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazolo-6-carbossammide 4a



Solido marroncino.

Resa 23%

Formula molecolare: C₁₅H₁₆N₄O

PM: 268.32

P.f.: 135-136 °C

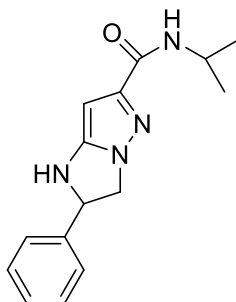
¹H-NMR (CDCl₃): d 2.18-2.50 (m, 4H, 2CH₂ cicloprop.), 2.60-2.80 (m, 1H, CHNH), 3.90 (q t, 1H, H3), 4.40 (q t, 1H, H3), 5.30 (q t, 1H, H2), 6.90 (s, 1H, H7), 7.18-7.60 (m, 5H, Ar).

IR (KBr): cm⁻¹ 3309, 3233 (NH), 1646 (CONH).

Analisi elementare di C₁₅H₁₆N₄O

	C%	H%	N%
Calcolato	67.15	6.01	20.88
Trovato	67.27	6.20	20.69

N-isopropil-2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazolo-6-carbossammide 4b



Solido bianco.

Resa: 22%

Formula molecolare: C₁₅H₁₆N₄O

PM: 270.34

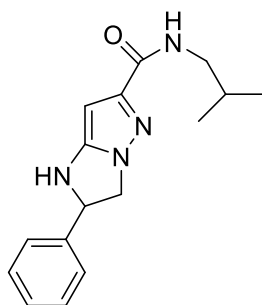
P.f.: 118-121 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.15-1.20 (m, 4H, 2CH₂ isoprop.), 2.90-3.00 (m, 1H, CHNH), 3.80 (q t, 1H, H3), 4.30 (q t, 1H, H3), 5.20 (n t, 1H, H2), 6.92-7.41 (m, 6H, 5Ar + H7).

Analisi elementare di C₁₅H₁₆N₄O

	C%	H%	N%
Calcolato	66.64	6.71	20.73
Trovato	66.30	6.45	20.63

N-isobutil-2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazolo-6-carbossammide 4c



Solido bianco.

Resa: 32%

Formula molecolare: C₁₆H₂₀N₄O

PM: 284.36

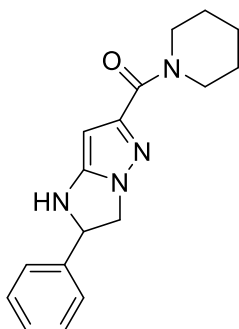
P.f.: 116-120 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.74-1.00 (m, 6H, 2CH₃ isobut.), 1.70-1.91 (m, 1H, CHNH), 2.90-3.11 (m, 2H, CH₂ isobut.), 3.83 (n t, 1H, H3), 4.62 (q t, 1H, H3), 5.40 (q t, 1H, H2), 6.12 -7.58 (m, 6H, 5Ar + H7).

Analisi elementare di C₁₆H₂₀N₄O

	C%	H%	N%
Calcolato	67.58	7.09	19.70
Trovato	67.36	7.05	19.50

(2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazol-6-il)(piperidin-1-il)metanone 4d



Solido bianco.

Resa: 30%

Formula molecolare: C₁₇H₂₀N₄O

PM: 296.37

P.f.: 202-203 °C

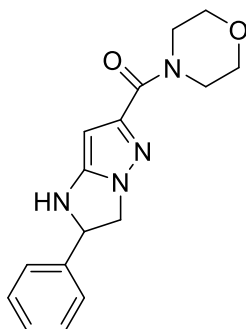
¹H-NMR (CDCl₃): d 1.38-1.78 (m, 6H, 3CH₂ pip.), 3.45-3.61 (m, 2H, CH₂N pip.), 3.77-3.94 (m, 3H, CH₂N pip. + H3), 4.62 (q t, 1H, H3), 5.28 (q t, 1H, H2), 6.58 (s, 1H, H7), 7.28-7.57 (m, 5H, Ar).

IR (KBr): cm⁻¹ 3226 (NH), 1601 (CONH).

Analisi elementare di C₁₇H₂₀N₄O

	C%	H%	N%
Calcolato	68.89	6.80	18.90
Trovato	68.69	7.19	18.83

morfolino(2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazol-6-il)metanone 4e



Solido rosa.

