



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Farmacologia e Tossicologia sperimentali

XXVI Ciclo

Studio del ruolo del sistema serotonergico in un
modello acuto murino di Morbo di Crohn

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli

Tutor:

Elisabetta Barocelli

Simona Bertoni

Dottorando:

Alberto Rapalli

Triennio Accademico 2010/2013

Indice

INTRODUZIONE	pag 6
<i>Cenni anatmici</i>	<i>pag 6</i>
<i>Il sistema nervoso enterico (SNE)</i>	<i>pag 11</i>
<i>Il sistema immunitario intestinale</i>	<i>pag 14</i>
<i>Inflammatory Bowel Disease</i>	<i>pag 20</i>
<i>Morbo di Crohn (CD)</i>	<i>pag 23</i>
Patogenesi	pag 24
Sintomatologia	pag 26
Caratteristiche istologiche	pag 28
Caratteristiche dell'infiammazione	pag 29
Modelli per lo studio della patologia	pag 32
Terapia farmacologica	pag 33
Trattamento chirurgico	pag 35
<i>La serotonina (5-HT)</i>	<i>pag 36</i>
Recettore 5-HT ₁	pag 38
Recettore 5-HT ₂	pag 38
Recettore 5-HT ₃	pag 39
Recettore 5-HT ₄	pag 39
Recettore 5-HT ₅	pag 40
Recettore 5-HT ₆	pag 40
Recettore 5-HT ₇	pag 41
<i>La serotonina ed il tratto gastrointestinale</i>	<i>pag 41</i>
<i>La serotonina ed il sistema immunitario</i>	<i>pag 43</i>
<i>La serotonina e le IBD</i>	<i>pag 44</i>

SCOPO DELLA RICERCA (I)	pag 46
PROTOCOLLO SPERIMENTALE (I)	pag 47
RISULTATI (I)	pag 48
<i>Onset della patologia</i>	<i>pag 48</i>
<i>Parametri morfologici</i>	<i>pag 50</i>
<i>Parametri infiammatori locali e sistemici</i>	<i>pag 55</i>
<i>Citochine coliche e plasmatiche</i>	<i>pag 60</i>
<i>Mediatori dell'infiammazione</i>	<i>pag 67</i>
CONCLUSIONI (I)	pag 71
SCOPO DELLA RICERCA (II)	pag 76
PROTOCOLLO SPERIMENTALE (II)	pag 77
RISULTATI (II)	pag 78
<i>Onset della patologia</i>	<i>pag 78</i>
<i>Parametri morfologici</i>	<i>pag 79</i>
<i>Parametri infiammatori locali e sistemici</i>	<i>pag 84</i>
<i>Mortalità</i>	<i>pag 88</i>
<i>Citochine coliche e plasmatiche</i>	<i>pag 89</i>
<i>Attivazione immunitaria, sopravvivenza e rigenerazione tissutale</i>	<i>pag 96</i>
CONCLUSIONI (II)	pag 100
MATERIALE E METODI	pag 105
<i>Animali e protocollo sperimentale</i>	<i>pag 105</i>
<i>Parametri analizzati</i>	<i>pag 107</i>
Disease activity index (DAI)	<i>pag 108</i>

Spessore intestinale	pag 108
Macroscopical Score (MS)	pag 109
Edema colico ed epatico	pag 110
MPO colica e polmonare	pag 110
Citochine tissutali	pag 111
Citochine plasmatiche	pag 112
Nitriti plasmatici	pag 112
Serotonina colica	pag 113
Sostanza P colica	pag 114
Livelli tissutali di CD68, TLR2, Caspase 3 e HSP70	pag 114
<i>Analisi dei dati</i>	<i>pag 115</i>
<i>Reagenti chimici</i>	<i>pag 115</i>

BIBLIOGRAFIA

pag 117

INTRODUZIONE

CENNI ANATOMICI

L'intestino è l'organo deputato all'assorbimento dei nutrienti e dell'acqua introdotti tramite la dieta ed all'escrezione delle sostanze indigerite. È contenuto all'interno del peritoneo viscerale, che delimita la parete addominale; il rivestimento peritoneale secerne continuamente un liquido acquoso, chiamato liquor peritoneale, che lubrifica gli organi in esso contenuti. Gli organi dell'apparato digerente sono mantenuti nella loro posizione tramite i mesenterici, lamina sierose a doppia parete, che impediscono l'aggrovigliamento del tratto gastrointestinale durante i movimenti digestivi o in seguito ad improvvisi cambiamenti di posizione. Inoltre, il tessuto connettivo lasso presente fra le superfici mesoteliali costituisce la via di entrata ed uscita di vasi sanguigni, linfatici e delle terminazioni nervose agli/dagli organi. La parte inferiore dell'intestino tenue è sospesa da una spessa lamina peritoneale chiamata mesentere, il mesocolon è il meso del colon, mentre il colon trasverso e il colon sigmoideo sono sostenuti rispettivamente dal mesocolon trasverso e dal mesocolon sigmoideo. L'intestino è diviso dal punto di vista anatomico e funzionale in due porzioni: l'intestino tenue e crasso.

L'intestino tenue è la porzione più orale dell'intestino, è adibito alla digestione delle sostanze nutrienti introdotte ed al loro assorbimento (circa il 90% dell'assorbimento delle sostanze nutritive avviene a questo livello). La sua lunghezza massima, nell'uomo, è di circa 6 metri, con un diametro che passa dai 4 cm in prossimità dello stomaco a 2.5 cm a

livello della giunzione con l'intestino crasso. Riceve l'innervazione sia dalla sezione parasimpatica tramite il nervo vago, sia dalla sezione simpatica ad opera dei rami dei gangli superiori. L'irrorazione sanguigna è garantita dalle arterie e vene mesenteriche superiori. L'intestino tenue è a sua volta divisibile in tre porzioni:

- *Duodeno*: è il tratto più corto (25 cm circa) e più largo dell'intestino tenue. Ha inizio subito dopo lo sfintere pilorico, che regola l'arrivo del chimo dallo stomaco. A livello della lamina propria sono presenti numerose ghiandole esocrine che secernono grandi quantità di muco necessario proteggere l'epitelio duodenale dall'acidità del contenuto gastrico. Le secrezioni epatiche e pancreatiche sono riversate nel lume duodenale rispettivamente tramite il dotto coledoco ed il dotto pancreatico, fatti confluire in un compartimento chiamato ampolla duodenale o ampolla epatopancreatica.
- *Digiuno*: una curvatura improvvisa segna il confine fra duodeno e digiuno. Questa seconda porzione è lunga circa 2.5 m e costituisce il tratto di intestino nel quale avviene la maggior parte dei processi digestivi e di assorbimento. Presenta pliche e villi molto evidenti, al fine di favorire l'attività assorbente.
- *Ileo*: è il tratto più lungo, con una lunghezza media di circa 3.5 m. Termina a livello di uno sfintere, la valvola ileocecale, che controlla il flusso di materiale dall'ileo al cieco. Presenta pliche e villi meno sviluppati rispetto al digiuno, poiché la maggior parte dell'assorbimento dei nutrienti è già avvenuto. Nell'ileo sono presenti ammassi di tessuto linfoide, detti noduli linfatici aggregati o placche di Peyer, particolarmente numerose nei pressi della giunzione ileocecale, punto di separazione con l'intestino crasso

sede di un'abbondante microflora commensale.

L'intestino crasso inizia dopo il tratto terminale dell'ileo e si conclude a livello dell'ano. È lungo in media 1.5 m e largo 7.5 cm. Le sue funzioni principali sono il riassorbimento di acqua ed elettroliti, con conseguente compattazione delle feci, assorbimento di vitamine essenziali liberate dalla degradazione operata dalla microflora batterica commensale ed accumulo del materiale fecale prima della sua espulsione. La parete del crasso non presenta villi, poiché la maggior parte dell'assorbimento dei nutrienti è già avvenuta a livello dell'intestino tenue, mentre presenta ghiandole più profonde, molte delle quali caliciformi, rispetto a quelle localizzate a livello del tenue. Le secrezioni di queste ghiandole sono controllate da un meccanismo riflesso che coinvolge i plessi nervosi presenti a livello locale. Le ghiandole producono un'elevata quantità di muco, che lubrifica il contenuto intraluminale, al fine di minimizzare l'attrito tra il materiale presente nel lume e la mucosa. È irrorato dall'arteria mesenterica superiore ed inferiore e il sangue venoso è convogliato nella vena mesenterica inferiore e superiore. Anche l'intestino crasso può essere suddiviso in tre porzioni:

- *Cieco*: il transito di materiali a questo segmento dall'ileo è regolato dalla valvola ileocecale, che impedisce anche il reflusso di materiale nell'intestino tenue. A questo livello avvengono l'immagazzinamento dei materiali destinati all'espulsione e l'inizio della compattazione.
- *Colon*: presenta un diametro maggiore e una parete più sottile, rispetto all'intestino tenue, lungo la quale è presente una serie di tasche, dette *haustra*, che consentono la distensione e l'allungamento della parete. A livello della superficie esterna sono presenti tre nastri isolati di muscolatura, chiamati tenie del colon,

mentre la tonaca sierosa contiene numerose piccole masse di tessuto adiposo a forma di goccia, definite appendici grasse del colon o appendici epiploiche. Dal punto di vista anatomico, il colon può essere ulteriormente suddiviso in quattro regioni: il colon ascendente, che dal margine superiore del cieco ascende lungo la parete posteriore laterale destra della cavità peritoneale fino alla superficie inferiore del fegato, dove si piega a sinistra formando la flessura colica destra; il colon trasverso, che s'incurva anteriormente e attraversa la cavità addominale da destra a sinistra fino a livello della milza, dove si piega e forma la flessura colica sinistra o flessura splenica; il colon discendente, che procede fino alla fossa iliaca sinistra, dove forma la flessura sigmoidea, da cui origina il colon sigmoide.

- *Retto*: occupa gli ultimi 15 cm del canale digerente. È molto estensibile ed è deputato all'accumulo di materiale fecale prima della sua espulsione. Lo strato circolare della tonaca muscolare forma lo sfintere anale interno, costituito da muscolatura liscia involontaria, mentre lo sfintere anale esterno è costituito da un anello di muscolatura striata sottoposto al controllo della volontà.

In sezione trasversale, la parete intestinale comprende vari strati (Figura 1) rappresentati, dall'interno verso l'esterno, da:

- *Tonaca mucosa*: le mucose consistono in uno strato di tessuto connettivo lasso rivestito da epitelio umettato dalle secrezioni delle ghiandole sottostanti. L'epitelio può essere mono o pluristratificato, a seconda della regione in cui si trova e dell'entità degli insulti a cui è fisiologicamente sottoposto. A livello dell'intestino la mucosa, ripiegata in pliche, protrude verso l'interno del lume generando microscopiche strutture digitiformi, i villi intestinali, a

loro volta rivestiti da un tappeto di microvilli: questa particolare conformazione permette di aumentare considerevolmente la superficie assorbente, in particolare a livello dell'intestino tenue. Le ghiandole esocrine presenti a livello della mucosa, sottomucosa o degli organi accessori riversano le secrezioni nel lume intestinale. Lo strato connettivo lasso sottostante all'epitelio è chiamato *lamina propria* e contiene vasi sanguigni e linfatici, terminazioni nervose sensitive, fibre muscolari lisce ed aree sparse di tessuto linfoide (il MALT, ovvero Mucosa-Associated Lymphoid Tissue). Sotto la *lamina propria* è presente uno strato sottile di fibre muscolari lisce e fibre elastiche chiamato *muscularis mucosae*, che comprende uno strato circolare interno ed uno longitudinale esterno, formato da fibre muscolari parallele all'asse del canale, le cui contrazioni influenzano la struttura del tubo digerente.

- *Tonaca sottomucosa*: consiste in uno strato di tessuto connettivo lasso che avvolge la *muscularis mucosae*. Contiene grossi vasi sanguigni, vasi linfatici e ghiandole esocrine secernenti succhi con proprietà tampone ed enzimi nel lume intestinale. Lungo il suo margine esterno è presente il plesso sottomucoso o di Meissner, un reticolo di fibre nervose originanti da aggregati neuronali, comprendenti neuroni sensitivi, gangli parasimpatici e fibre simpatiche postgangliari che provvedono all'innervazione della mucosa e alla regolazione delle funzioni secreto-motorie, del tono vascolare e delle funzioni assorbenti.
- *Tonaca muscolare*: chiamata anche *muscularis externa*. È costituita da due strati, uno circolare interno ed uno longitudinale esterno, che svolgono un ruolo fondamentale nel mescolamento e nella propulsione del materiale intraluminale, tramite la coordinazione

operata dai neuroni del plesso mienterico o di Auerbach, interposto tra i due.

- *Tonaca sierosa*: questa membrana sierosa manca solo a livello del retto, dove la tonaca muscolare è avvolta da un reticolo denso di fibre di collagene, chiamata tonaca avventizia. Questo strato serve a tenere gli organi uniti alle strutture circostanti.

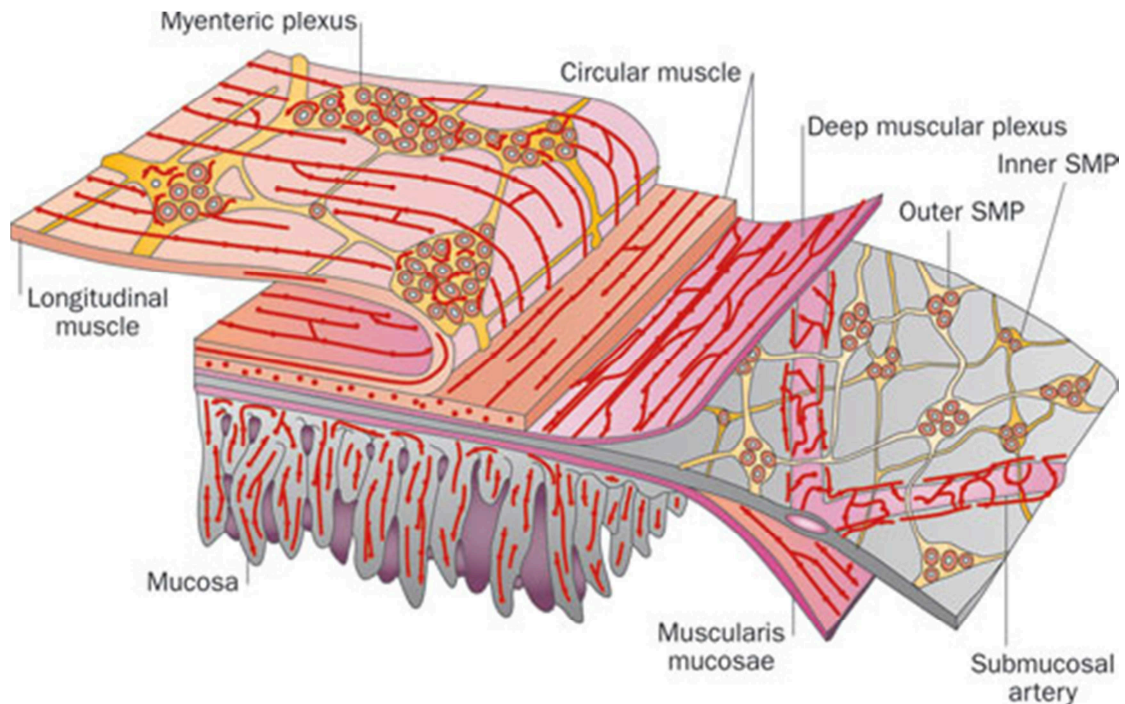


Figura 1: Rappresentazione dei vari strati della parete intestinale (Furness, 2012).

IL SISTEMA NERVOSO ENTERICO (SNE)

I due plessi nervosi presenti nella tonaca sottomucosa e muscolare costituiscono il Sistema Nervoso Enterico (SNE). Anche se in stretta e continua comunicazione con il Sistema Nervoso Centrale (SNC), attraverso il sistema nervoso autonomo simpatico, tramite i gangli prevertebrali, e parasimpatico, tramite il nervo vago e i nervi pelvici, i neuroni facenti parte del SNE regolano un elevato numero di azioni atte a rendere funzionale l'attività intestinale anche in assenza di informazioni

provenienti dal Sistema Nervoso Centrale. Tale capacità è dovuta alla complessa rete neurale che pone in connessione neuroni aventi compiti diversi tra loro: in questo sistema sono, infatti, presenti neuroni sensoriali, secretori, motoneuroni, vasomotori ed interneuroni.

L'attivazione dei meccanocettori e dei neuroni sensoriali presenti a livello della mucosa porta all'attivazione, tramite rilascio di serotonina (5-HT), somatostatina e colecistochinina, dei neuroni afferenti primari intrinseci (IPANs) ed estrinseci (EPANs) che sono situati in entrambi i plessi (*Figura 2*): i primi controllano localmente l'attività degli altri neuroni del SNE e, in modo riflesso, regolano l'attività motoria e secretoria intestinale, i secondi trasportano l'informazione relativa ad eventi fisiopatologici intestinali, sia di natura motoria che sensoriale, al SNC che interviene tramite la componente nervosa estrinseca nella modulazione delle funzioni enteriche. (*Furness, 2004; Costa, 2000*).

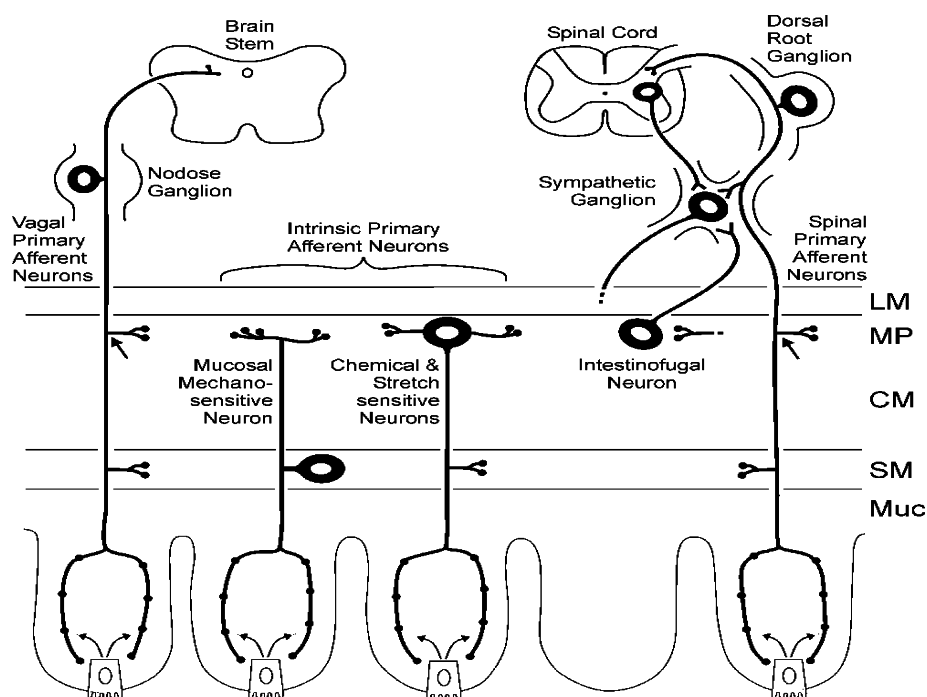


Figura 2: rappresentazione delle connessioni neuronali svolte dagli IPAN ed EPAN (Furness, 2004).

In seguito alla loro attivazione da parte degli IPANs, gli interneuroni, mediano l'attività dei motoneuroni. Gli interneuroni si dividono in due classi: ascendenti, proiettanti nel verso orale e secernenti acetilcolina (Ach) e tachichinine (TK), e discendenti, proiettanti nel verso aborale e rilascianti una più ampia gamma di neurotrasmettitori. Tra questi troviamo Acetilcolina (Ach), monossido d'azoto (NO), peptide vasoattivo intestinale (VIP), 5HT e somatostatina. Entrambe le classi di interneuroni possono fare sinapsi con motoneuroni, regolando l'attività motoria intestinale, neuroni secretomotori e vasomotori, che regolano le secrezioni ed il flusso ematico intestinale, o con altri interneuroni.

I neuroni motori, a seconda che medino la contrazione o il rilasciamento muscolare, si dividono in eccitatori o inibitori. I primi rilasciano Ach e TK, ed in maniera particolare Sostanza P (SP) e Neurochinina A (NKA), e i secondi liberano principalmente NO, VIP ed ATP.

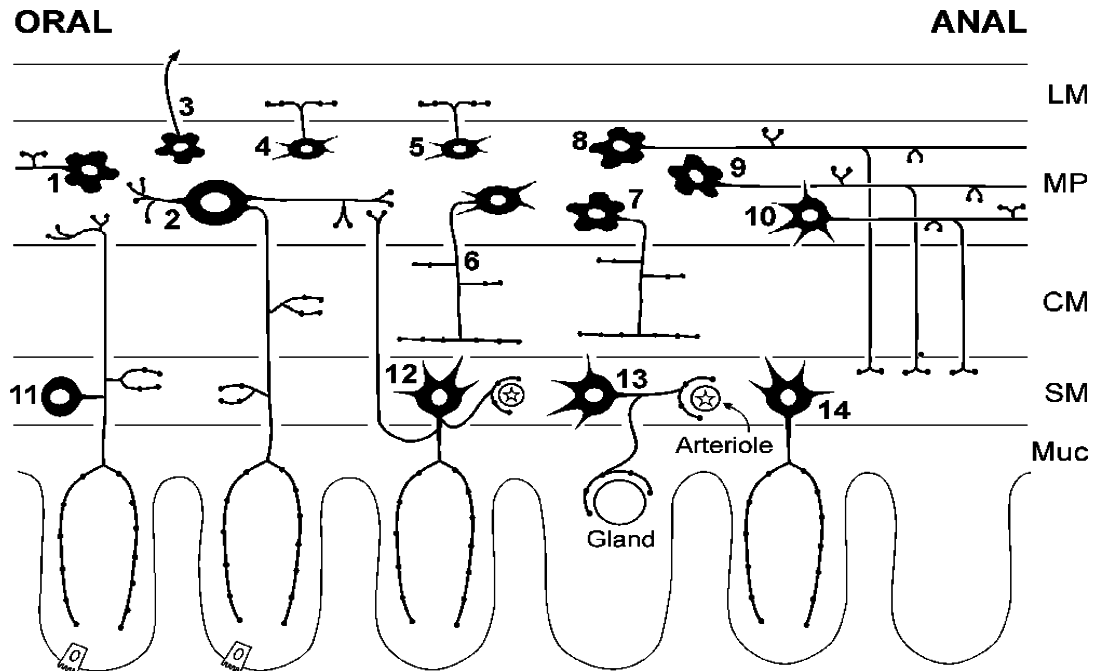


Figura 3: rappresentazione del network neuronale presente tra i vari strati della parete intestinale (Furness, 2004).

I neuroni secretomotori e vasomotori possono essere di tipo colinergico e VIPergico con effetti positivi sulla secrezione ghiandolare e l'afflusso

sanguigno oppure di tipo adrenergico e peptidergico (Neuropeptide Y) con funzione di vasocostrizione (*Figura 3*).

IL SISTEMA IMMUNITARIO INTESTINALE

Oltre alle funzioni correlate all'assorbimento dei nutrienti e all'omeostasi dell'equilibrio elettrolitico, l'intestino svolge un fondamentale ruolo endocrino e immunitario.

Il pH acido, la presenza di muco, i movimenti peristaltici intestinali, la presenza del lisozima, proteasi e composti ad azione antimicrobica sono una serie di meccanismi aspecifici con i quali è mantenuta l'omeostasi intestinale, anche se il ruolo principale è svolto dal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT).

Il MALT contiene una notevole quantità di cellule immunocompetenti responsabili del mantenimento dell'omeostasi: in condizioni fisiologiche, infatti, l'attività immunitaria è indirizzata esclusivamente contro i batteri patogeni, mentre sia la flora saprofitica sia l'enorme quantità di antigeni alimentari introdotti tramite la dieta non ne causano l'attivazione. A livello della *lamina propria* sono presenti un elevato numero di cellule immuno-competenti, rappresentate, in condizioni normali, da linfociti T (60%), linfociti B e plasmacellule (25-30%), macrofagi (8-10%) e circa 2-5% di mastociti e cellule polimorfonucleate.

La tolleranza verso gli antigeni assunti per via orale è un processo indispensabile alla sopravvivenza, infatti, normalmente l'intestino si trova in uno stato di attivazione immunologica altamente regolata, che consente di contrastare gli agenti patogeni senza intaccare la flora commensale. Eventuali alterazioni di questo equilibrio possono portare, in soggetti geneticamente predisposti e con il contributo di fattori ambientali, alla

perdita della capacità discriminatoria tra strutture batteriche patogene e non da parte delle cellule immunitarie della parete intestinale. Questo processo porta all'insorgenza di allergopatie di tipo umorale o cellulare e all'insorgenza di malattie croniche intestinali come la colite ulcerosa e il Morbo di Crohn (*Bene, 2011*).

La presenza di microrganismi patogeni all'interno del lume intestinale attiva le risposte immunitarie atte alla loro eliminazione: durante la flogosi si verifica un aumento del flusso ematico nella zona danneggiata e modificazioni strutturali delle pareti dei capillari permettono il passaggio delle proteine plasmatiche, dei leucociti e formazione di essudato infiammatorio.

Dopo essere usciti dai vasi mediante diapedesi, i leucociti, prevalentemente neutrofili, migrano verso la sede del danno per chemiotassi, processo che può essere definito come un movimento orientato lungo un gradiente chimico. Sono agenti chemotattici sostanze esogene, come i prodotti di origine batterica, ed endogene che comprendono alcuni componenti del sistema del complemento, il leucotriene B₄ e le citochine.

Questi ultimi mediatori solubili sono fondamentali per l'induzione e la regolazione delle risposte immunitarie (*Figura 4*) che implicano interazioni multiple tra linfociti, macrofagi e cellule endoteliali. Molte citochine possono essere prodotte da tipi cellulari diversi e i loro effetti sono spesso pleiotropici:

- Citochine che mediano l'immunità naturale, ad esempio IL1, TNF α ed IL6 che causano risposte infiammatorie non specifiche;
- Citochine che regolano l'attivazione, la crescita ed il differenziamento dei leucociti quali IL2, IL4, IL5, IL12, IL15, IL17, IL23 e TGF- β . Alcune, come IL2, IL4, IL17 ed IL23

favoriscono la crescita e il differenziamento dei linfociti, mentre altre, come IL10 e TGFβ, inibiscono le risposte immunitarie;

- Citochine che attivano le cellule infiammatorie, tra cui troviamo IFNγ, TNFα, TNFβ, IL5 e IL12 che agiscono attivando i macrofagi durante le risposte immunitarie cellulo-mediate;
- Citochine che regolano i movimenti leucocitari, dette anche chemochine, come IL-8.

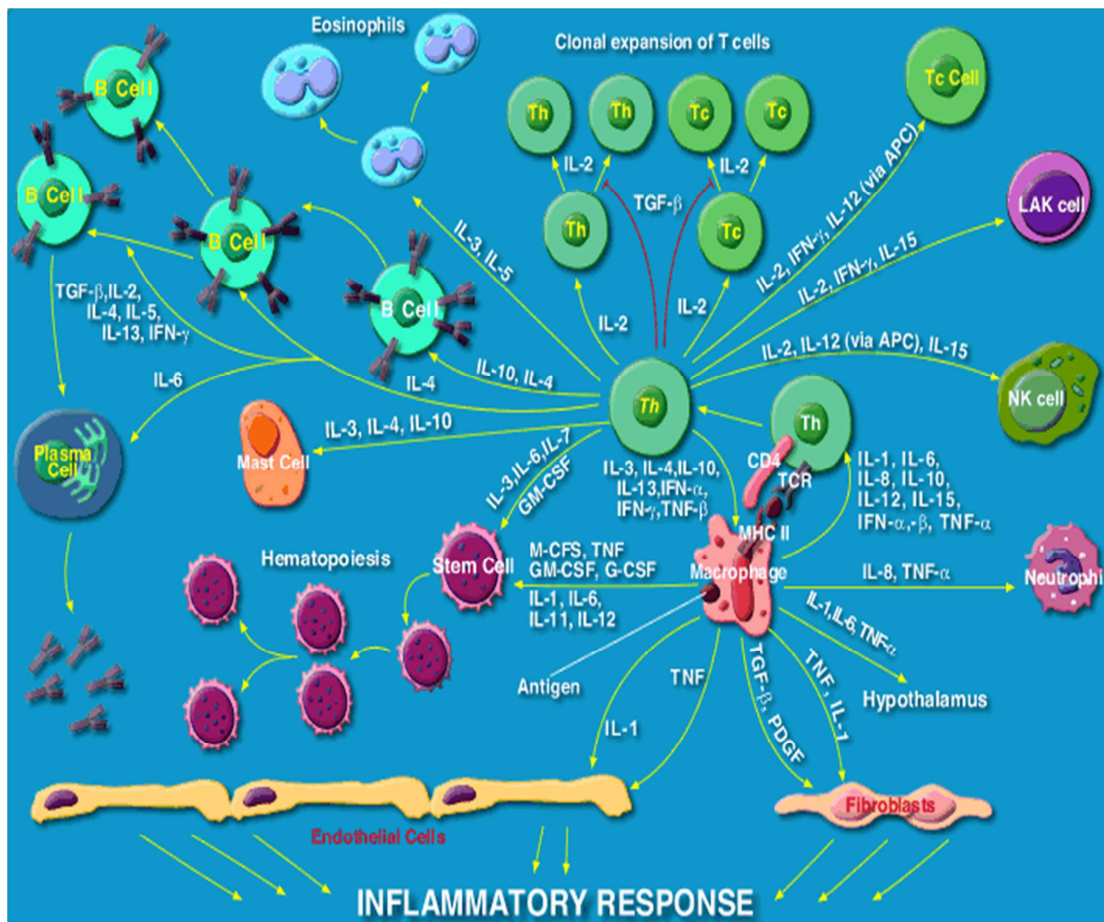


Figura 4: rappresentazione dell'interazione delle diverse citochine con le cellule del sistema immunitario.

Molti fattori chemotattici, soprattutto se presenti in concentrazioni elevate, inducono l'attivazione dei leucociti che causa sia l'eliminazione dell'agente patogeno sia i danni tissutali dovuti al rilascio di agenti tossici come enzimi lisosomiali e metaboliti attivi dell'ossigeno (ROS).

Una volta neutralizzato lo stimolo lesivo, i processi infiammatori dovrebbero regredire e portare quindi a risoluzione completa. Se ciò non avviene, lo stato infiammatorio cronicizza: la distruzione tissutale, i tentativi di riparazione e l'infiammazione attiva procedono simultaneamente causando una forte deposizione di materiale fibrotico e la perdita di funzionalità tissutale. L'infiammazione cronica è caratterizzata da infiltrazione di cellule mononucleate quali macrofagi, linfociti e plasmacellule.

Queste cellule, insieme all'epitelio intestinale, esprimono i Toll Like Receptors (TLR), proteine transmembrana che giocano un ruolo chiave nell'immunità innata: attivati dal contatto con gli antigeni (rappresentati nella maggior parte dei casi da proteine, glicoproteine o acidi nucleici di agenti esterni come batteri, funghi e virus), tramite produzione di una cascata di secondi messaggeri, culminanti con l'attivazione del sistema NF- κ B e l'espressione di citochine pro infiammatorie, fungono da collegamento tra la risposta innata e la risposta adattativa. È probabile che il polimorfismo genetico dei TLRs influenzi la sensibilità della risposta ai microrganismi patogeni, mentre una deficienza o un loro malfunzionamento può essere responsabile di uno squilibrio nel sistema di controllo del processo infiammatorio, favorendo la comparsa di patologie di natura infiammatoria cronica.

Nell'infiammazione cronica, linfociti e macrofagi sono in stretta e reciproca inter-relazione. I macrofagi sono effettori importanti dell'immunità cellulo-mediata: fagocitano agenti patogeni e cellule danneggiate o morte, ed in seguito alla loro attivazione, processo facilitato da citochine come IFN γ , rilasciano ROS e citochine. I linfociti rappresentano la componente centrale dell'immunità acquisita e si dividono in due grandi categorie: i linfociti B, che mediano l'immunità umorale, e i linfociti T, responsabili dell'immunità cellulo-mediata.

I linfociti T sono deputati a combattere le infezioni da microbi intracellulari e si dividono a loro volta in linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺.

I linfociti T helper CD4⁺ riconoscono gli antigeni presentati da molecole MHC di classe II espresse dalle APC e macrofagi, e tramite la secrezione di diversi tipi di citochine, regolano l'attività delle altre cellule immunitarie; essi possono differenziarsi in due sottopopolazioni di cellule effettrici: T helper di tipo 1 (T_{h1}) e T helper di tipo 2 (T_{h2}).

Il bilanciamento tra attivazione di cellule T_{h1} e cellule T_{h2} in risposta ad un agente patogeno, condiziona il decorso e l'esito di molte infezioni: le due sottopopolazioni linfocitarie danno origine a due tipologie di risposte effettrici che non possono coesistere e per questo si inibiscono a vicenda mediante l'azione paracrina delle rispettive citochine.

L'attivazione dei linfociti T CD8⁺ è stimolata dal riconoscimento di complessi peptide-MHC I, e richiede un processo di costimolazione e/o cooperazione con i linfociti T helper. I linfociti T CD8⁺ riconoscono peptidi derivanti da proteine citoplasmatiche potenzialmente espresse da tutte le cellule nucleate. In caso d'infezione ad opera di un patogeno intracellulare, vengono forniti secondi segnali dalla cellula stessa o dai linfociti T helper CD4⁺ necessari per la differenziazione in linfociti T citotossici effettori (CTL). La funzione dei CTL è quella di uccidere le cellule infettate secernendo proteine che causano la lisi della membrana della cellula bersaglio e inducono in essa la frammentazione del DNA e l'innescio di un processo di morte apoptotica.

