

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di Ricerca in Clinica e Terapia d’Urgenza

Ciclo XXI

TESI DI DOTTORATO

IMPORTANZA DEL SISTEMA NERVOSO INTRINSECO ED ESTRINSECO
NEL CONTROLLO DELLA GIUNZIONE ILEO-CIECALE NEL CAVALLO:
IMPLICAZIONI CHIRURGICHE IN CASO DI RESEZIONE ILEALE.

Tesi di Dottorato
di:

CORRADO MONTONERI

Relatore
Chiar.mo Prof.

LORENZO MASETTI

Visto, si approva la tesi

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento al Prof.Lorenzo Masetti, alla Prof.ssa Monika Joechler ed al Dott.Luciano Pisoni, della Sezione di Chirurgia del Dipartimento Clinico della Facoltà di medicina Veterinaria di Bologna, per la disponibilità ed il calore mostrati nell'avermi accolto nel loro gruppo di lavoro come in una famiglia.

Un ringraziamento particolare al Prof.Roberto Chiocchetti, del Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali della Facoltà di medicina Veterinaria di Bologna, per l'amicizia dimostrata nel corso di questi anni e l'estrema professionalità ed entusiasmo dimostrati nella conduzione e nell'assistenza allo svolgimento del lavoro quotidiano.

MOTIVAZIONI DELLO STUDIO ED OBIETTIVI

Il sistema nervoso enterico (“*Enteric Nervous System*”, ENS) è un insieme di neuroni e fibre intramurali frammiste a fibre nervose provenienti dal sistema nervoso simpatico e parasimpatico. I neuroni enterici, organizzati nei gangli dei plessi mioenterico e sottomucoso, regolano le principali funzioni enteriche, come l’attività muscolare, l’assorbimento, la secrezione, il flusso ematico e linfatico. Tra i neuroni dell’ENS troviamo motoneuroni eccitatori ed inibitori, interneuroni, neuroni vasomotori e secretomotori, e anche neuroni sensitivi primari, che rendono l’intestino quasi totalmente indipendente dal controllo nervoso centrale. L’intestino perciò possiede un “secondo cervello” definito anche “*the little brain*” o più propriamente “*the brain in the gut*”. Sebbene la maggior parte degli studi sull’ENS sia stata svolta su modelli murini, esistono ricerche relative all’organizzazione, morfologia e neurochimica dei neuroni enterici del cavallo. Tuttavia la letteratura non riporta studi morfo-funzionali riguardanti il controllo intramurale della giunzione ileo-ciecale (“*ileocaecal junction*”, ICJ), sede di frequenti complicazioni gastroenteriche. E’ quindi oggi indispensabile, per il chirurgo, approfondire le conoscenze sull’intimo controllo della ICJ. In questa tesi si presenta uno studio sperimentale condotto in collaborazione tra il Prof. Roberto Chiocchetti (DIMORFIPA) e la Sezione di Chirurgia del Dipartimento Clinico della Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Ateneo di Bologna. I risultati di questa ricerca sono stati pubblicati (febbraio 2009) dalla rivista *Equine Veterinary Journal* (“Intrinsic innervation of the ileocaecal junction in the horse: Preliminary study” doi: 10.2746/042516409X407594) e accettati (marzo 2009) dalla rivista scientifica *Research in Veterinary Science* (“Intrinsic innervation of the horse ileum”). Altri risultati, in corso di scrittura, saranno presentati quanto prima (“Anatomical evidence of sympathetic control of the distal ileum and ileocaecal junction in the horse”).

Questo studio è stato condotto grazie ai fondi del RFO 2007, Università di Bologna.

AUTORIZZAZIONE ALLA SPERIMENTAZIONE

Tutte le procedure descritte a seguito sono state svolte seguendo la legislazione italiana che riguarda i protocolli di sperimentazione animale, dopo approvazione del Comitato Etico-Scientifico per Sperimentazioni su Animali della Università di Bologna (Rif. BQ/gf PROT.: 13825-X/10 All. 17 del 19/03/2007).

Sono stati compiuti tutti gli sforzi possibili allo scopo di minimizzare il numero di animali impiegati e la loro sensibilità al dolore.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

CaudMG - *caudal mesenteric ganglion*
CG - *coeliac ganglion*
CGRP - *calcitonin gene-related peptide*
ChAT - *choline acetyl transferase*
CMG - *cranial mesenteric ganglion*
CML - *circular muscle layer*
CNS - *central nervous system*
DBH - *dopamine-beta hydroxylase*
DRG - *dorsal root ganglion*
EGS - *equine grass sickness*
ENS - *enteric nervous systems*
GIT - *gastrointestinal tract*
ICJ - *ileocaecal junction*
IML - *intermedio-lateral cell colum*
IPANs - *intrinsic primary sensory neurons*
IR - *immunoreactive*
ISMP - *inner submucosal plexus*
LML - *longitudinal muscle layer*
mm - *muscularis mucosae*
MMC - *myoelectric migrating complex*
MP - *myenteric plexus*
NF200 - *neurofilament 200kDa*
nNOS - *neuronal nitric oxide synthase*
NPY - *neuropeptide Y*
NSE - *neuron specific enolase*
OSMP - *outer submucosal plexus*
PBS - *phosphate buffer saline*
PGP 9.5 - *protein gene product*
S100 - *calcium binding protein*
SC - *sympathetic chain*
SG - *splanchnic ganglia*
SMP - *submucosal plexus*
SNA - *autonomic nervous system*
SNS - *sympathetic nervous system*
SP - *substance P*
TH-IR - *tyrosine hydroxylase*
TSC - *toracic sympathetic chain*

INDICE

1. ANATOMIA - P.12

1.1. ILEO - P.12

- 1.1.1. STRUTTURA DELLA PARETE ILEALE - P.12
- 1.1.2. ANATOMIA TOPOGRAFICA ILEALE - P.15
- 1.1.3. ANATOMIA VASCOLARE ILEALE - P.15
 - 1.1.3.1. FLUSSO SANGUIGNO ILEALE - P.17

1.2. CIECO - P.20

- 1.2.1. STRUTTURA DELLA PARETE CECALE - P.20
- 1.2.2. ANATOMIA TOPOGRAFICA CECALE - P.21
- 1.2.3. VASCOLARIZZAZIONE CECALE - P.21

1.3. VALVOLA ILEO-CIECALE (*Ileo-Caecal Junction, ICJ*) - P.22

- 1.3.1. STRUTTURA DELLA ICJ - P.22
- 1.3.2. VASCOLARIZZAZIONE DELLA ICJ - P.23
- 1.3.3. INNERVAZIONE ESTRINSECA DELLA ICJ - P.25
 - 1.3.3.1. SISTEMA NERVOSO SIMPATICO - P.25
 - 1.3.3.1.1. Simpatico addominale - P.25
 - 1.3.3.1.1.1. *Plesso e ganglio celiaco* - P.26
 - 1.3.3.1.1.2. *Plesso e ganglio mesenterico craniale* - P.27
 - 1.3.3.1.1.3. *Plesso e ganglio mesenterico caudale* - P.27
 - 1.3.3.2. SISTEMA NERVOSO PARASIMPATICO - P.27
 - 1.3.3.3. INNERVAZIONE SENSITIVA - P.28
 - 1.3.3.3.1. Gangli delle radici dorsali del midollo spinale - P.28
 - 1.3.3.3.2. Organizzazione della sostanza grigia del midollo spinale - P.29
 - 1.3.3.3.3. Organizzazione della sostanza bianca del midollo spinale - P.29
 - 1.3.3.3.4. Vie sensitive - P.30
 - 1.3.3.3.4.1. Sensibilità viscerale - P.30
- 1.3.4. INNERVAZIONE INTRINSECA (*Enteric Nervous System, ENS*) - P.30
 - 1.3.4.1. FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA DELL'INNERVAZIONE INTRINSECA - P.30
 - 1.3.4.2. ORGANIZZAZIONE MORFO-FUNZIONALE DEL ENS - P.31
 - 1.3.4.3. CODICE CHIMICO E MECCANISMI DI TRASMISSIONE NEURONALE - P.34

- 2. FISIOLOGIA DELLA MOTILITÀ ILEO-CIECALE** - P.36
 - 2.1. MOTILITÀ DELL'INTESTINO TENUE - P.36
 - 2.2. MOTILITÀ CECALE - P.40
 - 2.3. CONTROLLO NEUROMUSCOLARE ILEOCECALE - P.41

- 3. FISIO-PATOLOGIA DELLA MOTILITÀ ILEO-CIECALE** - P.43
 - 3.1. INFIAMMAZIONE - P.43
 - 3.2. RIFLESSI NEURONALI - P.44
 - 3.3. DISTENSIONE - P.45
 - 3.4. DIFETTI DI SVUOTAMENTO CECALE - P.46

- 4. STUDIO SPERIMENTALE** - P.47
 - 4.1. SINTESI** - P.47
 - 4.1.1. CONCLUSIONI - P.48
 - 4.1.2. POTENZIALE RILEVANZA - P.49
 - 4.2. INTRODUZIONE** - P.50
 - 4.3. MATERIALI E METODI** - P.55
 - 4.3.1. PRIMA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELL'ILEO - P.55
 - 4.3.1.1. PREPARAZIONE DEI TESSUTI: WHOLE-MOUNT - P.55
 - 4.3.1.2. PREPARAZIONE DEI TESSUTI: CRIOSEZIONI - P.56
 - 4.3.1.3. IMMUNOISTOCHEMICA - P.56
 - 4.3.1.4. SPECIFICITÀ ANTICORPALE - P.57
 - 4.3.1.5. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA - P.57
 - 4.3.2. SECONDA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELLA ICJ - P.57
 - 4.3.2.1. INIEZIONE DI FAST BLUE (FB) - P.57
 - 4.3.2.2. PREPARAZIONE DEI TESSUTI - P.58
 - 4.3.2.3. IMMUNOISTOCHEMICA - P.58
 - 4.3.2.4. SPECIFICITÀ ANTICORPALE - P.59
 - 4.3.2.5. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA - P.59

4.3.3. TERZA FASE DELLO STUDIO: CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ - P.59

4.3.3.1. PREPARAZIONE DEI TESSUTI - P.59

4.3.3.1.1. Ileo - P.59

4.3.3.1.2. Gangli simpatici, midollo spinale e gangli delle radici dorsali del midollo spinale - P.60

4.3.3.2. IMMUNOISTOCHEMICA - P.60

4.3.3.3. SPECIFICITÀ ANTICORPALE - P.61

4.3.3.4. WESTERN BLOTTING - P.61

4.3.3.5. SPECIFICITÀ DEGLI ANTICORPI SECONDARI - P.61

4.3.3.6. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA - P.62

4.3.3.7. ANALISI QUANTITATIVE: SEZIONI AL CRIOSTATO DI SISTEMA NERVOSO SIMPATICO, DRG E ILEO - P.63

4.4.RISULTATI - P.64

4.4.1. PRIMA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELL'ILEO - P.64

4.4.1.1. IMMUNOISTOCHEMICA - P.64

4.4.1.1.1. Ileo - P.64

4.4.1.1.2. ICJ - P.66

4.4.2. SECONDA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELLA ICJ - P.66

4.4.2.1. IMMUNOISTOCHEMICA - P.66

4.4.2.1.1. Ileo - P.66

4.4.2.1.1.1. Marcatura FB - P.67

4.4.2.1.1.2. Neuroni discendenti e correlata immunoistochimica - P.67

4.4.3. TERZA FASE DELLO STUDIO: CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ - P.68

4.4.3.1. MARCATURA FB - P.68

4.4.3.1.1. Gangli simpatici - P.68

4.4.3.1.2. Gangli della radice dorsale - P.69

4.4.3.1.3. Ileo - P.69

4.4.3.1.4. Midollo spinale - P.69

4.4.3.2. IMMUNOISTOCHEMICA - P.69

- 4.4.3.2.1. Ganglio celiaco - P.69
- 4.4.3.2.2. Ganglio Mesenterico Craniale - P.70
- 4.4.3.2.3. Ganglio Mesenterico Caudale - P.70
- 4.4.3.2.4. Catena Toracica Simpatica - P.71
- 4.4.3.2.5. Gangli della radice dorsale - P.71
- 4.4.3.2.6. Midollo spinale - P.72
 - 4.4.3.2.6.1. Corno dorsale - P.72
 - 4.4.3.2.6.2. Colonna cellulare intermedio laterale - P.72
 - 4.4.3.2.6.3. Corno ventrale - P.72
 - 4.4.3.2.6.4. Ileo e ICJ - P.72

4.5. DISCUSSIONE - P.74

4.5.1. CONTROLLO NERVOSO INTRINSECO (ENS) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ - P.74

- 4.5.1.1. NEURONI NITRERGICI - P.74
- 4.5.1.2. NEURONI COLINERGICI - P.74
- 4.5.1.3. NEURONI PEPTIDERGICI - P.75
- 4.5.1.4. INNERVAZIONE DELLA MUCOSA - P.76
- 4.5.1.5. GLIA ENTERICA - P.77
- 4.5.1.6. INNERVAZIONE DELLA ICJ - P.77
 - 4.5.1.6.1. Neuroni nitrenergici - P.78
 - 4.5.1.6.2. Neuroni colinergici - P.78

4.5.2. CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ - P.79

- 4.5.2.1. MARCATURA FB - P.79
 - 4.5.2.1.1. Gangli simpatici - P.79
 - 4.5.2.1.2. Gangli splanchnici - P.80
 - 4.5.2.1.3. Catena toracica simpatica - P.80
 - 4.5.2.1.4. Gangli delle radici dorsali - P.80
- 4.5.2.2. IMMUNOISTOCHEMICA - P.81
 - 4.5.2.2.1. Gangli simpatici prevertebrali - P.81
 - 4.5.2.2.2. Terminazioni peri-cellulari - P.82
 - 4.5.2.2.3. Midollo spinale - P.85

4.5.2.2.4. Gangli delle radici dorsali - P.86

4.5.2.2.5. Ileo - P.87

5. IMPLICAZIONI CHIRURGICHE - P.89

5.1. OSTRUZIONI SEMPLICI ILEALI - P.90

5.1.1. OSTRUZIONI DA ASCARIDI - P.90

5.1.2. COSTIPAZIONI ILEALI - P.90

5.1.3. IPERTROFIA DELL'ILEO - P.91

5.1.4. ADERENZE - P.92

5.2. INFARTO DELLA PARETE INTESTINALE SENZA STRANGOLAMENTO - P.93

5.3. OSTRUZIONI DA STRANGOLAMENTO - P.94

5.3.1. VOLVOLO - P.94

5.3.2. INTRAPPOLAMENTO NEL FORAME EPIPLOICO - P.95

5.3.3. LIPOMA PEDUNCOLATO - P.95

5.3.4. INTUSSUSCEZIONI - P.96

5.4. IMPLICAZIONI CHIRURGICHE IN CASO DI COINVOLGIMENTO DI ILEO ED ICJ IN RESEZIONE E CONSEGUENTE ANASTOMOSI - P.99

6. APPENDICI, GRAFICI ED IMMAGINI - P.102

7. BIBLIOGRAFIA - P.115

1. ANATOMIA

1.1 ILEO

1.1.1. STRUTTURA DELLA PARETE ILEALE

La parete dell'ileo è formata da quattro diversi strati concentrici: il peritoneo (sierosa), la tonaca muscolare (formata da uno strato longitudinale ed uno circolare), la sottomucosa e la mucosa. La sottomucosa, ricca di collagene, fornisce una robusta impalcatura su cui è costruita la struttura dell'intestino. Una modificazione strutturale della forma tubulare di base è data da pieghe sottomucose permanenti (*plicae circulares*) che si estendono da 1/2 ai 2/3 della circonferenza del tubo intestinale (Basmajian, 1975; Lenz, 1971). Il lume intestinale è rivestito dalla mucosa, che rappresenta la componente metabolicamente più attiva di questo organo. Anche la mucosa presenta particolarità strutturali che permettono di aumentarne la superficie e conseguentemente favorire il contatto con il contenuto del lume intestinale: i villi, le ghiandole intestinali, una trama di tessuto connettivale definita lamina propria e la *muscularis mucosae* (Gray, 1966; Lenz, 1971). I villi intestinali sono proiezioni digitiformi che si estendono nel lume aumentando la superficie della mucosa fino 600 volte (Wilson, 1962). Queste strutture sono particolarmente numerose nel duodeno e sono progressivamente meno numerose e più brevi verso l'ileo (Basmajian, 1975; Rhodin, 1974). L'epitelio della mucosa in tutto l'intestino tenue è sostenuto dalla lamina propria, che è uno strato di tessuto connettivo lasso con numerose cellule, contenente un'ampia rete microvascolare con un vaso chilifero centrale (Rhodin, 1974). Il vaso chilifero centrale inizia all'estremità del villo con un fondo cieco, si estende per tutta la sua lunghezza e si unisce ad altri vasi chiliferi formando dei canali linfatici nella sottomucosa. I capillari del villo sono organizzati in una struttura a rete sotto la membrana basale dell'epitelio della mucosa per distribuire uniformemente ossigeno e sostanze nutritive alle cellule epiteliali metabolicamente attive (Granger et al, 1980; Lundgren, 1967; Shikata et al, 1973).

La *muscularis mucosae*, un sottile strato di muscolatura liscia (spesso organizzato in duplice strato), segna il limite fra la lamina propria e la sottomucosa (Rhodin, 1974). Cellule muscolari lisce si spingono da questo strato all'interno del villo e sono localizzate a fianco del vaso chilifero centrale. Quando queste fibre muscolari si contraggono, il villo si accorcia ed il chilo all'interno del vaso chilifero viene riversato nel sistema linfatico (Rhodin, 1974).

Il lume dell'intestinale è rivestito principalmente da due tipi di cellule: le cellule assorbenti colonnari semplici e le cellule globose che producono muco (Gray, 1966). La superficie luminale delle cellule assorbenti presenta dei microvilli che ne aumentano notevolmente la superficie. Vi sono circa 2000 microvilli in ogni cellula epiteliale, i microvilli hanno un'altezza media di 0,1 μm . Le cellule epiteliali del lume originano da cellule indifferenziate nelle ghiandole intestinali alla base del villo (cripte) e successivamente migrano verso l'estremità di quest'ultimo sotto la spinta di cellule neoformate. Le cellule più mature si esfoliano dalle estremità e vengono quindi continuamente rimpiazzate (Rhodin, 1974). Il tempo di turnover per le cellule epiteliali intestinali varia da due a otto giorni (Wilson, 1962).

Le ghiandole intestinali, in corrispondenza ed al di sotto della base del villo, sono rivestite da cellule epiteliali indifferenziate, da cellule di Paneth, da cellule epiteliali assorbenti, da cellule mucose e da cellule endocrine. Le cellule di Paneth producono enzimi che sono coinvolti nei processi digestivi, specificamente nella demolizione proteica. Le cellule enterocromaffini e le cellule argirofile sono cellule endocrine che si trovano nella zona ghiandolare e nel villo. Esistono almeno tre differenti popolazioni di cellule enterocromaffini che producono serotonina, sostanza P e motilina (Rhodin, 1974; Polak et al, 1976).

La sottomucosa ileale è composta da tessuto connettivo lasso che, a sua volta, forma la sovrastruttura per l'aggregazione di nervi e di plessi nervosi, di vasi sanguigni e linfatici. Queste strutture risultano intimamente correlate nei processi funzionali dell'intestino tenue.

La tonaca muscolare risulta costituita da due strati di cellule muscolari lisce orientati fra loro perpendicolarmente: uno strato longitudinale esterno ("*longitudinal muscle layer*", LML) ed uno strato circolare interno ("*circular muscle layer*", CML) (Basmajian, 1975; Ghoshal, 1975). Fra lo strato longitudinale e quello circolare sono inserite cellule nervose gangliari. Il rivestimento esterno della tonaca muscolare è costituito da uno strato di tessuto connettivo submesoteliale, contenente una scarsa quantità di strutture neuromuscolari, ed un singolo strato esterno di mesotelio (Rhodin, 1974).

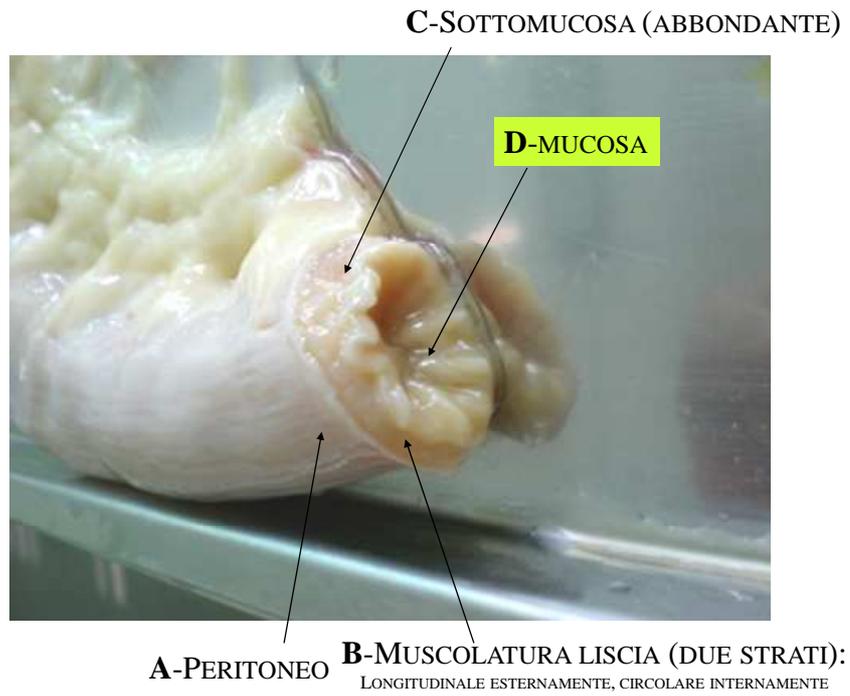


FIG. 1.1.1.A SEZIONE TRASVERSALE DELLA PARETE ILEALE

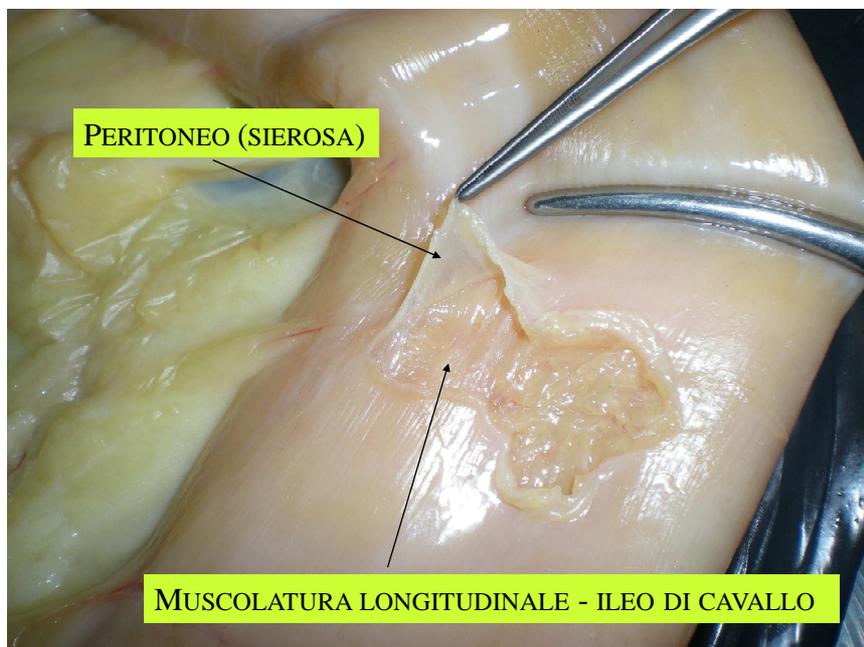


FIG. 1.1.1.B PARETE ILEALE

1.1.2. ANATOMIA TOPOGRAFICA ILEALE

L'ileo è la porzione terminale, relativamente breve (da 70 a 80 cm), del piccolo intestino. Inizia dalla parte aborale del digiuno e si porta alla parte destra dell'addome a livello della terza o quarta vertebra lombare. L'ileo termina nella valvola ileo-ciecale nella curvatura minore della base del cieco. L'ileo ha una caratteristica tenia anti-mesenterica che è collegata alla tenia dorsale del cieco dalla plica ileo-ciecale. La porzione terminale dell'ileo si porta all'interno del cieco e la valvola ileo-ciecale risulta sita al centro di una leggera sporgenza, la "*papilla ilealis*", formata da pliche circolari della mucosa, che contengono un plesso venoso (Schummer et al, 1979a; Kotzé, 1990). Il plesso venoso e le pliche circolari agiscono in modo combinato formando uno sfintere funzionale.

1.1.3. ANATOMIA VASCOLARE ILEALE

La maggior parte dell'intestino tenue è irrorato da vari rami dell'arteria mesenterica craniale che, correndo all'interno della radice del mesentere, è responsabile dell'irrorazione dell'intero digiuno, dell'ileo, di parte del duodeno ed anche del grosso colon.

La vascolarizzazione dell'ileo avviene attraverso l'arteria ileale, un ramo dell'arteria ileo-colica che proviene dall'arteria mesenterica craniale. L'arteria ileale corre in direzione orale lungo la parte terminale dell'ileo e si unisce con l'ultima arcata del digiuno (Sisson e Grossman, 1953a). Non vi è alcuna vascolarizzazione collaterale (Edwards, 1981).

Le arterie digiunali e ileali formano un fascio costituito da 17 a 21 vasi le cui origini risiedono nella radice del mesentere sono giustapposte in un breve spazio e spesso raggruppate in corti tronchi comuni. Sono lunghe, quasi rettilinee e formano delle arcate generalmente semplici a qualche centimetro dall'intestino tenue. L'arteria ileo-colica, molto breve e robusta, sembra prolungare la mesenterica craniale. Si divide generalmente in 4 branche: ramo ileo mesenteriale, arterie ciecali mediale e laterale e ramo colico. Il ramo ileo-mesenteriale è il più esile e spesso deriva dall'arteria ciecale mediale (Barone, 1993).

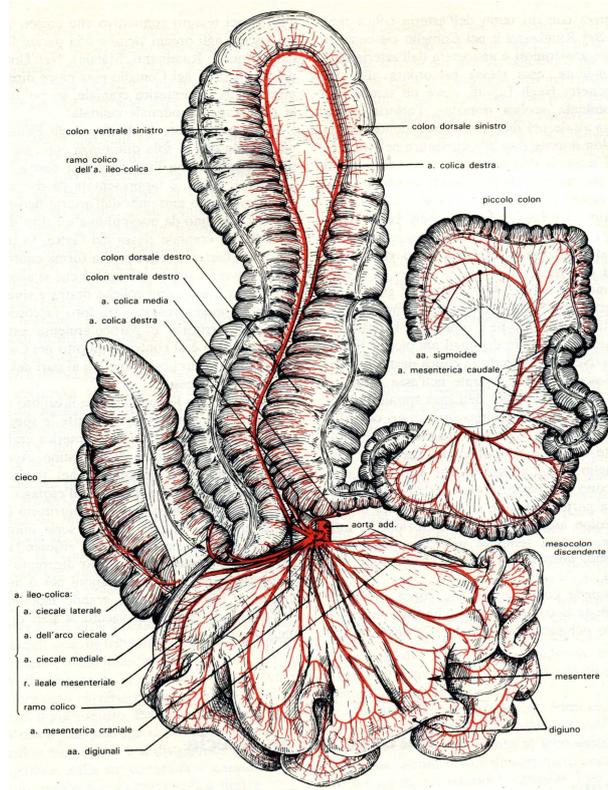


FIG. 1.1.3.A Rappresentazione delle principali diramazioni dell'a.mesenterica craniale nel cavallo (Modificato da Barone).