Resa 40%

Formula molecolare: C₁₆H₁₈N₄O₂

PM: 298.35

P.f.: 162-163 °C

¹H-NMR (CDCl₃): d 3.50-3.70 (m, 4H, 2CH₂N morf.), 3.85 (q t, 1H, H3), 3.90-4.18 (m, 4H, 2CH₂O morf.), 4.63 (q t, 1H, H3), 5.37 (q t, 1H, H2), 5.63 (s all, 1H, NH scompare con D₂O), 6.60 (s, 1H, H7), 7.25-7.58 (m, 5H, Ar).

IR (KBr): cm⁻¹ 3239 (NH), 1606 (CONH).

Analisi elementare di C₁₆H₁₈N₄O₂

	C%	H%	N%
Calcolato	64.41	6.08	18.78
Trovato	64.69	6.27	18.47

5. Valutazione biologica

I composti **4** sono stati testati su piastrine umane per valutare la loro capacità di inibire l'aggregazione, la produzione di ROS e l'inibizione della fosforilazione di p38.

Colorburst™, uno standard a peso molecolare noto per elettroforesi, la 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) e la trombina sono stati acquistati da Sigma-Aldrich/Merck Millipore. Da Santa Cruz Biotechnology, USA, sono stati acquistati l'anti p-p38, anticorpo secondario coniugato con la perossidasi del rafano, e l'anti- β -actina. Il sistema ECL® è stato ottenuto da GE Healthcare, USA, mentre le membrane di nitrocellulosa, con una dimensione dei pori di 0,45 μ m, da Bio-Rad Laboratories, USA.

5.1 Raccolta del sangue e procedure preparative

Il sangue venoso, prelevato da volontari sani del “Centro Trasfusionale, Ospedale San Martino” di Genova, è stato raccolto in soluzione acquosa anticoagulante di citrato trisodico 130 mM (9:1). I donatori hanno dichiarato di non aver assunto farmaci in grado di interferire con la funzione piastrinica nelle due settimane precedenti il prelievo ed hanno fornito il loro consenso informato.

Le piastrine lavate sono state preparate centrifugando il sangue intero a 100xg per 20 minuti. Il plasma ricco di piastrine ottenuto dal primo trattamento è stato nuovamente sottoposto a centrifugazione a 1100xg per 15 minuti. A questo punto le piastrine sono state lavate una volta con la soluzione ACD (citrato trisodico 75 mM, acido citrico 42 mM, glucosio 136 mM) a pH 5,2, centrifugate a 1100xg per 15 minuti e poi risospese a pH 7,4 nel tampone Hepes (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, glucosio 10 mM, Hepes 10 mM).

5.2 Valutazione dell'inibizione dell'aggregazione piastrinica.

L'aggregazione piastrinica è stata valutata mediante l'aggregometro BIOData seguendo il metodo turbidimetrico di Born [47], quantificando la trasmittanza ottenuta dopo 6 minuti a 37 °C. Le piastrine lavate

(3.0×10^8 /mL) sono state pre-incubate con soluzione salina o con i composti in esame per 3 minuti a 37 °C e successivamente stimulate con trombina 0.1 U/mL.

5.3 Valutazione dell'inibizione della produzione di ROS.

La formazione di ROS è considerata marker dello stato redox cellulare. È stata pertanto valutata la capacità antiossidante dei composti **4**, quantificando la loro capacità di inibire la produzione di ROS indotti da trombina. La produzione di ROS è stata valutata mediante la formazione intracellulare di 2',7'-diclorofluoresceina (DCF). Le piastrine lavate (1.0×10^8 /mL) sono state pre-incubate con soluzione salina o con i composti in esame in presenza di DCFH-DA, il quale, diffondendo rapidamente attraverso la membrana, è substrato delle esterasi cellulari che lo intrappolano all'interno trasformandolo in 2',7'-diclorodidrossifluoresceina (DCFH). DCFH è quindi ossidato dai ROS prodotti durante l'attivazione piastrinica a formare il composto altamente fluorescente DCF. Dopo la pre-incubazione di 15 minuti a 37 °C, i campioni sono stati stimolati con trombina 0.1 U/mL a 37 °C. L'incubazione è stata bloccata dopo 15 min ponendo i campioni in ghiaccio. Immediatamente dopo, i campioni sono stati saggiati al citofluorimetro Guava easyCyte di Merck Millipore Bioscience.