L'immunità umorale è mediata dagli anticorpi che prevengono l'infezione grazie alla loro capacità di bloccare l'ingresso dei patogeni nelle cellule e nei tessuti dell'ospite e contribuiscono alla loro eliminazione. Questo tipo di risposta è molto importante a livello delle mucose del tratto gastroenterico e respiratorio, dove gli anticorpi IgA, prodotti dalle plasmacellule della *lamina propria*, sono attivamente

trasportati attraverso l'epitelio e legano i microbi che tentano di penetrare la barriera, neutralizzandoli.

Il ruolo delle APC sembra essere di fondamentale importanza nella regolazione di questa risposta immunitaria; infatti, per innescarsi, essa richiede non solo l'esposizione di antigeni su MHC I e II, ma anche di un'adeguata concentrazione di molecole costimolatorie e di citochine. Mentre le APC, concentrate nelle placche di Peyer possiedono tutte le caratteristiche per stimolare adeguatamente i linfociti, altre cellule, in grado di comportarsi come APC accessorie, inducono prevalentemente la tolleranza. Tra queste troviamo gli stessi enterociti che sono in grado di attivare dei linfociti regolatori (T_{REG}) grazie alla presenza di ligandi MHC "atipici"; l'attività inibitoria esercitata nei confronti dei linfociti T helper è mediata dal rilascio di citochine ad attività anti-infiammatoria, come IL10 ed il $TGF\beta$, o dalla promozione della loro apoptosi. Tale meccanismo evita che s'innesci una risposta immunitaria non necessaria.

I microrganismi commensali sono a loro volta in grado di eludere la risposta immunitaria con meccanismi riconducibili, almeno in parte, alla capacità di inibire il fattore nucleare di trascrizione $NF\kappa\beta$, implicato nell'attivazione di molti geni coinvolti nelle risposte immunitarie e flogistiche, quali, ad esempio, l'aumento della capacità fagocitaria dei macrofagi, il rilascio di citochine da parte di APC, macrofagi e linfociti e proliferazione di cellule immunitarie.

L'omeostasi tessutale nell'intestino è, quindi, mantenuta tramite un delicato equilibrio tra proliferazione cellulare e morte: la perdita di questo equilibrio è la causa di patologie a carico del tratto gastrointestinale come le Inflammatory Bowel Diseases (IBDs), nelle quali i livelli di apoptosi dei linfociti sono significativamente ridotti portando alla perdita della normale tolleranza immunologica mucosale; questo si riflette in

un'abnorme risposta immunitaria nei confronti della flora batterica commensale (*Saikumar, 1999*).

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

Le IBD sono una famiglia di patologie idiopatiche, croniche di natura infiammatoria ed autoimmune che interessano il tratto gastrointestinale; è noto che in queste patologie vi sia un'eccessiva risposta del sistema immunitario su base genetica in seguito all'esposizione a fattori ambientali.

Il decorso di queste patologie è caratterizzato da 3 fasi temporali distinte: inizialmente si ha la penetrazione del contenuto batterico luminale a livello sottomucosale, facilitato dalla copresenza di fattori ambientali (alterazioni della composizione della microflora da infezioni o terapia antibiotica) che portano al danno mucosale od infezioni, seguita da una diminuita capacità di eliminazione degli agenti patogeni da parte delle difese immunitarie aspecifiche, che termina con un tentativo di compensazione da parte del sistema immunitario adattativo che culmina con un'infiammazione cronica, disbiosi e nelle tipiche lesioni collegate alle IBD (*Figura 5*).

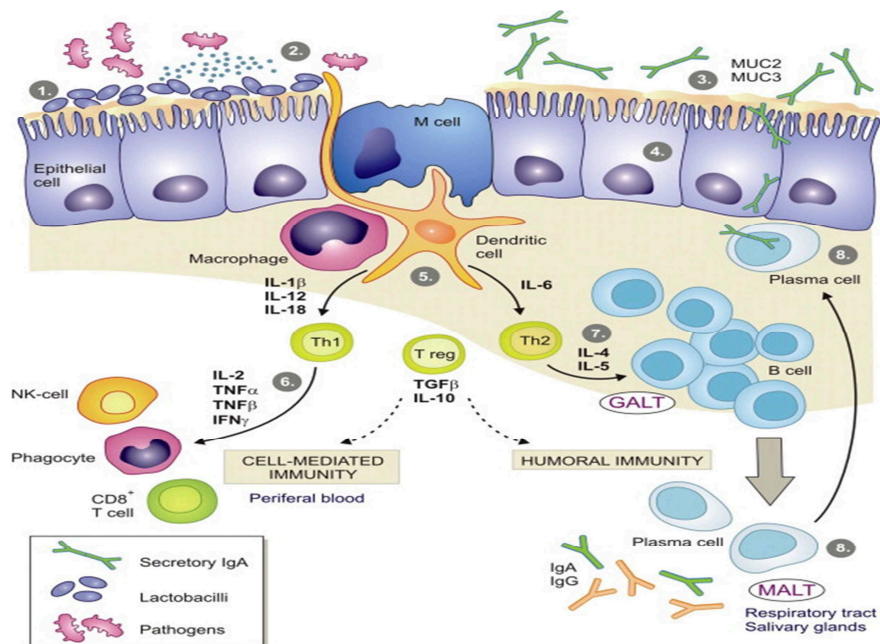


Figura 5: Meccanismi di attivazione della risposta immunitaria intestinale (Niittynema, 2012).

Queste patologie sono fortemente disabilitanti per i pazienti che ne soffrono e portano a forti cambiamenti nella loro qualità della vita, sia per i sintomi infiammatori che per il caratteristico dolore cronico.

Nord America e Nord Europa sono le zone dove le IBD presentano una maggior incidenza, ed è stata evidenziata anche una predisposizione allo sviluppo di queste patologie in alcune etnie rispetto ad altre. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che le IBD sono in aumento in tutte le zone urbanizzate del mondo (Soon, 2012), in età pediatrica (Cucchiara, 2011) ed in pazienti affetti da Irritable Bowel Syndrome (Porter, 2012). Per quanto riguarda la dipendenza dal sesso, vi è un'incidenza lievemente maggiore a livello del sesso femminile.

La sede principale dell'infiammazione è il tratto intestinale. I pazienti lamentano forti dolori addominali, diarrea, vomito e rettorragia, ai quali si aggiungono ripercussioni a livello sistemico, con febbre, perdita di peso, malnutrizione legata al malassorbimento ed anemia. Tra le complicanze che le IBD causano, il cancro a livello colon-rettale, che affligge il 10% dei pazienti, è probabilmente quella più grave.

I principali trattamenti terapeutici sono mirati a migliorare la qualità della vita del paziente, favorendo il mantenimento delle fasi remissive della patologia, prevenendo o trattando le complicazioni, trattando i deficit nutrizionali, provvedendo ad un supporto psicosociale e modificando il decorso delle manifestazioni più aggressive. Vengono applicate 5 diverse tipologie di trattamento: anti-infiammatori, immunosoppressori, antibiotici, agenti biologici e farmaci per il trattamento sintomatico; in tutti i casi, tutti questi farmaci sono caratterizzati dalla presenza di pesanti effetti collaterali. Nei casi più gravi, l'intervento chirurgico diventa necessario per salvare la vita al paziente, benché questo non sia sempre risolutivo della patologia e possa risultare debilitante quasi quanto le IBD stesse.

Benché presentino caratteristiche comuni, le IBD presentano differenze nel loro decorso ed incidenza che le porta ad essere classificate in 8 patologie diverse:

- Morbo di Crohn;
- Colite Ulcerosa;
- Colite Macroscopica;
- Colite Collagenosica;
- Colite Linfocitica;
- Colite Ischemica;
- Colite da Diversione;
- Sindrome di Behçet.

MORBO DI CROHN (CD)

Il Morbo di Crohn (CD) è classificato, insieme alla colite ulcerosa (UC), come una delle forme principali di IBD. Sebbene condividano alcune caratteristiche, queste due malattie si differenziano principalmente per la sede anatomica d'insorgenza della patologia e lo strato tissutale intestinale interessato dell'infiammazione, per la risposta immunitaria che viene a scatenarsi e per alcune manifestazioni sintomatologiche.

Le popolazioni maggiormente affette sono quelle di razza caucasica, soprattutto del Nord America, Nord Europa ed Australia, in età compresa tra i 15 e i 30 anni (primo picco di incidenza) e tra i 50 e gli 80 anni (secondo picco di incidenza) (*Calkins, 1984*) (*Figura 6*).

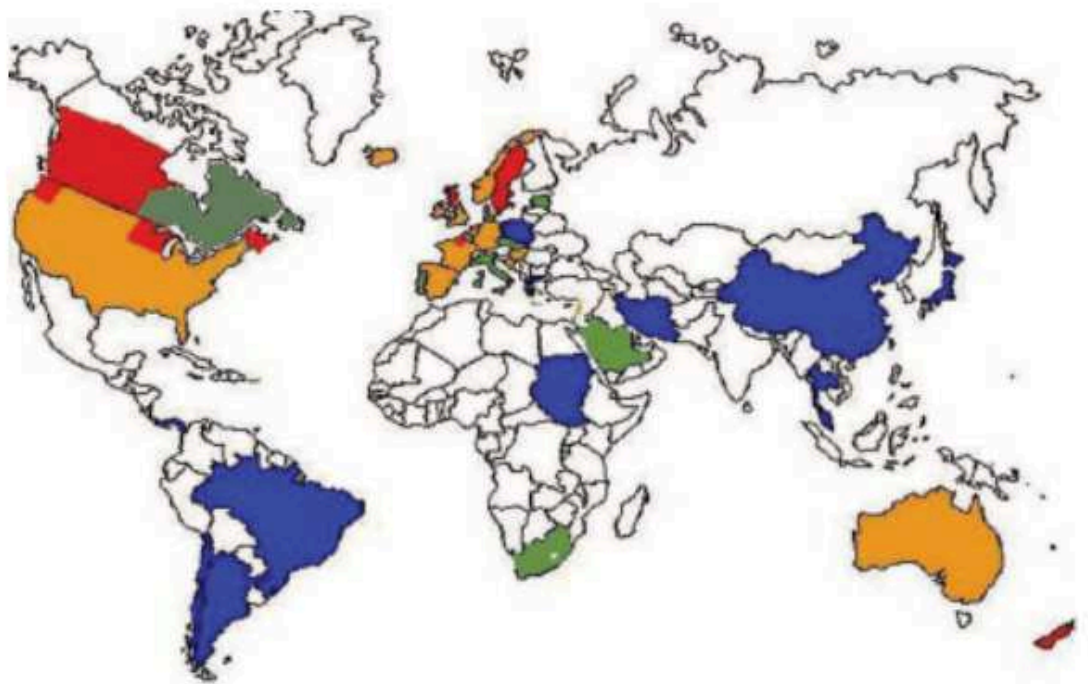


Figura 6: Diffusione mondiale del Morbo di Crohn. I dati sono rappresentati come incidenza ogni 100000 abitanti per anno. In rosso 7 nuovi casi, in arancione tra 4 e 7 casi, in verde tra 1 e 4 casi, in blu < 1 caso, in bianco regioni in cui non sono presenti dati (Economou, 2008).

Nel Nord America il tasso di incidenza varia tra i 3.1 e i 14.6 nuovi casi ogni 100.000 persone l'anno; gli individui già colpiti dalla patologia si attestavano nel 2003 a non meno di 630.000 abitanti tra Canada e Stati Uniti (*Loftus, 2004*). L'European Collaboratory Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD) ha stimato tra gli 3.9 e i 7.0 nuovi casi ogni 100.00 persone l'anno in Europa tra il 1991 e il 1993. Le persone particolarmente colpite risultano quelle del Nord Europa, con un'aumento dell'incidenza del 40-80% rispetto alle popolazioni meridionali (*Shivananda, 1996*). Altri studi epidemiologici hanno tuttavia dimostrato un'aumento dell'incidenza delle IBD in Sud e Centro Europa (*Vucelic, 1991; Mate-Jimenez, 1994; Manousos, 1996; Tragnone, 1996*), in Asia (*Fireman, 1989*), in Africa ed in Sud America (*Hou, 2000*).

Patogenesi

La patogenesi del morbo di Crohn non è ancora totalmente chiara. Non ci sono prove che si tratti di una malattia autoimmune e la maggior parte dei patologi sostiene che si sviluppa in seguito alla coesistenza di più fattori, di natura genetica ed ambientale che portano all'insorgenza di danno epiteliale, risposta immunitaria anomala ed alterazione nella comunicazione tra la flora commensale ed il sistema immunitario della parete intestinale (*Bene, 2011*).

Alcuni fattori genetici predispongono allo sviluppo della malattia (*Cho, 2008*) ed il rischio aumenta nelle persone con almeno un familiare con CD e nei gemelli monozigoti il tasso di concordanza è di circa il 50%. Inoltre, sono stati identificati alcuni geni suscettibili per lo sviluppo della malattia, come il gene per NOD2, il gene per ATG16L1 e il gene per IRGM.

Le NOD2 sono proteine citoplasmatiche che riconoscono il peptidoglicano batterico all'interno della cellula e inducono la trascrizione dei geni codificanti le citochine pro- e anti-infiammatorie attraverso la via dell'NF- κ B. Mutazioni a carico di questo gene sono correlate allo sviluppo di CD (*Hugot, 2001*). Inoltre, nei pazienti affetti dalla malattia con gene NOD2 inalterato, è stato riscontrato un aumento nell'espressione di tale proteina (*Elson, 2011*), causa di una diminuita tolleranza verso la microflora intestinale residente.

Il gene *ATG16L1* codifica per un componente di un complesso proteico necessario per la formazione dell'autofagosoma. La proteina ATG16L1 è necessaria per la risposta della cellula ospite verso i batteri intracellulari e per l'omeostasi dell'epitelio. Similmente ad ATG16L1, anche il gene *IRGM* codifica per una proteina coinvolta nel processo di autofagia e clearance dei batteri intracellulari. Mutazioni a carico di questi geni sono state correlate ad un alto rischio di sviluppo della CD (*Hampe, 2007; Rioux, 2007*).

Le anomalie a livello del sistema immunitario possono contribuire all'instaurarsi della malattia. Una nota caratteristica della patologia è l'alterazione dell'attività dei linfociti T intestinali. Ad esempio, il polimorfismo del gene codificante per il recettore per l'IL23, citochina largamente rilasciata in questa condizione infiammatoria e che è coinvolta nel mantenimento della risposta infiammatoria cronica attraverso l'attivazione dei linfociti T_{h17}, conferisce protezione nello sviluppo della patologia (*Duerr, 2006*). Un recente studio correla alla malattia anche un'alterazione nell'immunità innata (*Marks, 2008*).

Numerosi difetti epiteliali sono presenti nella CD, ad esempio, nei pazienti possono essere presenti anomalie nella formazione delle tight junctions (*Turner, 2006*) e a carico del gene *SLC22A4*, responsabile della codifica del trasportatore di cationi organici (*Fisher, 2008*).

Infine, la flora intestinale è necessaria per lo sviluppo della patologia, ma non è stato ancora chiarito l'esatto meccanismo e se siano coinvolti specifici ceppi batterici. Ciò che è noto è che la CD è associata a disbiosi, cioè ad un'alterazione nella normale flora intestinale (*Bai, 2006*).

Sintomatologia

Le prime manifestazioni sintomatologiche della malattia di Crohn sono del tutto sovrapponibili a quelle di un'appendicite od ulcera intestinale e sono dolori e crampi addominali, febbre, diarrea, flatulenza e sangue fecale, anche se quest'ultimo è più frequente nella UC. Ai sintomi acuti seguono poi periodi di remissione, che possono durare da pochi giorni ad alcuni mesi. Con il progredire della patologia, il paziente può iniziare a perdere peso ed accusare deficit nutrizionali dovuti al malassorbimento. Ad esempio, in pazienti affetti dalla malattia di Crohn a localizzazione prevalentemente colica si può instaurare una condizione di anemia sideropenica, mentre nel caso in cui la porzione più colpita sia quella dell'intestino tenue, i disturbi maggiori sono l'ipoproteïnemia, come l'ipoalbuminemia, e la carenza di vitamina B12. L'infiammazione può estendersi ad altri distretti del sistema gastrointestinale, come la bocca, dove si formano afte croniche, o la zona perianale, con disagi che vanno dal prurito al dolore fino all'incontinenza fecale.

Oltre a questi sintomi, la CD presenta sintomi extraintestinali: sono tra le complicanze più comuni le uveiti e l'eritema nodoso. Le pericolangiti e le colangiti sclerosanti primitive sono invece più rare e sono complicanze più correlate alla UC.

Table 1 Major extraintestinal immune-related manifestations of IBD

Arthritis
Erythema nodosum
Pyoderma gangrenosum
Aphthous stomatitis
Iritis/uveitis

Table 2 Autoimmune disorders associated to IBD

Alopecia areata
Ankylosing spondylitis
Bronchiolitis obliterans
Cold urticaria
Hemolytic anemia
Henoch-Schoenlein purpura
Insulin-dependent diabetes mellitus
Pancreatitis
Primary biliary cirrhosis
Primary sclerosing cholangitis
Polymyositis
Raynaud phenomenon
Seropositive rheumatoid arthritis
Sjogren syndrome
Thyroid disease
Vitiligo
Wegener's granulomatosis
Takayasu's arteritis

Table 3 Extraintestinal complications in IBD and principal pathogenetic mechanisms of arthritis

Extraintestinal complications in IBD	Principal pathogenetic mechanisms of arthritis
Anemia	Iron deficiency, inflammation
Thromboembolic events	Hypercoagulopathies, platelet activation
Osteopathy	Steroid therapy, vitamin D deficiency inflammation
Growth failure	Malnutrition
Nephrolithiasis	Dehydration, hyperoxaluria, low urinary PH
Cholelithiasis	Intestinal loss of bile acids
Amyloidosis	Acute phase reaction, chronic inflammation
Fatty liver	Malnutrition

Figura 7: Elencazione dei sintomi extra-intestinali causati dalle IBD (Danese, 2005).

Oltre alle manifestazioni a livello cutaneo, il CD è strettamente correlato ad altri sintomi sistemici di natura artritica (poliartrite migrante, sacro-ileite, spondilite anchilosante), epatica (cirrosi biliare), pancreatica (diabete mellito insulino-dipendente, pancreatiti), tiroidea, polmonare e

trombotica, che aggravano il quadro clinico e la qualità della vita del paziente (*Danese, 2005*) (*Figura 7*).

Se la zona prevalentemente colpita dall'infiammazione è il colon, la conseguenza più drammatica sussiste nello sviluppo di cancro al colon-retto (CRC), che colpisce circa il 10% dei pazienti affetti da CD. Il CRC s'instaura mediamente intorno ai 55 anni, dopo almeno 7 anni dalla diagnosi della patologia (in media dopo 15 anni) (*Mattar, 2011*). Il rischio di sviluppo di CRC è aumentato nei pazienti con CD gravi e sviluppate in giovane età, nei pazienti con colangite sclerosante primitiva, con pseudo polipi colonici o con storie familiari di CRC.

Caratteristiche istologiche

La malattia di Crohn, a differenza della UC che è limitata al colon e al retto, colpisce tutto il tubo digerente, dalla bocca all'ano, con particolare prevalenza nel tratto ileale, del cieco e della valvola ileo-ciecale. Nel 40% dei casi è colpito l'intestino tenue, nel 30% l'intestino crasso, negli altri casi sono colpiti entrambi (*Kumar, 2010*) (*Figura 8*).

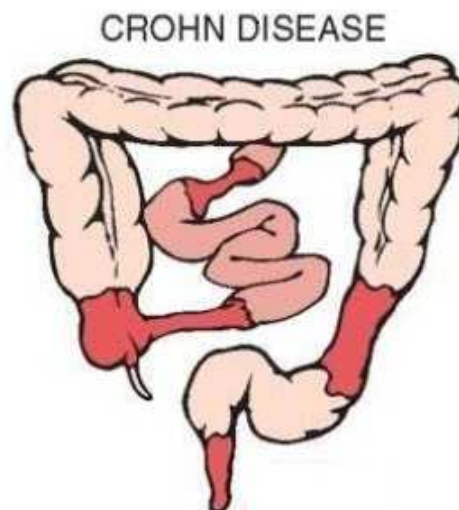


Figura 8: Distribuzione delle lesioni nel Morbo di Crohn.

Il tessuto intestinale infiammato è caratterizzato da lesioni discontinue: inizialmente si generano piccole afte, che successivamente si fondono tra loro per formare vere e proprie ulcere. Queste possono attraversare tutti gli strati della parete e generare fistole, ad esempio con la vescica o la vagina, e richiedono immediato intervento chirurgico.

L'epitelio risulta arrossato e granuloso; si presenta inoltre ispessito, a causa dell'edema, della fibrosi e dell'ipertrofia della tonaca muscolare. Elementi frequenti a livello intestinale nella CD sono le stenosi (restringimenti del canale, soprattutto a livello ileale, che spesso richiedono la rimozione chirurgica), granulomi non caseosi (usati come marker della malattia), grasso mesenterico che si estende attorno alla tonaca sierosa (grasso rampicante) e disorganizzazione dell'architettura tissutale, come nel caso delle cripte intestinali.

Caratteristiche dell'infiammazione

Dall'analisi della popolazione linfocitaria e delle citochine, l'infiammazione nella malattia di Crohn è stata definita prevalentemente di tipo T_{H1} (Rovedatti, 2009; Bene, 2011).

I linfociti T_{H1} sono una sottofamiglia di linfociti T che guidano la risposta specifica nei confronti di patogeni intracellulari, di cellule tumorali o, nel caso di malattie autoimmuni cellulo-mediate, di cellule non riconosciute come self. Le cellule presentanti l'antigene, come cellule dendritiche e macrofagi, producono IL12, che è in grado di attivare la risposta innata (cellule NK) e la risposta adattativa (linfociti T vergini). Questi ultimi producono $IFN\gamma$, una molecola in grado di determinare il differenziamento in senso T_{H1} dei linfociti T $CD4^+$, limitando quello in senso T_{H2} . I linfociti T_{H1} attivati liberano principalmente $IFN\gamma$, IL2, IL6 e $TNF-\alpha$, che scatenano una risposta cellulo-mediata.

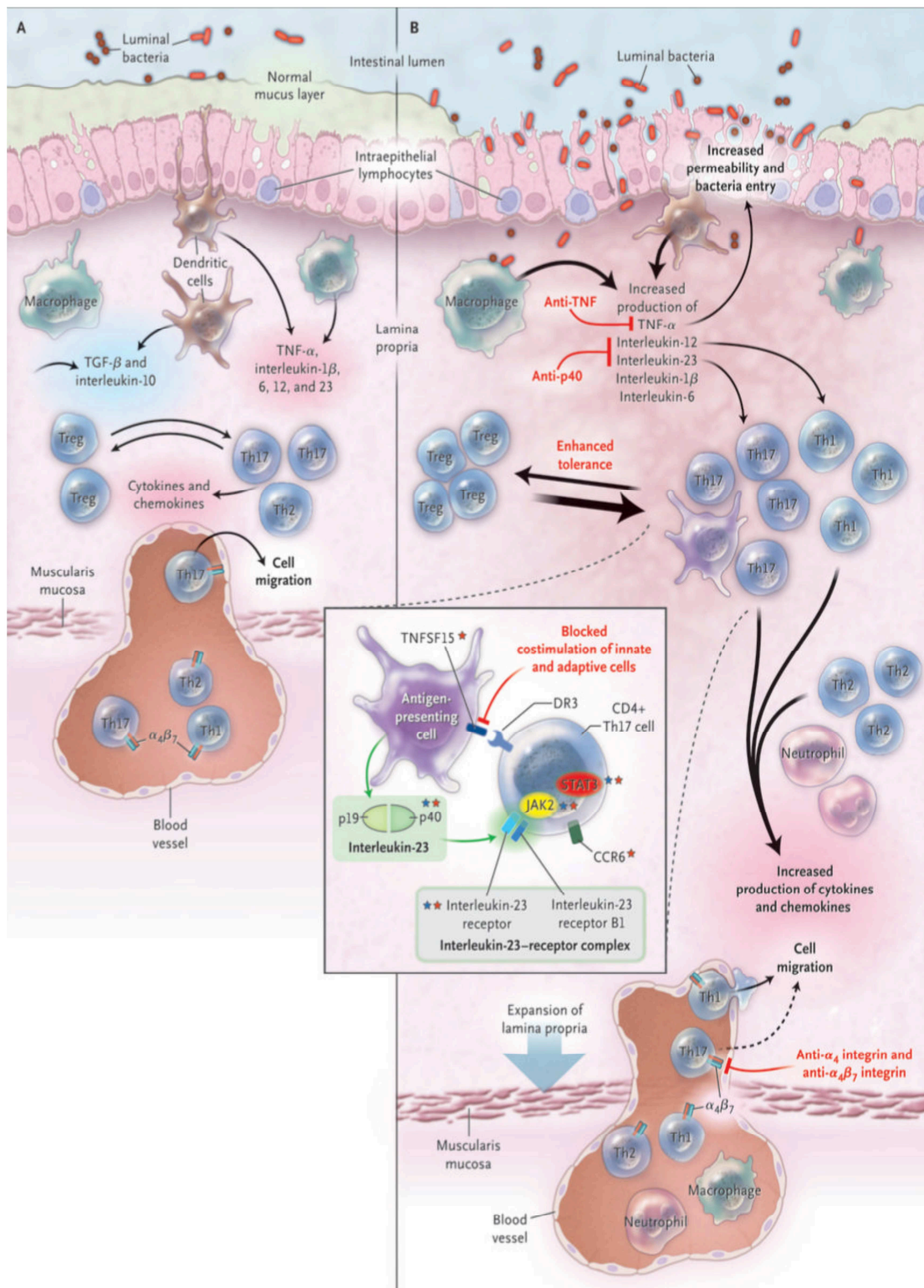


Figura 9: Rappresentazione della risposta immunitaria che si genera a livello intestinale in una persona sana (A) ed in una persona affetta dal Morbo di Crohn (B) (Abraham, 2009).

Nella malattia di Crohn, infatti, le citochine maggiormente espresse sono $\text{IFN}\gamma$, IL12, $\text{TNF}\alpha$ ed IL2. L'ambiente citochinico è completato dalla presenza di IL23, IL21, IL17 e citochine con azione antiapoptotica nei confronti dei linfociti e di altre cellule immunitarie, come IL6, IL15, IL17 e IL18 (Bene L, 2011). L'iperespressione di IL12 è stata confermata da uno studio condotto a livello murino da Neurath (Neurath, 1995), dimostrando un blocco della progressione della malattia in seguito alla somministrazione di anticorpi specifici anti IL12. L'iperespressione di $\text{TNF}\alpha$ è confermata da molti studi su modelli animali (Neurath, 1997; Murthy, 1999; Williams, 1999), e può essere prodotta in seguito all'attivazione dei linfociti $T_{\text{H}1}$, ma anche dall'attivazione di macrofagi o di cellule non T del colon (Figura 9).

Uno studio condotto da Rovedatti (Rovedatti, 2009) ha dimostrato che l'IL17 è iperespressa nella CD e la sua funzione è quella di indurre la produzione di IL6 e IL8, che stimolano il reclutamento dei neutrofili al sito dell'infiammazione ed i macrofagi a produrre citochine proinfiammatorie che reclutano altre cellule immunitarie al sito infiammato. La produzione di IL17 è regolata da IL23, così come da IL12 e $\text{IFN}\gamma$. I linfociti $T_{\text{H}17}$ e $T_{\text{H}1}/T_{\text{H}17}$, altra sottopopolazione dei linfociti T_{H} , producono rispettivamente IL17 e IL17 con $\text{IFN}\gamma$. Entrambi sono attivati a loro volta da IL23 e da $\text{TGF}\beta$, IL6 e IL1 β (Langrish, 2005).

Un'importante citochina anti-infiammatoria, l'IL10, normalmente in equilibrio con le altre citochine pro-infiammatorie, è invece ipoespressa nella malattia di Crohn (Bene, 2011; Correa I, 2009).

Modelli per lo studio della patologia

Per lo studio della malattia di Crohn, vengono utilizzati dei modelli animali che riproducono i sintomi e le caratteristiche tipiche di questa patologia. Grazie ai modelli animali è stato possibile identificare i meccanismi biochimici e molecolari sia dell'infiammazione, acuta e cronica, sia della rigenerazione tissutale nel CD.

Gli animali più utilizzati sono i roditori, in particolare il topo, la cavia e il ratto. I modelli murini possono essere indotti o spontanei. L'induzione avviene con agenti chimici, come nel caso dell'acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS), con produzione di animali transgenici, tramite delezione genica oppure tramite trasferimento di cellule T CD4⁺ in topi SCID (immunodeficienti). I topi che sviluppano spontaneamente la CD hanno invece mutazioni sui geni *C3H/HeBir* e *SAMP1/Yit* (Boismenu, 2000).

Uno dei modelli più utilizzati è quello con induzione chimica da TNBS in etanolo: l'applicazione rettale di tale composto causa una risposta infiammatoria grave, con necrosi tissutale transmurale, seguita dalla rigenerazione del tessuto. I sintomi riscontrati sono ulcerazioni, iperemia, adesioni, edema e cambiamenti nell'architettura del tessuto. Sebbene il meccanismo non sia del tutto noto, si pensa che l'etanolo provochi un aumento transiente della permeabilità della membrana, permettendo al TNBS di raggiungere lo strato subepiteliale e qui legare covalentemente proteine tissutali o di microrganismi, generando antigeni.

La risposta immunitaria che si scatena coinvolge le cellule T della lamina propria, dello spazio intraepiteliale e del GALT.

Terapia farmacologica

La terapia convenzionale per la cura del Morbo di Crohn, così come per la colite ulcerosa, prevede l'utilizzo cronico di farmaci derivati dell'acido 5-aminosalicilico (5-ASA) e corticosteroidi, come il prednisone, per ridurre l'infiammazione, o immunosoppressori, come metrotressato, azatioprina e mercaptopurina.

Il 5-ASA o mesalazina inibisce la via dell'NF- κ B: inibendo questa via, le cellule vanno incontro ad apoptosi e l'infiammazione o il tumore non possono progredire. Per questo motivo, il 5-ASA è utilizzato sia come terapia per il controllo sintomatologico del CD e come chemiopreventivo per il cancro colon-rettale, sebbene gli studi su quest'ultimo utilizzo esprimano risultati discordanti (*Mattar, 2011*).

Il prednisone e gli altri corticosteroidi invece inibiscono le manifestazioni precoci e tardive dell'infiammazione. Tra gli effetti principali, sono in grado di diminuire gli effetti vascolari dell'infiammazione, l'azione di neutrofili, macrofagi, linfociti T, la sintesi o il rilascio di prostanoidei, citochine, istamina, ossido nitrico (NO) e l'attivazione del complemento. Questi farmaci sono tuttavia inefficaci nei periodi di remissione nel 30% dei casi di IBD e sono inoltre noti i loro effetti collaterali nella terapia a lungo termine.

Per questo motivo sono state messe a punto alcune terapie alternative. Tra queste, la più comune è l'uso di anticorpi anti TNF α , come l'Infliximab e Adalimumab. Il TNF α è una citochina chiave nella promozione dell'infiammazione. L'Infliximab (Remicade[®]) riduce il danno tissutale e velocizza il processo di guarigione nei pazienti con CD gravi o medio-gravi. Altri anticorpi in studio sono gli anticorpi anti IL12, che si sono dimostrati efficaci nei topi con CD indotta con TNBS (*Neurath, 1995*).

Per questo motivo, una terapia a base di anticorpi anti IL12 potrebbe essere una valida alternativa alla terapia anti TNF α .

Un'altra via ad oggi in studio per curare la CD prevede l'utilizzo di IL10 ricombinante (rIL10), sostanza ora sottoposta a trials clinici e proposta per la terapia grazie ai risultati positivi ottenuti quale anti-infiammatorio in alcuni modelli di IBD. Si tratta, infatti, di una citochina con azione antinfiammatoria, che inibisce la produzione di altre sostanze pro infiammatorie.

Fuss (*Fuss, 1999*) ha proposto una terapia che prevede la somministrazione intranasale di un plasmide codificante per TGF β : questa terapia genica si è dimostrata efficace nel prevenire quasi completamente l'infiammazione da TNBS. Il TGF β , infatti, ha un ruolo antinfiammatorio in seguito all'aumento dei livelli di IL10 e diminuzione dell'espressione del recettore per l'IL12. Le principali problematiche di questa tecnica riguardano la sicurezza, in quanto non si conosce il meccanismo con cui il DNA codificante TGF β venga integrato nel DNA e in quali cellule dell'ospite; inoltre non è chiaro se l'espressione sia transiente o duratura.

Anche l'uso di un adenovirus ricombinante di tipo 5 esprimente l'IL4 e oligonucleotidi antisenso anti NF- κ B hanno dimostrato rispettivamente miglioramenti (*Hogaboam, 1997*) e capacità preventive nei topi con CD da TNBS (*Henry, 1999*). Gli oligonucleotidi antisenso potrebbero rappresentare una terapia complementare o alternativa alle precedenti.