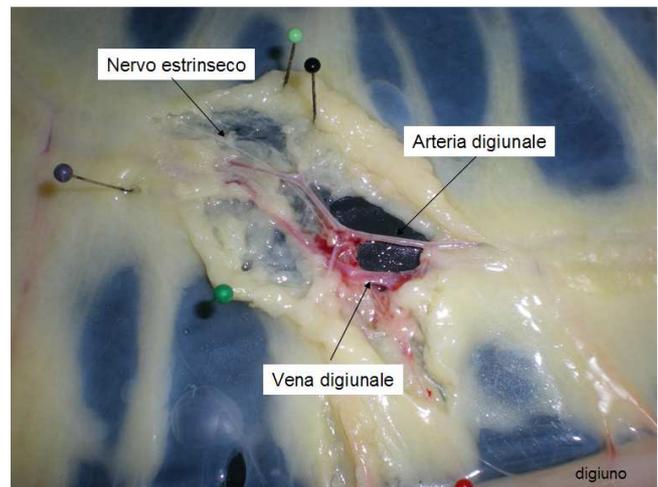


FIG. 1.1.3.B MESENTERE DI CAVALLO con vasi sanguigni, linfatici e nervi

1.1.3.1. FLUSSO SANGUIGNO ILEALE

L'ileo è vascolarizzato da un unico ramo dell'arteria ileo-colica, questo fornisce le arterie rette che rappresentano la fonte principale dell'irrorazione ileale (Basmajian, 1975; Ghoshal, 1975). Le arterie rette entrano attraverso la sierosa intestinale e si arborizzano in numerosi rami. Alcuni rami ritornano verso il mesentere dove formano numerose anastomosi con analoghi vasi che formano un arco dalla direzione opposta (Baez, 1959; Weidemen, 1963). Lungo questi vasi, verso la parte antimesenterica dell'intestino, vengono emesse numerose ramificazioni che formano i rami parietali sottosierosi (Granger et al, 1980).



Fig.1.1.3.1. ARTERIE RETTE ILEALI

Il resto degli rami sierosi attraversa la tonaca muscolare e prosegue formando un esteso plesso vascolare sottomucoso. Rami del plesso sottomucoso si ramificano riportandosi verso la sierosa e, con i rami delle arterie sottosierose, irrorano la tunica muscolare esterna. Prendono, inoltre, origine da questo plesso sottomucoso due gruppi di arterie che si dirigono verso la mucosa. Un gruppo si ramifica sul lato della mucosa rivolto verso la *muscularis mucosae* fornendo una rete di capillari che circonda le ghiandole all'interno delle cripte, l'altro gruppo di arterie continua all'interno dei villi, dove origina l'arteriola centrale che si arborizza in una fitta rete di capillari e circonda un canestro pericellulare (Granger et al, 1980; Lundgren, 1967; Shikata et al, 1973). All'interno di ciascun villo si formano una o due venule che, prima di penetrare la sottomucosa, si uniscono ad altre venule che provengono dalla regione ghiandolare; qui si fondono con vene che drenano il plesso sottomucoso e proseguono attraverso la tonaca muscolare esterna e la sierosa. Dopo essersi ulteriormente unite ad altri vasi, le vene confluiscono, infine, nella vena porta (Granger et al, 1980). Alcuni Autori descrivono un particolare meccanismo di scambio "contro corrente" associato alla vascolarizzazione nei villi intestinali. Anatomicamente, nel cane, nel gatto, nell'uomo (Lundgren, 1967) e nel cavallo (Spanner, 1932) all'interno dei villi intestinali avviene l'intima fusione fra la vascolarizzazione arteriosa e quella venosa ed il flusso venoso è in contro corrente a quello arterioso. Questa disposizione consente la diffusione libera dei gas e degli elettroliti disciolti attraverso la struttura vascolare. In presenza di un flusso sanguigno lento, l'ossigeno si concentra alla base del villo, lasciando l'estremità ipossica (Lundgren, 1967). Lo spazio fra i vasi del villo è circa 15-20 μm .

In passato è stato osservato che il controllo del flusso sanguigno intestinale può essere in parte influenzato da fattori metabolici e miogeni (Granger e Shepard, 1979; Granger e Kvietys, 1981). La teoria metabolica del controllo del flusso sanguigno asseriva che il metabolismo tissutale e la muscolatura arteriolare comprendono il sistema di controllo locale che accoppia i fabbisogni nutritivi al flusso sanguigno (Granger et al, 1980). Una riduzione dell'apporto di ossigeno ai tessuti da parte del sangue determina il rilascio di metaboliti nel fluido interstiziale che diffonde fino alle arteriole. Questo determina un rilassamento dello sfintere precapillare e di conseguenza la teoria miogenica si basa sull'assunto che la resistenza vascolare sia direttamente proporzionale alla pressione trasmurale a livello dell'arteriola dovuta all'effetto di stiramento della muscolatura liscia basale (effetto di Bayliss). In altri termini, se la pressione arteriosa diminuisce, si riduce la pressione interna che viene esercitata sulla parete arteriosa e sullo sfintere precapillare, determinando un rilassamento della muscolatura liscia arteriolare e dello sfintere precapillare. Questo provoca vasodilatazione ed aumento del flusso sanguigno che, a sua volta, aumenta la pressione trasmurale. Viceversa un aumento della pressione venosa si ripercuote attraverso il letto capillare nel tratto

arterioso, causando un aumento della tensione della parete vascolare che porta ad incremento del tono arteriolare e a vasocostrizione (Bayliss, 1902; Johnson, 1959).

1.2. CIECO

1.2.1. STRUTTURA DELLA PARETE CECALE

La parete del cieco si compone, come quella dell'ileo, di quattro tonache disposte concentricamente che, procedendo dal lume verso l'esterno, sono la mucosa, la sottomucosa, la muscolare e la sierosa. Non esistono sostanziali differenze strutturali tra i due tratti intestinali.

Nella mucosa del cieco mancano i villi e l'epitelio presenta numerose cellule caliciformi, mentre le cellule prismatiche sono notevolmente diminuite e le ghiandole intestinali hanno una lunghezza maggiore rispetto a quelle dell'ileo.

Il cieco è lungo circa 1 m, ha una capacità da 16 a 68 l ed occupa il quadrante addominale caudale destro (Schummer et al, 1979b). Ha la forma di una virgola e si divide in base e corpo. La base del cieco è unita saldamente tramite il mesentere alla parete addominale dorsale e si estende cranialmente fino alla quattordicesima o quindicesima costa (Sisson e Grossman, 1953b). La base del cieco si continua incurvandosi ventralmente nel corpo che termina in un fondo cieco, l'apice. Il corpo del cieco ha quattro bande longitudinali (tenie), dorsale, laterale, ventrale e mediale.

La tenia ventrale si unisce alla mediale vicino all'apice. La plica ileo-ciecale si porta dal margine anti-mesenterico dell'ileo alla tenia ciecale dorsale. L'ileo penetra nella faccia medio ventrale della base del cieco e termina nello orifizio ileo-ciecale. La base del cieco è divisa in una porzione craniale ed in una caudale da una piega trasversa che origina dal pavimento della base del cieco, appena cranialmente alla valvola ileo-ciecale. La parte craniale della base del cieco, o cupola, è voluminosa, e forma una struttura sigmoide che termina nella valvola cecocolica (anche detto ostio cecocolico), localizzata caudalmente nella cupola, lateralmente ed appena al di sopra dell'ostio ileo-ciecale rispetto al quale risulta più ampio (circa 5-6 cm). L'ostio cecocolico si presenta nettamente delimitato da un restringimento anulare muscolare che lo rinforza, è lo sfintere cieco-colico. Un legamento cieco-colico (plica cieco-colica) ben sviluppato si porta dalla tenia laterale del cieco alla tenia laterale del colon ventrale destro. A causa della sua forte zona di adesione mesenterica dorsale, del legamento cieco-colico e della plica ileo-ciecale, il cieco può essere spostato solo insieme agli organi adiacenti (Sisson e Grossman, 1953b).

Fra le tenie il cieco è tipicamente sacculato, con formazione delle cosiddette *haustra*. Il nome latino di "*haustum*" (secchio per attingere acqua) descrive abbastanza chiaramente la forma di queste concavità, separate l'una dall'altra dalle pliche semilunari che sporgono nel lume a tutto spessore e che ricalcano, in negativo, la tipica conformazione ciecale esterna a "bozzellature". Nell'apice del cieco le *haustra* e le bozzellature sono quasi assenti e le tenie appena accennate. Le *haustra*

potrebbero essere determinate da tre particolari condizioni: da fibre muscolari che, partendo dalle tenie, si ramificano nella muscolatura circolare; da sottili strati muscolari separati fra loro e contenenti fasci di collagene; da una raccolta sottomucosa di fibre elastiche. Studi radiologici, eseguiti per la valutazione delle contrazioni segmentarie del colon, hanno mostrato che non tutte le sacculazioni hanno una sede fissa. Questa osservazione consente di prendere nuovamente in considerazione la vecchia teoria di Broman, secondo cui le pliche semilunari derivano da una contrazione transitoria di fibrocellule muscolari: ciò potrebbe spiegare la presenza solo momentanea e, comunque, irregolare, delle sacculazioni stesse (Sisson e Grossman, 1953b).

1.2.2. ANATOMIA TOPOGRAFICA CECALE

Il cieco si presenta come un sacco allungato a forma di virgola, con l'asse maggiore obliquo dorsoventralmente e cranialmente ed è allocato dietro l'ipocondrio destro. La base è in contatto con il rene destro e con il duodeno e si presenta incurvata verso l'avanti, con una convessità dorsale in rapporto con la regione sottolombare ed una concavità ventrale nella quale avviene la terminazione dell'ileo mediante la valvola ileo-ciecale. Il corpo è cilindroide ed occupa l'ipocondrio destro. L'apice è completamente libero, si dirige verso la regione xifoidea dove si colloca, generalmente, nella curvatura sternale del colon ripiegato.

1.2.3. VASCOLARIZZAZIONE CECALE

La vascolarizzazione del cieco deriva dall'arteria ciecale, un ramo dell'arteria ileo colica, e dall'arteria colica media, rami dell'arteria mesenterica craniale. Le arterie centrali mediali e laterali (e le vene) corrono in un meso lasso rispettivamente lungo la tenia mediale e laterale. Poichè entrambe le arterie del cieco derivano da un unico vaso senza apporti collaterali, il cieco è particolarmente predisposto alle patologie tromboemboliche (Schummer et al, 1979b; Sisson e Grossman, 1953b). Le vene sono satelliti delle arterie ed affluiscono alla vena porta.

1.3. VALVOLA ILEO-CIECALE (*Ileo-Caecal Junction*, ICJ)

1.3.1. STRUTTURA DELLA ICJ

Nel corso dello sviluppo, il cieco si annette alla parte iniziale del colon, che si dilata e perde ogni demarcazione con esso, isolandosi dal colon propriamente detto mediante un netto restringimento provvisto di uno sfintere.

Questa parte incurvata e dilatata forma la base del cieco (un tempo denominata “arco” o “testa”), nella cui concavità si inserisce la terminazione dell’ileo e l’inizio del grosso colon.

L’ileo termina nel cieco mediante l’ostio ileale. Questo si trova sulla sommità di un rilievo anulare, del diametro di circa 2 cm, che sembra risultare da una invaginazione dell’ileo nel cieco: la *papilla ilealis*, anche denominata giunzione ileo-ciecale (“*ileocaecal junction*”, ICJ) o "valvola ileo-ciecale" o "valvola di Bauhin". La *papilla ilealis* è costituita dall’addossamento della tonaca muscolare dell’ileo a quella del cieco, che in qualche modo ricalza, rinforzandosi più o meno a seconda della specie per formare una sorta di sfintere ileale. La sierosa non partecipa a questa invaginazione. La mucosa, riflettendosi dall’ileo sul cieco a livello dell’ostio, forma intorno a questo un bordo quasi circolare.

Kotzé (1988b) ha sottolineato come la ICJ nel cavallo non mostri le caratteristiche strutturali tipiche di uno sfintere, ad esempio un ispessimento focalizzato della muscolatura liscia come lo sfintere pilorico (Kotzé, 1988a), ma appaia piuttosto come un sistema angio-muscolare, nel quale un denso plesso venoso sub-mucosale a livello della *papilla ilealis* completa, dopo l’insorgenza, la funzione del "muscolo dello sfintere" in quest’area, contribuendo alla chiusura dell’apertura ileo-ciecale (Kotzé, 1988b).

Nel cavallo la ICJ è costituita solamente dalla CML e da due componenti semicircolari del CML ciecale disposti lateralmente. Anche la LML sembra avere effetti sui movimenti della *papilla ilealis*, dal momento che la tenia dorsale del cieco si costituisce anche di fibre della LML ileale (Kotzé, 1988a).

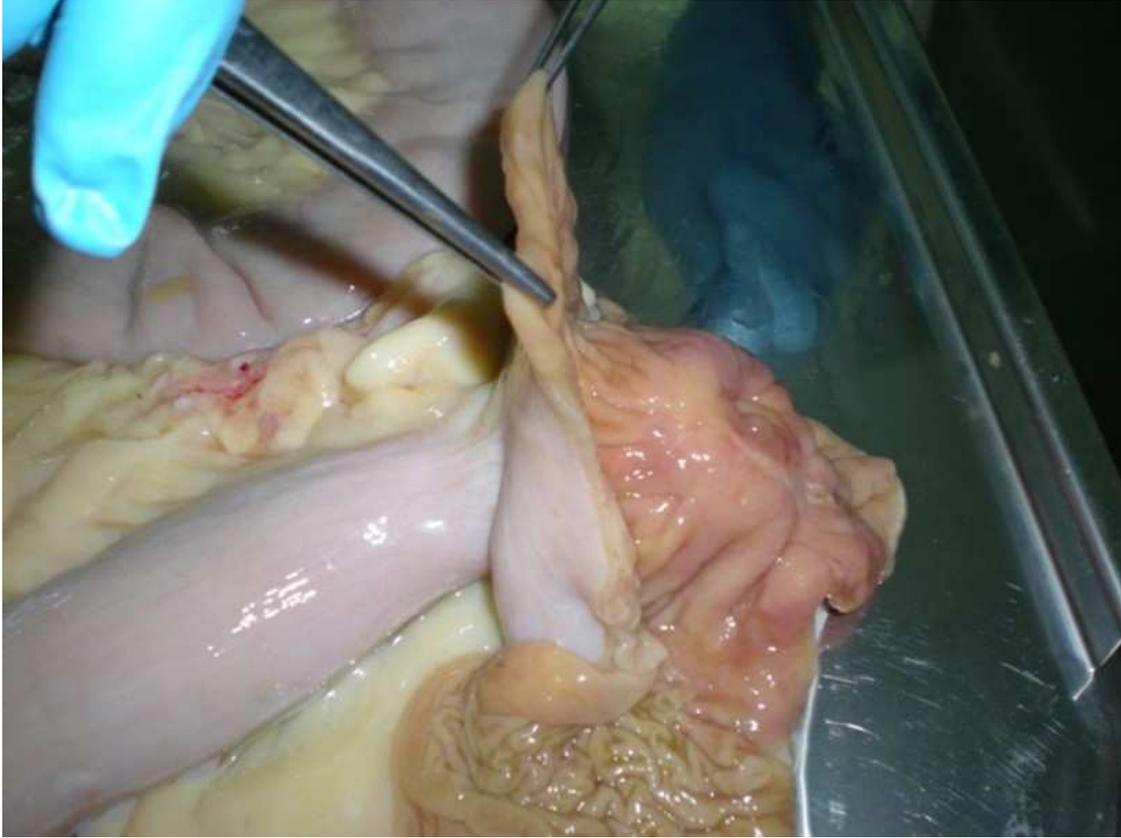


FIG.1.3.1.A TRATTO DISTALE DI ILEO E PAPILLA ILEALIS.

La parete ciecale è stata tagliata e ribaltata attorno alla papilla ilealis.

1.3.2. VASCOLARIZZAZIONE DELLA ICJ

La *papilla ilealis*, nel cavallo, riceve la sua irrorazione da una singola arteria papillare, una branca del ramo ileo-mesenteriale. Nonostante quest'ultima formi delle connessioni ad arco con le arterie ileali, branche dirette della arteria mesenterica craniale, non esiste alcuna vascolarizzazione collaterale nel tratto distale dell'ileo. Ne consegue, dunque, che sia il tratto distale dell'ileo che la *papilla ilealis* possono essere considerati potenziali candidati a rischio di patologie perfusionali, qualora si verificassero disturbi di circolo come ad esempio trombosi ed arteriti verminose associate ad infestazioni da *Strongylus vulgaris*, comunemente riportate nella arteria ileo-colica del cavallo. Anche se queste patologie non necessariamente occludono il lume vasale, in ogni caso compromettono il flusso sanguigno del GIT rendendolo irregolare e, in assenza di una vascolarizzazione collaterale alla ICJ e considerato il modesto diametro dell'arteria papillare, anche una lieve parziale occlusione del plesso venoso sub-mucosale può risultare in un difetto funzionale come l'impedimento del meccanismo di apertura della *papilla ilealis* (Edwards, 1981; Kotzé, 1990).



FIG.1.3.1.B GIUNZIONE ILEO-CIECALE DI CAVALLO

(per gentile concessione del Museo di Anatomia degli Animali Domestici, Sistema Museale di Ateneo, Università di Bologna)

1.3.3. INNERVAZIONE ESTRINSECA DELLA ICJ

L'innervazione estrinseca della giunzione ileo-ciecale proviene dal sistema nervoso autonomo, simpatico e parasimpatico.

1.3.3.1. SISTEMA NERVOSO SIMPATICO

Il nostro studio si è concentrato sull'influenza del controllo nervoso simpatico nella regolazione funzionale della ICJ.

Il sistema nervoso simpatico è costituito, macroscopicamente, da gangli vertebrali o paravertebrali, definiti dalla nomina anatomica veterinaria (N.A.V.) catena dei gangli simpatici (*sympathetic chain ganglia*), in numero variabile a seconda delle specie, posti ventro-lateralmente alla colonna vertebrale e tra loro uniti da un cordone bianco-grigiastro detto ramo intergangliare; si formano così due lunghe catene di gangli, destra e sinistra, che si portano fino alle prime vertebre coccigee, ed il cui primo ganglio si situa ventralmente alla base cranica (ganglio cervicale craniale).

I gangli simpatici che si trovano in cavità addominale possono essere definiti gangli prevertebrali e sono in stretto rapporto con la faccia ventrale dell'arteria aorta.

Tutti i neuroni pregangliari rilasciano acetilcolina a livello delle sinapsi con i neuroni gangliari. La maggior parte delle fibre postgangliari rilascia invece noradrenalina, sebbene alcune possano rilasciare acetilcolina (Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.1.1. Simpatismo addominale

Il simpatico addominale inizia subito dopo il diaframma; corrisponde a tutte le vertebre lombari ed è posto medialmente al muscolo piccolo psoas.

I gangli vertebrali lombari sono piccoli, poco distinti, e il loro numero è variabile essendo presenti con una certa frequenza, gangli intermedi situati lungo il ramo intergangliare, che talvolta si presenta sdoppiato; ad esempio nel cavallo se ne possono da 5 a 9. A livello dei primi quattro gangli si formano i nervi splanchnici lombari che si portano al plesso celiaco ed al plesso mesenterico caudale.

I plessi e i gangli prevertebrali della cavità addominale sono in stretto rapporto con la parete ventrale dell'arteria aorta, in vicinanza dell'origine dei suoi rami viscerali. I principali sono il plesso e il ganglio celiaco, il plesso ed il ganglio mesenterico craniale, il plesso aortico addominale ed il

plesso e il ganglio mesenterico caudale, dai quali prendono origine rami che, seguendo i vasi, formano altri plessi destinati alla visceri (Bortolami e Callegari, 1999).

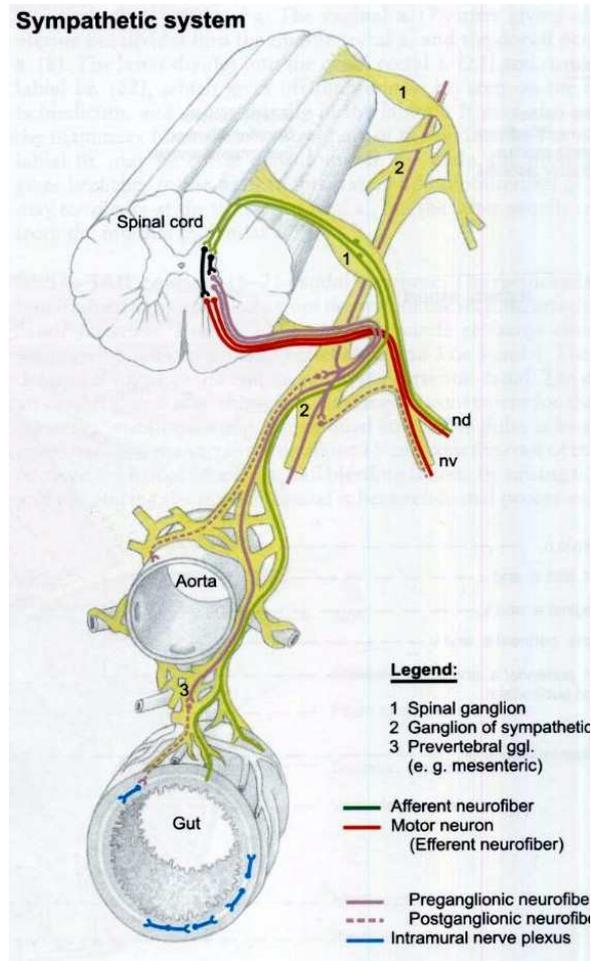


FIG. 1.3.3.1.1. Modificato da Bovine Anatomy. An illustrated text. 1° ed. Schlutersche 2003

1.3.3.1.1.1. Plesso e ganglio celiaco - Il plesso celiaco appare come una fitta rete che circonda la emergenza dell'arteria omonima; è formata dai nervi splancnici, da nervi vagali, soprattutto del tronco vagale dorsale, e da ammassi gangliari posti ai lati dell'origine dell'arteria celiaca. I gangli dei due lati sono tra loro uniti da grossi rami intergangliari; nel cavallo è presente un grosso ganglio celiaco lungo circa 5 cm e largo 3 cm, che può presentarsi anche fuso con il ganglio mesenterico craniale (Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.1.1.2. Plesso e ganglio mesenterico craniale - Il ganglio mesenterico craniale è impari ed è posto attorno all'emergenza dell'arteria mesenterica craniale, unito a quello celiaco da grossi cordoni nervosi (Bortolami e Callegari, 1999).



FIG. 1.3.3.1.1.2. GANGLIO CELIACO E GANGLIO MESENTERICO CRANIALE

1.3.3.1.1.3. Plesso e ganglio mesenterico caudale - È posto attorno alla radice dell'arteria mesenterica caudale; il suo ganglio può risultare alla fusione di due piccoli gangli, sinistro e destro, e si trova, indifferentemente, in posizione craniale o caudale rispetto all'arteria. Dalla estremità caudale del plesso mesenterico caudale si staccano rami che costituiscono il nervo ipogastrico, destro e sinistro, che segue l'arteria iliaca interna per portarsi in cavità pelvica, lateralmente al retto, dove si ramifica e si anastomizza con i nervi pelvici formando il plesso pelvico (Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.2. SISTEMA NERVOSO PARASIMPATICO

Il sistema nervoso parasimpatico esplica la sua azione tramite fibre vagali pregangliari che non raggiungono un ganglio extramurale, ma si portano ai gangli intramurali nella parete viscerale (Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.3. INNERVAZIONE SENSITIVA

1.3.3.3.1. Gangli delle radici dorsali del midollo spinale

Il midollo spinale nell'adulto è una struttura cilindrica, più corta del canale vertebrale in cui è contenuto, che può essere suddiviso in segmenti corrispondenti ai corpi vertebrali. Ai lati di ciascun segmento si trovano due gangli spinali (rispettivamente destro e sinistro) che contengono il corpo cellulare dei neuroni sensitivi.

I neuroni sensitivi sono neuroni pseudounipolari o a T, così denominati poichè dal loro corpo cellulare, posto nel ganglio spinale, emerge un breve assone che si divide quasi subito in due rami. Il ramo periferico raggiunge la periferia dove recepisce stimoli sensoriali di varia natura, mentre il ramo centrale si porta verso il midollo spinale ed contrae sinapsi con interneuroni posti nella sostanza grigia.

Quando i neuroni sensitivi percepiscono stimoli provenienti dall'esterno del corpo si dicono neuroni sensitivi somatici; quando percepiscono stimoli provenienti dall'interno dell'organismo si dicono neuroni sensitivi viscerali.

Gli assoni dei neuroni sensitivi formano le cosiddette radici dorsali dei nervi spinali.

All'interno della sostanza grigia del midollo spinale, gli interneuroni, che ricevono l'impulso dai neuroni sensitivi, contraggono sinapsi con neuroni posti nella parte ventrale della sostanza grigia del midollo spinale. Da questi neuroni si dipartono assoni che uscendo dal midollo spinale per portarsi ad organi bersaglio, costituiscono le radici ventrali dei nervi spinali.

Le radici ventrali e dorsali dei nervi spinali emergono dai fori intervertebrali. Subito dopo la loro emergenza dal midollo spinale, le radici si uniscono per formare il nervo spinale.

Tutti i nervi spinali si dicono, proprio a causa del fatto di essere composti dall'unione di due radici con diverso significato, nervi misti.

La radice dorsale é detta sensitiva perchè é costituita dagli assoni dei neuroni sensitivi il cui corpo é posto nei gangli spinali; la radice ventrale invece é detta effettrice, essendo formata dagli assoni di motoneuroni efferenti viscerali, il cui corpo cellulare é posto nella sostanza grigia del midollo spinale, che possono raggiungere muscolatura liscia, striata e ghiandole.

Le radici ventrali e dorsali sono molto corte e passano attraverso il foro intervertebrale immediatamente adiacente (Beghelli, 1992; Bortolami e Callegari, 1999)

1.3.3.3.2. Organizzazione della sostanza grigia del midollo spinale

La sostanza grigia é organizzata in due corna ventrali (corte e tozze e in cui si riconoscono una testa e una base) e due corna dorsali (più sottili e più lunghe e in cui si riconoscono una testa, un collo e una base). Tra il corno dorsale e quello ventrale è interposta la sostanza grigia intermedia laterale, che medialmente si estende nella sostanza grigia intermedia centrale (formata dalla commessura grigia ventrale e dalla commessura grigia dorsale) e percorsa dal canale midollare o canale centrale. Nel tratto toracico e nei primi segmenti lombari del midollo spinale si osserva un rilievo laterale nella sostanza grigia intermedia laterale, denominato corno laterale o colonna intermedio-laterale (“*intermedio-lateral cell colum*”, IML).

Le corna dorsali, composte da interneuroni, ricevono le informazioni di senso raccolte dai neuroni sensitivi (pseudounipolari o a T) il cui corpo cellulare si trova nei gangli spinali; le corna ventrali, composte dai corpi e dai dendriti dei motoneuroni, inviano comandi di moto in periferia. Gli interneuroni, oltre a comporre le corna dorsali del midollo spinale, si trovano anche, inframezzati ai neuroni di moto, nelle corna ventrali.

