

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in SALUTE ANIMALE

Ciclo XXII

EFFETTI DI FARMACI ANTINFIAMMATORI
NON STEROIDEI (FANS) E ALFA-2
ADRENERGICI SULLA MOTILITA'
INTESTINALE DEL CAVALLO. UNO STUDIO *IN*
VITRO

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. SANDRO CAVIRANI

Tutor:
Chiar.mo Prof. SIMONE BERTINI

Dottorando: ZULLIAN CHIARA

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUZIONE.....	7
ASPETTI ANATOMICI DELL'INTESTINO DE CAVALLO.....	7
L'INTESTINO TENUE.....	9
MOTILITA' INTESTINALE.....	13
Attività mioelettrica intestinale.....	15
Regolazione della motilità intestinale.....	18
LE PROSTAGLANDINE.....	29
Sintesi.....	29
Funzioni.....	34
I FARMACI ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI (FANS).....	38
Meccanismo d'azione.....	38
Selettività dei FANS.....	40
Farmacocinetica.....	42
Indicazioni terapeutiche.....	44
Effetti collaterali.....	47
Classificazione dei FANS.....	53
<i>Flunixin meglumina</i>	55
<i>Indometacina</i>	57
<i>SC-560</i>	59
<i>Celecoxib</i>	60
<i>DUP-697</i>	61
<i>NS-398</i>	63

TRASMISSIONE NORADRENERGICA.....	64
Classificazione dei recettori adrenergici.....	64
Sintesi della noradrenalina.....	64
Degradazione metabolica delle catecolamine.....	67
FARMACI α_2 -AGONISTI.....	70
Effetti α_2 su organi e sistemi.....	73
IMPIEGO CLINICO DEGLI α_2 -AGONISTI ED EFFETTI	78
FARMACOLOGICI	
Clonidina.....	79
Xilazina.....	84
Detomidina.....	89
Medetomidina.....	91
FARMACI α_2 -ANTAGONISTI.....	94
Yoimbina.....	96
Atipamezolo.....	98
SCOPO DELLA RICERCA.....	101
MATERIALI E METODI.....	104
ISTOLOGIA.....	104
ORGANO ISOLATO.....	106
Allestimento dei materiali.....	106
Stimolazione elettrica.....	110
Analisi dei dati.....	112
Protocollo sperimentale.....	114
<i>Somministrazione dei farmaci</i>	114
<i>Principi attivi utilizzati</i>	115
RT-PCR.....	118
Campionamento.....	119
Estrazione dell'acido ribonucleico (RNA)	121
<i>Estrazione con Trizol®, fenolo acido-guanidina tiocianato</i>	121

<i>(Invitrogen, Milano)</i>	
<i>Estrazione con Invisorb® Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitek,</i>	122
<i>Berlino)</i>	
Verifica e quantificazione dei risultati.....	124
Trascrizione inversa (RT)	126
PCR (polymerase Chain Reaction)	130
Elettroforesi su gel di agarosio.....	133
Risorse bioinformatiche.....	135
RISULTATI.....	137
ORGANO ISOLATO.....	135
FANS.....	135
Motilità spontanea.....	135
<i>Effetti dei FANS sulla motilità spontanea</i>	139
EFFETTI SUL TONO BASALE.....	139
EFFETTI SULL' AMPIEZZA DEI PICCHI.....	142
<i>Effetti dei FANS sulla attività contrattile indotta dalla</i>	145
<i>stimolazione elettrica</i>	
EFFETTI DEI COX-1 INIBITORI.....	145
EFFETTI DEI COX-2 INIBITORI.....	145
EFFETTI DEGLI ANTAGONISTI DEI RECETTORI	146
DELLE PROSTAGLANDINE.....	
FARMACI α_2 -ADRENERGICI.....	148
<i>Effetti degli α_2 sulla motilità spontanea</i>	151
<i>Effetti degli α_2 sulla attività contrattile indotta dalla</i>	152
<i>stimolazione elettrica</i>	
α_2 AGONISTI.....	152
α_2 ANTAGONISTI.....	153
ANTAGONISMO DEGLI EFFETTI α_2 MEDIATI.....	154

ISTOLOGIA	158
RT-PCR.....	160
Estrazione e qualità dell'RNA.....	160
Retrotrascrizione ed amplificazione.....	163
DISCUSSIONE.....	166
Effetti dei COX-inibitori sulla motilità intestinale (ileo) di cavallo...	166
Effetti degli α_2 adrenergici sulla motilità intestinale (digiuno) di cavallo.....	171
BIBLIOGRAFIA.....	178

RIASSUNTO

I farmaci analgesici sono ampiamente usati nella pratica clinica equina per il controllo di diverse patologie e disturbi muscolo-scheletrici, osteoartiti e disordini addominali come coliche, pneumatosi intestinali e dislocazioni del cieco e del colon.

I farmaci usati per la loro attività di soppressione del dolore sono prevalentemente farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) ed analgesici narcotici, nonostante anche altri composti vengano comunemente impiegati per il loro marcato potere analgesico. E' questo il caso degli α_2 -agonisti, nonostante siano più spesso usati come sedativi.

La scelta tra i diversi tipi di farmaci analgesici è spesso dovuta alla severità del dolore ed al tipo di patologia così, alcuni FANS, come la flunixin meglumina, ad esempio, sono particolarmente efficaci contro il dolore viscerale ma nel caso di coliche, condizione in cui il soggetto si presenta estremamente ansioso, gli α_2 -agonisti sembrano essere i farmaci ideali, potendo essi inibire il dolore e allo stesso tempo l'ansia e lo stato di agitazione che ne derivano.

E' di fondamentale importanza capire gli effetti degli analgesici sulla motilità intestinale, sia per quanto riguarda l'efficacia terapeutica, sia per gli effetti indesiderati, considerando ad esempio che nel cavallo le coliche sono associate sia all'iperomotilità che all'ipomotilità.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti di alcuni inibitori non selettivi delle ciclossigenasi (COX), (indometacina e flunixin meglumina), inibitori selettivi della COX-1 (SC-560) e della COX-2 (celecoxib, DUP-398 e NS-697) sulla motilità dell'ileo del cavallo. In una fase successiva sono stati valutati anche gli effetti dei farmaci α_2 -adrenergici, sia agonisti (xilazina, medetomidina e detomidina) che antagonisti (atipamezolo e yoimbina) sulla motilità del digiuno. In entrambi i casi, le valutazioni sono state eseguite in vitro, attraverso la metodica dell'organo isolato.

Gli inibitori non selettivi delle COX si sono dimostrati privi di effetti significativi sulla motilità, con l'eccezione della flunixin meglumina che ha inibito le contrazioni toniche. Il composto SC-560 non ha causato alcun effetto sulla motilità ileale, così come gli antagonisti dei recettori delle prostaglandine (PG), mentre gli inibitori selettivi della COX-2 hanno ridotto sia le contrazioni toniche, sia quelle fasiche associate alla motilità spontanea.

Alcuni campioni di ileo sono stati sottoposti ad un esame istologico e ad una valutazione genomica (RT-PCR- *reverse transcription-polymerase chain reaction*) che hanno reso evidente la presenza di uno stato infiammatorio e di RNA messaggero (mRNA) codificante per le isoforme della COX. I dati ottenuti ci hanno consentito di sostenere l'ipotesi per cui gli effetti degli inibitori delle COX sull'intestino del cavallo non siano legati alla deplezione delle PG.

Per quanto riguarda l'azione dei farmaci α_2 -agonisti, essi hanno ridotto in modo dose-dipendente le contrazioni fasiche sia spontanee, sia indotte dalla stimolazione elettrica. Al contrario, gli antagonisti si sono dimostrati inefficaci quando testati da soli e hanno avuto un comportamento anomalo nei confronti degli agonisti.

Infatti, l'antagonismo esercitato dalla dose più alta di atipamezolo e di yoimbina verso gli agonisti è stata più debole rispetto a quello esercitato dalla concentrazione inferiore.

I dati ottenuti sembrano indicativi della presenza di α_2 -adrenocettori sia presinaptici che postsinaptici con attività inibitoria sulla motilità del digiuno di cavallo e possono suggerire un'utilità terapeutica di tali farmaci nei disordini intestinali della specie equina associati ad ipermotilità.

ABSTRACT

Analgesic drugs are widely used in the equine for the management of several pathological conditions like musculoskeletal lesions or osteoarthritis and abdominal disorders such as colic, intestinal pneumatosis and colon and caecum dislocation. Drugs used for their painkilling activity are mainly nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and narcotic analgesics, but other compounds are commonly employed for their strong analgesic effect, like α_2 -agonists, even if they are usually used as sedatives. The choice between the different analgesic drugs is often driven by the severity of pain and the type of disease.

Some NSAIDs, for instance, like flunixin meglumine, are particularly effective against visceral pain, and the anti-inflammatory properties possessed by these drugs are often therapeutically crucial. However, abdominal pain, like in horse colic, is joined by great anxiety of the animal and, therefore, α_2 -agonists, for their strong sedative and analgesic effects, have soon gained a pivotal role in the management of this kind of disorders.

It is very important to understand the effects of analgesic drugs on intestinal motility, in order to elucidate possible therapeutic activities as well as noxious effects, considering that horse colic could be associated both with hypermotility and hypomotility.

The aim of the present study was to investigate the effects of non selective cyclooxygenase (COX) inhibitors (indomethacin and flunixin meglumine), selective COX-1 inhibitors (SC-560) or COX-2 (celecoxib, DUP-398, NS-697) inhibitors on horse ileum. We then assessed the effects of α_2 -adrenergic drugs, both agonists (xilazine, medetomidine, detomine) and antagonists (yohimbine and atipamezole) on equine jejunum motility. Both studies were performed using isolated organ baths.

Our data showed that non selective COX inhibitors were devoid of major effects on motility, except for an inhibition of tonic contraction shown by flunixin meglumine. SC-560, selective COX-1 inhibitor, was devoid of major effects on ileal motility. Selective COX-2 inhibitors reduced both tonic contraction and spontaneous phasic contractions, while prostaglandin (PG) receptors were ineffective. Some of the intestinal samples were submitted to histological investigation or reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR), which revealed the presence of an inflammatory reaction and

the presence of both COX isoforms mRNAs. Present data support the hypothesis that the effects of COX inhibitors on horse small intestinal motility are not linked to PG depletion.

All tested α_2 -agonists dose-dependently reduced both spontaneous and electrically-evoked phasic contractions. Conversely, α_2 -antagonists were ineffective when tested alone, and showed a heterogeneous and dose-independent ability to inhibit agonist activity. In particular, the antagonism exerted by higher concentrations of both yohimbine and atipamezole against α_2 -agonists was weaker than when lower concentrations were used.

Present data are indicative of the presence of both pre- and post-synaptic α_2 -adrenoceptors with inhibitory activity on equine jejunum motility, and support a possible therapeutic utility of these drugs in horse intestinal disorders associated with hypermotility.

INTRODUZIONE

ASPETTI ANATOMICI DELL'INTESTINO DEL CAVALLO

L'intestino (Fig. 1) è la parte dell'apparato digerente che inizia dal piloro e termina all'ano. Si presenta come un tubo di diametro variabile con pareti flessibili, ripiegato più volte su se stesso. È distinto in due parti principali, l'intestino tenue e l'intestino crasso. L'intestino tenue (22 metri di lunghezza e 60 litri di capacità) fa seguito allo stomaco e si estende dal piloro all'ostio ileale. Si presenta come un lungo tubo cilindroide molto flessuoso, di calibro pressoché uniforme, nel quale si effettuano le fasi più importanti della digestione. Vi si riconoscono tre segmenti successivi e molto ineguali: il duodeno, il digiuno (il più lungo di tutti) e l'ileo; in effetti, solo il duodeno è nettamente delimitato e presenta una topografia costante. Il limite tra gli altri due segmenti è poco distinto e perciò si può parlare di un digiuno-ileo, molto più mobile, nel suo insieme, della parte

precedente. L'intestino crasso (lungo 8 metri e con ben 140 litri di capacità) è la parte del tubo digerente che fa seguito all'ostio ileale e che termina all'ano, orifizio mediante il quale si apre all'esterno. E' divisibile in tre segmenti successivi: cieco, colon e retto ai quali bisogna aggiungere il breve canale anale (Barone, 1996).

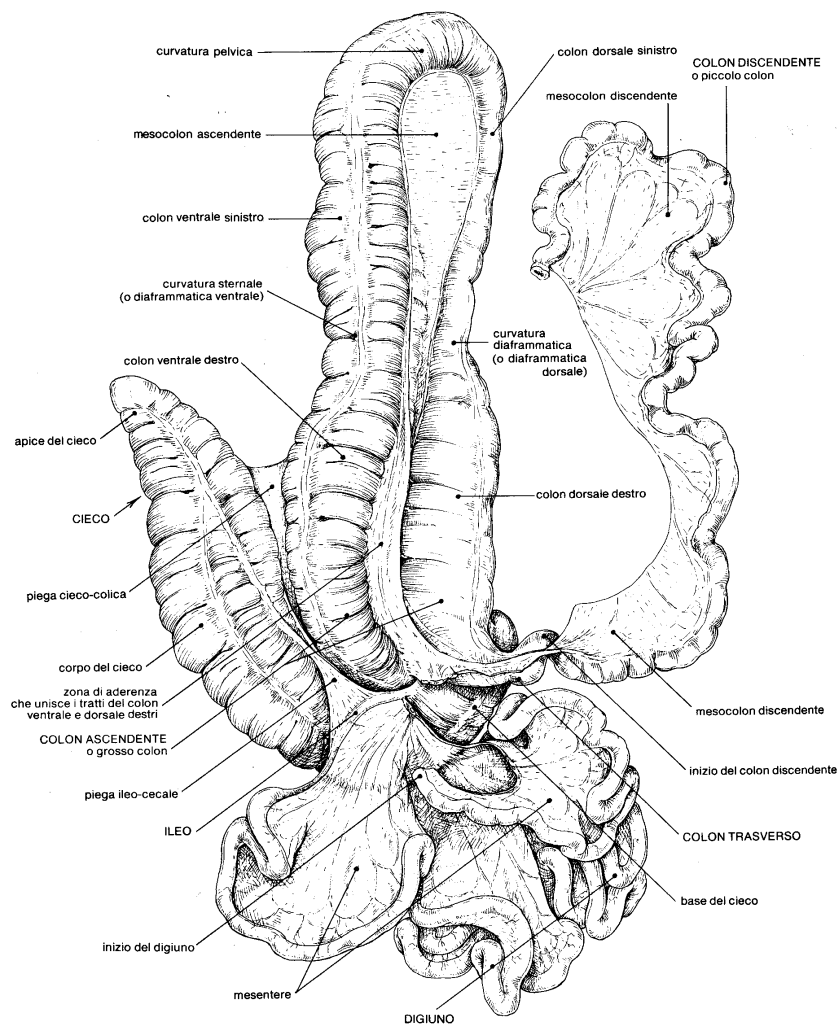


Figura 1 - Intestino del cavallo, veduta ventrale dopo isolamento e distensione appropriata (Barone, 1996).

L'INTESTINO TENUE

Nella prima parte dell'intestino tenue si versano i secreti esocrini del fegato e del pancreas, i quali portano a termine l'azione del succo gastrico ed agiscono, tra l'altro, su sostanze che quest'ultimo non aveva modificato (glucidi). Il contenuto intestinale è così trasformato in una massa fluida, o *chilo*, i cui costituenti, assai diffusibili, sono in gran parte assorbiti dalla mucosa riccamente vascolarizzata, specialmente nel tratto digiuno-ileo.

Il duodeno, fissato alla parete lombare destra mediante il meso, presenta un calibro leggermente maggiore di quello del digiuno-ileo e possiede una parete relativamente sottile e molle. Descrive un anello, allungato in senso cranio-caudale, aperto verso sinistra e cranialmente, di modo che la sua terminazione, vicina al rene sinistro, è relativamente poco lontana dalla sua origine. Compiono quindi tre curvature che lo dividono in quattro parti: craniale, discendente, traversa, ascendente.

Il digiuno-ileo inizia dalla curvatura duodeno-digiunale e termina all'ostio ileale; tuttavia, poiché non esiste alcun limite preciso tra le due parti in questione, la divisione classica in digiuno ed ileo rimane arbitraria. Il calibro di questo tratto nel cavallo è di circa 35-40 mm per 22 metri di lunghezza media approssimativa. Il calibro può

diventare più che doppio durante la distensione o, invece, ridursi della metà a causa della contrazione. Nella metà distale, dove la parete diventa più ispessita e consistente, il calibro si riduce in modo graduale.

Tutta la cavità del digiuno-ileo è rivestita da una mucosa molle, vellutata per la presenza di innumerevoli piccole villosità di colore grigio-rosato o giallastro. Strutturalmente si compone di quattro tonache: la sierosa, la muscolare, la sottomucosa e la mucosa, tutte riccamente innervate e vascolarizzate (Fig. 2). La sierosa si presenta come un sottile involucre che aderisce intimamente alla tonaca muscolare, sulle facce e sul margine libero del condotto. La tonaca muscolare si compone di due piani di fasci di cellule muscolari lisce. Lo strato longitudinale, in posizione superficiale, è sempre più sottile e riveste in maniera uniforme tutto il viscere. Lo strato circolare invece è profondo ed è molto più ispessito. Nell'ileo in particolare, lo strato longitudinale, pur rimanendo più sottile, si presenta particolarmente sviluppato. La sottomucosa è formata da uno strato di connettivo fibroso delicato; serve da supporto ad una ricchissima rete arteriosa, venosa e linfatica, come pure ad un plesso nervoso molto sviluppato. La mucosa è costituita da una serie di minuscoli rilievi, i villi, tra i quali sboccano innumerevoli microscopici orifizi

ghiandolari. Alla base della tonaca mucosa si trova la lamina propria, costituita da un connettivo reticolare infiltrato di linfociti e di eosinofili migrati dai capillari sanguigni. Nella parte più profonda, al limite tra la mucosa e la sottomucosa, si trova la *muscularis mucosae*, i cui fasci di cellule muscolari si dispongono a formare due piani, uno superficiale, longitudinale, ed uno profondo, circolare.

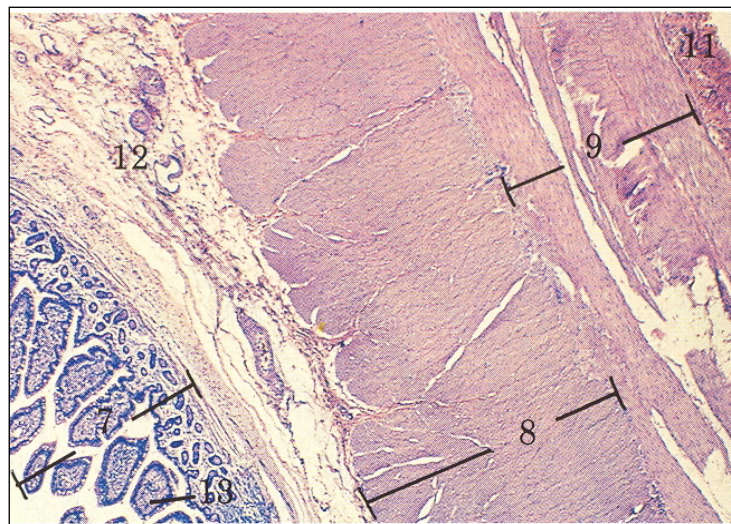


Figura 2 - Aspetto istologico dell'ileo: 7. tonaca mucosa; 8. tonaca muscolare, strato circolare interno; 9. tonaca muscolare, strato longitudinale esterno; 11. tonaca sierosa; 12. tonaca sottomucosa; 13. villo. (Bacha & Wood, 1997).

L'irrorazione sanguigna dell'intestino tenue dipende dall'arteria e dalla vena mesenterica craniale. Inoltre, la parete intestinale è provvista di uno sviluppatissimo sistema di vasi linfatici (vasi chiliferi), i quali

veicolano, insieme alla linfa, una parte dei prodotti assorbiti dall'intestino.

L'innervazione dell'intestino tenue proviene tanto dai nervi vaghi, le cui fibre (parasimpatiche) attraversano i gangli celiaci e mesenterici craniali senza arrestarvisi, quanto dal simpatico. Tutti raggiungono il margine mesenteriale del viscere e si distribuiscono sulle sue facce penetrando quindi nella parete, per far capo ai due plessi fondamentali, situati uno nella tonaca muscolare e l'altro nella sottomucosa. Il plesso mioenterico, un tempo denominato "plesso di Auerbach", è situato tra i due strati della tonaca muscolare. È costituito da fibre amieliniche, disposte a formare una rete a maglie quadrangolari in modo irregolare, interposte a quelle del plesso linfatico. Nei punti nodali di queste maglie si trovano degli ammassi irregolari di cellule nervose, che formano dei gangli microscopici. Questo plesso fornisce fibre motrici ai due strati muscolari; altre fibre si portano nella sottomucosa, assicurando l'unione funzionale con quest'ultima. Il plesso sottomucoso, in passato chiamato "plesso di Meissner", è costituito da una rete di fibre più delicata e più irregolare della precedente, alla quale sono annessi gruppi di cellule costituenti altrettanti gangli microscopici. Il plesso sottomucoso innerva la *muscularis mucosae* e fornisce fibre alle ghiandole ed ai villi. Si

osservano pure cellule nervose isolate nella tonaca propria e nello stroma dei villi. Generalmente, il sistema parasimpatico aumenta la motilità e l'attività secernente dell'intestino, mentre il simpatico inibisce tali processi (Barone, 1996).

MOTILITA' INTESTINALE

All'intestino sono riconosciuti tre tipi di movimenti: di segmentazione ritmica, pendolari e peristaltici. I primi, che hanno lo scopo di rimescolare il contenuto del lume, consistono in una serie di contrazioni concentriche della muscolatura circolare; i secondi, quelli pendolari, constano di una serie di contrazioni eccentriche e di rilasciamenti, che si susseguono con frequenza più o meno identica a quella dei movimenti di segmentazione ritmica, ma interessano solo la muscolatura longitudinale. I movimenti peristaltici sono i soli che hanno lo scopo di far progredire il contenuto del canale intestinale verso le porzioni più caudali di esso (Beghelli, 2000). La peristalsi si manifesta come un'onda di costrizione viaggiante, prodotta dalla contrazione della muscolatura circolare, preceduta dalla contrazione di quella longitudinale e contemporaneo rilasciamento della muscolatura circolare. Questo andamento della contrazione “spinge” il contenuto del lume in direzione dell'onda peristaltica (Randall *et al.*, 1999).

Attività mioelettrica intestinale

L'attività mioelettrica intestinale è caratterizzata da onde lente e da attività di spike.

Le onde lente costituiscono il ritmo elettrico basale; esse sono potenziali elettrici sottosoglia a cui non corrisponde nessuna contrazione muscolare. La loro funzione è quella di mantenere l'eccitabilità contrattile della muscolatura liscia.

L'attività di spike, a cui corrispondono le contrazioni muscolari, è caratterizzata da potenziali elettrici che si sovrappongono alle onde lente. Questi spike assumono forme diverse a seconda della specie e del tratto gastrointestinale (Koenig, 2006).

Tali attività elettriche, a cui corrispondono determinate sequenze motorie, costituiscono i cosiddetti complessi mioelettrici migranti (CMM) (Argenzio, 2002).

Nell'uomo e nel cane i CMM si trovano nello stomaco e nel piccolo intestino solo durante la fase digestiva, appena dopo il pasto. Quindi, l'attività contrattile più rapida e consistente è presente solo dopo l'assunzione di alimento (Koenig, 2006). Nel cavallo i CMM sono sempre presenti, infatti, il modello ciclico non si interrompe, mancando una distinzione netta tra fase digestiva e fase interdigestiva (Sasaki & Yoshinara, 1999).

L'equino, erbivoro monogastrico, nutrendosi *ad libitum*, obbliga l'intestino a continui movimenti, che servono a far transitare il materiale, ad impedire le fermentazioni anomale, la crescita di batteri dannosi, ed a mantenere l'omeostasi di tutto il sistema digestivo (Davies, 1989; Sasaki, 1999).

I CMM constano di tre fasi (Fig. 3). La fase I è caratterizzata da un periodo di quiescenza, durante il quale sono presenti solo onde lente e non si manifestano potenziali d'azione generatori. Nella fase II si rileva un'attività di spike intermittente; durante la fase III vi sono scariche intense di spike che accompagnano ogni onda lenta (Freeman, 1996). Alcuni autori hanno descritto un'attività di fase IV che consiste in un periodo che separa la fase III dalla fase I (Code & Marlett, 1975; Lester *et al.*, 1992). Le contrazioni della muscolatura liscia sono correlate alla seconda e terza fase.

Una ricerca condotta su ponies a digiuno ha dimostrato che durante il periodo di fase III lo stomaco si contrae da due a tre volte al minuto. Quando poi lo stomaco torna in fase I, il duodeno e il digiuno entrano in fase III (Merritt *et al.*, 1989; King *et al.*, 1991); appena l'ileo entra in fase III le sue contrazioni diventano più lunghe (in media 45 minuti) rispetto al digiuno (8 minuti di media). Questo fenomeno è unico del cavallo e probabilmente serve a rendere il più veloce

possibile il flusso del contenuto intraluminare al cieco e al colon (Sasaki & Yoshinara, 1999).

Anche il fatto che l'intensa fase III di spike nell'ileo preceda immediatamente l'attività mioelettrica ciecale nel 72% delle volte sta a significare che questo accoppiamento mioelettrico ileo-cieco contribuisce a garantire il rapido transito dell'ingesta (Ross *et al.*, 1990).

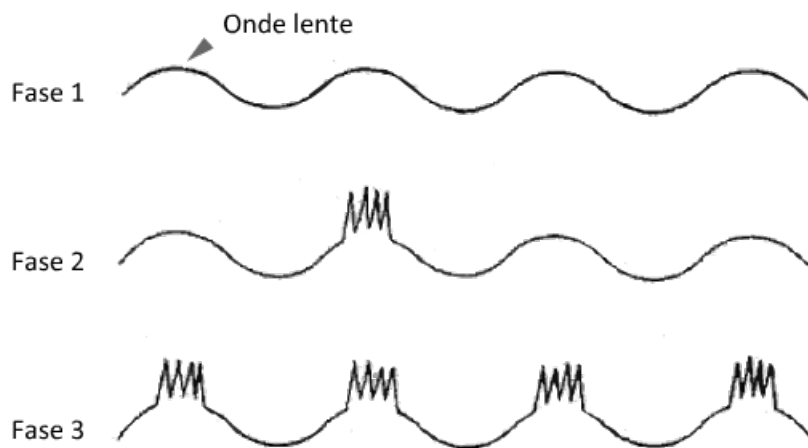


Figura 3 - Complesso mioelettrico migrante dello stomaco e dell'intestino tenue (Argenzio, 2002).

Regolazione della motilità intestinale

La regolazione della motilità intestinale è il risultato della complessa interazione tra un controllo intrinseco, determinato dal sistema nervoso enterico, ed un controllo estrinseco, dato dall'innervazione centrale, quella del sistema nervoso autonomo ed una ormonale.

Il sistema nervoso enterico è un insieme di neuroni che regolano, in maniera indipendente dal sistema nervoso centrale, la motilità, le secrezioni esocrine ed endocrine e la microcircolazione (Goyal & Hirano, 1996). E' costituito dal plesso mioenterico, compreso tra lo strato muscolare longitudinale e quello circolare, estendendosi poi per tutta la lunghezza del tubo digerente, e dal plesso sottomucoso, localizzato tra la muscolatura circolare e la *muscularis mucosae* dell'intestino tenue (Guyton & Hall, 2000).

Il sistema nervoso enterico influenza il tratto gastrointestinale in modo diretto attraverso neurotrasmettitori, o indirettamente attraverso cellule intermedie come cellule di Cajal, cellule del sistema immunitario ed endocrine (Goyal & Hirano, 1996).

Le cellule di Cajal sono pacemaker responsabili delle onde elettriche lente (attività mioelettrica di base), agendo del tutto indipendentemente dal sistema nervoso autonomo simpatico o parasimpatico (Freeman, 1996).

La loro localizzazione varia nei diversi segmenti dell'intestino: nel tenue sono predominanti a livello del plesso mioenterico, mentre nel grosso intestino si trovano maggiormente nello strato muscolare circolare. Inoltre, queste cellule si trovano in maggiore concentrazione a livello di ileo, di flessura pelvica e di cieco (Hudson *et al.*, 1999). È stato dimostrato che quando nell'equino le cellule interstiziali di Cajal sono danneggiate, per esempio in caso di grass sickness (malattia da erba – disautonomia equina), si osserva una riduzione *in vitro* della frequenza delle onde lente.

La motilità dell'intestino è controllata anche dal sistema nervoso autonomo simpatico e parasimpatico. In generale si può affermare che il sistema nervoso parasimpatico (attraverso il nervo vago e i nervi pelvici) funge da stimolatore della motilità, mentre il simpatico (attraverso il plesso mioenterico craniale e caudale) inibisce o rallenta le contrazioni (Guyton & Hall, 2000).

L'acetilcolina è il più importante neurotrasmettitore dell'intestino di tutte le specie. Essa promuove la contrazione legandosi ai recettori muscarinici di tipo 2 presenti sulle cellule muscolari lisce. L'utilizzo di agonisti colinergici come neostigmina e betanecolo determina un significativo aumento della motilità intestinale (Lester, 2002).

In uno studio del 1996 condotto nel cavallo (Rakestraw *et al.*, 1996), è stato dimostrato che l'acetilcolina può determinare il rilassamento delle fibre circolari se queste sono sottoposte ad una tensione troppo elevata, attraverso la liberazione di un neurotrasmettitore, l'ossido nitrico (NO). Tale sostanza è prodotta da un enzima, la NO sintetasi (NOS), capace di formare NO a partire dalla L-arginina. L'NO, inducendo iperpolarizzazione della membrana cellulare, determina l'inibizione della contrazione. Sottoponendo le fibre longitudinali alle stesse condizioni sperimentali, si è notato che queste, al contrario di quelle circolari, si contraggono (Rakestraw *et al.*, 1996).