Oltre alla cura dell'infiammazione, si sono tentati nuovi approcci complementari, ad esempio per favorire la rigenerazione tissutale. FGF-7 e FGF-10 sono potenti mitogeni e fattori di differenziazione per le cellule epiteliali: sono in grado di favorire la rigenerazione del tessuto in tutto l'intestino e si sono dimostrati efficaci nel limitare il danno tissutale in modelli animali di CD (*Khan, 1997; Miceli, 1999*).

Trattamento chirurgico

Nell'UC l'asportazione chirurgica del colon (colectomia) può essere un utile strumento terapeutico, soprattutto in quelle situazioni più gravi e in quelle in cui i farmaci siano risultati inefficaci. In seguito alla resezione del colon, il paziente mostra miglioramenti nei sintomi e ridotto rischio di CRC associato a UC (*Mattar, 2011*), sebbene siano possibili complicanze postoperatorie (*Ma, 2012*).

La colectomia e gli altri interventi chirurgici sono solo temporaneamente efficaci nella malattia di Crohn e possono invece portare a riacutizzazioni dei sintomi, a causa dell'ampia distribuzione dello stato patologico lungo tutto il sistema gastrointestinale (*Lewis, 2012*)

Il trattamento chirurgico nella CD è, quindi, riservato ai pazienti refrattari a qualsiasi terapia farmacologica o che hanno sviluppato complicanze potenzialmente mortali. L'intervento è necessario in caso di fistule, ascessi gravi, ostruzione parziale o totale dell'alvo, presenza di tumori e ritardo nella crescita nei bambini. In caso di ulcere perforanti o emorragie, l'operazione deve essere eseguita con la massima urgenza per salvare la vita del paziente.

LA SEROTONINA (5-HT)

La serotonina o 5-idrossitriptamina (5-HT) è una monoamina che regola un elevato numero di funzioni dell'organismo e sintetizzata a partire dall'aminoacido L-triptofano grazie all'attività della triptofano idrossilasi (TpH). Tale enzima esiste in due isoforme con una diversa distribuzione a livello tissutale: TpH di tipo 1, principalmente presente a livello delle cellule enterocromaffini (EC) e della milza e TpH di tipo 2, espressa nel cervello e nel plesso mienterico.

In seguito a questa prima reazione, per attività della 5-idrossi-L-triptofano decarbossilasi, si ha una decarbossilazione e formazione della 5-HT, che viene stoccata nelle cellule in vescicole, in maniera tale da poter essere velocemente liberata per degranulazione/esocitosi (*Figura 10*).

Altrettanto velocemente avviene il blocco della sua azione, attraverso il reuptake attivo della molecola, carica positivamente, da parte di uno specifico trasportatore che prende il nome di SERT. L'attività di questa proteina è influenzata da vari fattori: per esempio, uno stato infiammatorio, nel quale si ha un aumentato rilascio di mediatori pro-infiammatori come $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ causa una minore attività ed espressione dei SERT (*Foley, 2006*).

L'effetto pleiotropico attribuibile alla 5-HT va ricercato nell'elevato numero di recettori che la riconoscono, suddivisi in 7 sottotipi principali diversi: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇. Essi sono localizzati prevalentemente nel sistema nervoso centrale e periferico, nell'intestino, sulla muscolatura liscia, a livello piastrinico e delle cellule immunitarie.

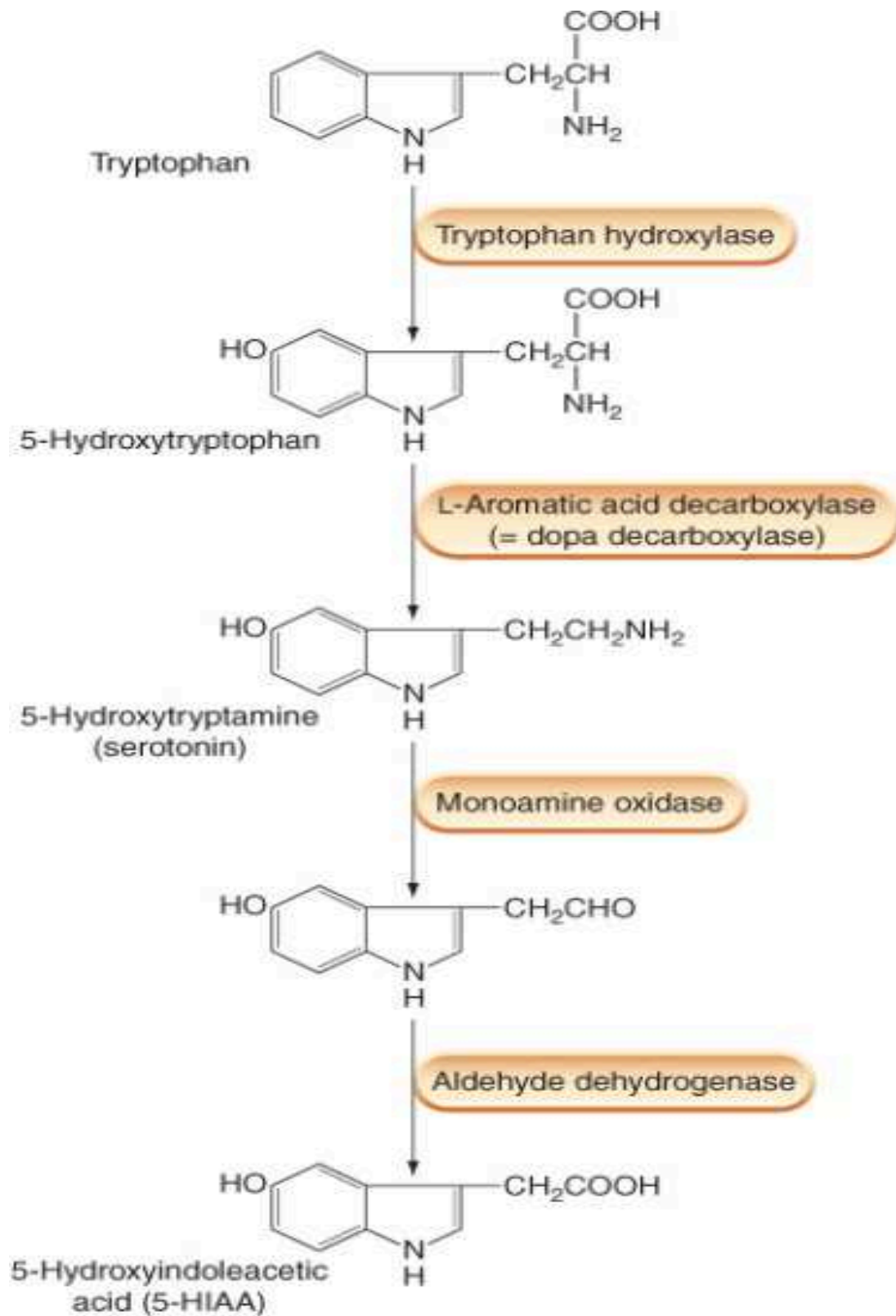


Figura 10: Sintesi e degradazione della serotonina (Rang, 2008).

Il solo recettore ionotropico è il recettore 5-HT₃, mentre gli altri sottotipi sono recettori metabotropici accoppiati a diversi tipi di proteine G e costituiti da 7 domini transmembrana.

Recettore 5-HT₁

Insieme al recettore 5-HT₅, è accoppiato negativamente all'adenilato ciclasi, comportando una diminuzione di AMP ciclico (cAMP) all'interno della cellula e quindi ad un'inibizione dell'attività della cellula stessa. Principalmente espresso a livello del SNC e dei vasi sanguigni, è implicato in un elevato numero di effetti, sia legati alla sfera emozionale che al controllo pressorio. Questo sottotipo recettoriale è a sua volta distinguibile in ulteriori 6 isoforme, di cui il sottotipo 1A ed 1P sono espressi anche a livello gastrointestinale. Il recettore 5-HT_{1A} è espresso a livello presinaptico nei neuroni del plesso sottomucoso e mienterico, e funge da auto ed eterorecettore inibitorio sia sulla neurotrasmissione eccitatoria di tipo veloce, sia su quella lenta, causando una riduzione nel rilascio di 5-HT ed altri neurotrasmettitori (*De Ponti, 2004*).

Recettore 5-HT₂

Si tratta di recettori accoppiati ad una proteina G₁₁ la cui attivazione è accoppiata positivamente alla via degli inositidi, ed in seguito alla sua attivazione si ha un aumento dell'inositolo-3-fosfato e del diacilglicerolo. Questo recettore è espresso a livello del SNC, piastrine, vasi sanguigni, muscolatura e tratto gastrointestinale. Come avviene per il recettore 5-HT₁, anche questo sottotipo recettoriale è suddiviso in 3 isoforme: A, B e C, e tutti i recettori 5-HT₂ sono di tipo eccitatorio sia a livello centrale che periferico.

Il recettore 5-HT_{2A} è prevalentemente espresso a livello delle cellule muscolari lisce del tratto gastrointestinale, ma è anche presente a livello degli enterociti, neuroni mienterici e submucosali, e la sua attivazione causa la secrezione della mucosa (*Bonaventure, 2005*) e la contrazione muscolare digiunale (*Kuemmerle, 1995*).

Recettore 5-HT₃

In seguito alla sua attivazione si ha l'apertura del canale e l'entrata a livello cellulare di Na⁺ e K⁺, promuovendo l'attivazione cellulare. È principalmente espresso a livello del SNC e a livello gastrointestinale, ed in quest'ultimo distretto è localizzato sui neuroni dei plessi mienterico e sottomucosale e sui terminali delle vie EPANs; media l'attività pacemaker delle cellule di Cajal (*Wouters, 2007*) e la trasmissione eccitatoria veloce (*Gershon, 2007*). L'attivazione di questo recettore è quindi associata ad un effetto procinetico e stimolante le secrezioni intestinale.

Inoltre gioca un ruolo fondamentale nel trasporto delle informazioni dolorifiche dal distretto viscerale al SNC (*Mori, 2004*), rendendo utili antagonisti di questo recettore nel trattamento di patologie viscerali dolorifiche associate ad un'eccessiva attività intestinale.

Recettore 5-HT₄

Questo recettore è accoppiato positivamente all'adenilato ciclasi e promuove l'attivazione cellulare. È espresso principalmente a livello neuronale a livello intestinale, e più precisamente a livello presinaptico degli IPANs submucosali. L'attivazione di questo recettore ha un effetto facilitatorio nei confronti dell'attività motoria gastrointestinale, facilitando la propagazione ed il mantenimento dell'evento peristaltico

tramite il rilascio di Acetilcolina e CGRP e stimolando gli interneuroni ascendenti e discendenti. Questo recettore presenta anche un'attività pro-secretoria a livello dei neuroni enterici submucosali e degli enterociti (*Gershon, 2007*). E' anche espresso a livello delle cellule muscolari lisce del tratto gastrointestinale, favorendo il rilasciamento gastrico e del colon (*Komada, 2007*).

Recettore 5-HT₅

Come accadeva per il recettore 5-HT₁, questo recettore è accoppiato negativamente all'adenilato ciclasi. Principalmente localizzato a livello del SNC, regola la locomozione e i cicli sonno/veglia tramite la sua funzione di autorecettore sulle terminazioni serotoninergiche cerebrali. È ulteriormente suddiviso in due isoforme, benché il recettore 5-HT_{5B} sia stato per ora caratterizzato solo a livello murino (*Matthes, 1993*).

Recettore 5-HT₆

Questo recettore è accoppiato positivamente all'adenilato ciclasi. È espresso principalmente a livello del SNC, ed in particolare a livello della corteccia cerebrale, nucleo accumbens, striato, nucleo caudato, ippocampo e cervelletto, con ruolo di controllo su funzione motoria, cognizione, memoria, ansia e stati d'animo. In quanto recettore di natura eccitatoria, quando è spesso espresso su terminazioni di tipo GABAergico, causa in seguito a stimolazione un effetto inibitorio generale. Agonisti di questo recettore, infatti, causano un aumento nell'attività GABAergica, mentre un blocco di questi recettori causa un incremento nella secrezione glutammatergica e colinergica (*Dawson, 2000*).

Recettore 5-HT₇

Quest'ultimo recettore per la 5-HT è accoppiato positivamente all'adenilato ciclasi e, insieme al recettore 5-HT₅ e 5-HT₆, è di più recente scoperta. È localizzato a livello del SNC, vasi sanguigni e tratto gastrointestinale. In quest'ultimo distretto è espresso a livello degli IPANs mienterici e submucosali, nei neuroni discendenti e a livello del muscolo liscio del tratto ileale (*Tonini, 2005*), determinando la trasmissione eccitatoria postsinaptica lenta ed il rilascio dell'ileo e del colon (*Carter, 1995*).

LA SEROTONINA ED IL TRATTO GASTROINTESTINALE

A livello gastrointestinale, insieme all'acetilcolina, la serotonina è uno dei principali mediatori, coinvolta nella regolazione dell'omeostasi intestinale, sia in termini di motilità, secrezioni, percezioni. Stimoli meccanici o chimici intraluminali attivano le cellule enterocromaffini (EC), con conseguente liberazione di 5-HT. Una volta rilasciata, questa sostanza agisce sia da neurotrasmettitore che da agente paracrino, portando all'attivazione delle fibre nervose, della muscolatura liscia o delle ghiandole presenti a livello della mucosa, agendo su 5 dei sottotipi recettoriali (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇) (*Gershon, 2007*) (*Figura 11*).

La 5-HT liberata stimola sia gli IPANs submucosali sia quelli mienterici, che a loro volta portano all'attivazione di interneuroni ascendenti e discendenti e dei motoneuroni. Il rilascio di 5-HT va anche ad influenzare l'attività delle cellule di Cajal, cellule che regolano la ritmicità

dell'attività intestinale, regolando l'attività elettrica muscolare e partecipando alla trasmissione neuromuscolare (Wouters, 2007). Inoltre, la 5-HT rilasciata dalla cellula EC porta all'attivazione della risposta neuronale estrinseca, fenomeno fondamentale per la trasmissione delle percezioni viscerali a livello centrale (Beattie, 2008).

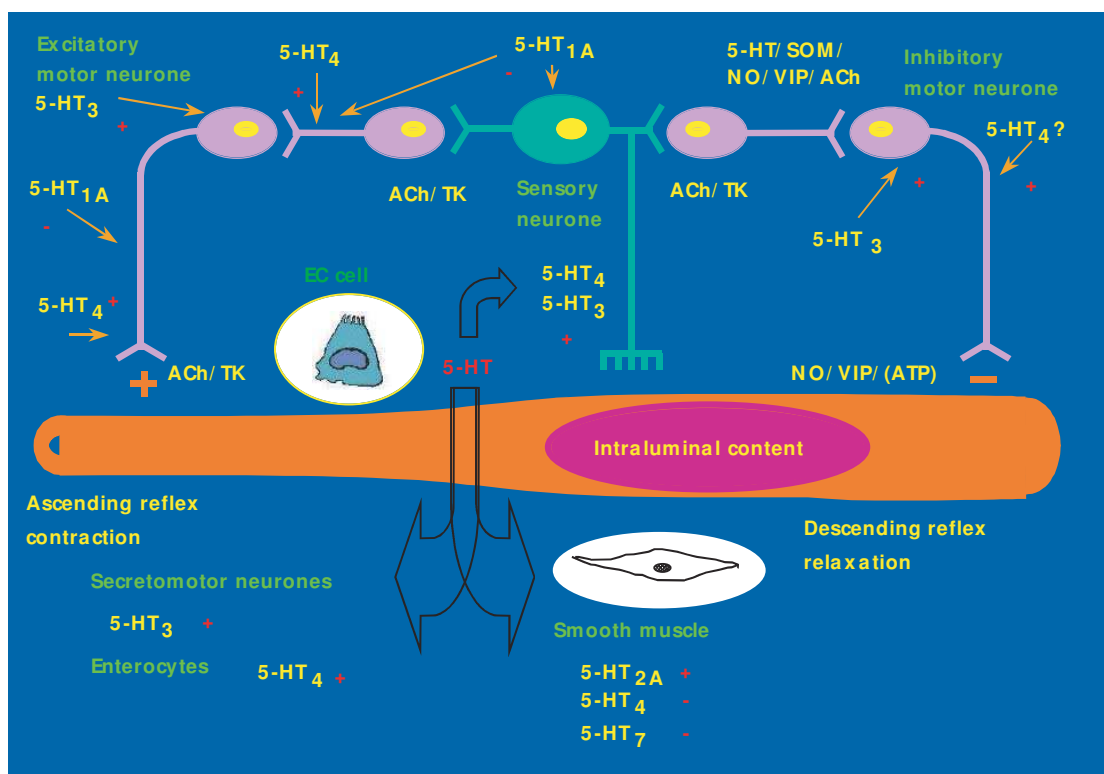


Figura 11: Rappresentazione del network neuronale serotoninergico a livello intestinale (De Ponti, 2004).

Alterazioni a livello del sistema serotoninergico sono alla base di diversi disordini del tratto gastrointestinale, e la compensazione di questi disordini tramite l'utilizzo di agenti esterni che bersagliano i 5-HTRs sono alla base della terapia farmacologica moderna. I principali agenti serotoninergici utilizzati in clinica sono gli antagonisti del recettore 5-HT₃ e gli agonisti del recettore 5-HT₄ (De Ponti, 2004).

Oltre al loro effetto antiemetico, gli antagonisti 5-HT₃ sono utilizzati nel trattamento di forme diarroiche di Irritable Bowel Disease (IBS), in virtù della diminuzione della motilità e delle percezioni viscerali a livello intestinale che essi provocano. Gli agonisti del recettore 5-HT₄, invece,

sono utilizzati da procinetici, sostanze che facilitano lo svuotamento gastrico ed intestinale, e la loro principale applicazione è il trattamento di IBS con stipsi.

LA SEROTONINA ED IL SISTEMA IMMUNITARIO

Tra l'elevato numero di azioni svolte dalla 5-HT un ruolo particolarmente importante è quello svolto a livello del sistema immunitario. Vari studi hanno dimostrato la presenza di recettori serotoninergici e SERT a livello di tutte le cellule immunitarie (*Figura 12*).

L'effetto di questo neurotrasmettitore è tale che la sola iniezione a livello sottocutaneo ha un effetto chemiotattico su mastociti ed eosinofili, promuovendone l'adesione di queste cellule in animali che esprimono il recettore 5-HT_{1A} (*Kushnir-Sukhov, 2006*). Stesso effetto si è riscontrato per i macrofagi, oltre ad un aumento della fagocitosi e del rilascio di citochine. In entrambe i casi, questi effetti sembrano essere imputabili ai recettori 5-HT₁ e 5-HT₂. Questi stessi recettori promuovono anche l'attività delle cellule dendritiche, cellule fondamentali per l'attivazione linfocitaria.



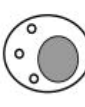




	 Eosinophil	 Mast cell	 Natural killer cell	 Macrophage	 Dendritic cell	 T cell	 B cell
Cell function	Antiparasitic, Antiviral, Secretory granules	Antiparasitic, Secretory granules	Innately cytotoxic	Phagocytotic, Antigen presentation	Antigen presentation to naïve T cells	Cell mediated immunity	Secrete antibodies
5-HT synthesis and transport		TPH-1 SERT	SERT? [10]	TPH-1 [6]	SERT [3]	TPH-1 [3,5]	SERT [4]
5-HT receptors and signaling	5-HT _{2A} R [8] Chemotaxis	5-HT _{1A} R [7] Chemotaxis	SSRIs [10] Increase cytolytic function	5-HT _{1A} R [6] Phagocytosis 5-HT _{2A} R [9] Chemokines	5-HT _{1B} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{2B} Rs [12,13] Chemotaxis 5-HT ₄ , 5-HT ₇ Rs [12,13] Chemokines	5-HT ₇ , 5-HT _{1B} , 5-HT _{2A} Rs [6,16,17] Proliferation	5-HT ₃ R [21-23] Unknown SSRIs [11,19,20] Apoptosis

Figure 12: Ubicazione dei 5-HTR a livello delle cellule immunitarie (Ahern, 2011).

Non solo il sistema dell'immunità innata, ma anche l'immunità adattativa è influenzata dall'attività della 5-HT: l'attività linfocitaria sembra essere stimolata da serotonina, ed in maniera particolare quando viene attivato il recettore 5-HT₁ (*Ahern, 2011*).

Evidenze importanti che suffragano questa ipotesi sono state portate dagli studi svolti da Aune. Aune ha dimostrato, infatti, che a livello dei linfociti T helper è presente il recettore 5-HT_{1A}, iper-espresso in seguito all'attivazione di questa classe di linfociti e responsabile di incremento nella proliferazione e rilascio di citochine (*Aune, 1993; Aune, 1994*)

Inoltre, è stato dimostrato che diverse cellule immunitarie, tra cui mastociti, macrofagi e linfociti, in seguito alla loro attivazione e degranulazione, secernono, oltre che citochine, prostaglandine ed istamina, anche la serotonina. Queste evidenze mostrano come la 5-HT giochi un ruolo importante anche nel controllo dell'omeostasi della risposta immunitaria.

LA SEROTONINA E LE IBD

Alcune evidenze cliniche e sperimentali sembrano suggerire il coinvolgimento della 5-HT nella patogenesi e nel mantenimento dello stato infiammatorio delle IBD.

È noto che in seguito ad un'inflammatione cronica, si ha una perdita di funzionalità tissutale che non intacca solo la muscolatura, ma anche il plesso nervoso: durante le IBD, infatti, l'intestino è sottoposto a alterazioni strutturali e funzionali importanti: ipertrofia ed iperplasia delle fibre nervose (*Dvorak, 1985*), iperplasia delle cellule neuronali, degenerazione e necrosi assonale (*Mertz, 2003*), alterazione della

percezione e della motilità intestinale (*Annese, 1997*) sono state registrate in pazienti affetti da questa patologia e da studi su modelli animali.

Sono state inoltre registrate alterazioni nel normale rilascio di neurotrasmettitori: un forte aumento nella sintesi e nel rilascio di serotonina è stato registrato a livello di tessuti di animali in cui è stata indotta la colite e da EC provenienti da pazienti affetti dal CD (*Linder, 2005; Depoortere, 2002*).

Gli studi su modelli sperimentali di colite svolti da Bishoff hanno dimostrato come la 5-HT possa giocare un ruolo fondamentale nella severità dell'infiammazione. Animali KO per i SERT, il principale sistema di reuptake della serotonina, presentano un'infiammazione esacerbata a livello intestinale rispetto agli animali esprimenti tale proteina (*Bishoff, 2009*).

Gli studi svolti da Ghia dimostrano in maniera inequivocabile il ruolo fondamentale che questo neurotrasmettitore svolge nella patogenesi delle IBD: animali KO per il gene trascrivente la TpH1, e quindi con livelli estremamente bassi di 5-HT a livello intestinale, non sviluppano colite. Questi animali presentano livelli d'infiltrazione leucocitaria, citochine e danno intestinale uguale agli animali normali. Inoltre, la somministrazione d'idrossitriptofano, precursore della serotonina che viene a mancare negli animali TpH1^{-/-}, causa l'insorgenza di una risposta infiammatoria massiccia negli animali che si erano dimostrati resistenti, ed un'esacerbazione del danno negli animali che presentavano un fenotipo non modificato geneticamente, ulteriore prova del ruolo fondamentale svolto della serotonina nell'insorgenza delle infiammazioni intestinali (*Ghia, 2009*).

SCOPO DELLA RICERCA (I)

Sulla base delle evidenze sperimentali che attribuiscono alla 5-HT il ruolo di potenziale mediatore nella patogenesi e nel mantenimento del CD, dato il ruolo fondamentale svolto dai linfociti T_{h1} nella regolazione e mantenimento della risposta immunitaria cronica presente in tale patologia, e data la presenza del recettore 5-HT_{1A} nei linfociti, con ruolo attivante, come pure a livello intestinale, con ruolo di auto- ed etero-recettore inibitorio, primo scopo di questa ricerca è stato quello di accertare ed analizzare il ruolo giocato da questo recettore nel Morbo di Crohn.

Per compiere tale studio è stato utilizzato un modello murino acuto di colite da induzione chimica: tramite somministrazione intrarettale di acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico (TNBS), in soluzione al 50% di etanolo, è stata indotta la colite in topi trattati con un antagonista 5-HT_{1A} (WAY100135) ed un agonista (8-OH DPAT·HBr) di tale recettore.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE (I)

Gli animali sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. Topi normali (**N**): animali cui non è stata indotta la colite, ma è stata somministrata per via intrarettale e sottocutanea soluzione fisiologica 10 ml/kg;
2. Topi controllo (**C**): animali in cui è stata indotta la colite, tramite somministrazione intrarettale di una soluzione 0.34 M di TNBS in 50% EtOH e trattati per via sottocutanea con soluzione fisiologica 10 ml/kg;
3. Topi (**W**): animali in cui è stata indotta la colite e trattati con l'antagonista del recettore 5-HT_{1A} WAY100135 al dosaggio di 5 mg/kg sottocute;
4. Topi (**O**): animali in cui è stata indotta la colite e trattati con l'agonista 5-HT_{1A}8-OH DPAT·HBr al dosaggio di 1 mg/kg sottocute.

Le somministrazioni dei vari agenti farmacologici o di soluzione fisiologica, iniziate un'ora dopo l'induzione della colite, sono state effettuate due volte al giorno per 3 giorni fino al giorno del sacrificio.

Sia il dosaggio del TNBS che quello degli agenti farmacologici testati, sono stati selezionati in seguito ad una serie di esperimenti preliminari.

RISULTATI (I)

ONSET DELLA PATOLOGIA

Il trattamento con l'agonista del recettore 5-HT_{1A} causa un rallentamento nello sviluppo della patologia intestinale.

Il modello da noi utilizzato per indurre la colite porta alla rapida insorgenza della patologia, che culmina 3 giorni dopo la somministrazione intrarettale di TNBS. L'insorgenza e il decorso della patologia sono stati quantificati attraverso il Disease Activity Index (DAI), marker ottenuto sommando i punteggi attribuiti a diversi parametri macroscopici (consistenza delle feci, perdita di peso e rettorragia).

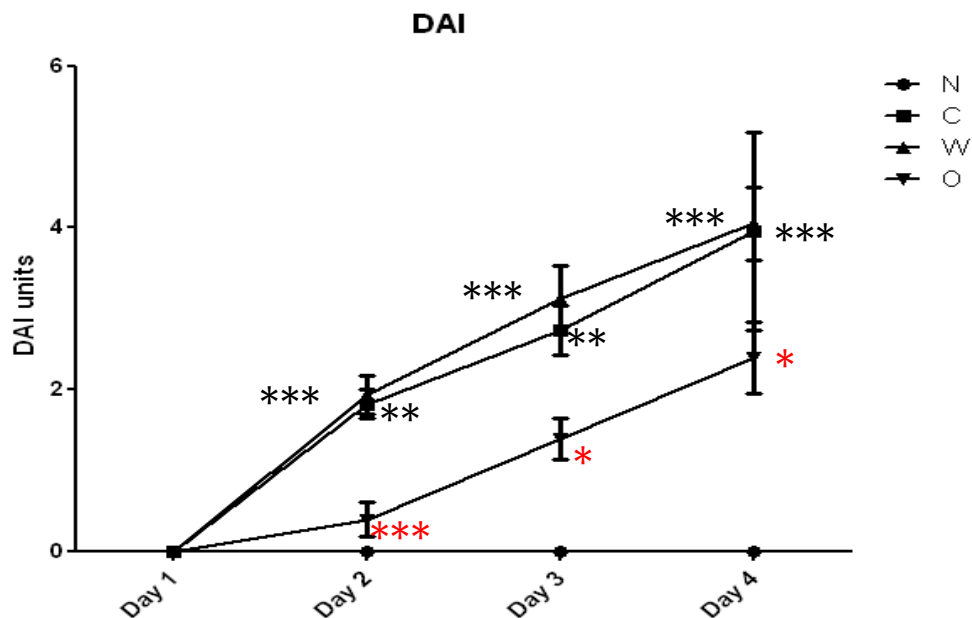


Figure 13: Valori di DAI misurati per tutta la durata della sperimentazione negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).

: $p < 0.01$; *: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunn).

Il gruppo **N**, gruppo in cui non è stata indotta la colite, presenta per tutta la durata del protocollo un punteggio DAI pari a 0 ± 0 (*Figura 13*). Negli animali in cui è stata indotta la colite, invece, si riscontrano due diversi andamenti:

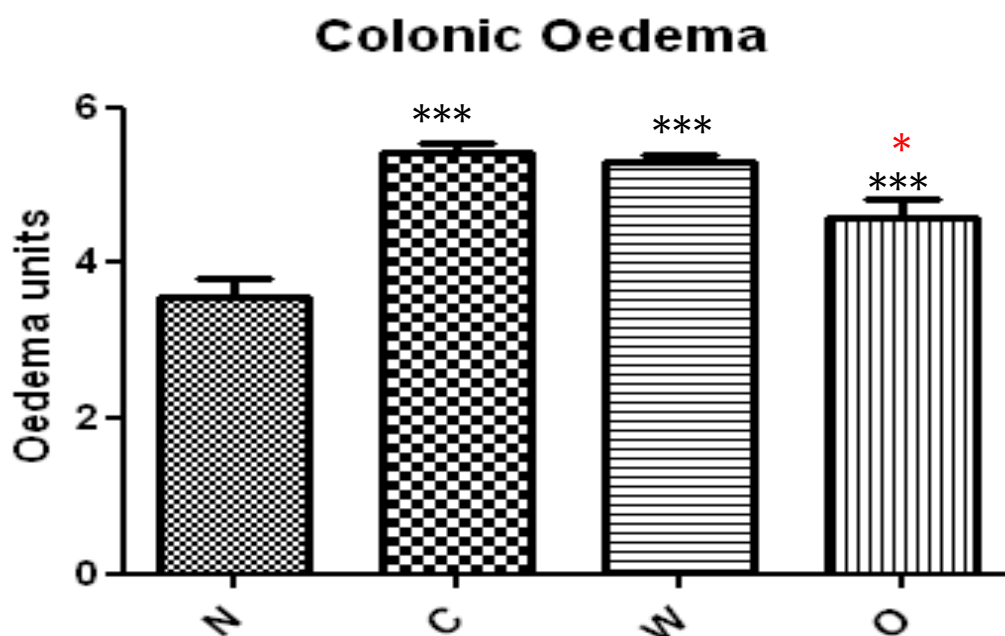
- un incremento veloce di questo parametro, indice di un elevato stato infiammatorio a partire dal giorno seguente l'induzione, condiviso dai gruppi **C** e **W**, per i quali il punteggio è sempre significativamente diverso dal gruppo **N** (rispettivamente DAI2 1.83 ± 0.17 , DAI3 2.74 ± 0.31 , DAI4 3.96 ± 0.26 ; DAI2 1.94 ± 0.23 , DAI3 3.12 ± 0.41 , DAI4 4.06 ± 0.45),
- un aumento graduale e parziale di tale parametro, presentato dagli animali del gruppo **O** (DAI2 0.39 ± 0.24 , DAI3 1.39 ± 0.33 , DAI4 2.39 ± 0.43), con valori DAI mai significativamente diversi rispetto al gruppo **N** ed al contempo sempre significativamente diversi rispetto al gruppo **C** (DAI2 $p < 0.001$, DAI3 $p < 0.05$, DAI4 $p < 0.05$).

I dati rivelano come il trattamento con WAY100135 non porta nessun beneficio nell'onset della patologia, mentre il trattamento con 8-OH DPAT·HBr rallenta l'insorgenza della patologia, diminuendo l'entità del danno macroscopico e dello stato di malessere degli animali.

PARAMETRI MORFOLOGICI

Il trattamento con l'agonista del recettore 5-HT_{1A} presenta un effetto protettivo nei confronti dell'infiammazione intestinale indotta da TNBS.

Lo stato infiammatorio severo dei tessuti intestinali è documentato dalle profonde variazioni morfologiche rilevabili come un aumento della permeabilità vascolare, deposizione di materiale amorfo, contrazione della muscolatura con accorciamento del tessuto e formazione di aree di stenosi, ulcerazioni ed eritema; questi effetti sono alla base della perdita di funzionalità tissutale. Al fine di valutare le alterazioni della morfologia colica, sono stati valutati edema (*Figura 14*), spessore (*Figura 15*), lunghezza (*Figura 16*) e Macroscopical Score (MS) (*Figura 16*) in questo distretto.



*Figure 14: Valori di edema colico misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT-HBr 1 mg/kg (O).
***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).*

L'induzione della colite causa negli animali un aumento significativo ($p < 0.001$) dei valori di edema tissutale rispetto a quelli degli animali del gruppo **N** (3.56 ± 0.25).

Tra i gruppi degli animali in cui è stata indotta la colite, i gruppi **C** e **W** mostrano valori simili (rispettivamente 5.43 ± 0.11 e 5.29 ± 0.09), mentre il gruppo **O** ha un valore tendenzialmente inferiore (4.8 ± 0.21), significativamente minore rispetto al gruppo **C** ($p < 0.05$) (Figura 14).



Figure 15: Valori di spessore colico misurati negli animali Normali (**N**), Controllo (**C**), trattati con WAY100135 5 mg/kg (**W**) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (**O**).
*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo **N**. **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo **C**. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

In seguito alla somministrazione intrarettale di TNBS si ha una forte deposizione di materiale amorfo a livello colico, che causa un aumento significativo ($p < 0.001$ per i gruppi **C** e **W**, $p < 0.05$ per il gruppo **O**) dello spessore del colon rispetto agli animali **N** (0.042 ± 0.002 g/cm).