I motoneuroni delle corna ventrali del midollo spinale (dette anche cellule radicolari in quanto i loro assoni formano le radici dei nervi spinali) si distinguono in somatici e viscerali; i motoneuroni somatici (più comunemente detti motoneuroni) a loro volta comprendono i motoneuroni alfa, che innervano le fibre muscolari striate, e i motoneuroni gamma, che si portano ai fusi neuromuscolari (strutture localizzate nella compagine dei muscoli striati). Gli assoni dei motoneuroni somatici e dei motoneuroni viscerali (più comunemente detti visceroeffettori) fuoriescono insieme dal corno ventrale del midollo spinale e formano la radice ventrale del nervo spinale. Dai neuroni visceroeffettori posti nelle corna ventrali del midollo spinale hanno origine assoni che si portano con un decorso complesso verso i visceri; l'insieme di questi neuroni, dei loro assoni e dei neuroni sui quali essi fanno sinapsi prima di raggiungere l'organo bersaglio, formano il sistema nervoso autonomo (SNA) (Beghelli, 1992; Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.3.3. Organizzazione della sostanza bianca del midollo spinale

La sostanza bianca del midollo spinale è suddivisa, da entrambi i lati del midollo, in 3 regioni dette colonne: dorsale, ventrale e laterale. Ogni colonna contiene fasci di assoni; i fasci più brevi trasportano informazioni sensitive o motorie tra segmenti del midollo spinale, mentre i fasci più lunghi collegano il midollo spinale all'encefalo. I fasci ascendenti portano informazioni sensitive

verso l'encefalo mentre i fasci discendenti portano comandi di moto verso il midollo spinale (Beghelli, 1992; Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.3.4. Vie sensitive

Un neurone sensitivo che veicola informazioni al SNC presenta il corpo cellulare nel ganglio annesso alle radici dorsali del nervo spinale o a un nervo cranico. L'informazione giunge quindi nel SNC e qui contrae sinapsi con un interneurone posto nel midollo spinale o nel tronco encefalico. Se la sensazione è destinata a diventare cosciente, questo neurone effettuerà sinapsi con un altro neurone posto nel talamo. Nel raggiungere il talamo, l'assone del secondo neurone che entra in gioco, si sposta dalla parte opposta rispetto a quella in cui si trovava; il talamo destro riceve pertanto informazioni di senso provenienti dalla metà sinistra del corpo e viceversa. Gli assoni dei neuroni talamici raggiungono infine le aree sensitive primarie della corteccia telencefalica ove fanno sinapsi con l'ultimo neurone (Beghelli, 1992; Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.3.3.4.1. Sensibilità viscerale - Le informazioni viscerosensitive sono raccolte da enterocettori quali nocicettori, termocettori e barocettori che controllano gli organi della cavità toracica, addominale e pelvica.

Le radici dorsali dei nervi spinali trasportano la sensibilità viscerale proveniente dai recettori posti negli organi addominali e pelvici. I neuroni sensitivi contraggono sinapsi con interneuroni posti nelle corna dorsali del midollo spinale i cui assoni salgono, decorrendo nei cordoni ventro-laterali; la maggior parte delle informazioni raggiunge il nucleo solitario ma non la corteccia sensitiva primaria, per cui tali sensazioni rimangono inconscie (Beghelli, 1992; Bortolami e Callegari, 1999).

1.3.4. INNERVAZIONE INTRINSECA (*Enteric Nervous System*, ENS)

1.3.4.1. FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DELL'INNERVAZIONE INTRINSECA

Il tratto gastrointestinale dei mammiferi possiede la peculiare proprietà di essere dotato di un sistema nervoso intrinseco (o Sistema Nervoso Enterico, ENS) in grado di regolare in maniera autonoma tutte le funzioni digestive.

L'esistenza di un sistema nervoso intestinale capace di agire in maniera indipendente era derivata dagli studi pionieristici dei due grandi fisiologi inglesi Bayliss e Starling che già alla fine dell'800/inizi del secolo scorso postularono la cosiddetta "legge dell'intestino" (Bayliss e Starling,

1900). Tale legge si basava sulla dimostrazione che ogni distensione radiale endoluminale di un'ansa di intestino tenue isolata evocava un riflesso stereotipo propulsivo caratterizzato da due eventi coordinati: una contrazione a monte, unitamente ad un rilasciamento a valle, della sede di stimolazione. I due ricercatori inglesi chiamarono tale attività coordinata riflesso peristaltico o peristalsi e attribuirono correttamente la genesi ed il controllo di tale evento riflesso alla rete nervosa enterica. Dalle brillanti osservazioni di Bayliss e Starling, negli anni successivi si ebbe un progressivo declino delle ricerche sull'innervazione enterica tanto che negli anni successivi si consolidò l'erronea convinzione che le due divisioni del sistema autonomico, il parasimpatico ed il simpatico, svolgessero un ruolo preponderante nella regolazione delle attività digestive. Tuttavia, il rifiorire della ricerca in questo affascinante settore della neurologia negli ultimi trenta anni ha consentito di stabilire inequivocabilmente che il ENS non solo ha una dignità propria, ma è l'unica divisione del SNP paragonabile ad un vero e proprio "cervello" (o *little brain* degli Autori Anglosassoni), per certi versi simile all'encefalo (o *big brain*), presente nella parete del canale alimentare, nel tratto biliare e nel parenchima pancreatico. Pertanto, l'erronea interpretazione secondo la quale i neuroni enterici funzionano come "relais" parasimpatici per segnali provenienti dal SNC è stata definitivamente abbandonata.

Un'immensa mole di dati ha chiaramente dimostrato che il ENS è costituito, proprio come il SNC, da un rete neuronale che comprende classi di cellule nervose altamente specializzate, ossia neuroni effettori (eccitatori e inibitori), sensori intrinseci ed interneuroni che, sebbene connessi ed integrati al sistema nervoso centrale (SNC) e al sistema nervoso periferico (SNP), sono in grado di governare autonomamente, attraverso circuiti nervosi integrati, pressoché tutte le funzioni digestive, quali l'attività motoria del canale alimentare, le secrezioni gastro-entero-bilio-pancreatiche, l'assorbimento intestinale di nutrienti ed il circolo splanchnico.

Il tutto è governato da un numero di cellule neuronali intrinseche paragonabili per numero a quelle del midollo spinale (da cui l'assunto del *little brain*).

Inoltre, recenti evidenze dimostrano che il ENS è in grado di modulare ed a sua volta di essere modulato dal ricco sistema immunitario disperso lungo tutto il tratto digestivo (Furness e Costa, 1987; Goyal Ray e Hirano, 1996).

1.3.4.2. ORGANIZZAZIONE MORFO-FUNZIONALE DEL ENS

I neuroni enterici sono organizzati in plessi gangliari (il mienterico di Auerbach e il sottomucoso di Meissner) ed in plessi agangliari (Furness e Costa, 1987; Goyal Ray e Hirano, 1996). I gangli sono avvolti da cellule gliali simili agli astrociti del SNC che, rivestendo con le loro estensioni la

maggior parte del soma dei neuroni, li separano dai tessuti adiacenti costituendo una vera e propria barriera emato-enterica. La glia enterica svolge un ruolo importante anche in complessi meccanismi di modulazione della risposta infiammatoria intestinale, attraverso la produzione di interleuchine e l'espressione de novo di antigeni di istocompatibilità di classe II. Il plesso mienterico, localizzato tra gli strati muscolari longitudinale e circolare, provvede all'innervazione motoria della muscolatura liscia e secretomotoria della mucosa, presentando numerose proiezioni verso i gangli sottomucosi e verso i plessi gangliari localizzati al di fuori del canale alimentare (gangli della parete della colecisti, del parenchima pancreatico e gangli simpatici prevertebrali). Il plesso sottomucoso, localizzato tra lo strato muscolare circolare e la muscularis mucosae, si sviluppa particolarmente nel piccolo intestino, dove ne controlla la funzione secretoria tramite l'innervazione dell'epitelio ghiandolare, della muscularis mucosae, delle cellule endocrine e dei vasi sanguigni sottomucosi.

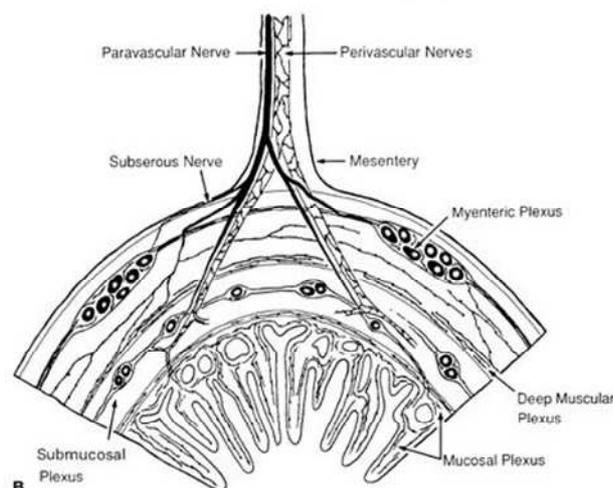


FIG 1.3.4.2.A Organizzazione del MP e del SMP nella parete intestinale (Mod. da Furness 2006).

Altri plessi gangliari sono stati trovati nella colecisti, nei dotti cistico e biliare comune, nello sfintere di Oddi e nel pancreas. I plessi agangliari, formati solo da fasci di fibre, sono localizzati a livello sottosieroso (fibre di connessione tra nervi estrinseci e plessi intramurali), muscolare profondo (piccoli fasci nervosi connessi precipuamente al plesso mienterico) e mucoso (fine rete di fibre nervose che innervano le cellule epiteliali ed endocrine dello strato mucoso). Secondo la classificazione proposta dal morfologo Dogiel già nel 1899 (Dogiel, 1899), e tutt'ora ampiamente utilizzata, si distinguono tre tipi principali di cellule nervose enteriche (tipo I, tipo II e tipo III) in base alle caratteristiche morfologiche del corpo cellulare, dell'assone e dei dendriti.

Successivamente, tramite lo studio dell'attività bioelettrica intracellulare, l'uso di sostanze traccianti e tecniche immunostochimiche, si è potuto correlare ad ogni fenotipo neuronale una caratteristica elettrofisiologica e/o funzionale, in modo tale da definire l'esistenza di sottogruppi di cellule nervose (Furness e Costa, 1987; Goyal Ray e Hirano, 1996). Ad esempio, i neuroni appartenenti al tipo I di Dogiel che innervano la muscolatura liscia, sono dotati di elevata eccitabilità in risposta a diversi stimoli e vengono definiti tipo S (dall'Anglosassone *synaptic* poiché essi sono maggiormente responsabili della trasmissione sinaptica nicotinic gangliare). Essi hanno funzione di motoneuroni, cioè stimolano o inibiscono la muscolatura gastrointestinale evocandone la contrazione o il rilassamento, rispettivamente. I neuroni tipo III possiedono funzioni simili in quanto sono provvisti di input eccitatori che danno origine a potenziali post-sinaptici eccitatori. I neuroni tipo II hanno una lunga fase di ineccitabilità in risposta ad un singolo stimolo e vengono definiti tipo AH (dall'Anglosassone *after hyperpolarization*, ossia un'iperpolarizzazione della membrana neuronale che segue il singolo potenziale d'azione e che rende il neurone temporaneamente ineccitabile) ed hanno la funzione di neuroni sensoriali, ossia quella peculiare proprietà di percepire stimoli meccanici, chimici e termici (sono cioè mecano-, chemo- e termocettori).

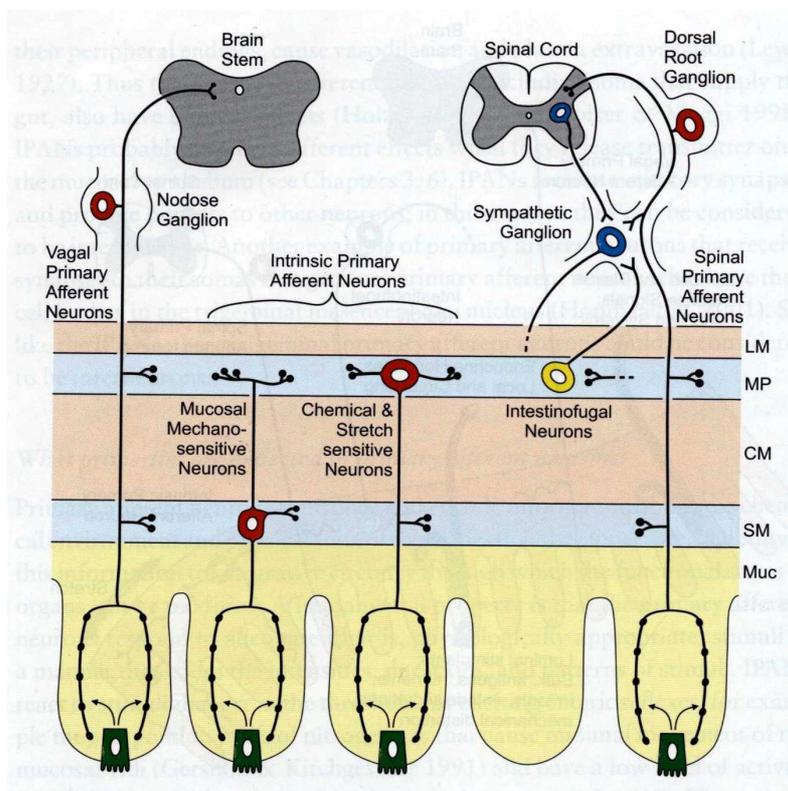


FIG 1.3.4.2.B Organizzazione del ENS nella parete intestinale (Mod. da Furness 2006).

1.3.4.3. CODICE CHIMICO E MECCANISMI DI TRASMISSIONE NEURONALE

Come tutti i neuroni anche quelli del ENS possiedono la capacità di sintetizzare, immagazzinare e rilasciare, in risposta a stimoli adeguati, un'ampia gamma di messaggeri chimici. Tuttavia, il numero di sostanze biologicamente attive (oltre quaranta) a tutt'oggi identificate fa sì che il ENS sia l'unica divisione del SNP ad avere un così vasto patrimonio neurochimico comparabile solo a quello reperibile negli elementi neuronali del SNC (Furness e Costa, 1987; Goyal Ray e Hirano, 1996; Gershon, 1990; Tonini et al, 2002). Dal punto di vista biochimico, le sostanze biologicamente attive identificate in neuroni enterici sono distinguibili in non peptidici (amine, aminoacidi, purine, etc) e peptidici che possono agire come neurotrasmettitori o come neuro modulatori. Nel primo caso la sostanza biologicamente attiva è in grado di influenzare direttamente l'attività della cellula bersaglio (un altro neurone o una cellula epiteliale esocrina e/o endocrina); nel secondo caso, il messaggero chimico "modula", mediante potenziamento o riduzione, l'effetto dei trasmettitori.

L'impiego di tecniche quali l'ibridizzazione *in situ* e l'immunoistochimica unitamente ad esperimenti di "rilascio dei messaggeri chimici", hanno dimostrato che ciascun neurone enterico è caratterizzato da un codice chimico, ossia dalla capacità di sintetizzare e contenere più di un neuromodulatore e/o neurotrasmettitore).

Tale codice chimico, unitamente al fenotipo cellulare di Dogiel, alle caratteristiche elettrofisiologiche ed alla polarità assonale, permette l'identificazione di sottopopolazioni funzionalmente distinte di neuroni enterici (Furness e Costa, 1987; Goyal Ray e Hirano, 1996; Gershon, 1990; Tonini et al, 2002). Ad esempio, i motoneuroni eccitatori contengono, fra le numerose sostanze biologicamente attive, acetilcolina (Ach) e tachichinine (sostanza P, SP; neurochinina A, NKA); i motoneuroni inibitori presentano un profilo neurochimico più eterogeneo, rappresentato da una serie di neurotrasmettitori che includono monossido d'azoto (NO), polipeptide intestinale vasoattivo (VIP), *pituitary-adenilate cyclase activating polypeptide* (PACAP, peptide strutturalmente simile al VIP) e adenosintrifosfato (ATP). Esempi simili possono essere applicabili ad altre classi di neuroni funzionalmente specializzate.

Un classico esempio di come tutta questa moltitudine di neuroni e relativi neuromodulatori e/o neurotrasmettitori vengano coinvolti nel controllo delle funzioni gastrointestinali è rappresentato dall'analisi morfo-funzionale dei circuiti neuronali che controllano il riflesso della peristalsi. In sintesi, la distensione meccanica del lume intestinale indotta dal bolo stimola direttamente (o indirettamente attraverso il rilascio di serotonina da parte delle cellule endocrine enterocromaffini distribuite lungo la mucosa intestinale) i neuroni sensoriali intrinseci i quali sono in contatto

sinaptico, attraverso interneuroni, sia con motoneuroni eccitatori (a polarità ascendente) che con quelli inibitori (a polarità discendente).

I primi, rilasciando ACh e peptidi come la SP e la NKA, determinano la contrazione dello strato muscolare circolare a monte dello stimolo; i secondi, attraverso una trasmissione plurichimica di trasmettitori come NO, VIP, ATP e verosimilmente anche il PACAP, causano il rilasciamento della muscolatura a valle dello stimolo. L'integrazione e la coordinazione di questi fenomeni eccitatori e inibitori lungo il canale alimentare favorisce la progressione dei contenuti luminali in direzione oro-aborale (Tonini et al, 2002). A distanza di più di cento anni dalla sua comparsa, la "legge dell'intestino" trova piena conferma dagli studi che hanno consentito, almeno in parte, di definire i meccanismi riflessi coinvolti nell'innescare e nella propagazione della peristalsi.

Esistono poi altri circuiti neuronali responsabili del controllo di altre funzioni digestive, quali ad esempio le secrezioni e l'assorbimento, la cui trattazione esula dagli scopi della presente rassegna. Da quanto brevemente esposto si evince quindi che qualsiasi noxa o anomalia congenita o acquisita, in grado di danneggiare l'integrità morfologica e/o funzionale dei neuroni enterici, si traduce in un alterato controllo delle funzioni digestive responsabile, a sua volta, di disturbi gastrointestinali. Di seguito, verranno presi in considerazione alcuni disordini della motilità del canale alimentare associati ad alterazioni del ENS. Da un punto di vista fisiopatologico, tali patologie sono caratterizzate da una compromissione, parziale o totale, della propulsione intestinale con conseguente ostruzione funzionale del tubo digerente che, a seconda del segmento interessato, viene inquadrata in una precisa condizione morbosa (Stanghellini et al, 1966; Krishnamurthy e Schuffer, 1987; De Giorgio et al, 2000).

2. FISIOLOGIA DELLA MOTILITÀ ILEO-CIECALE

2.1. MOTILITÀ DELL'INTESTINO TENUE

L'attività motoria dell'intestino tenue controlla il miscelamento e l'avanzamento del contenuto intestinale all'interno del lume (Condon e Sanra Sushil, 1975). Inoltre, durante il periodo interdigestivo, l'attività motoria mantiene il lume dell'intestino tenue relativamente libero dall'accumulo delle normali secrezioni intestinali. Il controllo di questi movimenti è molto complesso ed implica il coordinamento di risposte miogeniche, nervose e ormonali (Wienbreck e Ereckenbrecht, 1982). L'attivazione della muscolatura intestinale e la conseguente attività motoria si accompagnano ad un aumento dell'attività elettrica colinergica. Questa attività è sotto il controllo dei rapporti ormonali e dei potenziali depolarizzanti intrinseci degli strati muscolari longitudinale e circolare. La depolarizzazione della muscolatura liscia dell'intestino tenue è controllata da una attività elettrica ritmica onnipresente nota come "onde lente", "ritmo elettrico di base" o "attività elettrica di controllo" (Condon e Sanra Sushil, 1975; Posser e Bartoff, 1968; Guyton, 1981; Bass, 1968). Queste onde lente sono il *pacemaker* della motilità intestinale, originano dallo strato muscolare longitudinale e si ritiene siano miogenicamente mediate in quanto sono risultate mantenute nell'intestino tenue denervato (Bass, 1968). Le onde lente possono essere rilevate senza segni evidenti di attività motoria e rappresentano una regolare depolarizzazione e ripolarizzazione della muscolatura liscia intestinale longitudinale. Il meccanismo responsabile di questo processo non è completamente chiaro, ma si presume che le depolarizzazioni regolari abbiano origine all'interno della tonaca muscolare della parte distale dello stomaco e/o del duodeno prossimale. La frequenza delle onde lente è maggiore nel duodeno e si riduce progressivamente verso l'ileo. È stato ipotizzato che questa entità di variazione di frequenza sia essenziale per la regolare progressione aborale delle onde peristaltiche (Guyton, 1981). È importante sottolineare che, qualora le onde lente non si possano propagare per l'intera lunghezza del tratto intestinale, come ad esempio può accadere in seguito a resezioni chirurgiche ed anastomosi dell'intestino tenue, i *pacemaker* nelle regioni aborali possono originare gli impulsi necessari al perpetuarsi del ritmo delle onde lente. Quando la progressione aborale delle onde lente si interrompe a livello della anastomosi, i *pacemaker* alternativi iniziano un nuovo ciclo di onde lente nel tratto intestinale distale alla anastomosi. La depolarizzazione e l'attività della muscolatura circolare iniziano solo dopo la massima depolarizzazione della muscolatura longitudinale e sono quindi sovrapposte alla attività delle onde lente (Bass e Wiley, 1965; Summers e Dusdieker, N.S. 1981). Questo determina un

movimento aborale progressivo di contrazioni e rilassamenti regolari (peristalsi) della parete intestinale.

Oltre alle contrazioni peristaltiche progressive che si verificano nell'intestino tenue, esiste, come accennato in precedenza, un movimento di progressione aborale dell'attività elettrica muscolare che viene detto complesso mioelettrico migrante ("*myoelectric migrating complex*", MMC) (Szurszewski, 1969). Il MMC, che viene da alcuni definito il guardiano intestinale, serve ad evacuare le secrezioni gastriche ed intestinali e le cellule epiteliali desquamate durante i periodi interdigestivi. Il MMC inizia nel duodeno prossimale e prosegue aboralmente, sovrapposto al ritmo di onda lenta. Quando un MMC raggiunge l'ileo terminale, un nuovo MMC ha origine nel duodeno (Szurszewski, 1969).

Il MMC è diviso in tre fasi ben riconoscibili. La prima fase è il periodo di pausa nel quale non si osserva alcuna attività elettromotoria. Durante la seconda fase si nota un'attività elettrica a picchi irregolare e sporadica. La terza fase è il periodo di onde elettromotrici regolari e progressivamente aborali e, pertanto, caratterizza il momento dell'evacuazione del lume intestinale (Grivel e Ruckebusch, 1972; Code e Marlette, 1975). Se si verificano condizioni che compromettono o annullano il MMC, i fluidi e le *ingesta* iniziano ad accumularsi all'interno del lume, come accade in corso di ileo paralitico.

È interessante notare che l'intestino tenue può funzionare anche qualora venga isolato dall'innervazione estrinseca (Bueno et al, 1979; Gershon e Gide, 1980). È presente, infatti, un'organizzazione intrinseca alla parete intestinale completa di nervi sensitivi e motori in grado di regolare l'attività meccanica e funzionale del tratto gastrointestinale ("*gastrointestinal tract*", GIT). Si tratta del sistema nervoso enterico ("*enteric nervous system*", ENS) che perpetua la sua attività in intima correlazione anatomico-funzionale al controllo estrinseco presieduto dal sistema nervoso autonomo ("*autonomic nervous system*", SNA) e contestualmente in risposta alla stimolazione locale. I meccanismi di controllo della motilità intestinale da parte del ENS e del SNA e la loro interconnessione funzionale sono oggetto della discussione della parte sperimentale di questa trattazione.

La motilità dell'intestino tenue dipende, inoltre, dall'integrità dei plessi di Meissner e di Auerbach (Bueno et al, 1979; Gershon e Gide, 1980). Mancando delle giunzioni neuro muscolari specifiche, la liberazione locale di neurotrasmettitori stimola le fibre muscolari lisce elettricamente collegate (Gershon e Gide, 1980). Concettualmente, l'innervazione estrinseca dell'intestino controlla un organo con un'eccitazione elettrica autonoma e serve a moderare centralmente le risposte dell'intero organo agli stimoli locali. Per sostenere questa affermazione, è stato dimostrato che l'intestino

denervato risulta maggiormente eccitabile rispetto a quello innervato, come dimostra l'aumento della frequenza dei MMC (Bueno et al, 1979).

Il controllo ormonale della motilità dell'intestino tenue è dovuto principalmente alle interazioni neuro-ormonali con il sistema nervoso enterico (Wienbreck e Ereckenbrecht, 1982). Alcuni Autori hanno sottolineato l'importanza che riveste la motilina, un polipeptide a 22 aminoacidi, per la sua potenzialità di propagazione ormonale e propagazione dei MMC (Wienbreck e Ereckenbrecht, 1982). La motilina è prodotta da speciali cellule enterocromaffini che sono concentrate nel duodeno e nel digiuno prossimale (Bloom et al, 1976). È stato osservato, inoltre, un aumento della concentrazione plasmatica di motilina dopo l'ingestione di alimenti ricchi di carboidrati, ma non dopo l'ingestione di alimenti altamente proteici (Mitznegg et al, 1976). L'infusione di motilina causa l'aumento della frequenza e della velocità dei MMC nell'uomo, nei cani e nei suini ed è stato ipotizzato possa essere un ormone regolatore dell'attività mioelettrica dell'intestino tenue (Vantrappen et al, 1979). È stato suggerito che la motilina ecciti preferenzialmente i recettori duodenali e che questo stimolo venga portato tramite fibre nervose afferenti ai centri e controllano i MMC. Questo stimolo afferente regola la sequenza in modo tale che, attraverso vie efferenti, si instauri un fronte di attività nel duodeno prossimale, mentre contemporaneamente venga inibita la risposta diretta alla motilina delle zone aborali (Wingate et al, 1976).

È stato condotto degli studio per valutare gli effetti di diverse modificazioni dell'attività elettrica intestinale nei cani (Iwamatsu, 1964). Gli Autori hanno osservato che l'occlusione dell'ileo (tramite legatura) per 7 ore causava un aumento dell'attività elettrica per 12 ore, seguito da una riduzione dell'attività ed eventualmente dalla paralisi muscolare per 48 ore, in seguito alle quali l'attività elettrica gradualmente ritornava normale. Non si è verificato alcun ripristino dell'attività elettrica quando l'occlusione veniva mantenuta per 24 ore, in questi casi il soggetto moriva entro 72 ore. È stato osservato, inoltre, che l'occlusione della vascolarizzazione mesenterica comportava l'aumentato della frequenza e della durata delle serie di picchi rilevati per la durata di un'ora. Se l'occlusione vascolare veniva rimossa entro 3 ore, si aveva guarigione. Gli Autori hanno osservato che l'occlusione perpetuata per 3 ore portava a danni irreversibili del tratto intestinale interessato. In peritoniti acute indotte sperimentalmente, è stata prodotta una forte scarica di potenziali a picco per 5 ore, a cui seguiva la paralisi intestinale e la scomparsa dei potenziali a picco (Iwamatsu, 1964).

Con la paralisi o l'ostruzione meccanica, si instaura la dilatazione dell'intestino tenue, che può stimolare un fenomeno ciclico che determina un aumento della secrezione di acqua ed elettroliti nel lume del tratto disteso (Wright, 1971). Nelle ostruzioni acute con strozzamento dell'ansa intestinale, l'iniziale iperattività intestinale, con il progredire della distensione, viene sostituita da ileo mediato da scariche simpatico-adrenergiche e dall'annullamento da parte del parasimpatico dei MMC

dovuto all'attivazione di recettori α - e β -adrenergici nella tonaca muscolare (Watson e Sodeman, 1974).

2.2. MOTILITÀ CECALE

I movimenti del grosso intestino sono complessi e non completamente noti. Nel cieco esistono sia peristalsi (il movimento aborale del contenuto intestinale) che anti-peristalsi (movimento orale del contenuto intestinale).