Numerosi studi (Malone *et al.*, 1996; Lester *et al.*, 1998; Malone *et al.*, 1999; Re *et al.*, 2001) hanno rilevato che, nell'uomo e negli animali domestici, le catecolamine provocano una riduzione della motilità intestinale; tuttavia, per quanto riguarda il cavallo, non si è ancora arrivati a risposte certe ed univoche. Sembra che un aumentato rilascio di catecolamine giochi un ruolo nella patogenesi dell'ileo post-operatorio del cavallo (Malone *et al.*, 1996), patologia in cui si ha un decremento notevole della motilità intestinale, fino ad arrivare alla completa stasi. È stata dimostrata la presenza di due diversi sottotipi recettoriali per i neurotrasmettitori simpatici, i recettori α_1 e α_2 . Entrambi sono coinvolti nell'inibizione della motilità, ma mentre il

ruolo degli α_1 non è ancora stato chiarito del tutto, gli α_2 hanno un effetto determinante sulla motilità.

L'uso di simpaticomimetici inibisce il rilascio di acetilcolina dalle fibre colinergiche attraverso l'attivazione di recettori α_2 adrenergici presinaptici presenti nei gangli enterici (Lester *et al.*, 1998). La xilazina, agonista del recettori α_2 e farmaco abitualmente utilizzato nella clinica equina, inibisce in particolare l'attività mioelettrica-contrattile del cieco. E' stato tuttavia dimostrato che l'effetto sul piccolo intestino è di stimolare una attività di spike (fase III) (Lester *et al.*, 1998). Gli adrenocettori α_2 inoltre, mediano l'inibizione della secrezione di fluidi intestinali da parte della prostaglandina E1 (PGE_1), del peptide intestinale vasoattivo (VIP) e dell'AMP ciclico (AMPC), presumibilmente aumentando l'assorbimento di ioni da parte della mucosa. In medicina umana la clonidina, una molecola agonista selettiva dei recettori α_2 , è usata nella terapia della diarrea. I recettori adrenergici sono presenti a livello pre e post-sinaptico, e svolgono la loro azione sia sulla muscolatura liscia intestinale sia su quella vasale; è stato infatti dimostrato che contribuiscono alla vasocostrizione a livello intestinale. Sembra che la loro concentrazione sia maggiore nel cavallo maschio, forse a causa della relazione tra le catecolamine e la sintesi di ormoni steroidei (Re *et al.*, 2001).

I recettori α e le catecolamine dunque, svolgono un ruolo primario nella regolazione della motilità, sebbene i loro effetti siano variabili da specie a specie e da individuo ad individuo (Re *et al.*, 2001). In determinate condizioni inoltre, i neurotrasmettitori simpatici possono dare risultati inaspettati. In uno studio *in vitro* sul cavallo, condotto nel 1997 da Murray e collaboratori, si è registrata un'attività contrattile della noradrenalina. Questo effetto non era associato al rilascio di istamina, serotonina o bradichinine, né tantomeno a quello di acetilcolina, dal momento che la somministrazione di atropina non contrastava tale effetto. Poiché la contrazione era inibita a seguito della somministrazione di ergotamina (un antagonista dei recettori α adrenergici) si è giunti alla conclusione che la stimolazione dei recettori α_2 a livello intestinale possa in certe condizioni, provocare una contrazione della muscolatura liscia (Murray *et al.*, 1997).

La stimolazione dei recettori β adrenergici rivela una differente distribuzione di essi nelle fibre circolari rispetto a quelle longitudinali (Belloli *et al.*, 1997; Re *et al.*, 1997). Nelle prime, a seguito della stimolazione con β agonisti, si è registrata una riduzione della motilità ma nessuna variazione del tono basale; nelle seconde si è verificata una riduzione della motilità spontanea e del tono basale. Questa diversa risposta adrenergica spiega come, nel controllo della motilità

intestinale, le due fibre muscolari lisce agiscono in modo diverso e complementare tra loro (Belloli *et al.*, 1997). Sono stati anche individuati i sottotipi dei recettori β maggiormente coinvolti nella motilità, attraverso la loro stimolazione *in vitro* con specifici agonisti selettivi (Re *et al.*, 1997). Si è concluso che il controllo simpatico della muscolatura liscia intestinale nel cavallo, dipende soprattutto dall'attivazione dei recettori β atipici, una nuova classe di recettori, chiamati così perché non appartenenti al sottotipo $\beta 1$ e nemmeno al $\beta 2$, sebbene un ruolo importante sia giocato anche da questi ultimi. La popolazione di recettori $\beta 1$ invece, non sembra essere coinvolta nell'inibizione della motilità.

La motilità intestinale è regolata anche da vie neuronali intrinseche inibitorie ed eccitatorie, riconducibili all'attività di neuroni nonadrenergici-noncolinergici (NANC), che si servono dell'NO come principale neurotrasmettitore inibitorio, e di varie sostanze peptidergiche, (Van Hoogmoed *et al.*, 2000). L'inibizione primaria della motilità intestinale si pensa sia proprio mediata da questi neuroni. Il ruolo dei NANC è stato dimostrato nell'uomo, nella pecora, nel ratto e anche nel cavallo (Reid & Titchen, 1988; Boeckxstaens *et al.*, 1993; Rakestraw *et al.*, 1996). La presenza di neurotrasmettitori NANC nel sistema nervoso enterico è stata confermata sottoponendo

segmenti di muscolatura liscia circolare e longitudinale di digiuno di cavallo a stimolazione elettrica dopo aver bloccato i recettori adrenergici e colinergici (Malone *et al.*, 1999). La stimolazione di tali neuroni localizzati nei gangli del plesso mioenterico, determina in queste specie il rilasciamento della muscolatura liscia attraverso la liberazione di NO (Malone *et al.*, 1999). L'attività inibitoria dell'NO è stata ampiamente dimostrata *in vitro* attraverso la somministrazione di L-nitroarginina metil estere (L-NAME) su preparati stimolati elettricamente (Van Hoogmoed *et al.*, 2000). Questa sostanza è un analogo dell'arginina e si comporta come inibitore della NOS, competendo a livello del sito attivo dell'enzima con il substrato naturale. La L-NAME è in grado di bloccare l'effetto inibitorio e quindi di ristabilire le contrazioni della muscolatura liscia intestinale. Sono state osservate differenze nella contrattilità tra la muscolatura longitudinale e quella circolare, dovute ad una differente distribuzione di recettori per l'NO sintetasi, che sembra predominare nelle fibre circolari. Grazie al suo effetto procinetico, la L-NAME potrebbe avere un ruolo importante nel trattamento delle numerose disfunzioni intestinali del cavallo, dove l'NO gioca un ruolo importante come modulatore negativo della peristalsi (Rakestraw *et al.*, 1996).

Numerose molecole, tra cui peptidi e ormoni, rientrano nel controllo umorale della motilità intestinale. Questi possono agire come agenti inibitori o eccitatori della motilità, e spesso non è facile determinare con precisione la loro attività, a causa della variabilità delle risposte ottenute. Sembra che molecole come la 5-idrossitriptamina (5-HT), la sostanza P, liberate dall'intestino in seguito alla sua distensione, vadano a stimolare chemocettori specifici dando inizio alla peristalsi. Sembra più probabile tuttavia, che queste sostanze operino potenziando la capacità recettiva dei meccanicocettori della mucosa enterica, sui quali agiscono le fibre nervose intestinali (Beghelli, 2000). Sono molteplici gli stimoli che inducono il rilascio di queste sostanze, e spesso la loro attività è strettamente correlata a quella dei neurotrasmettitori, in particolare l'NO.

La presenza del VIP è stata dimostrata nei plessi mioenterici e submucosali di molti mammiferi (Burns & Cummings, 1993). Il VIP è in grado di produrre la dilatazione dei vasi sanguigni intestinali e un significativo rilassamento della muscolatura liscia del tratto gastroenterico. La sua attività è anche correlata ai NANC, in quanto stimola la sintesi di NO da parte della NOS e la sua liberazione da parte delle cellule muscolari lisce (Rakestraw *et al.*, 1996). La sostanza P, oltre ad avere molte funzioni biologiche, quali la

trasmissione dei segnali dolorifici, la regolazione della pressione sanguigna e la stimolazione alla secrezione di cellule endocrine e del sistema immunitario, è presente nelle fibre nervose dell'intestino e nelle cellule gangliari (Colten & Krause, 1997). La sostanza P provoca anch'essa vasodilatazione, ma, al contrario del VIP, possiede effetti stimolanti sulla muscolatura liscia intestinale e influenze eccitatorie sui neuroni mioenterici (Sellers & Lowe, 1986). Recentemente si è dimostrato che è causa di rilasciamento o contrazione della muscolatura liscia digiunale a seconda della intensità della stimolazione e dell'orientamento del muscolo longitudinale (Malone *et al.*, 2000). La sostanza P appartiene al gruppo delle tachichinine, una famiglia di neuropeptidi ampiamente presenti nelle fibre muscolari lisce dell'organismo e in tutto il sistema nervoso centrale e periferico (Belloli *et al.*, 1994). La sostanza P, la neurochinina A (NKA) e la neurochinina B (NKB) sono state identificate nel sistema nervoso centrale e periferico, e la presenza di tre tipi di recettori specifici per le neurochine (NK1, NK2 e NK3) è stata dimostrata in diversi tessuti (Regoli *et al.*, 1988). Le neurochine sono coinvolte in molti meccanismi fisiologici dell'apparato respiratorio, urinario e gastrointestinale, e possono agire regolando la vasodilatazione, lo stimolo dolorifico, la secrezione ghiandolare, l'attivazione della

risposta immunitaria e la flogosi (Erspamer, 1971; Pernow, 1983; Maggio, 1988).

A livello gastroenterico, le suddette sostanze svolgono la loro azione contratturante soprattutto sulla muscolatura circolare, dove è stata notata una maggioranza di recettori rispetto a quella longitudinale (Belloli *et al.*, 1994).

Un altro fattore responsabile della regolazione umorale della motilità intestinale è la motilina. Questo ormone digestivo svolge un ruolo importante nella regolazione della motilità; causa infatti le forti contrazioni del tratto gastroenterico, andando a stimolare i recettori muscarinici nelle fibre colinergiche (Sasaki & Yoshinara, 1999). Grazie a questa sua proprietà si è pensato di utilizzare alcuni suoi derivati con effetti molto simili nei pazienti con alterate funzioni intestinali, per esempio nel cavallo affetto da ileo post-operatorio. Tuttavia in questo animale, il ruolo della motilina non è ancora stato definito con precisione (Sasaki & Yoshinara, 1999).

La presenza di recettori per la serotonina (5-HT) nell'intestino, è stata ampiamente dimostrata (Weiss *et al.*, 2002). Questa molecola ha principalmente un'azione contratturante sulla muscolatura liscia (Sellers *et al.*, 1985). Sono numerosi i principi attivi studiati che agiscono come agonisti serotoninergici. I più famosi sono senza

dubbio la cisapride e la metoclopramide, che agiscono in particolare sui sottotipi recettoriali 5-HT₄.

Questi farmaci sono ampiamente usati nella pratica clinica nel cavallo come agenti procinetici sia all'occorrenza di episodi colici, sia a seguito dell'insorgenza di ileo paralitico post-operatorio e, più in generale, in tutti quegli stati patologici in cui la motilità peristaltica intestinale sia alterata o inibita (King & Gerring, 1988).

LE PROSTAGLANDINE

Sintesi

I prostanoidi, detti anche eicosanoidi, sono dei mediatori lipidici ubiquitari che coordinano diversi processi fisiologici e patologici attraverso l'interazione con specifici recettori di membrana accoppiati alle proteine G (Riccardi, 2005). Essi si formano a partire dall'acido arachidonico (AA). Attraverso la via ciclo-ossigenasica si vengono a formare: le prostaglandine, il trombossano e le prostacicline, mentre attraverso una seconda via lipossigenasica si formano i leucotrieni.

L'acido arachidonico, un acido grasso polinsaturo di 20 atomi di carbonio, direttamente disponibile nella dieta o derivante dalla conversione di un acido grasso essenziale (l'acido linoleico), può essere liberato dai fosfolipidi di membrana in seguito all'interazione di stimoli di diversa natura con la membrana cellulare.

Stimoli fisiologici (istamina, bradichinina, IL-1, trombina, fattori di crescita, angiotensina II, vasopressina) fisici (shear stress, ischemia), ed agenti farmacologici (esteri del forbolo), interagendo con dei recettori specifici presenti sulla membrana cellulare, stimolano delle

proteine G che a loro volta attivano alcune fosfolipasi, in particolare la fosfolipasi A₂, capaci di liberare l'AA dai fosfolipidi di membrana.

A questa prima tappa della sintesi dei prostanoidi ne segue una seconda in cui avviene la conversione dell'acido arachidonico a prostaglandine PGH₂, un endoperossido alquanto instabile. Questa richiede l'intervento di un enzima denominato PGH-sintasi, dotato di due attività catalitiche: una ciclo-ossigenasica che porta alla formazione della PGG₂ ed una perossidasi che riduce la PGG₂ a PGH₂. Due isoforme dell'enzima PGH-sintasi sono state clonate e caratterizzate: la PGH-sintasi 1 (PGHS-1 o COX-1) e la PGH-sintasi 2 (PGHS-2 o COX-2). L'espressione delle due isoforme è regolata in modo diverso. Il gene della COX-1 fa parte degli "*house-keeping genes*" che sono espressi in modo costitutivo da quasi tutte le cellule dell'organismo. Attraverso tecniche di immunocistochimica, si è dimostrato che l'enzima è localizzato a livello del reticolo endoplasmatico orientato verso il lume del reticolo stesso e a livello peri-nucleare. La COX-1 interviene soprattutto nella biosintesi immediata dei prostanoidi e svolge un ruolo importante nella formazione fisiologica di tali composti coinvolti nella comunicazione intercellulare e nell'amplificazione o modulazione locale di funzioni omeostatiche, quali quella gastrointestinale, piastrinica e renale.

Fu nel 1989 che studi condotti attraverso reazioni di immunoprecipitazione con anticorpi anti-COX (Rosen *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 1989) permisero di individuare una nuova isoforma di COX, oggi nota come COX-2. Questa non è presente nella maggior parte dei tessuti; è infatti definita come isoforma inducibile in seguito a stimoli pro-infiammatori. Interviene nella biosintesi ritardata dei prostanoïdi. La sua espressione è indotta da una notevole varietà di stimoli, come ad esempio i fattori di crescita (TGF- β , EGF, PDGF, FGF), le citochine pro-infiammatorie (IL-1, TNF- α), fattori cancerogeni ed il lipopolisaccaride (endotossina) (Jones *et al.*, 1993). L'espressione della COX-2, dunque, è repressa in condizioni basali, ma è drasticamente accelerata in presenza di flogosi in molte categorie cellulari: cellule sinoviali, endoteliali, condrociti, osteoblasti, monociti e macrofagi (Kay-Mugford *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2002). Tuttavia la COX-2 è espressa costitutivamente in alcuni distretti dell'organismo come il cervello, le isole pancreatiche, l'ovaio, l'utero ed il rene (Fossile, 2000). Questo enzima è codificato da un gene che fa parte degli “*immediate early genes*” ovvero geni che sono rapidamente espressi in risposta a stimoli e il cui mRNA è altamente instabile. Inoltre, studi effettuati sul topo, hanno dimostrato un ruolo fisiologico per la COX-2 in diversi organi: nel rene è stato osservato

che le maggiori concentrazioni dell'enzima si trovano nelle cellule della macula densa (Harris *et al.*, 1994) e nelle cellule interstiziali della midollare (Guan *et al.*, 1997); i prostanoidi generati dall'attività dell'enzima COX-2 si comportano da importanti mediatori nel processo della secrezione di renina e nel feedback tubulo-glomerulare (Stokes, 1979).

Infine, la terza tappa, consiste nella trasformazione della PGH₂ nei diversi prostanoidi attraverso diverse sintasi che sono espresse in modo tessuto-specifico (Riccardi, 2005). La prostaciclina (PGI₂) è dovuta all'azione della prostaciclina sintetasi, il trombossano (TXA₂) dalla trombossano sintetasi e le prostaglandine della prostaglandina isomerasi (Kore, 1990).

Recentemente è stata scoperta da Chandrasekharan e collaboratori (Chandrasekharan *et al.*, 2002) la COX-3. Forma variante della COX-1, è stata identificata nel cervello di cane. Sebbene questa forma sia stata riportata essere più sensibile all'inibizione del paracetamolo rispetto alla COX-1 ed alla COX-2 *in vitro*, questo effetto sembra essere dipendente dalla concentrazione di AA esogeno. Non sono disponibili, almeno fino ad ora, delle evidenze sperimentali e/o cliniche che supportino la possibilità che gli effetti analgesici del

paracetamolo e di altri FANS, quando somministrato alle dosi terapeutiche, siano dovuti all'inibizione della COX-3.

Funzioni

Le prostaglandine sono importanti modulatori del tono vascolare e dell'omeostasi idrosalina nel rene di tutti i mammiferi. Intervengono nella regolazione emodinamica a livello glomerulare, nel riassorbimento tubulare di acqua e di sale e nella regolazione della secrezione di renina (Breyer & Breyer, 2000). Le prostaglandine svolgono inoltre un ruolo primario nella regolazione della motilità e dell'omeostasi dell'apparato gastroenterico (Cao *et al.*, 1997).

Le prostaglandine della serie E esplicano effetto protettivo contro la formazione di ulcere gastriche (citoprotezione gastrica). È stato dimostrato che basse dosi di tali composti non riducono la secrezione gastrica nell'animale da esperimento, mentre la somministrazione di alte dosi di PGE riduce significativamente tale secrezione (Ebherart & Dubois, 1995). Numerosi studi hanno quindi dimostrato che la PGE ed i suoi analoghi, proteggono contro le ulcere gastriche prodotte dagli steroidi o dai farmaci antinfiammatori (Ebherart & Dubois, 1995; Smith & DeWitt, 1995). Le PGE₂, PGF_{2α} e PGI₂, hanno un ruolo predominante sulle funzioni enteriche in quanto sono in grado di modulare l'attività della muscolatura liscia gastrointestinale. Agiscono inoltre sulla regolazione dell'assorbimento di liquidi ed elettroliti,

sulla secrezione mucosale, sul flusso sanguigno, sull'immunoregolazione, sulla motilità, ma soprattutto sulla flogosi, inducendo vasodilatazione, aumento della permeabilità capillare e della chemiotassi. Potenziano inoltre gli effetti degli altri mediatori chimici dell'infiammazione, come l'istamina e le bradichinine e sono in grado di provocare uno stato di iperalgesia. Tra i numerosi sottotipi, la PGE₂ è quella maggiormente presente nel tratto gastrointestinale (Van Hoogmoed *et al.*, 2000). I vari sottotipi di prostaglandine hanno azioni diverse sulle fibre circolari e su quelle longitudinali. In generale la muscolatura longitudinale è contratta sia dalla PGE₂ e sia dalla PGF_{2α} mentre la muscolatura circolare è contratta dalla PGF_{2α} e rilassata sia dalla PGI₂ sia dalla PGE₂. Studi condotti *in vivo* nel cavallo (Hunt & Gerring, 1985), hanno dimostrato che le prostaglandine di tipo I₂ deprimono l'attività elettrica e meccanica del piccolo e del grosso intestino, inibendo la contrazione della muscolatura circolare e longitudinale, mentre la PGF_{2α} si comporta allo stesso modo in tutte le specie animali studiate, inducendo contrazioni su entrambi i tipi di fibre. È difficile tuttavia, studiare con precisione l'azione di ogni singolo sottotipo, poiché la popolazione, la densità recettoriale e la funzione stessa di queste molecole variano a seconda del segmento di intestino preso in esame oltre che dalla

specie considerata; inoltre le prostaglandine hanno un'emivita brevissima, dato che dopo solo pochi minuti dall'entrata in circolo sono idrolizzate e trasformate in metaboliti inattivi (Van Hoogmoed *et al.*, 1999).

In generale dunque, si può affermare che nel cavallo, la PGE₂ e la PGF_{2α} sono le più importanti prostaglandine coinvolte nella regolazione dell'attività contrattile (specialmente nel grosso intestino), mentre la PGI₂ ha un effetto inibitorio principalmente sulla motilità e la sua azione si può riscontrare in diversi distretti, dallo stomaco al grosso intestino (Van Hoogmoed *et al.*, 1999).

Recenti studi (Van Hoogmoed *et al.*, 2002) condotti *in vitro* nel cavallo, hanno dimostrato una correlazione tra prostaglandine e NO.

Quest'ultimo induce il rilascio di prostaglandine nelle fibre muscolari lisce longitudinali. L'NO infatti, è un mediatore dell'infiammazione dotato di effetti pleiotropici, ritenuto inizialmente un fattore di derivazione endoteliale, capace di indurre vasodilatazione per il suo effetto di rilassamento sulle cellule muscolari lisce dei vasi (Nathan, 1997). Le prostaglandine, d'altra parte, sono responsabili della regolazione di numerose funzioni intestinali, tra cui la promozione della sintesi dei mediatori della flogosi a livello gastroenterico. Inducendo la liberazione locale di prostaglandine, l'NO può

ulteriormente incentivare il meccanismo di risposta infiammatoria a seguito di un danno intestinale. Inoltre sono state riscontrate molte similitudini tra la NOS e la COX, la cui sintesi, in sede d'infiammazione, è stimolata dalle citochine e da altri fattori di origine macrofagica, o dalle cellule endoteliali.

I FARMACI ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI (FANS)

Meccanismo d'azione

I FANS sono un gruppo eterogeneo di composti che mostrano gli stessi effetti terapeutici (antipiretici, analgesici ed antinfiammatori) e collaterali (in particolare la tossicità gastrointestinale e renale), che dipendono in gran parte dalla mancata biosintesi dei prostanoidi, attraverso l'inibizione delle COX (Riccardi, 2005).

I FANS in commercio inibiscono in modo non selettivo le due isoforme della COX (COX-1 e COX-2), o hanno una certa selettività per l'isoforma COX-1, considerando che l'impiego di farmaci con tale meccanismo d'azione precede la scoperta dell'esistenza delle distinte isoforme della COX. Tra questi si ricordano l'ibuprofene, il naprossene, l'indometacina, il diclofenac, il sulindac, il ketoprofene, etc. L'azione preferenziale dei FANS sulle isoforme della COX, rende ragione dei differenti effetti farmacologici e tossici di questa classe di farmaci a livello dei diversi distretti organici. In seguito all'identificazione delle due isoforme della COX si è venuta a

consolidare la convinzione che l'inibizione della isoforma COX-2 possa spiegare gli effetti terapeutici dei FANS, mentre l'inibizione della COX-1 sarebbe alla base dei loro effetti collaterali (Mitchell *et al.*, 1994). Numerosi studi sono stati condotti al fine di determinare i diversi effetti relativi all'inibizione delle due isoforme e, alla fine, è stato dimostrato che maggiore è la selettività di un FANS per la COX-1, maggiore è la probabilità di comparsa di effetti collaterali (Mitchell *et al.*, 1994). La dose necessaria per inibire ciascuna delle due isoforme, fornisce comunque un metodo per valutare la sicurezza ed efficacia relative di ciascuna molecola, anche se spesso alti dosaggi terapeutici possono determinare l'inibizione di entrambe le COX (Moses & Bertone, 2002). Un farmaco che inibisca la COX-2 a concentrazione più bassa rispetto a quella necessaria per inibire la COX-1, è probabilmente più sicuro, perché con maggiore probabilità le prostaglandine che derivano dalla COX-2 saranno maggiormente inibite rispetto a quelle COX-1-dipendenti.

L'inibizione delle ciclossigenasi può essere reversibile od irreversibile. Il legame irreversibile del FANS alla ciclossigenasi potrebbe spiegare l'apparente incongruenza tra la breve emivita del farmaco rispetto alla durata d'azione relativamente lunga (Kore, 1990).

Selettività dei FANS

La selettività dei FANS verso le due isoforme della COX può essere valutata *in vitro* utilizzando diversi modelli biochimici che prevedono l'utilizzo di enzimi umani isolati o cellule intere che esprimono selettivamente uno dei due isoenzimi. La selettività è basata sulla valutazione dell'inibizione concentrazione-dipendente dell'attività delle due isoforme della COX ed è espressa dal rapporto della concentrazione del farmaco necessaria per inibire del 50% (IC_{50}) l'attività della COX-1 e della COX-2 ($COX-1/COX-2 IC_{50} ratio$). Una $COX-1/COX-2 ratio$ molto maggiore dell'unità indica che il farmaco è selettivo per la COX-2; un rapporto delle IC_{50} vicino all'unità significa che il farmaco è un inibitore non selettivo delle ciclo-ossigenasi; una $COX-1/COX-2 ratio$ molto più bassa di 1 si ottiene per farmaci inibitori selettivi della COX-1.

Il test biochimico del sangue intero viene considerato il saggio di riferimento per la valutazione della selettività biochimica verso le COX da parte dei FANS. In questo modello, l'effetto inibitorio dei farmaci sull'attività della COX-1 si valuta misurando i livelli di trombossano B_2 , un indice dell'attività ciclo-ossigenasica della COX-1

piastrinica, nel siero ottenuto lasciando coagulare il sangue per 1 ora a 37°C. L'effetto inibitorio dei farmaci sull'attività della COX-2 si valuta inducendo l'espressione di questo enzima nel sangue intero con lipopolisaccaride (LPS). L'aggiunta di LPS al sangue intero eparinizzato induce l'aumento della biosintesi di PGE₂ in modo tempo-dipendente, che correla con l'aumentata espressione della COX-2 monocitaria. Il contributo dell'attività delle COX-1 viene soppresso aggiungendo aspirina *in vitro*, o pretrattando i soggetti con lo stesso farmaco 48 ore prima del prelievo. Infatti nelle piastrine l'inibizione irreversibile della COX-1 non può essere recuperata perché queste sono prive di nucleo e hanno scarsa attività di sintesi proteica (Riccardi, 2005).

Farmacocinetica

Per quanto i FANS presentino notevoli differenze farmacocinetiche, tali farmaci hanno alcune proprietà generali in comune. La maggior parte dei FANS, tranne il nabumetone (un chetone presente come pro-farmaco che è metabolizzato a farmaco attivo acido) sono somministrati come acidi organici deboli e vengono prontamente assorbiti dai primi tratti dell'apparato gastroenterico. Numerosi fattori possono tuttavia influenzare l'entità e la velocità dell'assorbimento: la specie animale, il pH intragastrico, la presenza o meno di cibo nello stomaco, la motilità gastro-intestinale intrinseca, eventuali lesioni della mucosa e la concentrazione del farmaco (Kore, 1990). I FANS sono distribuiti generalmente a livello extracellulare, sebbene, essendo acidi deboli, spesso tendono a penetrare nel tessuto danneggiato o infiammato, dove il pH è generalmente più basso. Il metabolismo dei FANS è epatico, attraverso la via del citocromo P450. La maggior parte dei FANS è largamente metabolizzata, sia da reazioni di fase I sia da reazioni di fase II e queste ultime possono aver luogo anche direttamente sul farmaco immodificato (Vane & Botting, 1987). L'escrezione è per la maggior parte renale, attraverso la filtrazione glomerulare e la secrezione tubulare. Molti di questi farmaci sono

soggetti a successivo riassorbimento a livello intestinale, dando vita ad un circolo entero-epatico che prolunga il tempo di permanenza del farmaco stesso nell'organismo; tale fenomeno, che da un lato mantiene gli effetti dei farmaci per un tempo maggiore, evidenzia anche il grado di lesività dei FANS a livello del tratto gastroenterico inferiore ed è direttamente proporzionale all'entità di tale circolo (Wagner *et al.*, 2006). La proteina più coinvolta nel legame è l'albumina ed una volta che i suoi siti di legame sono saturati, aumenta la quota libera di farmaco in circolo, fenomeno che ovviamente si può manifestare anche in caso di ipoalbuminemia. Il legame farmaco-proteico è molto forte (>98%), tanto che spesso i FANS spiazzano altre molecole dai siti di legame, potenziando gli effetti di altri farmaci presenti nell'organismo. Il più significativo tra i farmaci spiazzanti è certamente il fenilbutazone, un membro della famiglia dei FANS che, almeno nella pratica clinica umana, è stato completamente soppiantato, soprattutto per la propensione notevole a condizionare la cinetica di altri farmaci ad esso associati.

Indicazioni terapeutiche

Gli inibitori delle ciclossigenasi hanno effetti anti-infiammatori, analgesici ed antipiretici. Unica eccezione è il paracetamolo, che viene utilizzato come analgesico ed antipiretico, ma non come anti-infiammatorio, in quanto sembra inibire le ciclo-ossigenasi prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale (Riccardi, 2005).

Il principale impiego clinico dei FANS è la terapia delle affezioni infiammatorie dell'apparato muscolo-scheletrico, come l'artrite reumatoide, l'artrosi, le artriti, la spondilite anchilosante e i più svariati processi infiammatori, sia acuti che cronici, che colpiscono articolazioni, tendini e muscoli. In genere, però, i FANS producono solamente un effetto sintomatico, liberando il paziente dal dolore e dagli altri sintomi del processo infiammatorio, senza peraltro influire sui meccanismi patogenetici della malattia e senza arrestarne la progressione.

L'acido acetil salicilico (ASA) ed altri FANS sono stati somministrati in associazione con analgesici oppioidi nella terapia del dolore oncologico, dove i loro effetti analgesici sono sinergici con gli effetti degli oppioidi. Inoltre l'ASA è utilizzato come antiaggregante

piastrinico sia in terapia umana che in ambito veterinario, ad esempio nel trattamento della coagulazione intravascolare disseminata (CID) secondaria a filariosi cardio-polmonare nel cane e nelle cardiomiopatie del gatto (Moses & Bertone, 2002).

L'utilizzo dei FANS come analgesici è stato in questi ultimi anni un argomento di studio molto interessante, che ha aperto nuove frontiere nell'ambito della terapia del dolore. Le prostaglandine agiscono sulle terminazioni delle fibre sensitive, provocando una scarica di impulsi nervosi, che rendono la terminazione stessa più sensibile a mediatori algogeni quali l'istamina e la bradichinina, capaci di amplificare la soglia della nocicezione e di causare un aumento della sensazione dolorifica. I FANS dunque, non esercitano un effetto diretto sulla percezione del dolore, ma riducono l'ipersensibilità allo stimolo dolorifico causato ad esempio dalla risposta infiammatoria (Kallings, 1993). Tuttavia l'effetto analgesico dei FANS non si riduce all'azione sulle terminazioni nervose periferiche. Alcuni FANS esercitano anche un'azione diretta sulla ciclossigenasi spinale, bloccando l'ipersensibilità al dolore che si manifesta in corso di flogosi, indotta dall'attivazione dei recettori per il glutammato e la sostanza P (Malmberg & Yaksh, 1992). I FANS possono avere effetti analgesici attraverso meccanismi che non sono correlati all'inibizione delle

prostaglandine; per esempio sono tra i responsabili dell'inibizione della sintesi di neurotrasmettitori coinvolti nella percezione dello stimolo dolorifico (Liles & Flecknell, 1992). Alterano inoltre il flusso di ioni attraverso la membrana cellulare, con possibile diminuzione della probabilità di generare un potenziale d'azione, e quindi riduzione della propagazione sinaptica, generando un effetto parzialmente inibitorio sulla trasmissione dell'impulso nervoso (Kallings, 1993). L'influenza della flunixin meglumina e di altri FANS sul controllo del dolore addominale nel cavallo affetto da colica può essere dunque dovuta, anche se solo in parte, ad un'azione centrale (Kallings, 1993).