Mentre il trattamento con l'antagonista 5-HT_{1A} causa un'ulteriore tendenza all'aumento nello spessore colico (0.076 ± 0.004 g/cm), la somministrazione dell'agonista 5-HT_{1A} porta ad una significativa ($p <$

0.01) diminuzione di questo parametro (0.055 ± 0.002 g/cm) rispetto al gruppo C (0.069 ± 0.003) (Figura 15).

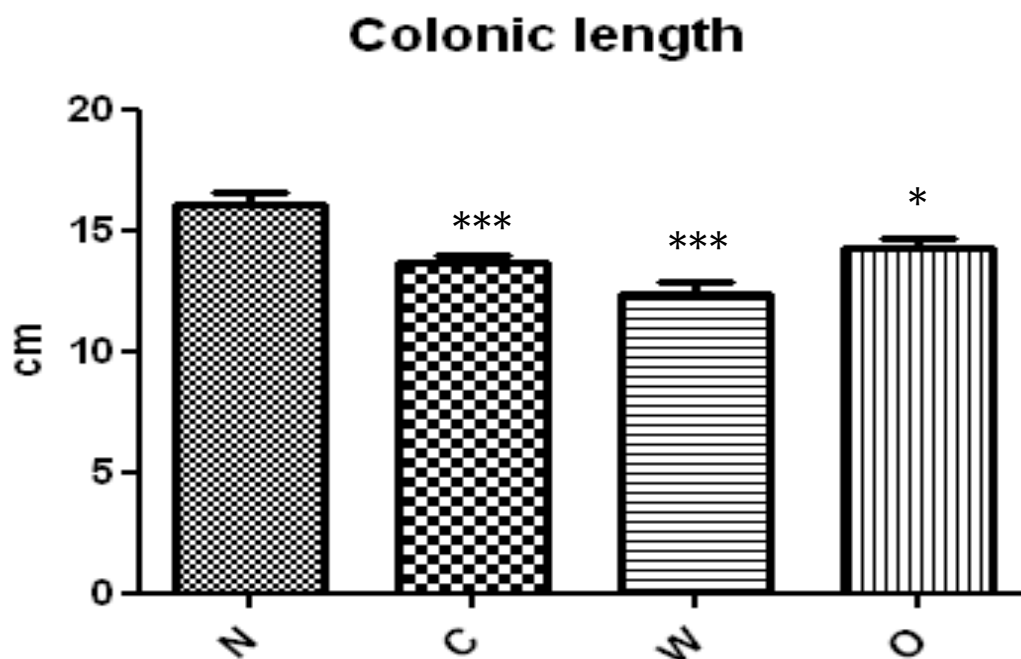
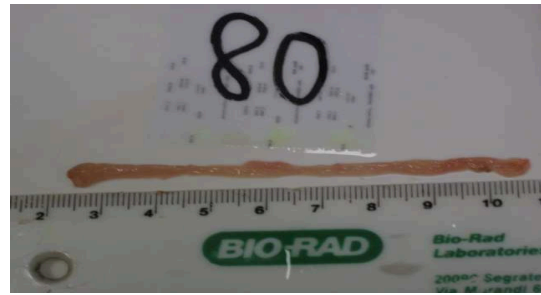


Figure 16: Valori di lunghezza colica e del cieco misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Anche per quanto riguarda la lunghezza del colon e del cieco, l'induzione della colite porta ad una significativa riduzione ($p < 0.001$ per i gruppi C e W, $p < 0.05$ per il gruppo O) rispetto ai valori del gruppo N (16.02 ± 0.56 cm). Il gruppo W presenta il massimo accorciamento colico (12.40 ± 0.45 cm), che supera anche ai valori del gruppo C (13.63 ± 0.32 cm), mentre il gruppo O si avvicina maggiormente ai valori del gruppo N (14.31 ± 0.37 cm) (Figura 16).



N1



N2



C1



C2



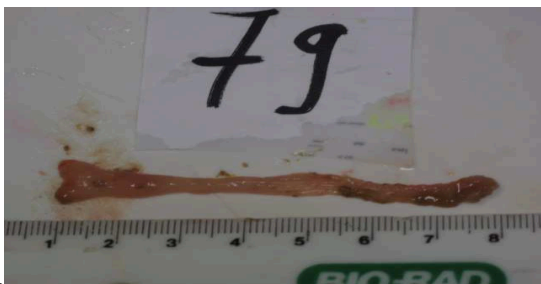
W1



W2



O1



O2

Figure 17: Fotografie dei colon chiusi (1) ed aperti (2) degli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT-HBr 1 mg/kg (O).

Come si può valutare dalle foto riportate in *Figura 17*, l'induzione della colite causa una perdita di funzionalità a livello colico, con la totale perdita della capacità della formazione di pellet fecali. Tale disfunzione è

da ricondurre alle alterazioni in precedenza descritte (edema, spessore e lunghezza coliche), e può essere associata alla formazione di aree edematose, ulcerazioni, zone di stenosi e presenza di emorragie negli animali trattati con TNBS. Queste variazioni sono state quantificate tramite la valutazione del parametro MS.

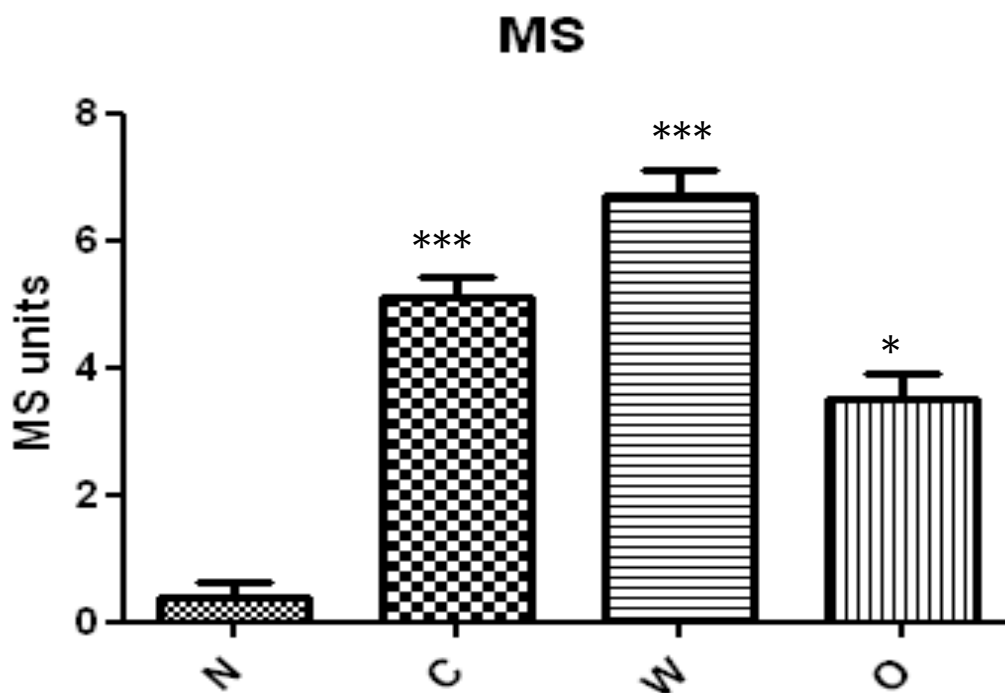


Figure 18: Valori di MS misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT-HBr 1 mg/kg (O).
*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

Come ci si poteva aspettare dalle immagini fotografiche del colon, l'induzione della colite causa un fortissimo aumento dei valori del MS. Infatti, mentre il gruppo N presenta un valore molto basso di MS (0.40 ± 0.22), dovuto ad animali che sporadicamente presentavano un leggero arrossamento colico, i gruppi C (5.09 ± 0.32), W (6.71 ± 0.42) e O (3.50 ± 0.47) hanno valori significativamente maggiori ($p < 0.001$ per C e W, $p < 0.05$ per O).

In particolare, vediamo nuovamente una tendenza al peggioramento nel gruppo trattato con WAY100135, dovuto ad un maggiore numero di ulcerazioni ed aree edematose, rispetto al gruppo C.

Il trattamento con 8-OH DPAT·HBr porta ad un limitato peggioramento dell'aspetto dell'organo, in cui mancano le ulcerazioni e sono presenti rare aree edematose, benché non vi sia un miglioramento significativo rispetto al gruppo C (*Figura 18*).

La valutazione di questi parametri conferma quanto visto in precedenza con l'analisi DAI, cioè un effetto protettivo della somministrazione dell'agonista 5-HT_{1A} (8-OH DPAT·HBr) e la tendenza ad un peggioramento dei sintomi indotti da questo modello sperimentale a seguito della somministrazione dell'antagonista di tale recettore (WAY100135).

PARAMETRI INFIAMMATORI LOCALI E SISTEMICI

Il trattamento con l'antagonista del recettore 5-HT_{1A} presenta un effetto esacerbante l'infiammazione indotta da TNBS.

Per valutare i possibili effetti dei vari trattamenti farmacologici sull'infiammazione, sono stati valutati alcuni marker, sia a livello colico (mieloperossidasi colica) che a livello sistemico (mieloperossidasi polmonare, edema polmonare ed epatico).

La mieloperossidasi (MPO) è un enzima presente nei lisosomi leucocitari, e la sua quantificazione permette di stimare l'infiltrazione tessutale dei polimorfonucleati, mentre la valutazione dell'edema anche in organi diversi dal colon, evidenziata come aumento della permeabilità vasale in

siti diversi dal sito infiammatorio primario, dimostra l'esistenza di uno stato infiammatorio sistemico.

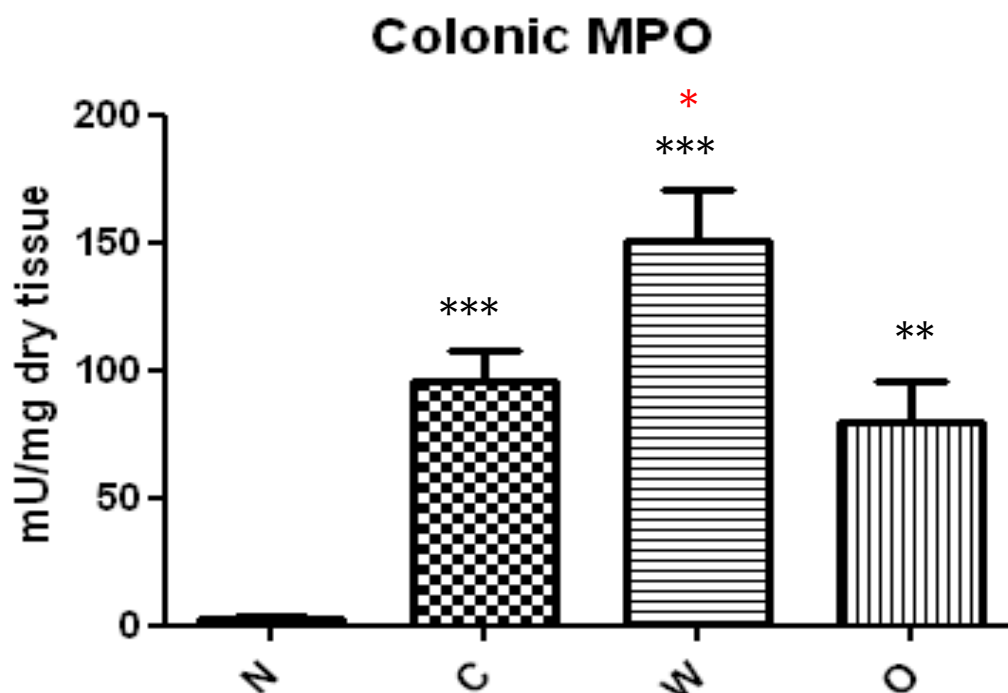


Figure 19: Valori di MPO colica misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).
: $p < 0.01$; *: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

L'attività MPO colica (Figura 19), nello stato non infiammatorio degli animali del gruppo N, è particolarmente bassa (2.66 ± 1.05 mU/mg dry tissue), ma cresce intensamente ed in maniera significativa negli animali con colite ($p < 0.001$ per i gruppi C 96.03 ± 11.90 mU/mg dry tissue e W, $p < 0.01$ per il gruppo O).

Si nota nel gruppo W un aumento significativo del valore di MPO (150.8 ± 20.3 mU/mg dry tissue) rispetto al gruppo C ($p < 0.05$).

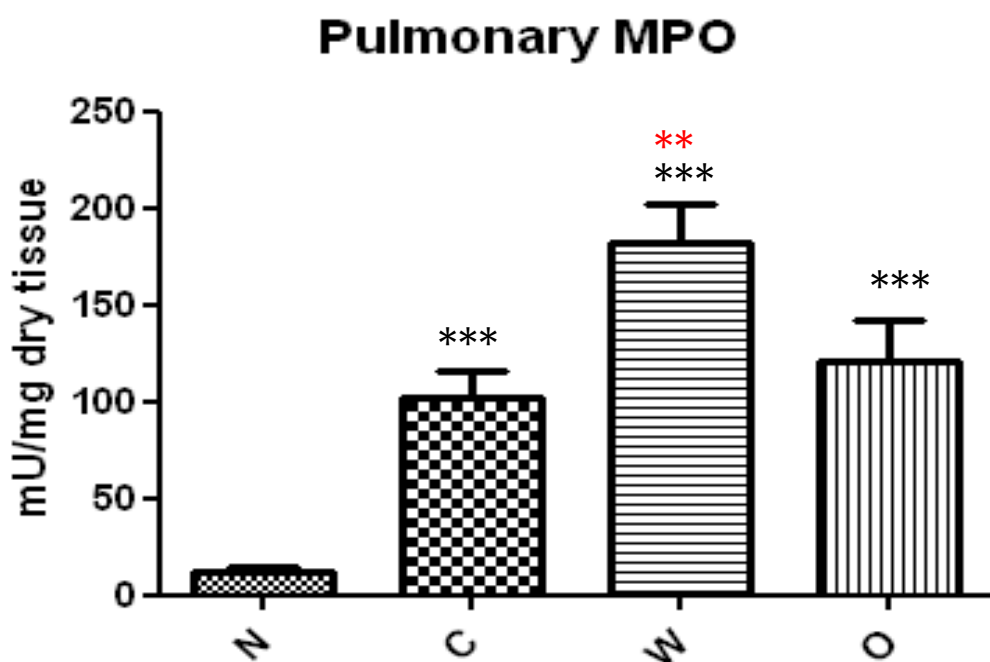


Figure 20: Valori di MPO polmonare misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT-HBr 1 mg/kg (O).

***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Un quadro simile emerge relativamente all'attività MPO a livello polmonare (Figura 20). Nuovamente i livelli degli animali del gruppo N si presentano particolarmente bassi (11.7 ± 2.4 mU/mg dry tissue), e significativamente inferiori ($p < 0.001$) rispetto agli animali dei gruppi C (102.3 ± 13.0), W (182.6 ± 19.7) ed O (116.1 ± 21.8).

Anche in questo caso il trattamento con WAY100135 causa un aumento significativo di questo parametro rispetto al gruppo degli animali controllo ($p < 0.01$) (Figura 20).

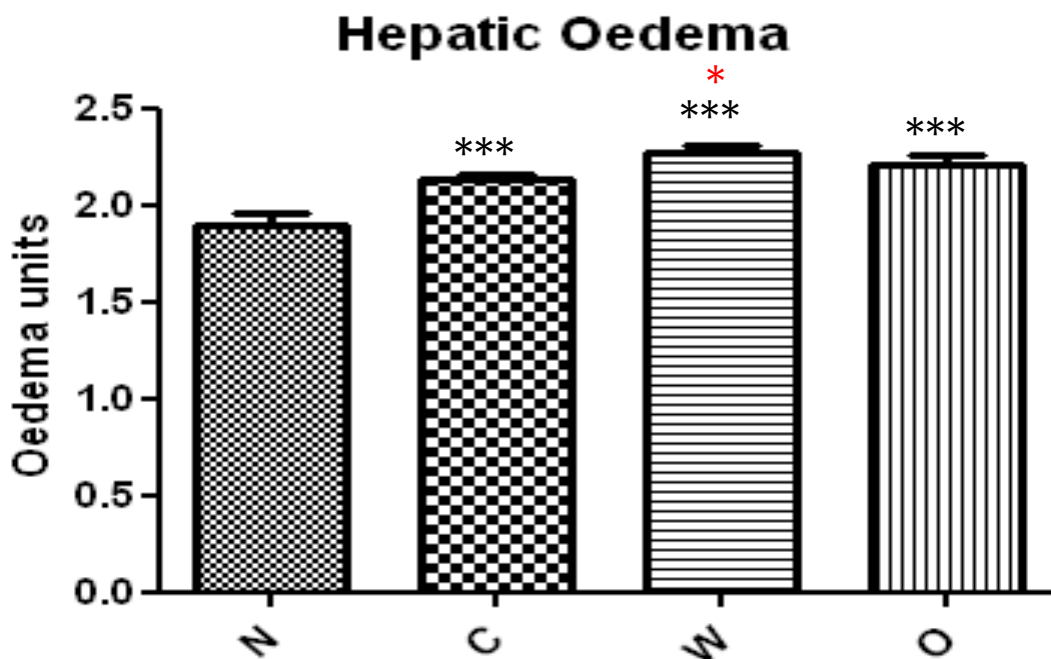


Figure 21: Valori di edema epatico misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).
 ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Ulteriore prova del danno sistemico indotto da questo modello di colite si ha quando si va a valutare l'edema epatico (Figura 21). Tutti i gruppi degli animali trattati con TNBS presentano valori di edema epatico significativamente superiori ($p < 0.001$) rispetto al gruppo N (1.89 ± 0.06). Il gruppo W, in particolare, presenta i valori più alti (2.27 ± 0.04), significativamente superiori ($p < 0.05$) al gruppo C (2.14 ± 0.03), mentre il gruppo O (2.21 ± 0.05) presenta valori più simili al gruppo controllo.

Pulmonary Oedema

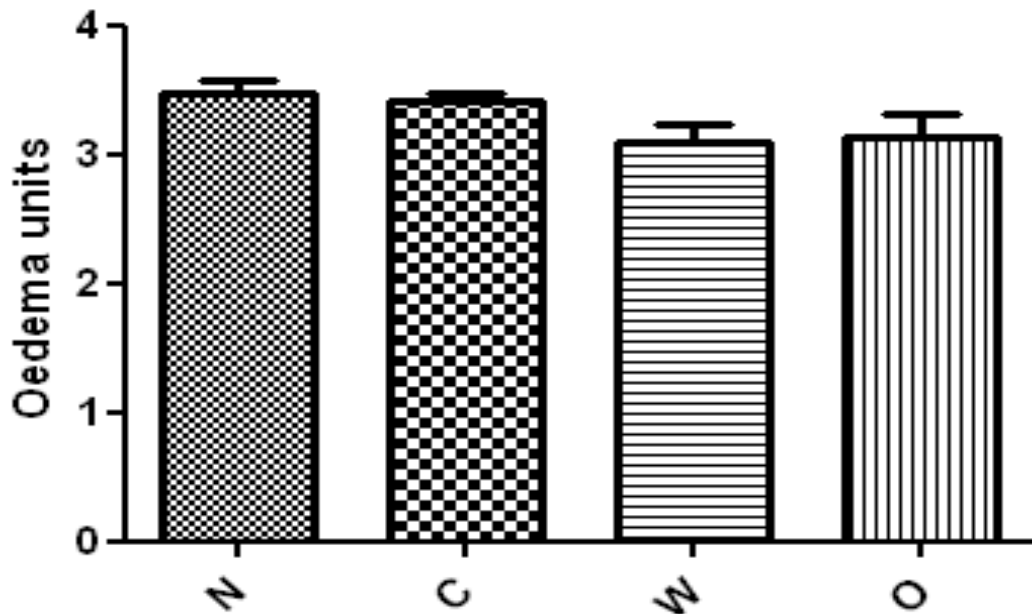


Figure 22: Valori di edema polmonare misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Per quanto riguarda i valori di edema polmonare (Figura 22), non si sono riscontrate variazioni significative rispetto al gruppo N (3.48 ± 0.09) per il gruppo C (3.42 ± 0.07), W (3.10 ± 0.13) od O (3.24 ± 0.17).

L'analisi di questi parametri mostra come, a differenza di quando si è osservato per i parametri di tipo morfologico, il trattamento con l'agonista 5-HT_{1A} 8-OH DPAT·HBr non migliora i parametri infiammatori rispetto al gruppo controllo, mentre il trattamento con WAY100135 causa un peggioramento, con un aumento dell'intensità dell'infiammazione, sia a livello topico (aumento dell'infiltrazione leucocitaria colica), sia a livello sistemico (aumento della MPO polmonare e dell'edema epatico), indice di un effetto pro-infiammatorio.

CITOCINE COLICHE E PLASMATICHE

I trattamenti farmacologici influiscono solo in maniera lieve sull'incremento delle concentrazioni di citochine associato alla colite da TNBS: la stimolazione 5-HT_{1A} attenua l'aumento delle concentrazioni coliche di TNF α e IL1 β , l'inibizione 5-HT_{1A} attenua l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di TNF α e IL1 β

Le citochine, rilasciate da varie cellule immunitarie, svolgono un ruolo fondamentale nel controllo dell'infiammazione, promuovendo o diminuendo il differenziamento ed il reclutamento di ulteriori globuli bianchi nel sito del loro rilascio.

Al fine di valutare lo stato infiammatorio in seguito all'induzione della colite e alla somministrazione degli agenti farmacologici testati, sono state quantificate a livello colico TNF α , interleuchina 1 β (IL1 β), IL10, interferone γ (IFN γ), IL4 ed IL2, e a livello plasmatico TNF α ed IL1 β .

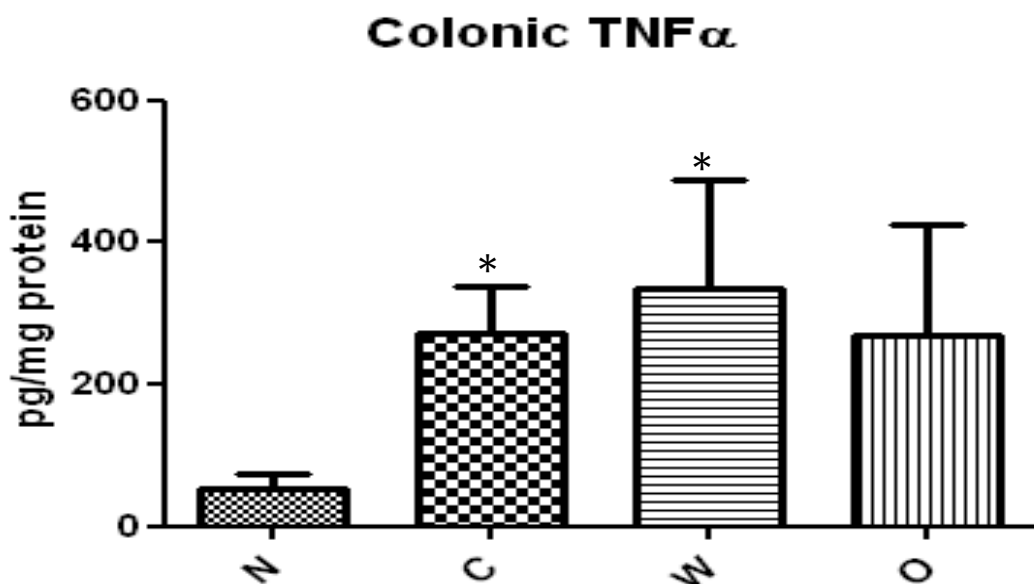


Figure 23: Valori di TNF α colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).

*: $p < 0.05$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

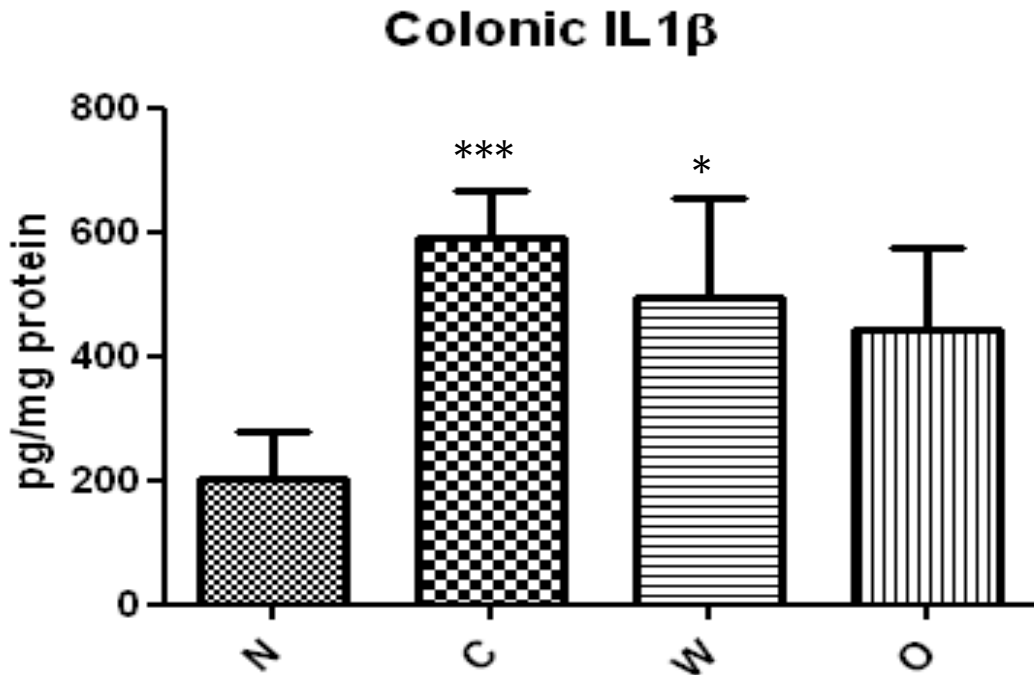


Figure 24: Valori di IL1 β colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

TNF α ed IL1 β , insieme alla IL6, sono le prime e principali citochine rilasciate durante l'infiammazione. L'induzione della colite causa un forte aumento della concentrazione tissutale di queste molecole (Figura 23 e 24), che è significativo per i gruppi C (271.8 ± 65.6 pg/mg proteine, $p < 0.05$ per il TNF α e 591.1 ± 76.3 pg/mg proteine, $p < 0.001$ per l' IL1 β) e W (333.5 ± 153.3 pg/mg proteine, $p < 0.05$ per il TNF α e 495.8 ± 160.2 pg/mg proteine, $p < 0.05$ per l' IL1 β) rispetto al gruppo N (53.43 ± 21.05 pg/mg proteine per il TNF α e 128.7 ± 27.7 pg/mg proteine per l' IL1 β), mentre si ha solo una tendenza all'aumento per il gruppo O (268.3 ± 156.5 pg/mg proteine per il TNF α e 442.6 ± 130.3 pg/mg proteine per l' IL1 β).

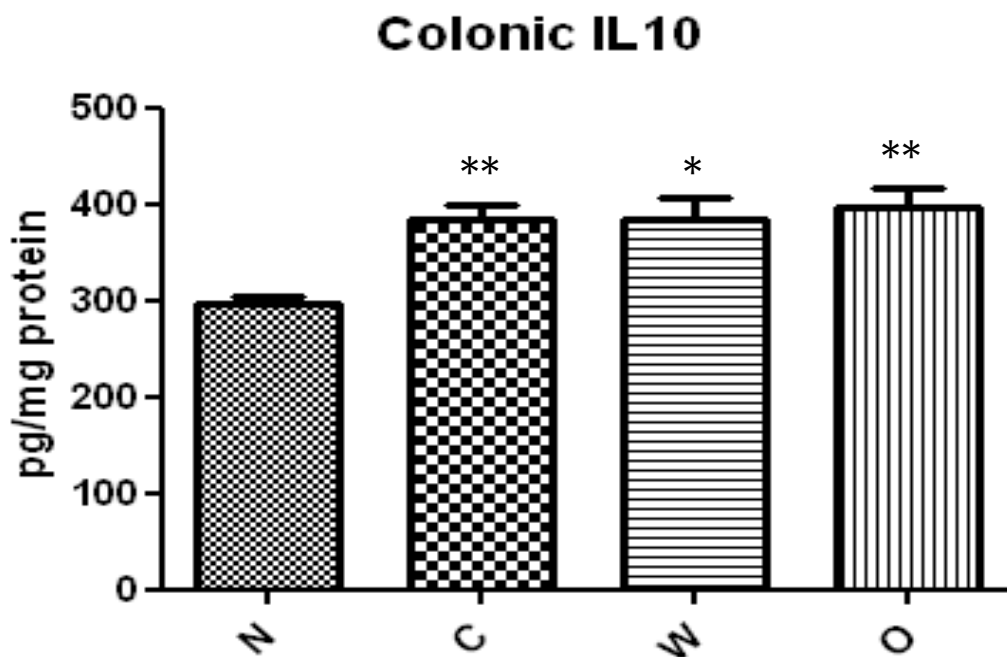


Figure 25: Valori di IL10 colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

L'IL10 è una citochina con ruolo anti-infiammatorio: questa citochina viene rilasciata al fine di controllare la risposta immunitaria ed impedire un'eccessiva risposta a possibili infezioni. Tutti gli animali sottoposti a somministrazione intrarettale di TNBS presentano livelli significativamente maggiori di questo parametro (384.9 ± 15.2 pg/mg proteine, $p < 0.01$ per il gruppo C, 383.7 ± 22.8 pg/mg proteine, $p < 0.05$ per il gruppo W e 395.6 ± 21.4 pg/mg proteine, $p < 0.01$ per il gruppo O) rispetto al gruppo N (297.0 ± 7.5 pg/mg proteine) (Figura 25).

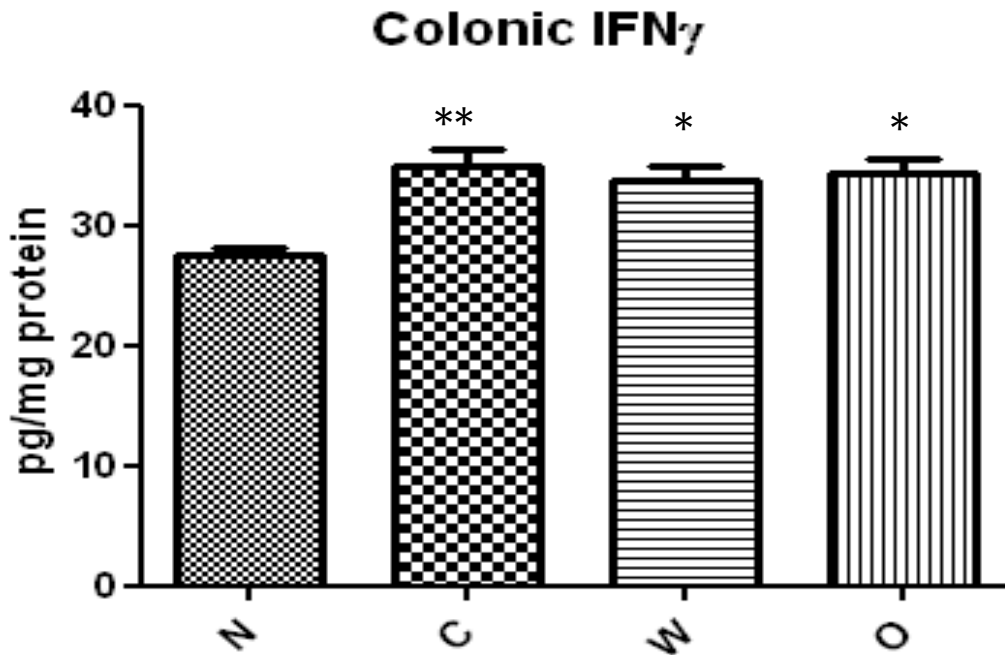


Figure 26: Valori di IFN γ colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).
 *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

L'interferone γ (IFN γ) è una delle principali citochine rilasciate durante un'inflammatione guidata da una risposta immunitaria di tipo T_{h1}. Anche in questo caso, l'induzione della colite ha causato un incremento significativo (34.93 ± 1.32 pg/mg proteine $p < 0.01$ per il gruppo C, 33.73 ± 1.12 e 34.29 ± 1.23 pg/mg proteine $p < 0.05$ per i gruppi W ed O) rispetto al gruppo N (27.48 ± 0.58 pg/mg proteine) (Figura 26).