Il contenuto intestinale entra nel cieco dalla valvola ileo-ciecale, spinto dal potenziale d'azione migrante, un evento elettrico rilevante e rapidamente progressivo dell'ileo (Ross et al, 1990). I ricercatori hanno identificato numerosi tipi di motilità del cieco normale mediante endoscopia o fistole (Sellers et al, 1982; Dyce e Hartman, 1973), cinefluoroscopia (Ross et al, 1986) e manometri permanenti intraluminali che rilevavano l'attività mioelettrica (Ross et al, 1986; Ross et al, 1989). Nella base del cieco si verificano serie di scariche di potenziali coordinate, che spingono il contenuto intestinale nell'apice del cieco. Numerose serie di scariche di potenziali all'interno del corpo del cieco sembrano contribuire a movimenti non propulsivi, miscelanti da *haustra ad haustra*. È stato identificato un movimento di progressione, che inizia nell'apice del cieco, si propaga al corpo attraverso le porzioni caudale e craniale della base del cieco e nel colon ventrale destro. Questo movimento si verifica una volta ogni tre minuti nel pony alimentato, è associato con un caratteristico forte rumore causato dalla onda di contenuto intestinale udibile all'auscultazione ed è probabilmente responsabile del transito del materiale dal cieco al colon ventrale destro. Sembra che una zona con funzione di pacemaker elettrico, localizzata nei 10-15 cm ventrali dell'apice del cieco, inizi questo tipo di movimento progressivo (Ross et al, 1990; Ross et al, 1989). Numerosi movimenti retrogradi, generati dalla base del cieco craniale o caudale, sembrano essere abbinati a questo movimento peristaltico. L'elettromiografia in vivo del cieco ha dimostrato la esistenza di lunghe scariche di potenziali che possono risultare maggiori di cinque secondi e di brevi scariche di potenziali in grado di durare meno di cinque secondi. Nel cieco le brevi scariche di potenziali comunemente si verificano durante i movimenti peristaltici (Ross et al, 1989; Ruckebusch e Fioramonti, 1980; Adams, 1984).

2.3. CONTROLLO NEUROMUSCOLARE ILEO-CIECALE

La ritmicità dell'attività elettrica è controllata nell'intestino dalle cellule interstiziali di Cajal, cellule altamente specializzate che sono connesse dal punto di vista elettrico ai miociti tramite delle "gap-junction" (Horowitz, 1999).

Queste cellule generano e propagano impulsi a basse frequenze e possono essere coinvolte in diverse patologie portando ad alterazione della motilità intestinale. La contrazione della muscolatura intestinale è controllata e coordinata in primis dal sistema nervoso enterico (ENS). Una complessa interazione tra il sistema nervoso centrale ed il sistema nervoso autonomo è alla base della regolazione di diverse funzioni, ma la contrazione della muscolatura intestinale non richiede necessariamente un input neuronale esterno. Il tratto gastro intestinale ("*gastro intestinal tract*", GIT) riceve il controllo parasimpatico tramite il nervo vago ed i nervi pelvici e quello simpatico tramite fibre post-ganglioniche dei plessi mesenterici craniale e caudale. Una complessa rete di interneuroni integra ed amplifica l'input nervoso in ogni plesso; l'intensità e la frequenza delle contrazioni del muscolo liscio sono quindi proporzionali all'input simpatico e parasimpatico.

L'attività del sistema nervoso enterico e della muscolatura liscia intestinale si avvale anche di numerose altre sostanze chimiche endogene, quali dopamina, motilina e serotonina (Bertaccini e Coruzzi, 1987).

L'acetilcolina è il principale neurotrasmettitore gastrointestinale ed esercita la sua azione sulle cellule della muscolatura liscia tramite il legame con recettori muscarinici di tipo 2. Il controllo simpatico del GIT è affidato a fibre adrenergiche post-ganglioniche i cui corpi cellulari sono localizzati nei gangli prevertebrali. L'attivazione di un recettore α -2-adrenergico su un neurone colinergico in un ganglio enterico, inibisce il rilascio di acetilcolina e riduce quindi la contrazione della muscolatura intestinale.

I recettori β -1-, β -2- e β -atipico esercitano direttamente una funzione inibitoria sulla muscolatura liscia intestinale (Re et al, 1997).

I neurotrasmettitori inibitori non-adrenergici non-colinergici includono l'adenosina trifosfato (ATP), il peptide intestinale vaso attivo e l'ossido nitrico (NO) (Malone et al, 1999; Rakestraw et al, 1996).

La funzione di questi neurotrasmettitori si esplica nella mediazione dell'inibizione discendente nella peristalsi ed il conseguente rilassamento della muscolatura. La sostanza P è un neurotrasmettitore non-adrenergico non-colinergico che si pensa coinvolto nella contrazione muscolare del grosso colon (Sellers et al, 1985; Sonea et al, 1997).

La frequenza e l'intensità delle contrazioni muscolari intestinali nel piccolo intestino e nel grosso colon del cavallo sono fondamentali nel determinare la motilità intestinale; un'importanza ancora maggiore nel determinare la progressione del materiale nel lume intestinale è rivestita dagli schemi di ciclicità degli eventi contrattili. Questi schemi sono anche conosciuti come complessi migranti di motilità (o mioelettrici) ("*myoelectric migrating complex*", MMC) del piccolo intestino e del colon (Lester et al, 1992; Merritt et al, 1995).

Il MMC del colon origina in genere dal colon ventrale destro e si sposta con uno schema variabile tra il colon ascendente e discendente. Molti di questi MMCs sono temporalmente legati ad uno specifico evento di motilità dell'ileo, il complesso migrante del potenziale d'azione.

3. FISIO-PATOLOGIA DELLA MOTILITÀ ILEO-CIECALE

3.1. INFIAMMAZIONE

L'infiammazione locale della muscolatura intestinale ed il controllo inibitorio nervoso sono fondamentali nella patogenesi di ileo intestinale (Kalff et al, 1999; Türler et al, 2002).

L'infiammazione intestinale può essere presente sia in disordini primari come duodenite o colite oppure anche indotta dalla manipolazione delle anse intestinali in corso di laparotomia. Da studi sperimentali su altre specie sappiamo che la manipolazione del piccolo o del grosso intestino durante un intervento chirurgico può facilmente attivare il rilascio da parte di macrofagi di sostanze in grado di interagire con i leucociti ed attivare processi a cascata seguiti dalla migrazione di neutrofili nel interstizio. Le sostanze rilasciate dai neutrofili conducono ad una riduzione dell'intensità della contrazione della muscolatura liscia. Conseguentemente, in risposta a presunti agenti procinetici, la parete intestinale infiammata non riesce ad ottenere una contrazione fisiologica.

Bisogna inoltre sottolineare l'iperproduzione di NO indotta da un aumento dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) scatenato localmente dagli macrofagi. L'ossido nitrico è un neurotrasmettitore inibitorio chiave nel sistema non-adrenergico, non-colinergico (Rakestraw et al, 1996).

L'inibizione dell'ossido nitrico rappresenta uno degli scopi della ricerca farmacologica sperimentale per il trattamento dell'ileo.

3.2. RIFLESSI NEURONALI

I riflessi neuronali possono contribuire a mediare l'inibizione della motilità intestinale in concomitanza ad infiammazione peritoneale (Sjöqvist al, 1985; Pairet e Ruckebuschl, 1989).

Il segmento afferente si compone parzialmente di fibre C afferenti viscerali capsaicina-sensibili che terminano nel corno dorsale del midollo spinale dove possono attivare fibre o sinapsi simpatiche inibitorie direttamente sui gangli simpatici. Conseguentemente il ramo afferente del riflesso stimola un aumento del controllo simpatico, principalmente tramite la stimolazione di α -2-adrenocettori e l'inibizione del rilascio di acetilcolina, fornendo così la base per un blocco α -2- in risposta ad ileo. L'infusione intraluminale di capsaicina precedente a chirurgia addominale ha dimostrato l'attenuazione della gravità di POI in studi sperimentali sulla cavia. Questi risultati sottolineano l'importanza delle fibre afferenti viscerali nella patogenesi di POI (Zittel, 2001).

3.3. DISTENSIONE

Una distensione della parete del lume intestinale da lieve a moderata, come accade nei primi stadi di un'ostruzione intraluminale, evoca un aumento nell'attività contrattile locale (Lowe et al, 1980; MacHarg et al, 1986). Un'eccessiva distensione risulta in un'inibizione della motilità circoscritta al segmento di ansa intestinale disteso.

3.4. DIFETTI DI SVUOTAMENTO CECALE

Nel cavallo il cieco risulta sporadicamente colpito da specifici problemi di motilità. Questi possono, in genere, verificarsi in seguito ad anestesia generale e/o a chirurgia extra addominale, in particolare chirurgia ortopedica e delle vie respiratorie superiori, ed è quindi spesso considerata una forma di ileo post operatorio. Si possono considerare anche altre cause ad insorgenza spontanea, come accade in soggetti affetti da disordini primari quali uveite o tenosinovite settica. La sintomatologia clinica non mostra segni particolari, a meno che il quadro clinico non venga complicato da una perforazione del cieco. Nei soggetti con problemi di svuotamento ciecale post anestesia, dei sintomi palesi appaiono in genere dopo 3 o 5 giorni dalla chirurgia. I primi sintomi che possono essere in genere riscontrati sono depressione, scarso interesse al cibo e defecazione diminuita o assente. Il mancato svuotamento del cieco provoca un accumulo di materiale che può portare l'animale a mostrare una lieve o moderata sintomatologia colica. Un ritardo nella diagnosi o nella terapia può portare a lacerazione del cieco e conseguente peritonite fatale (Campbell et al,1984; Ross, 1985; Hilbert, 1987).

4. STUDIO SPERIMENTALE

4.1. SINTESI

Questo studio descrive come la motilità intestinale, in particolare del tratto più distale dell'ileo e della giunzione ileo-ciecale, sia regolata da meccanismi di controllo intrinseci (sistema nervoso enterico) ed in che modo questi siano in intima correlazione funzionale alla parte simpatica del controllo estrinseco.

Il sistema nervoso enterico ("*enteric nervous system*", ENS) è costituito da un imponente numero di neuroni localizzati al di fuori del sistema nervoso centrale ("*central nervous system*", CNS) che forma circuiti capaci di attività riflessa autonoma. Per quanto riguarda la specie equina non solo i dati relativi all'architettura dell'ENS sono modesti ma non esistono studi anatomo-funzionali relativi al controllo degli sfinteri.

Per valutare la morfologia, la distribuzione, la densità, il fenotipo e le proiezioni dei neuroni che controllano la giunzione ileo-ciecale ("*ileocaecal junction*", ICJ), abbiamo abbinato la tecnica che prevede il trasporto retrogrado del tracciante neuronale fluorescente Fast Blue (FB^a) ad indagini immunohistochimiche. A tal fine, in due cavalli, anestetizzati e sottoposti a laparotomia, è stato iniettato il FB nello spessore della parete della ICJ. Dopo 30 giorni dall'intervento è stata effettuata l'eutanasia, a seguito della quale tutto l'ileo e una piccola porzione della base del cieco sono stati asportati.

Le reazioni di immunohistochimica, effettuate su sezioni ottenute al criostato e preparati wholemount sono state eseguite al fine di valutare l'immunoreattività (IR) dei neuroni del ENS per la choline acetyltransferase (ChAT), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), *neurofilament NF200kDa* (NF200) ed S100 protein. Per quantificare le sottopopolazioni neuronali intramurali sono stati utilizzati dei "*pan-neuronal markers*", cioè anticorpi anti-*protein gene product* (PGP 9.5) e/o anti-*neuron specific enolase* (NSE).

I neuroni del plesso mio-enterico ("*myenteric plexus*", MP) e del plesso submucoso ("*submucosal plexus*", SMP) dell'ileo che esprimevano ChAT-IR sono risultati essere 66±7% e 74±15% rispettivamente, mentre le cellule nNOS-IR sono risultate essere 38±7% e 5±1% rispettivamente. Sono inoltre stati osservati neuroni che esprimevano sia ChAT- che nNOS-IR. È stata osservata SP-IR dal 14±13% dei neuroni del MP e dal 66±8% dei neuroni del SMP, mentre CGRP-IR è stata riscontrata solamente nel 43±6% dei neuroni del SMP. La maggioranza dei neuroni del SMP CGRP-IR hanno espresso anche SP-IR. Quasi tutti i neuroni SP-IR in entrambi i plessi sono risultati

essere colinergici. Abbiamo riscontrato NF200-IR nel $61\pm 15\%$ dei neuroni del MP e nel $91\pm 10\%$ delle cellule del SMP. La maggior parte dei neuroni del CGRP-IR ha espresso anche SP-IR. Quasi tutti i neuroni SP-IR in entrambi i plessi sono risultati colinergici.

Nella seconda fase della ricerca abbiamo identificato la distribuzione e la neurochimica dei neuroni del ENS che controllano la ICJ.

Abbiamo riscontrato che i neuroni discendenti del MP e del SMP nitrergici erano il $54\pm 11\%$ ed il $68\pm 4\%$ rispettivamente, quelli colinergici il $60\pm 19\%$ ed $82\pm 11\%$ rispettivamente, quelli NF-IR il $54\pm 9\%$ e $78\pm 21\%$ rispettivamente e quelli SP-IR circa il 20% in entrambi i plessi. Solamente i neuroni discendenti del SMP hanno mostrato CGRP-IR ($45\pm 21\%$). In entrambi i plessi i neuroni discendenti co-esprimenti nNOS- e ChAT-IR sono stati osservati essere il $25\pm 11\%$ ed il $61\pm 27\%$ rispettivamente.

Nella terza e ultima fase del nostro studio sono stati identificati e caratterizzati i neuroni e le fibre del sistema nervoso simpatico ("*sympathetic nervous system*", SNS) in connessione con la ICJ, grazie alla loro immunoreattività per la *tyrosine hydroxylase* (TH-IR) ed *dopamine-beta hydroxylase* (DBH)-IR. Inoltre sono stati studiati i rapporti tra le fibre simpatiche e i neuroni enterici a loro volta deputati al controllo della ICJ, cioè FB-positivi. A completamento della ricerca sono stati identificati anche i neuroni dei gangli delle radici dorsali del midollo spinale ("*dorsal root ganglia*", DRG) che veicolano la sensibilità della ICJ. Sono stati osservati numerosi neuroni FB-positivi a livello degli ultimi gangli della catena simpatica toracica e dei gangli prevertebrali celiaco ("*coeliac ganglion*", CG), mesenterico craniale ("*cranial mesenteric ganglion*", CMG) e mesenterico caudale ("*caudal mesenteric ganglion*", CaudMG) mentre erano poco rappresentati i neuroni dei DRG. I neuroni dei DRG destinati alla ICJ sono risultati immunoreattivi per il CGRP, NF200, nNOS, SP.

4.1.1. CONCLUSIONI

Questo lavoro evidenzia che:

- a) esistono sottopopolazioni di neuroni enterici classificabili in base al loro corredo neurochimico;
- b) la ICJ di cavallo è ampiamente regolata da neuroni del ENS, distribuiti nei due plessi, capaci di proiezioni molto lunghe (sino a 48 cm per i neuroni del MP);
- c) i maggiori gangli simpatici partecipano all'innervazione della ICJ.
- d) i neuroni dei DRG innervano, seppure modestamente, la ICJ e instaurano rapporti con i neuroni postgangliari simpatici.

In generale si evince, quindi, in che misura questo importante tratto intestinale risulti ampiamente influenzato dal sistema nervoso enterico e simpatico.

Dal punto di vista chirurgico si deve rimarcare che la presenza di neuroni intramurali deputati al controllo della ICJ localizzati a lunga distanza dalla ICJ indica che, in corso di resezione chirurgica del piccolo intestino, è preferibile, quando possibile, conservare quanto meno l'ultima porzione di ileo, così da evitare problemi al transito di materiale dall'ileo al cieco e prevenire reflusso gassoso dal cieco all'ileo.

4.1.2. POTENZIALE RILEVANZA

L'identificazione della complessa struttura morfo-funzionale del ENS risulta fondamentale per chiarire diversi meccanismi patogenetici coinvolti nel determinismo di numerose patologie del tratto gastrointestinale, in particolare quelle caratterizzate da turbe della motilità. Nonostante i notevoli progressi fino ad ora effettuati, molti aspetti restano ancora da definire circa le fini connessioni esistenti tra i molteplici circuiti neuronali e le funzioni gastroenteriche. Tali acquisizioni saranno necessarie non solo per approfondire le attuali conoscenze relative all'eziopatogenesi di molte patologie digestive, ma anche per favorire lo sviluppo di possibili strategie terapeutiche sempre più mirate ed efficaci e lo sviluppo di trattamenti farmaceutici per problemi alla motilità della ICJ.

4.2. INTRODUZIONE

La regolazione della motilità del tratto gastrointestinale (GIT) è basata su complesse interazioni tra il sistema nervoso parasimpatico, il simpatico ed il sistema nervoso enterico (ENS). Tuttavia è noto che la motilità intestinale è controllata primariamente dall'ENS, il sistema intrinseco, e secondariamente dal sistema nervoso estrinseco (Fleckenstein et al., 1982; Yamamoto et al., 1999), di cui in questo studio è stata analizzata la componente simpatica.

Il ENS è un complesso di neuroni e fibre intrinseci alla parete del GIT; consiste di neuroni che sono organizzati in due principali plessi gangliari: il plesso mio-enterico (MP), la cui funzione principale è la regolazione dell'attività muscolare, ed il plesso sub mucoso (SMP), che regola principalmente le funzioni della mucosa. In questi gangli i neuroni sensitivi, i motoneuroni, gli interneuroni ed i neuroni secreto-motori sono organizzati in circuiti riflessi funzionali che rendono il ENS capace di riflessi integrati senza il coinvolgimento del sistema nervoso centrale (CNS).

La maggior parte delle testimonianze riportate in letteratura riguardano l'architettura ed il fenotipo del digiuno (Burns e Cummings, 1993; Pearson, 1994; Doxey et al., 1995; Rakestraw et al., 1996; Malone et al., 1996, 1999, 2000) ed il grosso intestino (Murray et al., 1988; Burns et al., 1990; Burns e Cummings, 1991,1993; Schusser e White, 1994), spesso in correlazione all'Equine Grass Sickness (EGS) (Pogson et al., 1992; Murray et al., 1997; Cottrell et al., 1999; Milne et al., 2005), all'aganglionosi ileo-colica (lethal white foal syndrome; Vonderfecht et al., 1983) ed alla ganglionite mioenterica (Burns et al. 1990). Molta ricerca è stata anche rivolta all'Ileo (Kotze e van Aswegen, 1990; Doxey et al., 1995; Hudson et al., 2000; Domeneghini et al., 2004; Milne et al., 2005). La parte distale dell'Ileo rappresenta una regione intestinale altamente specializzata all'interno della quale il transito del materiale è molto rallentato.

L'organizzazione, la morfologia, la neurochimica del ENS ileale sono già state descritte nel cavallo (Kotze e van Aswegen, 1990; Doxey et al., 1995; Hudson et al., 2000; Domeneghini et al., 2004; Milne et al., 2005). A tutt'oggi non esiste tuttavia testimonianza in letteratura di studi che riguardino la proiezione dei neuroni enterici. La "*papilla ilealis*", una tumefatta prominente rivolta verso la giunzione tra il cieco e il colon ascendente (fig. 1A), rappresenta una porzione intestinale altamente specializzata nella quale il transito di materiale è drasticamente rallentato. La *papilla ilealis* nei cavalli sottoposti ad anestesia generale perde il suo aspetto ed appare come un orifizio appiattito (fig. 1B). Come si può osservare in corso di laparoscopia, il transito di materiale dall'ileo al cieco è un processo intermittente; durante l'attività quiescente dello "sfintere" ileale, la *papilla ilealis* non è facilmente distinguibile, mentre, durante il transito di materiale, protrude nel grosso intestino per alcuni centimetri (fig. 1C).

La giunzione ileo-ciecale (ICJ) è spesso chiamata in causa nella sindrome colica in associazione ad ostruzione e/o strangolamento del piccolo intestino, enterite e/o colite di varia natura e infiammazioni o ostruzioni del grosso intestino (Edwards, 1981; Pearson et al., 1975; Erkert et al., 2003; Freeman, 2006). Si ritiene, inoltre, che l'ipertrofia muscolare dell'Ileo equino possa essere secondaria a stenosi causata da disturbi neurogenici della ICJ (Rooney e Jeffcott, 1968).

In questo studio abbiamo, in una prima fase, investigato il ENS nell'Ileo distale e nella ICJ del cavallo analizzando, in sezioni effettuate al criostato ed in preparazioni wholemount, la morfologia, il fenotipo, la distribuzione e la densità delle principali sottoclassi di neuroni nel MP e nel SMP.

In una seconda fase abbiamo effettuato iniezioni di tracciante neuronale retrogrado fluorescente Fast Blu (FB) al livello della ICJ ed osservato, quindi, il ENS dell'ileo di cavallo in sezioni ottenute al criostato.

La terza fase della nostra ricerca è stata concepita per studiare i diversi aspetti del controllo simpatico (estrinseco) nella porzione terminale dell'ileo ed in particolare nella ICJ.

Il primo scopo è stato studiare, tramite tecniche di marcatura con tracciante fluorescente a trasporto retrogrado associata a tecniche di immunistoichimica, la distribuzione, la densità, la morfologia e la neurochimica dei neuroni simpatici e dei gangli della radice dorsale (DRG) che innervano la ICJ. Il secondo scopo è stato dimostrare che, nel cavallo, i neuroni dei DRG sensitivi viscerali prendono contatto con i motoneuroni simpatici. Il terzo obiettivo è stato studiare l'organizzazione e la distribuzione delle fibre adrenergiche nella porzione distale di ileo e nella ICJ. L'ultima finalità è stata determinare l'esistenza di relazioni tra le fibre del sistema nervoso simpatico ed i neuroni del ENS che controllano la ICJ. Questi ultimi sono, appunto, stati identificati tramite il tracciante retrogrado fluorescente Fast Blue (FB) iniettato a livello della ICJ nella seconda fase del nostro studio.

L'innervazione simpatica del GIT è costituita da motoneuroni prevalentemente allocati nella catena dei gangli simpatici toracici e nei gangli più grandi prevertebrali, celiaco (CG), mesenterico craniale (CMG) e mesenterico caudale (CaudMG); i gangli vertebrali sembrano originarie neuroni implicati nel controllo del flusso sanguigno vascolare, mentre i neuroni allocati nei gangli prevertebrali controllano, oltre al flusso sanguigno, la motilità e le secrezioni (Furness, 2006).

I neuroni dopaminergici del ENS, inoltre, sono stati studiati tramite studi di immunistoichimica nella cavia (Li et al., 2004; Mongardi Fantaguzzi et al., 2009), nella pecora (Chiocchetti et al., 2006), e nell'uomo (Singaram et al., 1995; Anlauf et al., 2003).

È ormai noto da molto tempo (Langley e Anderson ,1895) che il controllo simpatico inibisce la muscolatura del GIT. Si sa, inoltre, che quest'ultima è anche inibita da un controllo intrinseco, tramite fibre non-adrenergiche che (Burnstock et al. 1963, 1964). Il controllo simpatico potrebbe

essere mediato da adrenocettori α -eccitatori o β -inibitori (ARs) con effetti diretti (sugli sfinteri e/o sulla muscolatura del GIT) o indiretti (neuroni del ENS) (Furness, 2006).

È noto che il primario meccanismo di azione simpatico di inibizione della funzione digestiva è quello indiretto (Wood 2000).

L'innervazione simpatica estrinseca ed il ENS hanno una notevole interazione ed una maggior comprensione dell'innervazione simpatica risulta quindi fondamentale per capire i meccanismi di controllo enterici. L'organizzazione della rete simpatica ed i modi in cui le terminazioni dei motoneuroni post-ganglionici simpatici sono correlati ai neuroni del ENS e ad altre strutture (ad esempio cellule della muscolatura liscia degli strati muscolari e dei vasi ed altre cellule del GIT), sono state studiate soprattutto nelle specie di laboratorio (Furness, 2006). Gli Autori sono d'accordo nell'affermare che in molti mammiferi la stimolazione simpatica induca una contrazione dello sfintere ileo-ciecale (Malbert parla di sfintere ileo-colico). Ci sono, tuttavia, variazioni di specie nella risposta di questa regione e, senza dubbio, di altri tratti dell'ansa intestinale ai trasmettitori catecolaminergici. Nel cane e nella cavia ad esempio, la stimolazione simpatica causa contrazione non solo dello sfintere ileo-ciecale, ma anche della porzione distale dell'ileo (Munro 1951), così che quest'ultima parte del piccolo intestino possa, insieme allo sfintere ileo-ciecale, inibire il trasporto tra l'ileo ed il grosso intestino.

Munro (Munro 1951) suggerisce che questa contrazione possa in qualche modo dipendere dall'azione di elementi ganglionici colinergici nella parete muscolare. Nell'uomo è stato osservato, inoltre, che gli ultimi centimetri dell'ileo sembrano avere una funzione differente dal tratto antecedente ed un tono persistente, contrariamente alla restante porzione di ileo ed al duodeno (Barclay 1936).

Nel gatto, al contrario, è stata indicata nello sfintere ileo-ciecale e nella parete intestinale adiacente una risposta opposta e molto specifica all'adrenalina (Elliott 1904), fatta eccezione che per un tratto di circa 1 cm ad entrambi i lati dello sfintere.

Sembra quindi molto difficile identificare una "generica" risposta ileale all'innervazione simpatica, in quanto si rende palese come svariati fattori possano influire sulla risposta contrattile dell'intestino: la differente distribuzione dei ARs su cui numerosi bersagli (ad esempio muscolatura, neuroni del plesso mio-enterico (MP) e del plesso sub-mucosale (SMP), cellule interstiziali di Cajal (ICC), mastociti ed altri tipi cellulari localizzati nel ileo, l'organizzazione intrinseca del ENS, la quantità di neurotrasmettitori rilasciati e di catecolamine in circolo e l'autonomia del GIT.

Nel cavallo, inoltre, la risposta contrattile del piccolo intestino alla stimolazione simpatica sembra variare a seconda del tratto preso in considerazione. Alcuni Autori (Brunaud e Labouche, 1947), ad esempio, hanno osservato che la contrazione di alcuni segmenti duodenali isolati era stimolata da

adrenalina. Il ruolo della noradrenalina nella regolazione della motilità della muscolatura liscia intestinale è stato anche dimostrato nel digiuno (Malone et al., 1999). Nella muscolatura liscia di ileo equino sono stati distinti differenti sottotipi di α - e β -ARs (Belloli et al., 1997; Re et al., 2001). L'ileo equino sembra mostrare, diversamente dal digiuno, diversi schemi di motilità e di contrattilità spasmodica. La peculiarità della ICJ inoltre, è data anche dai diversi schemi contrattili rispetto ad altre specie, come ad esempio cane ed uomo; mentre in quest'ultimo, infatti, la maggior parte delle contrazioni registrate allo sfintere ileo-ciecale originano dal ileo, nel cavallo circa i due terzi delle contrazioni dello sfintere ileo-ciecale originano dal cieco (Roger et al., 1990).

Questi risultati macroscopici ci portano a credere che, come ipotizzato per l'intestino di cavia, cane e uomo, anche nel cavallo il tratto terminale dell'ileo possa pienamente agire da sfintere. In cavalli soppressi al macello statale il tratto di ileo distale appare come un tubo abbastanza rigido. La ICJ nel cavallo non mostra le caratteristiche strutturali tipiche di uno sfintere, ad esempio un ispessimento focalizzato della muscolatura liscia come lo sfintere pilorico (Kotzé 1988a), ma pare piuttosto come un sistema angio-muscolare, nel quale un denso plesso venoso sub-mucosale a livello della *papilla ilealis* completa, dopo l'insorgenza, la funzione del "muscolo dello sfintere" in quest'area, contribuendo alla chiusura dell'apertura ileo-ciecale (Kotzé 1988b). Nel cavallo la ICJ è costituita solamente dalla CML e da due componenti semicircolari del CML ciecale disposti lateralmente, non essendo quest'ultimo costruito anatomicamente come un vero sfintere. Anche la LML sembra avere effetti sui movimenti della *papilla ilealis*, dal momento che la tenia dorsale del cieco si costituisce anche di fibre della LML ileale (Kotzé 1988a).

Nella medicina equina è noto che la stimolazione dolorifica inibisce la motilità intestinale; in caso di manipolazioni l'inibizione della motilità potrebbe durare a lungo (ileo post operatorio o adinamico). Questo effetto sembra essere evocato da riflessi simpatici, anche se altri componenti potrebbero contribuire altre componenti (ad esempio l'infiammazione).