La scoperta che la COX-1 è espressa costitutivamente nella maggior parte dei tessuti ed è implicata nella regolazione di alcune funzioni fisiologiche (mantenimento dell'integrità della mucosa gastrica, dell'omeostasi renale e l'aggregazione piastrinica), mentre l'espressione della COX-2 è repressa in condizioni basali, ha suscitato, negli anni '90, un grande interesse nei confronti dei farmaci COX-2 selettivi (coxib). Con l'utilizzo di questi composti si pensava di poter mantenere gli stessi effetti terapeutici dei FANS non selettivi, ma senza i loro tipici effetti collaterali, aumentandone dunque la sicurezza (Coruzzi *et al.*, 2004).

Il verificarsi di alcuni effetti collaterali hanno spinto gli scienziati a non semplificare l'equazione COX-1 costitutiva e COX-2 indotta, ed ad indagare un possibile ruolo fisiologico delle COX-2 (Coruzzi *et al.*, 2004).

Effetti collaterali

Tutti i FANS inducono effetti collaterali indesiderati e potenzialmente pericolosi per la vita del paziente. Gli effetti collaterali che si osservano più frequentemente riguardano l'apparato gastroenterico e possono causare da un leggero dolore epigastrico ad una gastrite ulcerativa ed emorragica, che può essere accompagnata secondariamente da anemia ed ipoproteinemia. Il meccanismo patogenetico riguarda chiaramente l'inibizione della sintesi di prostaglandine sintetizzate dalla COX-1. La PGE₂ e la PGI₂ diminuiscono il volume, l'acidità ed il contenuto di pepsina delle secrezioni gastriche, la cui produzione è stimolata dall'assunzione di alimento, dall'istamina o dalla gastrina. Le prostaglandine inoltre, stimolano la produzione di muco e bicarbonato dalle cellule epiteliali,

determinano vasodilatazione nella mucosa gastrica e produzione di muco nel piccolo intestino.

Si pensa che l'inibizione della produzione di prostaglandine sia una sorta di "priming", cioè di stimolo primario, al quale si aggiungono in seguito altri effetti secondari, quali lo stress o danni concomitanti alla mucosa, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, che predispone ad eventi emorragici a livello del microcircolo. Sono inoltre esaltate le azioni lesive dei radicali liberi prodotti dai leucotrieni (non inibiti dai comuni FANS), che contribuiscono a danneggiare la mucosa. Le prostaglandine prodotte dalle COX-2 non sembrano giocare un ruolo significativo di difesa nel mantenimento dell'integrità della mucosa gastrica. Piuttosto agiscono come "seconda linea di difesa" nel processo riparativo e di guarigione dalle ulcere (Coruzzi *et al.*, 2004). L'utilizzo, infatti, di questi farmaci ritarda i processi riparativi attraverso l'inibizione della proliferazione cellulare ai margini dell'ulcera, la maturazione e la contrazione del tessuto di granulazione al di sotto del cratere e la neoangiogenesi (Coruzzi *et al.*, 2004). Se è vero dunque che i coxib per la loro scarsa influenza sulla integrità della mucosa e sulla funzionalità piastrinica possono essere meno ulcerogeni in pazienti senza problemi di ulcere gastriche, il loro utilizzo è controindicato in presenza di precedenti danni, dove il ruolo

protettivo dei prostanoidi della COX-2 diventa predominante (Coruzzi *et al.*, 2004).

Gli effetti collaterali dei FANS, sia COX-1 sia COX-2, si possono rilevare anche nel rene, sebbene si presentino con una frequenza minore rispetto a quelli a carico dell'apparato gastroenterico. L'incidenza di nefrotossicità è più elevata nei soggetti con patologia renale preesistente o con disordini che comportino ipoperfusione renale (Brown, 1989). L'effetto negativo che i FANS possono esplicare a livello renale consegue alla diminuita sintesi di prostaglandine in tale sede. Le due prostaglandine più importanti prodotte nel rene sono la PGI₂ (presente a livello dei glomeruli, delle arteriole e dei tubuli collettori della corticale) e la PGE₂ (presente nella midollare nei tubuli collettori e nelle cellule interstiziali) (Dunn, 1984). Il ruolo delle prostaglandine è di garantire il mantenimento del flusso ematico renale attraverso la dilatazione delle arteriole efferenti e bilanciando gli effetti di agenti vasocostrittori sistemici quali l'angiotensina, la noradrenalina e la vasopressina (Dibona, 1986; Venturini *et al.*, 1998). Un altro ruolo importante svolto dalle prostaglandine renali, in particolare la PGI₂, è relativo alla liberazione di renina; tale prostaglandina, infatti, induce l'aumento dell'AMPc nelle cellule iuxtaglomerulari, che a loro volta stimolano direttamente

la secrezione di renina; questa agisce inducendo il rilascio di aldosterone, ormone responsabile di diverse importanti azioni nel metabolismo renale, come la diminuzione dell'escrezione urinaria di sodio e l'aumento della secrezione di potassio (Stillman & Schlesinger, 1990). Le più importanti implicazioni cliniche relative alla nefrotossicità da FANS sono dunque nefrite interstiziale acuta, necrosi papillare acuta, sindrome nefrosica ed insufficienza renale acuta e cronica. Quest'ultima, in particolare, è la patologia riscontrata più frequentemente in seguito a trattamenti prolungati con FANS. È definita insufficienza renale prostaglandina dipendente, ed è provocata dall'ipoperfusione renale conseguente alla diminuita produzione delle prostaglandine vasodilatatorie PGE₂ e PGI₂.

I FANS possono alterare la funzionalità piastrinica, in particolare l'aspirina che induce in maniera irreversibile la produzione, mediata dalla COX-1, di TXA₂. Questo esita in una minore aggregazione piastrinica ed in una maggiore tendenza all'emorragia, che potrebbe aggravarsi nei soggetti con coagulopatie (Kore, 1990).

Recentemente, molta attenzione è stata posta sulla sicurezza cardiovascolare degli inibitori selettivi della COX-2. Diverse esperienze sperimentali suggeriscono che la prostaciclina (PGI₂), un prostanoide vasodilatatore ed antiaggregante le piastrine, sia in grado

di limitare le conseguenze dell'attivazione piastrinica *in vivo*. La biosintesi della PGI₂ è in gran parte COX-2 dipendente infatti, nei soggetti sani, i coxib riducono l'escrezione urinaria dei metaboliti della prostaciclina in modo simile ai FANS non selettivi, ma diversamente da quest'ultimi, non inibiscono la biosintesi del trombossano (TXA₂), un prostanoide vasocostrittore e pro-aggregante le piastrine. Dunque, l'utilizzo di COX-2 inibitori può essere associato ad un aumento del rischio problemi cardiovascolari (Coruzzi *et al.*, 2004; Riccardi, 2005). Oltre all'azione antiplastrinica, certi FANS (per esempio il fenilbutazone) sono responsabili di discrasie ematiche per un effetto sul midollo osseo (Moses & Bertone, 2002).

Poiché il fegato svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo dei FANS, c'è da aspettarsi che possa essere un organo bersaglio degli effetti collaterali, sebbene un'epatotossicità legata a terapie con FANS non sia stata registrata così frequentemente. Tali reazioni tossiche vengono generalmente considerate di natura idiosincrasica e sono ospite-dipendenti (Zimmerman, 1981). Implicano, infatti, una suscettibilità individuale causata da disturbi metabolici, reazioni di ipersensibilità e reazioni immuno-mediate; non sono dose-dipendenti e non possono essere previste, poichè sono legate alla risposta del singolo soggetto. Un FANS in particolare, il paracetamolo, è risultato

essere molto epatotossico soprattutto nel gatto. Il motivo di questa tossicità è il deficit della glucuronil-transferasi epatica: il farmaco in eccesso che non riesce ad essere completamente coniugato, è convertito in metaboliti tossici, che nel giro di 2-4 ore causano un danno ossidativo all'emoglobina, con conseguente formazione di metaemoglobina. Quest'ultima in condizioni fisiologiche viene ridotta ad emoglobina dal glutathione, la cui sintesi è però deficitaria in presenza di paracetamolo. I metaboliti tossici dunque, si accumulano a livello epatico, provocando necrosi. Mentre nel gatto la tossicità del paracetamolo è legata ad una carenza dei sistemi metabolici epatici tipica di questa specie, nel cane la tossicosi è soprattutto dose-dipendente, legata quindi al sovradosaggio e non ad un difetto intrinseco dell'organismo (Zimmerman, 1981).

Classificazione dei FANS

I FANS possono essere classificati in tre modi; in base alla struttura chimica, a seconda del meccanismo di inibizione della ciclossigenasi ed in base all'isoenzima della ciclossigenasi che inibiscono (Moses & Bertone, 2002). Chimicamente si dividono in 13 gruppi: (Insel, 1997).

1. Salicilati: acido acetilsalicilico (ASA)
2. Salicilati non acetilati: salicilato di colina e magnesio, salicilato di sodio, salicil-salicilato.
3. Derivati dell'acido propionico: ibuprofene, fenoprofene, ketoprofene, naprossene, carprofene, flurbiprofene.
4. Derivati degli acidi pirroloalcanoici: tolmetina.
5. Derivati indolici: indometacina.
6. Derivati pirazolici: fenilbutazone.
7. Derivati acidi fenilacetici: diclofenac.
8. Fenamati: acido meclofenamico.
9. Oxicami: piroxicam, meloxicam, tenoxicam.
10. Aril-antiacilici: flunixina meglumina.
11. Alcanoni: nabumetone.
12. Sulfanilidi: nimesulide, flosulide, NS-398.

13. Diaril eterociclici: celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, etoricoxib, parecoxib, SC-560, DUP 697.

In base al meccanismo di inibizione delle ciclossigenasi si dividono in tre classi:

1. Classe 1: inibizione semplice, competitiva, reversibile; vi appartengono: paracetamolo, indometacina, etodolac, diclofenac, ketorolac, ibuprofene, naprossene, flurbiprofene, ketoprofene, carprofene, piroxicam, meloxicam, fenilbutazone, nabumetone, flunixina meglumina, celecoxib, rofecoxib, nimesulide.
2. Classe 2: inibizione tempo-dipendente, competitiva, reversibile; vi appartiene l'acido meclofenamico.
3. Classe 3: inibizione tempo-dipendente, competitiva, irreversibile; vi appartiene l'aspirina.

Infine, in base all'isoenzima della ciclossigenasi che inibiscono si dividono in:

1. Inibitori specifici della COX-1: SC-560, aspirina a basse dosi.
2. Inibitori non specifici della COX: ibuprofene, naprossene, flunixina meglumina, indometacina.

3. Inibitori preferenziali della COX-1: indometacina, flunixina meglumina.
4. Inibitori preferenziali della COX-2: etodolac, meloxicam, carprofene, nimesulide, diclofenac.
5. Inibitori specifici della COX-2: celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib, parecoxib, DUP-697, NS-398.

Nello studio in esame sono stati usati 6 tipi di FANS appartenenti a diverse famiglie: celecoxib, flunixina meglumina, indometacina, SC-560, DUP-697, NS-398.

Flunixina meglumina

La flunixina meglumina è un farmaco antinfiammatorio molto usato nel cavallo per la gestione del dolore nella colica, per le patologie dell'apparato locomotore e per la gestione del dolore post-operatorio (Soma *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1993).

Rispetto agli altri FANS, presenta il vantaggio di avere effetti antiendotossici ed analgesici anche a dosaggi molto bassi. Esplica dunque il suo effetto senza mascherare la sintomatologia, aspetto molto importante nella pratica clinica, per evitare errori di valutazione

sulle reali condizioni dell'animale (Semrad *et al.*, 1985; Mac Allister; 1994).

La durata dell'effetto della flunixinina non è molto facile da stabilire. Una singola dose può prolungare il suo effetto anche oltre le 24 ore, e questa lunga durata d'azione dipende chiaramente dalla sua farmacocinetica (Lees *et al.*, 1987). Una volta somministrata all'animale, per via orale o intramuscolare, si distribuisce rapidamente nell'organismo (Landoni & Lees, 1995); è stato tuttavia riscontrato che la somministrazione per via intramuscolare può causare una miosite clostridica mortale (Moses & Bertone, 2002). Il picco di concentrazione plasmatica si raggiunge circa 30 minuti dopo la somministrazione; l'emivita plasmatica è breve, circa un'ora e mezza, e l'inizio dell'effetto si registra dopo circa 2 ore (Kallings, 1993). La concentrazione di flunixinina negli essudati infiammatori è alta, perché, dato il forte legame alle albumine, in corso di infiammazione queste passano dal plasma ai foci della flogosi, trascinando con sé il farmaco legato. Si può ipotizzare una chiara tendenza della flunixinina a lasciare il compartimento centrale (il plasma), per andare a localizzarsi nei tessuti colpiti e nei compartimenti meno vascolarizzati, andando così a prolungare la durata d'azione. La maggiore quota di flunixinina meglumina è escreta rapidamente con le urine, ma a questa fase segue

una prolungata escrezione urinaria di piccole quantità di farmaco anche per sei giorni. La flunixina è un inibitore non selettivo della ciclossigenasi, ed i suoi effetti collaterali nell'apparato gastroenterico sono simili a quelli della maggior parte dei FANS. Ha un ruolo importante nella motilità, in quanto è molto efficace nel combattere la stasi da endotossine (un altro dei motivi per cui viene sovente impiegata in caso di colica) (King & Gerring, 1991; Lester *et al.*, 1998). La flunixina sembra anche in grado di modificare il trasporto di ioni ed acqua nel grosso intestino, alterando il riassorbimento di liquidi e quindi il transito intestinale (Freeman *et al.*, 1997).

Indometacina

L'indometacina è un potente farmaco antinfiammatorio, antipiretico ed analgesico, che è stato largamente impiegato nel trattamento di patologie osteoarticolari, sia nell'uomo sia nel cavallo. In seguito alla somministrazione endovenosa si lega alle proteine plasmatiche, ma rimane in circolo per un tempo inferiore rispetto agli altri FANS; viene infatti rapidamente assorbita e già 12 ore dopo la somministrazione, il picco massimo di eliminazione è rintracciabile

nelle urine (Mac Allister, 1994). Tuttavia, in questi ultimi anni, l'utilizzo di indometacina nella pratica clinica è stato un po' scoraggiato dai seri effetti collaterali registrati.

Numerose evidenze scientifiche (Vadenbossche, 1990; Delbeke *et al.*, 1991) hanno dimostrato che l'indometacina, somministrata alle dosi terapeutiche, ha provocato in diversi cavalli disfunzioni transitorie del sistema nervoso centrale, quali ottundimento del sensorio, atassia, paresi e dispnea. I segni clinici nella maggior parte dei casi sono scomparsi nell'arco delle 24 ore, ma alcuni cavalli hanno registrato una persistenza dei sintomi per 7 giorni. Inoltre, nei cavalli trattati con indometacina, si è riscontrata leucopenia e sangue occulto nelle feci. L'utilizzo prolungato di questo farmaco, può avere serie ripercussioni sull'apparato gastroenterico, con effetti ulcerogenici accentuati dal fatto che anche l'indometacina è un inibitore non specifico della ciclossigenasi, con attività preferenziale sulla COX-1 (Rotting *et al.*, 2004). L'ultimo dato da segnalare sull'indometacina riguarda il suo utilizzo in passato come sostanza dopante negli sport equestri. Infatti, questo FANS, oltre che essere eliminato velocemente per via urinaria, quando è somministrato per via transrettale, non è rintracciabile dalle metodologie analitiche di routine per la ricerca di sostanze dopanti nel sangue (Delbeke *et al.*, 1991).

SC-560

Il composto SC-560 è un inibitore selettivo della COX-1, di esclusivo interesse sperimentale, in quanto nell'uomo e negli animali può causare danni serissimi ed in certi casi anche la morte, proprio a causa della sua specifica selettività nei confronti della ciclossigenasi costitutiva. Non essendo usato correntemente nella pratica clinica, la sua farmacocinetica non è stata studiata in maniera approfondita, e le informazioni presenti in letteratura sono piuttosto scarse. È una molecola molto lipofila e scarsamente solubile in soluzioni acquose; per questa sua proprietà è più facilmente assorbito da tessuti con alto tenore lipidico, quali il tessuto adiposo e l'encefalo. Uno studio condotto sul ratto (Teng *et al.*, 2003) ha dimostrato che se somministrato per via orale, l'SC-560 possiede una bassissima biodisponibilità e, una volta assunto, viene interamente metabolizzato a livello epatico. Alcuni studi (Rudnick *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Lopez-Parra *et al.*, 2002) condotti *in vivo* sul ratto hanno dimostrato che l'SC-560, somministrato in animali con patologie da ridotta funzionalità epatica (cirrosi), ha un comportamento alterato in termini di metabolismo e farmacocinetica. L'escrezione dell' SC-560 è prettamente renale; nel ratto induce un incremento significativo della

N-acetyl- β -D-glucosaminidasi (NAG) nel volume di urine prodotte nelle 24 ore. La NAG è un enzima lisosomiale presente nelle cellule dei tubuli renali, che non è sottoposto alla filtrazione glomerulare per il suo peso molecolare troppo elevato. Pertanto l'aumento dell'escrezione urinaria di tale molecola è considerato indicativo di danno cellulare. Inoltre, in seguito a somministrazione dell'SC-560 è stata rilevata, sempre a livello renale, una diminuzione nell'escrezione di sodio, potassio e cloro; si ricorda infatti, che uno dei ruoli delle prostaglandine costitutive renali (prodotte dalla COX-1), è la regolazione elettrolitica. L'effetto antinfiammatorio di questa molecola è molto scarso; inibendo solo la formazione di prostaglandine derivate dalla COX-1, riduce il livello di PGE₂ negli essudati infiammatori, ma non blocca l'edema e l'iperalgia (Teng *et al.*, 2003).

Celecoxib

Sono poche le informazioni in letteratura riguardo all'uso di questa molecola nella pratica equina. Il celecoxib è il prototipo degli inibitori specifici e reversibili della COX-2. La sua selettività tuttavia è un fenomeno dose dipendente, nel senso che dosaggi superiori a quelli terapeutici possono consentire l'inibizione anche della COX-1, e

quindi provocare effetti collaterali più gravi. Il farmaco ha un'emivita plasmatica di circa 11 ore. È fortemente legato alle proteine plasmatiche, viene metabolizzato a livello epatico dal sistema del citocromo P450 e viene escreto per la maggior parte a livello renale. La sua distribuzione nell'organismo in corso di flogosi non è differente dagli altri FANS presi in considerazione. Può dare effetti collaterali a livello gastrointestinale, che consistono soprattutto in dolore addominale e diarrea alternata a stipsi (Dorigo, 2003).

DUP-697

Il composto DUP-697 appartiene, insieme al celecoxib, alla classe dei composti diarileterociclici, caratterizzati da un anello centrale che sembra importante per l'inibizione selettiva della COX-2 (Dannhardt *et al.*, 2001). Studi in vitro hanno evidenziato un'attività inibitoria selettiva sull'attività della COX-2, mentre effetti inibitori sull'attività della COX-1 si verificano con concentrazioni almeno 80 volte maggiori rispetto a quelle necessarie per inibire le COX-2. Inoltre, il legame del DUP-697 con l'isoenzima COX-1 è debole e di tipo reversibile. Al contrario, in seguito all'interazione del DUP-697 con l'isoenzima COX-2, si verifica una modificazione strutturale

dell'enzima stesso da cui risulta un'inibizione di tipo irreversibile e tempo-dipendente (Copeland *et al.*, 1994).

Studi in vivo condotti in diverse specie animali hanno evidenziato un'efficacia antinfiammatoria, analgesica e antipiretica paragonabile a quella di indometacina, piroxicam e sulindac. Diversamente dai farmaci antiinfiammatori classici, il DUP-697 non ha prodotto danni tissutali a livello gastrico nel ratto e nel cane, non ha indotto disturbi gastrointestinali e non ha inibito né la produzione di prostaglandine renali né il flusso renale nel ratto (Gans *et al.*, 1990). Il composto DUP-697 è somministrabile per via orale, presenta una biodisponibilità elevata (80%) e scarso metabolismo epatico.

L'uso di tale composto è per ora esclusivamente sperimentale; inoltre, almeno nella specie umana, il DUP-697 va incontro a circolazione entero-epatica e la sua emivita è di 292 ore circa (Pinto *et al.*, 1996). Tale caratteristica lo rende quindi un composto difficilmente applicabile in clinica.

Non sono noti studi in vivo condotti con questo composto nella specie equina.

NS-398

Il composto NS-398 è ampiamente usato in farmacologia sperimentale per la sua capacità di inibire in modo selettivo l'attività della COX-2 (Dannhardt *et al.*, 2001). Pur essendo una molecola strutturalmente diversa dal DUP-697, anche il composto NS-398 è attivo per via orale ed inibisce selettivamente e in modo irreversibile e tempo-dipendente l'enzima COX-2 in vitro, con una potenza che è circa 10 volte minore rispetto a quella del DUP-697 (Copeland *et al.*, 1994; Gierse *et al.*, 1995). NS-398 è una sulfoanilide con attività antiinfiammatoria, analgesica e antipiretica, che sembra sprovvista di effetti indesiderati a livello del tratto gastrointestinale (Masferring *et al.*, 1994).

TRASMISSIONE NORADRENERGICA

Il neurone noradrenergico rappresenta un importante obiettivo nello studio dell'azione dei farmaci, sia perché oggetto di ricerche relative al suo ruolo funzionale, sia in quanto costituisce il sito d'azione di molti farmaci utili in terapia.

Classificazione dei neuroni noradrenergici

La principale classificazione farmacologica prevede la distinzione nei principali sottotipi recettoriali α e β , originariamente basata sulla potenza dei vari agonisti e successivamente sulla selettività degli antagonisti.

Esistono due principali sottotipi del recettore α : α_1 e α_2 e tre sottotipi di recettori β : β_1 , β_2 , β_3 .

Studi di clonazione hanno dimostrato che tali recettori sono caratterizzati da una struttura simile e appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati alla proteina G.

Ognuna di queste classi farmacologiche sembra essere associata ad un particolare sistema di secondi messaggeri. Più precisamente, i recettori

α_1 sono accoppiati alla fosfolipasi C e producono i loro effetti principalmente grazie al rilascio del calcio intracellulare; i recettori α_2 sono accoppiati negativamente all'adenilato ciclasi e riducono pertanto la formazione di cAMP; tutti e tre i tipi di recettore β agiscono stimolando l'adenilato ciclasi con conseguente aumento di AMPc intracellulare.

Sintesi della noradrenalina

Il precursore della noradrenalina è la *L-tirosina*, un aminoacido presente nei fluidi corporei che viene captato dai neuroni noradrenergici per mezzo di un sistema di trasporto sodio-dipendente.

La *tirosina idrossilasi*, l'enzima che catalizza la conversione della tirosina a *diidrossifenilalanina* (DOPA), è localizzata soltanto nei neuroni catecolaminici, probabilmente libera nel citosol. E' un enzima piuttosto selettivo, diversamente da altri enzimi implicati nel metabolismo delle catecolamine.

Questo primo passaggio di idrossilazione rappresenta la tappa limitante della sintesi di noradrenalina; la tirosina idrossilasi viene inibita dal prodotto finale della via biosintetica e cioè dalla

noradrenalina: questo costituisce il meccanismo di regolazione a feedback negativo della velocità della sintesi.

L' α metiltirosina, un analogo della tirosina, inibisce la tirosina idrossilasi e può essere usata sperimentalmente allo scopo di bloccare la sintesi della noradrenalina.

La tappa successiva, la conversione della DOPA in *dopamina*, viene catalizzata dalla *DOPA decarbossilasi*, un enzima citosolico la cui presenza non è confinata ai soli neuroni catecolaminergici. E' un enzima relativamente aspecifico e catalizza la decarbossilazione, oltre che della L-DOPA, di altri vari aminoacidi aromatici, quali la L-istidina e L-triptofano, precursori della sintesi dell'istamina e della serotonina, rispettivamente. La dopamina viene quindi trasportata attivamente all'interno delle vescicole sinaptiche.

La *dopamina- β -idrossilasi* converte nelle vescicole la dopamina in noradrenalina.

La liberazione del trasmettitore si verifica quando il potenziale d'azione apre i canali del calcio sensibili alle variazioni di voltaggio e fa aumentare il calcio intracellulare.

La fusione delle vescicole con la membrana superficiale ha come risultato l'estrusione di noradrenalina e dei cotrasmettitori.

Tale liberazione può essere bloccata da farmaci quali la guanetidina ed il bretilio.

Dopo la liberazione, la noradrenalina diffonde fuori dallo spazio sinaptico ed agisce sui recettori posti sulla cellula effettrice; l'effetto termina quando il neurotrasmettitore viene captato dal trasportatore posto sulla terminazione nervosa (UPTAKE-1) o sulla cellula post-sinaptica (UPTAKE-2). L'uptake-1 viene bloccato dalla cocaina e dagli antidepressivi triciclici.

Degradazione metabolica delle catecolamine

Le catecolamine endogene ed esogene vengono metabolizzate essenzialmente da due enzimi: la *monoaminossidasi* (MAO) e la *catecol-O-metiltransferasi* (COMT).

La MAO si trova all'interno delle cellule, legata alla superficie delle membrane mitocondriali. E' abbondante nelle terminazioni nervose noradrenergiche ma è presente anche in molti altri siti, quali il fegato e l'epitelio gastrointestinale.

La MAO trasforma le catecolamine nelle corrispondenti aldeidi, che a livello periferico vengono rapidamente metabolizzate dall'*aldeide deidrogenasi*, formando i corrispondenti acidi carbossilici.

Nel caso della noradrenalina, questa reazione determina la formazione dell'acido diidrossimandelico (DOMA).

La MAO può anche ossidare altre monoamine, tra cui la dopamina e la serotonina. L'enzima è inibito da vari farmaci, utilizzati essenzialmente per il loro effetto sul SNC, dove queste tre amine funzionano quali neurotrasmettitori.

La seconda via responsabile della degradazione enzimatica delle catecolamine implica la metilazione di uno dei due ossidrilici del gruppo catecolico per dare origine a un derivato metossilato.

La COMT è un enzima che si trova sia nei neuroni, sia a livello extraneuronale. È il principale responsabile della degradazione delle catecolamine circolanti.

Agisce su molti substrati diversi ma tutti contenenti un gruppo catecolico, tra cui le catecolamine stesse ed i loro prodotti deaminati.

La O-metilazione della noradrenalina porta alla formazione del metabolita *normetanefrina*; il principale metabolita finale sia della noradrenalina, sia dell'adrenalina è l'*acido 3-metossi-4-idrossimandelico (VMA)*.

A livello periferico, la fine della trasmissione noradrenergica non è determinata in maniera sostanziale né dalla MAO né dalla COMT, in quanto la maggior parte della noradrenalina liberata viene rapidamente

captata adopera dall'uptake-1. Le catecolamine circolanti vengono solitamente inattivate dall'azione combinata di uptake-1, uptake-2 e COMT.

L'importanza relativa di questi processi varia in funzione del tipo di catecolamina.

La noradrenalina circolante viene infatti rimossa essenzialmente dall'uptake-1, mentre la rimozione dell'adrenalina è imputabile soprattutto all'uptake-2.

FARMACI α_2 -AGONISTI

Gli agonisti selettivi α_2 -adrenergici in Medicina Umana sono utilizzati principalmente nel trattamento dell'ipertensione sistemica.

La loro efficacia come antiipertensivi è notevole, anche se molti vasi sanguigni possiedono recettori α_2 -adrenergici postsinaptici che mediano vasocostrizione; la clonidina infatti, prototipo di farmaco α_2 -agonista, fu inizialmente sviluppata come decongestionante nasale vasocostrittore.

La sua capacità di diminuire la pressione arteriosa deriva dall'attivazione dei recettori α_2 nei centri di controllo cardiovascolare del sistema nervoso centrale; l'attivazione di tali recettori sopprime gli impulsi efferenti del sistema nervoso simpatico dal cervello.

Inoltre, gli α_2 -agonisti stimolano gli autorecettori presinaptici inibitori che diminuiscono il rilascio di ossido nitrico (NO).

In Medicina Veterinaria, gli α_2 -agonisti sono ampiamente utilizzati nel cane, nel gatto e nel cavallo, nonostante il loro uso sia comunque riconosciuto anche in altre specie animali, per i loro effetti sedativi, analgesici e di risparmio degli anestetici.

Poiché tali farmaci favoriscono il rilascio della muscolatura liscia addominale, sono impiegati nella clinica equina in caso di coliche addominali, nel trattamento di pneumatosi intestinali, dislocazioni e torsioni del cieco e del colon (Sasaki *et al.*, 2003).

Le molecole più comunemente impiegate sono la xilazina, la medetomidina, la romifidina e la detomidina.

Differiscono fra loro per quanto riguarda la selettività per i recettori α_2 (medetomidina >>> romifidina > xilazina), la farmacocinetica e la struttura chimica.

A differenza della xilazina infatti, la medetomidina e la romifidina sono delle imidazoline.

Sottotipi recettoriali α_2

Nei primi anni '80 si intuì che il tipo recettoriale α_2 potesse essere caratterizzato da una grande eterogeneità e da quel momento sono stati condotti numerosi studi che hanno confermato tale ipotesi (Timmermans & Van Zwieten, 1982; Bylund, 1985, 1988 e 1989).

I recettori α_2 possono essere classificati in più sottotipi a seconda dell'affinità per i diversi agonisti ed antagonisti, studiati mediante test di binding molecolare.