5.4 Valutazione dell'inibizione della fosforilazione di p38.

Le piastrine, lavate e portate a concentrazione pari a 1.0×10^9 /mL, sono state preincubate con soluzione salina o con composti e stimulate con trombina (0.1 U/mL) per 5 minuti. L'incubazione è stata bloccata aggiungendo il tampone riducente Laemmli-SDS. Dopo denaturazione per 5 minuti a 100 °C, i campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE 5-10% e la corsa elettroforetica è stata eseguita con marcatori di peso molecolare noto Colorburst™ Electrophoresis. Successivamente sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa, mediante western blotting e, in seguito, i blot sono stati saturati in BSA 5%, sciolta in TBST (Soluzione Tris, pH 7.6, con Tris 10 mM, NaCl 150 Mm e Tween20 0,1%) a 37°C per 30 minuti. Durante la notte i campioni sono rimasti in incubazione a 4°C con anticorpi anti p-p38 (diluizione 1:1000). Le

membrane, lavate accuratamente, sono state incubate a temperatura ambiente per 60 minuti con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano. Dopo ulteriori lavaggi, il blot è stato sviluppato mediante il sistema ECL[®]. Le membrane di nitrocellulose sono state strippate tramite incubazione con Tris (62.5 mM in HCl, pH 6.7), SDS 2% e β -mercaptoetanolo 100 μ M per 30 minuti a 50 °C ed incubate con anticorpo anti- β -actina. Le densità delle bande sono state quantificate direttamente usando il software Bio-Rad Chemi-Doc.

Il valore di IC₅₀ riportato rappresenta la concentrazione molare del composto, che è in grado di inibire del 50% la massima aggregazione, ottenuta con l'agonista. L'IC₅₀ viene calcolato a partire dalla percentuale di inibizione, ovvero l'inibizione dell'aggregazione massima misurata in presenza del composto e confrontata con quella misurata in un campione di controllo contenente soluzione fisiologica e sottoposto alle stesse condizioni.

I valori di IC₅₀, relativamente all'inibizione dell'aggregazione piastrinica, della produzione di ROS e della fosforilazione di p38, sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Valori di IC₅₀ (μ M \pm SD) relativi all'inibizione dell'aggregazione piastrinica, della produzione di ROS e della fosforilazione di p38 in piastrine umane dei composti **4a-e**.

Composto	Aggregazione piastrinica (IC₅₀ μM \pm SD)	Produzione di ROS (IC₅₀ μM \pm SD)	Fosforilazione p38 (IC₅₀ μM \pm SD)
4a	106,06 \pm 6,49	86,40 \pm 6,49	115,75 \pm 4,83
4b	225,91 \pm 15,95	314,87 \pm 19,13	261,46 \pm 15,68
4c	86,39 \pm 3,68	80,90 \pm 0,53	109,06 \pm 9,24

4d	148,12 ± 4,94	144,41 ± 8,64	178,29 ± 8,88
4e	210,03 ± 8,91	198,90 ± 8,83	265,79 ± 11,62

6. Conclusioni

Dai dati biologici precedentemente riportati si evidenzia come i nuovi composti **4a-e** abbiano tutti, anche se con differente potenza, un'azione inibente sia sull'aggregazione piastrinica e la produzione di ROS, sia sulla fosforilazione di p38 in piastrine umane.

In particolare, i composti più attivi sembrano essere **4a** e **4c**, caratterizzati da piccoli e ramificati sostituenti ammidici (ciclopropile ed isobutile rispettivamente); entrambi, infatti, presentano valori di IC₅₀ comprese tra 80 e 100 µM in tutti e tre i test effettuati. Degno di nota è il fatto che nei precedenti composti **3** proprio il derivato ciclopropilammidico era tra quelli più attivi.

Stranamente il composto **4b** (isopropil derivato), molto simile strutturalmente sia a **4a** che a **4c**, risulta il derivato meno attivo, con valori di IC₅₀ tra 225 e 314 µM. Questi dati potrebbero forse significare che sia necessaria la presenza in posizione 6 dell'anello imidazo-pirazolico di un sostituyente piccolo, eventualmente ciclizzato o comunque rigido.

L'introduzione di ammidi più grosse, cicliche e quindi ancora più ingombranti, come nei composti **4d** e **4e** (piperidina e morfolina rispettivamente), comporta infatti un calo di attività biologica.

Si può quindi ipotizzare che lo spostamento della funzione ammidica dalla posizione 7 dell'anello imidazo-pirazolico alla posizione 6 sia positivo ai fini dell'ottenimento di derivati ad azione duale, cioè attivi sia nell'inibire l'aggregazione piastrinica e la produzione di ROS, sia nell'inibire la fosforilazione di p38, a patto che il gruppo ammidico inserito sia comunque piccolo e non eccessivamente rigido.