Le fibre sensitive dei neuroni del ganglio della radice dorsale (DRG) rappresentano le afferenze dei riflessi simpatici aventi effetto sulla motilità del GIT. Queste fibre afferenti chiudono l'arco riflesso simpatico attivando i neuroni simpatici preganglionici della colonna intermedio-laterale. Le stesse fibre sensitive potrebbero proiettare rami collaterali ai motoneuroni allocati nei gangli prevertebrali. È stato, infatti, dimostrato che le fibre afferenti varicose dei DRG prendono contatto sinaptico con i neuroni simpatici del ganglio celiaco nel ratto (Lee et al., 1987); questa interazione tra i neuroni afferenti ed efferenti potrebbe integrare o bypassare le risposte o i riflessi del sistema nervoso centrale. Un altro tipo di infiammazione errore informazione sensitiva (e di generazione di riflessi simpatici) è rappresentata neuroni intestinofugali, che inviano dei rami collaterali dal ENS al di fuori del GIT ha i gangli del prevertebrali (Furness 2003).

È evidente che nei piccoli animali molti aspetti dell'organizzazione e della struttura simpatica sono già stati studiati, ma che ancora poco si sa delle specie equine.

I risultati di questo studio contribuiscono ad approfondire le conoscenze sulla neuroanatomia del GIT nei grossi mammiferi domestici ed in particolare, fornendo nozioni funzionali neuroanatomiche basilari sulla terminazione del piccolo intestino, possono aiutare a capire le vie motorie definitive dell'attività motoria riflessa polarizzata dell'ileo equino, anche in correlazione alla maggior parte dei problemi di motilità di questa giunzione, come accade ad esempio nella Equine Grass Sickness (EGS).

4.3. MATERIALI E METODI

Tutte le procedure descritte a seguito sono state svolte seguendo la legislazione italiana che riguarda i protocolli di sperimentazione animale, dopo approvazione del Comitato Etico-Scientifico per Sperimentazioni su Animali della Università di Bologna. Sono stati compiuti tutti gli sforzi possibili allo scopo di minimizzare il numero di animali impiegati e la loro sensibilità al dolore.

Per la prima fase dell'indagine è stato utilizzato l'Ileo di due giovani femmine trotter (7 mesi e 2,5 anni di età) che erano precedentemente state destinate al macello statale per seri problemi ortopedici. I cavalli sono stati sedati profondamente con somministrazione di Acepromazina (0.04 mg/kg IV) e Xylazina (1.1 mg/kg IV), indotti e soppressi tramite somministrazione di Thiopentale sodico (10 mg/kg IV) e Tanax[®] (Intervet, Italia, 5 mg/kg, IV).

Ulteriori campioni di ileo sono stati prelevati il più in fretta possibile dal GIT di altre due femmine di 3 e 4 anni di origine e razza differenti, sacrificati al macello statale e che non presentavano alcun tipo di problemi gastro-intestinali.

Per la seconda fase dell'indagine, l'iniezione del tracciante a livello del ICJ, sono state utilizzate due giovani femmine trotter di razza Standardbred nate in Italia; entrambe, la prima (2,5 anni di età), già impiegata nella prima fase della ricerca, e la seconda (3,5 anni di età), erano state già precedentemente destinate alla soppressione dai proprietari dei rispettivi allevamenti, a causa di gravi problemi ortopedici.

4.3.1. PRIMA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELL'ILEO

4.3.1.1. PREPARAZIONE DEI TESSUTI: WHOLE-MOUNT

Solamente tessuti prelevati da soggetti sottoposti ad eutanasia si sono dimostrati adatti alla preparazione wholemount, in quanto le procedure anestetiche a cui vengono sottoposti gli animali predispongono il rilasciamento della spessa muscolatura ileale. Il tratto distale dell'Ileo (20 cm di lunghezza) e la ICJ sono state prelevate, vigorosamente risciacquate ed immerse in tampone fosfato salino ("*phosphate buffer saline*", PBS) contenente L-Nicardipina, un calcio antagonista che agisce per blocco dei canali del calcio nelle cellule eccitabili, per 30 minuti. I tessuti sono stati in seguito tagliati lungo il tratto mesenterico risciacquati con soluzione tampone salina (PBS: 0,15 M NaCl in 0,01 M di tampone Sodio-Fosfato, pH 7,2) e inchiodati su legno leggero di spessore di 3 mm con la superficie mucosale rivolta verso il basso. I campioni sono stati in seguito fissati in paraformaldeide contenente 0,2% di Acido Picrico in 0,1M di tampone Sodio-Fosfato (pH 7,0) a 4°C per una notte

intera; i campioni sono stati in seguito rimossi dal legno e risciacquati in Dimetilsulfossido DMSO 3 volte per 30 minuti ciascuna. Tutti i tessuti sono stati stoccati a 4°C in Sodio-Azide contenente PBS 0,1% fino a quando sono stati sottoposti a preparazione wholemount di MP e SMP.

I campioni di Ileo sono stati inchiodati in modo da distendere quanto più il tessuto, con la mucosa rivolta verso l'alto, in capsule *Sylgard-covered Petri* contenenti PBS. La mucosa è stata staccata con cautela usando uno scalpello. Per ottenere sottili preparazioni wholemount di SMP, abbiamo rimosso tre strati di tessuto: la sottomucosa allocata molto vicina al doppio strato di *muscularis mucosae* (*mm*) ed ai due distinti strati di SMP, l'interno (ISMP) e l'esterno (OSMP), come descritto in letteratura (Pearson 1994; Domeneghini 2004). Per ottenere le preparazioni di MP abbiamo rimosso non solo gli strati di SMP, ma anche il peritoneo, costituito da mesotelio, da uno strato spesso di connettivo attaccato fermamente aderente alla muscolatura longitudinale e da alcune strisce del piano di muscolatura longitudinale (LML).

4.3.1.2. PREPARAZIONE DEI TESSUTI: CRIOSEZIONI

Al criostato abbiamo ottenuto sezioni trasversali e longitudinali (spessore 12-16 μm) della ICJ da ciascun soggetto. Pezzi (2 x 0,5cm) di Ileo fissato e ICJ sono stati immersi in PBS contenente Sodio Azide (0,1%) e saccarosio (30%) e stoccati a 4°C per una notte. Il giorno seguente i tessuti sono stati trasferiti in una soluzione contenente una miscela di PBS-saccarosio-azide e composto *Optimal Cutting Temperature* (OCT^m) in un rapporto di 1:1 per altre 24 ore prima di essere congelati in 100% OCT in Cryomold^d. Per preparare le sezioni refrigerate i tessuti sono stati congelati in isopentano e liquido nitrogeno; in seguito delle sezioni di 12-16 μm di spessore sono state tagliate e preparate su vetrini ricoperti di gelatina e lasciate asciugare per 1 ora a temperatura ambiente (RT).

4.3.1.3. IMMUNOISTOCHEMICA

Si è deciso di avvalersi di metodi di doppia marcatura tramite immunofluorescenza indiretta. I tessuti sono stati incubati in una soluzione di siero di capra contenente PBS al 10% e TritonX 100 all' 1% per 30 minuti a temperatura ambiente per ridurre la possibilità di legame non-specifico degli anticorpi secondari e rendere permeabile il tessuto all'antisiero. I tessuti sono stati successivamente incubati a 4°C in una cella umida per 2-3 giorni (preparazioni wholemount) o per tutta una notte (criosezioni) in una miscela di due antisieri primari diluiti in un idoneo solvente (1.8% NaCl in 0.01M tampone fosfato contenente 0.1% Na-azide). Dopo aver effettuato lavaggi in PBS (3x10minuti) i tessuti sono stati incubati per $\frac{3}{4}$ ore (preparazioni wholemount) o 1 ora (criosezioni)

a temperatura ambiente in una cella umida in una miscela di due anticorpi secondari (Tavola 2) diluiti in PBS. I tessuti (preparazioni wholemount e criosezioni) sono stati in seguito lavati in PBS (3x10 minuti) e fissati in una soluzione tampone al glicerolo (pH 8,6). I preparati di MP ed SMP prelevati da siti differenti in ciascun animale, ad almeno 2 cm dall'iniezione di FB, sono stati quindi analizzati.

4.3.1.4. SPECIFICITÀ ANTICORPALE

La specificità degli anticorpi anti-CGRP è stata già provata (Domeneghini et al., 2004). L'anticorpo anti-S100 riconosce l'enteroglia dell'ileo equino (Hudson et al., 2000). Gli anticorpi NF200, ChAT, SP ed nNOS sono stati ben contraddistinti in altre specie e sono richiamati da proteine altamente conservate; molto probabilmente riconoscono gli antigeni appropriati nel cavallo, ma questo non è stato ancora direttamente dimostrato. Le specificità degli anticorpi secondari è stata testata tramite l'utilizzo di questi antisieri senza l'utilizzo degli anticorpi primari. Nessun neurone o fibra marcata sono stati ritrovati dopo aver escluso l'antisiero primario.

4.3.1.5. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

I preparati sono stati esaminati al microscopio^e equipaggiato con dei filtri cubici per distinguere tra istiocianato fluorescente (FITC^{f,g,h}). Le immagini sono state registrate da una fotocamera digitaleⁱ e tramite un programma software^j. Per le modifiche di contrasto e sensibilità sono stati usati programmi software^{k,l}.

4.3.2. SECONDA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELLA ICJ

4.3.2.1. INIEZIONE DI FAST BLUE (FB)

I cavalli sono stati sottoposti ad una procedura chirurgica mirata all'iniezione intramurale nella ICJ di un tracciante neuronale fluorescente retrogrado FB[®] (2% in soluzione NaCl 0,9%). Dopo premedicazione con acepromazina (0.04 mg/kg, i.v.) e romifidina (0.8 mg/Kg, i.v.), l'anestesia è stata indotta tramite la somministrazione IV di diazepam (0.05 mg/kg) e ketamina (2.2 mg/kg) e mantenuta con gas isofluorano al 2% veicolato da ossigeno al 100% in un circuito aperto, tramite un catetere oro tracheale cuffiato. Per assicurare una buona analgesia ci siamo serviti di un'infusione continua di ketamina (0.8 mg/kg/ora IV) per tutta la durata dell'intervento chirurgico e di

fenilbutazone (2.2 mg/kg, i.v.) al giorno per 5 giorni nel periodo post operatorio. Una terapia antibiotica è stata effettuata per 3 giorni dall'intervento tramite amoxicillina (20 mg/kg, i.v. TID) e gentamicina (6.6 mg/kg, i.v.). I cavalli sono stati posizionati in decubito dorsale, il campo operatorio è stato preparato sterilmente con Betadine®^b scrub ed alcohol isopropilico. Un'incisione preombelicale di 40 cm è stata eseguita sulla linea alba. Dopo aver esteriorizzato il digiuno ed il colon ascendente la ICJ è stata visualizzata nella sua collocazione profonda sotto lombare e la sua parete è stata sottoposta a delicate iniezioni intramurali con il tracciante neuronale retrogrado fluorescente FB. 150 µl di FB® sono stati iniettati in diversi punti per un totale di 15 iniezioni per mezzo di una micro siringa in vetro Hamilton da 10 µl. Ogni singola iniezione è stata eseguita scrupolosamente per evitare ogni perdita di tracciante dal sito di iniezione. Il digiuno e il colon sono stati, in seguito, correttamente riposti nell'addome e quest'ultimo chiuso con tre piani di struttura di routine. Il risveglio ed il periodo post operatorio hanno avuto un decorso normale.

A distanza di un mese dall'iniezione del tracciante FB i cavalli sono stati profondamente premedicati tramite somministrazione di acepromazina (0.04 mg/kg IV) e xylazina (1.1 mg/kg IV), l'anestesia è stata indotta tramite la somministrazione di tiopentale sodico (10 mg/kg IV) e la soppressione effettuata tramite somministrazione di Tanax® (5mg/kg IV).

4.3.2.2. PREPARAZIONE DEI TESSUTI

L'ileo (circa 60 cm in lunghezza), la ICJ e circa 10 cm di cieco vicino ai siti di iniezione sono stati prontamente prelevati, vigorosamente lavati ed immersi in PBS contenente L-Nicardipina, un calcio antagonista che agisce per blocco dei canali del calcio nelle cellule eccitabili, per 30 minuti. Le procedure utilizzate in questo studio per ottenere le criosezioni e le preparazioni wholemout dell'ileo sono già state descritte in altra sede (Chiocchetti *et al.*, 2006).

4.3.2.3. IMMUNOISTOCHEMICA

Le criosezioni, nelle quali le cellule marcate FB- sono state osservate tramite l'utilizzo di un microscopio ad epifluorescenza, sono state in seguito incubate con antisieri primari e secondari descritti nelle tavole 1 e 2 rispettivamente. Sono stati quindi effettuati studi di doppia marcatura tramite tecnica di immunofluorescenza indiretta come già descritto in altra sede (Chiocchetti *et al.*, 2006). La morfologia dei neuroni marcati FB è stata studiata avvalendosi dell'uso di un antisiero primario anti-neurofilamento NF200kDa, mentre la stima della loro percentuale sulla popolazione neuronale totale è stata studiata tramite l'uso di anticorpi anti-PGP 9.5 o anti-NSE.

4.3.2.4. SPECIFICITÀ ANTICORPALE

La specificità della anti-CGRP è già stata testata (Domeneghini et al. 2004). Per quanto riguarda gli anticorpi NF200, ChAT, SP ed nNOS si veda sottocapitolo: 4.3.1.4. SPECIFICITÀ ANTICORPALE.

4.3.2.5. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

I preparati sono stati esaminati al microscopio^e equipaggiato con sistema A^f in grado di emettere un fascio di luce avente una lunghezza d'onda di 360nm, necessaria per esaltare la fluorescenza blu del colorante FB che marca il citoplasma neuronale, ed equipaggiato come descritto precedentemente (sottocapitolo: 4.3.1.5. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA).

4.3.3. TERZA FASE DELLO STUDIO: CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ

Tutte le procedure descritte a seguito sono state svolte seguendo la legislazione italiana che riguarda i protocolli di sperimentazione animale, dopo approvazione del Comitato Etico-Scientifico per Sperimentazioni su Animali della Università di Bologna (Prot Rif. BQ/gf PROT 13825–X/10 - All. 67). Sono stati compiuti tutti gli sforzi possibili allo scopo di minimizzare il numero di animali impiegati e la loro sensibilità al dolore. Per l'iniezione del tracciante a livello del ICJ, sono state utilizzate due giovani femmine trotter di razza Standardbred nate in Italia; entrambe, la prima (2,5 anni di età), già impiegata nella prima fase della ricerca, e la seconda (3,5 anni di età), erano state già precedentemente destinate alla soppressione dai proprietari dei rispettivi allevamenti, a causa di gravi problemi ortopedici.

I dettagli del protocollo anestesilogico, della procedura chirurgica e del protocollo di soppressione sono stati già esposti nella trattazione della seconda fase dello studio.

4.3.3.1. PREPARAZIONE DEI TESSUTI

4.3.3.1.1. Ileo

L'ileo (circa 60 cm in lunghezza), la ICJ e circa 10 cm di cieco vicino ai siti di iniezione sono stati prontamente prelevati, vigorosamente lavati ed immersi in PBS contenente L-Nicardipina, un calcio

antagonista che agisce per blocco dei canali del calcio nelle cellule eccitabili, per 30 minuti. Le procedure utilizzate in questo studio per ottenere le criosezioni e le preparazioni wholemount dell'ileo sono già state descritte in altra sede (Chiocchetti *et al.*, 2006).

4.3.3.1.2. Gangli simpatici, midollo spinale e gangli della radice dorsale

Sono state rimosse le catene toraciche bilaterali del simpatico (“*toracic sympathetic chain*”, TSC), (iniziando dal ganglio cervicotoracico), i grandi nervi splancnici, i gangli splancnici (“*splanchnic ganglia*”, SG), il ganglio celiaco (“*coeliac ganglia*”, CG) ed i gangli mesenterico craniale (CMG) e caudale (CaudMG).

Il midollo spinale tra T5-L4, avvolto dal rivestimento della dura madre è stato visualizzato nella sua intera lunghezza in seguito ad una laminectomia dorsale. Durante questa procedura ci siamo cautelati di non tagliare le radici spinali per assicurare, in seguito, la precisa identificazione dei diversi segmenti di midollo e l’ottenimento dei DRG.

Dopo aver isolato il midollo spinale dalla dura madre, il midollo è stato diviso in due segmenti. I limiti di questi segmenti sono stati identificati contando le radici spinali dalla radice dell’ultimo nervo spinale toracico subito dietro la diciottesima costola. Tutti i tessuti sono stati prontamente asportati, fissati per 36-48 ore in una soluzione tampone al 4% di paraformaldeide in tampone fosfato (0.1 M, pH 7.2) a 4°C, sciacquati per tutta la durata di un notte in soluzione tampone fosfato (PBS: 0.15 M NaCl in 0.01 M tampone sodio fosfato, pH 7.2) e messi in stoccaggio a 4°C in una soluzione di PBS contenente saccarosio (30%) e sodio azide (0,1%). I tessuti sono stati congelati in isopentano raffreddato in azoto liquido ed in seguito fissati su supporti di legno Tissue Tek (Sakura Finetek Europe). Sono state quindi tagliate delle sezioni seriali longitudinali (spessore 14-16 µm) al criostato in seguito a poste su vetrini ricoperti con gelatina. Le sezioni sono state ricoperte con vetrino copri-oggetti e sono state esaminate nell’arco delle due ore successive al taglio.

I campioni selezionati per l’immunoistochimica sono stati sottoposti ad immunomarcatura oppure conservati a -20°C. Sono stati eseguiti studi di immunoistochimica sui campioni congelati (gangli simpatici, DRG ed ileo) né i quali erano stati precedentemente osservati neuroni marcati FB.

4.3.3.2. IMMUNOISTOCHIMICA

Le criosezioni sono state incubate con antisieri primari e secondari elencati nelle tavole 1 e 2, rispettivamente. Sono stati effettuati studi di doppia marcatura avvalendosi del metodo di immunofluorescenza indiretta, già descritto in altra sede (Chiocchetti *et al.* 2006).

La percentuale di neuroni marcati FB è stata studiata tramite l'utilizzo di Neurotrace (Molecular Probes, N21480) o antisieri primari anti-PGP 9.5 o anti-NSE.

4.3.3.3. SPECIFICITÀ ANTICORPALE

Tramite l'utilizzo di Western Blot analisi è stata studiata la specificità degli anticorpi per TH, DBH. La specificità dell'anticorpo anti-CGRP è stata già testata tramite test di assorbimento (Gibson et al., 1984; Domeneghini et al., 2004).

4.3.3.4. WESTERN BLOTTING

I campioni dei tessuti (midollo spinale e ileo) sono stati prelevati, congelati in azoto liquido e messi in stoccaggio a -80°C . In seguito, per l'analisi proteica, i tessuti sono stati congelati ed omogeneizzati direttamente in una soluzione tampone (5% SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8, 20mM *Tris*-HCl) con fenilmetilsolfonilfluoruro 0.1 mM (PMSF) e *Complete mini*ⁿ. Il tessuto omogeneizzato (10 %) ottenuto per l'analisi è stato preparato tramite l'utilizzo di un sistema automatizzato^o per essere mescolato con soluzione tampone in quantità doppia rispetto al campione e denaturato tramite ebollizione a 96°C per 10 minuti.

Le proteine nella soluzione ottenuta sono state quantificate tramite il *BCA Protein assay kit*^p. Un'aliquota di 25 μg è stata caricata su pozzetti *12% NuPAGE Novex Bis-Tris Gels*^q ed il peso molecolare misurato utilizzando *precision plus protein standards marker*^f.

Le proteine sono state quindi separate per mezzo di elettroforesi di massa con applicazione costante di 120V per 45 minuti con tampone MES (50mM MES, 50mM *Trisma base*, 1mM EDTA, 0,1% SDS) e trasferite tramite *electroblotting* su membrane PVDF, a 150V per tempi differenti impostati in base al peso molecolare per CGRP, TH, DBH, nNOS, SP e NPY.

Le membrane PVDF sono state quindi incubate per una notte a quattro 4°C con i rispettivi antibiotici: anticorpi policlonali di coniglio anti- αCGRP (1:3000); anticorpi monoclonali di topo anti-TH (1:1000); anticorpi monoclonali di topo anti-DBH (1:2000); anticorpi policlonali di coniglio anti-NPY; anticorpi monoclonali di ratto anti-SP. Dopo lavaggio con una soluzione 10 mM *Tris*-HCl, 133 mM NaCl, e 0.2% *Tween 20* (TBST), le membrane PVDF sono state incubate rispettivamente, con anticorpi di capra secondari anti-coniglio^s (1:20000), in anticorpi di capra secondari anti-topo^t ed in anticorpi secondari anti-ratto a temperatura ambiente per un'ora. Dopo lavaggio con TBST, le membrane PVDF sono state bilanciate in un tampone luminescente, montate su un substrato chemiluminescenteⁿ ed in fine esposte a raggi X.

Sono state descritte diverse forme molecolari di DBH: tetrameriche DBH-A (294,000 D), dimeriche DBH-B (147,000 D), una forma molecolare di DBH definita DBH-C di 125,000 D (Fraeyman et al., 1988) ed una forma DBH monomerica. Nelle nostre analisi WB abbiamo ottenuto prova di entrambe le forme monomeriche e dimeriche di DBH. La WB analisi ha confermato, quindi, la specificità degli anticorpi primari utilizzati in questo studio.

4.3.3.5. SPECIFICITÀ DEGLI ANTICORPI SECONDARI

La specificità degli anticorpi secondari è stata testata impiegandoli in seguito ad omissione degli anticorpi primari. Né i neuroni né le fibre colorate hanno potuto essere identificate dopo aver ommesso gli anticorpi primari.

Nei protocolli di doppia immunomarcatura, sono stati eseguiti esperimenti di controllo per studiare la marcatura non-specifica di anticorpi secondari agli anticorpi primari non appropriati, omettendo uno o l'altro dei reagenti della prima parte.

È stata inoltre eseguita l'incubazione con due anticorpi primari seguita solamente da uno anticorpo secondario, per valutare l'eventuale presenza di cross-reattività tra anticorpi primari e secondari. Infine è stata eseguita l'incubazione con ogni singolo anticorpo primario seguita dall'anticorpo secondario appropriato, per assicurare che lo schema di marcatura per ogni marker nelle metodiche di doppia marcatura concordasse con quello osservato nelle sezioni di singola marcatura. Non è stato rinvenuto alcun risultato che potesse dimostrare legame non specifico.

4.3.3.6. MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Come descritto precedentemente, i preparati sono stati esaminati al microscopio^e equipaggiato con dei filtri cubici per distinguere tra istiocianato fluorescente (FITC^{g,h}). Le proporzioni di neuroni nei quali l'immunoreattività è risultata co-localizzata sono state determinate esaminando le preparazioni marcate con fluorescenza, a doppia marcatura.

Nelle preparazioni nelle quali erano stati precedentemente osservati neuroni marcati FB, in un primo momento i neuroni sono stati localizzati tramite la presenza di un fluoroforo in grado di marcare un antigene, in seconda battuta è stata cambiata l'illuminazione per valutare se il neurone risultasse marcato o meno da un secondo antigene, localizzato tramite l'impiego di un fluoroforo di colore differente. Sono state in questo modo determinate le proporzioni dei neuroni marcati tramite appaia mento di antigeni. Le percentuali delle sottoclassi dei neuroni osservati in entrambe le preparazioni sono espresse come media \pm della deviazione standard.

Le immagini sono state registrate da una fotocamera digitaleⁱ e tramite un programma software^j. Per le modifiche di contrasto e sensibilità sono stati usati programmi software^{k,l}.

4.3.3.7. ANALISI QUANTITATIVE: SEZIONI AL CRIOSTATO DI SISTEMA NERVOSO SIMPATICO, DRG E ILEO

Le proporzioni dei neuroni positivi alla marcatura retrograda FB ed immunoreattivi per molti markers sono state determinate esaminando le preparazioni con marcatura fluorescente, singola e doppia immunomarcatura. I neuroni sono stati prima localizzati tramite l'osservazione di colorazione FB ed in seguito il filtro è stato cambiato per determinare se il neurone fosse stato marcato da uno, nessuno o entrambi i markers localizzati con due fluorofori di differenti colori. Le percentuali di sottoclassi dei neuroni sono espresse come media \pm della deviazione standard.

Sono stati quindi contati i neuroni con marcatura DRG ed è stata determinata la loro immunoreattività. Sono stati contati tutti i neuroni marcati FB per ciascun ganglio DRG (non tutti i gangli DRG sono stati tagliati). Per quanto riguarda i gangli simpatici (CG, CMG, e CaudMG) è stata contata la densità di neuroni marcati FB in 80 sezioni seriali (area 1 x 1 cm; spessore 16 μ m). Il valore risultato è puramente indicativo del numero totale di neuroni marcati.

4.4. RISULTATI

4.4.1. PRIMA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELL'ILEO

4.4.1.1. IMMUNOISTOCHEMICA

4.1.1.1. Ileo

Non tutti i marcatori sono stati espressi nelle preparazioni o wholemount probabilmente a causa dello spessore delle preparazioni. La percentuale di sottoclassi dei neuroni ottenuti da entrambi i tipi di preparazioni rappresentano la media della deviazione standard. Il numero di cavalli (*n*) utilizzati è stato indicato.

Nelle criosezioni, le cellule e le fibre PGP 9.5-IR sono state osservate distribuite in due livelli del MP, uno classicamente locato tra lo strato di muscolatura circolare e quello longitudinale, l'altro accolto all'interno del LML. Poche cellule e fibre immunomarcate sono state osservate anche sotto la sierosa. Nel SMP sono stati osservati singoli neuroni immunomarcati vicino alla *mm* anche organizzati come piccoli gangli nel ISMP. I gangli maggiori nel OSMP sono risultati allocati vicino allo strato di muscolatura circolare CML. Le fibre PGP 9.5-IR sono risultate essere densamente distribuite in tutta la mucosa incluso lo strato di *mm*. All'interno dei villi è stata osservata una densa arborizzazione delle fibre PGP 9.5-IR fino alla membrana basale dell'enterocitta (fig. 1A). Piccoli follicoli linfatici nella mucosa hanno mostrato un anello di fibre neurali (fig. 1B) osservate anche al centro dei follicoli stessi. Nella sottomucosa del cavallo più giovane (età 7 mesi) sono stati osservati anche grandi follicoli linfatici ampiamente distribuiti. Nelle preparazioni wholemount del SMP non è stata rinvenuta alcuna immunoreattività PGP 9.5.

L'anticorpo anti-NSE non ha marcato nessuna cellula nelle preparazioni wholemount o mentre si è rivelato molto utile nelle criosezioni.

Nelle criosezioni l'anticorpo anti-NF200 ha marcato con un differente grado di intensità cellule e fibre in entrambi i plessi; alcuni neuroni hanno mostrato solo marcatura peri-nucleare. Poche fibre NF200-IR sono state osservate nel LML mentre sono risultate numerose nel CML SP.