Oggi si conoscono 4 sottotipi recettoriali:

- α_{2A}

- α_{2B}

- α_{2C}

- α_{2D}

Il sottotipo α_{2A} è stato identificato prevalentemente nelle piastrine dell'uomo mentre il sottotipo α_{2B} è stato riconosciuto nella corteccia cerebrale, nel polmone e nel rene di ratto.

Il sottotipo α_{2C} è stato identificato nel rene di opossum, mentre il quarto sottotipo è stato isolato nelle ghiandole sottomandibolari del ratto e, in un secondo momento, nella ghiandola pineale di bovino; tuttavia, alcuni autori affermano che si tratti di un recettore omologo all' α_{2A} , ipotizzando quindi che i due sottotipi siano in realtà varianti di uno stesso recettore presente in specie diverse (Harrison *et al.*, 1991).

E' importante sottolineare come la distribuzione dei diversi sottotipi recettoriali α_2 possa variare a seconda della specie animale considerata.

In generale, i recettori α_2 localizzati a livello dei vasi sanguigni, mediano risposte pressorie bifasiche: la prima, ipertensiva, sarebbe mediata dagli α_{2B} mentre la seconda, di maggior durata e di carattere ipotensivo, dagli α_{2A} (Civantos Calzada & De Artinano, 2001).

Tutti questi sottotipi recettoriali mediano l'azione analgesica imputabile ai farmaci α_2 -agonisti, mentre la sedazione, in particolare, è il risultato di una stimolazione degli α_{2A} , espressi in modo specifico nei neuroni del *locus coeruleus* (Wang *et al.*, 1996).

Ci sono evidenze secondo le quali il sottotipo α_{2C} sarebbe implicato nella modulazione di meccanismi complessi come il comportamento e la memoria; la stimolazione degli α_{2A} invece sembra possa promuovere le funzioni cognitive, aumentando il flusso ematico regionale a livello della corteccia (Avery *et al.*, 2000).

Effetti α_2 su organi e sistemi

Sistema nervoso centrale

Nell'encefalo, gli α_2 -agonisti inibiscono il rilascio di noradrenalina. Il *locus coeruleus* è particolarmente ricco di recettori α_2 ed è coinvolto nella regolazione del sonno e della veglia. Si ritiene che l'effetto sedativo/ipnotico degli α_2 -agonisti sia mediato a questo livello.

Questi agenti inoltre dimostrano un effetto ansiolitico, sebbene, a dosi elevate, la xilazina possa indurre irrequietezza, attraverso un effetto sui recettori α_1 .

Gli α_2 -agonisti riducono il fabbisogno di farmaci anestetici, anche fino all'80% nel cane ed al 100% nel ratto. Nel gatto, è riferita una diminuzione del 27% della concentrazione alveolare minima dell'alotano dopo la somministrazione per via orale di 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di medetomidina.

Si ritiene che l'effetto di risparmio di anestetici sia mediato dalla riduzione del rilascio di noradrenalina, principalmente da parte del *locus coeruleus* (Pypendop, 2004).

Gli α_2 -agonisti hanno effetto analgesico.

Questo effetto è mediato dai recettori posti nelle corna dorsali del midollo spinale e nel tronco encefalico. Inoltre, possono potenziare l'analgesia indotta dagli oppiacei e dalla ketamina.

Quando vengono somministrati per via subaracnidea, gli α_2 -agonisti associati a midazolam, neostigmina, lidocaina o antagonisti dei recettori NMDA (N-metil-D-aspartato) del glutammato producono una antinocicezione sinergica.

La xilazina può avere degli effetti analgesici aggiuntivi, dovuti alla sua interazione con i recettori α_2 . Tuttavia, clinicamente, l'analgesia

mediata dalla medetomidina è più profonda e duratura rispetto a quella indotta dalla xilazina.

Gli α_2 -agonisti inducono ipotermia per inibizione dei meccanismi noradrenergici centrali responsabili del controllo della temperatura corporea e per diminuzione dell'attività muscolare.

Essi inoltre inducono il vomito nell'8-20% dei cani e fino al 90-100% dei gatti (nei quali la xilazina può essere utilizzata proprio come emetico).

Sistema cardiovascolare

Gli α_2 -agonisti, quando vengono somministrati per via endovenosa, inducono una risposta cardiovascolare bifasica. Inizialmente, la pressione sanguigna aumenta a causa di un incremento della resistenza vascolare sistemica. Successivamente diminuisce, per effetto di un calo della frequenza e della gittata cardiaca. La resistenza vascolare sistemica rimane elevata o ritorna progressivamente alla normalità, a seconda del farmaco e della dose impiegati. Quindi, la pressione sanguigna viene mantenuta entro limiti normali o più frequentemente portata al di sotto della norma.

Possono essere presenti delle bradiaritmie ed infine si può aggiungere che gli effetti cardiovascolari di tali farmaci sembrano essere dose-dipendenti, benché possa esistere un effetto “soffitto” (*ceiling*).

L'aumento della resistenza vascolare sistemica è dovuta alla vasocostrizione in risposta alla stimolazione dei recettori α_2 sulla muscolatura liscia dei vasi. Il calo della gittata cardiaca è correlato all'effetto bradicardico, dovuto ad un primo momento ad un riflesso dei barocettori e poi alla simpaticolisi centrale.

Sistema endocrino

Gli α_2 -agonisti inibiscono l'efflusso simpatico e modulano la risposta da stress all'anestesia ed alla chirurgia.

Provocano inoltre un'inibizione diretta del rilascio di insulina tramite stimolazione dei recettori α_2 nelle cellule β delle isole di Langherans del pancreas e, a seconda della dose somministrata, possono causare iperglicemia. Essi inoltre incrementano il rilascio dell'ormone della crescita, che può contribuire all'effetto iperglicemico.

Infine, inibiscono la secrezione di ACTH ed il cortisolo.

Sistema urinario

Gli α_2 -agonisti promuovono la diuresi e la natriuresi.

Inibiscono il rilascio di ADH dall'ipofisi, nonché la sua azione sui tubuli renali; inibiscono il rilascio di renina ed aumentano la secrezione di peptide natriuretico atriale.

Possono inoltre aumentare la velocità di filtrazione glomerulare.

Sistema gastroenterico

Gli α_2 -agonisti inducono una diminuzione della salivazione, il rilasciamento dello sfintere gastroesofageo, un rallentamento della motilità dell'esofago, dello stomaco e del piccolo intestino.

Utero

Gli α_2 -agonisti aumentano l'intensità delle contrazioni uterine. Le perfusioni dell'organo e l'apporto di ossigeno vengono diminuiti, così come i valori di PO_2 e pH arterioso nella madre e nel feto.

Essi attraversano la placenta, ma i farmaci con un'elevata liposolubilità possono rimanervi parzialmente intrappolati, riducendo la quantità di principio attivo che arriva nella circolazione fetale.

Occhio

In Medicina Umana gli α_2 -agonisti selettivi sono usati nella terapia del glaucoma; recettori α_2 sono infatti presenti nel muscolo dilatatore pupillare dell'iride e la loro attivazione causa midriasi. Tale attivazione ha importanti effetti anche sulla pressione endoculare, favorendo l'efflusso di umor acqueo dall'occhio.

IMPIEGO CLINICO DEGLI α_2 -AGONISTI ED EFFETTI FARMACOLOGICI

Clonidina

La clonidina, una imidazolina, fu sintetizzata per la prima volta all'inizio degli anni '60 e si dimostrò in grado di produrre vasocostrizione indotta dai recettori α_2 -adrenergici.

Nel corso della sperimentazione clinica del farmaco come decongestionante nasale topico, si notò che essa era in grado di provocare ipotensione, sedazione e bradicardia.

Tra i principali effetti farmacologici della clonidina (come prototipo dei farmaci α_2 -agonisti) si ricordano variazioni della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca.

L'infusione endovenosa di clonidina provoca un iniziale innalzamento della pressione arteriosa a causa dell'attivazione dei recettori α_2 -adrenergici post-sinaptici della muscolatura liscia dei vasi (Kobinger, 1978). L'affinità della clonidina per questi recettori è elevata, sebbene il farmaco sia un agonista parziale con un'efficacia relativamente bassa su questi siti.

La risposta ipertensiva che segue la somministrazione di clonidina per via parenterale non è in genere presente quando il farmaco è somministrato per via orale.

Comunque, anche dopo somministrazione per via endovenosa, la vasocostrizione transitoria che si osserva è seguita da una più prolungata risposta ipotensiva che deriva da una diminuzione del flusso degli impulsi centrali nel sistema nervoso simpatico.

Dati ottenuti utilizzando [³H] clonidina come ligando, suggeriscono l'esistenza, nel cervello e a livello periferico, di siti di legame noradrenergici con preferenze per strutture imidazoliniche potenzialmente in grado di mediare effetti ipotensivi della clonidina; questi siti comunque non legano le catecolamine e di conseguenza non sono in grado di mediare gli effetti ipotensivi indotti, a livello centrale, dalla noradrenalina.

Numerose evidenze indicano che i siti di legame imidazolinici possono rappresentare una nuova famiglia di recettori a cui si possono legare la clonidina e altre imidazoline (Hamilton, 1992; Tibirica *et al.*, 1991); questi potenziali siti recettoriali potrebbero rappresentare obiettivi per lo sviluppo di nuovi farmaci.

La clonidina induce una diminuzione delle scariche nelle fibre pregangliari del nervo splanchnico e nelle fibre postgangliari dei nervi cardiaci (Langer *et al.*, 1980).

Essa è anche in grado di stimolare l'attività parasimpatica efferente e quindi di partecipare al rallentamento della frequenza, come conseguenza dell'aumento del tono vagale e del minore tono del simpatico. Inoltre, una parte degli effetti antiipertensivi della clonidina è mediata dall'attivazione dei recettori α_2 -adrenergici presinaptici che sopprimono il rilascio di noradrenalina dalle terminazioni nervose periferiche.

La clonidina diminuisce la concentrazione plasmatica di noradrenalina e ne riduce l'escrezione nelle urine.

Essa può quindi far diminuire le concentrazioni di renina e di aldosterone nel plasma di alcuni pazienti affetti da ipertensione (Lowenthal *et al.*, 1988).

Assorbimento, metabolismo ed escrezione

La clonidina risulta ben assorbita dopo somministrazione orale e la sua biodisponibilità è quasi del 100%.

Il picco di concentrazione plasmatica e l'effetto ipotensivo massimale vengono osservati dopo 1-3 ore dall'assunzione di una dose orale.

L'emivita di eliminazione del farmaco varia dalle 6 alle 24 ore, con una media di 12 ore (Lowenthal *et al.*, 1988). Circa la metà della dose somministrata si ritrova nelle urine nella forma non metabolizzata.

Effetti indesiderati

I principali effetti indesiderati provocati dall'utilizzo della clonidina sono secchezza delle fauci e sedazione (effetto invece ricercato nella pratica clinica veterinaria).

Una risposta di questo tipo si verifica in almeno il 50% dei soggetti e può portare all'interruzione della somministrazione del farmaco; tuttavia, questi effetti possono diminuire di intensità dopo alcune settimane di trattamento. In alcuni pazienti si possono verificare anche disfunzioni a livello sessuale o una marcata tachicardia. Questi ed altri effetti indesiderati sono in genere legati alle dosi di clonidina somministrate e la loro incidenza è attenuata qualora si ricorra alla somministrazione transdermica.

Si ricordi, tuttavia, che circa il 15-20% dei pazienti che utilizzano la preparazione transdermica, sviluppano dermatite da contatto.

L'interruzione immediata della somministrazione di clonidina in una terapia protrattasi per lungo tempo può causare reazioni da sospensione (Parker & Atkinson, 1982).

Usi terapeutici

Come precedentemente ricordato, il principale uso terapeutico della clonidina consiste nel trattamento dell'ipertensione.

Questa sostanza sembra avere efficacia anche nel trattamento di altri disturbi. La stimolazione dei recettori α_2 -adrenergici a livello del tratto intestinale può aumentare l'assorbimento di cloruro di sodio e di fluidi ed inibire parallelamente la secrezione di bicarbonato (Chang *et al.*, 1986). Ciò potrebbe spiegare il fatto che, spesso, in pazienti diabetici che presentano neuropatie a livello del sistema nervoso autonomo, si osserva un miglioramento della diarrea (Fedorak *et al.*, 1985).

La clonidina risulta utile anche nel trattamento e nella preparazione dei pazienti tossicodipendenti all'interruzione dell'utilizzo di oppiacei (Gold *et al.*, 1978), alcol (Bond, 1986) e tabacco (Glassman *et al.*, 1988); essa infatti può aiutare a migliorare alcuni degli effetti indesiderati a livello del sistema nervoso simpatico associati alla

sospensione dell'utilizzo di queste sostanze, ed è in grado di diminuire la richiesta delle stesse.

L'applicazione topica di clonidina è usata nella terapia del glaucoma, potendo essa abbassare, nell'uso cronico, la pressione endoculare e favorendo in questo modo il deflusso dell'umor acqueo.

Sono in fase di studio i benefici a lungo termine che la clonidina potrebbe apportare nelle malattie neuropsichiatriche.

E' invece riconosciuta la sua utilità in pazienti sottoposti ad anestesia, in quanto essa è in grado di diminuire la quantità di anestetico richiesto e di aumentare la stabilità emodinamica.

Ulteriori benefici della clonidina e farmaci simili nell'anestesia includono la sedazione preoperatoria, la riduzione delle secrezioni e l'analgesia.

La somministrazione di clonidina è stata utilizzata nella diagnosi differenziale di pazienti con ipertensione e feocromocitoma; in pazienti con ipertensione primaria, dopo la somministrazione di una singola dose del farmaco, si osserva una marcata riduzione della concentrazione plasmatica di noradrenalina, questo genere di risposta non avviene in molti pazienti affetti da feocromocitoma (Bravo *et al.*, 1981).

Xilazina

E' un potente α_2 -agonista strutturalmente correlato alla clonidina.

A livello del sistema nervoso centrale riduce il rilascio neuronale di dopamina e noradrenalina; inibisce inoltre la trasmissione intraneuronale degli impulsi a livello centrale producendo mio rilassamento scheletrico.

Essa agisce anche come analgesico.

A causa di un effetto diretto sul centro del vomito, nel gatto l'emesi compare frequentemente (90%); nel cane invece solo occasionalmente (30%).

Gli effetti della xilazina sul sistema cardiovascolare sono variabili, legati alla presenza contemporanea delle azioni α_1 ed α_2 adrenergiche.

L'azione centrale α_2 è quella che prevale nel determinare l'ipotensione arteriosa, che è anche il risultato dell'effetto cardiodepressore della xilazina, associato ad una diminuzione della gittata cardiaca.

Nel gatto la xilazina provoca una depressione dose-dipendente della termoregolazione; nel cane e nel gatto induce inoltre iperglicemia conseguente all'inibizione della secrezione di insulina e ad un aumento del rapporto glucagone/insulina.

Nel gatto, invece, la xilazina provoca bradicardia e talvolta blocco atrio-ventricolare di II grado (che può essere contrastato dall'atropina).

Farmacocinetica

La xilazina viene rapidamente assorbita dopo somministrazione IM in seguito alla quale, nel cane e nel gatto, gli effetti si manifestano dopo 10-15 minuti; per via IV compaiono invece dopo 3-5 minuti.

L'attività analgesica dura per 15-30 minuti, mentre la sedazione si protrae per 1-2 ore, per esaurirsi dopo 3-4 ore.

Controindicazioni, precauzioni, avvertenze

La xilazina è controindicata nei soggetti con aritmie ventricolari e deve essere impiegata con estrema cautela negli animali con preesistenti problemi cardiaci, ipotensione, shock, deficit respiratori, insufficienza renale/epatica grave e disordini convulsivi.

Nei cani di grossa taglia, la somministrazione IV o IM può provocare accidentalmente distensione addominale acuta dovuta ad aerofagia e/o correlata attività parasimpaticolitica della sostanza che esita nell'atonia intestinale con accumulo di gas. Questo aspetto rende la xilazina poco indicata durante le radiografie dell'apparato gastrointestinale anteriore, dal momento che può provocare l'accumulo di gas nello stomaco e rendere l'interpretazione del radiogramma poco attendibile.

In caso di sovradosaggio ed in presenza di effetti indesiderati va impiegata la yoimbina (antagonista specifico).

L'associazione della xilazina con altri tranquillanti e barbiturici deve sempre essere effettuata con cautela.

Interazioni farmacologiche

L'impiego di adrenalina in presenza di xilazina può favorire la comparsa di aritmie ventricolari.

L'associazione con acepromazina è generalmente considerata sicura, benché ci sia la possibilità di effetti ipotensivi additivi; è bene quindi

impiegare con cautela tale associazione in animali suscettibili di complicazioni emodinamiche.

Altri farmaci attivi sul sistema nervoso centrale (barbiturici, narcotici, fenotiazine, ecc) possono incrementare gli effetti depressori della xilazina.

Indicazioni e dosaggi

a) sedazione

CANE, GATTO:

0,5-1,1 mg/kg IV

0,5-2 mg/kg IM, SC

b) induzione del vomito nel gatto

0,5-1,0 mg/kg IM

c) trattamento delle crisi ipoglicemiche

CANE

1,1 mg/kg IM insieme a destrosio IV.

Parametri da monitorare

- Funzione respiratoria e cardiovascolare.
- Stato di idratazione e poliuria.

Specialità medicinali

Rompun® (Bayer); flac. Multi dose IM, IV 25 ml; xilazina: 20mg/ml

Detomidina

E' un α_2 -agonista sintetico che produce sedazione ed analgesia superficiale e viscerale dose-dipendente, sia nella profondità, sia nella durata.

La detomidina è impiegata prevalentemente nella clinica equina; in seguito alla sua amministrazione, si osserva un caratteristico e breve periodo di incoordinazione, seguito da sonnolenza, inclinazione della testa, ptosi del labbro inferiore, atassia, barcollamento, fino alla perdita della stazione quadrupedale.

Questa molecola è usata soprattutto come sedativo ed analgesico per facilitare procedure diagnostiche e chirurgiche minori sia in cavalli adulti, sia nei puledri.

Controindicazioni ed effetti indesiderati

L'uso della detomidina è sconsigliato nei cavalli con preesistente blocco atrio-ventricolare o seno-atriale, nei soggetti con grave insufficienza coronarica, disturbi respiratori ed insufficienza renale cronica.

E' possibile che in seguito a somministrazione di detomidina si presentino aritmie, ipertensione e bradicardia. E' inoltre possibile osservare piloerezione, salivazione e lievi tremori muscolari immediatamente dopo la somministrazione.

Altro effetto di frequente riscontro è il prolasso del pene (parziale e transitorio) unitamente a minzione, che si presenta dai 45 ai 60 minuti dopo il trattamento.

Dosaggi

0,2-0,4 ml/100 kg IV o IM, sulla base della profondità e della durata della sedazione e l'analgesia richieste; tali effetti si presentano dai 2 ai 5 minuti dopo la somministrazione endovenosa e durano per circa 30 minuti. Si ricordi che prima e dopo la somministrazione del farmaco, l'animale deve essere mantenuto in luogo tranquillo.

Specialità medicinale

Dormosedan® (Pfizer); detomidina: 10 mg/ml

Medetomidina

Per quanto riguarda gli effetti di questa sostanza si rimanda a quanto detto per la xilazina.

La medetomidina è un potente e selettivo α_2 -agonista ($\alpha_2/\alpha_1 = 1620$, rispetto a 160 della xilazina). Questa caratteristica spiega perché la medetomidina risulti efficace a dosi più basse rispetto a quelle impiegate per la xilazina.

La medetomidina non deve essere somministrata con farmaci simpatico mimetici o depressori del sistema nervoso centrale e con l'associazione sulfamidico-trimethoprim.

Come tutte le altre molecole α_2 -impiegate in Medicina Veterinaria, essa viene usata nella clinica del cane e del gatto come agente analgesico-sedativo e come preanestetico.

In caso di sovradosaggio o dell'accentuarsi degli effetti indesiderati, deve essere impiegato l'atipamezolo, antagonista selettivo.

INDICAZIONI E DOSAGGI

a) **sedazione**

CANE

10-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IM, IV, SC

GATTO

100-150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IM, IV, SC

b) **sedazione ed analgesia da moderata a profonda**

CANE

40-80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IM, IV, SC

GATTO

100-150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IM, IV, SC

c) **preanestesia**

CANE

10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IM, IV, SC

d) induzione dell'anestesia generale (interventi di routine o di breve durata) in associazione a ketamina

CANE

Medetomidina 30-40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ketamina 2,0-5,0 mg/kg IM

GATTO

Medetomidina 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + ketamina 5,0 mg/kg IM, nella stessa siringa

Specialità medicinale

Domitor® (Pfizer); medetomidina: 1,0mg/ml

FARMACI α_2 -ANTAGONISTI

I farmaci α_2 -antagonisti sono impiegati in tutte quelle situazioni in cui si vogliono rendere reversibili gli effetti degli α_2 -agonisti.

In medicina veterinaria i più usati sono la yoimbina e l'atipamezolo.

Le caratteristiche farmacologiche di questi agenti variano a seconda della struttura chimica, della selettività nei confronti degli α_2 -adrenocettori e della loro affinità nei confronti imidazolinici.

E' già stato descritto come i recettori α_2 -adrenergici ricoprono un ruolo importante nella regolazione delle funzioni del sistema nervoso simpatico, sia a livello periferico sia centrale.

Come precedentemente osservato, l'attivazione dei recettori α_2 -adrenergici a livello presinaptico inibisce il rilascio della noradrenalina dalle terminazioni nervose periferiche.

L'attivazione dei recettori α_2 -adrenergici nella regione pontomidollare del sistema nervoso centrale inibisce l'attivazione del sistema nervoso simpatico e conduce a caduta della pressione sanguigna.

Il blocco degli α_2 -recettori mediante antagonisti selettivi può così provocare un aumento dell'attività simpatica e potenziare il rilascio di noradrenalina da parte delle terminazioni nervose, comportando

attivazione dei recettori α_1 dei vasi periferici e β_1 cardiaci con il conseguente aumento della pressione.

Sebbene alcuni letti vascolari contengano recettori α_2 -adrenergici che promuovono la contrazione della muscolatura liscia, si pensa che questi recettori vengano stimolati in modo preferenziale dalle catecolamine circolanti, mentre i recettori α_1 risultano stimolati dalla noradrenalina rilasciata dalle terminazioni nervose simpatiche (Davey, 1987; van Zwieten, 1988).

In altri letti vascolari, i recettori α_2 -adrenergici promuovono la vasodilatazione, stimolando il rilascio di ossido nitrico (Moncada *et al.*, 1991).

Gli effetti degli antagonisti α_2 -adrenergici sul sistema cardiovascolare sono dominati dalle azioni sul sistema nervoso centrale e sulle terminazioni nervose simpatiche.

Inoltre, l'attivazione dei recettori α_2 -adrenergici nelle isole pancreatiche sopprime la secrezione di insulina e quindi il blocco di questi recettori ne può facilitare il rilascio con possibile ipoglicemia.

Yohimbina

La yohimbina è un alcaloide indolalchilaminico che si estrae dalla pianta *Pausinystalia Yohimbe* e dalla radice *Rauwolfia*.

È un antagonista competitivo selettivo per i recettori α_2 -adrenergici; essa infatti è 60 volte più selettiva verso recettori α_2 rispetto a quelli α_1 (Adams, 1999).

Arriva rapidamente a livello del sistema nervoso centrale dove agisce aumentando la pressione ematica e la frequenza cardiaca. Aumenta anche l'attività motoria e può indurre tremore.

Agisce inoltre come antagonista della serotonina.

In passato è stata usata per il trattamento delle disfunzioni sessuali maschili; sebbene la sua efficacia non sia mai stata dimostrata, vi è attualmente un rinnovato interesse nell'utilizzo della yohimbina nel trattamento dell'impotenza.

Viene rapidamente assorbita per via orale ed altrettanto rapidamente eliminata; è sottoposta a metabolismo epatico che porta alla produzione di due metaboliti idrossilati (*11-idrossi-yohimbina* e *10-idrossi-yohimbina*), i quali vengono eliminati per via urinaria.

La sua azione centrale e periferica antagonizza con rapidità (1-3 minuti) gli effetti α_2 stimolanti della xilazina.

Controindicazioni/precauzioni/avvertenze

La somministrazione di yohimbina va effettuata con cautela nei cani epilettici; non è ancora stata stabilita la sicurezza d'impiego nelle cagne gravide.

La yohimbina annulla anche gli effetti analgesici della xilazina e, pertanto, essa ripristina un'eventuale sintomatologia algica, se quest'ultima era presente prima della somministrazione di xilazina.

Effetti indesiderati

Occasionalmente si può notare uno stato di irrequietezza e di eccitazione (con salivazione, tremori, tachipnea), comunque reversibili dopo la scomparsa degli effetti della xilazina.

Indicazioni e dosaggi

a) antagonismo degli effetti della xilazina

CANE

0,11 mg/kg IV, lentamente

GATTO

0,5 mg/kg IV, lentamente

Specialità medicinali

Nessuna specialità medicinale registrata in Italia.

Atipamezolo

L'atipamezolo è uno dei più potenti e selettivi α_2 -antagonisti conosciuti. E' ugualmente efficace sia sui recettori centrali che periferici e annulla con rapidità gli effetti della stimolazione α_2 (neurologici, comportamentali, cardiovascolari, respiratori).

Il rapporto di selettività α_2 / α_1 è 300 volte più elevato rispetto alla yoimbina.

L'atipamezolo viene rapidamente assorbito dopo somministrazione IM; la massima concentrazione si ha nel sistema nervoso centrale entro 10-25 minuti.

L'escrezione avviene sotto forma di metaboliti attraverso le feci e le urine.

Controindicazioni/precauzioni/avvertenze

E' controindicato in gravidanza, non essendo stata definita la sicurezza d'impiego in tale condizione.

L'atipamezolo va somministrato con cautela nei soggetti cardiopatici e/o debilitati.

Effetti indesiderati

Se pur raramente, l'atipamezolo può indurre emesi e difficoltà respiratorie.

Indicazioni e dosaggi

a) antagonismo selettivo degli effetti centrali e periferici della medetomidina

Il dosaggio dell'atipamezolo in $\mu\text{g}/\text{kg}$ per via IM è in funzione di quello impiegato per la medetomidina. Come regola generale, è per il cane da 4 a 6 volte più elevato della dose di medetomidina, mentre per il gatto da 2 a 4 volte.

L'atipamezolo può essere somministrato 15-60 minuti dopo la somministrazione della medetomidina; la completa normalizzazione del soggetto avviene di norma entro 5-10 minuti.

CANE

A- medetomidina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 20 40 80

B- atipamezolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 120 200 320

GATTO

medetomidina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 50 100 150

atipamezolo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 200 250 300

dosi crescenti di medetomidina

dosi di atipamezolo per antagonizzare le dosi di agonista sovrastanti

Specialità medicinali

Antisedan® (Pfizer)

Flacone multidose IM, 10 ml; atipamezolo: 5mg/ml.

SCOPO DELLA RICERCA

Scopo del presente lavoro è stato quello di testare farmaci antinfiammatori non steroidei (inibitori non selettivi della COX, inibitori selettivi della COX-1 ed inibitori selettivi della COX-2) ed alcuni α_2 -adrenergici su segmenti di intestino di cavallo per indagarne l'effetto sulla motilità intestinale *in vitro*, attraverso la metodica dell'organo isolato. L'effetto dei FANS è stato valutato, sia per quanto riguarda la motilità spontanea sia per quel che riguarda la motilità indotta dalla stimolazione elettrica, su segmenti di muscolatura circolare di ileo di cavallo. Essendo riportato in letteratura che la COX-1 è espressa costitutivamente e la COX-2 è indotta da uno stato infiammatorio, al fine di giustificare la risposta del tessuto alle somministrazioni dei FANS abbiamo deciso di condurre in parallelo un'analisi istologica ed una biomolecolare (RT-PCR). Con la prima metodica abbiamo voluto verificare la presenza o meno di uno stato infiammatorio nei campioni prelevati; con la seconda, attraverso un campionamento più mirato, si è voluto indagare la reale espressione delle COX-1 e soprattutto delle COX-2 nell'intestino tenue del cavallo. Un ulteriore passo è stato poi quello di inibire l'eventuale

effetto di questi enzimi bloccando il sito recettoriale dei loro principali metaboliti, utilizzando antagonisti delle prostaglandine sull'organo isolato *in vitro*.

La necessità dello studio degli effetti dei farmaci α_2 -adrenergici sulla motilità intestinale di cavallo nasce dal largo impiego che essi hanno nel caso di coliche addominali, nel trattamento di pneumatosi intestinali e nelle torsioni del cieco e del colon, favorendo tali farmaci il rilascio della muscolatura liscia addominale.

E' molto importante capire gli effetti degli analgesici sulla motilità intestinale, non soltanto per conoscerne gli effetti terapeutici, ma anche per valutare gli eventuali effetti indesiderati, considerando ad esempio che le coliche sono associate sia a ipomotilità che a ipermotilità e che quindi un uso non consapevole potrebbe aggravare il quadro clinico del soggetto.

L'effetto degli α_2 -adrenergici è stato valutato soltanto attraverso la metodica dell'organo isolato, sia per quanto riguarda la motilità spontanea sia per quel che riguarda la motilità indotta dalla stimolazione elettrica, su segmenti di muscolatura circolare di digiuno di cavallo, non potendo in questa fase sperimentale considerare l'ileo un preparato adeguato per lo studio della motilità intestinale.

Attraverso questo studio si è cercato di compiere un ulteriore passo nel campo ancora relativamente inesplorato della motilità intestinale del cavallo, non solo per capire quali siano i principali meccanismi fisiologici che la regolano, ma anche per aprire nuove frontiere verso lo studio di molecole da utilizzare nella pratica terapeutica equina, dove sia necessario un intervento farmacologico per regolarizzare anomalie motorie del tratto digerente.

MATERIALI E METODI

ORGANO ISOLATO

Allestimento dei materiali

Segmenti di intestino tenue di cavallo sono stati prelevati al macello pubblico di Parma, allo scopo di valutarne la motilità intestinale *in vitro*. I campioni presi in esame erano costituiti da segmenti di muscolatura liscia intestinale, ottenuti dalla parte iniziale dell'ileo, circa 30 cm prossimalmente al cieco, o dal digiuno, subito dopo abbattimento ed eviscerazione.

Una volta isolato dal resto dell'intestino, un tratto di una ventina di centimetri che ci interessava veniva posto immediatamente in un thermos, precedentemente refrigerato a 4°C contenente una soluzione nutritizia (soluzione di Krebs) così composta: NaCl 113 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glucosio 11,5 mM.