Lo scaffold imidazo-pirazolico si conferma comunque come nucleo promettente, su cui attuare diverse modifiche strutturali, per la progettazione e la sintesi di nuovi composti potenzialmente attivi come agenti antiinfiammatori/anticancro.

Ulteriori indagini farmacologiche saranno condotte allo scopo di verificare se queste attività riscontrate nelle piastrine vengano mantenute anche a livello cellulare, in particolare in cellule HUVEC; di fondamentale importanza sarà infatti comprendere se questi nuovi composti possano avere anche un'azione anti-angiogenica come i precedenti derivati imidazo-pirazolici **2** e **3** di precedente sintesi.

7. Bibliografía

- [1] Cuenda A., Rousseau S. “p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, *1773*, 1358–1375.
- [2] Cargnello M., Roux P.P. “Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases”, *Microbiology and molecular biology reviews*, **2011**, *75*, 50-83.
- [3] Schindler J.F., Monahan J.B., Smith W.G. “p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets”, *Critical reviews in oral biology & medicine*, **2007**, *86*, 800-811.
- [4] Zarubin T., Han J. “Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway”, *Cell Research*, **2005**, *15*, 11-18.
- [5] Swapna D., Prathyusha Pooja V., Sucharitha D., Sunitha K., Swetha M. “A review of p38 kinase inhibitors as anti-inflammatory drug targets”, *International Journal Of Pharmacy & Technology*, **2010**, *2*, 86-101.
- [6] Cuadrado A., Nebreda A.R. “Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling”, *Biochemical Society*, **2010**, *429*, 403-417.
- [7] Madkour M.M., Anbar H.S., El-Gamal M.I. “Current status and future prospects of p38a/MAPK14 kinase and its inhibitors”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2021**, *213*, 113216.
- [8] Bradham C., McClay D.R. “p38 MAPK in Development and Cancer”, *Cell Cycle*, **2006**, *5*, 824-828.

- [9] Gupta J., Nebreda A.R. “Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer.”, *FEBS Journal*, **2015**, *282*, 1841-1857.
- [10] Houle F., Huot J. “Dysregulation of the Endothelial Cellular Response to Oxidative Stress in Cancer”, *Molecular Carcinogenesis*, **2006**, *45*, 362-367.
- [11] Quintero-Fabián S., Arreola R., Becerril-Villanueva E., Torres-Romero J.C., Arana-Argáez V., Lara-Riegos J., Ramírez-Camacho M.A., Alvarez-Sánchez M.E. “Roles of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer”, *Frontiers in Oncology*, **2019**, *9*, 1370.
- [12] www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/oncologia/nel-2019-in-italia-meno-casi-di-tumore, **maggio 2021**.
- [13] www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/oncologia/tumore-al-seno-nel-mondo-aumentano-i-casi-e-le-disparita, **maggio 2021**.
- [14] Pereira L., Igea A., Canovas B., Dolado I., Nebreda A.R. “Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK”, *EMBO Molecular Medicine*, **2013**, *5*, 1759-1774.
- [15] Wua X., Zhanga W., Font-Burgada J., Palmerb T., Hamile A.S., Biswasf S.K., Poidingerf M., Borcherdindg N., Xied Q., Elliesc L.G., Lytleb N.K., Wua L., Foxb R.G., Yangb J., Dowdye S.F, Reyab T., Karin M. “Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 controls breast cancer metastasis through a TAK1-p38 MAP kinase cascade”, *PNAS*, **2014**, *111*, 13870-13875.
- [16] www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-al-polmone, **aprile 2021**.