Solo molte poche fibre NF200-IR sono state trovate nella lamina propria, vicino allo strato muscolare, mentre nessuna di queste è stata osservata nei villi. L'immunoreattività NF200 è stata espressa dal $61 \pm 15\%$ dei neuroni del MP e dal $91 \pm 10\%$ dei neuroni del SMP. L'immunoreattività nNOS è stata espressa dal $74 \pm 13\%$ dei neuroni NF200-IR del MP (fig. 1C-C). Quasi tutti i neuroni SP-IR del SMP ($98 \pm 2\%$) hanno espresso anche immunoreattività NF200 mentre l' $86 \pm 12\%$ de i

neuroni NF200-IR hanno espresso anche l'immunoreattività SP. L'immunoreattività nNOS è stata espressa dal 38±7% dei neuroni del MP (risultando distribuita in entrambi i livelli del MP), questi hanno sempre mostrato una morfologia Dogiel del tipo I (fig. 1C; fig. 2C-D) variando da piccole a molto grandi. Nel SMP l'immunoreattività nNOS è stata espressa solo dal 5±1% dei neuroni generalmente localizzati nei gangli più grandi mentre è risultata in generale assente nel ISMP. Neuroni e fibre marcati con anticorpi anti-nNOS sono stati osservati anche nelle preparazioni wholemount; delle proiezioni neurali primarie molto grandi sono state osservate longitudinalmente. Diversi neuroni (fino a 48 cellule) nNOS-IR sono stati osservati nei gangli del MP, La maggior parte di questi era allineata circonferenzialmente. L'immunoreattività ChAT è risultata espressa dal 42±14% e dal 69±11% dei neuroni del MP e del SMP rispettivamente. I neuroni del MP nNOS-IR hanno espresso anche l'immunoreattività NF200 (74±13%). Anche neuroni nNOS-IR della SMP hanno espresso l'immunoreattività NF200 (51±8%).

Nelle criosezioni le fibre ChAT-IR sono state osservate in entrambi i plessi mentre non sono state osservate nella *mm* e nella mucosa. I neuroni ChAT-IR sono stati osservati nel MP (66±7%) e nel SMP (74±15%). I neuroni ChAT-IR nella MP e nel SMP hanno espresso anche l'immunoreattività nNOS (30±11%) e (4±1%), rispettivamente. Nel MP i neuroni ChAT-IR che hanno espresso anche l'immunoreattività SP sono risultati essere il 26±6%, mentre nel SMP i neuroni ChAT-IR che hanno espresso anche l'immunoreattività SP sono risultati essere il 68±10%. Nelle preparazioni wholemount del MP è stato difficile osservare delle cellule ChAT-IR.

Abbiamo osservato un densa distribuzione dell'immunoreattività S100 in tutti gli strati delle criosezioni del ileo.

Processi delle cellule entero-gliali S100-IR sono state osservate essere densamente distribuite lungo i villi (fig. 1D). Le cellule neuronali e le fibre sono risultate essere ampiamente avvolte dai processi entero-gliali S100-IR.

Nelle criosezioni numerose fibre intensamente SP-IR sono state osservate nel CML, mentre molte meno sono state trovate nel LML. Le fibre SP-IR sono state osservate innervare densamente la mucosa, in particolare i villi (fig. 1E), e i linfonodi sono stati osservati essere ampiamente avvolti da marcature SP-IR e CGRP-IR. Poche fibre SP-IR sono state osservate attorno agli vasi più grandi del SMP. I neuroni SP-IR sono stati osservati nel MP (14±13%) e nel SMP (66±8%); queste cellule del SMP hanno sempre mostrato una morfologia Dogiel del tipo II quando localizzate negli piccoli gangli del ISMP, mentre hanno mostrato una differente morfologia nei gangli del OSMP; i neuroni SP-IR che mostravano una morfologia Dogiel di tipo II hanno ampiamente espresso anche un'immunoreattività CGRP (95±10%) e un'immunoreattività ChAT (98±2%). Nelle preparazioni wholemount del MP le fibre SP-IR sono state osservate in fascicoli primari secondari e terziari.

Nelle criosezioni le fibre CGRP-IR non sono state osservate né nel CML né nel LML; al contrario varicosità pericellulari CGRP-IR sono state osservate attorno al MP, al SMP ed anche ai neuroni nella sottosierosa. La *mm*, la mucosa e i linfonodi hanno mostrato una ricca innervazione CGRP-IR, ampiamente co-localizzate a SP-IR. I neuroni CGRP-IR che mostravano una morfologia Dogiel di tipo II sono stati osservati solo nel SMP; queste cellule sono risultate il $43\pm 6\%$ e hanno anche ampiamente espresso l'immunoreattività SP ($93\pm 7\%$) mentre non hanno mai espresso l'immunoreattività nNOS. Nelle preparazioni wholemount l'immunoreattività CGRP non è mai stata evidenziata.

I risultati di questa indagine immunoistochimica sono riassunti nella Tavola 3.

4.4.1.1.2. ICJ

Alcune caratteristiche dell'innervazione neuronale della ICJ sono già state ampiamente descritte da altri autori (Kotzé e Van Aswegen 1990; Domeneghini et al., 2004). Abbiamo osservato che, come accade nel ENS ileale, i neuroni nNOS-IR risultano maggiormente espressi nel MP e le fibre nNOS-IR nel CML. Diversi neuroni ChAT-IR sono stati osservati nel SMP mentre pochi sono stati quelli osservati nel MP; ampi fasci di fibre ChAT-IR sono state osservate negli strati muscolari, soprattutto nel CML. Sottili fibre colinergiche sono state ritrovate anche nella mucosa del porzione ciecale della ICJ sia vicino alla *mm* che nelle cripte. Neuroni e fibre SP-IR sono stati osservati in entrambi i plessi della ICJ, mentre fibre SP-IR sono risultate solo nel CML. Poche o addirittura nessuna fibra SP-IR è stata osservata attorno e lungo i vasi del SMP. Sono stati osservati neuroni CGRP-IR solo nel SMP, mentre fibre CGRP-IR sono state osservate in entrambi i plessi e soprattutto nella mucosa.

4.4.2. SECONDA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELLA ICJ

4.4.2.1. IMMUNOISTOCHIMICA

4.4.2.1.1. Ileo

La percentuale delle sottoclassi dei neuroni marcati FB è espressa come media \pm della deviazione standard.

4.4.2.1.2.1. Marcatura FB - I dati sono stati ottenuti da criosezioni longitudinali, trasversali e tangenziali e da preparazioni wholemount a diverse distanze fino a 52 cm oralmente ai siti di iniezione FB. Non abbiamo considerato i campioni neuronali a meno di 2 cm dai siti di iniezione FB allo scopo di evitare, così, di contare cellule marcate FB per diffusione della soluzione del tracciante.

I neuroni marcati FB sono risultati essere variamente distribuiti nei tessuti, ma localizzati nei due strati del MP e solamente nel ganglio maggiore del SMP, mentre nessun neurone marcati FB è stato osservato vicino alla *mm* o in posizione sottosierosale. La percentuale di neuroni del MP e del SMP marcati FB è risultata $5\pm\%$ e $7\pm\%$ rispettivamente. La figura 2 mostra il numero di neuroni del MP e del SMP marcati FB a diverse distanze (fino a 24 cm) dal punto in cui il tracciante è stato applicato; questi dati sono riferiti al cavallo (età 2,5 anni) nel quale abbiamo osservato le proiezioni del MP e del SMP più lunghe. Ci siamo serviti di doppia marcatura con markers chimici differenti per rivelare la morfologia neuronale (NF200-, PGP 9.5-, NSE-, o nNOS-IR). I neuroni del MP marcati FB hanno mostrato prevalentemente una morfologia Dogiel di tipo I, sebbene siano stati osservati anche diversi neuroni con morfologia Dogiel di tipo II. Anche la maggior parte dei neuroni del SMP marcati FB hanno mostrato una morfologia Dogiel di tipo I.

Sono stati osservati neuroni marcati FB nelle preparazioni wholemount del cieco solamente in un soggetto (cavallo di età 3,5 anni), sino a 6 cm (MP) ed a 4 cm (SMP) dalla ICJ.

4.4.2.1.2.2. Neuroni discendenti e correlata immunoistochimica - La distanza maggiore alla quale abbiamo osservato neuroni del MP e del SMP marcati FB è risultata 48 cm e 28 cm rispettivamente (cavallo di 2,5 anni di età), anche se la maggior parte dei neuroni del MP e del SMP marcati sono stati trovati nei 20 cm più vicini ai siti di iniezione del tracciante FB (fig. 2).

Le proporzioni delle cellule nervose marcate nei primi 12 cm oralmente al sito di iniezione sono state determinate contando il numero di cellule FB nei preparati marcati per PGP 9.5-IR o NSE-IR. Inoltre i campioni presi tra 2 e 12 cm dal sito di iniezione sono stati marcati per determinare le proporzioni di neuroni marcati in modo retrogrado che esprimevano antigeni differenti (tavola 3). Tra i neuroni discendenti del MP marcati FB $65\pm\%$ sono risultati ChAT-IR, $41\pm\%$ nNOS-IR, $60\pm\%$ NF-IR, e $37\pm\%$ SP-IR. I neuroni discendenti del MP SP-IR e ChAT-IR (19%) hanno mostrato prevalentemente una morfologia Dogiel di tipo II (Fig. 4 A-B''). I neuroni del MP marcati FB hanno espresso sia ChAT- che nNOS-IR (31%) (Fig. 4 C-D''). Tra i neuroni del SMP marcati FB il $74\pm\%$ è risultato ChAT-IR, il $65\pm\%$ nNOS-IR. Nel SMP i neuroni discendenti ChAT- e nNOS-IR sono risultati il 42%. In entrambi i plessi i neuroni marcati FB nNOS-IR hanno mostrato una

morfologia Dogiel di tipo I, mentre gli anticorpi anti-NF200 hanno evidenziato dei neuroni marcati FB con una morfologia Dogiel di tipo II, neuroni con lunghi assoni discendenti non nNOS-IR.

Anche i neuroni del SMP marcati FB hanno mostrato SP-IR (32±%) (Fig. 4 E-F''), CGRP-IR (30±%), e NF-IR (92±%). Abbiamo anche studiato il fenotipo di alcuni neuroni localizzati a 36-44 cm dai siti di iniezione; questi neuroni del MP con morfologia Dogiel di tipo I sono risultati nNOS-IR (2/3 delle cellule contate) e ChAT-IR (3/5 delle cellule contate) (Fig. 4 C-D''); è stata anche osservata una cellula sia ChAT- che nNOS-IR ed una cellula negativa ad entrambi i markers.

I risultati del codice chimico dei neuroni marcati FB sono riassunti nella tavola 3.

4.4.3. TERZA FASE DELLO STUDIO: CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ

4.4.3.1. MARCATURA FB

4.4.3.1.1. Gangli simpatici

Un gran numero di cellule multipolari marcate FB in grado di diramare fino a sei lunghi processi, è stato rinvenuto nelle criosezioni di CG e CaudMG, mentre nel CMG i neuroni con marcatura retrograda sono risultati inferiori in numero oltre che marcati in modo molto più debole. Il numero di neuroni marcati FB osservati in 80 sezioni seriali scelte casualmente da campioni di gangli prevertebrali è risultato essere: 225 cellule (cavallo 1) e 175 cellule (cavallo 2) nel CG, 25 cellule (cavallo 2) nel CMG e 60 cellule (cavallo 2) nel CaudMG. Questi numeri sono solo indicativi, dal momento che non tutti i campioni di gangli sono stati tagliati ed è probabile che anche nel cavallo, come osservato nei gangli prevertebrali del ratto (Quinson et al., 2001), esista un'organizzazione viscerotopica/organotopica tale che i neuroni che innervano la ICJ possano risultare concentrati in qualche area gangli ionica che non è stata osservata.

I neuroni marcati FB sono risultati scarsamente presenti negli ultimi gangli TSC (T15-T18) (solamente tre cellule marcate FB in T15), al contrario queste cellule sono state riscontrate in numero maggiore nel SG. I neuroni marcati FB del TSC e SG hanno mostrato avere un numero di diramazioni dendritiche minore o addirittura assente, a paragone della maggior parte dei neuroni marcati FB prevertebrali simpatici.

4.4.3.1.2. Gangli della radice dorsale

È stata osservata una quantità esigua di cellule marcate FB.

4.4.3.1.3. Ileo

In entrambi i plessi dell'ileo è stata osservata una grande quantità di cellule marcate FB distribuite fino a 48 cm (MP) e 28 cm (SMP) dai siti di iniezione, ma molto concentrata nei 20 cm a di accenti alla ICJ. I dettagli sulla morfologia, distribuzione e fenotipo sono già stati trattati nei paragrafi precedentemente.

4.4.3.1.4. Midollo spinale

Dal momento che il FB non è un tracciante trans ganglionico, l'osservazione di cellule marcate FB nella IML è risultata negativa, non essendo, per altro, considerata come scopo del presente studio.

4.4.3.2. IMMUNOISTOCHEMICA

Le sezioni sono state esaminate istologicamente al microscopio con obiettivo x40 e la localizzazione e la distribuzione dei corpi e delle fibre cellulari immunoreattivi è stata classificata sulla base della densità della colorazione stabilita, tramite valutazione soggettiva, e giudicata in modo semiquantitativo come: – (non rinvenuto); ± (molto scarso); + (scarso); ++ (un numero moderato); +++ (un gran numero di corpi e/o fibre neurali).

È stata osservata qualche differenza nel codice chimico dei tre differenti gangli prevertebrali, che sono stati quindi descritti separatamente:

4.4.3.2.1. Ganglio Celiaco

Non tutti i neuroni marcati FB hanno espresso TH- (44/58 cellule, 76%) o DBH-IR (28/31 cellule, 90%). Non sono state osservate cellule marcate FB che esprimessero NPY-IR.

I neuroni del CG non hanno mostrato CGRP-, SP-, CCK-, e nNOS-IR. Al contrario diverse fibre varicose CGRP- e TH-IR sono state osservate attorno al corpo ed ai processi di neuroni marcati FB (Fig. 1 A-A''-A'''). Larghi fasci di fibre non-varicose CGRP- e NOS-IR, non co-esperimenti TH-IR, sono stati osservati scorrere a fianco di gruppi di neuroni. Fibre SP-IR sono risultate raramente

osservabili attorno e tra i neuroni. Poche sottili fibre varicose CCK-IR sono state osservate cingere solamente uno scarso numero di neuroni FB-negativi.

In generale abbiamo osservato che in tutti i gangli la distribuzione di varicosità pericellulari immunoreattive spesso appare irregolare, con alcune aree contenenti un gran numero di bottoni terminali ed altre che sembrano esserne prive.

4.4.3.2.2. Ganglio Mesenterico Craniale

Non tutti i neuroni del CG hanno mostrato TH- (12/14 cellule, 86%) o DBH-IR (2/3 cellule, x%). I neuroni marcati FB non hanno mostrato NPY-, SP-, CCK- e nNOS-IR. I neuroni FB-negativi hanno mostrato una moderata o intensa immunoreattività per CGRP; in studi di co-localizzazione è stato osservato che il 20% (13/66 cellule) di questi neuroni CGRP-IR, non aggregati in gruppi, ha espresso anche TH-IR ed, al contrario, solamente il 2% (2/89 cellule) delle cellule TH-IR sono risultate anche CGRP-IR.

Tra le cellule FB negative una grande percentuale di neuroni TH-IR ha espresso debole NPY-IR; l'intensità della marcatura per NPY-IR è risultata così debole da dare l'impressione che la curva di NPY-IR si estendesse al di sotto della soglia stabilita. Sono state identificate, ad ogni modo, tre tipi di sottopopolazioni: la maggioranza dei neuroni TH-IR ha mostrato una scarsa o assente NPY-IR; tra i neuroni NPY-IR marcati intensamente, una grande percentuale di cellule (86%, 117/136 cellule) non ha mostrato TH-IR; mentre una piccola percentuale di cellule (19/117 cellule, 14%) ha co-espresso una debole TH-IR.

Le fibre CGRP- e NOS-IR (CGRP>NOS) varicose sono risultate numerose attorno al corpo ed ai processi di neuroni marcati FB; come osservato nel CG, i CGRP-IR varicosità pericellulari sono risultate distribuite in modo irregolare. Le fibre SP- e CCK-IR (SP>CCK), al contrario, sono raramente state osservate attorno e tra i neuroni.

4.4.3.2.3. Ganglio Mesenterico Caudale

Non tutti i neuroni marcati FB hanno espresso TH- (18/19 cellule, 95%) o DBH-IR (7/7 cellule). Contrariamente ai risultati ottenuti nel CG e CMG, alcuni neuroni marcati FB hanno mostrato NPY-IR (6/11 cellule, 55%). L'intensità della NPY-IR dei neuroni ganglionici, inoltre, è stata in generale più forte. Nessuna cellula ganglionica ha espresso CGRP-, SP-, CCK- e nNOS-IR.

In studi di co-localizzazione sono state osservate ampie percentuali di neuroni TH-IR che esprimevano NPY-IR (60/89 cellule, 67%), mentre quasi tutti i corpi NPY-IR erano anche TH-IR (105/106 cellule).

È stata osservata una grossa concentrazione di fibre CGRP-IR perineurali, anche attorno ai corpi marcati FB (Fig. 1 E), mentre una concentrazione minore di fibre varicose SP-IR è stata tuttavia osservata accanto a neuroni marcati FB. Sono state osservate fibre debolmente CCK-IR molto esili, soprattutto attorno ai neuroni marcati FB. Sono state osservate anche fibre NPY-IR attorno ai neuroni. Solamente poche fibre sono risultate NPY-IR nei larghi fasci di fibre TH-IR e attraversano i gangli.

4.4.3.2.4. Catena Toracica Simpatica

Nessuna cellula ha mostrato CGRP- o SP-IR, mentre qualche neurone FB negativo è risultato nNOS-IR; queste cellule hanno mostrato un profilo sottile e sono sembrate apparentemente avere una morfologia unipolare; in queste cellule era visibile un lungo e largo assone nNOS-IR. Solamente in piccole aree abbiamo potuto osservare delle sottili fibre CGRP-IR co-esperimenti SP-IR, attorno a pochi neuroni FB-negativi. Le fibre CGRP-IR non varicose sono risultate numerose attorno ai gangli, mentre le cellule e fibre NPY-IR sono risultate quasi del tutto assenti.

4.4.3.2.5. Gangli della radice dorsale

I neuroni DRG mostranti una intensa marcatura FB sono risultati immunoreattivi per CGRP (2/2 cellule), SP (1/2 cellule), nNOS (1/3 cellule), e NF (1/1 cellule) (Fig. 1 C-D'). I neuroni DRG hanno co-espresso CGRP- e SP-IR (Fig. 1 C-C'), e NF- e nNOS-IR (Fig. 1 D-D'). I neuroni DRG con marcatura retrograda non hanno mai espresso NPY- o CCK-IR. I gangli CGRP-positivi hanno rappresentato circa la metà del numero totale delle cellule gangli ioniche (come descritto da Gibson et al., (1984)). Circa la metà della popolazione neuronale CGRP-IR dei DRG (49%), che ha mostrato un'immunoreattività da debole a molto forte, ha co-espresso anche SP-IR, mentre il 94% dei corpi SP-IR sono risultati anche CGRP.

4.4.3.2.6. Midollo spinale

4.4.3.2.6.1. Corno dorsale - Le fibre CGRP-, SP-, e CCK-IR sono state prevalentemente osservate nelle lamine I e II del corno dorsale (CGRP->SP->CCK->nNOS-IR); non sono state osservate fibre TH-IR nè neuroni SP- o CGRP-IR.

4.4.3.2.6.2. Colonna cellulare intermedio laterale - Sono state osservate fibre CGRP-, nNOS-, e SP-IR (SP>nNOS>CGRP) formare prominenti canestri cellulari attorno ai presunti neuroni del IML preganglionici del sistema nervoso autonomo dei segmenti del midollo spinale toracico e lombare (L3-L4) (Fig. 1 D-E). Nella IML sono stati osservati numerosi neuroni nNOS-IR.

4.4.3.2.6.3. Corno ventrale - Non sono stati osservati neuroni SP- e CGRP-IR nella *lamina IX*. È stato notato con interesse che le fibre TH-IR erano visibili nel margine ventro-laterale della sostanza bianca. Bisogna inoltre sottolineare che non è stata osservata alcuna struttura del midollo spinale NF-IR.

4.4.3.2.6.4. Ileo e ICJ - In entrambi i plessi non sono stati osservati neuroni TH- o DBH-IR; al contrario sono state osservate fibre adrenergiche (TH>DBH) attorno e lungo i vasi sanguigni ed attorno ai neuroni marcati FB (ed FB-negativi) del MP e del SMP (1 F MP, G SMP) che hanno mostrato anche un fenotipo colinergico. Molte fibre TH-IR sono state osservate nella mucosa, tra le cripte e lungo l'asse maggiore dei villi, mentre fibre DBH-IR sono raramente state osservate a questo livello. Poche fibre adrenergiche (TH>DBH) sono state osservate negli strati muscolari (CML>LML). Nella ICJ sono stati visti piccoli fasci di fibre TH-IR mischiate a grandi fasci di fibre colinergiche.

È noto che, nel cavallo i neuroni e le fibre ileali discendenti del MP esprimono ChAT-, nNOS-, NF-, e SP-IR; i neuroni del SMP, inoltre, mostrano anche CGRP-IR, come è stato precedentemente spiegato. I neuroni NPY-IR che mostravano diversi livelli di intensità, sono stati osservati solamente nel SMP; le fibre NPY-IR sono risultate ben distribuite nella mucosa e maggiormente concentrate attorno alle cripte indicando il loro coinvolgimento putativo nei processi di secrezione.

I neuroni e le fibre NPY-IR non hanno mai co-espresso SP-IR.

Sono state osservate attorno e lungo i vasi sanguigni delle fibre intensamente marcate NPY-IR che co-esprimevano TH- e DBH-IR. Sono state osservate poche fibre NPY⁺/TH⁺ attorno ai neuroni, mentre fibre TH- e DBH-IR formavano densi canestri pericellulari attorno ai neuroni (TH>DBH), del MP e SMP. Al contrario, nella mucosa, sono state osservate fibre NPY-IR in grado di

raggiungere l'apice dei villi, con una presenza molto maggiore rispetto a quelle TH-IR. È probabile che le fibre NPY⁺/TH della mucosa possano originarsi da neuroni del SMP o da neuroni simpatici prevertebrali con lo stesso fenotipo (vedi sopra).

Sono state osservate fibre CGRP-IR attorno e lungo i vasi sanguigni, questo dimostra il coinvolgimento di questo peptide nel controllo della circolazione sanguigna intestinale; né a questo livello né a livello dei corpi cellulari nel MP e nel SMP né nella mucosa è stata riscontrata co-localizzazione di TH- e CGRP-IR.

4.5. DISCUSSIONE

4.5.1. CONTROLLO NERVOSO INTRINSECO (ENS) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ

Le prime due fasi di questo studio sono state concepite per studiare i fenotipi, la distribuzione e le proiezioni dei neuroni discendenti del ENS che controllano la ICJ, nella porzione distale dell'ileo equino.

Questa è la prima descrizione di una sperimentazione di questo tipo condotta sul cavallo e, sebbene siano stati impiegati pochi soggetti, i risultati di questa ricerca possono contribuire ad espandere la conoscenza della neuroanatomia e fisiologia del GIT nei grandi mammiferi domestici ed eventualmente a fungere da stimolo per future ricerche farmacologiche. Bisogna sottolineare, d'altronde, che i cavalli non sono da considerarsi "grandi cavie" ed impiegare più cavalli per lo stesso esperimento potrebbe, quindi, far sorgere dubbi di carattere etico ed anche, non possiamo trascurarlo, avere costi proibitivi.

4.5.1.1. NEURONI NITRERGICI

Tutti i neuroni NOS-IR osservati in questo studio sono risultati avere una morfologia Dogiel di tipo 1. Sappiamo da altri studi che in questa categoria possiamo includere interneuroni discendenti e motoneuroni inibitori discendenti. Questa osservazione è supportata anche dalla presenza di una ricca innervazione nNOS-IR del CML a livello della ICJ. Sappiamo da altri studi effettuati su altre specie che i motoneuroni inibitori dovrebbero esprimere immunoreattività nNOS (ma non ChAT) (Furness, 2006a). Rakestraw et al. (1996) hanno dimostrato che il NO prodotto nel ENS è probabilmente il principale inibitore dell'attività muscolare gastrointestinale nel cavallo. Ancora, esistono prove che un eccesso di NO può causare ileo generalizzato gastrointestinale nella EGS (De Winter et al. 1997). Cottrell et al. (1999) ipotizzano il coinvolgimento di neuroni nitrergici nella EGS che potrebbero causare un rilassamento passivo e conseguente ostruzione gastrointestinale.

4.5.1.2. NEURONI COLINERGICI

L'innervazione intrinseca colinergica a già stata dimostrata nel piccolo intestino i cavallo (Malone et al., 1996, 1999). I neuroni ChAT-IR potrebbero essere motoneuroni eccitatori, interneuroni ed anche neuroni sensitivi intrinseci primari (IPANs). Tra i neuroni del MP e del SMP abbiamo osservato dei neuroni ChAT-IR e SP-IR, mostranti una morfologia Dogiel di tipo II, che

confermerebbero quest'ultima ipotesi; nella cavia, infatti, i IPANs dei plessi utilizzano tachichinina come principale neurotrasmettitore (Furness, 2006b). La presenza di neuroni ChAT- e nNOS-IR suggerisce che questi possano essere interneuroni, come è già stato ipotizzato nella cavia (Chiocchetti et al., 2003) e nella pecora (Mazzuoli et al., 2007).

4.5.1.3. NEURONI PEPTIDERGICI

I neuroni colinergici normalmente includono anche neuroni peptidergici CGRP- e SP-IR. Nel SMP i neuroni CGRP-IR sono risultati essere numerosi, come è stato già dimostrato da altri autori (Kotzé e Van Aswegen, 1990; Domeneghini et al., 2004). È stato dimostrato su basi neuroanatomiche che e farmacologiche che il CGRP gioca un ruolo cruciale in molte funzioni fisiologiche del ENS, inclusa la regolazione della muscolatura liscia e della motilità gastrointestinale (Palmer et al., 1986), di funzioni sensitive (Sternini, 1991) e della microcircolazione intestinale (Vanner, 1994). La distribuzione dell'immunoreattività CGRP è stata studiata nel maiale (Scheuermann et al., 1987), nell'uomo (Timmermans et al., 1992), nella pecora (Chiocchetti et al. 2006) ed anche nel cavallo (Burns e Cummings, 1993; Domeneghini et al., 2004). Questi studi hanno indicato che l'immunoreattività CGRP si riscontra principalmente nei neuroni con morfologia Dogiel di tipo II, considerati in queste specie i IPANs; questo tipo di neurone fornisce una buona innervazione della mucosa e dei gangli enterici e poca innervazione al muscolatura circolare (Bornstein et al. 1991). Il cavallo differisce da altre specie poichè l'immunoreattività CGRP stata riscontrata solo nei neuroni dei gangli sub-mucosali. Tuttavia la morfologia dei neuroni ISMP CGRP-IR e la distribuzione delle fibre CGRP-IR nell'ileo di cavallo suggeriscono che i neuroni IPANs nella sottomucosa del piccolo intestino di cavallo possano contenere CGRP come non i IPANs in piccoli roditori.

I neuroni scarsamente SP-IR nel MP sono stati osservati non solo in questo studio ma anche da Burns e Cummings (1993). Al contrario altri autori (Bishop et al., 1994; Pearson, 1994; Domeneghini et al., 2004) hanno riportato la presenza unicamente di fibre SP-IR. Poiché nessuno dei sopra menzionati autori ha utilizzato la colchicina per evidenziare l'espressione di neuropeptidi somatici, pensiamo che questa discrepanza possa essere dovuta all'utilizzo di diversi antisieri SP o a differenti metodiche utilizzate.

La presenza di varicosità pericellulari CGRP- e SP-IR attorno ai neuroni del MP e nel CML ci spinge a credere che il controllo del ileo equino possa originarsi da riflessi assonici, ad esempio da rami collaterali intramurali di fibre sensitive periferiche DRG che ricevono riflessi nell'ileo. Esiste in effetti prova che le fibre afferenti DRG partecipino attivamente nella regolazione locale della circolazione, secrezione, motilità, emostasi e riparazione della mucosa nel GIT (Holzer, 2007).

Esiste prova sperimentale che nel cavallo il SP moduli la contrattilità del muscolo liscio nel digiuno (Malone et al., 2000).