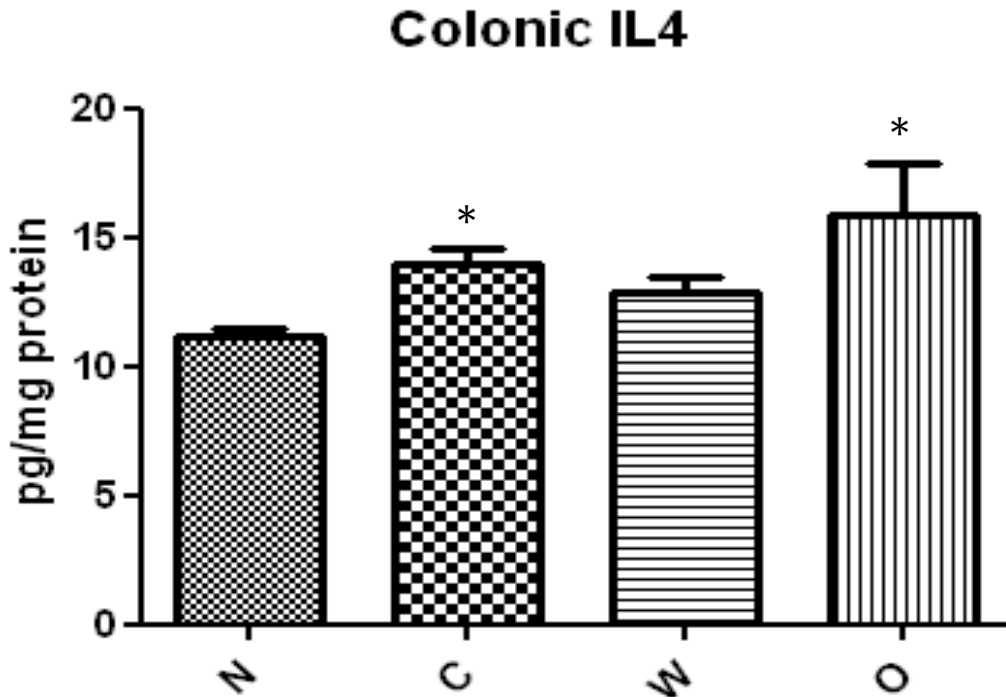


Figure 27: Valori di IL4 colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

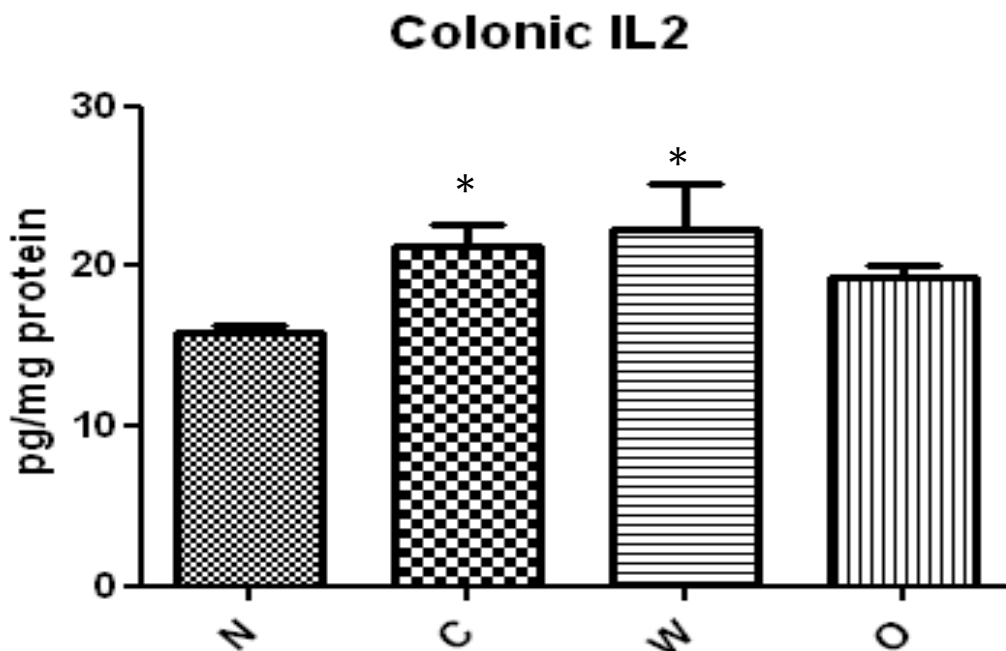


Figure 28: Valori di IL2 colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

IL4 ed IL2 sono due tra le principali citochine rilasciate durante una risposta infiammatoria guidata da una risposta immunitaria di tipo T_{h2} . Per entrambe le citochine si ha un aumento dei valori nei gruppi trattati con TNBS rispetto al gruppo N (11.13 ± 0.34 pg/mg proteine per l'IL4 e 15.85 ± 0.40 pg/mg proteine per l'IL2) (Figura 27 e 28).

Per quanto riguarda l'IL4, tale aumento è significativo ($p < 0.05$) per il gruppo C (13.98 ± 0.60 pg/mg proteine) ed O (15.86 ± 2.00 pg/mg proteine), ma non per il gruppo W (12.92 ± 0.56 pg/mg proteine).

Il quadro riguardante l'IL2 è leggermente diverso, infatti, si presentano valori significativamente aumentati ($p < 0.05$) rispetto al gruppo N per il gruppo C (21.30 ± 1.26 pg/mg proteine) e W (22.35 ± 2.74 pg/mg proteine), mentre solo una tendenza all'aumento per il gruppo O (19.24 ± 0.88 pg/mg proteine).

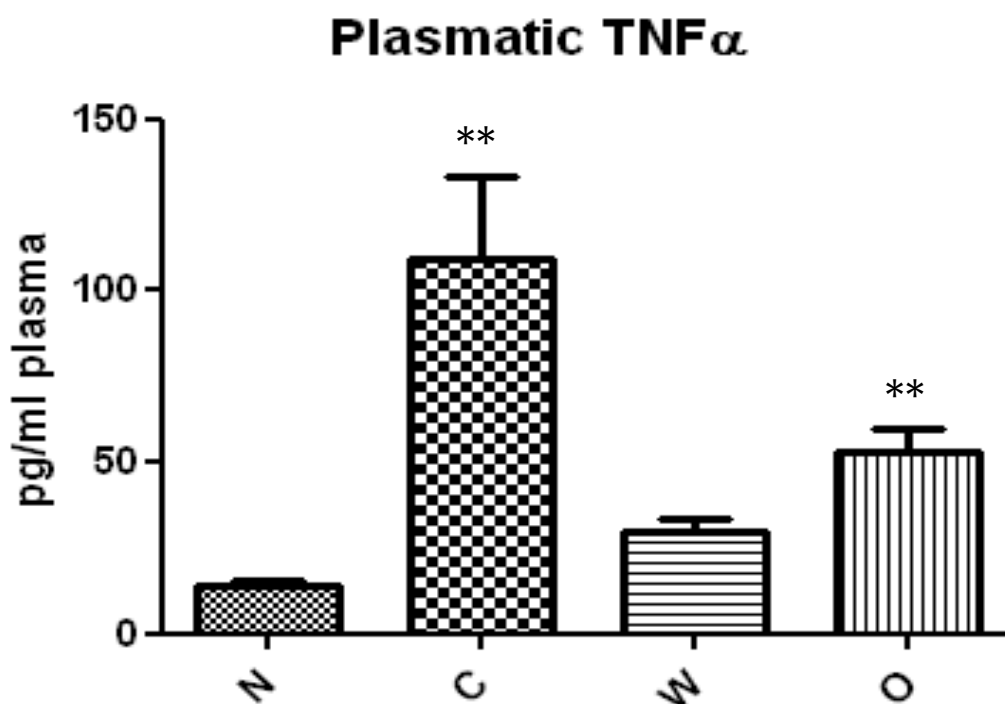


Figure 29: Valori di $TNF\alpha$ plasmatici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). **: $p < 0.05$ rispetto al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

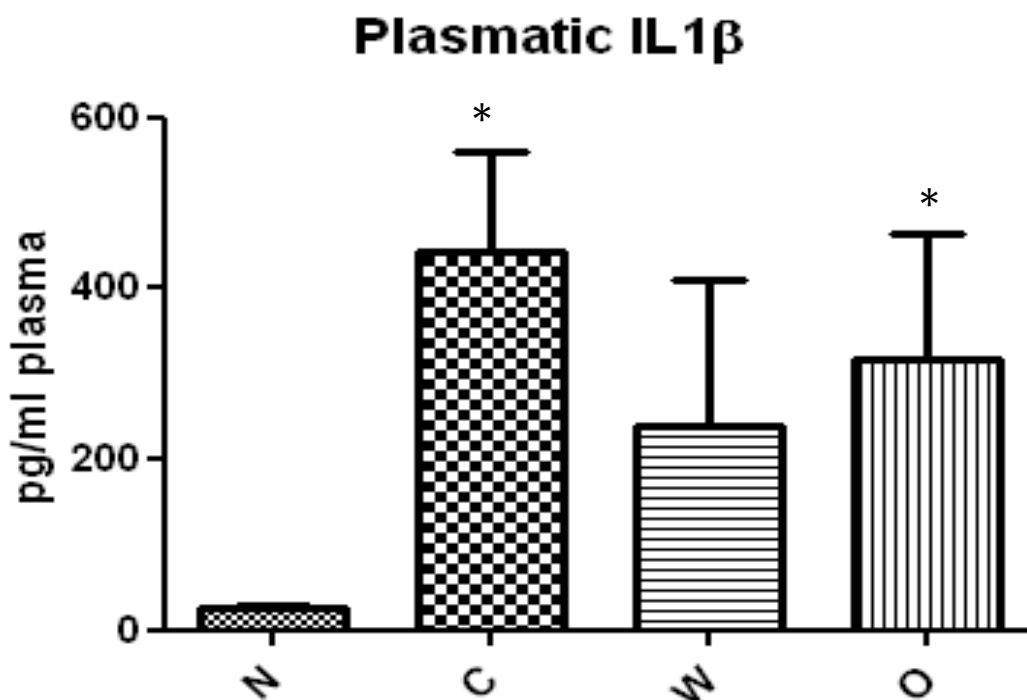


Figure 30: Valori di IL1 β plasmatici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT-HBr 1 mg/kg (O). *: $p < 0.05$ al gruppo N (ANOVA one way, Kruskal-Wallis test seguito dal post-test di Dunn).

Al fine di valutare lo stato infiammatorio anche a livello sistemico in seguito all'induzione della colite, sono state quantificate TNF α ed IL1 β a livello plasmatico (Figura 29 e 30). Anche a livello sistemico è stato riscontrato un forte aumento dei valori di queste citochine rispetto al gruppo N (rispettivamente 13.79 ± 1.93 e 25.45 ± 3.53 pg/ml plasma).

Per entrambe le citochine è stato riscontrato un significativo aumento nel gruppo C (109.1 ± 24.1 pg/ml plasma, $p < 0.01$ per TNF α e 443.6 ± 116.1 pg/ml plasma, $p < 0.05$ per IL1 β) e per il gruppo O (53.14 ± 6.43 pg/ml plasma, $p < 0.01$ per TNF α e 316.1 ± 148.4 pg/ml plasma, $p < 0.05$ per IL1 β) nei confronti del gruppo N, e solo una tendenza all'aumento per il gruppo W (30.04 ± 3.22 pg/ml plasma per TNF α e 239.9 ± 169.9 pg/ml plasma per IL1 β).

Entrambe i gruppi trattati con ligandi del recettore 5-HT_{1A} presentano livelli di queste citochine tendenzialmente inferiori rispetto al gruppo controllo, benché la variazione non risulti significativa.

MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE

Il trattamento con l'agonista 5-HT_{1A} limita l'incremento delle concentrazioni coliche di 5-HT, mentre il trattamento con l'antagonista 5-HT_{1A} aumenta i livelli plasmatici di NO.

Vari studi hanno dimostrato che, oltre a svolgere il loro ruolo di neurotrasmettitori, alcune sostanze hanno effetti chemiotattici e pro-infiammatori: NO, SP e 5-HT ne sono un esempio. Questi 3 mediatori giocano un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi intestinale, regolandone l'attività motoria e secretoria ed in un quadro clinico come quello della CD sono stati riscontrati squilibri nel rilascio di queste sostanze. La loro eccessiva secrezione potrebbe essere uno dei meccanismi alla base dell'esacerbazione ed il mantenimento dell'infiammazione a livello intestinale durante le IBD.

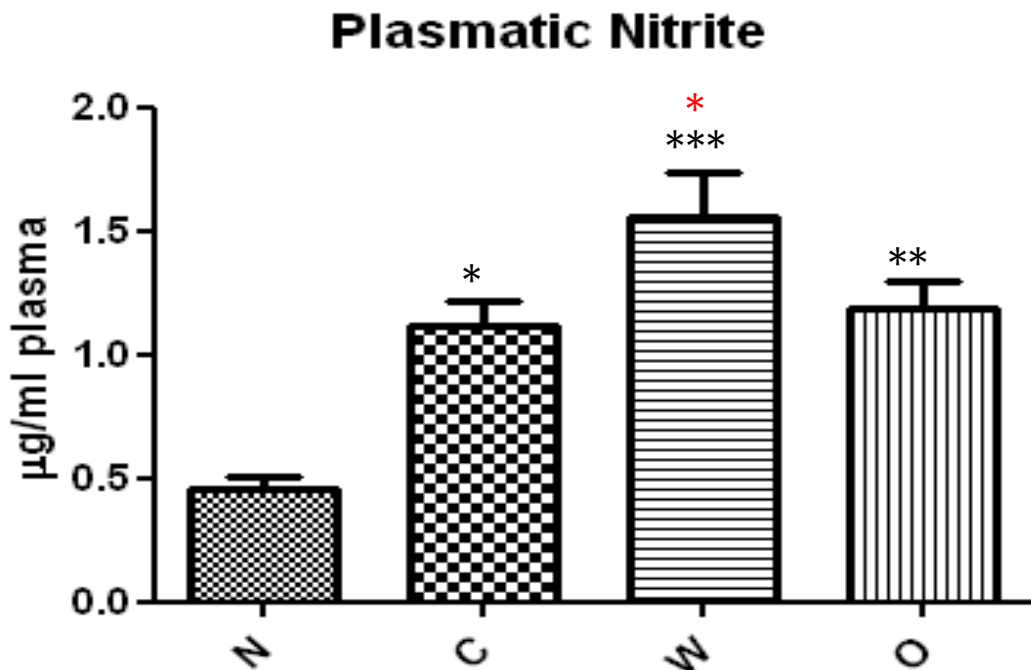


Figure 31: valori di nitriti plasmatici misurati negli animali **N**ORMALI (**N**), **C**ONTROLLO (**C**), trattati con WAY100135 5 mg/kg (**W**) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (**O**). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo **N**. *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo **C**. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

L'induzione della colite causa negli animali un significativo aumento (1.12 ± 0.10 µg/ml plasma $p < 0.05$ per il gruppo **C**, 1.26 ± 0.13 µg/ml plasma $p < 0.001$ per il gruppo **W** e 1.56 ± 0.18 µg/ml plasma $p < 0.01$ per il gruppo **O**) dei nitriti plasmatici (marker della quantità di NO rilasciato) rispetto ai valori del gruppo **N** (0.46 ± 0.05 µg/ml plasma) (Figura 31). L'incremento dai nitriti plasmatici negli animali trattati con WAY100135 è tale da essere significativamente maggiore anche rispetto ai valori del gruppo controllo ($p < 0.05$).

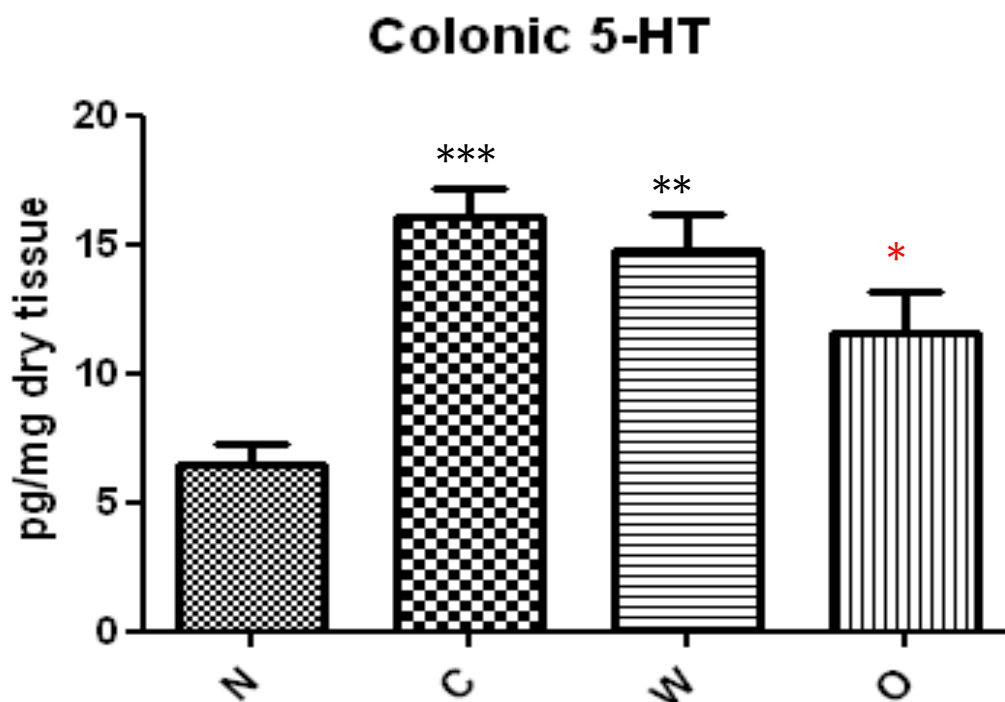


Figure 32: valori di 5-HT colici misurati negli animali *NORMALI* (N), *CONTROLLO* (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O).

** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. * : $p < 0.05$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Benché sia stato registrato un incremento in tutti i gruppi in cui è avvenuta la somministrazione intrarettale di TNBS (Figura 32), le concentrazioni tessutali di 5-HT raggiungono valori significativi dal punto di vista statistico solo per i gruppi C e W (rispettivamente 16.06 ± 1.07 pg/mg dry tissue, $p < 0.001$ e 14.74 ± 1.40 pg/mg dry tissue, $p < 0.01$) rispetto al gruppo N (6.48 ± 0.78 pg/mg dry tissue). Al contrario, il trattamento con 8-OH DPAT·HBr, previene tale incremento e porta a valori (11.15 ± 1.98 pg/mg dry tissue) significativamente inferiori rispetto al gruppo C ($p < 0.05$).

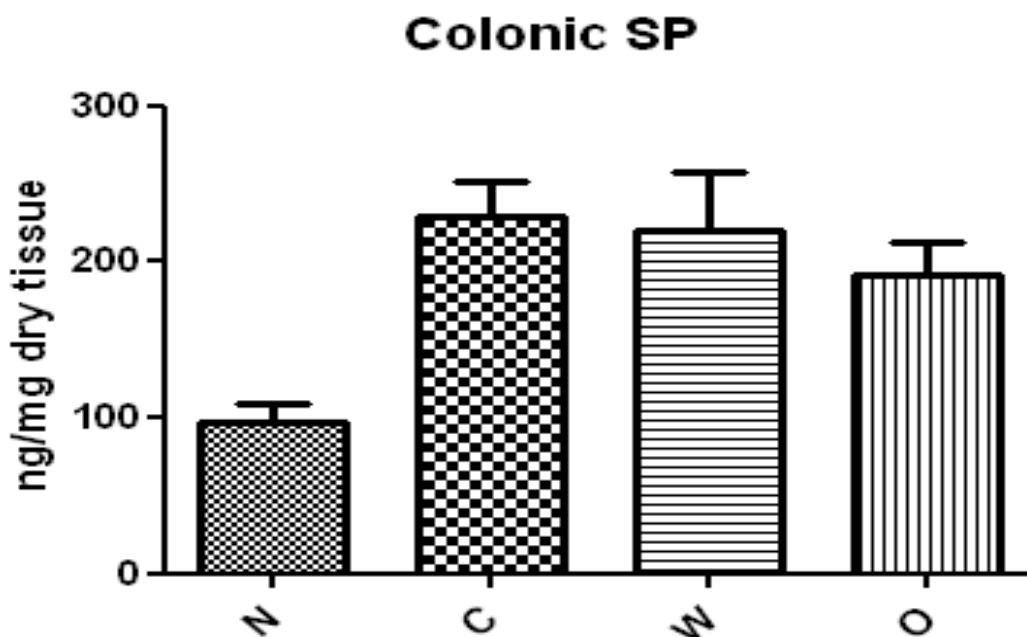


Figure 33: Valori di SP colici misurati negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con WAY100135 5 mg/kg (W) e 8-OH DPAT·HBr 1 mg/kg (O). (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Infine, sono stati quantificati i livelli colici di SP (Figura 33). L'induzione della colite è accompagnata da un aumento, non significativo, dei livelli tissutali di SP. L'incremento di questa proteina è comunque marcato in quanto tutti gli animali in cui è stata indotta la colite presentano un valore più che raddoppiato (C 260.9 ± 52.4 ng/mg dry tissue) rispetto a quello degli animali normali (N 99.36 ± 13.45 ng/mg dry tissue) mentre il gruppo O presenta valori inferiori (215.1 ± 25.0 ng/mg dry tissue) rispetto al gruppo controllo.

L'induzione della colite e la somministrazione dei ligandi 5-HT_{1A} ha causato variazioni nei livelli dei mediatori indagati. L'agonista 8-OH DPAT·HBr ha limitato l'incremento delle concentrazioni coliche di 5-HT, mentre l'antagonista WAY100135 ha aumentato i livelli plasmatici di NO, rispetto allo stato di colite.

CONCLUSIONI (I)

In questa prima parte della ricerca, si è voluto valutare il ruolo svolto dal recettore 5-HT_{1A} nell'eziopatogenesi del Morbo di Crohn, tramite l'utilizzo di un modello murino acuto di tale patologia. La colite è stata indotta chimicamente, mediante somministrazione intrarettale di TNBS/EtOH, e la valutazione del ruolo svolto dal recettore 5-HT_{1A} si è realizzata tramite somministrazione dello specifico antagonista (WAY100135) ed agonista (8-OH DPAT·HBr) di tale recettore.

La somministrazione sottocutanea di tali composti ha causato effetti opposti su alcuni dei targets analizzati:

- la somministrazione del **8-OH DPAT·HBr** ha causato un miglioramento significativo di tutti i parametri morfologici che riguardano il tessuto intestinale (edema, spessore, lunghezza e MS colici), e dei valori DAI per tutto il protocollo sperimentale, lasciando invariati i parametri infiammatori (MPO colica e polmonare, edema epatico e polmonare),
- il trattamento con **WAY100135** ha prodotto il risultato opposto esacerbando il quadro infiammatorio locale e sistemico con incrementi significativi dell'infiltrazione leucocitaria intestinale e polmonare e dell'edema epatico.

I dati così ottenuti evidenziano il coinvolgimento, con ruolo protettivo, del recettore 5-HT_{1A} nella evoluzione della risposta infiammatoria locale e diffusa indotta nel modello sperimentale di CD.

Al fine di esplorare il meccanismo sotteso a questi effetti protettivi e l'eventuale contributo del sistema immunitario, è stato quantificato il profilo di alcune citochine (TNF α , IL1 β , IL10, IFN γ , IL4 ed IL2) a livello colico, e i livelli di TNF α ed IL1 β a livello plasmatico. Inoltre è

stata quantificata la presenza di 5-HT, SP e NO quali potenziali mediatori del processo infiammatorio.

Come atteso le concentrazioni tessutali e plasmatiche delle diverse citochine sono risultate significativamente aumentate a seguito dell'insulto da TNBS negli animali C rispetto agli animali N: l'incremento dei valori di $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, ed $\text{IL1}\beta$ rivelano un profilo Th1 dipendente e il probabile coinvolgimento della popolazione macrofagica; l'aumento dei livelli di IL10 e IL4 riflettono l'innescamento dei meccanismi compensatori ed anti-infiammatori endogeni. IL4 , (citochina tipica della risposta $\text{T}_{\text{h}2}$), porta ad un'inibizione della risposta infiammatoria generata nel presente modello (nel quale si genera un'infiammazione guidata da una risposta $\text{T}_{\text{h}1}$).

Il quadro citochinico sembra essere tendenzialmente invariato successivamente alla somministrazione dei due agenti farmacologici, infatti, non si è registrata nessuna variazione significativa rispetto al gruppo C. Se si considera il confronto con la situazione basale (gruppo N) emerge che la stimolazione $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ non consente incrementi statisticamente significativi dei livelli intestinali delle citochine pro-infiammatorie $\text{IL1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ ed IL2 e, al contrario, comporta un lieve incremento delle concentrazioni di IL4 , mentre l'inibizione $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ non è accompagnata da un aumento significativo dei livelli tessutali di quest'ultima citochina, IL4 , né di quelli plasmatici di $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$.

Queste osservazioni possono ricondurre parte degli effetti positivi registrati con il trattamento con 8-OH DPAT·HBr a lievi variazioni nel complesso profilo delle citochine pro- ed anti-infiammatorie e suggeriscono l'intervento del recettore $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ nelle dinamiche del sistema immunitario.

I risultati ottenuti si rivelano particolarmente interessanti quando confrontati con i dati provenienti da studi condotti su differenti modelli di colite e da studi in vitro che, in modo non univoco, attribuiscono a questo recettore un ruolo pro-infiammatorio e attivante il sistema immunitario. L'attivazione del recettore 5-HT_{1A} causerebbe, infatti, l'aumento della capacità fagocitaria di macrofagi peritoneali murini in vitro (Freire-Garabal, 2003) e della proliferazione e del rilascio di citochine IFN e IL2 da parte dei linfociti isolati (Aune, 1994). Tale recettore verrebbe inoltre iper-espresso dai linfociti B e T murini una volta che questi sono attivati (Aune, 1993; Abdouh, 2001), e la somministrazione di antagonisti del recettore 5-HT_{1A} si rivelerebbe utile nel trattamento delle risposte di sensibilizzazione da contatto cutaneo causate da Ossazolone nel topo (Aune, 1994). Al contrario, Kubera et al (Kubera, 2005) dimostra l'assenza di un suo coinvolgimento nel rilascio di citochine (IL6, TNF α , IL10 e IFN γ) indotto da 5-HT sui macrofagi e linfociti murini in vitro.

I risultati da noi ottenuti risultano quindi differire dai dati presenti in bibliografia, ma tale discrepanza può essere giustificata, almeno in parte, dalla diversa complessità dei substrati usati in vitro rispetto al sistema biologico da noi considerato, dove coesistono elementi del sistema immunitario, neuroni e componenti vascolari/plasmatiche. Queste diverse strutture, tra di loro interconnesse e soggette a reciproca influenza, possono variamente esprimere il recettore 5-HT_{1A}.

A livello neuronale il recettore 5-HT_{1A} è presente, ad esempio, a livello presinaptico, dove funge da auto- ed etero-recettore inibitorio che, attivato, può ridurre la liberazione di vari trasmettitori intestinali, come la stessa 5-HT. Oltre alla 5-HT anche SP e NO svolgono un ruolo pro-infiammatorio in questo distretto, promuovendo l'attivazione del sistema immunitario: è stato dimostrato che sostanze che diminuiscono le quantità a livello tissutali o vanno ad antagonizzare i loro effetti a livello

recettoriale e portano ad un miglioramento del quadro infiammatorio in modelli di colite sperimentale (*Ursino, 2009; Ghia, 2009; Xing, 2012*).

La SP è un polipeptide formato da 11 amminoacidi facente parte della famiglia delle tachichinine e presente a livello gastrointestinale. Essa è strettamente associata alla percezione dolorifica, all'emesi, porta a vasodilatazione in seguito al rilascio di NO e a livello intestinale causa la contrazione della muscolatura e la secrezione ghiandolare. Un altro ruolo importante svolto dalla SP è la promozione della risposta immunitaria: diversi studi hanno dimostrato un aumento nel rilascio e nella secrezione di citochine da parte di cellule immunitarie esposte a tale polipeptide (*Azzolina, 2003; Cuesta 2002; Delgado 2003; Cunin 2011*) e l'aumentata espressione di COX-2 e prostaglandina E₂ (*Koon, 2006*). Inoltre, dai risultati ricavati da studi su modelli animali, questo neuropeptide sembrerebbe giocare un ruolo molto importante nell'attivazione dei fibroblasti e nella deposizione di materiale amorfo da parte loro (*Koon, 2010*).

Il NO è prodotto a partire d'arginina e ossigeno tramite l'azione della monossido nitrico sintasi. Formato ad opera della nNOS e della eNOS media il rilasciamento sia della muscolatura vascolare che extravascolare. Prodotto in quantità massicce dalla iNOS rappresenta uno dei principali mezzi con cui il sistema immunitario aspecifico elimina gli agenti patogeni. Un'eccessiva produzione può tuttavia generare quantità citotossiche di perossinitrito. Questa sostanza può andare ad interagire con il DNA, le proteine cellulari e i lipidi, denaturandoli e portando a mutazioni o alla morte cellulare, causa l'aumento della secrezione di IL8 e di diverse molecole di adesione, favorendo l'attivazione dei neutrofili e la cronicizzazione dell'insulto infiammatorio (*Pacher, 2007*). Inoltre va considerato che un'infiammazione cronica a livello intestinale causa una forte alterazione della normale trasmissione neuronale e nel rilascio di

neurotrasmettitori, situazione che, date le osservazioni presentate in precedenza, va ad esacerbare e prolungare ulteriormente il quadro patologico (*Depoortere, 2002; Gross, 2007*).

In questo studio, negli animali trattati con TNBS il grave stato di infiammazione intestinale è associato effettivamente ad elevati livelli di 5-HT e SP nel colon e di nitriti nel plasma, indice di massiccia formazione di NO. I trattamenti farmacologici hanno portato ad un'alterazione nei livelli di questi 3 neurotrasmettitori: la somministrazione dell'antagonista 5-HT_{1A} ha portato ad un incremento significativo dei livelli plasmatici di NO rispetto agli animali del gruppo C, mentre la somministrazione dell'agonista 5-HT_{1A} ha portato ad una diminuzione significativa dei livelli di 5-HT ed ad un lieve calo dei livelli di SP colici.

Questi risultati dimostrano, per la prima volta, che il recettore 5-HT_{1A} gioca un ruolo protettivo nei confronti del CD tramite un diminuito release di neurotrasmettitori pro-infiammatori, e porta ad intravedere una potenziale prospettiva di utilizzo di agonisti del recettore 5-HT_{1A} come adiuvanti per il trattamento di tale patologia.

SCOPO DELLA RICERCA (II)

Dati i risultati ottenuti dal primo studio, che confermano il ruolo fondamentale giocato dalla 5-HT nella patogenesi e nell'entità dell'infiammazione a livello intestinale durante una colite, secondo scopo della ricerca è stato quello di valutare il ruolo che i vari 5-HTR presenti a livello intestinale (5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇) giocano in questo modello di CD.

Per compiere tale studio è stato utilizzato il modello murino acuto di CD descritto in precedenza, e sono stati somministrati agli animali degli antagonisti specifici per i 5-HTR presenti a livello intestinale, e nella fattispecie, Ketanserina (antagonista 5-HT₂), Ondansetron (5-HT₃), GR125487 (5-HT₄) e SB269970 (5-HT₇).

PROTOCOLLO SPERIMENTALE (II)

Gli animali sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. Topi normali (**N**): animali cui non è stata indotta la colite, ma è stata somministrata per via intrarettale e sottocutanea soluzione fisiologica 10 ml/kg;
2. Topi controllo (**C**): animali in cui è stata indotta la colite, tramite somministrazione intrarettale di una soluzione 0.34 M di TNBS in 50% EtOH e trattati per via sottocutanea con soluzione fisiologica 10 ml/kg;
3. Topi (**K**): animali in cui è stata indotta la colite e trattati con l'antagonista del recettore 5-HT₂ Ketanserina al dosaggio di 5 mg/kg sc;
4. Topi (**O**): animali in cui è stata indotta la colite e trattati con l'antagonista 5-HT₃ Ondansetron al dosaggio di 10 mg/kg sottocute.
5. Topi (**G**): animali in cui è stata indotta la colite e trattati con l'antagonista 5-HT₄ GR125487 al dosaggio di 10 mg/kg sottocute.
6. Topi (**S**): animali in cui è stata indotta la colite e trattati con l'antagonista 5-HT₇ SB269970 al dosaggio di 10 mg/kg sottocute.

Le somministrazioni dei vari agenti farmacologici o di soluzione fisiologica, iniziate un'ora dopo l'induzione della colite, sono state effettuate due volte al giorno per 3 giorni fino al giorno del sacrificio.

Sia il dosaggio del TNBS che quello degli agenti farmacologici testati, sono stati selezionati in seguito ad una serie di esperimenti preliminari.

RISULTATI (II)

ONSET DELLA PATOLOGIA

Il trattamento con gli antagonisti del recettore 5-HT₂ e 5-HT₄ causa un rallentamento nello sviluppo della patologia intestinale.