Il trasferimento al laboratorio avveniva entro 15-30 minuti dal prelievo.

Una volta giunto al laboratorio il campione veniva posto in un becker contenente soluzione di Krebs e veniva ulteriormente lavato per

eliminare ogni tipo di residuo alimentare. Veniva posto quindi in piastre petri contenenti anch'esse soluzione di Krebs, dove si procedeva all'allestimento dei segmenti .

Da ciascun campione di digiuno o ileo sono state ottenute 6 strisce delle dimensioni di 3 millimetri di larghezza e circa 20 millimetri di lunghezza, prelevate o nel senso della muscolatura longitudinale o nel senso della muscolatura circolare. Lo strato mucoso veniva tolto accuratamente, prima di legare ciascuna estremità delle strisce con un filo di seta, per il successivo allestimento del preparato. Uno dei due estremi veniva usato per fissare le strisce all'interno dei bagni per organi isolati, come appare nelle figure 4-5. Tali bagni sono costituiti da celle a doppia parete della capacità di 10 millilitri ciascuno, termostatate alla temperatura di 37 °C e contenenti la stessa soluzione nutritizia di Krebs descritta in precedenza. Tale soluzione era ossigenata con una miscela di ossigeno (95%) e anidride carbonica (5%), ottenendo così un valore di pH di 7.4-7.5. Questo valore consente di ricreare con buona approssimazione le condizioni di pH fisiologico che si misurano nell'interstizio dei tessuti intestinali.



Figura 4 - Bagno per organo isolato contenente una striscia di intestino.

Il secondo estremo era invece collegato alla leva di un trasduttore isotonico, un dispositivo elettronico capace di misurare le modificazioni di lunghezza dei preparati (Fig. 6).



Figura 5 - Bagno per organo isolato.

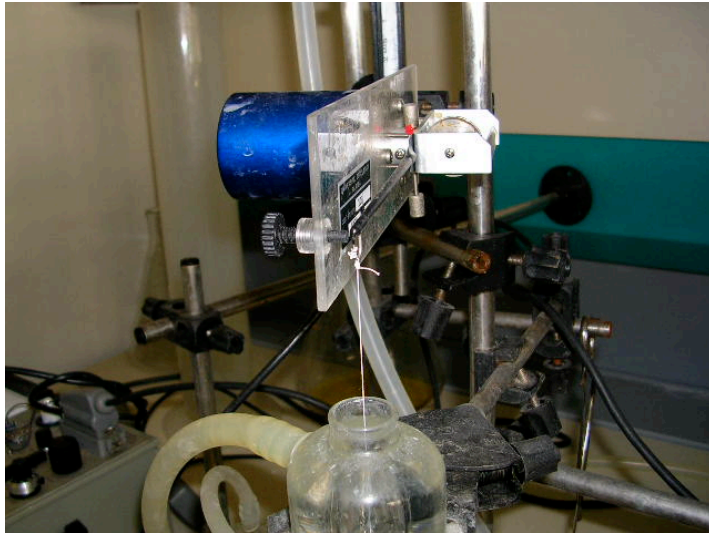


Figura 6 - Trasduttore di tensione.

Il trasduttore a sua volta veniva collegato ad un registratore, capace di convertire il segnale elettrico in un segnale grafico (meccanogramma). Tali registratori utilizzano un sistema a penna scrivente su carta scorrevole (Basile, Comerio, Italy) (Fig. 7).

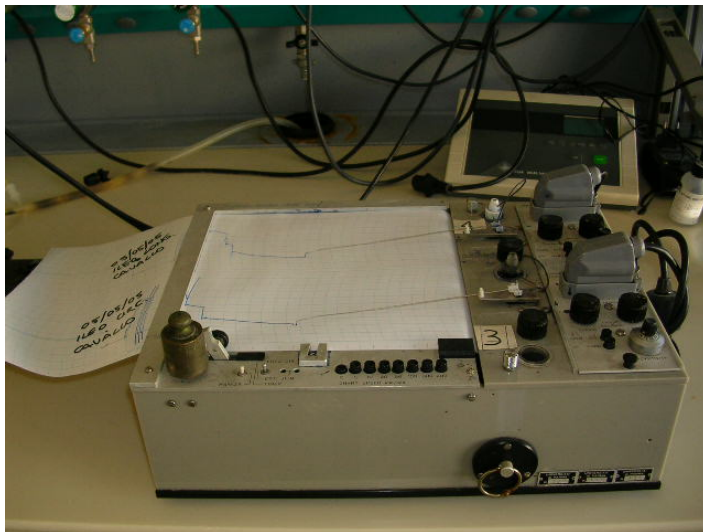


Figura 7 - Poligrafo a penna scrivente.

Ai preparati così allestiti, veniva applicato un carico costante di 2 grammi, attraverso un apposito contrappeso graduabile posto sulla leva del trasduttore. Quindi venivano lasciati stabilizzare in assenza di farmaci per almeno un'ora dall'allestimento. Ogni 10 minuti la soluzione all'interno della cella veniva sostituita con un equivalente volume di soluzione fresca.

Alcuni preparati venivano conservati in frigorifero a 4 °C per 24 ore e allestiti il giorno successivo. Esperimenti pilota avevano infatti dimostrato che non erano evidenziabili sostanziali differenze tra questi preparati e quelli allestiti di fresco, sia per quanto concerne la motilità spontanea, sia per quanto riguarda la risposta ai farmaci.

Stimolazione elettrica

I preparati di muscolatura longitudinale e circolare sono stati sottoposti ad una stimolazione elettrica di campo, effettuata tramite elettrodi disposti nel bagno in maniera coassiale rispetto al preparato, ad una distanza tra loro di circa 1 cm e collegati ad uno stimolatore elettronico, capace di liberare impulsi ad onda quadra, di ampiezza e durata aggiustabili secondo le esigenze.

Esperimenti preliminari sono stati condotti per trovare le condizioni ideali di stimolazione, aggiustando i parametri di frequenza e di intensità dell'impulso in modo da ottenere una risposta contrattile stabile nel tempo e riproducibile. La maggior parte degli esperimenti sono stati poi condotti con frequenza a 10 Hz e ampiezza a 300 mA.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

In una prima serie di esperimenti si è valutato l'effetto di alcuni FANS sia sulla motilità spontanea sia sulla motilità indotta da stimolazione elettrica. Nella seconda parte del protocollo sperimentale sono stati utilizzati alcuni principi attivi al fine di chiarire il meccanismo d'azione degli inibitori delle COX.

Per quanto riguarda invece i farmaci α_2 -adrenergici, abbiamo in un primo momento valutato l'effetto di alcuni α_2 -agonisti ed antagonisti sui due tipi di motilità, mentre successivamente abbiamo valutato l'attività di alcuni antagonisti dei recettori α_2 sugli effetti mediati dagli agonisti sulla motilità intestinale indotta dalla stimolazione elettrica.

SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI

L'effetto della somministrazione dei farmaci è stato valutato come variazione sia della motilità spontanea sia di quella indotta dalla stimolazione elettrica, mantenendo costanti i parametri (1 minuto, 5 secondi, 0,5 millisecondi, 10 Herz, 300 mA). Ciascun preparato è stato impiegato per saggiare l'effetto di una sola sostanza e ciascun composto è stato lasciato agire per il tempo necessario al raggiungimento dell'effetto massimale.

FANS UTILIZZATI NELLO STUDIO:

Celecoxib (Sigma-Aldrich): inibitore specifico COX-2.

DUP 697 (Tocris): inibitore selettivo della COX-2.

Flunixin meglumina (Sigma-Aldrich): inibitore non specifico COX-1 e COX-2.

Indometacina (Sigma-Aldrich): inibitore non specifico COX-1 e COX-2.

NS 398 (Tocris): inibitore selettivo della COX-2.

SC-560 (Pfizer): inibitore specifico COX-1.

Tutti i FANS sono stati diluiti e somministrati secondo il metodo delle dosi cumulative (Van Rossum, 1963). I FANS, ad esclusione della flunixinina meglumina, sono stati sciolti in dimetilsolfossido (DMSO), un solvente igroscopico derivato dalla polpa del legno. La concentrazione finale di DMSO nel bagno non superava mai l'1%.

PRINCIPI ATTIVI UTILIZZATI NELLO STUDIO DEI FANS

AH6809 (Tocris): antagonista dei recettori delle PGD_2 e PGE_2 .

AL8810 (Tocris): antagonista potente e selettivo dei recettori delle $PGF_{2\alpha}$.

Nitroarginina metil-estere (L-Name) (Sigma-Aldrich): analogo della L-arginina che inibisce l'enzima sintetizzante l'ossido nitrico, la NO sintetasi (NOS).

Dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma): solvente.

L-Name è stato diluito in acqua distillata mentre gli antagonisti delle prostaglandine sono stati sciolti in DMSO secondo la modalità descritta per i FANS.

FARMACI E PRINCIPI ATTIVI UTILIZZATI NELLO STUDIO DEGLI EFFETTI DEI FARMACI α_2 -ADRENERGICI

Atropina solfato (Merck): antagonista competitivo non selettivo dei recettori muscarinici.

Tetrodotossina (Sigma-RBI): bloccante reversibile dei canali rapidi per il sodio.

Xilazina (Sigma-RBI): agonista dei recettori α_2 -adrenergici.

Medetomidina (Tocris): agonista altamente selettivo dei recettori α_2 -adrenergici.

Detomidina (Orion Pharma): agonista selettivo dei recettori α_2 -adrenergici.

Atipamezolo (Orion Pharma): antagonista selettivo dei recettori α_2 -adrenergici.

Yoimbina (Sigma-RBI): antagonista dei recettori α_2 -adrenergici.

Quando usati insieme agli α_2 -agonisti, i farmaci antagonisti dei recettori α_2 venivano lasciati agire per venti minuti prima della somministrazione degli agonisti.

Tutte le sostanze sono state disciolte in acqua distillata. Gli agonisti dei recettori α_2 -adrenergici sono stati somministrati secondo il metodo delle dosi cumulative (Van Rossun, 1963)

ISTOLOGIA

I campioni di intestino tenue utilizzati nell'indagine istologica, sono stati prelevati da cavalli maschi adulti di età compresa tra i tre ed i sette anni, ottenuti da animali sacrificati presso il macello pubblico di Parma. La maggior parte di essi erano provenienti da paesi dell'est, dove vivono e vengono allevati allo stato brado. Al momento della macellazione non presentavano alcuna patologia conclamata, soprattutto per quanto riguarda le patologie intestinali più diffuse del cavallo, per esempio ostruzioni, aderenze, invaginamenti, volvoli, incarceramenti di anse intestinali e timpanismo.

I campioni così ottenuti sono stati fissati in formalina tamponata al 7% per circa 48 ore. Successivamente sono stati sezionati a circa 0.5 cm di spessore e quindi disidratati con diluizioni seriali di alcool e xilene e successivamente impregnati in paraffina con la macchina processatrice Ventana Renaissance.

I campioni così trattati sono poi stati inclusi in cubetti di paraffina a caldo i quali, una volta solidificati, sono stati sezionati con microtomo Leica RM 2155 in sezioni di 5 micron di spessore e quindi posti su vetrini. Dopo 24h di incubazione in stufa a 56°C i vetrini sono stati reidratati e colorati con ematossillina ed eosina (colorazione

topografica che utilizza un colorante nucleare, ematossillina e un colorante acido citoplasmatico, l'eosina). Dopo successiva disidratazione, i vetrini sono stati ricoperti con vetrino coprioggetto e quindi osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i.

RT-PCR

La RT-PCR, *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, è una tecnica di biologia moleolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di un DNA a partire da un pool di RNA di un tipo cellulare. Variante della classica PCR, è composta da due tappe: la retrotrascrizione dell'RNA e l'amplificazione del cDNA (DNA complementare) ottenuto con la prima reazione.

CAMPIONAMENTO

Il campionamento per realizzare la RT-PCR è stato eseguito utilizzando le stesse procedure di prelievo descritte nell'allestimento dell'organo isolato.

Vista la rapidità con cui l'RNA si degrada e la presenza di enzimi RNAasi nei campioni biologici e nell'ambiente, tutti gli strumenti che

sono venuti a contatto con il materiale in esame, dai guanti alle soluzioni usate per l'estrazione dell'RNA, sono stati autoclavati e successivamente trattati con *RNAasi Zap* (Celbio, Milano).

Indossati un paio di guanti, con l'aiuto di ferri chirurgici sterili, il campione di intestino, dopo averlo sciacquato in soluzione di Krebs in modo tale da pulirlo il più possibile, è stato posto su un foglio di alluminio, appoggiato al di sopra di un letto di ghiaccio. Utilizzando un paio di forbici sono stati tagliati alcuni pezzettini di intestino di circa 100 mg che sono stati in seguito inseriti in tubi da 2 ml, sterili, DNAasi e RNAasi-free, contenenti circa 2 ml di *RNAlater* (Celbio, Milano). Imbibiti i frammenti di intestino di questa soluzione, i tubi, sigillati e richiusi da parafilm, sono stati conservati a 4°C per qualche ora, aspettando di essere stoccati a -20°C. Infine, i campioni sono stati portati al laboratorio di Farmacologica del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, dove sono stati sottoposti a RT-PCR. Si riporta schematicamente il campionamento effettuato con le relative sigle utilizzate nella tabella 1.

Tabella 1 - Schema di campionamento dei segmenti intestinali sottoposti a RT-PCR.

Campione	Data prelievo	Età	Sesso	Stallone/Castrone
1	08/06/2006	3 anni	Maschio	S
2	08/06/2006	3 anni	Maschio	S
3	15/06/2006	5 anni	Maschio	C
4	15/06/2006	5 anni	Maschio	C
5	29/06/2006	5 anni	Maschio	C
6	29/06/2006	5 anni	Maschio	C
7	06/07/2006	4 anni	Maschio	S
8	06/07/2006	3 anni	Maschio	C

S= stallone

C= castrone

ESTRAZIONE DELL'ACIDO RIBONUCLEICO (RNA)

La prima tappa nella realizzazione della tecnica ha previsto l'estrazione dell'RNA totale dai campioni.

Nelle fasi iniziali dello studio sono state testate due diverse metodiche per l'estrazione, in modo da verificare quale fosse la più adatta e quella che consentisse di ottenere i migliori risultati.

Estrazione con Trizol[®], fenolo acido-guanidina tiocianato
(Invitrogen, Milano)

Il campione (circa 100 mg), viene posto in una provetta contenente 1 ml di Trizol[®] (mantiene integro l'RNA mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari) ed omogenato prima con forbicine e poi con Ultra Turrax[®], strumento che si basa sull'azione meccanica di lame rotanti.

Si aggiungono nella provetta 200 µl di cloroformio, il tutto viene rimescolato per inversione ed incubato a temperatura ambiente per 10 minuti. Poi viene posto in centrifuga per 10 min a 13.000 rpm, a 4°C.

A questo punto il mix risulta separato in tre fasi. La fase organica inferiore, di colore rossastro, contiene proteine, fenolo e cloroformio; nella fase intermedia, biancastra, sono presenti DNA genomico e

proteine denaturate; infine, nella parte acquosa superiore (incolore) si trova l'RNA totale.

La porzione acquosa (circa 500 μ l) viene prelevata ed addizionata dello stesso volume di isopropanolo, il quale fa precipitare l'RNA. Seguono una fase di agitazione per inversione per 1 minuto a temperatura ambiente ed una fase di incubazione a -20°C per 30 minuti per ottenerne la precipitazione. Dopo aver centrifugato per 30 min a 13.000 rpm, a 4°C ed eliminato il surnatante, utilizzando una pompa a vuoto o una pipetta, il pellet che rimane viene ripreso in 1 ml di etanolo al 70% freddo e ricentrifugato per 20 min a 13.000 rpm, a 4°C . Alla fine di questo lavaggio, ripetuto due volte per pulire meglio l'RNA, viene eliminato il surnatante e si lascia asciugare il pellet a temperatura ambiente. Successivamente viene dissolto in 75 μ l di H_2O , e posto a 4°C per 10 minuti. Dopo la lettura allo spettrofotometro, il campione viene conservato a -80°C .

Estrazione con Invisorb® Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitex, Berlino).

Ad un campione di circa 20 mg viene aggiunto un buffer di lisi contenente guanidina tiocianato ed omogenato prima con forbicine e

poi con Ultra Turrax®. Dopo aver centrifugato la provetta per far precipitare il materiale più grossolano, viene prelevato il surnatante al quale è aggiunto etanolo assoluto per separare il DNA genomico.

In seguito, il surnatante viene caricato sulla colonnina silicea (*spin column*) e sottoposto a lavaggi seriali con tamponi forniti dal produttore e a successivi passaggi in centrifuga, in modo da eliminare l'etanolo.

Come ultimo passaggio, nella colonnina viene introdotto un tampone di eluizione, il quale ha il compito di separare l'RNA dalla matrice silicea e raccoglierlo in un tubo RNAasi-free sottostante. Questo passaggio viene ripetuto due volte, seguito da centrifugazione, in modo da consentire una maggior concentrazione del prodotto.

VERIFICA E QUANTIFICAZIONE DEI RISULTATI

Per verificare che l'RNA dei campioni sia integro e quindi utilizzabile per le prove seguenti di retrotrascrizione e PCR, è stata adottata la tecnica di elettroforesi su gel. Al gel di agarosio all'1%, eluito in tampone TBE 1X (formato da Tris-HCl 1 mM, acido borico 89 mM ed EDTA 2 mM a pH 8.0), è stato aggiunto un marcatore intercalante (bromuro di etidio).

Fasi del processo:

- a 5 μ l di campione, viene aggiunto 1 μ l di SSCP *loading dye* 6X (colorante di caricamento con azione denaturante sull'RNA e formato da blu di bromofenolo 0.1%, xilene cianolo FF 0.1%, EDTA 10 mM (pH 8.0) e formaldeide 98%).
- i campioni vengono denaturati a 70°C per 5 minuti e nei seguenti 5 minuti vengono tenuti in ghiaccio.
- i campioni (volume finale di 6 μ l) vengono caricati sul gel e sottoposti ad elettroforesi con campo elettrico di 100 V per 20 minuti.

Terminata la corsa elettroforetica, l'avvenuta migrazione dei campioni tra le maglie del gel può essere visualizzata e fotografata mediante il transilluminatore a luce UV *Image Master VDS* (Amersham Biosciences, Milano); in questo modo si possono mettere in evidenza

due bande corrispondenti ai due tipi di RNA ribosomale: 18S (1.9 kb) e 28S (5 kb). Più le bande sono nette e ben differenziate con l'assenza di *smear*, indice di degradazione, più l'RNA è di buona qualità e utilizzabile per le seguenti reazioni.

La quantificazione dell'RNA estratto, è stata valutata mediante l'analisi della densità ottica (DO) con spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, UK). A differenza dello spettrofotometro classico, lo spettrofotometro UV/VIS permette di quantificare l'RNA estratto in maniera ultrasensibile. Per conoscere la concentrazione dell'RNA estratto, viene misurata l'assorbanza di 1.5 µl di campione alla lunghezza d'onda (λ) di 260 nm (A_{260}); ad un determinato valore di assorbanza, corrisponde una data concentrazione di RNA: ad una soluzione di RNA con densità ottica pari a 1.0, corrisponde una concentrazione di 40 µg/µl, tuttavia, per risultati attendibili, il valore di assorbanza deve essere superiore a 0.15.

Il grado di purezza dell'RNA viene stimato dal rapporto tra i valori delle assorbanze lette a 260 nm e a 280 nm (A_{260}/A_{280}) e quello A_{260}/A_{230} . Se i valori risultano compresi tra 1.8 e 2.1, l'RNA risulta privo di contaminanti. Il rapporto A_{260}/A_{280} indica la presenza di residui proteici, lipidici o polisaccaridici, mentre il rapporto A_{260}/A_{230} è segnale di contaminazione dell'RNA da parte di solventi come Tris,

EDTA, fenolo o guanidina tiocinato, che assorbono tra 230 nm e 260 nm.

L'utilizzo del NanoDrop consente di quantificare l'estratto utilizzando una minima quantità di campione (1-2 μ l) e permette di ridurre eventuali variazioni o contaminazioni dovute alla diluizione dell'estratto ed alla sostituzione delle cuvette, in quanto il campione bagna direttamente il sistema ottico. Inoltre lo spettro viene misurato su lunghezze d'onda comprese tra 400 e 750 nm, riuscendo in questo modo, a fornire maggiori informazioni sull'integrità dell'RNA o sulla presenza di contaminanti.

Come tutti gli spettrofotometri però, non è in grado di discriminare tra DNA genomico e RNA in quanto entrambi assorbono a 260 nm. Per evidenziare l'eventuale contaminazione da DNA genomico pertanto risulta utile la comparazione dei dati quantitativi con i risultati della corsa elettroforetica.

TRASCRIZIONE INVERSA (RT)

Questo processo è necessario per poter applicare la metodologia della PCR (*polymerase chain reaction*) allo studio di un campione di RNA. Questo, infatti, deve prima essere convertito in DNA complementare (cDNA) per fornire lo “stampo” necessario alla polimerasi termostabile. Le trascrittasi inverse generalmente utilizzate a tale scopo sono quelle dell'*Avian Myeloblastosis virus (AMV)* o del *Moloney Murine Leucemia Virus (M-MLV)*. In questo studio è invece stata utilizzata la trascrittasi *SuperScriptIII™ (SS III)* (Invitrogen, Milano); si tratta di una forma ingenerizzata della MMLV che presenta maggiore stabilità termica. La *SS III* è in grado di sintetizzare cDNA a singolo filamento a temperature maggiori rispetto a *MMLV-RT*, ed è attiva fino a temperature di 55°C, incrementando in questo modo la specificità e la quantità di prodotto ottenibile. A tal proposito, la *SS III* è in grado di generare cDNA con una lunghezza da 100 pb a oltre 12 kb.

Questa tecnica viene particolarmente utilizzata in analisi che riguardano l'espressione differenziale di geni in tessuti durante lo sviluppo o il clonaggio di cDNA da RNA messaggeri.

◆REATTIVI

- Random Primers (3 μ g/ μ L): primer esameri (miscela di tutte le possibili sequenze a sei basi)
- Ditiotreitolo (DTT) 0,1 M (stabilizzatore di membrana)
- dNTP 10 mM (soluzione contenente dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- RNasiOUT™ (inibitore delle ribonucleasi) 40 U/ μ L
- SS III (200 UI/ μ l)
- Tampone 5X per SS III (fornito con l'enzima): 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂.

◆REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE

La reazione di retrotrascrizione viene divisa in due fasi (volume finale di 20 μ L).

Nella prima fase la reazione avviene tra (volume finale di 13 μ L):

- | | |
|---|-------------------|
| - RNA | 1,4 μ g |
| - random primer (3 μ g/ μ L) | 0,15 μ M |
| - dNTPs (10 μ M) | 0,77 μ M |
| - Soluzione acquosa di Dietil-pirocarbonato | q.b. a 13 μ l |

Il mix viene incubato nel termociclatore (Biometra, Milano) a 65°C per 5 minuti, poi trasferito in ghiaccio per altri 5 minuti.

Nella seconda fase, dopo centrifugazione sono stati aggiunti:

- Tampone 5X 1X (1,5 mM MgCl₂)
- DDT 0,1 M 5 mM
- *RNAasiOUT*TM (40 UI/μl) 2 UI/μl
- *SS III*TM (200 UI/μl) 10 UI/μl

La miscela è stata incubata a 25°C per 5 minuti, poi a 50°C per 45 minuti ed infine, 70°C per 15 minuti (disattivazione dell'enzima).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Scoperta da Kary Mullis nel 1984, la PCR, reazione a catena mediata dall'enzima DNA polimerasi, è una tecnica che permette l'amplificazione selettiva di una sequenza genomica delimitata da due sequenze specifiche (primers), fissate dallo sperimentatore. Questa metodologia è dunque caratterizzata da elevata sensibilità ed efficienza, poiché a partire anche da minime quantità di DNA (DNA a doppia elica di origine genomica o anche cDNA), in poche ore si possono ottenere milioni di copie del frammento desiderato. A tale proposito, si sfruttano le proprietà di resistenza all'inattivazione termica di polimerasi termostabili, come la Taq polimerasi, estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus*.

Il processo di amplificazione, infatti, consiste nella ripetizione di cicli termici successivi, che si possono riassumere come segue:

- Denaturazione (in forma lineare) del DNA a 92-98°C (30-60 secondi)
- Appaiamento (*annealing*) dei primers, con temperatura variabile dai 40 ai 68°C a seconda delle sequenze (30-60 secondi)

- Estensione o sintesi di un nuovo filamento di DNA a 72°C, che rappresenta la temperatura ottimale delle DNA polimerasi termostabili (30-90 secondi)

◆REATTIVI

- H₂O doppiamente demineralizzata sterile (milliQ)
- dNTP 2.5 mM o 10 mM (soluzione contenente quantità equimolari di dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- primers 10 µM
- MgCl₂
- Enzima DNA Polimerasi
- Tampone per Taq DNA polimerasi (fornito con l'enzima)

◆REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE DEL DNA

Il protocollo di amplificazione prevede l'utilizzo dell'enzima GoTaq[®] Flexi DNA Polimerasi (Promega, USA). Questo viene fornito in una formulazione contenente il 50% di glicerolo per incrementare l'attività di amplificazione. L'enzima è una forma non ricombinante e modificata della Taq DNA Polimerasi che manca di attività esonucleasica 5'→3'. Come tampone è stato utilizzato il 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer, contenente due coloranti (blu e giallo) che si

separano durante l'elettroforesi per monitorare il fronte di migrazione: il colore blu migra alla stessa velocità di frammenti di DNA di 3-5 kb in un gel di agarosio all'1%. Il colore giallo migra a velocità maggiore dei primers (<50 pb) nello stesso tipo di gel. Questo buffer permette di effettuare direttamente l'elettroforesi sul materiale amplificato senza dover aggiungere il tampone di caricamento dopo la PCR.

La reazione di PCR è stata allestita in un volume finale di 20 µl e secondo le seguenti concentrazioni finali:

- H ₂ O	qb 20 µl
- 5X Green GoTaq [®] Flexi Buffer	1X (1,5 mM MgCl ₂)
- MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM
- dNTPs (2.5 o 10 mM)	0,2 mM
- <i>Primer</i> senso	0,4 µM
- <i>Primer</i> antisenso	0,4 µM
- GoTaq [®] Flexi DNA Polimerasi	0,025 U/µl
- cDNA	0,125 µg

I campioni sono stati incubati nel termociclatore T Personal (Biometra[®], Milano) e sottoposti al seguente protocollo termico:

a) Attivazione della

GoTaq[®] Flexi DNA Polimerasi 95°C per 2 minuti

b) Denaturazione

95°C per 30 secondi

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| c) Appaiamento | 56°C per 45 secondi * |
| d) Polimerizzazione | 72°C per 45 secondi |
| e) Estensione finale | 72°C per 5 minuti |
| f) Raffreddamento e inattivazione | 4°C per 5 minuti |
| g) Conservazione | 10°C |

Il ciclo comprendente i passaggi b, c, d, è stato ripetuto 35 volte.

*È stata usata una temperatura di appaiamento pari a 56°C per COX-1 e COX-2, mentre di 55°C per GAPDH.

ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

In seguito all'amplificazione dei geni d'interesse, i prodotti di PCR vengono caricati in un gel di agarosio e sottoposti a corsa elettroforetica al fine di separare e visualizzare le bande degli ampliconi.

I gel vengono preparati sciogliendo l'agarosio (1 o 2% peso/volume) in TBE 1X e portando ad ebollizione. La soluzione viene lasciata raffreddare e prima che solidifichi si aggiunge Etidio Bromuro ad una concentrazione finale di 10 µg/ml; si versa in un'apposita vaschetta in presenza di un pettine, per la formazione dei pozzetti, e si attende la

completa polimerizzazione. A questo punto il gel viene immesso nell'apposito apparato elettroforetico con il tampone di corsa TBE 1X a pH 8.

In seguito al caricamento dei prodotti di PCR amplificati con GoTaq[®] Flexi DNA Polimerasi e già diluiti in 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer, si applica una differenza di potenziale di 100 V per 20 minuti. Al termine della corsa il gel viene posto sotto i raggi UV per visualizzare le bande: l'Etidio bromuro intercalatosi tra le basi del DNA, appare fluorescente. Le dimensioni dei frammenti vengono poi stimate in presenza di un marcatore con peso molecolare noto.

RISORSE BIOINFORMATICHE

Nella parte di ricerca delle sequenze è stato utilizzato il sito del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), in cui, grazie all'impiego di motori di ricerca quali *Pubmed*, *Nucleotide*, *Gene* e *Protein*, si sono potute reperire informazioni e dati sulle pubblicazioni scientifiche e sulle sequenze dei geni, dei trascritti e delle proteine di interesse nella specie *Equus caballus*.

In tal modo sono state reperite le sequenze nucleotidiche degli RNA messaggeri relativamente ai geni GAPDH e COX-1, sulle quali si è lavorato utilizzando software come Primer3 (per GAPDH) e Primer Express (per COX-1) per pervenire al disegno dei primer riportati nella tabella sottostante.

Per quanto riguarda, invece, il gene COX-2, i primer relativi, specifici per il cavallo, sono stati tratti dal lavoro di Dell'Aquila *et al.*, 2004.

Le informazioni relative ai primer utilizzati sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2. – *Primers utilizzati per la PCR.*

Gene	COX1	COX2	GAPDH
Primer forward	F 5'-AGGAGGTGTTTGGGCTGCTT-3'	5'-ATACCAAACCGCATTGCCG- 3'	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'
Primer reverse	R 5'-GGGTGCCAGTGGTAGAGGTG-3'	5'-TCTAACTCCGCAGCCATTTC-3'	5'-TGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3'
Sequence ID	DQ246452	AB041771	AF157626
Amplicone (bp)	301	360	708

ANALISI DEI DATI

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm errore standard (SEM) di $n=5-8$ osservazioni. L'azione delle sostanze con effetto contratturante o di rilasciamento sul tono muscolare era valutato come variazione di lunghezza del preparato che, come sopra descritto, lavorava in condizioni isotoniche. Tali variazioni venivano quindi espresse in cm di spostamento della leva del trasduttore, calibrando la risposta grafica in funzione dello spostamento della leva. L'azione dei farmaci sulla motilità spontanea o sulla risposta contrattile alla stimolazione elettrica era calcolata invece come percentuale di incremento (aumento o diminuzione) dell'ampiezza della contrazione basale, misurata prima di somministrare il farmaco e considerata quindi pari al 100%.