4.5.1.4. INNERVAZIONE DELLA MUCOSA

Abbiamo osservato una densa rete di fibre PGP 9.5-, CGRP- ed SP-IR penetranti i villi e che arrivano fino alla membrana basale dell' enterocita. Le cellule CGRP- ed SP-IR sembrano essere coinvolte nel controllo della vasodilatazione dei vasi intestinali (Gulbenkian et al., 1986) o nella genesi del dolore (Lim e Seet, 2007). Esiste prova che le tossine di *Clostridium Botulinum* siano implicate nell'eziologia della EGS (Nunn et al., 2007). Le tossine causano chemio denervazione dei nervi colinergici e inibiscono il rilascio di diversi altri neurotrasmettitori come noradrenalina, SP e CGRP. Le tossine sembrano essere in grado di attraversare l'epitelio monostratificato del lume ileale tramite transitosi o tramite un'attività di legame selettivo ai microvilli degli enterociti del piccolo intestino (Fujinaga, 2006). Dopo aver penetrato la barriera epiteliale le tossine potrebbero raggiungere il circolo sanguigno e linfatico o, come noi ipotizziamo, potrebbero direttamente legarsi direttamente alle terminazioni nervose della mucosa, originando un' alterazione e disfunzione del ENS. Infatti nella EGS il ENS sembra essere danneggiato in primis e il danno gastrointestinale è sempre maggiore a livello del ileo (Bishop et al., 1984). Dal ENS il danno neuronale potrebbe raggiungere tramite meccanismo retrogrado il restante sistema nervoso autonomo (e centrale); Howell et al. (1974) hanno dimostrato che le lesioni nel ganglio celiaco-mesenterico non possono essere osservate nei primi giorni dei casi acuti, questo supporta l'ipotesi che possa essere implicata una lesione primaria dell'ansa intestinale con un trasporto retrogrado di neutrotossina o degenerazione secondaria.

Nel nostro studio è stata anche riscontrata una ricca innervazione (PGP 9.5-, CGRP- ed SP-IR) attorno e dentro ai follicoli linfatici della mucosa. In diversi mammiferi e nell'uomo le placche del Peyer (PP) mostrano una ricca innervazione (Vuchanova et al., 2007; Defaweux et al., 2007; Chiocchetti et al., 2008); le particelle estranee transitano dal lume intestinale ai follicoli attraverso le cellule *microfold* (M) che si trovano sopra i follicoli linfatici. È plausibile che i follicoli densamente innervati osservati nel cavallo possano rappresentare una porta di entrata selettiva per patogeni neurotrofici che possano utilizzare i percorsi enterici neuronali per raggiungere i gangli del sistema nervoso autonomo e il sistema nervoso centrale.

4.5.1.5. GLIA ENTERICA

Abbiamo osservato una marcata S-100-IR a tutti i livelli della parete ileale. Nel GIT la proteina calcio legante S-100 è ipotizzata essere esclusivamente localizzata nelle cellule gliali (Ferri et al., 1982). C'è motivo di pensare che le cellule entero-gliali ricoprano un ruolo molto importante nella omeostasi del GIT, mantenendo l'integrità neuronale tramite il supporto strutturale, rilasciando fattori neurotrofici o assicurando un micro ambiente di protezione (Rühl, 2005). La glia enterica può essere coinvolta nella trasmissione nitrergica attraverso la produzione di L-arginina, un precursore essenziale dell'ossido nitrico. È stato ipotizzato che la glia enterica possa anche interagire con i capillari intestinali per modulare la permeabilità endoteliale. Esiste prova che la glia enterica giochi anche un ruolo cruciale nella regolazione della permeabilità dell'epitelio intestinale e possa essere una fonte di fattori protettivi per la mucosa. Questo suggerirebbe che le cellule gliali potrebbero ricoprire un ruolo essenziale nel sistema di difesa della mucosa intestinale (Rühl, 2005; Savidge et al., 2007).

4.5.1.6. INNERVAZIONE DELLA ICJ

Questo è il primo studio che riporta la descrizione proiezioni di neuroni enterici estese per una tale lunghezza in direzione anale (48 cm). La presenza di proiezioni neuronali in grado di controllare la ICJ rinvenute a tale distanza dallo sfintere indica che, in corso di resezione chirurgica del piccolo intestino nel cavallo, è preferibile, quando possibile, conservare almeno l'ultimo tratto di ileo così da mantenere quanto più possibile la normalità anatomica e fisiologica dell'ansa intestinale; questo potrebbe, quindi, contribuire ad evitare alterazioni del transito del materiale tra l'ileo ed il cieco ed a prevenire reflusso gassoso dal cieco nell'ileo. I nostri risultati forniscono un supporto dal punto di vista anatomico alle importanti recenti osservazioni di Loesch *et al.* (2002) e Rendle *et al.* (2005), che hanno suggerito che, in caso di resezione chirurgica, è preferibile conservare l'ultimo tratto di ileo allo scopo di conservare la funzionalità della ICJ.

I neuroni marcati del SMP possono anche contribuire non solo a determinare il tono muscolare del ICJ, ma anche a regolare la sua vascolarizzazione; diversi autori, infatti, hanno interpretato le funzioni della ICJ come un sistema angio-muscolare, piuttosto che considerarlo solamente uno sfintere muscolare (Kotzé 1988b). L'importanza di un denso plesso venoso sub-mucosale della ICJ, inoltre, è evidenziata dall'assenza di uno sfintere muscolare a questo livello (Schummer 1953; Kotzé 1988b).

Abbiamo osservato neuroni colinergici del SMP marcati FB, che potrebbero controllare la vasodilatazione tramite proiezioni alla ICJ. Questo suggerisce che, come è già stato osservato in altre specie (Vanner e Surprenant 1996; Li *et al.* 1998; Lomax *et al.* 2007), il tono vascolare del GIT equino potrebbe essere regolato da un'innervazione simpatica estrinseca e da una innervazione colinergica intrinseca.

Neuroni marcati FB sono stati osservati nel cieco solamente in un soggetto; è possibile che la coordinazione tra il tratto distale dell'ileo ed il cieco possa essere mediata da corti riflessi intramurali ed anche da lunghi riflessi extramurali, nei quali i recettori intestinali mandino, tramite afferenze splancniche (o vagali), un segnale ai gangli simpatici ed ai nuclei centrali che originano una risposta motoria nell'ileo. Abbiamo potuto osservare in alcuni video di laparoscopia (gentilmente offerti dal Chiar.mo Prof. S.Cinotti, Università di Bologna) che lo svuotamento ileale è preceduto dal passaggio di materiale liquido dal cieco al colon. È possibile che l'attivazione di uno schema di motilità progressiva, che inizia da un'area pacemaker prossima all'apice del cieco e spinge il materiale dal cieco al colon ventrale destro (Ross 1989), possa anche innescare il riflesso di svuotamento dell'ileo attraverso l'eccitazione di mecano- o chemio-recettori localizzati nel cieco attorno alla *papilla ilealis*.

4.5.1.6.1. Neuroni nitrgici

Da studi condotti su altre specie sappiamo che queste cellule probabilmente includono interneuroni discendenti e motoneuroni inibitori discendenti. Rakestraw *et al.* (1996) hanno dimostrato che il NO prodotto nel ENS è probabilmente il principale inibitore dell'attività muscolare del GIT nel cavallo. Non esistono, inoltre, testimonianze di un ileo gastrointestinale generalizzato nella EGS causato da eccessivo NO (De Winter *et al.* 1997). Cottrell *et al.* (1999) hanno suggerito il coinvolgimento di neuroni nitrgici nella EGS che potrebbero causare rilassamento passivo del GIT e persino ostruzione gastrointestinale.

4.5.1.6.2. Neuroni colinergici

L'innervazione colinergica intrinseca è già stata dimostrata nel piccolo intestino equino (Malone *et al.*, 1996, 1999). I neuroni discendenti ChAT-IR potrebbero essere motoneuroni eccitatori, interneuroni ed anche neuroni sensitivi primari (IPANs). La capacità dei neuroni discendenti di esprimere ChAT- ed nNOS-IR ci spinge a supporre che questi possano essere interneuroni, come è già stato ipotizzato in altre specie (Chiocchetti *et al.* 2003; Mazzuoli *et al.* 2007). Abbiamo inoltre

osservato, in entrambi i plessi, numerosi neuroni discendenti non immunoreattivi per ChAT- ed nNOS-. Riteniamo, tuttavia, che altre sottopopolazioni neuronali discendenti con specifiche caratteristiche neurochimiche debbano ancora essere identificate nel MP e nel SMP dell'ileo equino.

I neuroni colinergici di solito comprendono anche neuroni peptidergici CGRP- ed SP-IR. Come già descritto da altri autori (Kotzé 1990; Hudson *et al.* 2000; Domeneghini *et al.* 2004), abbiamo trovato numerosi neuroni CGRP-IR nel SMP.

Indagini neuroanatomiche e farmacologiche hanno dimostrato che il CGRP gioca un ruolo fondamentale in molte funzioni fisiologiche del ENS (Palmer *et al.* 1986; Sternini 1991; Vanner 1994). La distribuzione della CGRP-IR è già stata studiata nel cavallo (Kotzé and Van Aswegen 1990; Burns and Cummings 1991; Domeneghini *et al.* 2004). Ricerche condotte su altre specie hanno evidenziato che la ci CGRP-IR riguarda principalmente neuroni con morfologia Dogiel di tipo II considerati IPANs; questo tipo di neurone fornisce una buona innervazione alla mucosa ed ai gangli enterici ed una scarsa innervazione della muscolatura circolare (Bornstein 1991). Il cavallo differisce da altre specie poiché i neuroni CGRP-IR sono stati rinvenuti solamente nei gangli submucosali. Tuttavia la morfologia dei neuroni del SMP CGRP-IR e la distribuzione errore

La morfologia dei neuroni CGRP-IR del SMP e la distribuzione delle fibre CGRP-IR nell'ileo di cavallo suggeriscono, tuttavia, che i IPANs del SMP equino possano contenere CGRP al pari dei IPANs nella cavia. Abbiamo anche osservato dei neuroni marcati FB del SMP che esprimevano CGRP-IR.

4.5.2. CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ

4.5.2.1. MARCATURA FB

4.5.2.1.1. Gangli simpatici

I neuroni prevertebrali marcati FB hanno mostrato avere fino a sei lunghi processi dendritici. Diversi studi hanno riportato che la grandezza e la complessità dell'albero dendritico dei neuroni simpatici nei mammiferi è correlata alle dimensioni dei loro bersagli periferici (Purves 1988). È probabile che i neuroni marcati FB più grandi ed arborizzati possano originare assoni in grado di raggiungere i grandi gangli del ENS o i grandi vasi sanguigni, prerogativa della ICJ.

Abbiamo osservato che alcuni gangli del tronco simpatico e del CG, CMG, e CaudMG innervano il tratto distale dell'ileo e la ICJ. I nostri risultati concordano con le osservazioni di Quinson (Quinson et al. 2001), ma contrasta hanno con quelli di Luckensmeyer e Keast (Luckensmeyer e Keast 1994), che avevano escluso il CaudMG dal innervazione dell'ileo di ratto.

Sembra chiaro che, anche per i piccoli animali da laboratorio, questo tipo di indagine possa presentare qualche difficoltà. È possibile, infatti, che possano essere omessi piccoli gruppi di neuroni simpatici dispersi lungo i principali nervi simpatici.

Contrariamente al gruppo di studio di Quinson, che ha riportato dati numerici anche nell'innervazione del GIT, noi non abbiamo riportato il numero totale di neuroni marcati FB presenti lungo i gangli simpatici e sensitivi; il principale obiettivo del nostro studio è stato fornire la prova anatomica del controllo simpatico dell'ileo distale e equino e dimostrare l'esistenza di una possibile relazione tra neuroni simpatici e sensitivi. Contare il numero totale di cellule con marcatura retrograda non è stato considerato un obiettivo della nostra indagine.

4.5.2.1.2. Gangli splancnici

Come osservato nel cane e nel ratto (Quinson et al. 2001), il cavallo presenta dei prominenti gangli splancnici appaiati sui maggiori nervi splancnici, subito cranialmente al CG.

4.5.2.1.3. Catena toracica simpatica

Sono già state descritte le arborizzazioni dendritiche apparentemente ridotte dei neuroni marcati FB osservati in questi gangli (Baluk e Gabella 1987); pare che questo aspetto morfologico sia dovuto al ridotto numero di input convergenti preganglionici che queste cellule ricevono (Forehand 1987; Jobling et al. 2003, 2004).

Nei gangli TSC della cavia, ad esempio, i neuroni pilomotori presentano delle arborizzazioni dendritiche più grandi rispetto a quelle dei neuroni vasocostrittori (Gibbins e Matthew 1996).

Potremmo ipotizzare che i neuroni TSC marcati in modo retrogrado, osservati nel cavallo in questo studio, siano neuroni vasocostrittori che innervano la ICJ.

4.5.2.1.4. Gangli delle radici dorsali

Siamo stati sorpresi di osservare solamente un piccolo numero di neuroni marcati FB innervare la ICJ; recentemente abbiamo osservato un gran numero di neuroni dei DRG innervare l'ileo distale

nella pecora (Chiocchetti et al., 2006). Questa discrepanza potrebbe essere spiegata dalle minori aree intestinali infiltrate dal tracciante retrogrado; questa ipotesi, tuttavia, lascia dei dubbi poiché un gran numero di neuroni simpatici è risultato invece marcato dopo infiltrazione della ICJ. Un altro motivo potrebbe essere rappresentato dalla distanza tra la ICJ ed i DRG; questo pare improbabile, in quanto i pochi neuroni marcati FB osservati presentavano un'intensa marcatura. Abbiamo anche ipotizzato che la ICJ possa ricevere una importante innervazione sensitiva dai gangli vagali. Anche se è noto che le fibre vagali siano in natura prevalentemente sensitive, abbiamo trascurato questa ipotesi in quanto è stato dimostrato che nei grandi mammiferi il nervo vago non si estende così a lungo in direzione anale (Chiocchetti et al., 2003). La nostra opinione è che due fattori principali potrebbero giustificare la scarsa innervazione sensitiva dei DRG sulla ICJ: la presenza di una grande quantità di neuroni intestinofugali e la grande importanza dei neuroni intrinseci afferenti primari IPANs (Furness 2006) che permette al GIT di essere quasi completamente autonomo e indipendente dal CNS. Qualunque sia il motivo, l'osservazione di un piccolo numero di neuroni marcati FB dei DRG, automaticamente riduce, ma non estingue, l'importanza dei processi collaterali neuronali dei DRG a livello dei gangli simpatici.

4.5.2.2. IMMUNOISTOCHEMICA

4.5.2.2.1. Gangli simpatici prevertebrali

I neuroni del sistema nervoso autonomo, che si trovano nei singoli gangli, spesso mostrano percorsi e profili neurochimici specifici, si dicono “*chemically coded*” (Furness et al. 1989). Una conseguenza di questa caratteristica è che i diversi motoneuroni terminali nello stesso ganglio possono utilizzare caratteristiche combinazioni di neurotrasmettitori per regolare le funzioni dei loro tessuti bersaglio (Morris e Gibbins 1992). Le implicazioni funzionali di questa diversità neurochimica non sono ancora note nel cavallo e noi possiamo solamente esprimere ipotesi confrontando i nostri risultati con quelli ottenuti in altre specie. Non tutti i neuroni del CG, CMG, e CaudMG hanno espresso TH-IR (or DBH-IR), in accordo a quanto già osservato nei gangli TSC del cavallo (John et al., 2001). È noto che i gangli simpatici non contengono solamente catecolamine quali neurotrasmettitori; recentemente abbiamo potuto osservare che nei gangli cervicali della pecora i neuroni hanno espresso nNOS-IR ma non TH- o DBH-IR. Anche altri neurotrasmettitori potrebbero giocare un ruolo nei percorsi simpatici, ad esempio ATP (Lacroix et al., 1988), NPY (Lundberg et al., 1982), VIP (Furness 2006), CGRP (Anderson et al., 1995), ChAT, NOS (Anderson et al., 1995), somatostatina (SOM; Lindh et al., 1986), ed altri co-trasmettitori CGRP-IR.

Nel cavallo le cellule CGRP-IR erano già state osservate in particolare nei gangli stellati (Nasu et al. 2003). Bisogna sottolineare che queste cellule sono state osservate solamente nel CMG, mentre nessuna marcatura CGRP è stata osservata nel CG e CaudMG. Non possiamo tuttavia escludere che altri gangli possano presentare cellule CGRP-IR, dal momento che non sono stati sezionati tutti i tessuti dei gangli. Alcuni Autori (Anderson et al. 1995) hanno attribuito una funzione sudomotoria ai neuroni CGRP-IR appartenenti alla catena simpatica L7 ed ai gangli stellati nel gatto.

Una piccola percentuale di CMG hanno co-espresso TH- e CGRP-IR; queste cellule sono indicate come neuroni vasocostrittori nei gangli della catena simpatica della cavia (Gibbins e Matthew, 1996). Gli Autori hanno dimostrato che in questi neuroni TH-positivi, potrebbero essere co-espressi il neuropeptide Y (NPY)-, e CGRP-IR. Non siamo in grado di verificare la co-espressione tra NPY- e CGRP-IR in quanto i due anticorpi sono entrambi ottenuti dalla stessa specie, il coniglio.

Il NPY, un peptide con 36 amminoacidi, co-esiste alla noradrenalina nei nervi postganglionici simpatici in diversi organi periferici (Lundberg et al., 1982); agisce sui recettori Y1 per potenziare gli effetti di vasocostrizione della noradrenalina (Han et al., 1998). Nel CG abbiamo osservato neuroni TH-IR co-esperimenti NPY-IR ed una piccola percentuale di neuroni NPY-IR completamente TH-negativi; possiamo ipotizzare che, come osservato in altre specie, le cellule TH⁺/NPY⁺ possano essere neuroni vasocostrittori, mentre quelli NPY⁺/TH⁻ possano essere vasodilatatori, come suggerito in altri studi (Gibbins e Matthew, 1990). In un esperimento di marcatura retrograda nella cavia, sono state osservate proiezioni di neuroni CG+CMG TH- e NPY-IR fino al piloro (Lindh et al., 1986); si è ipotizzato quindi che i neuroni TH⁺/NPY⁻ (and SOM⁻), potessero innervare i gangli del MP e che quelli TH⁺/NPY⁻ (e SOM⁺) potessero innervare i gangli del SMP. I neuroni TH⁺/NPY⁺ sono stati considerati neuroni vasomotori, mentre altre cellule TH⁻/NPY⁺ sono state considerate neuroni noncatecolaminergici. Recentemente, in altri studi (Browning et al., 1999), non è stato possibile discriminare nella cavia le cellule che innervano arterie e vene, tra i pochi neuroni simpatici NPY-IR del CaudMG che innervano le arterie o le vene mesenteriche. Questo indica che anche studi intraspecifici non possono spesso dare risultati costanti e ripetibili.

Neuroni nNOS-IR (non marcati FB) sono stati osservati nel TSC. È stato dimostrato (Anderson et al., 1995) che le cellule postganglioniche nNOS-IR lombari e stellate nel gatto sono neuroni colinergici sudomotori o vasodilatatori muscolari.

4.5.2.2.2. Terminazioni peri-cellulari

Studi ultrastrutturali sull'organizzazione sinaptica dei gangli simpatici hanno concluso che le sinapsi asso-dendritiche sono più comuni di quelle asso-somatiche (Matthews 1983/1983).

Quest'osservazione porta a concludere che le sinapsi siano preferenzialmente distribuite sui dendriti piuttosto che sul corpo cellulare (Forehand 1985). Abbiamo notato una distribuzione disordinata di varicosità pericellulari attorno a gruppi di neuroni. Le aree che contengono un gran numero di bottoni terminali sono probabilmente quelle che contengono un molti dendriti (Gibbins et al. 1998, 2003a). Il numero di bottoni terminali in un area risulta, inoltre, altamente correlata con la relativa quantità di dendriti nella stessa area (Gibbins et al. 2003a; Anderson et al. 2001, 2002).

Esistono molte sorgenti potenziali di input sinaptici per i neuroni prevertebrali, inclusi i neuroni preganglionici sinaptici, i neuroni sensitivi, i neuroni enterici. Il modo in cui questi input sinaptici governano il controllo nervoso della ICJ (muscolatura, vasi, ENS) dipende dall'origine e dalle caratteristiche neurochimiche dell'input. Nei gangli simpatici queste relazioni non sono ancora completamente chiare. Due tipi di neuroni sensitivi innervano i gangli simpatici prevertebrali: i nervi sensitivi primari, con i loro corpi cellulari siti nei DRG ed i neuroni sensitivi enterici (neuroni intestinofugali, IFANs), con i loro corpi cellulari confinati al MP nei piccoli mammiferi, quali ratto, topo e cavia (Lindh et al., 1988; Zheng et al., 1999; Furness 2006), ed al MP e SMP nei grandi mammiferi, ad esempio il maiale (Barbiers et al., 1993; Timmermans et al., 1993). I neuroni IFANs, che controllano ampiamente i riflessi simpatici ed entero-enterici, dimostrando così l'esistenza di proiezioni sui o attraverso i gangli prevertebrali, potrebbero presentare una morfologia Dogiel di tipo I o II; queste cellule sono colinergiche (Szurszewski e Miller, 1994; Mann et al., 1995) ed è stato dimostrato che potrebbe co-esprimere NOS-, *bombesin*-, *vasoactive intestinal peptide*-, CCK- ed *enkephalin*-IR nella cavia (Furness e Anderson, 1993) e NOS-IR nel ratto (Domoto et al., 1995). I IFANs non sono mai stati oggetto di studio nel cavallo; tuttavia non possiamo escludere (per analogia con altre specie) che una piccola quantità, nel gran numero di neuroni colinergici del MP nell'ileo di cavallo in grado di co-esprimere anche NOS-IR (Chiocchetti et al. 2008 Eq Vet J) o VIP-IR, possa essere neuroni intestinofugali.

Entrambe queste categorie di neuroni sensitivi, quando attivati dalla distensione intestinale, producono potenziali sinaptici in sottopopolazioni dei neuroni dei gangli sinaptici (Kreulen et al., 1986) e partecipano attraverso i gangli nei "riflessi periferici" (Keef e Kreulen, 1988; 1990; Szurszewski, 1981). I neuroni nei gangli prevertebrali che ricevono connessioni dai neuroni enterici hanno funzione di inibizione della secrezione e della motilità (Costa e Furness, 1984). I corpi cellulari dei neuroni deputati alla vasocostrizione non ricevono input dall'intestino (Furness 2006). Solamente i neuroni che proiettano ai gangli enterici o alla muscolatura liscia dovrebbero, infatti, ricevere input sinaptici dai neuroni intestinofugali. Questa rappresenta un'altra spiegazione in grado di giustificare la distribuzione disordinata dei varicosità pericellulari nei gangli. È probabile che i grandi e multidendritici neuroni marcati FB ricevano input intestinofugali; nel ganglio simpatico

prevertebrale della cavia è stato dimostrato che neuroni con input intestinofugali possiedono aree di proiezione dendritica tre volte superiori rispetto ai neuroni che ricevono solamente input spinali preganglionici (Boyd et al. 1996; Anderson et al. 2001). Sembra che gli input intestinofugali sui neuroni prevertebrali formino sinapsi asso-dendritiche prossime alle quelle formate dagli input preganglionici (Gibbins et al. 2003).

In aggiunta agli input preganglionici ed intestinofugali, i gangli prevertebrali ricevono proiezioni collaterali da neuroni sensitivi senza guaina mielinica contenenti SP (Kondo e Yui 1981; Matthews e Cuello 1984; Masuko e Chiba 1988) e CGRP (Lee et al., 1987; Lindh et al., 1988). Questi neuroni sono attivati da stimolazioni dolorifiche e da infiammazione del GIT e generano lenti potenziali di attivazione in neuroni prevertebrali soprattutto tramite l'azione della sostanza P sui recettori NK1. L'immunoistochimica al microscopio ottico ha, tuttavia, recentemente rivelato che la maggior parte delle terminazioni dei neuroni sensitivi contenenti la sostanza P non contiene le proteine normalmente reputate necessarie al rilascio di neurotrasmettitori (Morris et al. 2005). Questo può significare che la maggioranza dei neuroni sensitivi collaterali non forma sinapsi con neuroni simpatici prevertebrali. Senza dubbio la maggior parte di queste fibre non sembra essere strettamente associata alla superficie dei neuroni simpatici (Messenger et al. 1999; Jobling et al. 2001). Considerando che i neuroni preganglionici simpatici non esprimono CGRP-IR, che il grande splancnico contiene fibre CGRP-IR e che i neuroni dei DRG innervano la ICJ, possiamo supporre che, sebbene i nostri risultati non si basino su evidenza ultrastrutturale, anche nel cavallo i neuroni gangliari sensitivi CGRP-IR, potrebbero regolare direttamente l'attività nel tratto terminale dell'ileo ed in particolare nella ICJ. Non possiamo, tuttavia, escludere che i neuroni CGRP-IR nel CMG di cavallo possano inviare processi al CG e/o CaudMG. Non possiamo, inoltre, escludere che i neuroni intestinofugali di cavallo siano in grado di proiettare fibre CGRP-IR (o nNOS-IR) ai gangli simpatici prevertebrali, dal momento che la CGRP-IR è stata già riscontrata negli neuroni intestinofugali del MP nel grosso intestino di cane (Li e Masuko, 1997). Le cellule intestinofugali che proiettano terminazioni nervose nei gangli prevertebrali (Furness 2003), potrebbero anche giocare, nel cavallo, un ruolo fondamentale negli schemi dei riflessi e entero-enterici. Le fibre SP-IR sono state anche osservate nei gangli simpatici; alcuni studi (Matthew e Cuello, 1982) hanno descritto le fibre SP-IR varicose e le sinapsi in contatto con i neuroni dei gangli simpatici nella cavia e suggerito che queste fibre possano prendere parte al meccanismo di controllo dei riflessi nei visceri, indipendentemente dal sistema nervoso centrale. Nel nostro studio è stata confermata un'intensa rete di fibre SP-IR varicose anche attorno ai neuroni IML preganglionici simpatici. Sono stati tuttavia osservati pochi bottoni terminali SP-IR attorno ai neuroni marcati FB. Ad ogni modo, sebbene in piccole proporzioni rispetto alle varicosità pericellulari CGRP-IR, quest'ultima

osservazione, assieme al rinvenimento di neuroni marcati FB dei DRG e fibre SP-IR nei gangli simpatici, sembra sostenere anche quanto riportato da (Rothstein et al. 1990) nel gatto; questi Autori hanno dimostrato che fibre SP-IR sensitive ed efferenti simpatiche prendono parte al meccanismo riflesso di controllo della chiusura dello sfintere ileo-ciecale nel gatto a seguito della distensione del colon e che questi riflessi sono coordinati a livello del midollo spinale. I nostri risultati ci portano a credere che i riflessi viscerali, innescando un'attivazione simpatica possano svilupparsi almeno su due livelli, come ad esempio sui gangli simpatici e sul midollo spinale. Dovremmo anche considerare che il controllo della motilità della ICJ del cavallo possa originare da riflessi assonici, ad esempio da rami intra murali collaterali di fibre sensitive periferiche dei DRG che originino riflessi nell'ansa intestinale. Esiste, infatti, prova che le fibre afferenti dei DRG partecipino nella regolazione locale della circolazione, secrezione, motilità, emostasi e riparazione della mucosa del GIT (Holzer 2007). Sono state osservate anche piccole matasse di fibre CCK-IR nel grande nervo splancnico (ed anche nel corno dorsale del midollo spinale). L'assenza di fibre CCK-IR nella parete ileale ed attorno alle cellule simpatiche marcate FB, ci rende dubbiosi che l'informazione sensitiva del GIT possa viaggiare attraverso fibre CCK-IR.