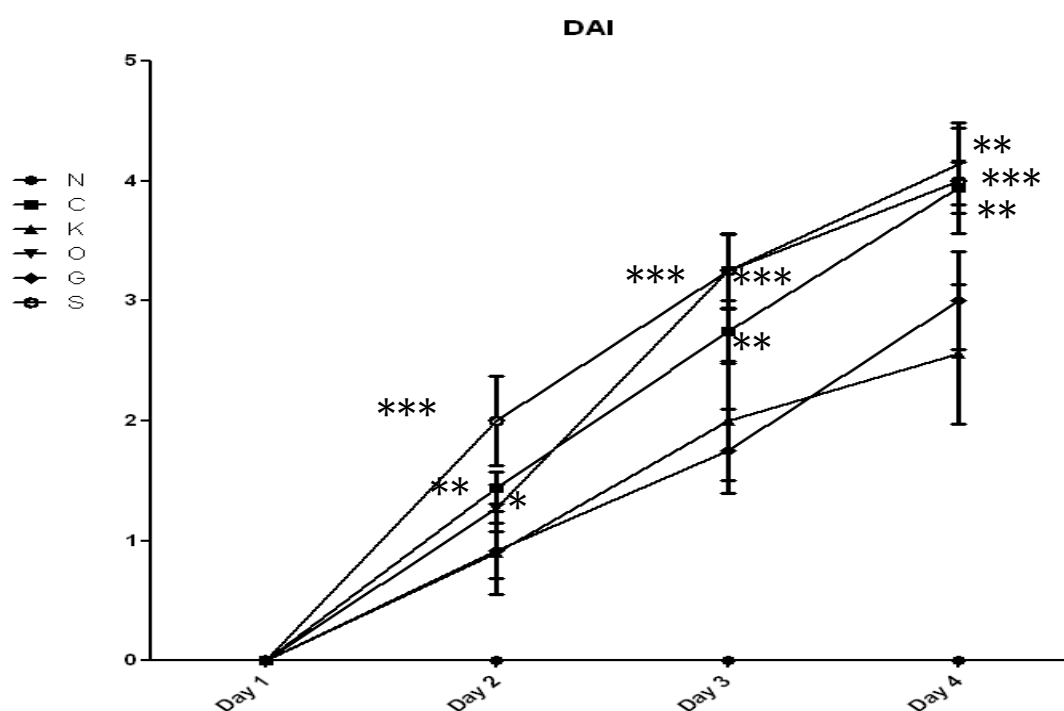


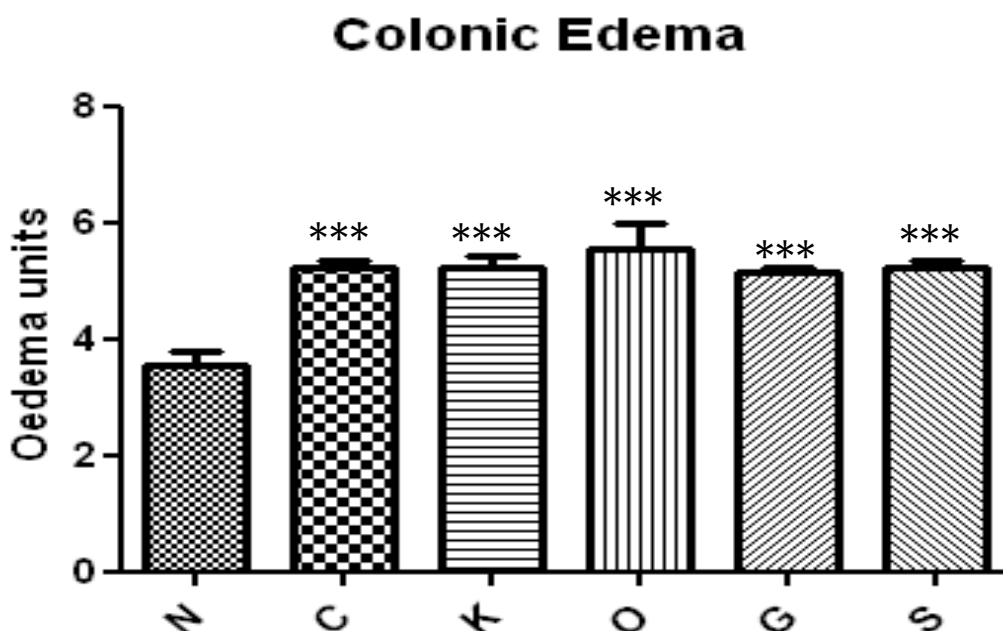
Figura 34: Valori di DAI misurati per tutta la durata della sperimentazioni negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S)
: $p < 0.01$; *: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunn).

Il gruppo N, gruppo in cui non è stata indotta la colite, presenta per tutta la durata del protocollo un punteggio DAI pari a 0 ± 0 (Figura 34). Negli animali in cui è stata indotta la colite, invece, si riscontrano due diversi andamenti: i valori del DAI dei gruppi C, O e S si presentano abbastanza simili e sempre significativamente maggiori del gruppo N

(rispettivamente DAI2: 1.44 ± 0.13 , $p < 0.05$, 1.27 ± 0.19 , $p < 0.01$, 2.00 ± 0.37 , $p < 0.001$; DAI3: 2.74 ± 0.26 , $p < 0.01$, 3.25 ± 0.31 , $p < 0.001$, 3.25 ± 0.30 , $p < 0.001$; DAI4 3.94 ± 0.21 , $p < 0.001$, 4.14 ± 0.34 , $p < 0.01$, 4.00 ± 0.44 , $p < 0.01$), mentre i valori dei gruppi **K** e **G**, benché visibilmente maggiori rispetto al gruppo **N** (rispettivamente DAI2 0.90 ± 0.35 , 0.92 ± 0.23 ; DAI3 2.00 ± 0.49 , 1.75 ± 0.35 ; DAI4 2.56 ± 0.58 , 3.00 ± 0.41), non sono mai significativamente diversi dai valori degli animali normali, indice di un parziale effetto positivo dato da questi trattamenti.

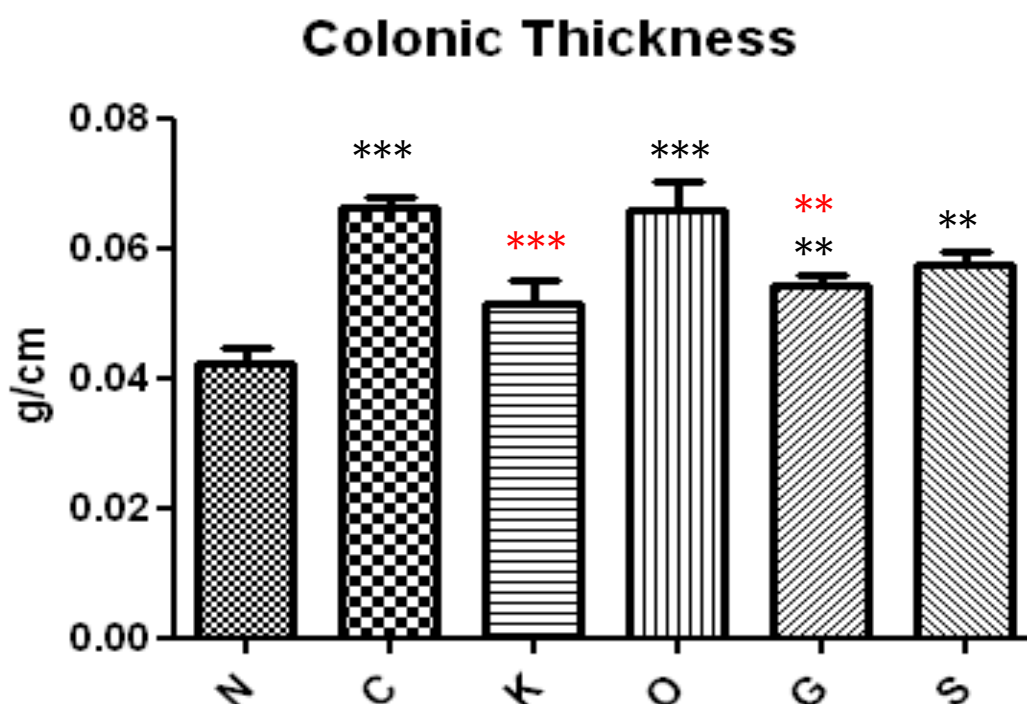
PARAMETRI MORFOLOGICI

Il trattamento con gli antagonisti del recettore 5-HT₂ e 5-HT₄ presenta un effetto protettivo nei confronti dell'inflammazione indotta da TNBS.



*Figura 35: Valori di edema colico animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S) ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).*

Tutti gli animali in cui è stata indotta la colite tramite somministrazione intrarettale di TNBS (gruppi **C**, **K**, **O**, **G**, **S**) presentano valori significativamente ($p < 0.001$) maggiori di edema colico (rispettivamente 5.24 ± 0.10 , 5.23 ± 0.22 , 5.53 ± 0.43 , 5.13 ± 0.43 , 5.22 ± 0.13) rispetto al gruppo **N** (3.56 ± 0.24). Nessuno dei trattamenti farmacologici con gli antagonisti dei 5-HTR ha portato a variazioni in tale parametro (*Figura 35*).



*Figura 36: Valori di spessore colico negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S) **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).*

Tutti gli animali in cui è stata indotta la colite, tranne quelli facenti parte del gruppo **K**, hanno presentato un aumento significativo ($p < 0.001$ per **C** 0.066 ± 0.002 g/cm ed **O**, $p < 0.01$ per **G** e **S**) di questo parametro se confrontati con il gruppo **N** (0.042 ± 0.002 g/cm) (*Figura 36*).

I valori dei gruppi **K** e **G** (rispettivamente 0.051 ± 0.004 g/cm, $p < 0.001$, 0.054 ± 0.002 g/cm, $p < 0.01$) sono significativamente inferiori al gruppo **C**.

Il trattamento con SB269970 ha portato ad un parziale miglioramento, non significativo, di questo parametro (0.057 ± 0.002 g/cm).

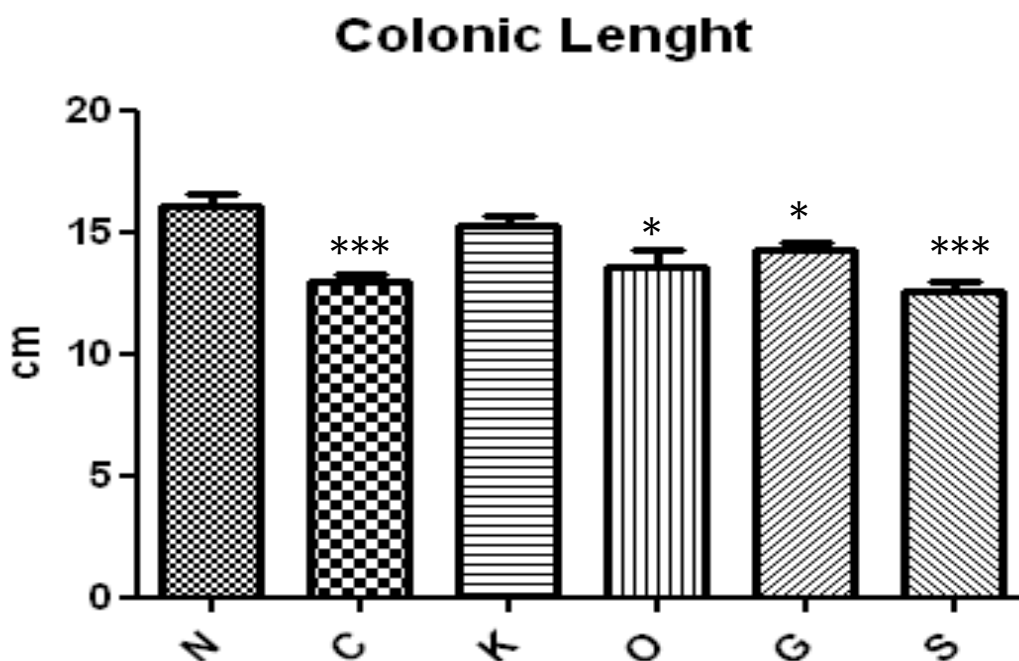


Figura 37: Valori di lunghezza colica e del cieco negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Anche per quanto riguarda questo parametro, tranne che per il gruppo **K**, la somministrazione intrarettale di TNBS ha portato ad un significativo ($p < 0.001$ per **C** 13.00 ± 0.26 cm e **S**, $p < 0.05$ per **O** e **G**) accorciamento del tessuto intestinale, quando comparato ai valori del gruppo normale (16.02 ± 0.56 cm) (Figura 37). Il trattamento con Ketanserina ha invece evitato questo cambiamento dell'aspetto del colon e la lunghezza colica è risultata vicina ai valori normali (15.23 ± 0.49 cm). (Figura 37)



N1



N2



C1



C2



K1



K2



O1



O2



G1



G2



S1



S2

Figura 38: Fotografie dei colon chiusi (1) ed aperti (2 negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

Le immagini documentano le marcate deformazioni del colon causate dall'applicazione di TNBS (*Figura 38*). I soli trattamenti con Ketanserina e GR125487 appaiono capaci di diminuire le aree eritematose, ulcerate e stenotiche mentre i trattamenti dei gruppi **O** e **S** non hanno portato a variazioni macroscopiche visibili.

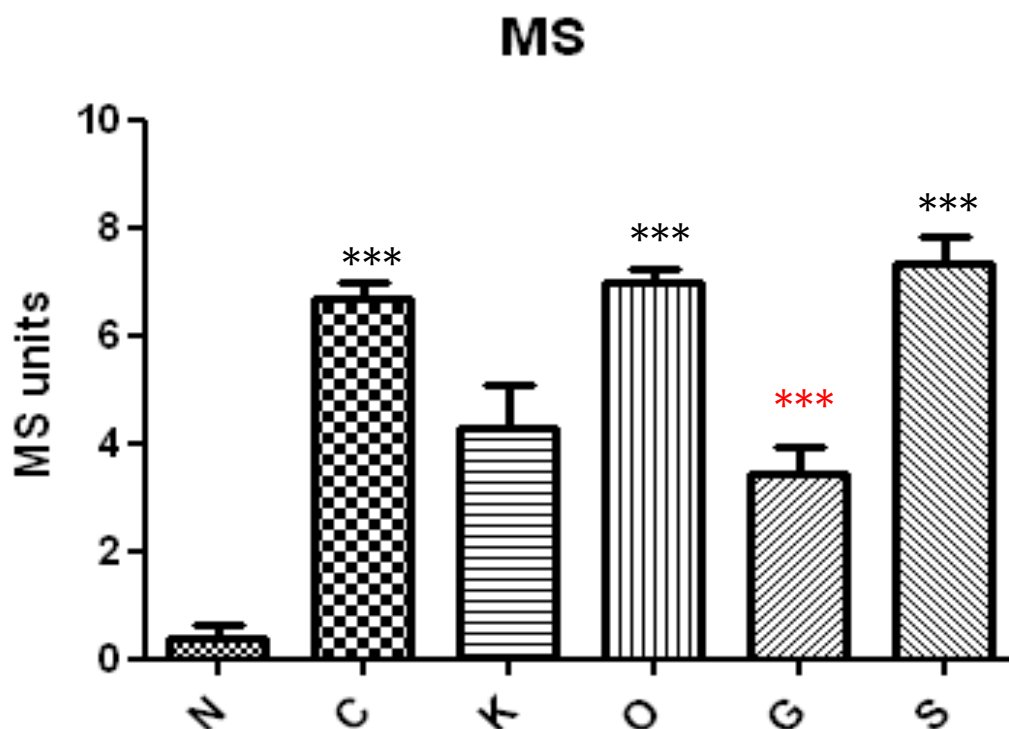


Figura 39: Valori di MS negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

****: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunn).*

Il quadro globale del danno macroscopico presente a livello colico è riassunto dai punteggi del MS (*Figura 39*). Infatti, mentre gli animali del gruppo **N** presentano livelli particolarmente bassi di questo parametro (0.40 ± 0.22), un aumento significativo ($p < 0.001$) è registrato per i gruppi **C** (6.70 ± 0.28), **O** (7.00 ± 0.21) e **S** (7.33 ± 0.50). I gruppi **K** (4.30 ± 0.79) e **G** (3.42 ± 0.50) presentano invece valori rispettivamente inferiori e significativamente inferiori ($p < 0.001$) a quelli del gruppo **C**.

Nell'insieme si evince che il trattamento con Ketanserina e GR125487 esplica capacità protettive nei confronti di questo modello di colite acuta.

PARAMETRI INFIAMMATORI LOCALI E SISTEMICI

Il trattamento con l'antagonista del recettore 5-HT₂ presenta un effetto protettivo nei confronti dell'infiammazione indotta da TNBS, il trattamento con l'antagonista del recettore 5-HT₃ presenta l'effetto opposto.

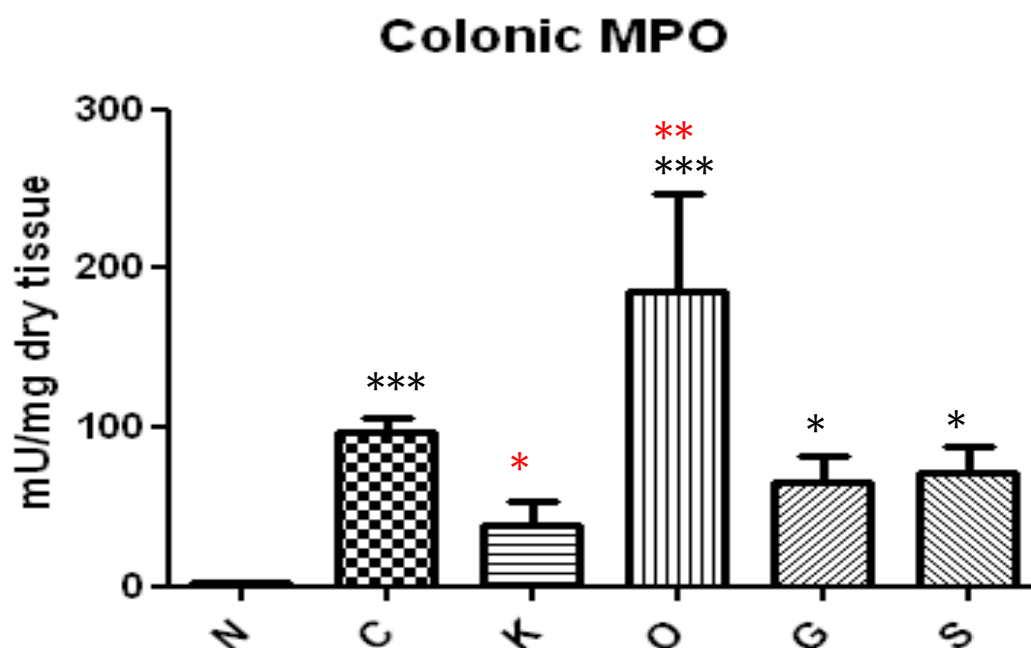


Figura 40: Valori di MPO colica negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S). *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

L'attività della MPO colica (Figura 40), quasi assente negli animali normali (2.27 ± 0.71 mU/mg dry tissue), è aumentata negli animali in cui viene indotta la colite. I valori del gruppo C (97.04 ± 9.32 mU/mg dry tissue), significativamente superiori ($p < 0.001$) rispetto al gruppo N, sono

comparabili a quelli registrati nei gruppi **G** (66.08 ± 15.61 mU/mg dry tissue) e **S** (71.94 ± 16.37 mU/mg dry tissue).

I valori del gruppo **K** (39.17 ± 13.82 mU/mg dry tissue), invece, sono significativamente inferiori rispetto al gruppo controllo ($p < 0.05$) mentre, al contrario, il gruppo trattato con Ondansetron (185.5 ± 61.2 mU/mg dry tissue), presenta valori dell'attività della MPO significativamente superiori al gruppo **C** ($p < 0.01$).

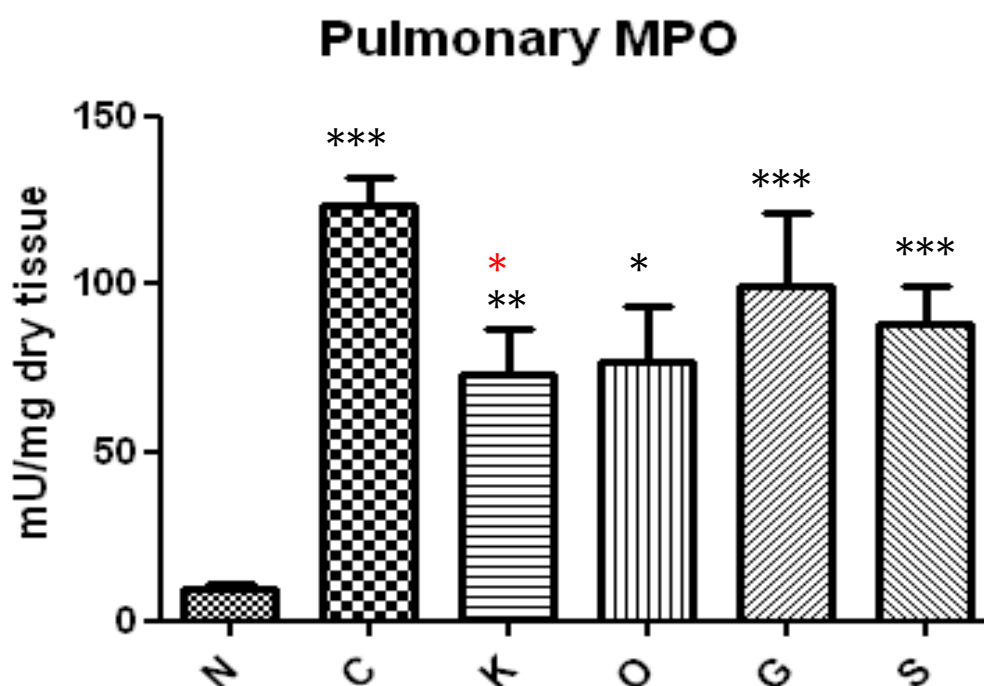


Figura 41: Valori di MPO polmonare negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.01$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

Similmente, a livello polmonare, nel gruppo **N** sono stati ottenuti valori di MPO bassi (9.28 ± 1.45 mU/mg dry tissue), e valori incrementati in tutti gli altri gruppi sperimentali. Rispetto al gruppo **C** (123.7 ± 8.0 mU/mg dry tissue) ($p < 0.001$ versus N) i gruppi **O** (77.06 ± 16.65 mU/mg dry tissue), **G** (66.08 ± 15.61 mU/mg dry tissue), **S** (71.94 ± 16.37 mU/mg dry tissue) non si sono differenziati significativamente mentre va notata la

diminuzione significata ($p < 0.05$) registrata per il gruppo **K** (73.10 ± 13.70 mU/mg dry tissue) (Figura 41).

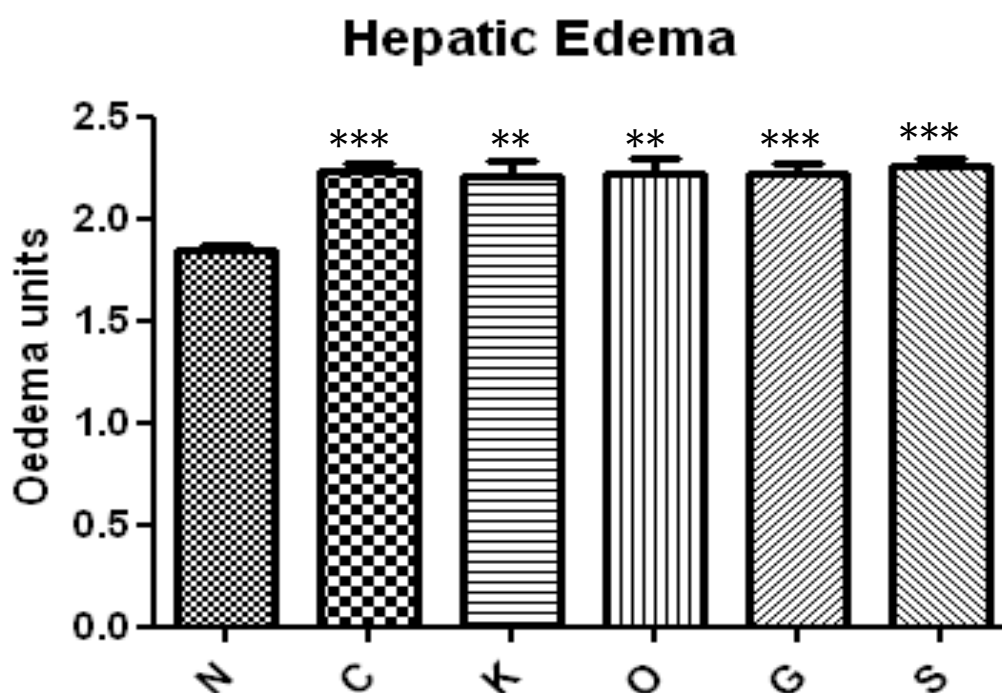


Figura 42: Valori di edema epatico negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S). **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

La somministrazione intrarettale di TNBS ha causato un aumento significativo ($p < 0.001$ per i gruppi C, G e S, $p < 0.01$ per i gruppi K ed O) dei valori di edema a livello epatico rispetto al gruppo N (1.89 ± 0.06); i valori nei vari gruppi sono tendenzialmente simili tra loro (C: 2.24 ± 0.03 ; K: 2.21 ± 0.07 ; O: 2.21 ± 0.08 ; G: 2.22 ± 0.05 ; S: 2.26 ± 0.04) (Figura 42).

Pulmonary Edema

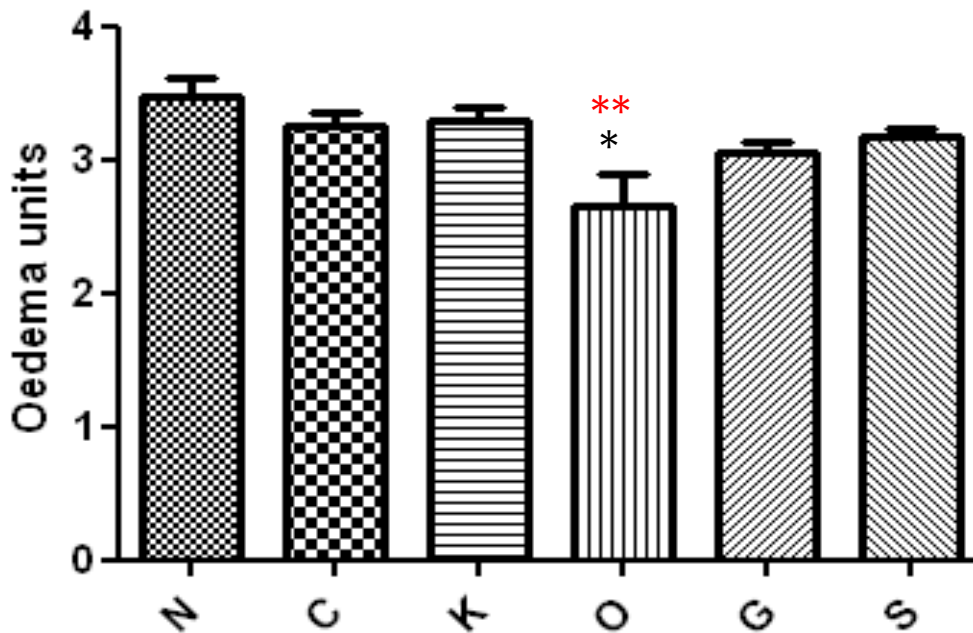


Figura 43: Valori di edema polmonare negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S) *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo N. **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way seguita dal post-test di Dunnett).

A livello polmonare (Figura 43), non si è osservata alcuna differenza significativa tra il gruppo N e il gruppo C mentre si è riscontrata una particolare diminuzione dei valori di edema nel gruppo O (2.65 ± 0.24), che risulta significativamente inferiore sia rispetto al gruppo N (3.48 ± 0.14 , $p < 0.05$) che al gruppo C (3.26 ± 0.10 , $p < 0.01$).

I dati così raccolti mostrano come il trattamento con Ketanserina, antagonista 5-HT_2 , presenti un effetto anti-infiammatorio in questo modello di colite, mentre emergono alcune indicazioni di un effetto opposto a seguito di trattamento con Ondansetron, antagonista del recettore 5-HT_3 .

MORTALITÀ

Il trattamento con gli antagonisti del recettore 5-HT₃ e 5-HT₇ portano ad aumento della mortalità degli animali con colite

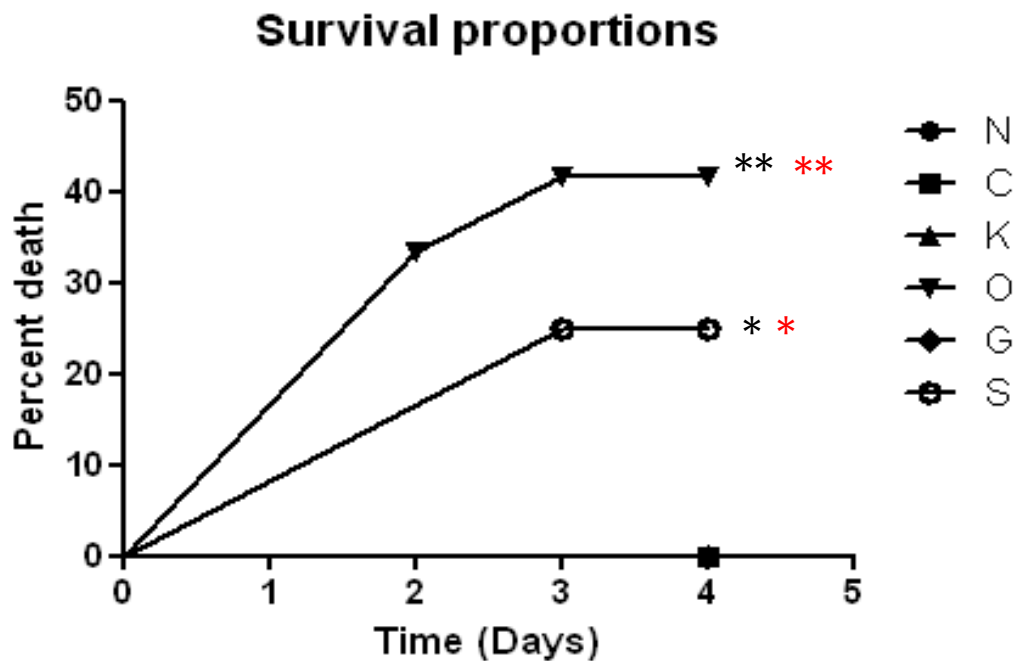


Figura 44: Andamento della mortalità durante tutta la sperimentazione negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo C (Mantel-Cox test).

Il modello da noi adottato causa una colite di entità elevata, ma senza causare la morte dell'animale (Figura 44). Il trattamento subito dagli animali del gruppo O e dal gruppo S ha causato la morte del 41.7% ($p < 0.01$) e del 25% ($p < 0.05$) degli animali, rispettivamente.

Questo risultato mostra come questi trattamenti presentino un effetto esacerbante il danno prodotto nel modello di colite da noi utilizzato.

CITOCHINE COLICHE E PLASMATICHE

Il trattamento con Ketanserina esplica un effetto inibente nei confronti del rilascio di citochine. Il composto GR125487 presenta una minima attività, solo nei confronti dei livelli plasmatici di $\text{TNF}\alpha$ ed $\text{IL1}\beta$.