L'attività degli agonisti è stata valutata calcolando il valore della concentrazione di agonista che induce il 50% dell'effetto massimale (EC_{50}) ottenuto dalla funzione di correlazione (non lineare) desunta dalle curve concentrazione-effetto. Il valore di EC_{50} è stato convertito successivamente in forma logaritmica ed espresso come pD_2 (-Log

EC₅₀). Lo studio delle interazioni agonista-antagonista è stato condotto valutando l'entità di spostamento della curva concentrazione-effetto dell'agonista in presenza di concentrazioni crescenti di antagonista. La potenza è stata quindi espressa in termini di pA₂ (-Log della concentrazione di antagonista in presenza della quale sono necessarie concentrazioni doppie di agonista per ottenere l'effetto, misurato in assenza di antagonista).

Tale valore si calcola con la formula di Gaddum: $pA_2 = -\text{Log} [B] + \text{Log} [CR-1]$ dove B è la concentrazione dell'antagonista e CR è il rapporto tra le EC₅₀ di agonista calcolate in presenza ed in assenza dell'antagonista (Kenakin, 1987).

Il confronto fra due o più serie di dati era condotto con test statistici appropriati, quali il t di Student o, nel caso di comparazioni multiple, con l'ANOVA a una o due code. Il limite di significatività veniva fissato per valori di $p < 0.05$.

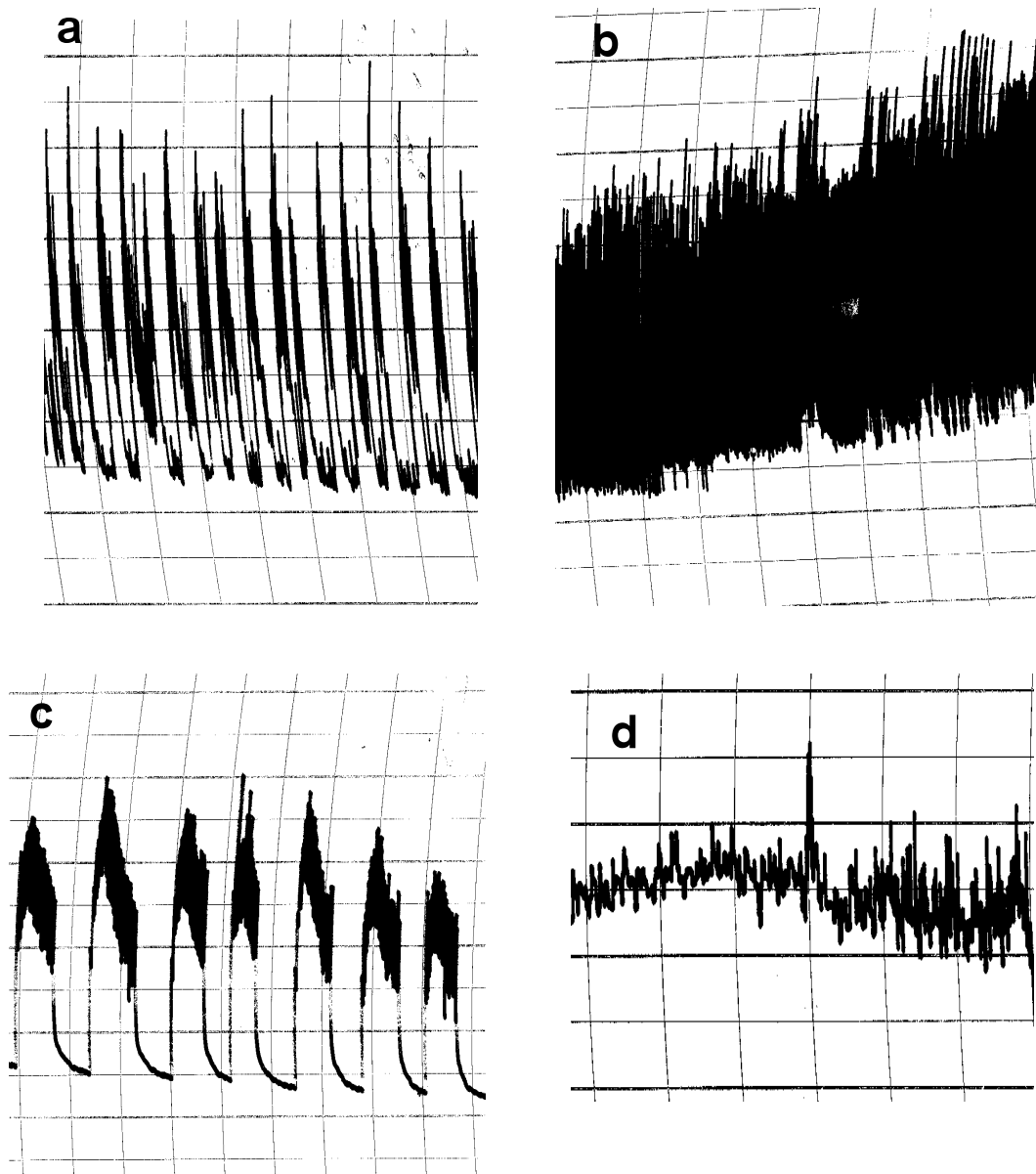
RISULTATI

ORGANO ISOLATO

FANS

Motilità spontanea

I preparati di ileo circolare presentano una motilità piuttosto variabile come dimostrato in uno studio recentemente condotto, i cui risultati sono riportati in un precedente lavoro (Marchese, 2005). Tale studio ha infatti rilevato la presenza di picchi di contrazione più o meno frequenti che potevano esitare in un'intensa attività contrattile del preparato (Fig. 8a e 8b). Talvolta è stata osservata una motilità caratterizzata da movimento ondulatorio con picchi di contrazione e rilasciamento, aventi ampiezza e durata variabile, eventualmente associati a variazioni del tono basale (Fig. 8c e 8d).



*Figura 8 - Ileo circolare di cavallo: esempi di motilità spontanea.
(Da Marchese, 2005)*

Per quanto riguarda lo studio dei meccanismi coinvolti nella regolazione fisiologica della motilità spontanea, l'uso di vari principi attivi ne ha dimostrato la natura sia neurogena sia miogena. In particolare, le contrazioni fasiche spontanee sono state ridotte dal

bloccante neuronale tetrodotossina (TTX) (0,01 μ M) e dall'atropina (0,1-0,01 μ M) suggerendone la loro parziale natura neurogena colinergica (Holzer & Holzer-Petsche, 1997).

I composti SR 14033 e MEN 10627 (inibitori della neurochinina 1 e 2, rispettivamente) (3 μ M) hanno causato un marcato rilasciamento, mentre l'inibitore della sintesi di NO (L-NAME), (1 μ M), ha indotto un aumento della contrazione tonica, suggerendo il coinvolgimento di peptidi e NO nella regolazione dell'attività miogena (Fig. 9a).

Come osservato in altri tessuti intestinali (Poli *et al.*, 1994) le contrazioni indotte dalla stimolazione elettrica erano TTX (0,01 μ M) (Fig.9b) e ω -conotossina sensibili (dato non mostrato), suggerendo in questo caso il coinvolgimento di neurotrasmettitori eccitatori rilasciati dai nervi estrinseci.

L'atropina (0,01 μ M) inoltre ha abolito completamente tali contrazioni dimostrando così la loro natura colinergica (Fig.9b)

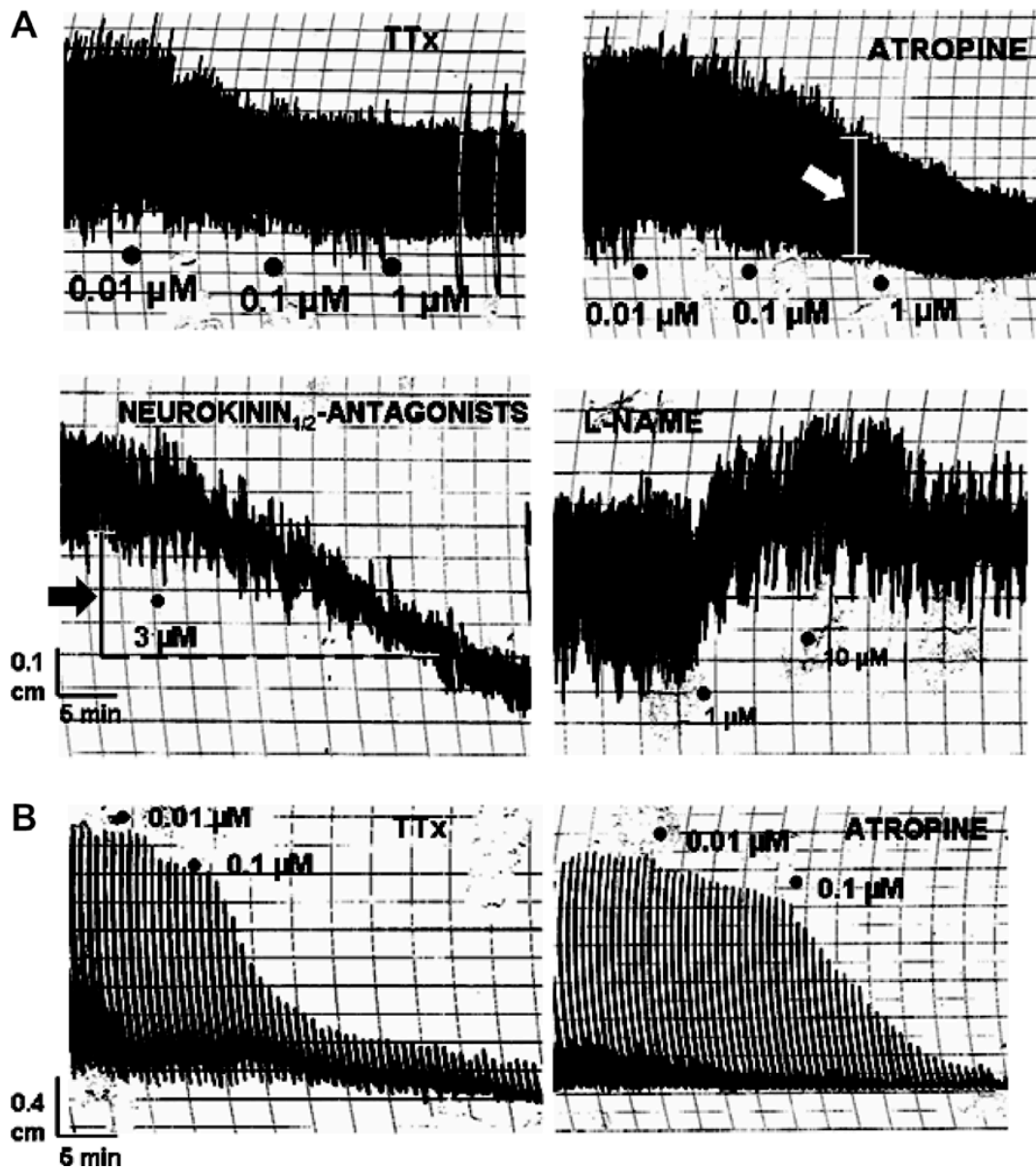


Figura 9- Caratterizzazione della motilità del muscolo circolare dell'ileo di cavallo .A: effetto della tetrodotossina (TTX), atropina, antagonisti della neurochinina 1 e 2 e L-NAME sulla motilità spontanea. Le frecce indicano il metodo di misura delle contrazioni toniche (freccia nera) e le contrazioni fasiche (freccia bianca).

B: Effetti della TTX e dell'atropina sulle contrazioni indotte da stimolazione elettrica.

Effetti dei fans sulla motilità spontanea (ileo)

EFFETTI SUL TONO BASALE

- *EFFETTI DEI COX-1 INIBITORI*

L'indometacina ha causato un aumento non significativo del tono basale nel muscolo circolare, mentre SC-560 e flunixin meglumina hanno diminuito in modo significativo il tono basale in maniera concentrazione dipendente (10^{-7} - 10^{-5} M), esercitando un effetto massimale di 0.09 ± 0.02 cm e 0.15 ± 0.03 cm rispettivamente ($P < 0.05$ rispetto al valore basale) (Fig. 10a).

- *EFFETTI DEI COX-2 INIBITORI*

Il celecoxib ha indotto una diminuzione concentrazione dipendente (10^{-7} - 10^{-5} M) del tono basale con un effetto massimale pari a 0.08 ± 0.01 cm ($P < 0.05$ rispetto al valore basale). Il composto NS-398 alle varie concentrazioni testate, (10^{-8} - 10^{-5} M), ha causato una riduzione non significativa del tono basale. Il composto DUP-697 ha diminuito in modo significativo il tono basale con un effetto pari a

0.07±0.01 cm e 0.11±0.02 cm alle concentrazioni 10⁻⁶ M e 10⁻⁵ M rispettivamente (P<0.05 rispetto al valore basale) (Fig. 10b).

- *EFFETTI DEGLI ANTAGONISTI DEI RECETTORI DELLE PROSTAGLANDINE*

Il composto AH6809, antagonista dei recettori delle PGD₂ e delle PGE₂, non ha prodotto alcuna modificazione del tono basale (dati non mostrati).

L'antagonista dei recettori delle PGF_{2α}, AH8810 ha prodotto scarsi effetti sul tono basale del preparato facendo inoltre registrare una certa variabilità (dati non mostrati).

MOTILITÀ SPONTANEA

TONO BASALE

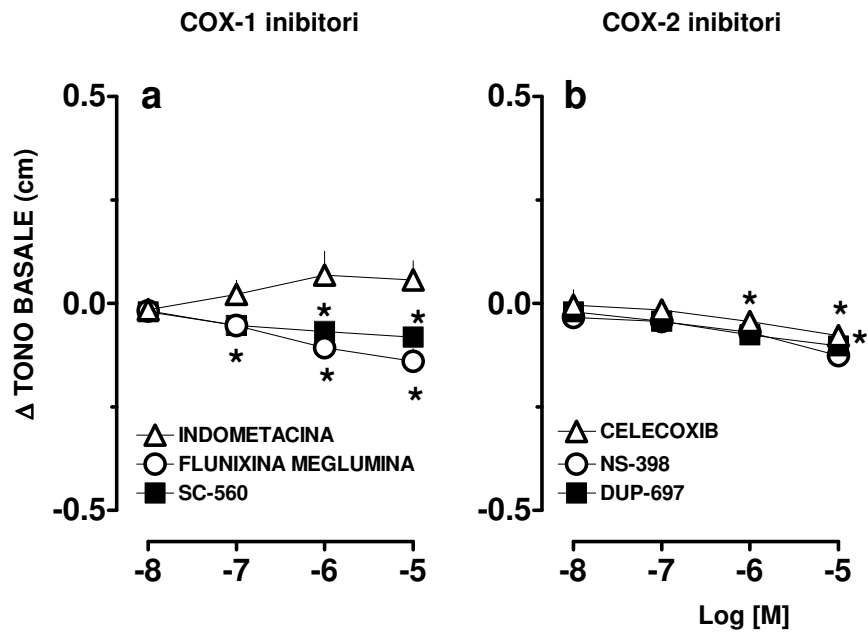


Figura 10 - Effetto dei COX-1 inibitori (a) e COX-2 inibitori (b) sul tono basale della motilità spontanea dell'ileo circolare di cavallo. *: $P < 0.05$ rispetto al basale.

EFFETTI SULL'AMPIEZZA DEI PICCHI

- *EFFETTI DEI COX-1 INIBITORI*

L'indometacina ha determinato un incremento concentrazione dipendente (10^{-8} - 10^{-5} M) dell'ampiezza dei picchi. In particolare, in presenza di indometacina 10^{-5} M, l'ampiezza è aumentata del $121.1 \pm 36.4\%$ ($P < 0.05$ rispetto all'ampiezza basale). In presenza di flunixin meglumina si è osservata una tendenza all'aumento peraltro di scarsa consistenza. Il composto SC-560 non ha avuto alcun effetto sull'ampiezza dei picchi di contrazione (Fig. 11a).

- *EFFETTI DEI COX-2 INIBITORI*

Il celecoxib, alla concentrazione di 10^{-5} M, ha prodotto una riduzione significativa dell'ampiezza dei picchi pari al $16.1 \pm 10.9\%$ ($P < 0.05$ rispetto all'ampiezza basale). Il composto NS-398 ha diminuito in modo concentrazione dipendente l'ampiezza dei picchi con un effetto massimale del $64.5 \pm 13.6\%$ alla concentrazione di 10^{-5} M ($P < 0.05$ rispetto all'ampiezza basale). Il composto DUP-697 ha ridotto in modo concentrazione dipendente l'ampiezza dei picchi. Tale riduzione ha raggiunto valori significativi del $29.4 \pm 10.4\%$ e del $39.5 \pm 10.7\%$ alle

concentrazione di 10^{-6} M e 10^{-5} M rispettivamente ($P < 0.05$ rispetto all'ampiezza basale) (Fig. 11b).

- *EFFETTI DEGLI ANTAGONISTI DEI RECETTORI DELLE PROSTAGLANDINE*

Entrambi i composti, AL6809 e AH8810, hanno prodotto modificazioni notevolmente variabili dell'ampiezza dei picchi della motilità spontanea (dati non mostrati). Tali effetti non sono comunque risultati significativi.

AMPIEZZA DEI PICCHI

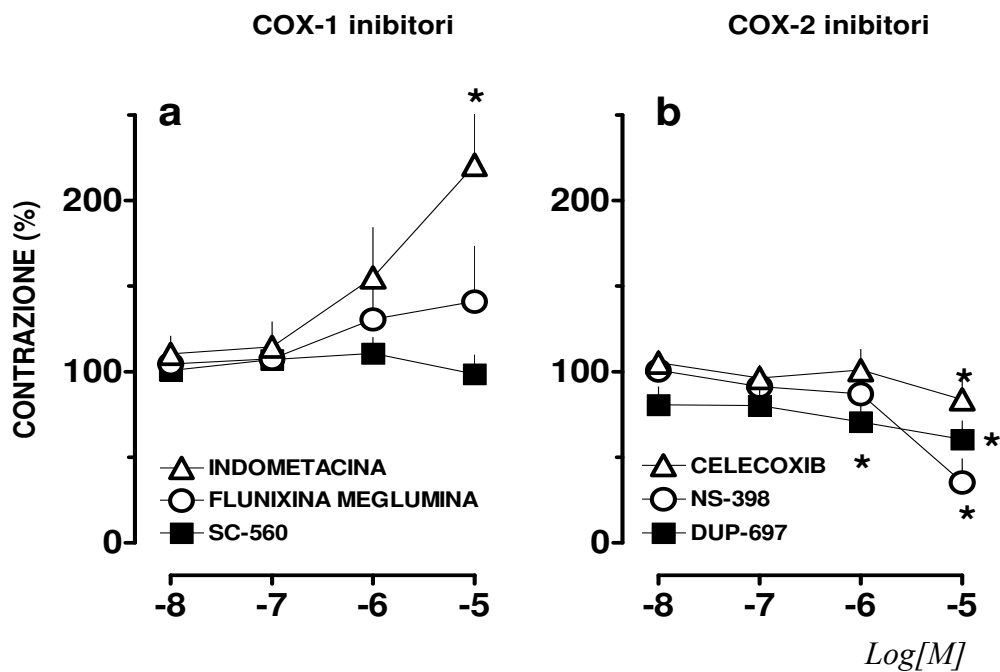


Figura 11 - Effetto dei COX-1 inibitori (a) e COX-2 inibitori (b) sull'ampiezza dei picchi della motilità spontanea dell'ileo circolare del cavallo. *: $P < 0.05$ rispetto all'ampiezza basale.

Effetti dei FANS sull'attività contrattile indotta dalla stimolazione elettrica

- *EFFETTI DEI COX-1 INIBITORI*

L'indometacina e la flunixinina meglumina non hanno variato l'ampiezza della risposta alla stimolazione elettrica nella muscolatura circolare. Il composto SC-560 ha provocato un aumento significativo dell'ampiezza dei picchi del $14.8 \pm 6.07\%$ e del $25.1 \pm 14.8\%$ alle concentrazioni di 10^{-6} M e 10^{-5} M rispettivamente ($P < 0.05$ rispetto al valore controllo) (Fig. 12a).

- *EFFETTI DEI COX-2 INIBITORI*

Sia il celecoxib, sia il composto NS-398 non hanno mostrato alterazioni significative dell'ampiezza delle contrazioni indotte dalla stimolazione elettrica. Solo il composto DUP-697 ha prodotto un aumento significativo del $42.5 \pm 13.29\%$ dell'ampiezza delle contrazioni alla più alta concentrazione testata (10^{-5} M, $P < 0.05$ rispetto al valore controllo) (Fig. 12b).

- *EFFETTI DEGLI ANTAGONISTI DELLE PROSTAGLANDINE*

L'antagonista dei recettori delle PGD_2 e delle PGE_2 , AH6809, e l'antagonista dei recettori delle $PGF_{2\alpha}$, AL8810, non producendo alcuna variazione nell'ampiezza delle contrazioni indotte dalla stimolazione elettrica, sono risultati inattivi (dati non mostrati).

ATTIVITÀ CONTRATTILE INDOTTA DALLA S.E.

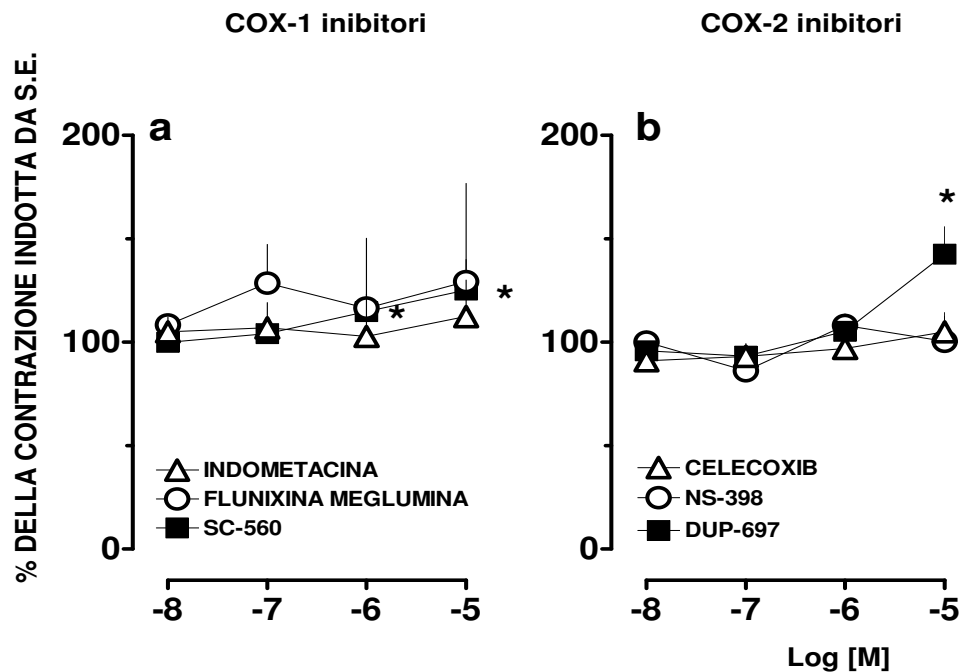


Figura 12 - Effetto dei COX-1 inibitori (a) e COX-2 inibitori (b) sull'attività contrattile indotta dalla stimolazione elettrica dell'ileo circolare del cavallo. In ascissa: Log della concentrazione molare dei farmaci. In ordinata: variazione (aumento o diminuzione), espressa in percentuale, della motilità indotta da stimolazione elettrica (S.E.). Alla motilità di ciascun preparato indotta da stimolazione elettrica prima della somministrazione di concentrazioni crescenti di farmaco è stato attribuito il valore di 100. *: $P < 0.05$ rispetto al valore controllo.

FARMACI α_2 -ADRENERGICI

Effetti dei farmaci α_2 -adrenergici sulla motilità spontanea (digiuno)

I campioni di digiuno hanno mostrato contrazioni fasiche che non sono state ridotte dal bloccante neuronale TTX (tetrodotossina (10^{-7} - 10^{-6}) e dall'atropina (10^{-7} - 10^{-6})

Gli antagonisti della neurochinina-1 e -2 (3×10^{-6}) hanno causato una notevole diminuzione delle contrazioni toniche, mentre l'inibitore dell'ossido nitrico sintasi (L-NAME) (10^{-5}) ne ha indotto un aumento (Fig.13).

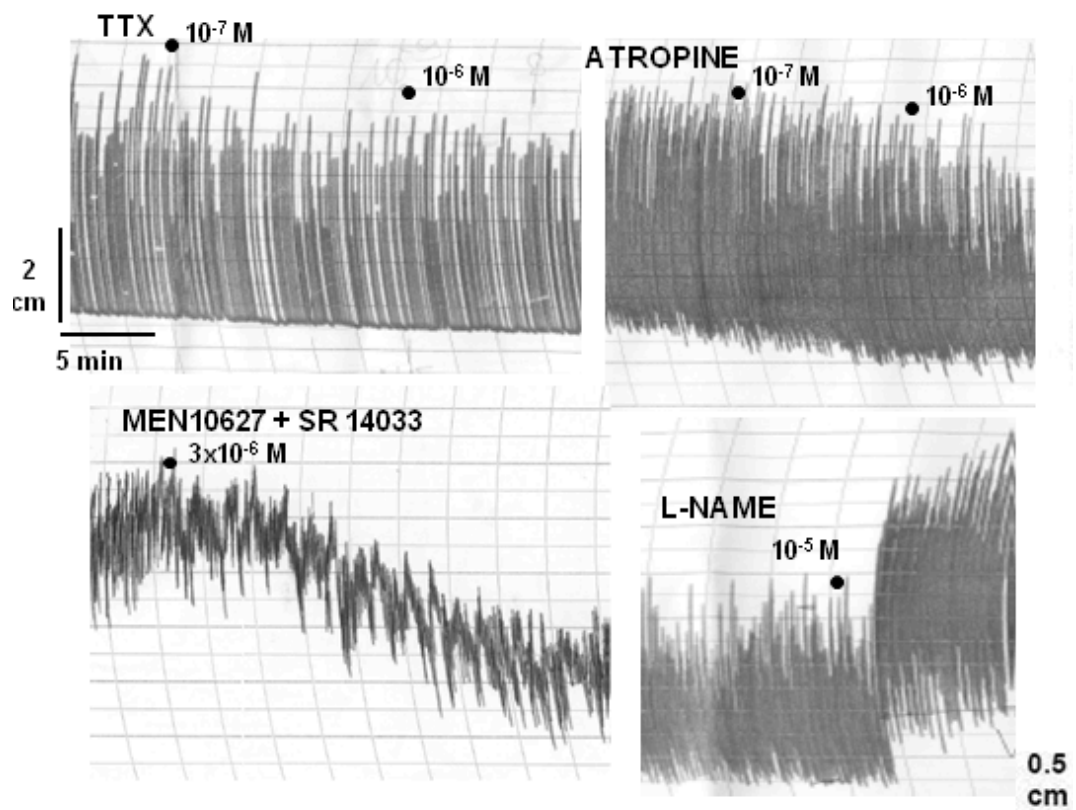


Figura 13- Muscolo circolare di digiuno di cavallo: caratterizzazione della motilità. Effetti dei composti TTX, atropina, antagonisti della neurokinina 1 e 2 ed L-NAME sulla motilità spontanea.

EFFETTI SUL TONO BASALE

La xilazina non ha indotto modificazioni significative del tono basale fino alla concentrazione di 10^{-5} M, mentre ha prodotto un aumento non significativo di 0.10 ± 0.8 cm ($p > 0.4$), solo alla concentrazione massima utilizzata (10^{-4} M).

La medetomidina ha diminuito il tono basale in modo concentrazione dipendente (10^{-10} - 10^{-5} M) con una riduzione massima di 0.27 ± 0.15 cm. La detomidina, a tutte le concentrazioni utilizzate (10^{-9} - 10^{-5} M), non ha prodotto variazioni del tono basale (dati non mostrati).

EFFETTI SULL'ATTIVITA' CONTRATTILE MIOGENA SPONTANEA

La xilazina ha fatto registrare una marcata riduzione ($-72.2 \pm 11.1\%$) dell'ampiezza dei picchi di contrazione rispetto al valore basale ($p < 0.05$). Tale riduzione è risultata concentrazione dipendente (10^{-8} - 10^{-4} M). La medetomidina ha mostrato un andamento contrastante, evidenziando un aumento ($+13.5 \pm 6.0\%$) alle basse concentrazioni (10^{-10} e 10^{-9} M) ed una riduzione concentrazione dipendente alle concentrazioni maggiori ($-38.9 \pm 12\%$), $p < 0.05$ rispetto al valore

basale. La detomidina ha causato una diminuzione concentrazione dipendente (10^{-10} - 10^{-4} M) dell'ampiezza dei picchi di contrazione con un effetto massimale del $49.5 \pm 5.7\%$ ($p < 0.05$ rispetto all'ampiezza basale), (fig 14).

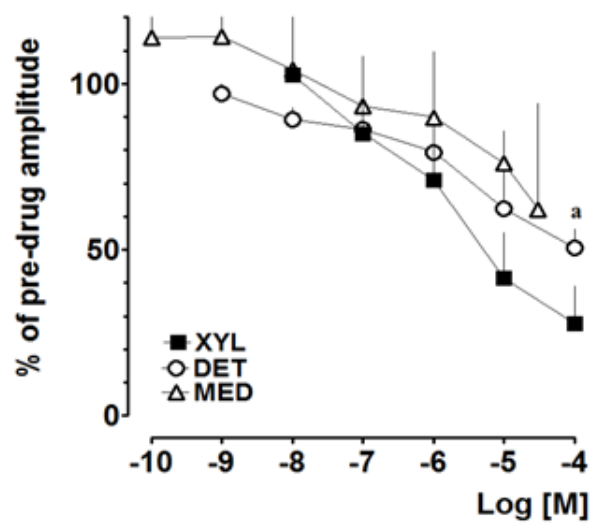


Figura 14- Effetti degli α_2 -agonisti sulla motilità spontanea. ^a $p < 0.05$ DET vs XIL

Effetti dei farmaci α_2 -adrenergici sull'attività contrattile indotta dalla stimolazione elettrica

La stimolazione elettrica di campo ha indotto nella muscolatura circolare una risposta contrattile fasica costituita da picchi regolari e caratterizzata dalla soppressione quasi completa della motilità spontanea del preparato.