- [17] Morandell S., Reinhardt H.C., Cannell I.G., Kim J.S., Ruf D.M., Mitra T., Couvillon A.D., Jacks T., Yaffe M.B. “A Reversible Gene-Targeting Strategy Identifies Synthetic Lethal Interactions between MK2 and p53 in the DNA Damage Response In Vivo”, *Cell Reports*, **2013**, *5*, 868-877.
- [18] www.roche.it/it/il-nostro-focus/oncologia/tumore-al-fegato.html, **maggio 2021**.
- [19] Hui L., Bakiri L., Mairhorfer A., Schweifer N., Haslinger C., Kenner L., Komnenovic V., Scheuch H., Beug H., Wagner E.F. “p38a suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK–c-Jun pathway”, *Nature Genetics*, **2007**, *39*, 741-749.
- [20] Wang S., Lee K., Tsai C., Chen Y., Yeh Y. “Phosphorylated p38 and JNK MAPK proteins in hepatocellular carcinoma”, *European Journal of Clinical Investigation*, **2012**, *42*, 1295-1301.
- [21] www.aiom.it/speciale-covid-19-creening-tumore-colon-piu-11-9-per-cento-morti-in-europa-con-ritardi-diagnosi, **maggio 2021**.
- [22] Gupta J., del Barco Barrantes I., Igea A., Sakellariou S., Pateras I.S., Gorgoulis V.G., Nebreda A.R. “Dual function of p38a MAPK in colon cancer suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival”, *Cancer Cell Survival*”, *Cancer Cell*, **2014**, *25*, 484-500.
- [23] www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-della-pelle, **maggio 2021**.
- [24] www.airc.it/news/i-danni-lampade-abbronzanti-0320, **maggio 2021**.

- [25] Yoshizuka N., Chen R.M., Xu Z., Liao R., Hong L., Hu W., Yu G., Han J., Chen L., Sun P. “A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis”, *Molecular and Cellular Biology*, **2011**, *32*, 606-618.
- [26] demenze.iss.it/epidemiologia, **maggio 2021**.
- [27] www.ilfattoquotidiano.it/2012/09/21/alzheimer-caso-ogni-4-secondi-ma-ricerca-si-arrende-cura-difficile-e-costosa/359452/, **maggio 2021**.
- [28] Lee J., Kim N. “Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer’s disease”, *Molecules*, **2017**, *22*, 1287-1309.
- [29] Bohush A., Niewiadomska G., Filipek A. “Role of mitogen activated protein kinase signaling in Parkinson’s disease”, *International Journal of Molecular Sciences*, **2018**, *19*, 2973-2989.
- [30] Nicoletti A., Zappia M. “Epidemiologia della malattia di Parkinson”, *Focus on brain*, **2019**, *5*.
- [31] www.alzalt.it/news/page/malattia-di-parkinson-costi-diretti-ed-indiretti-troppo-elevati, **maggio 2021**.
- [32] Ferrer F.A., Patschenko A.G., Miller L.J., Anderson K., Grunnet M., McKenna P.H., Kreutzer D. “Angiogenesis and neuroblastomas: interleukin-8 and interleukin-8 receptor expression in human neuroblastoma”, *The Journal of Urology*, **2000**, *164*, 1016–1020.
- [33] Sharma I., Singh A., Siraj F., Saxena S. “IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma”, *Journal of Biomedical Science*, **2018**, *25*, 62.

[34] Aikins A.R., Kim M., Raymundo B., Kim C.W. “Downregulation of transgelin blocks interleukin-8 utilization and suppresses vasculogenic mimicry in breast cancer cells.”, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, **2017**, *242*, 573–583.

[35] Bruno O., Brullo C., Bondavalli F., Schenone S., Ranise, A. Arduino N., Bertolotto M. B., Montecucco F., Ottonello L., Dallegri F., Tognolini M., Ballabeni V., Bertoni S., Barocelli E. “Synthesis and biological evaluation of N-pyrazolyl-N'-alkyl/benzyl/phenylureas: a new class of potent inhibitors of interleukin 8-induced neutrophil chemotaxis.”, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, *50*, 3618–3626.

[36] Bruno O., Brullo C., Bondavalli F., Ranise A., Schenone S., Falzarano M.S., Varani K., Spisani S. “2-Phenyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pyrazole derivatives: new potent inhibitors of fMLP-OMe-induced neutrophil chemotaxis.”, *Bioorganical & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, *17*, 3696–3701.

[37] Bruno O., Brullo C., Bondavalli F., Schenone S., Spisani S., Falzarano M.S., Varani K., Barocelli E., Ballabeni V., Giorgio C., Tognolini M. “1-Methyl and 1-(2-hydroxyalkyl)-5-(3-alkyl/cycloalkyl/phenyl/naphthylureido)-1*H*-pyrazole-4-carboxylic acid ethyl esters as potent human neutrophil chemotaxis inhibitors.”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 3379–3387.

[38] Brullo C., Spisani S., Selvatici R., Bruno O. “N-Aryl-2-phenyl-2,3-dihydro-imidazo[1,2-*b*]pyrazole-1-carboxamides 7-substituted strongly inhibiting both fMLP-OMe- and IL-8-induced human neutrophil chemotaxis.”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, *47*, 573–579.