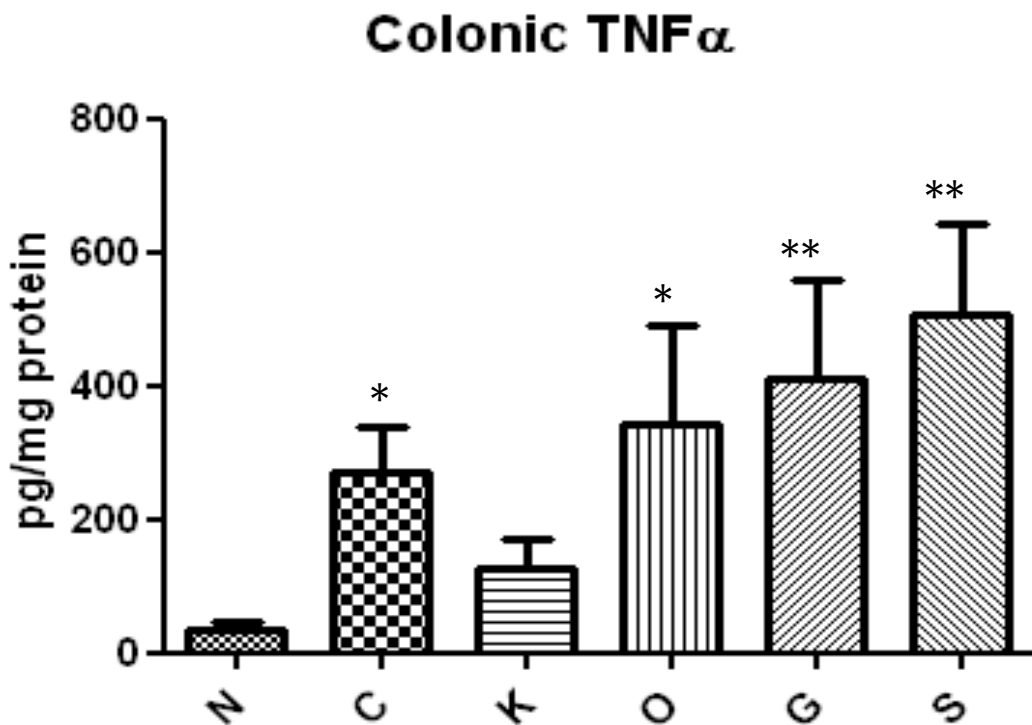


Figura 45: Valori di $\text{TNF}\alpha$ colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

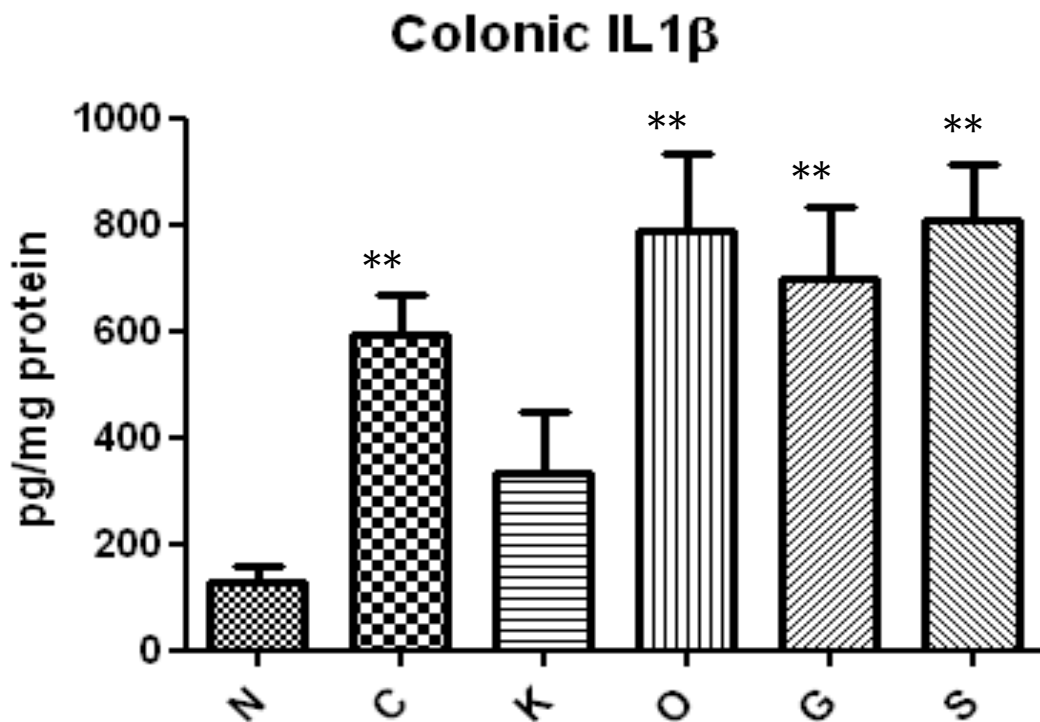


Figura 46: Valori di IL1 β colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

Negli animali N i livelli di TNF α (34.80 ± 11.00 pg/mgprotein) e di IL1 β (128.7 ± 27.7 pg/mgprotein) sono bassi se comparati agli animali C (271.8 ± 65.6 pg/mgprotein $p < 0.05$ per TNF α e 591.1 ± 76.3 pg/mgprotein $p < 0.01$ per IL1 β). I trattamenti applicati ai gruppi O, G e S non hanno prevenuto tale aumento. Solo la somministrazione di Ketanserina ha limitato la produzione delle due citochine le cui concentrazioni coliche non sono state significativamente superiori rispetto ai valori del gruppo N (125.3 ± 45.6 pg/mgprotein per TNF α e 335.6 ± 114.3 pg/mgprotein per IL1 β). (Figura 45 e 46)

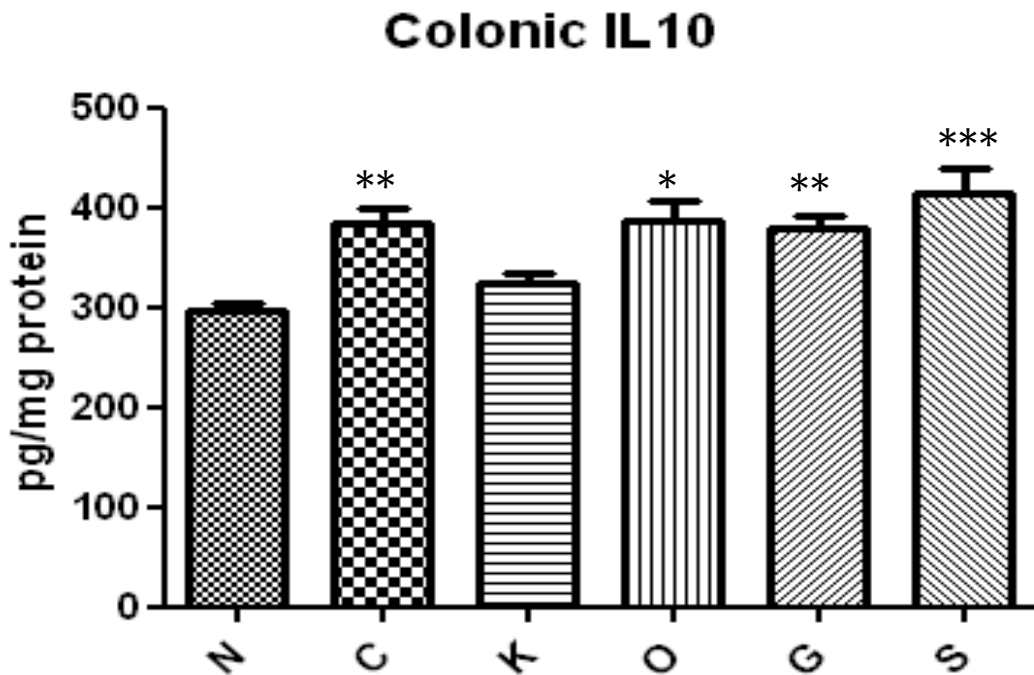


Figura 47: Valori di IL10 colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

L'induzione della colite ha causato in tutti i gruppi sperimentali un aumento dei valori colici di IL10 rispetto al gruppo N (297.0 ± 7.5 pg/mgprotein) (Figura 47). I valori misurati nei gruppi C (384.9 ± 15.2 pg/mgprotein), O (386.4 ± 19.1 pg/mgprotein), G (380.1 ± 10.5 pg/mgprotein) e S (414.8 ± 23.5 pg/mgprotein) sono significativamente maggiori rispetto al gruppo N mentre gli animali facenti parte del gruppo K presentano dei valori (323.5 ± 9.6 pg/mgprotein) comparabili e quelli del gruppo N.

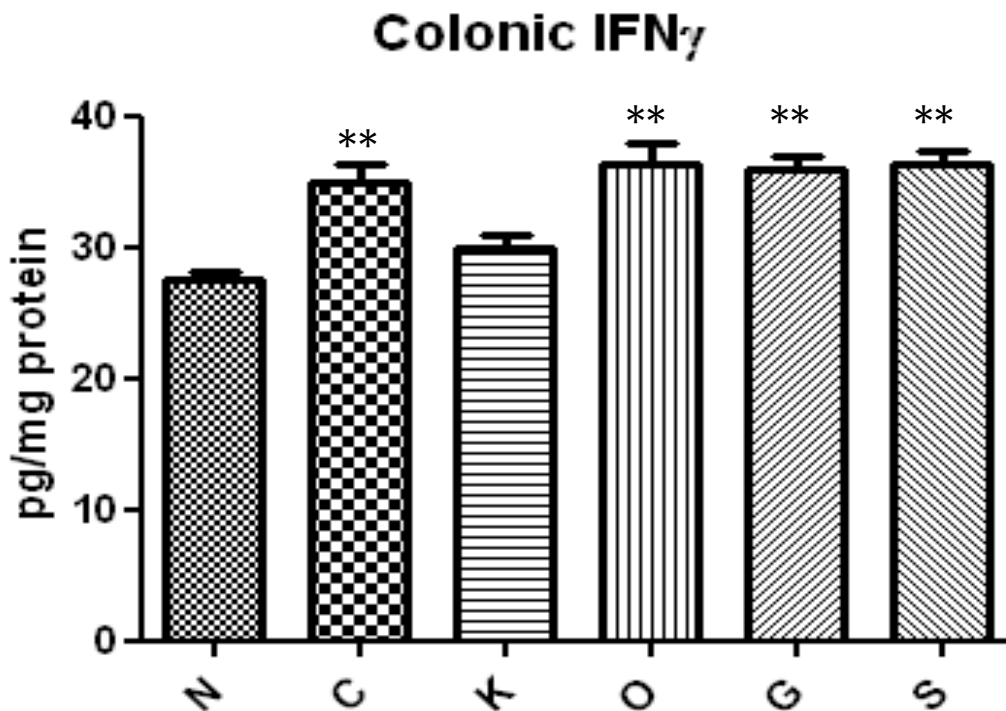


Figura 48: Valori di IFN γ colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S). **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

Anche per l'IFN γ , l'induzione della colite ha causato un aumento dei valori rispetto al gruppo N (27.48 ± 0.58 pg/mgprotein) (Figura 48).

I gruppi C, O, G e S presentano valori simili (rispettivamente 34.93 ± 1.32 , 36.40 ± 1.60 , 35.94 ± 0.99 e 36.35 ± 1.00 pg/mgprotein) e significativamente maggiori al gruppo N ($p < 0.01$).

Anche in questo caso il gruppo K (29.97 ± 1.00 pg/mgprotein) presenta valori non significativamente diversi dal gruppo N.

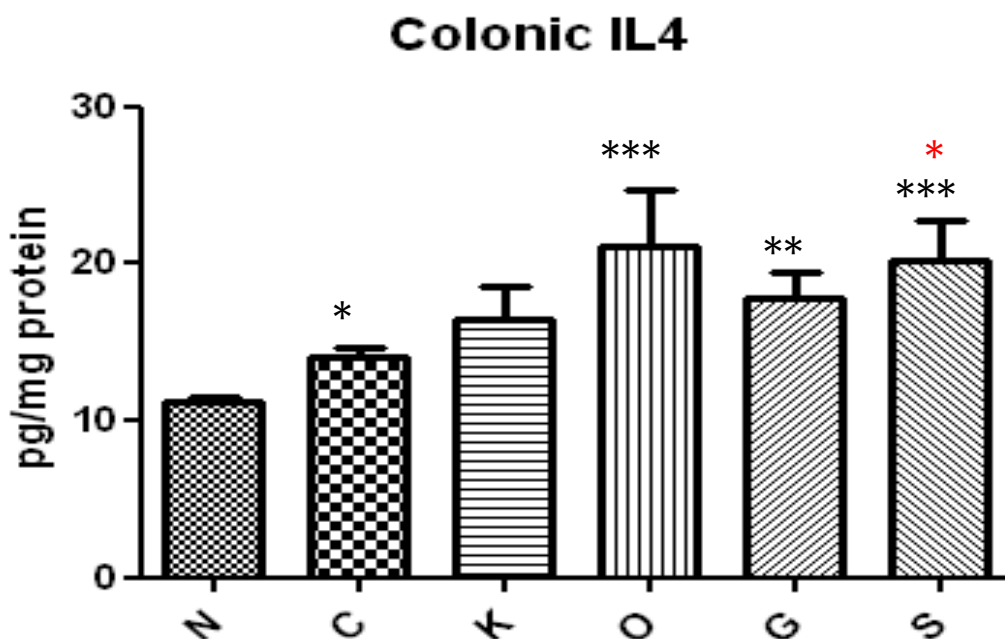


Figura 49: Valori di IL4 colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. * $p < 0.05$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

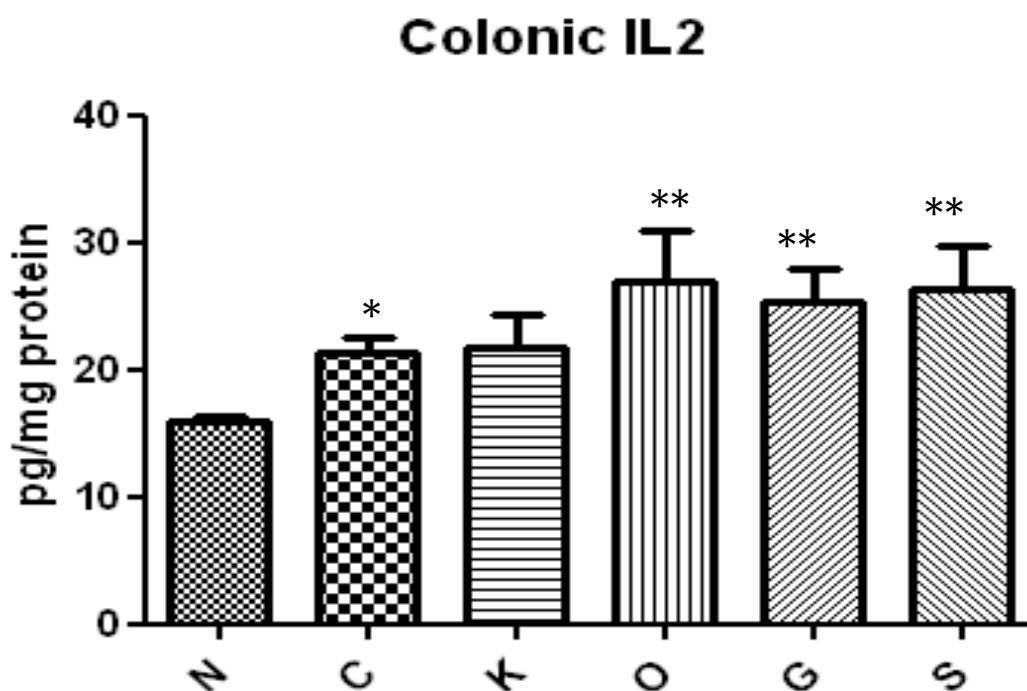


Figura 50: Valori di IL2 colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

La somministrazione intrarettale di TNBS ha causato un aumento dei valori di IL4 e IL2 nel colon degli animali rispetto agli animali normali e nessuno dei trattamenti farmacologici applicati ha prevenuto tale incremento. (Figura 49 e 50).

In particolare, soprattutto il trattamento con Ondansetron, GR125487 e SB269970 risulta associabile ad un incremento delle concentrazioni coliche delle due citochine anche rispetto allo stesso gruppo C.

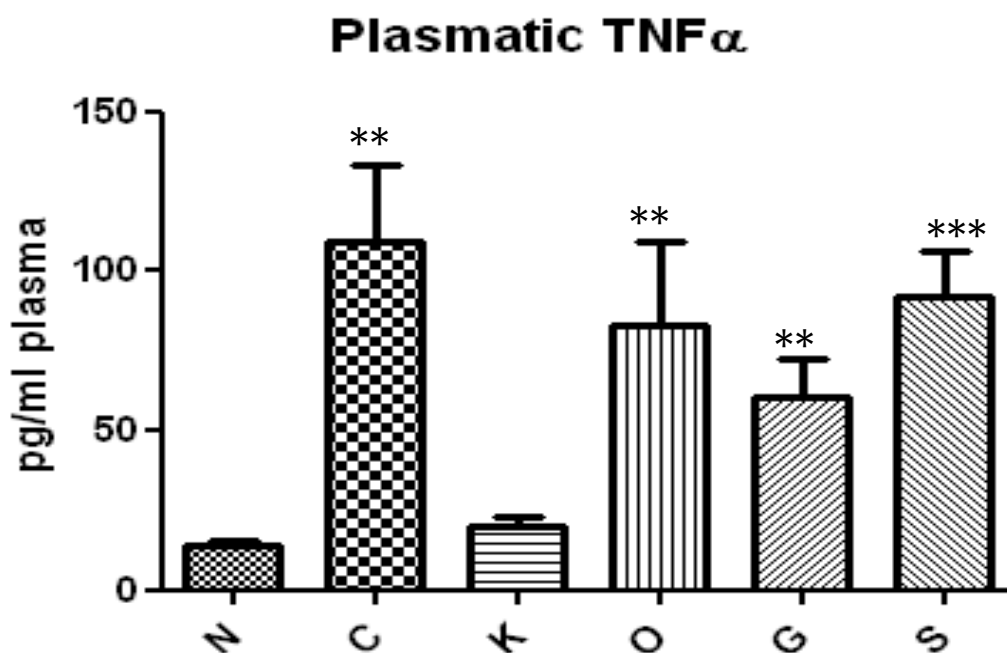


Figura 51: Valori di TNF α plasmatici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S)

** $: p < 0.01$; *** $: p < 0.001$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

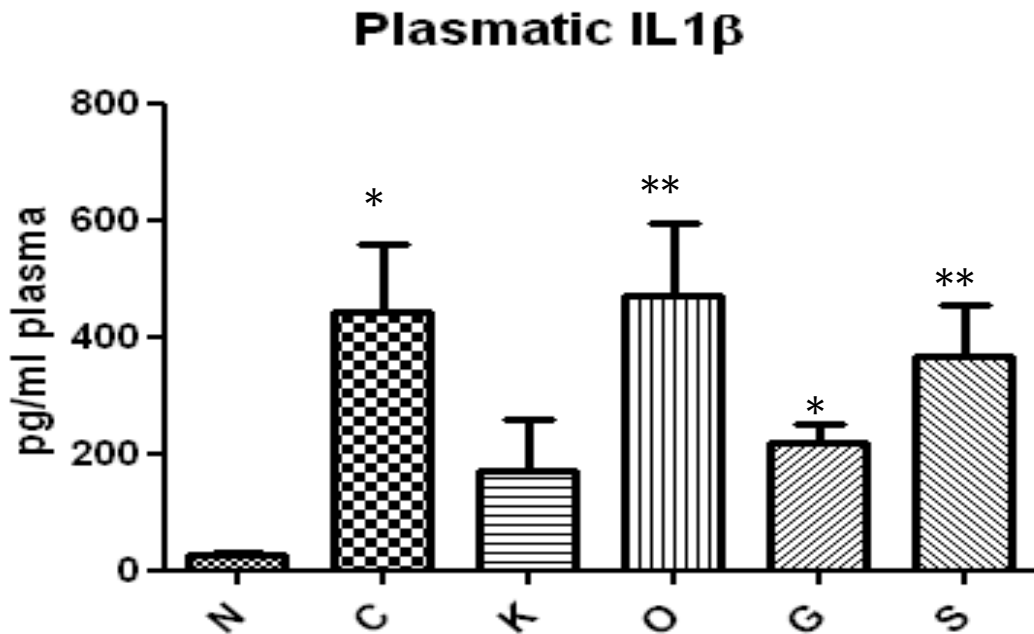


Figura 52: Valori di IL1 β plasmatici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S)

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo N. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

La somministrazione intrarettale di TNBS ha causato nel gruppo C un aumento significativo dei livelli plasmatici di TNF α (109.1 ± 24.1 pg/ml plasma, $p < 0.01$) e di IL1 β (443.0 ± 116.1 pg/mg protein, $p < 0.01$) rispetto agli animali del gruppo N (13.81 ± 1.90 pg/mg protein per TNF α ed 25.50 ± 3.23 pg/mg protein per IL1 β) (Figura 51 e 52).

La somministrazione di Ondansetron (83.22 ± 25.90 pg/mg protein per TNF α ed 470.3 ± 125.3 pg/mg protein per IL1 β) e SB269970 (91.90 ± 14.6 pg/mg protein per TNF α ed 365.3 ± 90.7 pg/mg protein per IL1 β) non ha influito sul rilascio di tali proteine, mentre il trattamento con Ketanserina (20.41 ± 2.80 pg/mg protein per TNF α e 171.4 ± 88.0 pg/mg protein per IL1 β) e GR125487 (60.91 ± 11.80 pg/mg protein per TNF α e 219.4 ± 32.5 pg/mg protein per IL1 β) ha portato ad una diminuzione di queste citochine: l'effetto è risultato più marcato per l'antagonista 5-HT $_2$, con valori non significativamente diversi dal gruppo N

ATTIVAZIONE IMMUNITARIA, SOPPRAVVIVENZA E RIGENERAZIONE TISSUTALE

I Toll-Like Receptors (TLRs) sono una famiglia di recettori espressi da diversi tipi di cellule e capaci di riconoscere strutture tipiche presenti sulle superfici di agenti patogeni. La loro attivazione innesca la risposta immunitaria innata. Tra i vari recettori appartenenti a questa famiglia, il TLR2 è il sottotipo espresso a livello dei macrofagi, cellule dendritiche e mastociti (Abreu, 2005) e pazienti affetti da CD che presentano un particolare polimorfismo di questa proteina sembrano essere soggetti ad un quadro clinico più complicato (Debler, 2003).

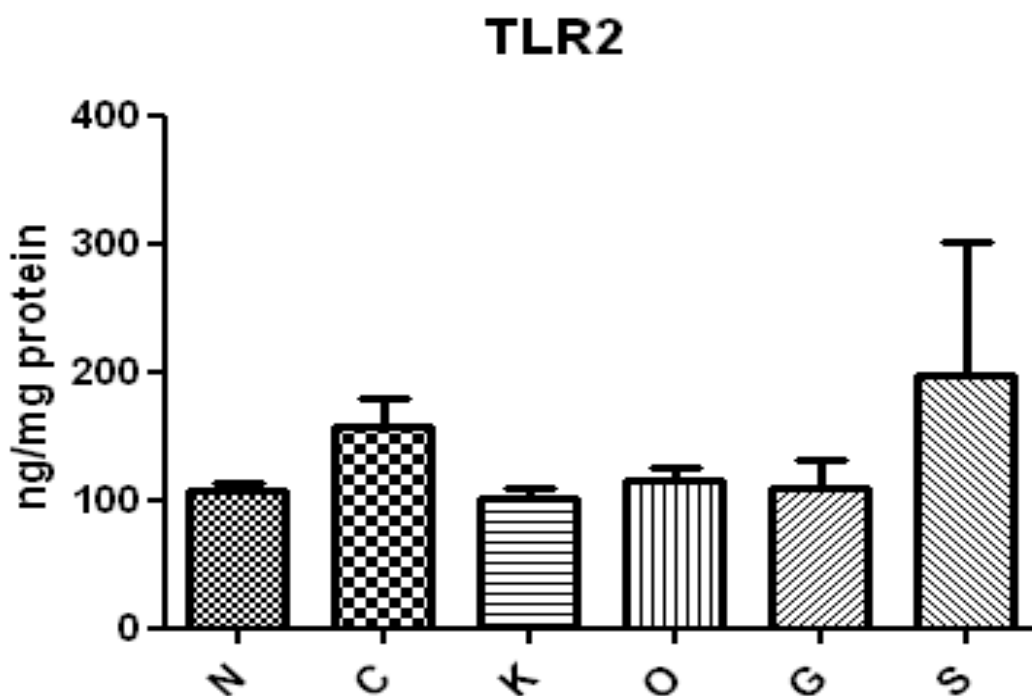


Figura 53: Valori di TLR2 colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

(ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

La maggiore attivazione immunitaria dovuta alla somministrazione intrarettale di TNBS ha causato un aumento dei valori colici di TLR2

(Figura 53). Tale variazione è risultata non essere mai significativa se confrontata con il gruppo N (106.7 ± 5.9 ng/mg protein).

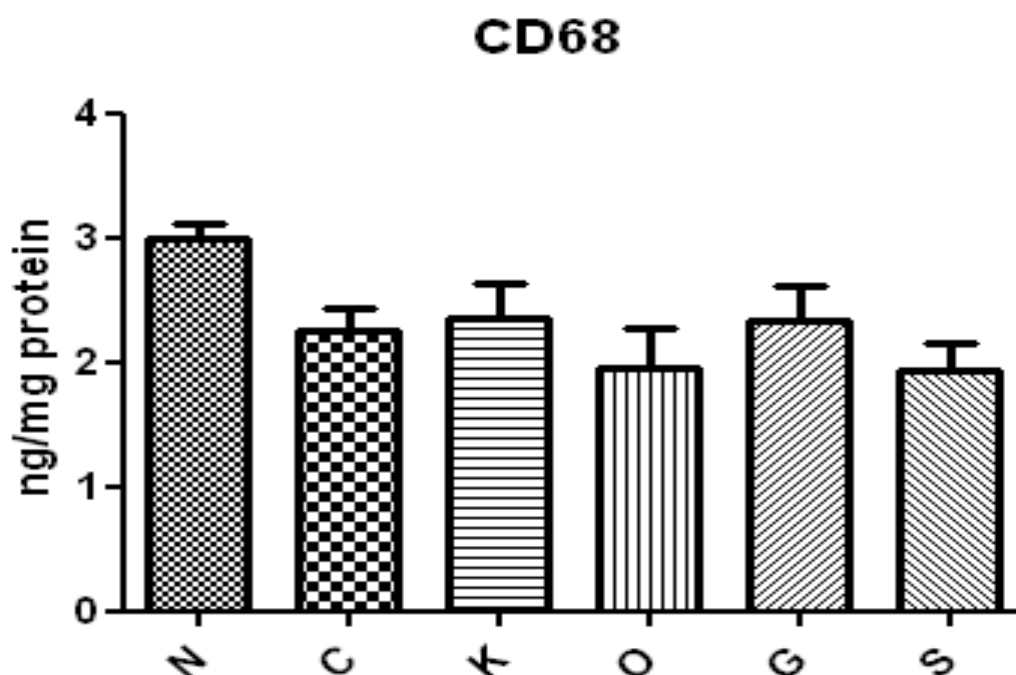


Figura 54: Valori di CD68 colici negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

(ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

CD68 o macrosialina è una glicoproteina espressa a livello dei monociti e macrofagi ed è utilizzata come uno dei marker della loro presenza a livello tissutale.

L'induzione della colite non ha comportato variazioni significative nei diversi gruppi sperimentali rispetto alla condizione N per la quale sono stati registrati valori tendenzialmente maggiori (3.00 ± 0.13 ng/mg protein) (Figura 54).

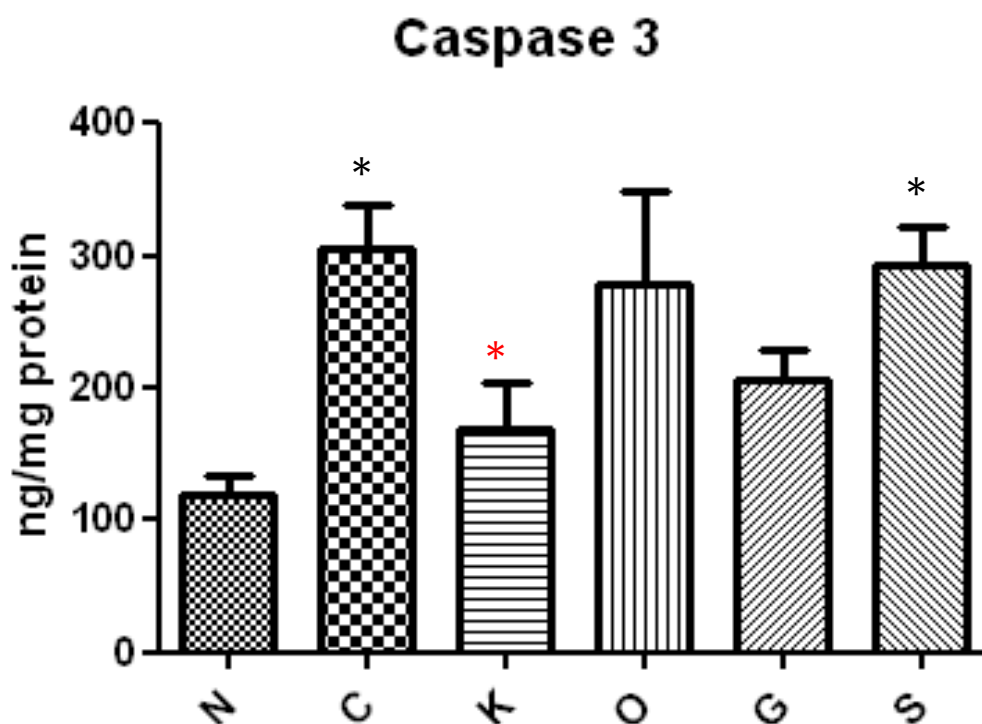


Figura 55: valori di Caspase 3 colici negli animali normali (N), controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$ rispetto al gruppo N. *: $p < 0.05$ rispetto al gruppo C. (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

La caspase 3 è una proteasi implicata nel processo di apoptosi cellulare: in seguito alla sua interazione con la caspase 8 o la caspase 9 si ha il clivaggio di diverse proteine a livello intracellulare e l'attivazione del processo di morte cellulare.

L'induzione della colite ha portato ad un aumento nei valori di questo parametro, che nel gruppo C (306.1 ± 32.2 ng/mg protein), è risultato significativo rispetto al gruppo N (119.7 ± 13.12 ng/mg protein; $p < 0.05$) (Figura 55).

Mentre i gruppi O e S presentano valori di caspase 3 intestinali simili a quelli del gruppo C (rispettivamente 278.5 ± 70.9 e 292.8 ± 29.8 ng/mg protein), il trattamento con Ketanserina e GR125487 ha portato ad un abbassamento di tale parametro (rispettivamente 167.8 ± 36.1 e 205.5 ± 22.3 ng/mg protein), significativo per il solo gruppo K ($p < 0.05$).

HSP70

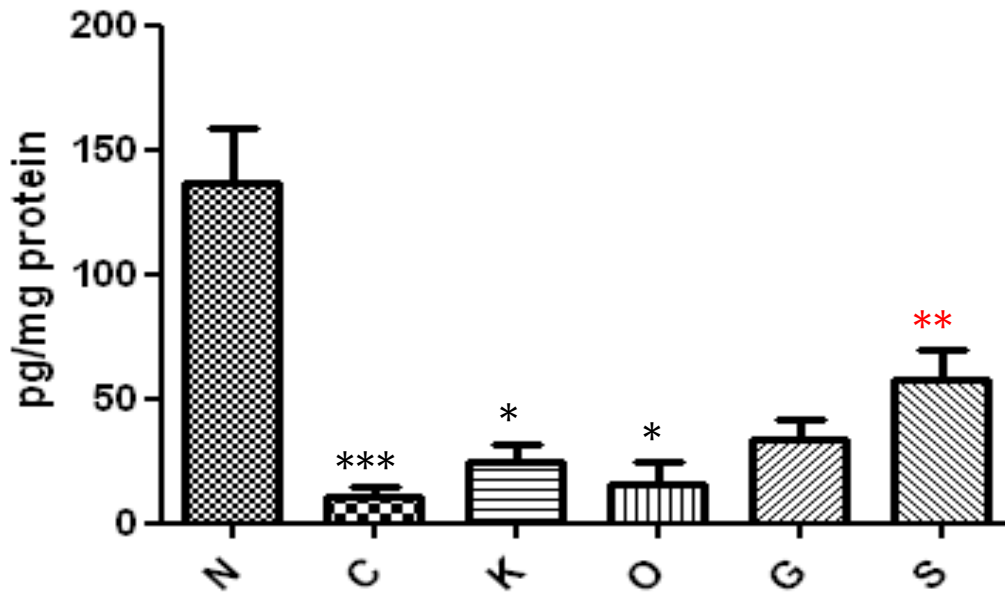


Figura 56: Valori di TNF α colico negli animali Normali (N), Controllo (C), trattati con Ketanserina 5 mg/kg (K), Ondansetron 10 mg/kg (O), GR125487 10 mg/kg (G) e SB269970 10 mg/kg (S).

*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ rispetto al gruppo N. **: $p < 0.01$ rispetto al gruppo C (ANOVA one way, Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunnett).

La Heat Shock Protein 70 (HSP70) facilita il folding di proteine che hanno subito un danno. In seguito a diverse tipologie di insulto, le proteine tendono a denaturarsi ed ad esporre i residui idrofobici presenti nel core proteico. La HSP70, legandosi in questo sito idrofobico, impedisce l'ulteriore denaturazione proteica e ne favorisce il ritorno alla strutture normale.

L'induzione della colite abbate le concentrazioni cellulari di questa proteina in tutti i gruppi sperimentali ed in modo particolare nel gruppo C (10.31 ± 4.19 pg/mg protein, $p < 0.001$), rispetto ai valori N. Solo il gruppo S (57.37 ± 12.61 pg/mg protein) presenta valori significativamente diversi rispetto al gruppo controllo ($p < 0.01$) (Figura 56).

CONCLUSIONI (II)

Nella seconda parte dello studio, è stato valutato il ruolo giocato nell'eziopatogenesi del CD dagli altri recettori serotoninergici espressi a livello intestinale (5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₇). A tal fine sono stati registrati gli effetti locali e sistemici prodotti dalla somministrazione di antagonisti selettivi dei diversi recettori serotoninergici, e più precisamente Ketanserina per il recettore 5-HT₂, Ondansetron per il recettore 5-HT₃, GR125487 per il recettore 5-HT₄ e SB269970 per il recettore 5-HT₇, sul modello acuto di CD indotto da TNBS/EtOH.

I risultati ottenuti presentano una indubbia complessità e non sempre si prestano ad una chiara ed immediata interpretazione. Nell'insieme portano a concludere che la serotonina, liberata a seguito dell'insulto da TNBS, partecipa agli eventi che si sviluppano in sede colica producendo prevalenti risposte pro-infiammatorie soprattutto tramite la mediazione del recettore 5-HT₂ e in minor misura 5-HT₄ ma non si può escludere anche un suo ruolo protettivo, esercitato tramite l'attivazione dei recettori 5-HT₃ e 5-HT₇.

La somministrazione dell'antagonista 5-HT₂ (Ketanserina) infatti ha portato ad un miglioramento nel decorso della condizione patologica, limitando l'incremento dei parametri indicatori di danno morfologica e di stato infiammatorio, a livello topico e sistemico. Benché nell'analisi delle citochine tissutali e plasmatiche il trattamento con Ketanserina non abbia rivelato alcuna variazione significativa rispetto agli animali controllo, in quasi la totalità dei casi si è riscontrato un abbassamento dei livelli di queste proteine verso i valori riscontrati negli animali normali. Si è inoltre registrata una diminuzione significativa dei livelli di caspase 3,

indice di una minore apoptosi e quindi di un minor danno a livello intestinale. L'effetto svolto dalla Ketanserina può essere spiegato considerando il ruolo che la 5-HT, tramite il recettore 5-HT₂, svolge nelle risposte, innata e adattativa, del sistema immunitario: in seguito all'attivazione del recettore 5-HT₂ viene promossa l'attività e la migrazione dei granulociti eosinofili a livello del sito infiammatorio (*Boehme, 2004*), è aumentato il release di citochine dalle cellule dendritiche e la produzione di chemochine dai macrofagi ed inoltre viene stimolata la proliferazione dei linfociti T (*Ahern, 2011*).

Recenti evidenze documentano la comparsa di complicanze tromboemboliche nei pazienti con CD con una frequenza 3-4 volte maggiore rispetto alla popolazione generale. L'eziologia di queste forme di tromboembolismo sembra essere multifattoriale e in gran parte attribuibile ad attivazione della coagulazione e dell'attivazione piastrinica nell'infiammazione sistemica (*Stadnicki, 2012*). Tenendo presente che il recettore 5-HT₂ è presente anche a livello piastrinico dove media l'aggregazione piastrinica, la somministrazione di antagonisti del recettore 5-HT₂ risulterebbe di possibile rilevanza clinica in pazienti con CD, in virtù degli effetti antiinfiammatori e della potenziale protezione nei confronti degli eventi tromboembolici che si possono sviluppare.