- *α_2 -AGONISTI*

La xilazina è stata in grado di ridurre in modo concentrazione dipendente (10^{-9} - 10^{-4} M) l'attività contrattile indotta dalla stimolazione elettrica del $74.3 \pm 5.3\%$ ($p < 0.05$ rispetto al valore controllo). La medetomidina ha diminuito in modo concentrazione dipendente (10^{-11} - 10^{-5} M) l'ampiezza delle contrazioni con una riduzione massimale del $56.4 \pm 9.8\%$ ($p < 0.05$ rispetto al valore pre-farmaco). La detomidina ha determinato un effetto inibitorio concentrazione dipendente (10^{-10} - 10^{-4} M) del $75.2 \pm 6.6\%$ ($p < 0.05$) (Fig 18).

I valori di pD_2 di xilazina, medetomidina e detomidina sono risultati pari rispettivamente a 5.50 ± 0.59 , 8.02 ± 0.75 e 5.30 ± 0.35 .

In particolare, il valore di pD_2 della medetomidina è risultato significativamente più alto ($p < 0.05$) sia rispetto a quello della xilazina, sia rispetto a quello della detomidina.

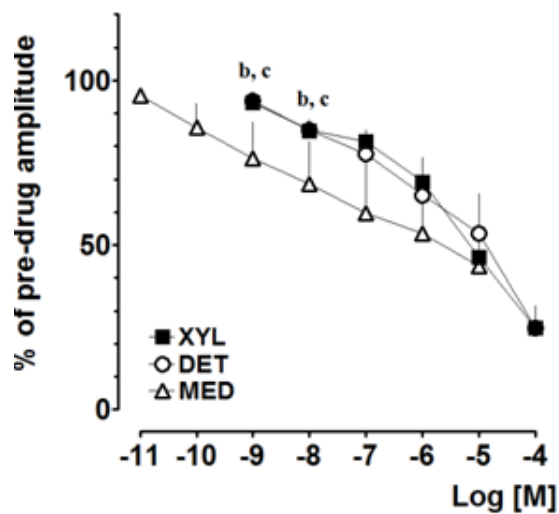


Figura 15- Effetti degli α_2 -agonisti sulle contrazioni indotte da stimolazione elettrica.. ^b $p < 0.05$ XIL vs MED e ^c $p < 0.05$ DET vs MED

- α_2 -ANTAGONISTI

Gli antagonisti dei recettori α_2 -adrenergici yoimbina ed atipamezolo, non hanno prodotto alcuna modificazione dell'ampiezza della contrazione indotta dalla stimolazione elettrica a tutte le concentrazioni utilizzate (10^{-19} - 10^{-6} M) (Fig.16).

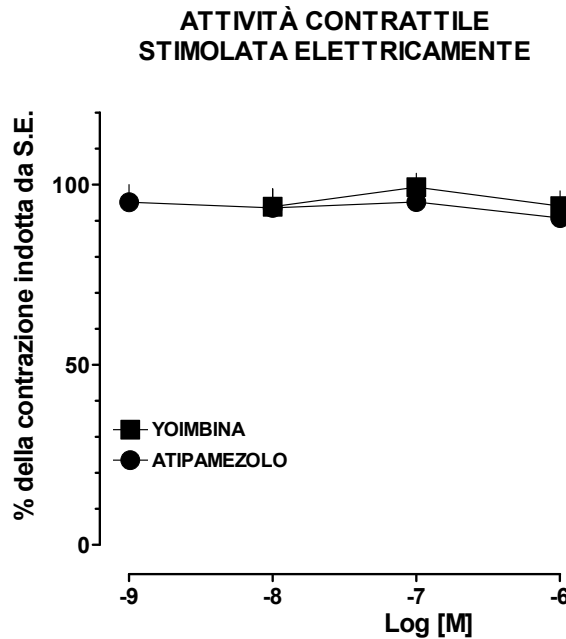


Figura 16- effetto degli α_2 -antagonisti sull'attività contrattile indotta dalla stimolazione elettrica

Antagonismo degli effetti α_2 -mediati

L'effetto inibitorio dell'agonista xilazina sull'ampiezza della contrazione indotta da stimolazione elettrica è risultato significativamente ridotto in presenza di atipamezolo 10^{-7} M. In tali condizioni sperimentali è stato infatti osservato uno spostamento in modo parallelo verso destra della curva concentrazione-effetto dell'agonista, caratteristico dell'agonismo competitivo. Il valore di pA_2 per l'atipamezolo è risultato pari a 7.60 ± 0.36 . La concentrazione

maggiore di atipamezolo (10^{-6} M) tuttavia, non è stata in grado di indurre un ulteriore spostamento verso destra della curva concentrazione-effetto dell'agonista. Tale curva è risultata spostata in grado addirittura minore rispetto a quanto osservato con la concentrazione di 10^{-7} M di atipamezolo (fig. 18).

L'antagonista yoimbina ha fatto registrare un comportamento alquanto insolito poiché, non solo non è stata in grado di antagonizzare l'effetto inibitorio della xilazina, ma ha determinato un potenziamento dell'effetto della xilazina stessa, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata, 10^{-7} M e 10^{-6} M (fig. 17).

L'effetto inibitorio della medetomidina non è stato modificato in modo significativo in presenza di concentrazioni pari a 10^{-7} M e 10^{-6} M di atipamezolo (fig. 18). La yoimbina, alla concentrazione di 10^{-7} M, ha antagonizzato l'effetto inibitorio della medetomidina ed è stato calcolato un pA_2 di 8.24 ± 0.66 . La concentrazione maggiore, 10^{-6} M, non è risultata in grado di spostare ulteriormente verso destra la curva concentrazione effetto della medetomidina (fig.17).

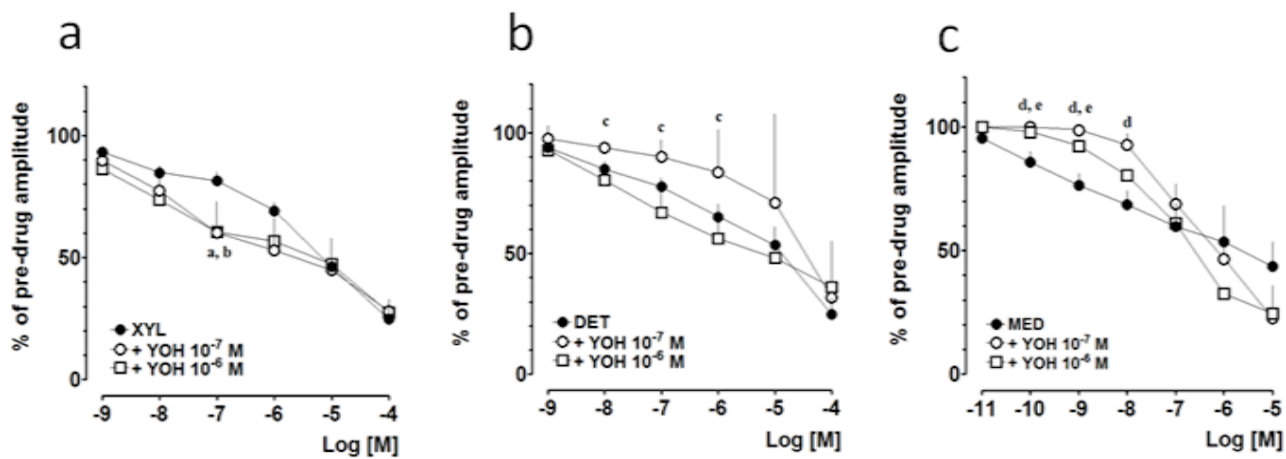


Figura 17- Effetti di α_2 -agonisti in presenza di due diverse concentrazioni di yohimbina. ^a $P < 0.05$ YOH 10^{-7} M vs. XYL, ^b $P < 0.05$ YOH 10^{-6} M vs. XYL, ^c $P < 0.05$ YOH 10^{-7} M vs. DET, ^d $P < 0.05$ YOH 10^{-7} M vs. MED e ^e $P < 0.05$ YOH 10^{-6} M vs. MED.

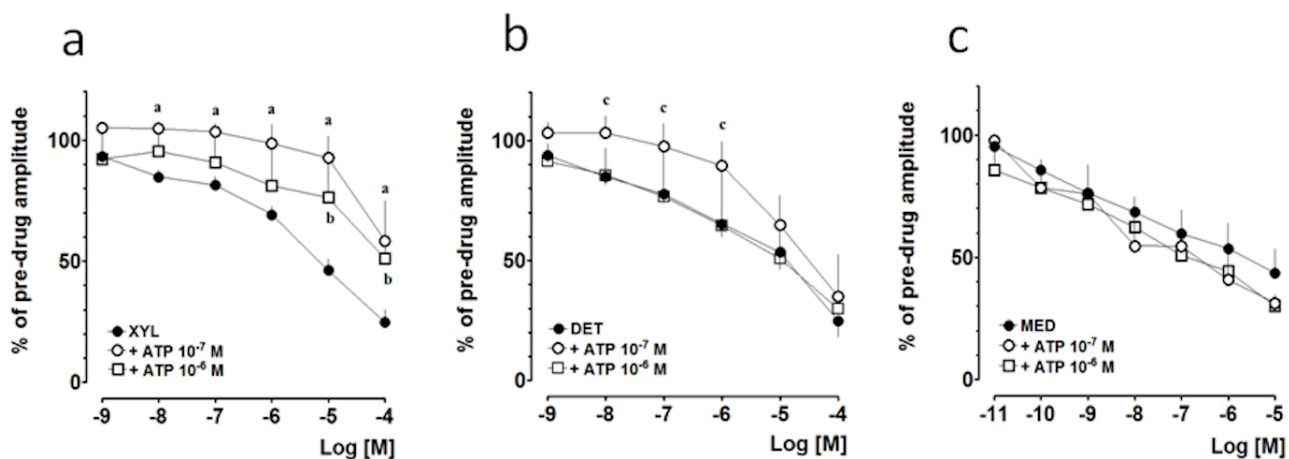


Figura 18 -Effetti di α_2 -agonisti in presenza di due differenti concentrazioni di atipamezolo. ^a $P < 0.05$ ATP 10⁻⁷ M vs. XYL, ^b $P < 0.05$ ATP 10⁻⁶ M vs. XYL e ^c $P < 0.05$ ATP 10⁻⁷ M vs. DET.

ISTOLOGIA

Tutti i campioni istologici analizzati evidenziano lievi fenomeni di infiammazione catarrale cronica caratterizzata da una iperplasia delle placche linfatiche, infiltrati di granulociti eosinofili e linfomononucleati che invadono la mucosa e la sottomucosa (Fig. 19 e 20).

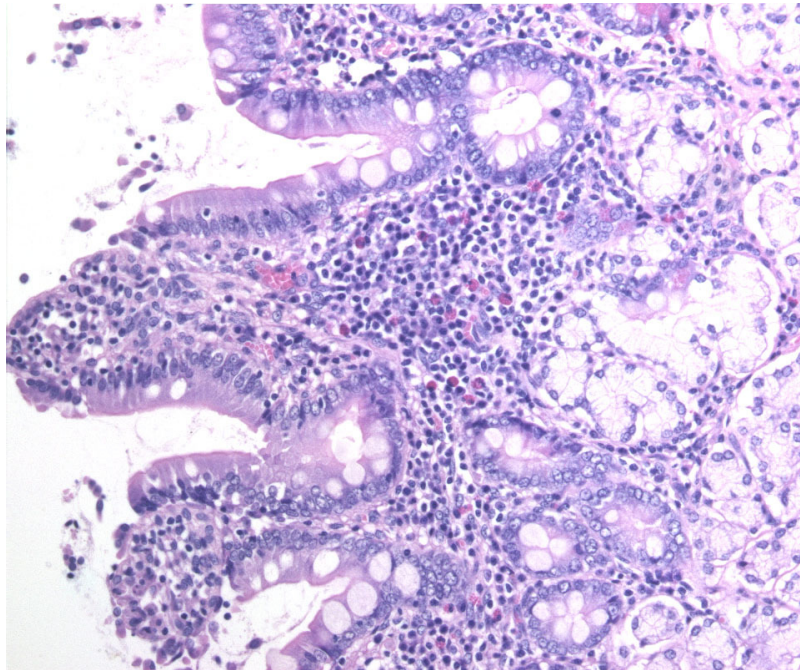


Figura 19.

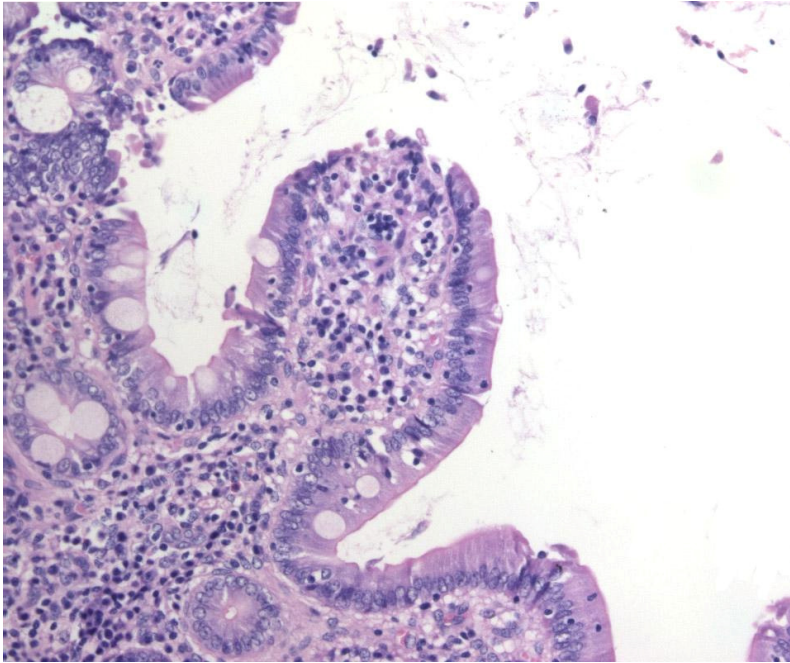


Figura 20- Ileo: la superficie della mucosa appare parzialmente disepitelizzata. La sottomucosa appare riccamente infiltrata da linfomononucleati e granulociti neutrofili (EE 20x).

RT-PCR

ESTRAZIONE E QUALITÀ DELL'RNA

Ogni campione è stato sottoposto ad estrazione dell'RNA totale con le due tecniche diverse e successivamente controllato in gel di agarosio all'1%, dopo averne effettuato la denaturazione secondo le modalità indicate in precedenza. Con la tecnica in kit *Invisorb*[®] si è proceduto all'estrazione di 20 mg circa per ogni aliquota analitica, con un volume finale di eluito pari a 20 µl; con la seconda tecnica di estrazione, *Trizol*[®], invece sono stati estratti circa 100 mg per campione e si è ottenuto un volume finale di 75 µl.

Tutti i campioni hanno dato luogo ad estratti di buona qualità, con la differenza che i campioni estratti con *Trizol*[®] sono più concentrati e mostrano un segnale meno pulito e in una certa misura più degradato in ragione della maggior massa iniziale di campione utilizzata e delle maggiori manipolazioni subite dal campione in corso di estrazione. Entrambe le serie di campioni, sia quelli estratti con kit *Invisorb*[®], sia quelli estratti con *Trizol*[®], sono stati amplificati per tutti e tre i geni di questo studio.

Tutti i campioni estratti sono stati valutati per la loro concentrazione in RNA totale allo spettrofotometro NanoDrop.

In generale, si osserva una buona correlazione tra rifrangenza della banda elettroforetica e valore della lettura di concentrazione al Nanodrop, particolarmente con l'estrazione in kit. I risultati sono riportati nella tabella 3.

Tabella 3. – Risultati relativi all'estrazione dell'RNA totale.

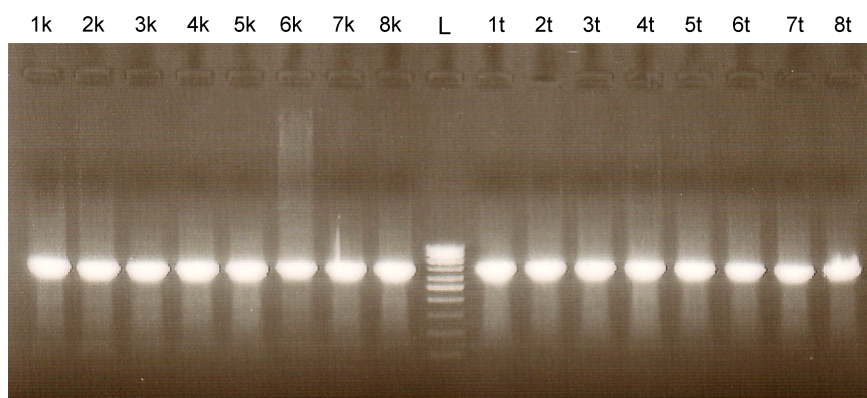
Campione	Data estrazione	Tecnica estrazione	Concentrazione (ug/μL)	Data estrazione	Tecnica estrazione	Concentrazione (ug/μL)
1	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.502	08 nov 2006	Trizol [®]	1.300
2	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.389	08 nov 2006	Trizol [®]	0.943
3	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.131	08 nov 2006	Trizol [®]	1.254
4	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.529	08 nov 2006	Trizol [®]	0.357
5	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.466	08 nov 2006	Trizol [®]	0.955
6	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.526	08 nov 2006	Trizol [®]	0.680
7	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.125	08 nov 2006	Trizol [®]	1.112
8	02 nov 2006	Invisorb [®]	0.503	08 nov 2006	Trizol [®]	0.666

RETROTRASCRIZIONE ED AMPLIFICAZIONE

I campioni di ogni estrazione sono stati retrotrascritti (1.4 µg per ogni campione) ed amplificati. Sono stati effettuati dei controlli di retrotrascrizione ed amplificazione: i bianchi di estrazione sono stati retrotrascritti ed amplificati; sono stati poi effettuati due controlli negativi di retrotrascrizione (RT minus) ed infine dei bianchi di amplificazione.

Gli 8 campioni retrotrascritti sono poi stati amplificati con i primer per GAPDH per verificare l'amplificabilità del campione; verificata la qualità dell'estratto retrotrascritto, gli stessi cDNA sono stati amplificati per COX1 e COX2. I risultati sono visualizzabili nelle figure. 21, 22 e 23.

GAPDH Intestino Cavallo

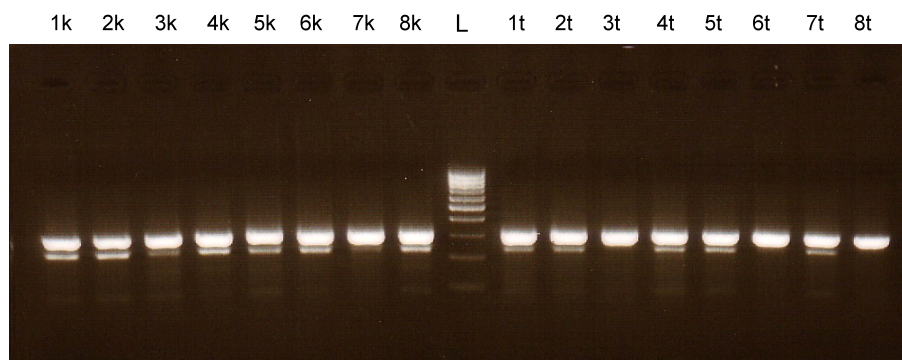


k = kit estrazione RNA Invitex
t = estrazione RNA con Trizol
L = DNA ladder 100 bp (4 ul)

Enzima: GoTaq Flexi Promega Italia
cDNA : 1,8 ul (125 ng)
T annealing : 55°C; 35 cicli
Elettroforesi in agarosio 1%
Amplicone atteso : 668 bp

Figura 21 – Amplificazione degli 8 campioni estratti alternativamente con kit Invisorb[®] e con Trizol[®], con primer per GAPDH

COX1 Intestino Cavallo

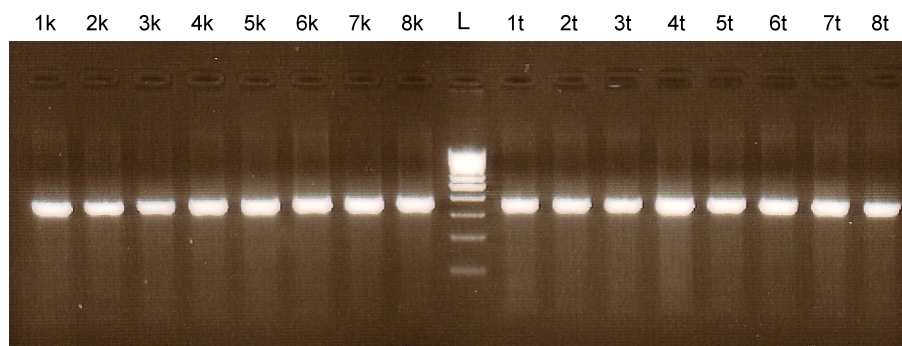


k = kit estrazione RNA Invitex
t = estrazione RNA con Trizol
L = DNA ladder 100 bp (4 ul)

Enzima: GoTaq Flexi Promega Italia
cDNA : 1,0 ul (75 ng)
T annealing : 56°C; 35 cicli
Elettroforesi in agarosio 1%
Amplicone atteso : 301 bp

Figura 22 – Amplificazione degli 8 campioni estratti alternativamente con kit Invisorb[®] e con Trizol[®], con primer per COX1

COX2 Intestino Cavallo



k = kit estrazione RNA Invitex
t = estrazione RNA con Trizol
L = DNA ladder 100 bp (4 ul)

Enzima: GoTaq Flexi Promega Italia
cDNA : 1,44 ul (100 ng)
T annealing : 56°C; 35 cicli
Elettroforesi in agarosio 2%
Amplicone atteso : 360 bp

Figura 23 – Amplificazione degli 8 campioni estratti alternativamente con kit Invisorb[®] e con Trizol[®], con primer per COX2

DISCUSSIONE

1. Effetti dei COX-inibitori sulla motilità intestinale (ileo) di cavallo

Per quanto riguarda lo studio dei meccanismi coinvolti nella regolazione fisiologica della motilità spontanea, l'uso di vari principi attivi ne ha dimostrato la natura miogena.

In particolare, poiché gli antagonisti delle neurochinine 1 e 2 hanno causato un rilasciamento della muscolatura e l'inibitore dell'NO sintasi (L-NAME) ha provocato un aumento del tono, è possibile pensare a un coinvolgimento di peptidi e NO nella regolazione dell'attività miogena.

Il fatto che la motilità spontanea dell'ileo fosse prevalentemente di natura miogena è supportato dal fatto che né il bloccante neuronale tetrodotossina (TTX), né l'atropina hanno indotto significative diminuzioni dell'attività contrattile .

La motilità indotta da stimolazione elettrica è invece risultata sensibile alla TTX e all'atropina, potendo così avanzare l'ipotesi di un coinvolgimento di neurotrasmettitori eccitatori, rilasciati dai nervi

intrinseci attraverso un meccanismo esocitotico, e quindi definirne la sua natura neurogena.

Per quanto riguarda l'effetto dei diversi farmaci saggiati sulla motilità dell'ileo, si è visto che la flunixinina meglumina (inibitore COX-1/COX-2) e il composto SC-560 (inibitore selettivo COX-1) hanno causato un'inibizione del tono basale, ma nessun effetto di rilievo sull'ampiezza dei picchi. A complicare ulteriormente il quadro, l'indometacina (inibitore non selettivo) ha invece rivelato una decisa attività stimolatoria sulla motilità spontanea.

I bloccanti selettivi della COX-2, celecoxib e i composti DUP-697 e NS-398, hanno causato un effetto inibitorio, sia sul tono basale sia sull'ampiezza delle contrazioni spontanee. Ciò potrebbe suggerire che le prostaglandine prodotte dall'attività della isoforma COX-2 svolgono un ruolo stimolatorio sulle funzioni motorie del piccolo intestino. Tuttavia, gli antagonisti dei recettori EP₁, EP₂ ed FP, su cui agiscono le PGE₂ e la PGF_{2α} endogene, di fatto non hanno indotto alcuna modificazione significativa della motilità. Inoltre, l'effetto dei bloccanti delle COX sulla motilità indotta dalla stimolazione elettrica non ha prodotto dati univoci fra i vari farmaci, suggerendo che la neurotrasmissione non viene significativamente influenzata.

Nel complesso, queste osservazioni tendono a minimizzare il ruolo delle prostaglandine prodotte dalla isoforma COX-1 nella motilità intestinale del cavallo, testimoniando piuttosto la presenza di attività aspecifiche dei farmaci utilizzati nello studio. Non si può escludere invece un ruolo della COX-2, anche se saranno necessari ulteriori esperimenti per chiarire se gli effetti dei composti inibitori selettivi di questa isoforma sono legati o meno all'azione delle prostaglandine.

L'indagine relativa all'espressione genica delle COX ha evidenziato la presenza dell'RNA messaggero relativo alle COX-2 a livello della mucosa e sottomucosa. E' noto infatti che uno stato infiammatorio, a livello intestinale come in altri tessuti dell'organismo, è associato alla over- espressione di tale enzima e che le prostaglandine derivanti dalla sua specifica attività sono direttamente responsabili dei sintomi legati alla flogosi. L'isoforma COX-1 viene fisiologicamente espressa in forma costitutiva a livello di ogni tessuto dell'organismo, rivestendo solitamente un ruolo protettivo a livello tissutale attraverso la sintesi di prostaglandine "buone", capaci cioè di favorire il normale trofismo e di regolare il flusso sanguigno.

La presenza di RNA messaggero codificante per la COX-1 è un dato comunemente riscontrato nel corso delle indagini di espressione

genica in condizioni basali; pertanto, il riscontro di questo enzima nei campioni da noi analizzati appare del tutto ovvio. L'indagine sui farmaci capaci di interferire con la sintesi o con l'effetto delle prostaglandine endogene sulla motilità non ha fornito riscontri univoci. Come dato generale, tali farmaci hanno dato effetti lievi, suggerendo che, nonostante siano presenti entrambe le isoforme COX-1 e COX-2, il ruolo delle prostaglandine endogene nel controllo della motilità nelle nostre condizioni sperimentali non sia particolarmente importante.

L'esame istologico dei campioni di tessuto ileale ha evidenziato segni di enterite catarrale cronica, giustificata dalla presenza di una moderata infiltrazione di granulociti eosinofili e linfomononucleati a livello degli strati mucosi e sottomucosi. Tale reperto potrebbe testimoniare il contatto dell'animale con agenti infestanti, che fatalmente possono attaccare animali che vivono allo stato brado, producendo stati infiammatori subclinici, rilevabili anche nel lungo termine. Infatti bisogna considerare che sono stati campionati animali che, pur se giudicati clinicamente sani, sono destinati alla macellazione. Solo l'analisi di campioni prelevati da animali

mantenuti in condizioni maggiormente controllate può dare l'esatta dimensione dello stato infiammatorio basale in questa specie. Tuttavia, il lieve stato infiammatorio riscontrato non coinvolge gli strati sottostanti la sottomucosa, quali il plesso mienterico e gli strati muscolari, permettendo di misurare la motilità dei preparati in condizioni di integrità del sistema contrattile e del sistema nervoso intrinseco.

Per quanto concerne le implicazioni cliniche dei farmaci antinfiammatori non steroidei testati in questo studio, con l'eccezione della flunixinina meglumina, soltanto gli inibitori selettivi della COX-2 sembrano rivestire un possibile ruolo terapeutico nelle malattie infiammatorie intestinali associate ad ipermotilità, considerato il loro effetto di inibizione sia sulle contrazioni toniche che fasiche.

Proprio per lo stesso motivo, tuttavia, si deve porre estrema cautela nei soggetti affetti da patologie intestinali caratterizzate da ipomotilità, al fine di evitare un ulteriore peggioramento del quadro clinico.

Tra i possibili futuri sviluppi, si allestiranno nuovi preparati per la caratterizzazione degli effetti delle prostaglandine sulla motilità digiuno-ileale, testando analoghi stabili delle prostaglandine e i

rispettivi antagonisti recettoriali. Sarebbe inoltre interessante caratterizzare l'effetto motorio dei COX-2 inibitori selettivi, quali il DUP-697 e il celecoxib o del FANS non selettivo indometacina, per quanto riguarda il meccanismo molecolare dell'attività contrattile. E' auspicabile inoltre l'utilizzo di campioni prelevati da animali affetti da patologie infiammatorie intestinali conclamate, dove il ruolo delle prostaglandine endogene dovrebbe essere maggiormente rilevante. Su tali tessuti, potrebbero essere più facilmente riscontrabili effetti di inibizione selettiva delle COX e/o dei recettori prostaglandinici. Inoltre, questi tessuti si prestano ad una misura quantitativa dell'espressione genica delle COX, per meglio definire l'esatto ruolo costitutivo o inducibile di ciascuna isoforma.

2. Effetti dei farmaci α_2 -adrenergici sulla motilità intestinale (digiuno) di cavallo

La caratterizzazione *in vitro* della motilità del digiuno di cavallo ha evidenziato una stretta somiglianza con quella osservata nell'ileo presentando caratteristiche sovrapponibili.

La motilità spontanea dei preparati di muscolatura circolare si presentava prevalentemente di natura miogena non colinergica e si è dimostrata non sensibile alla TTX e all'atropina, nelle nostre condizioni sperimentali. Inoltre, la diminuzione della motilità indotta dagli antagonisti delle neurochinine e l'aumento causato dall'L-NAME (inibitore dell'NO sintasi) sono indicativi di un coinvolgimento di neuropeptidi eccitatori e di ossido nitrico (NO) nel tono del muscolo liscio del digiuno.

Gli effetti inibitori degli α_2 -agonisti sulle contrazioni spontanee fasiche suggeriscono una localizzazione degli adrenocettori α_2 sulle cellule non neuronali.

I nostri risultati sembrano essere in disaccordo con uno studio condotto da altri autori (Malone *et al.*, 1996) nel quale si riporta un aumento dell'ampiezza delle contrazioni spontanee del muscolo liscio longitudinale del digiuno di cavallo, indotto dall'agonista selettivo α_2 UK 14304-18 e che tale effetto veniva inibito dalla TTX. Nello stesso studio, la clonidina si è dimostrata priva di qualsiasi effetto, mentre l'UK 14304-18 non ha avuto alcuna attività sui preparati di muscolo circolare (Malone *et al.*, 1996).