[39] Selvatici R., Brullo C., Bruno O., Spisani S. “Differential inhibition of signalling pathways by two new imidazo-pyrazoles molecules in fMLF-OMe- and IL8-stimulated human neutrophil.”, *European Journal of Pharmacology*, **2013**, *718*, 428–434.

- [40] Meta E., Brullo C., Sidibe A., Imhof B.A., Bruno O. “Design, synthesis and biological evaluation of new pyrazolyl-ureas and imidazopyrazolecarboxamides able to interfere with MAPK and PI3K upstream signalling involved in the angiogenesis”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *133*, 24-35.
- [41] Meta E., Imhof B.A., Roprazb P., Fish R.J., Brullo C., Bruno O., Sidibé A. “The pyrazolyl-urea GeGe3 inhibits tumor angiogenesis and reveals dystrophin myotonic protein kinase (DMPK)1 as a novel angiogenesis target”, *Oncotarget*, **2017**, *8*, 108195-108212.
- [42] Marengo B., Meta E., Brullo C., De Ciucis C., Colla R., Speciale A., Garbarino O., Bruno O., Domenicotti C. “Biological evaluation of pyrazolyl-urea and dihydro-imidazo-pyrazolyl-urea derivatives as potential anti-angiogenetic agents in the treatment of neuroblastoma”, *Oncotarget*, **2020**, *11*(37), 3459-3472.
- [43] Sakurai K., Matsuo Y., Sudo T., Takuwa Y., Kimura S., Kasuya Y. “Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Thrombus Formation.”, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, **2004**, *24*(4), 283-296.
- [44] Borst O., Walker B., Muenzer P., Russo A., Schmid E., Faggio C., Bigalke B., Laufer S., Gawaz M., Lang F., Skepinone L. “A Novel Potent and Highly Selective Inhibitor of p38 MAP Kinase, Effectively Impairs Platelet Activation and Thrombus Formation.”, *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2013**, *31*(6), 914-924.
- [45] Kuliopulos A., Mohanlal R., Covic L. “Effect of selective inhibition of the p38 MAP kinase pathway on platelet aggregation”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **2004**, *92*(6), 1387-1393.

- [46] Song F., Zuo X., Zhao Y., Li Q., Tian Z., Yang Y. “Betanin-enriched red beet extract attenuated platelet activation and aggregation by suppressing Akt and p38 Mitogen-activated protein kinases phosphorylation”, *Journal of Functional Foods*, **2019**, *61*, 103491.
- [47] Born G. V. R. “Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal”, *Nature*, **1962**, *194*, 927–929.
- [48] Xi C., Junfa F., Pingchen F., Krasinski A., Li L., Lui R.M., McMahon P., Jeffrey P., Powers J.P., Yibin Z., Zhang P. “Preparation of aza-aryl 1H-pyrazol-1-yl benzenesulfonamides as CCR9 antagonists.”, US 20130225580 A1, **2013**.
- [49] Schenone S., Bruno O., Fossa P., Ranise A., Menozzi G., Mosti L., Bondavalli F., Martini C., Trincavelli L. “Synthesis and biological data of 4-amino-1-(2-chloro-2-phenylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylic acid ethyl esters, a new series of A1-adenosine receptor (A1AR) ligands.”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, *11*(18), 2529-2531.

Indice

1. Introduzione	2
1.1 P38MAPK struttura e attività	2
1.2 Target e ruolo fisiologico di p38	5
1.3 Ruolo di p38 nell' infiammazione	7
1.4 Ruolo di p38 nel cancro	7
1.4.2 Tumore polmonare	11
1.4.3 Tumore epatico	12
1.4.4 Tumore del colon-retto	13
1.4.5 Tumori della pelle	15
1.5 Ruolo di p38: malattie neurodegenerative	16
1.5.1 Alzheimer	16
1.5.2 Morbo di Parkinson	18
2. Background della ricerca e progetto	20
3. Discussione	23
4. Parte sperimentale	25
5. Valutazione biologica	40
5.1 Raccolta del sangue e procedure preparative	40
5.2 Valutazione dell'inibizione dell'aggregazione piastrinica	40
5.3 Valutazione dell'inibizione della produzione di ROS	41
5.4 Valutazione dell'inibizione della fosforilazione di p38	41
6. Conclusioni	44

7. Bibliografia.....45