Anche la somministrazione dell'antagonista 5-HT₄ (GR125487) ha portato ad un miglioramento del quadro morfologico tissutale con riduzione dello spessore colico e del valore di MS e ad un abbassamento dei livelli di Caspase 3, dimostrando il ruolo protettivo, anti-apoptotico e favorente la rigenerazione tissutale. Non sono disponibili evidenze sufficienti per poter chiaramente definire il meccanismo alla base di questi effetti protettivi tuttavia possono venire in aiuto in questa

interpretazione i dati sulla distribuzione e sul ruolo svolto da questo recettore nel distretto intestinale.

L'azione degli antagonisti del recettore 5-HT₄ potrebbe essere attribuita all'effetto inibitorio esercitato sulle cellule dendritiche responsabili del rilascio di citochine (IL1 β e TGF β) che aumentano la proliferazione dei fibroblasti e la deposizione di materiale amorfo. Va inoltre tenuto presente che il recettore 5-HT₄ a livello dei plessi enterici gioca un ruolo facilitatorio sul rilascio di neurotrasmettitori, tra cui 5-HT, SP e NO che possiedono attività pro-infiammatoria.

La somministrazione dell'antagonista 5-HT₃ (Ondansetron) ha causato un peggioramento del quadro clinico della patologia con un marcato e significativo aumento dei livelli di MPO colica. La diminuzione significativa dell'edema polmonare che è stata registrata sembra probabilmente dovuta alla forte disidratazione causata dalla perdita di funzionalità del colon soggetto a severa infiammazione. Il danno infiammatorio e la forte disidratazione sembrano i maggiori responsabili degli esiti letali osservati nel 40% degli animali di questo gruppo.

Il risultato ottenuto in questo studio contrasta con quello di ricerche precedenti svolte dal gruppo di Mousavizadeh (*Mousavizadeh, 2009*), che avevano dimostrato un'attività protettiva del tropisetron, antagonista 5-HT₃, in un modello di colite indotta da acido acetico, agente che causa principalmente l'irritazione del tessuto, senza l'attivazione del sistema immunitario. La diversa natura e i differenti tempi di sviluppo della colite nei due modelli sperimentali rendono ragione di questa discrepanza.

Benché siano necessari ulteriori studi per valutare il meccanismo alla base del peggioramento del quadro clinico, una possibile spiegazione potrebbe essere individuata nella tendenza di alcuni antagonisti del recettore 5-HT₃ (Alosetron, Cilansetron) a produrre colite ischemica

quando somministrati per il trattamento di IBS di tipo diarroico (*Chang, 2005; Chang, 2010*) e nel fatto che durante uno stato acuto di colite, indotta da TNBS, si è già in presenza di una riduzione del normale flusso ematico intestinale (*Foitzik, 1999*). Queste considerazioni potrebbero quindi spiegare il peggioramento della condizione registrata nel colon degli animali trattati con Ondansetron come risultante di un aggravato stato d'ipossia.

La somministrazione dell'antagonista 5-HT₇ (SB269970) ha generato variazioni minime e risultati discordanti dei parametri analizzati. A parte un aumento significativo dei valori di HSP70, non si sono, infatti, riscontrate variazioni significative dei parametri analizzati rispetto al gruppo controllo se non un significativo aumento di eventi letali. I risultati da noi ottenuti sono differenti rispetto a quelli pubblicati recentemente dal gruppo di Kim (*Kim, 2013*), che ha dimostrato la resistenza al danno da Destrano Sodio Solfato o da Acido DinitroBenzenSolfonico di animali KO per il recettore 5-HT₇. Bisogna considerare però alcune differenze fondamentali nel protocollo utilizzato da questo gruppo rispetto al nostro, che possono spiegare la diversità nei risultati ottenuti come la diversa tipologia di danno intestinale (causato da DSS che genera una risposta immunitaria di tipo T_{h2}) e possibili compensazioni (per la completa assenza di proteine recettoriali).

Lo studio da noi compiuto ha permesso di delucidare il ruolo svolto dai recettori serotoninergici presenti a livello intestinale, dimostrando, per la prima volta:

- il ruolo marginale svolto dal recettore 5-HT₇ in questa patologia;

- il ruolo protettivo svolto da antagonisti dei recettori 5-HT₂ e 5-HT₄, che potrebbero dimostrarsi utili per il trattamento di clinico di pazienti affetti da CD;
- gli effetti negativi ed esacerbanti prodotti da una terapia che porta al blocco del recettore 5-HT₃, in un quadro sperimentale di CD.

MATERIALE E METODI

ANIMALI E PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Lo studio è stato eseguito su topi di razza Swiss di sesso femminile (Charles-River, Italia), di età compresa tra le 6 e le 10 settimane. Gli animali sono stati stabulati con cibo ed acqua *ad libitum* ed esposti a cicli di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

La ricerca è stata suddivisa due serie di esperimenti. Nel primo set è stata valutata l'attività del recettore 5-HT_{1A} nel modello acuto di colite da TNBS. I topi sono stati assegnati casualmente a quattro gruppi sperimentali, composti da 16 animali ciascuno:

- Gruppo [N]: topi che non subiscono nessun tipo di trattamento farmacologico;
- Gruppo [C]: topi a cui è stata indotta la colite sperimentale e che hanno ricevuto il veicolo (soluzione fisiologica 10 ml/kg sc);
- Gruppo [W]: topi a cui è stata indotta la colite sperimentale e che sono stati trattati con WAY100135 5mg/kg sottocute;
- Gruppo [O]: topi a cui è stata indotta la colite sperimentale e che sono stati trattati con 8-OH-DPAT 1mg/kg sottocute;

Nella seconda serie di esperimenti è stata valutata l'attività dei recettori 5-HT₂₋₃₋₄₋₇ nello stesso modello acuto di Morbo di Crohn. Gli animali sono stati suddivisi in 6 gruppi sperimentali, composti da 10 animali ciascuno:

- Gruppo [N]: topi che non hanno subito alcun tipo di trattamento;

- Gruppo [C]: topi in cui è stata indotta la colite sperimentale e che hanno ricevuto il veicolo (soluzione fisiologica 10 ml/kg sc);
- Gruppo [K]: topi in cui è stata indotta la colite sperimentale e che hanno ricevuto Ketanserina 5 mg/kg sottocute;
- Gruppo [O]: topi in cui è stata indotta la colite sperimentale e che hanno ricevuto Ondansetron 10 mg/kg sottocute;
- Gruppo [G]: topi in cui è stata indotta la colite sperimentale e che hanno ricevuto GR125487 10 mg/kg sottocute;
- Gruppo [S]: topi in cui è stata indotta la colite sperimentale e che hanno ricevuto SB296970 10 mg/kg sottocute.

Il primo giorno gli animali sono stati tenuti a digiuno le 16 ore precedenti l'induzione della colite, al fine di evitare la perdita della soluzione di TNBS per defecazione.

L'induzione della colite avviene tramite somministrazione intrarettale di 50 µl di una soluzione di TNBS 0,34 M in etanolo 50% ai topi sotto anestesia eterea. La soluzione è stata inoculata tramite un catetere PE50, che è stato mantenuto 2 cm all'interno del retto dell'animale per 1 minuto. Gli animali sono mantenuti in posizione verticale per 2 minuti, al fine di evitare la fuoriuscita della soluzione per gravità. Al termine della procedura, i topi sono rimessi nelle gabbie con libero accesso a cibo ed acqua. Ai topi del gruppo [N] sono stati inoculati 50 µl di soluzione fisiologica (NaCl 0,9% p/v).

Un'ora dopo l'induzione della colite, i trattamenti farmacologici iniziano, e consistono nella somministrazione due volte al giorno per via sottocutanea di soluzione fisiologica per i gruppi [N] e [C], di WAY100135 (5 mg/kg) per il gruppo [W] e di 8-OH DPAT·HBr (1 mg/kg) per il gruppo [O], per la prima serie di esperimenti, Ketanserina (5mg/kg) per il gruppo [K], Ondansetron (10mg/kg) per il gruppo [O],

GR125487 (10mg/kg) per il gruppo [G] e SB269970 (10mg/kg) per il gruppo [S] per la seconda serie di esperimenti. Il quarto giorno dopo l'induzione, l'animale è sacrificato per inalazione di CO₂, gli organi e il sangue sono prelevati per le analisi macroscopiche e biochimiche.

Il protocollo dell'esperimento è stato svolto secondo le norme di legge vigenti in materia di sperimentazione animale ed autorizzato dal Ministero della Salute (DL 116/92).

PARAMETRI ANALIZZATI

A partire dal giorno dell'induzione fino al sacrificio sono stati monitorati giornalmente il peso e la condizione generale di salute degli animali. In seguito al sacrificio dell'animale, l'intestino è stato fotografato sia aperto che chiuso, ne è stata misurata la lunghezza ed il peso, ne è stato stimato lo spessore e si è provveduto alla valutazione macroscopica del danno tissutale. Successivamente, al fine di valutare l'infiammazione tissutale, è stato suddiviso in quattro porzioni per quantificare l'edema colico, l'attività della mieloperossidasi colica (MPO), i livelli delle citochine (TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL10, IL-2 e IL-4) e, nella prima serie di esperimenti, sono stati anche valutati i livelli di SP e 5-HT, mentre, nella seconda serie, sono stati valutati i livelli di di Caspase 3, HSP70, CD68 e TLR2.

Per valutare l'infiammazione e livello periferico, il fegato è stato prelevato per la valutazione dell'edema, a livello polmonare sono stati quantificati edema e MPO, sono stati misurati i livelli plasmatici di TNF α , IL-1 β e, nella prima serie di esperimenti, sono stati valutati anche i livelli plasmatici dei nitriti.

Disease Activity Index (DAI)

L'onset della patologia indotta tramite instillazione intrarettale di TNBS è stata valutata per tutto il periodo della sperimentazione utilizzando una modifica del metodo di Cooper (*Cooper, 1993*) che prevede l'assegnazione di un punteggio a vari parametri, la cui somma (DAI) fornisce una stima del decorso della patologia. Il punteggio è stato così assegnato:

Consistenza delle feci:

- [2] Feci liquide
- [1] Feci molli
- [0] Normale output fecale

Rettorragia:

- [1] Presenza di rettorragia
- [0] Assenza di rettorragia

Variazione ponderale:

- [4] Perdita ponderale superiore al 20 %
- [3] Perdita ponderale compresa tra il 15 ed il 20 %
- [2] Perdita ponderale compresa tra il 10 ed il 15 %
- [1] Perdita ponderale compresa tra il 5 ed il 10%
- [0] Perdita ponderale inferiore al 5%

Spessore intestinale

Durante un processo infiammatorio, nell'area lesionata, si ha l'aumento della permeabilità vascolare che dà luogo alla formazione di un essudato infiammatorio e si ha la deposizione di materiale fibrotico. L'essudato è costituito soprattutto da proteine plasmatiche e cellule infiammatorie

fuoriuscite dai vasi, come i neutrofili e i monociti. La formazione dell'edema infiammatorio e la deposizione di materiale fibrotico porta ad un aumento dello spessore colico, con conseguente perdita di funzionalità tissutale.

Per la quantificazione dello spessore colico è stata utilizzata la metodologia di Bischoff (*Bischoff, 2009*), in cui viene rapportato il peso colico (g) con la lunghezza del segmento stesso (cm).

Macroscopical Score (MS)

Per la valutazione macroscopica (MS) sull'entità del danno tissutale, sono stati sommati i singoli valori assegnati ai seguenti aspetti, secondo una modifica dal metodo proposto da Cooper (*Cooper, 1993*).

Emorragia intraluminale:

- [1] Presenza di sangue nel lume intestinale
- [0] Assenza di sangue nel lume intestinale

Muco:

- [1] Presenza di muco nel lume intestinale
- [0] Assenza di muco nel lume intestinale

Eritema

- [2] Presenza di un'area arrossata superiore ad 1 cm
- [1] Presenza di un'area arrossata fino ad 1 cm
- [0] Assenza di eritema

Ulcerazioni

- [2] Presenza di aree necrotiche superiori ad 1 cm
- [1] Presenza di aree necrotiche fino ad 1 cm
- [0] Assenza di aree necrotiche

Restringimenti

- [3] Presenza di più di 2 restringimenti
- [2] Presenza di 2 restringimenti
- [1] Presenza di 1 restringimento
- [0] Assenza di restringimenti

Aree di adesione

- [3] Presenza di più di 2 aree di adesione tra organi
- [2] Presenza di 2 aree di adesione tra organi
- [1] Presenza di 1 area di adesione tra organi
- [0] Assenza di aree di adesione

Edema colico ed epatico

La valutazione dello stravasamento infiammatorio nel singolo organo o tessuto è stata ottenuta tramite una modifica del metodo Moore-Olufemi (*Moore-Olufemi, 2005*). Il campione è stato pesato subito dopo l'asportazione (peso umido) e dopo essiccazione a temperatura ambiente per 24 ore (peso secco). Il colon è lasciato asciugare dopo essere stato aperto lungo il tratto anti-mesenterico. Il rapporto tra la variazione di peso dovuta all'essiccazione del campione e il peso del tessuto secco fornisce la misura dell'edema:

[Edema = (peso umido- peso secco)/peso secco].

MPO colica e polmonare

L'attività della mieloperossidasi è una misura indiretta dell'accumulo di neutrofili a livello colico e polmonare. Il metodo utilizzato per la quantificazione della MPO è quello di Krawisz (*Krawisz, 1984*), a cui sono state apportate alcune modifiche.

La porzione di tessuto intestinale o polmonare è rapidamente prelevata, pesata e omogenata tramite sonicazione [Misonix Ultrasonic Processor XL-2020 (Gilson Italia)] in 10 volumi di tampone fosfato (PBS 100 mM a pH 7,4) addizionato di un inibitore delle proteasi (aprotinina 1µg/ml) . L'omogenato è centrifugato a 10.000 giri/minuto (rpm) per 20 minuti ad una temperatura di 4°C.

Il pellet, contenente più del 90% dell'attività MPO totale, è omogenato nuovamente in 5 volumi di PBS 50 mM a pH 6,0 contenente esadeciltrimetilammonio bromuro (HTAB) allo 0,5% e aprotinina (1 µg/ml). Il prodotto che si ottiene è conservato in criotubi e sottoposto a tre cicli di congelamento/scongelamento in azoto liquido (10 minuti) e in bagno termostato a 37°C (15 minuti). Al termine i criotubi sono centrifugati a 12000 rpm per 30 minuti ad una temperatura di 4°C.

Un'aliquota di surnatante (100 µl) è fatta reagire con una soluzione di reazione (900 µl) contenente H₂O₂ 0,0005% e O-dianisidina 0,167 mg/ml in PBS 50 mM a pH 6,0. I dati di assorbanza sono letti da uno spettrofotometro a λ 470 nm, tramite una lettura cinetica della durata di 4 minuti.

Un'unità di MPO è definita come la quantità di enzima in grado di causare una variazione di assorbanza di 1 unità/min a 25°C, a λ 470 nm. I risultati così ottenuti sono normalizzati per l'edema del campione ed espressi come U su g di tessuto secco.

Citochine tissutali

I livelli di TNFα, IL1β IFNγ, IL10, IL2 e IL4 sono stati rilevati mediante un kit ELISA, secondo la metodologia proposta da Chen (*Chen, 2006*).

I segmenti di colon sono stati conservati a -80°C fino al giorno dell'esperimento, quando sono stati tagliati in piccoli pezzi in un buffer di

lisi contenente 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodio deoxicolato, 1 mM EDTA, 0.1% SDS (pH 7.5) ed un cocktail di proteasi (aprotinina, pepstatina e leupeptina 1 μ M) I tessuti sono quindi stati omogenati e centrifugati per 20 minuti a 13000 rpm a 4°C. Sul surnatante sono state quantificate le proteine e la concentrazione di ogni campione è stata portata al valore di 5 mg/ml, in modo tale da caricare in ogni pozzetto 100 μ l di soluzione, contenenti 500 μ g di proteina. I livelli delle citochine sono quindi stati quantificati tramite kit ELISA in accordo con le istruzioni del fornitore, e la piastra è stata letta a 450 nm e i risultati sono stati espressi come pg di citochina su mg di proteina.

Citochine plasmatiche

I livelli di TNF α ed IL-1 β sono stati quantificati tramite kit ELISA.

In seguito all'eutanasia, il sangue è prelevato dal ventricolo destro del topo, addizionato di eparina 150 UI/ml e centrifugato a 4500 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente per separare le emazie dal plasma. Il surnatante (plasma) è stato conservato a -20°C fino al giorno dell'esperimento, quando 100 μ l sono stati caricati a livello del kit ELISA per la quantificazione delle citochine e tale kit è stato svolto seguendo le indicazioni fornite dal rivenditore. La piastra è quindi stata letta a 450 nm ed i risultati sono stati espressi come pg di citochina per ml di plasma.

Nitriti plasmatici

La determinazione dei nitriti è effettuata mediante il metodo di Guevara (*Guevara, 1998*) attraverso la reazione di Griess.

100 μ l di plasma sono stati incubati in una vial con 150 μ l di nitrato riduttasi (50 mU/100 μ l di campione) e 10 μ l di NADPH (80 μ M) per 2

ore a 37°C al buio. Successivamente, a questa soluzione, sono stati aggiunti 240 µl di una miscela metanolo/etere 3:1 v/v e viene vorticato tramite Vortex per 15 secondi. Dopo incubazione overnight al buio, le proteine precipitate sono eliminate per centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 4°C. Il surnatante così ottenuto è privo di proteine e può essere analizzato tramite spettrofotometria, previa aggiunta dei reattivi di Griess.

Per ogni campione sono stati riempiti due pozzetti di una piastra da 96 con 100 µl di surnatante e vengono successivamente aggiunti nell'ordine 25 µl di HCl 6N e 25 µl di acido sulfanilico 37,5 M (Reattivo di Griess "A"), incubando per 10 minuti a temperatura ambiente. Infine sono stati addizionati 25 µl di naftetilendiammina 12,5 M (Reattivo di Griess "B") e lasciata incubare per 30 minuti sull'agitatore. Entrambi i periodi di incubazione vengono svolti al buio.

La lettura spettrofotometrica è effettuata a 550 nm ed i risultati sono quindi espressi come µg di nitriti su ml di plasma.

Serotonina colica

La quantità di serotonina colica è stata rivelata mediante un kit ELISA di tipo competitivo tra la serotonina e la serotonina acilata.

I campioni di colon sono trattati con HCl 0,01N e acido ascorbico 0,1% per prevenire la degradazione della serotonina e sono successivamente diluiti 1000 volte con una miscela diluente presente nel kit e trasferiti in una prima piastra, in cui far avvenire la reazione di acilazione della serotonina.

In seguito sono state trasferite aliquote di 100 µl delle soluzioni acilate nella piastra ELISA ed il kit è stato svolto secondo le indicazioni fornite dal rivenditore. La lettura tramite spettrofotometro è stata effettuata a 450

nm. I risultati così ottenuti sono stati quindi corretti per il peso del tessuto e per il valore dell'edema tissutale ed espressi come pg su mg di tessuto secco.

Sostanza P colica

La misurazione tissutale di tale sostanza è effettuata mediante un kit ELISA, secondo quanto descritto da Ursino (*Ursino, 2009*).

I campioni sono stati omogenati tramite sonicatore per 1 minuto in 0,5 ml di PBS contenente un cocktail di inibitori proteici (pepstatina, aprotinina e leupeptina alla concentrazione di 1 μ M).

Gli omogenati sono poi centrifugati per 15 minuti a 6000 g alla temperatura di 4°C e un'aliquota del surnatante (50 μ l) è caricata nei pozzetti. Il kit è stato svolto seguendo le indicazioni del fornitore, e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 405 nm.

I risultati così ottenuti sono stati quindi corretti per il peso del tessuto e per il valore dell'edema tissutale ed espressi come ng su mg di tessuto secco.

Livelli tissutali di CD68, TLR2, Caspase 3 e HSP70

I livelli tissutali di CD68, TLR2, Caspase 3 e HSP70 sono stati quantificati tramite l'utilizzo di kit ELISA. Segmenti di colon sono stati lavati con PBS (0.02 mol/l, pH 7.0-7,2, 4°C), al fine di rimuovere l'eccesso di sangue presente nel tessuto, tagliati in piccoli pezzi e sonicati. In seguito alla sonicazione è avvenuta una centrifugazione di 15 minuti a 1500 g. Il surnatante è stato prelevato, sono state quantificate le proteine ed un'aliquota di tale surnatante (contenente 100 μ g/ml di proteina per Caspase3 e CD68 o 200 μ g/ml di proteina per HSP70 e

TLR2) è stata addizionata al kit ELISA, svolto secondo le indicazioni fornite dal rivenditore. La lettura spettrofotometrica è stata effettuata a 450 nm e i risultati sono stati espressi come ng su mg di proteina per Caspase 3, CD68 e TRL2 e pg su mg di proteina per HSP70.

ANALISI STATISTICA DEI DATI

I dati sono stati espressi come valore medio \pm errore standard (SEM). L'analisi statistica è stata eseguita applicando One-Way ANOVA seguita dal post-test di Dunnett, fatta eccezione per i dati riguardanti DAI, MS, i valori delle citochine, CD68, TLR2, Caspase 3 e HSP70, per i quali è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunn. Valori di P inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi, valori inferiori a 0,01 altamente significativi e inferiori a 0,001 estremamente significativi. Tutti i test sono stati eseguiti utilizzando il programma di analisi statistica Prism 5 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA).

REAGENTI CHIMICI

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti chimici, acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA): acido 2,4,6 trinitrobenzensolfonico 1M, metanolo, etanolo, butanolo, eparina, etere dietilico, acido tiobarbiturico, acido acetico, O-dianisidina, esadeciltetrametilammonio (HTAB), H₂O₂ 30%, HCl, 8-OH-DPAT, acido sulfanilico, O-nafteilendiammina, nitrato reduttasi, pepstatina, aprotinina, leupeptina, NADPH e NaNO₂, Ondansetron. Il WAY-100135, GR125487 e

SB269970 sono stati invece acquistati presso la ditta Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Per la quantificazione di TNF α , IL1 β , IL10, IFN γ , IL4 ed IL2 sono stati utilizzati kit ELISA della eBioscience (San Diego, CA, USA), per la sostanza P e della 5-HT sono stati usati EIA KIT rispettivamente della ditta Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) e della ditta Abnova (Taipei City, Taiwan), mentre per la CD68, TLR2, Caspase 3 e HSP70 sono stati utilizzati kit acquistati dalla Amsbio (Madrid, Spain).

BIBLIOGRAFIA

- Abdoun, M. S. (2001). Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in activated B and T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* , 276, 4382-4388.
- Abraham, C. C. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine* , 361, 2066-2078.
- Abreu, T. A. (2005). TLR signalin in gut in health and disease. *The journal of Immunology* , 174, 4453-4460.
- Ahern, G. P. (2011). 5-HT and the immune system. *Current Opinion in Pharmacology* , 11, 29-33.
- Annese, V. B. (1997). Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* , 31, 1107-1117.
- Aune, T. M. (1993). Expression of 5-HT_{1a} receptors on Activated Human T Cells. *The Journal of Immunology* , 151, 1175-1183.
- Aune, T. M. (1994). Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1a receptors inhibit T lymphocyte function in vitro and cell-mediated immunity in vivo. *The Journal of Immunology* , 153, 489-498.
- Azzolina, A. B. (2003). Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* , 7, 75-83.
- Bai, P. A. (2006). Probiotics and inflammatory bowel disease. *Postgraduate Medical Journal* , 82, 376-382.
- Beattie, D. T. (2008). Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn-Schmiedeberg' s Archives of Pharmacology* , 377, 181-203.

- Bene, L. F. (2011). Cellular and molecular mechanisms in the two major form of inflammatory bowel disease. *Pathology & Oncology Research* , 17, 463-472.
- Bischoff, S. C. (2009). Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology* , 296, G685-G695.
- Boehme, S. A. (2004). Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. *The Journal of Immunology* , 173, 3599-3603.
- Boismenu, R. C. (2000). Insights from mouse models of colitis. *Journal of Leukocyte Biology* , 67, 267-278.
- Bonaventure, P. N. (2005). Molecular and pharmacological characterization of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor subtypes in dogs. *European Journal of Pharmacology* , 513, 181-192.
- Calkins, B. M. (1984). Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestive Disease and Science* , 29, 913-920.
- Carter, D. C. (1995). Characterization of a postjunctional 5-HT receptor mediating relaxation of guinea pig isolated ileum. *European Journal of Pharmacology* , 280, 243-250.
- Chang, L. C. (2005). Incidence of ischemic colitis and serious complications of constipation among patients using alosetron: systematic review of clinical trials and post-marketing surveillance data. *The American Journal of Gastroenterology* , 101, 1069-1079.
- Chang, L. T. (2010). Ischemic colitis and complications of constipation associated with the use of alosetron under a risk management plan: clinical characteristics, outcomes, and incidences. *The American Journal of Gastroenterology* , 105, 866-875.

- Cho, J. H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* , 8, 458-466.
- Cooper, H. S. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory investigation* , 69, 238-249.
- Correa, I. V. (2009). Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. *Journal of Leukocyte Biology* , 85, 896-903.
- Costa, M. B. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* , 47, 15-19.
- Cucchiara, S. S. (2011). Incidence in pediatric IBD is rising: help from health administrative data. *Inflammatory Bowel Disease* , 17, 1048-1049.
- Cuesta, M. C.-R. (2002). Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochemistry International* , 40, 301-306.
- Cunin, P. C. (2011). The tachykinins substance P and hemokinin-1 favor the generation of human memory Th17 cells by inducing IL-1 β , IL-23, and TNF-like 1A expression by monocytes. *Journal of Immunology* , 186, 4175-4182.
- Danese, S. S. (2005). Extraintestinal manifestation in Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology* , 11, 7227-7236.
- Dawson, L. A. (2000). In vivo effects of the 5-HT(6) antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *British Journal of Pharmacology* , 130, 23-26.
- De Ponti, F. (2004). Pharmacology of Serotonin: what a clinician should know. *Gut* , 53, 1520-1535.
- Debler, J. S. (2003). Heat-shock protein HSP70-2 genotypes in patients with Crohn's disease: a more severe clinical course with intestinal complications in presence of the PstI-polymorphism. *European Journal of Medical Research* , 27, 120-124.

- Delgado, A. V. (2003). Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* , 37, 355-361.
- Depoortere, I. T. (2002). Generalized loss of inhibitory innervation reverses serotonergic inhibition into excitation in a rabbit model of TNBS-colitis. *British Journal of Pharmacology* , 135, 2011-2019.
- Duerr, R. H. (2006). A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* , 314, 1461-1463.
- Dvorak, A. M. (1985). Differentiation between Crohn's disease and other inflammatory conditions by electron microscopy. *Annals of Surgery* , 201, 53-56.
- Economou, M. P. (2008). New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflammatory Bowel Disease* , 14, 709-720.
- Elson, C. O. (2001). Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insight into old enigma. *Seminars in Immunology* , 13, 187-194.
- Fireman, Z. G. (1989). Epidemiology of Crohn's disease in the Jewish population of central Israel, 1970-1980. *The American Journal of Gastroenterology* , 84, 255-258.
- Fisher, S. A. (2008). Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature Genetics* , 40, 710-712.
- Foitzik, T. K. (1999). Does microcirculation play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases? Answers from intravital microscopic studies in animal models. *International Journal of Colorectal Disease* , 14, 29-34.

- Foley, S. C. (2006). Serotonin transporter expression is reduced in celiac disease. *Gastroenterology* , 130, 740.
- Freire-Garabal, M. N.-D.-C.-R.-M. (2003). Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. *British Journal of Pharmacology* , 139, 457-463.
- Furness, J. B. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in Neurobiology* , 72, 143-164.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* , 9, 286-294.
- Fuss, I. J. (1999). Successful treatment of experimental (TNBS) colitis by intranasal transfer of DNA encoding active TGF. *Immunology Letters* , 69, 116.
- Gershon, M. D. (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* , 132, 397-414.
- Ghia, J. E.-S. (2009). Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology* , 137, 1649-1660.
- Gross, K. J. (2007). Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease* , 13, 918-932.
- Guevara, I. I.-K.-M. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Chimica Clinica Acta* , 274, 177-188.
- Hampe, J. F. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics* , 39, 207-211.
- Henry, S. P. (1999). Correlation of toxicity and pharmacokinetic properties of a phosphorothioate oligonucleotide designed to inhibit ICAM-1. *Toxicologic Pathology* , 27, 95-100.

- Hogaboam, C. M. (1997). Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* , 100, 2766-2776.
- Hou, J. K.-S. (2009). Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *American Journal of Gastroenterology* , 104, 2100-2109.
- Hugot, J. P.-P.-R. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* , 411, 599-603.
- Kim, J. J. (2013). Targeted inhibition of serotonin type 7 (5-HT7) receptor function modulates immune responses and reduces the severity of intestinal inflammation. *Journal of Immunology* , 190, 4795-4804.
- Komada, T. Y. (2007). Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-receptor subtypes in circular muscle from the rat stomach. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* , 30, 508-513.
- Koon, H. W. (2010). Substance P modulates colitis-associated fibrosis. *The American Journal of Pathology* , 177, 2300-2309.
- Krawisz, J. E. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* , 87, 1344-1350.
- Kubera, M. M. (2005). Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Psychiatry Research* , 30, 251-258.
- Kuemmerle, J. F. (1995). Coexpression of 5-HT2A and 5-HT4 receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology* , 109, 1791-1800.
- Kumar, V. A. (2010). *Robbins and Cotran pathological basis of disease* (Vol. Eight Edition). Saunders Elsevier.

Kushnir-Sukhov, N. M. (2006). 5- hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *Journal of Immunology* , 177, 6422–6432.

Kushnir-Sukhov, N. M. (2006). 5- hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *Journal of Immunology* , 177, 6422–6432.

Langrish, C. L. (2005). IL-13 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* , 201, 233-240.

Lewis, R. T. (2010). Efficacy and Complications of Surgery for Crohn's Disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* , 6, 587-596.

Linder, D. R. (2005). Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterology and Motility* , 17, 565-574.

Loftus, E. V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* , 126, 1504-1517.

Ma, C. C. (2012). Postoperative complications following colectomy for ulcerative colitis: a validation study. *BMC Gastroenterology* , 12, 39.

Manousos, O. N. (1996). A prospective epidemiologic study of Crohn's disease in Heraklion, Crete. Incidence over a 5-year period. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* , 31, 599-603.

Marks, D. J. (2008). Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *The Journal of Pathology* , 214, 260-266.

Maté-Jimenez, J. M. (1994). Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988. *Journal of Clinical Gastroenterology* , 18, 27-31.

Mattar, M. C. (2011). Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Res* , 4, 53-61.

Matthes, H. B. (1993). Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin

receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Molecular Pharmacology* , 43, 313-319.

Mertz, H. (2003). Review article: visceral hypersensitivity. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* , 37, 231-237.

Miceli, R. H. (1999). Efficacy of keratinocyte growth factor-2 in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 290, 464- 471.

Moore-Olufemi, S. D. (2005). Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock* , 23, 258-263.

Mori, T. K. (2004). 5-HT₃-receptor antagonist inhibits visceral pain differently in chemical and mechanical stimuli in rats. *Journal of Pharmacological Sciences* , 94, 73-76.

Mousavizadeh, K. R. (2009). Anti-inflammatory effects of 5-HT receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats. *European Journal of Clinical Investigation* , 39, 375-383.

Neurath, M. F. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *The Journal of Experimental Medicine* , 182, 1281-1290.

Niittynena, L. P. (2012). Probiotics and otitis media in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* , 4, 465-470.

Pacher, P. B. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* , 87, 315-424.

Porter, C. K. (2012). Risk of inflammatory bowel disease following a diagnosis of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology* , 12, 55.

Rang, H. P. (2008). *Farmacologia*. Milano: Elsevier Masson.

Rioux, J. R. (2007). Genome-wide association study identifies five novel susceptibility loci for Crohn's disease and implicates a role for autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genetics* , 39, 596-604.

- Rovedatti, L. K. (2009). Differential regulation of interleukin 17 and interferon γ production in inflammatory bowel disease. *Gut* , 58, 1629-1636.
- Saikumar, P. D. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine* , 107, 489-506.
- Shivananda, S. L.-J. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* , 39, 690-697.
- Soon, I. S. (2012). The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterology* , 12, 51.
- Stadnicki, A. (2012). Involvement of coagulation and hemostasis in inflammatory bowel diseases. *Current Vascular Pharmacology* , 10, 659-669.
- Tonini, M. V. (2005). 5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology* , 129, 1557-1566.
- Tragnone, A. C. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease in Italy: a nationwide population-based study. Gruppo Italiano per lo Studio del Colon e del Retto (GISC). *International Journal of Epidemiology* , 25, 1044-1052.
- Turner, J. R. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American Journal of Pathology* , 169, 1901-1909.
- Ursino, M. G. (2009). Protection from DNBS-induced colitis by the tachykinin NK(1) receptor antagonist SR140333 in rats. *European Journal of Pharmacology* , 603, 133-137.

Vucelić, B. K. (1991). Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. *International Journal of Epidemiology* , 20, 216-220.

Wouters, M. M. (2007). 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterology and Motility* , 19, 5-12.

Xing, J. F. (2012). Protective effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rats. *Digestive Disease and Science* , 57, 2045-2054.