Un altro studio inoltre ha evidenziato come la noradrenalina aumenti la motilità in campioni di digiuno ed ileo di cavallo ed è stato

concluso che questo effetto era probabilmente mediato dagli α_2 adrenocettori (Murray *et al.*, 1997).

Al contrario, il nostro studio fornisce la prima evidenza di un'attività rilasciante da parte degli agonisti selettivi α_2 sulla motilità spontanea miogenica non colinergica del piccolo intestino di cavallo ed è compatibile con una localizzazione post sinaptica dei recettori α_2 . Una localizzazione di tali recettori sulle cellule muscolari lisce sembra tuttavia improbabile, non essendo gli agonisti testati in grado di inibire la contrazione indotta da carbacolo e KCl.

Anche se ci sono evidenze della presenza di recettori α_2 nel muscolo liscio del piccolo intestino di cavallo (Re *et al.*, 2001), senza ulteriori studi possiamo soltanto teorizzare una possibile localizzazione non neuronale di questi recettori. Non si può escludere, ad esempio, la presenza di recettori α_2 sulle cellule interstiziali del Cajal, le quali sembrano essere direttamente associate ai miociti dell'intestino dell'uomo, dove sembrerebbero agire come cellule pacemaker nell'attività miogena basale (Hansen, 2003; Koenig & Cote, 2006; Garcia-Lopez *et al.*, 2009). Inoltre, è già stato visto come tali cellule siano dotate di recettori per neurotrasmettitori sia di natura eccitatoria che inibitoria come l'acetilcolina, le tachichinine, l'NO ed il peptide

intestinale vasoattivo (VIP) (Kunze & Furness, 1999; Camilleri, 2001).

Nel nostro studio, le contrazioni indotte dalla stimolazione elettrica si sono dimostrate TTX e ω -conotossina-sensibili, suggerendo il coinvolgimento di neurotrasmettitori eccitatori rilasciati da nervi intrinseci con meccanismo di tipo esocitotico. Inoltre, poiché l'atropina ha inibito tali contrazioni, si può stabilire che anche l'acetilcolina sia coinvolta come neurotrasmettitore.

Per quanto riguarda i dati ottenuti con i diversi farmaci α_2 -adrenergici saggiati nel presente studio, si è visto che essi causano un effetto costante di inibizione delle contrazioni sia spontanee sia indotte dalla stimolazione elettrica. Tra i diversi farmaci testati, si sono evidenziate significative differenze di potenza; la medetomidina è risultato infatti il più attivo. La motilità spontanea è risultata influenzata a concentrazioni di agonista più elevate di quelle richieste per produrre gli effetti presinaptici. Questa osservazione è quindi indicativa di un ruolo minore dei recettori α_2 a localizzazione extraneuronale nella modulazione della risposta contrattile a livello muscolare.

L'azione dei farmaci agonisti dei recettori α_2 -adrenergici sulla contrazione neurogena colinergica è indicativa della presenza di

eterocettori inibitori, localizzati sui neuroni colinergici del plesso mienterico. L'attivazione di questi recettori è verosimilmente associata ad una riduzione della liberazione di acetilcolina, un evento ben noto e caratterizzato in preparati intestinali di altre specie (Surprenant & North, 1988).

Futuri sviluppi dello studio saranno orientati verso la misurazione diretta della liberazione di acetilcolina dai preparati, al fine di dimostrare in modo più diretto un effetto inibitorio a questo livello.

Gli antagonisti α_2 -adrenergici yoimbina e l'atipamezolo, somministrati da soli, fino a concentrazioni 100 volte superiori a quelle normalmente attive nei comuni studi *in vitro*, non hanno modificato nè la motilità spontanea nè quella stimolata elettricamente; questo dato permette di escludere un tono basale dei ligandi endogeni dei recettori α_2 -adrenergici.

Pur se appartenenti alla stessa classe farmacologica, sia la yoimbina che l'atipamezolo hanno mostrato interazioni non omogenee con gli agonisti studiati. In particolare, l'effetto della medetomidina non sembra antagonizzato dall'atipamezolo, mentre la yoimbina causa una sorta di antagonismo "non lineare", le cui caratteristiche non sembrano accordarsi con i canoni dell'antagonismo competitivo. Diversamente, l'atipamezolo antagonizza sia la xilazina sia la

detomidina, mentre la yohimbina antagonizza in modo significativo solo la detomidina.

Tali anomalie nell'antagonismo da parte dei farmaci α_2 -bloccanti suggerisce una complessità di meccanismi coinvolti che vanno oltre la semplice interazione competitiva a livello recettoriale.

Sembra probabile che tali anomalie di antagonismo siano dovute almeno in parte al coinvolgimento di diversi sottotipi recettoriali α_2 o addirittura al legame con recettori di tipo differente.

Nell'ambito dei recettori α_2 , sono noti diversi sottotipi recettoriali, riconosciuti come: α_{2a} , α_{2b} , α_{2c} , α_{2d} , simili dal punto di vista molecolare e degli effetti mediati, ma diversi per quanto concerne la specificità dei vari ligandi. Non essendo noti i possibili sottotipi recettoriali α_2 nell'intestino di cavallo, e neppure l'eventuale selettività dei farmaci testati per tali sottotipi in questa specie animale, è difficile trarre conclusioni definitive circa la natura dei recettori coinvolti. Uno studio esteso ad altri ligandi specifici potrebbe dare indicazioni più complete circa il coinvolgimento di eventuali sottotipi. Infine, non va dimenticata la possibile partecipazione di recettori delle "imidazoline", un sistema recettoriale simile ai recettori α_2 dal punto di vista degli effetti mediati, ma distinto dal punto di vista farmacologico. Tale sistema recettoriale riconosce come ligandi

diverse molecole a struttura imidazolica, inclusi molti dei ligandi ritenuti specifici per i recettori α_2 , quali clonidina, detomidina, medetomidina e yoimbina (Khan *et al*, 1999).

I recettori delle imidazoline sono noti infatti per mediare alcuni degli effetti terapeutici di farmaci α_2 -agonisti, quali quelli della clonidina in ambito cardiovascolare e sembrano essere coinvolti anche a livello gastrointestinale (Head GH *et al*, 1998).

Non esistono studi specifici su questi recettori nel cavallo, e quindi non è al momento possibile provare un loro eventuale coinvolgimento nell'effetto dei farmaci studiati.

Il comportamento anomalo degli antagonisti, i quali sembrano maggiormente attivi alla concentrazione più bassa, potrebbe essere dovuto anche ad un'interazione con recettori α_2 presinaptici, dotati di minore affinità, posti su terminazioni inibitorie di natura simpatica.

La mancanza di un antagonismo di natura concentrazione-dipendente dimostrato sia dalla yoimbina che dall'atipamezolo nei confronti di tutti gli agonisti testati necessita di ulteriori approfondimenti; è comunque possibile anche che alla base di questo fenomeno ci possa essere un fenomeno di sensitizzazione dei recettori α_2 , causato dalla concentrazione più alta di antagonista, sebbene una upregulation dei recettori richieda solitamente un periodo di tempo maggiore per avere

luogo e per poter manifestare i suoi effetti.

Per quanto riguarda le possibili implicazioni cliniche relative agli effetti degli α_2 -agonisti sull'attività del piccolo intestino di cavallo, i dati ottenuti suggeriscono un potenziale effetto benefico di tali farmaci in alcune malattie intestinali associate ad ipermotilità o spasmi del muscolo liscio, come ad esempio nelle coliche. In alcuni studi *in vivo*, è stato visto che la xilazina esercitava un effetto rilasciante quando somministrata per via endovenosa (Adams *et al.*, 1984) e che l'antagonista yohimbina si dimostrava più efficace del propranololo (β -bloccante) nella depressione dell'attività motoria gastrica, in un modello sperimentale di ileo post operatorio (Gerring & Hunt, 1986).

Si deve infine precisare che è sempre molto difficile correlare dati ottenuti *in vitro* con effetti osservati *in vivo*, ma sembra tuttavia che gli α_2 -agonisti possano essere usati in terapia nei disordini addominali associati a spasmi e dolore nel cavallo, proprio per la loro attività miorilassante sul piccolo intestino. D'altro canto, per i medesimi motivi, si dovrebbe porre particolare attenzione quando tali farmaci vengono somministrati a soggetti affetti da ipomotilità intestinale.

Poiché gli α_2 -agonisti sono largamente usati in fase di premedicazione, non si dovrebbe escludere un possibile ruolo aggravante degli α_2 -

agonisti nella patogenesi dell'ileo post-operatorio. In tali condizioni, soprattutto se presente uno spiccato tono adrenergico, è consigliabile invece l'uso di un α_2 -antagonista.

Per concludere, questo studio sembra confermare la notevole complessità del controllo della motilità intestinale e, in particolare, la difficoltà nell'interpretazione dei dati relativi agli α_2 -adrenocettori, che, come è noto, sono in grado di modulare il rilascio di numerosi neurotrasmettitori spesso dotati di effetti opposti sull'attività del muscolo liscio.

Saranno quindi necessari ulteriori esperimenti per approfondire i numerosi aspetti di questo campo della farmacologia, così come una maggiore disponibilità di composti selettivi per i diversi sottotipi recettoriali α_2 .

Infine, il prossimo obiettivo del nostro studio sugli effetti dei farmaci analgesici sulla motilità intestinale in vitro del cavallo sarà la valutazione dell'effetto degli oppioidi, considerando come siano ancora carenti gli studi condotti con tali farmaci in questo complesso campo della farmacologia.

BIBLIOGRAFIA

- Adams HR (1999). Farmaci adrenomimetici e antiadrenergici. In “Farmacologia e terapeutica veterinaria”, Adams HR (Ed.), 2^a edizione, EMSI, Roma; 99-130.
- Avery RA, Franowics JS, Studholme C, Van Dick CH and Arnsten AF (2000). The α_{2A} -adrenoreceptor agonist, guanefacine, increases regional cerebral blood flow in dorsolateral prefrontal cortex of monkeys performing a spatial working memory task. *Neuropsychopharmacology*; **23**: 240-249.
- Argenzio RA (2002). Motilità gastrointestinale. In: “Fisiologia degli animali domestici”, Swenson M J, Reece W O (Eds.), Idelson-Gnocchi, Napoli; 368-372.
- Barone R, (1996). Apparato digerente. In: "Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Volume 3: splancnologia, apparato digerente e respiratorio", Bortolami R (Ed.), Ed. Agricole, Bologna; 333-357.
- Beghelli V (2000). Apparecchio Digerente. In: "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia", Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, Debenedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S,

- Nuvoli P, Piazza R (Eds.), 2a edizione, UTET, Torino; 552-553.
- Belloli C, Arioli F, Beretta C, Madonna M (1994). *In vitro* effects of tachykinins on the smooth musculature of horse gut. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*; **17** (5): 379-383.
 - Belloli C, Re G, Arioli F, Badino P, Carcano R, Odore R, Girardi C, Beretta C, (1997). Differences between longitudinal and circular smooth muscle in β adrenergic control of motility of isolated equine ileum. *Am. J. Vet. Res.*; **58** (12): 1422-1426.
 - Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Herman AG (1993). Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. *Gastroenterology*; **104**: 690-697.
 - Bond WS (1986). Psychiatric indication for clonidine: the neuropharmacologic and clinical basis. *J. Clin. Psychopharmacol.*; **6**: 81-87.
 - Bravo EL, Taranzi RC, Fouad RM, Vidt DG and Gifford RW (1981). The clonidine suppression test: a useful aid in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clev. Clin. J. Med.*; **305**: 623-626.
 - Breyer MD, Breyer RM (2000). Prostaglandin receptors. Their role in the regulation of renal function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*; **9**: 23-29.

- Brown SA (1989). Renal effects of non steroidal anti-inflammatory drugs. In: "Current Veterinary Therapy X", Kirk RW (Ed.), Saunders, Philadelphia; 1158-1161.
- Burns GA, Cummings JF (1993). Neuropeptide distributions in the colon, cecum, and jejunum of the horse. *Anat. Rec.*; **236**: 341-350.
- Bylund DB (1985). Heterogeneity of alpha-2-adrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*; **22**: 235-243.
- Bylund DB (1988). Alpha-2-adrenergic receptors: a historical prospective. In: "The alpha-2-adrenergic receptors", Limbird L (Ed.), Clifton, NJ, USA; 1-13.
- Bylund DB (1989). Subtypes of α_2 -adrenoreceptors: a pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol. Sci.*; **9**: 356-361.
- Caldwell FJ, Mueller E, Lynn RC, Budsberg SC (2004). Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. *Am. J. Vet. Res.*; **65** (3): 271-276.
- Campbell NB, Jones SL, Blikslager AT (2002). The effects of cyclooxygenase inhibitors on bile-injured and normal equine colon. *Eq. Vet. J.*; **34** (5): 493-498.
- Cao C, Matsumara K, Watanabe Y (1997). Involvement of

cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the brain. *Am. J. Physiol.*; **272**: 1712-1725.

- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipiretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **99**: 13926-13931.

- Chang EB, Fedorak RN and Field M (1986). Experimental diabetic diarrhea in rats: intestinal, mucosal denervation hypersensitivity and treatment with clonidine. *Gastroenterology*; **91**: 564-569.

- Code CF, Marlett JA (1975). The interdigestive myo-electric complex of the stomach and small bowel of dogs. *J. Physiol*; **246**: 289-309.

- Colten HR & Krause JE (1997). Pulmonary inflammation: a balancing in act. *N. Engl. J. Med.*; **336**: 1094-1096.

- Copeland RA, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto DJ, Pick S, Trzaskos J (1994). Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandins G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**: 11202-11206.

- Coruzzi G, Menozzi A, Dobrilla G (2004). Novel non-steroidal anti-inflammatory drugs: what we have learned from animal studies. *Current Drug Target-Inflammation & Allergy*; 3: 41-59.
- Dannhardt G, Werner K (2001). Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.*; **36**: 109-126.
- Davey M (1987). Mechanism of alpha blockade for blood pressure control. *Am. J. Cardiol.*; **59**: 18G-28G.
- Davies JV (1989). Normal intestinal motility. *Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.*; **5** (2): 271-281.
- Dibona GF (1986). Prostaglandins and non steroidal anti-inflammatory drugs: effect on renal haemodynamics. *Am. J. Med.*; **80** (Suppl. 1A): 12- 21.
- Dorigo P (2003). I farmaci nella pratica anestetica e nell'analgesia. In: "I farmaci in terapia", Dorigo P (Ed.), CEDAM, Padova; 390-414.
- Dunn MJ (1984). Clinical effects of prostaglandins and non steroidal anti-inflammatory drugs: effect on renal haemodynamics. *Am. J. Med.*; **80** (Suppl. 1A): 12-21.
- Dunn MJ (1984). Clinical effects of prostaglandins in renal disease. *Hosp. Pract.*; **19**: 99-113.
- Eberhart CE, Dubois RN (1995). Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*; **109**: 285-301.

- Erspamer V (1971). Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. *Ann. Rev. Pharmacol.*; **11**: 327-350.
- Fedorak RN, Field M and Chang EB (1985). Treatment of diabetic diarrhea with clonidine. *Ann. Intern. Med.*; **102**: 197-199.
- Fosslien E (2000). Biochemistry of cyclooxygenase (COX-2) inhibitions and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*; **37**: 431-502.
- Freeman D (1996). Small intestine. In: “Equine Surgery”, Auer J, Stick JA (Eds.), WB Saunders, Philadelphia; 232–256.
- Gans KR, Galbraith W, Roman RJ, Haber SB, Kerr JS, Schmidt WK, Smith C, Hewes WE, Ackerman NR (1990). Anti-inflammatory and safety profile of DUP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *J. Pharm. Exp. Ther.*; **254**: 180-186.
- Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, Kolboldt C, Rangwala SH, Isakson PC, Seibert K (1995). Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem. J.*; **305**: 479-484.
- Glassman AH, Stetner F, Walsh BT, Raizman PS, Fleiss JL, Cooper TB and Coverly LS (1988). Heavy smokers, smoking cessation and clonidine. Result of double-blind, randomized trial. *J.A.M.A.*; **259**: 2863-2866.

- Gold MS, Redmond DE and Kleber HD (1978). Clonidine blocks acute opiate withdrawal symptoms. *Lancet*; **2**: 599-602.
- Goyal RK, Hirano I (1996). The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.*; **334**: 1106–1115.
- Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM, Breyer M (1997). Cloning, expression and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am. J. Physiol.*; **273**: 18-26.
- Guyton A, Hall J (2000). General principles of gastrointestinal function - motility, nervous control, and blood circulation. In: “Textbook of Medical Physiology”, Guyton A, (Ed.), 10a edizione, WB Saunders, Philadelphia; 718–727.
- Hamilton CA (1992). The role of imidazoline receptors in blood pressure regulation. *Pharmacol. Ther.*; **54**: 231-248.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, DuBois RN, Breyer MD (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increase with salt restriction. *J. Clin. Invest.*; **94**: 2504-2510.
- Harrison JK, Pearson WR and Lynch KR (1991). Molecular characterization of α_1 and α_2 -adrenoreceptors. *Trends Pharmacol. Sci.*; **266**: 10470-10478.

- Head GA, Chan CKS, Burke SL (1998). Relationship between imidazoline and α 2-adrenoceptors involved in the sympatho-inhibitory actions of centrally acting antihypertensive agents. *J Auton. Nerv. Sys.*; **72**: 163-169.
- Holzer, P, Holzer- Petsche U., (1997). Tachyknins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol. Ther.*, **73**, 173-217.
- Hudson NP, Pearson GT, Kitamura N, Mayhew IG (1999). An immunohistochemical study of interstitial cells of Cajal (ICC) in the equine gastrointestinal tract. *Res Vet Sci.*; **66**: 265–271.
- Hunt JM, Gerring EL (1985). The effect of prostaglandin E1 on motility of the equine gut. *J. vet. Pharmacol. Ther.*; **8** (2): 165-73.
- Insel AP (1997). Agenti analgesici-antipiretici e antinfiammatori. In: "Le basi farmacologiche della terapia", Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG (Eds.), 9a edizione, Mc Graw-Hill, New York; 611-634.
- Jones DA, Carlton DD, Mc Intire TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1993). Molecular cloning of human prostaglandin in response to cytokines. *J. Biol. Chem.*; **268**: 9049-9054.
- Kay-Mugford P, Benn SJ, LaMarre J, Conlon P (2000). *In vitro* effects of non steroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase

- activity in dogs. *Am. J. Vet. Res.*; **61** (7): 802-810.
- Kallings P (1993). Non steroidal anti-inflammatory drugs. *Vet. Clin. North Am. Eq. Pract.*; **9** (3): 523-540.
 - Kenakin TP (1987). *Pharmacological analysis of drug-receptor interaction*. Raven Press, NY, U.S.A.
 - Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM (1999). Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. *Anaesthesia*; **54**: 146-165.
 - King JN, Gerring EL (1988). Actions of the novel gastrointestinal prokinetic agent cisapride on equine bowel motility. *J. vet. Pharmacol. Ther.*; **11** (4): 314-321.
 - King JN, Gerring EL (1991). The action of low dose endotoxin on equine bowel motility. *Equine Vet. J.*; **23**: 11-17.
 - Kobinger W. (1978). Central α -adrenergic systems as targets for hypotensive drugs. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*; **81**: 39-100.
 - Koenig J, Cote N (2006). Equine gastrointestinal motility – ileus and pharmacological modification. *Can. Vet. J.*; **47**: 551-559.
 - Kore AM (1990). Toxicology of non steroidal anti-inflammatory drugs. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.*; **20** (2): 418-430.
 - Langer SZ, Cavero I and Massingham R (1980). Recent development in noradrenergic neurotransmission and its relevance to

the mechanism of action of certain antihypertensive agents.

Hypertension; **2**: 372-382.

- Lester GD, Bolton JR, Thurgate SM (1992). Computer-based collection and analysis of myoelectric activity of the intestine in horses. *Am. J. Vet. Res.*; **53**: 1548–1552.

- Lester GD, Merritt AM, Neuwirth L, Vetro-Widenhouse T, Steible C, Rice B (1998). Effect of α_2 adrenergic, and non steroidal anti-inflammatory drugs on myoelectric activity of ileum, cecum, and right ventral colon and on cecal emptying of radiolabeled markers in clinically normal ponies. *Am. J. Vet. Res.*; **59** (3): 320-327.

- Lester G (2002). Gastrointestinal ileus. In: “Large Animal Internal Medicine”, Smith B (Ed.) Mosby, St. Louis; 674–679.

- Liles JH, Flecknell PA (1992). The use of non steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. *Lab. Anim.*; **26**: 241-255.

- Lloyd E D (1999). Farmacologia veterinaria: introduzione allo studio della disciplina. In “Farmacologia e terapeutica veterinaria”, Adams H R (Ed.), 2a edizione, EMSI, Roma; 6.

- Lowental DT, Matzek KM and MacGregor TR (1988). Clinical pharmacokinetics of clonidine. *Clin. Pharmacokinet.*; **14**: 287-310.

- Maggio JE (1988). Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosc.*; **11**: 13-28.

- Malmberg AB, Yaksh TL (1992). Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science*; **257**: 1276-1279.
- Malone ED, Brown DR, Trent AM, Turner TA (1996). Influence of adrenergic and cholinergic mediators on the equine jejunum *in vitro*. *Am. J. Vet. Res.*; **57** (6): 884-90.
- Malone ED, Kannan MS, Brown DR, Turner TA, Trent AM (1999). Adrenergic, cholinergic, and nonadrenergic-noncholinergic intrinsic innervation of the jejunum in horses. *Am. J. Vet. Res.*; **60** (7): 898-904.
- Malone ED, Kannan MS, Brown DR (2000). Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.*; **61**: 1178–1184.
- Marchese M (2005). Effetto dei FANS sulla motilità intestinale "*in vitro*" del cavallo. Tesi di Laurea, Facoltà di Medicina Veterinaria, Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria, Relatore Prof. Bertini S.
- Masferrer JL, Zweifel B, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**: 3228-3232.
- Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P (1998). Isolation and

characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.*; **263**: 3350- 3353.

- Merritt AM, Campbell-Thompson ML, Lowrey S (1989). Effect of butorphanol on equine antroduodenal motility. *Equine Vet J Suppl.*; Suppl: 21–23.

- Mitchell JA, Belvisi M, Akarasereenont P, Robbins R, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR (1994). Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.*; **113**: 1008-1014.

- Moncada S, Palmer RM and Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*; **43**: 109-142.

- Moses VS, Bertone AL (2002). Non steroidal anti-inflammatory drugs. *Vet. Clin. Eq.*; **18**: 21-37.

- Mugelli A, Bianchi C, Beani L (1989). Metodiche sperimentali in vivo e in vitro. In “Farmacologia e tossicologia sperimentale”, Dolara P, Franconi F, Mugelli A (Eds.), Pitagora Editrice, Bologna; 373-374.

- Murray A, Pearson GT, Cottrell DF (1997). *In vitro* responses to noradrenaline of small intestine taken from normal and grass sickness affected horses. *Vet. Res. Commun.*; **21**: 571-585.

- Nathan C (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.*; **100**: 2417-2423.
- Parker M & Atkinson J (1982). Withdrawal syndromes following cessation of treatment with antihypertensive drugs. *Gen. Pharmacol.*; **13**: 79-85.
- Pernow B (1983). Substance P. *Pharmacol. Rev.*; **35**: 85-41.
- Pinto DJ, Copeland RA, Covington MB, Pitts WJ, Batt DG, Orwat MJ, Lam GN, Josho A, Chan YC, Wang S, Tzraskos JM, Magolda RL, Kornhauser DM (1996). Chemistry and pharmacokinetics of diarylthiophenes and terphenyls as selective COX-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; **6**: 2907-2912.
- Poli E., Pozzoli C., Coruzzi G., Bertaccini G., (1994). Signal transducing mechanisms coupled to histamine H3 receptors and alpha-2 adrenoreceptors in the guinea pig duodenum: possible involvement of N-type Ca⁺⁺ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 788-794.
- Pypendop B (2007). Gli alfa-2 adrenocettori agonisti nel cane e nel gatto. 50° Congresso SCIVAC, Rimini, 1-3 giugno 2007.
- Rakestraw PC, Snyder JR, Woliner MJ, Sanders KM, Shuttleworth CW (1996). Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in equine ileum. *Am. J. Vet. Res.*; **57** (8): 1206-1213.
- Randall D (1999). Assunzione di energia: alimentazione, digestione

e metabolismo. In: “Fisiologia Animale”, Randall D, Burggren W, French K (Eds.), 4a edizione, Zanichelli, Bologna; 752-753.

- Re G, Belloli C, Badino P, Arioli F, Novelli A, Girardi C, Beretta C (1997). Identification of β -adrenergic receptor subtypes mediating relaxation in isolated equine ileum. *Am. J. Vet. Res.*; **58** (6): 621-5.

- Re G, Badino P, Odore R, Galaverna D, Girardi C (2001). Characterization of α -adrenoceptor subtypes in smooth muscle of equine ileum. *Am. J. Vet. Res.*; **62** (9): 1370-1374.

- Regoli D, Drapeau G, Dion S, Couture R (1988). New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol. Sci.*; **9**: 290-295.

- Reid AM, Titchen DA (1988). Gastric electromyographic activity in the milk-fed lamb. *J. Physiol.*; **396**: 25-39.

- Riccardi C (2005). Farmaci della infiammazione. In: “Farmacologia-Principi di base ed applicazioni terapeutiche”, Cuomo V, Riccardi C (Eds.), Edizioni Minerva Medica, Torino; 524-536.

-Rosen GD, Birkenmeier TM, Raz A, Holtzman MJ (1989). Identification of a cyclooxygenase related gene and its potential role in prostaglandin formation. *Biochem. Biophys. Commun.*; **164**: 1358-1356.

-Ross MW, Cullen KK, Rutkowski JA (1990). Myoelectric activity of

the ileum, cecum, and right ventral colon in ponies during interdigestive, nonfeeding, and digestive periods. *Am J Vet Res.*; **51**: 561–566.

-Sasaki N, Yoshinara T (1999). The effect of motilin on the regulation mechanism of intestinal motility in conscious horses. *J. Vet. Med. Sci.*; **61** (2): 167-170.

-Sellers AF, Lowe JE, Cummings JF (1985). Trials of serotonin, substance P and α_2 -adrenergic receptor effects on the equine large colon. *Corn. Vet.*; **75** (2): 319-323.

- Sellers AF, Lowe JE (1986). Review of large intestinal motility and mechanism of impaction in the horse. *Eq. Vet. J.*; **18** (4): 261-263.

- Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y , Erikson RL (1989). Identification of a phorbol ester repressible v-rsc-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **86**: 1178-1182.

- Smith WL, Dewitt DL (1995). Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to non steroidal anti-inflammatory drugs. *Semin. Nephrol.*; **15**: 179-194.

- Stillman MT & Schlesinger PA (1990). Non steroidal anti-inflammatory drug nephrotoxicity. *Arch. Intern. Med.*; **150**: 268-270.

Stokes JB (1979). Effect of PGE₂ on chloride transport across the

- rabbit thick ascending limb of Henle. *J. Clin. Invest.*; **64**: 495-502.
- Surprenant A, North RA (1988). Mechanism of synaptic inhibition by noradrenaline acting at alpha₂-adrenoceptors. *Proc. R. Soc. Lond.*: **234**: 85-114.
 - Tibirica E, Feldman J, Mermet C, Gonon F and Bousquet P (1991). An imidazoline-specific mechanism for the hypotensive effect of the clonidine: a study with yohimbine and idazoxan. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*; **218**: 435-443.
 - Timmermans PBMWM & Van Ziwieten PA (1982). Alpha-2-adrenoreceptors: classification, localization, mechanisms and targets for drugs. *J. Med. Chem.*; **25**: 1389-1401.
 - Vane J, Botting R (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*; **1**: 89-96.
 - Van Hoogmoed LM, Rakestraw C, Snyder JR, Harmon FA (1999). *In vitro* effects of non steroidal anti-inflammatory agents and prostaglandins I₂, E₂, and F_{2α} on contractility of taenia of the large colon of horses. *Am. J. Vet. Res.*; **60** (8): 1004-1009.
 - Van Hoogmoed LM, Rakestraw PC, Snyder JR, Harmon FA (2000). Evaluation of nitric oxide as an inhibitory neurotransmitter in the equine ventral colon. *Am. J. Vet. Res.*; **61** (1): 64-68.
 - Van Hoogmoed LM, Snyder JR, Harmon FA (2000). *In vitro*

investigation of the effect of prostaglandins and non steroidal anti-inflammatory drugs on contractile activity of the equine smooth muscle of the dorsal colon, ventral colon and pelvic flexure. *Am. J. Vet. Res.*; **61** (10): 1259-1266.

- Van Hoogmoed LM, Harmon FA, Stanley S, White J, Snyder J (2002). *In vitro* investigation of the interaction between nitric oxide and cyclooxygenase activity in equine ventral colon smooth muscle. *Eq. Vet. J.*; **34** (5): 510-515.

- Van Rossum JM (1963). Cumulative dose-response curves. Techniques for making the dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*; **143**: 299-330.

- Van Zwieten PA (1988). Antihypertensive drugs interacting with α and β -adrenoreceptors: a review of basic pharmacology. *Drugs*; (Suppl.) **35** ; **6**: 6-19.

- Venturini CM, Isakson P , Needleman P (1998). Non steroidal anti-inflammatory drug-induced renal failure: a brief review of the role of cyclooxygenase isoforms. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*; **7**: 79-82.

- Wagner W, Khanna P, Furt DE (2006). Agenti antinfiammatori non steroidei; farmaci antireumatici in grado di modificare il decorso della malattia; antidolorifici non oppioidi e farmaci usati nella gotta. In:

“Farmacologia generale e clinica”, Katzung BG (Ed.), Ed. Piccin, Padova; 576.

- Wang R, Macmillan LB, Fremeau RT, Magnuson MA, Linder L and Limbird LE (1996). Expression of α_2 -adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information imparted by 3kb of 5' regulatory sequence for the α_2A -AR receptor gene in transgenic animals. *Neuroscience*; **74**: 199-218.

- Weiss R, Abel D, Scholtysik G, Straub R, Mevissen M (2002). 5-Hydroxytryptamine mediated contractions in isolated preparations of equine ileum and pelvic flexure: pharmacological characterization of a new 5-HT₄ agonist. *J. vet. Pharmacol. Ther.*; **25**: 49-58.

- Zimmerman HJ (1981). Effects of aspirin and acetaminophen on the liver. *Arch. Intern. Med.*; **150**: 268-270.