Le fibre nNOS-IR a livello del CG, CMG, e CaudMG sembrano avere una doppia origine: la nNOS-IR di neuroni simpatici preganglionici spiega la natura preganglionica dei contatti nNOS-IR sui neuroni marcati FB del CG; la presenza di nNOS-IR nei neuroni marcati FB dei DRG suggerisce che anche l'informazione sensitiva potrebbe essere implicata nei contatti e nella modulazione dei riflessi autonomi. Non sappiamo se il MP dell'ileo di cavallo possa originare neuroni intestinofugali nNOS-IR come osservato nel CG di ratto da Quinson (Quinson et al. 2001).

4.5.2.2.3. Midollo spinale

I motoneuroni simpatici finali ricevono solamente input sinaptici eccitatori dai neuroni preganglionici localizzati nel midollo spinale. Il neurotrasmettitore sinaptico utilizzato da tutti gli input preganglionici e che agisce sui recettori nicotinici è l'acetilcolina. Un'ampia gamma di potenziali co-trasmettitori, tuttavia, tra cui neuropeptidi ed ossido nitrico, sembrano poter essere rilasciati da diverse popolazioni di neuroni preganglionici. Nel nostro studio abbiamo osservato diversi neuroni IML NOS-IR, come già osservato in altre specie (Okamura et al. 1995). I neuroni IML sono circondati da varicosità pericellulari di diversa origine. Alcuni Autori (Gibson et al. 1984) hanno osservato nel midollo spinale delle fibre CGRP-IR, in stretta correlazione con le cellule IML, come da noi riscontrato nel midollo spinale a livello toracico e lombare. Anche canestri pericellulari SP-IR, osservati in gran numero attorno alle cellule simpatiche

preganglioniche, sono stati osservati in altre specie, ad esempio la cavia (Davidoff et al., 1986). Si pensa che alcune fibre dei DRG possano rappresentare afferenze primarie sensitive o viscerali.

Neuroni e fibre CGRP-IR sono già state osservate nel midollo spinale del cavallo, soprattutto nelle *lamina I* e *II* (Gibson et al., 1984), che contengono interneuroni che rispondono sia a stimoli di dolore (meccanici e termici) che a stimoli innocui (Willis e Coggeshall, 1978). Non abbiamo osservato motoneuroni CGRP-IR nella *lamina IX*, al contrario di quanto riportato in altri studi (Gibson et al. 1984; Merighi et al. 1990).

4.5.2.2.4. Gangli delle radici dorsali

Sappiamo che nel cavallo sottopopolazioni di neuroni dei DRG co-esprimono CGRP- e SP-IR (Gibson et al., 1984; Merighi et al. 1990). CGRP è presente in un gran numero di piccole cellule nei DRG dai quali originano fibre C e A δ e che sono responsabili della trasmissione degli stimoli dolorifici (Cervero e Iggo, 1980). CGRP rilasciato dai neuroni primari afferenti può aumentare l'eccitabilità in alcuni neuroni del corno dorsale spinale, probabilmente potenziando il rilascio di SP o gli effetti del SP rilasciato (Oku et al. 1987), contribuendo quindi alla sensibilizzazione dei percorsi nocicettivi centrali. Poiché abbiamo osservato l'ampia co-espressione di CGRP e SP nei neuroni dei DRG che innervano la ICJ nel cavallo, possiamo ipotizzare che questi due peptidi neuroattivi possano essere coinvolti in modo putativo nella nocicezione. CGRP-IR è già stata osservata nei neuroni dei DRG che innervano l'ileo nella pecora (Chiocchetti et al. 2006).

È stato dimostrato che il CGRP rilasciato dalle terminazioni periferiche dei neuroni dei DRG contribuisce alla risposta infiammatoria locale causando vasodilatazione locale ed aumentando la filtrazione plasmatica indotta dalla SP (Gamse et al. 1985). Alcuni Autori hanno osservato che le fibre afferenti dei DRG partecipano nella regolazione locale della circolazione del GIT (Holzer 2007). Poiché la ICJ del cavallo appare come un sistema angio-muscolare, la presenza di neuroni marcati FB SP⁺/CGRP⁺ dei DRG può suggerire un ruolo per il peptide TK (tachichinina) nella regolazione della microcircolazione della ICJ. In altre specie è stato osservato che il tono vascolare del GIT può essere bilanciato tra l'innervazione simpatica estrinseca e quella intrinseca colinergica (Vanner e Surprenant 1996; Li et al. 1998; Lomax et al. 2007).

I risultati di questo studio possono suggerire un ruolo nel controllo del tono vascolare del GIT del cavallo anche per i processi periferici dei neuroni SP- e CGRP-IR dei DRG.

La NOS-IR nei neuroni dei DRG che innervano l'ileo è già stata osservata nella pecora (Lalatta et al. 2007). È stato dimostrato che la CCK induce una contrazione nella muscolatura liscia dell'ileo nel maiale tramite un effetto miogenico diretto che dipende dall'interazione del peptide con diversi

recettori (Botella et al. 1992). Tra i pochi neuroni dei DRG marcati in modo retrogrado non abbiamo riscontrato CCK-IR; l'assenza, inoltre, di fibre CCK-IR nel ileo ed attorno ai neuroni prevertebrali simpatici marcati FB ci porta ad escludere che l'informazione sensitiva originata dalla ICJ non possa propagarsi attraverso percorsi CCK-IR.

4.5.2.2.5. Ileo

L'osservazione nelle criosezioni della presenza di una ricca rete di fibre TH-IR in tutti gli strati della parete ileale, suggerisce che il sistema simpatico influenzi intensamente le funzioni del GIT. Questa ipotesi è rinforzata anche dall'osservazione di reti di fibre TH-IR nelle preparazioni wholemout del MP del cavallo o anche di altre specie quali il ratto (Phillips et al. 2006) o la pecora (Chiocchetti et al., 2006). La scarsità di fibre simpatiche a livello degli strati muscolari e la presenza di canestri pericellulari attorno ai neuroni marcati FB del MP e del SMP (1 F MP, G SMP), suggerisce che, anche nel intestino di cavallo, l'inibizione adrenergica della motilità del piccolo intestino possa essere dovuta all'inibizione delle cellule ganglioniche attraverso il rilascio di noradrenalina da parte delle terminazioni nervose simpatiche circostanti. Le fibre TH-IR dovrebbero inibire la stimolazione simpatica del muscolo, come suggerito da esperimenti eseguiti sul GIT di gatto (Kewenter 1965; Jansson e Martinson 1966) e di cavia (Beani et al. 1969; Paton e Vizi 1969); questi risultati potrebbero, tuttavia, essere confermati solamente dalla presenza di specifici adrenocettori su neuroni marcati FB (ed FB negativi). Questa ipotesi è rafforzata dall'osservazione di fibre TH-IR attorno ad alcuni neuroni colinergici marcati FB. Varicosità pericellulari TH-IR, inoltre, sono state osservate anche attorno a neuroni nitregici marcati FB che nascondono adrenocettori nel MP del cavallo ed anche del ratto (Nishizaki et al 2003). Dai risultati del nostro studio sembra chiaro che le fibre ileali TH-IR possano avere una origine solamente estrinseca, dalla catena di gangli simpatici e da tutti i gangli prevertebrali.

Per quanto concerne i fenotipi delle fibre osservate, non possiamo distinguere tra le fibre sensitive dei DRG e le fibre intrinseche, dal momento che i neuroni del MP e del SMP che includono anche i IPANs, esprimono CGRP- (solamente SMP), SP-, NF-, e NOS-IR.

L'osservazione di fibre TH-IR attorno ad una grande percentuale di neuroni del SMP indica anche che il sistema simpatico agisce anche su neuroni secreto-vaso-motori. I riflessi secretomotori sono regolati in accordo con l'omeostasi di tutto il contenuto di acqua ed elettroliti, tramite il controllo di neuroni simpatici che abbassano l'eccitabilità dei neuroni secretomotori (Bornstein e Furness, 1988; Furness et al., 1989). Sono state osservate fibre NPY- e TH-IR perivascolari ed anche fibre perineuronali TH-IR e NPY-negative. I nostri risultati potrebbero essere confrontati con quelli

condotti da Furness (Furness 1983) e Costa e Furness (Costa e Furness 1984), che hanno dimostrato che differenti sottogruppi di neuroni non adrenergici del CG e CMG della cavia interessano separatamente i componenti dei tessuti della parete ileale.

Gli Autori hanno osservato che i principali bersagli dei neuroni TH^+/NPY^+ sono i vasi sanguigni, mentre quelli $TH^+/NPY^-/SOM^+$ proiettano sulla mucosa e sui neuroni del SMP ed infine che i neuroni $TH^+/NPY^-/SOM^-$ proiettano sul MP. Sembra così che questo gruppo di neuroni abbia proprietà funzionali differenti. Più recentemente altri Autori (De Fontgalland et al. 2008) hanno osservato fibre TH^+/NPY^+ lungo vasi del SMP nell'uomo, pur riscontrando raramente SOM-IR nelle fibre TH-IR del SMP. Appare chiaro che la comparazione dei risultati ottenuti da specie differenti è spesso difficile.

5. IMPLICAZIONI CHIRURGICHE

Per quanto esposto precedentemente nella trattazione del nostro studio sperimentale, dal punto di vista chirurgico la maggior comprensione della neurofisiologia della motilità ileo-ciecale ed in particolare l'osservazione di neuroni intramurali deputati al controllo della ICJ, localizzati anche a lunga distanza da quest'ultima (sino a 48 cm per i neuroni del MP), implica che, in corso di resezione chirurgica del piccolo intestino, è preferibile, quando possibile, conservare quanto meno l'ultima porzione di ileo, così da evitare problemi al transito di materiale dall'ileo al cieco e prevenire reflusso gassoso dal cieco all'ileo.

La nostra affermazione è, inoltre, in accordo alle considerazioni di Roger e Malbert (1989) in merito alle caratteristiche anatomo funzionali della giunzione ileo-ciecale ed alle conclusioni di Ross et al (1990) a seguito di uno studio dell'attività mioelettrica dell'ileo, cieco e colon ventrale destro, e trova solide conferme statistiche negli studi di Freeman et al (2000), Bladon e Hillyer (2000) e Pankowski (1987).

In questo capitolo verranno riassunte le principali patologie chirurgiche in grado di originare una compromissione vascolare della parete ileale tale da rendere necessaria la resezione del tratto intestinale coinvolto e la conseguente anastomosi.

5.1. OSTRUZIONI SEMPLICI ILEALI

Le ostruzioni semplici coinvolgono il lume intestinale senza un coinvolgimento vascolare. Se l'ostruzione è completa, i liquidi e i solidi ingeriti, le secrezioni intestinali e i gas si accumulano in quantità eccessive. La parte di intestino prossimale all'ostruzione si distende mentre la parte distale collassa (Clarke et al, 1990a; Clarke et al, 1990b). Le normali funzioni secretiva e di assorbimento della mucosa sono ridotte e la parete intestinale diventa edematosa e congesta. La distensione intestinale grave si autoperpetua e progredisce aumentando la peristalsi e lo sconvolgimento secretorio o il rischio di disidratazione, ischemia, necrosi, perforazione, peritonite e morte (Dabareiner et al, 1993; Allen et al, 1988).

White e Lessard (1986) hanno osservato che solo il 3% dei cavalli oggetto di studio presentati al loro ospedale presentava ostruzione semplice ileale (White e Lessard, 1986). Si ritiene che questa patologia dell'ileo possa originare da poche cause note e che in alcune aree geografiche la sua prevalenza possa aumentare (Hanson et al, 1996; Hanson et al, 1998).

5.1.1. OSTRUZIONI DA ASCARIDI

Tra le cause più frequenti le costipazioni causate da ascaridi colpiscono in genere puledri di età inferiore ai sei mesi che non siano stati sottoposti ad un attento programma di sverminazione. La costipazione può essere causata dall'accumulo di parassiti morti in seguito ad utilizzo di prodotti quali piperazina, organo fosfati e parante pamoato. In particolare gli ascaridi possono causare costipazioni di grossa entità a causa delle grandi dimensioni del parassita adulto (Clayton, 1986).

5.1.2. COSTIPAZIONI ILEALI

Massive infestazioni parassitarie o bruschi cambi alimentari possono rappresentare causa di costipazioni ileali anche nel cavallo adulto, dove l'80% dei casi di ostruzione è stato associato ad infestazioni da parte di cestodi (Proudman et al, 1998). La diagnosi in genere è effettuata in sede chirurgica, anche se occasionalmente l'ileo costipato può essere palpato per via rettale in corso di esplorazione rettale. Le costipazioni ileali possono essere trattate con terapia medica tramite la somministrazione di grosse quantità di fluidi (Hanson et al, 1996), ma nella maggior parte dei casi è necessaria la correzione chirurgica per ripristinare il transito intestinale. È noto che, a causa dell'imponente distensione della parete del piccolo intestino e delle manipolazioni intra operatorie dell'ileo, la terapia chirurgica può portare ad ileo post operatorio (*Post Operative Ileus*, POI)

(Blikslager et al, 1995), anche se recenti studi indicano che questa complicazione risulta meno frequente quanto più repentine sono la diagnosi e l'intervento (Hanson et al, 1998). La prognosi in questi casi è generalmente favorevole (Hanson et al, 1998; Hanson et al, 1996).

5.1.3. IPERTROFIA DELL'ILEO

L'ipertrofia dell'ileo è una patologia nella quale gli strati muscolari (circolare e longitudinale) diventano ipertrofici per ragioni sconosciute (idiopatico) o a seguito di ostruzioni incomplete o funzionali (secondario).

Tra le cause idiopatiche si ipotizza una disfunzione nervosa parasimpatica che risulti in un aumento cronico del tono muscolare ed una conseguente ipertrofia degli strati muscolari della parete ileale. È possibile che una disfunzione neuronale possa derivare da migrazioni parassitarie. Altre ipotesi includono aumenti cronici del tono muscolare della valvola ileo-ciecale, che possa condurre l'ileo ad una ipertrofia muscolare come conseguenza di una parziale occlusione della valvola ileo-ciecale. Anche il digiuno può essere affetto da ipertrofia, anche in concomitanza di ipertrofia ileale.

I sintomi clinici includono sindrome colica cronica intermittente conseguente all'ipertrofia della parete ileale ed alla diminuzione graduale del diametro del lume intestinale. In uno studio sono state osservate anoressia e perdita cronica di peso (nell'arco di 6 mesi) nel 45% dei soggetti, per lo più a causa degli episodi di colica intermittente e della riduzione dell'appetito. Poiché l'ipertrofia non colpisce anche la mucosa dell'ileo, non sussistono ragioni per credere che i soggetti affetti da questa patologia manifestino in concomitanza patologie da malassorbimento. La diagnosi è di norma effettuata in sede chirurgica, anche se in alcuni casi è possibile avvertire la parete ipertrofica dell'ileo durante l'esplorazione rettale. La risoluzione implica un'anastomosi ileo-ciecale o digiuno-ciecale finalizzata al bypass dell'ileo ipertrofico. Qualora il bypass chirurgico non venga effettuato, la sintomatologia colica intermittente persiste e la parete ispessita dell'ileo può infine giungere a rottura. In questi casi la prognosi è favorevole per il trattamento chirurgico (Chaffin et al, 1992; Edwards, 1981).

L'ipertrofia ileale secondaria si può frequentemente riscontrare in cavalli sottoposti a chirurgia addominale che possano presentare una parziale ostruzione meccanica o funzionale sul sito di anastomosi. È stato riportato un caso di ipertrofia dell'ileo a seguito di correzione chirurgica di una intussuscezione ileo-ciecale (Mair e Lucke, 2000). Ipertrofia del ileo è stata riscontrata anche in un cavallo nel quale una costipazione ciecale era stata risolta con una anastomosi ileo-colica non orientata correttamente (Gerard et al, 1996). La terapia chirurgica è in genere rivolta alla

identificazione della causa di ostruzione del piccolo intestino e alla conseguente resezione della porzione di intestino ipertrofica.

5.1.4. ADERENZE

Le aderenze tra le pareti di diversi segmenti di anse intestinali si manifestano, in genere, a seguito di interventi chirurgici e possono risultare clinicamente silenti, causare parziali ostruzioni e conseguenti coliche croniche ricorrenti o risultare in forme di ostruzione completa con evidente sindrome colica acuta.

Diversi tipi di aderenze possono causare differente sintomatologia clinica. Un'aderenza fibrosa, ad esempio, che non causa un'ostruzione del lume intestinale, può rappresentare un perno per un volvolo, mentre un'aderenza fra segmenti adiacenti della parete intestinale può creare un inginocchiamento in grado di originare una parziale ostruzione cronica (Baxter et al, 1989).

La quantità di aderenze che si può sviluppare può variare molto da soggetto a soggetto. Alcuni cavalli possono sviluppare una singola aderenza adiacente al sito di anastomosi o al segmento di parete intestinale patologico, altri soggetti, invece, possono sviluppare aderenze multiple coinvolgendo diversi tratti di intestino, come ad esempio può accadere in pazienti che presentino infiammazione del peritoneo al momento della prima chirurgia.

Alcuni Autori riportano che i cavalli maggiormente a rischio di sviluppare aderenze in seguito a chirurgia sembrano essere quelli che presentano patologie del piccolo intestino (Baxter et al, 1989; Phillips e Walmsley, 1993). Uno studio riporta che il 22% dei soggetti sottoposti a correzione chirurgica di ostruzione del piccolo intestino presentava lesioni associate ad aderenze. A prescindere dalla tipo di chirurgia addominale, i puledri sembrano avere una incidenza maggiore di aderenze rispetto agli soggetti adulti. (Baxter et al, 1989)

Esistono pareri contrastanti su quanto l'entità della correzione chirurgica possa influenzare la formazione di aderenze (Baxter et al, 1989), in uno studio è stato riportato che i soggetti che richiedono enterotomia o resezione ed anastomosi sviluppano più frequentemente aderenze (Phillips e Walmsley, 1993). Le aderenze sono considerate i motivi più frequenti per ripetere la laparotomia in pazienti operati per colica (Phillips e Walmsley, 1993; Parker et al, 1989).

La sintomatologia clinica riferita a soggetti con aderenze si esplica in genere in sindromi coliche intermittenti. Uno studio riporta che le sindromi coliche dovute ad aderenze che richiedono una correzione chirurgica a seguito di un primo intervento, generalmente si manifestano nei primi due mesi a seguito del primo intervento. Gli Autori riportano che, in questi casi, la percentuale di sopravvivenza è del 16% (Baxter et al, 1989).

5.2. INFARTO DELLA PARETE INTESTINALE SENZA STRANGOLAMENTO

L'infarto senza strangolamento si verifica più comunemente in seguito ad arteriti mesenteriche causate dalla migrazione di *Strongylus vulgaris*. Si pensa che il vasospasmo giochi un ruolo importante in questa patologia. Ogni segmento intestinale irrorato dalla arteria mesenterica craniale o da una delle sue branche e primarie può risultarne colpita, ma più comunemente risultano coinvolti l'ileo ed il grosso colon. In queste lesioni non si riscontrano delle palesi cause di ostruzione, tuttavia esse presentano delle aree ben delimitate e marcate di degenerazione o necrosi, a seconda dell'estensione dell'occlusione vascolare (McCraw e Slocombe, 1985).

5.3. OSTRUZIONI DA STRANGOLAMENTO

Le ostruzioni da strangolamento risultano da una contemporanea occlusione del lume intestinale e del suo flusso sanguigno. Esempi di questo tipo di ostruzioni possono essere lo strangolamento del piccolo intestino in un volvolo o un'invaginazione, in una ernia interna o attraverso una banda di tessuto anomalo come ad esempio nel linfoma peduncolato. Il danno attribuibile all'occlusione della vascolarizzazione dipende dalla natura dell'occlusione vascolare. Nella maggior parte dei casi nella genesi dello strangolamento le vene si occludono prima delle arterie a causa della loro più sottile ed esile parete. Questo fenomeno causa una disparità nel flusso sanguigno nelle prime fasi dell'ostruzione da strangolamento, in cui si verifica un pompaggio di sangue arterioso nella parete intestinale che, in assenza di deflusso, causa una lesione emorragica chiamata "ostruzione emorragica da strangolamento". Da questo risulta non solo un fenomeno ischemico ma anche una imponente congestione dei tessuti. In alternativa, lo strangolamento può esercitare sufficiente pressione sui vasi venosi ed arteriosi tale da occludere entrambi i flussi simultaneamente, risultando nella così detta ostruzione da strangolamento ischemico. Questa risulta in una rapida degenerazione della mucosa. Clinicamente, questo tipo di ostruzione da strangolamento emorragico o ischemico è più frequente nei cavalli che presentano volvolo del grosso colon (Huskamp, 1982; Tennant, 1975).

5.3.1. VOLVOLO

Si definisce volvolo una rotazione di più di 180° di un tratto intestinale su sé stesso ed attorno al mesentere. Nell'ileo un volvolo può svilupparsi da un'ectopia primaria o secondariamente ad una lesione preesistente, come ad esempio il diverticolo di Meckel, un'anomalia congenita dovuta alla presenza di un residuo del dotto onfalomesenterico che si organizza come un diverticolo, un sacco a fondo cieco a livello ileale, o anche ad una distensione della parete o ad aderenze. La presenza di un volvolo comporta una occlusione intestinale e una necrosi ischemica dell'organo per strozzamento dei vasi sanguigni contenuti nel suo mesentere (Stephen et al, 2004). Un volvolo primario può colpire cavalli di ogni età, ma rappresenta la causa più comune di chirurgia addominale nel puledro (Vatistas et al, 1996; Crowhurst et al, 1975). Nella forma più comune di volvolo, il mesentere ruota l'intestino in spirali ben distinte. Meno frequentemente è possibile osservare anche forme di volvolo nodoso, formato da ileo e digiuno sottoposti ad una torsione di 360° che forma una tasca nel mesentere nella quale si intrappola il digiuno prestenotico. La distensione dell'ansa di intestino intrappolata trascina l'ileo nella tasca del mesentere che si attorciglia formando un nodo che intrappola le anse intestinali. Il volvolo nodoso colpisce in genere

i puledri da due a sette mesi di età (Huskamp e Toth, 1998). La terapia chirurgica è mirata a alla riduzione manuale del volvolo seguita da resezione ed anastomosi delle anse intestinali (Stephen et al, 2004).

5.3.2. INTRAPPOLAMENTO NEL FORAME EPIPLOICO

Il forame epiploico, o forame di Winslow, è un'apertura di 4-10 cm della cavità peritoneale che la mette in comunicazione con la borsa omentale.

Il forame è circondato dorsalmente dal processo caudato del fegato e dalla vena cava caudale e ventralmente dal lobo destro del pancreas e dalla vena porta. Il forame è limitato cranialmente dal legamento epato-duodenale e caudalmente dalla giunzione fra il pancreas ed il meso-duodeno.

Qualsiasi porzione del digiuno o dell'ileo può essere incarcerata nel forame, ma sembra che siano coinvolti con maggior frequenza l'ultimo tratto del digiuno e l'ileo (Vachon e Fisher, 1995; Vasey, 1988). La lunghezza del tratto intestinale incarcerato può variare da 8 cm a 18 metri (Vachon e Fisher, 1995; Scheidemann, 1989; Vasey, 1988; Engelbert et al, 1993). Generalmente si riesce a ridurre l'ernia con una delicata trazione, ma qualora sia presente edema intestinale eccessivo può essere necessario resecare il tratto colpito prima della riduzione. Spesso si rende necessaria la resezione del tratto intestinale con successiva digiuno-digiunostomia o digiuno-ciecostomia (Archer et al, 2004). La prognosi è riservata, ma varia a seconda della lunghezza del tratto di intestino coinvolto e della precocità dell'intervento chirurgico. È stata riportata una mortalità del 85% per l'ernia nel forame epiploico nel cavallo (Proudman et al, 2002).

5.3.3. LIPOMA PEDUNCOLATO

Il lipoma peduncolato è un tumore benigno delle cellule adipose che presenta una superficie liscia ed è sospeso da un sottile peduncolo mesenteriale di variabile lunghezza.

Può presentarsi come tumore solitario, ma è anche possibile osservarne diversi nello stesso soggetto, con una prevalenza del 90% nel piccolo intestino. In genere i lipomi si osservano localizzati vicino alla radice del mesentere e sono in grado di causare ostruzioni da strangolamento quando il peduncolo si attorciglia attorno ad un'ansa intestinale ed al relativo mesentere (Edwards e Proudman, 1994). La correzione chirurgica impone la resezione del peduncolo del lipoma e qualora l'ansa intestinale presenti evidente stato di congestione o infarto, anche la resezione del tratto intestinale con conseguente anastomosi (Edwards e Proudman, 1994; Jansson, 2000). È stata

riscontrata una significativa associazione tra lo strangolamento provocato da lipoma ed ileo post operatorio. In questi casi la prognosi varia dal 48% al 78,6% (Edwards e Proudman, 1994).

5.3.4. INTUSSUSCEZIONI

Un'intussuscezione è un processo patologico dell'ansa intestinale in cui un tratto di ansa intestinale prossimale si invagina dentro l'ansa intestinale distale adiacente in senso aborale. La causa scatenante per questi processi patologici non è sempre chiara, ma si pensa possano essere coinvolte lesioni della parete intestinale dalle quali origina poi l'intussuscezione, ad esempio piccole masse, corpi estranei o parassiti (soprattutto *Anoplocephala Perfoliata*) (Edwards, 1986).

Nel cavallo l'intussuscezione più frequente è quella ileo-ciecale, che colpisce generalmente gli animali più giovani. In uno studio che ha preso in considerazione 26 casi di intussuscezione ileo-ciecale, l'età media degli soggetti che hanno presentato questa complicazione è risultata 1 anno di vita. Nei casi acuti di intussuscezione ileo-ciecale nel cavallo, la sindrome colica ha una durata inferiore alle 24 ore e riguarda segmenti intestinali di lunghezza variabile tra 6 e 457 cm di lunghezza. Nei casi acuti il tratto di ileo colpito presenta una vascolarizzazione compromessa. Le forme di intussuscezione ileo-ciecale croniche coinvolgono generalmente tratti di ileo più corti (sino a 10 cm di lunghezza) e la vascolarizzazione ileale è in genere conservata (Ford et al, 1990).

L'analisi del liquido ottenuto da una centesi addominale può portare dei risultati variabili e non del tutto attendibili, in quanto, essendo il tratto di intestino strangolato contenuto nel tratto di intestino adiacente, l'eventuale filtrazione di cellule, proteine e lattati utili ad effettuare una diagnosi può rimanere del tutto o in parte confinata nella tasca parietale neo formata. Le ostruzioni del piccolo intestino sono spesso diagnosticate grazie all'ottenimento di reflusso naso gastrico e la palpazione di diverse anse di piccolo intestino distese durante l'esplorazione rettale. I cavalli colpiti da forme croniche di intussuscezione ileo-ciecale presentano coliche intermittenti e moderate, spesso senza mostrare segni di ostruzione del piccolo intestino. Alcuni autori riportano il rinvenimento, in corso di esplorazione rettale, di una massa palpata nella regione della base del cieco nel 50% dei soggetti esaminati (Edwards, 1986).

Sebbene nei casi di intussuscezione duodeno-digiunale, ileo-ileale, cieco-ciecale e cieco-colica, l'ecografia possa rappresentare un buon ausilio diagnostico capace di mostrare, nelle sezioni trasversali, il tipico aspetto "a ciambella" della lesione, dove la parte centrale corrisponde alla porzione di intestino intussuscitato che risulta avvolto da un'ansa ispessita ed edematosa (Bernard et al, 1989), nei casi di intussuscezione ileo-ciecale la visualizzazione dell'immagine ecografica dell'ansa coinvolta può risultare difficile o addirittura impedita dal gas prodotto dalle fermentazioni

presente alla base del cieco, così che risulti possibile osservare solamente l'ansa prestenotica del piccolo intestino (McGladdery, 1992; Klohnen et al, 1996; Reef, 1998; Lester et al, 1998; Edwards, 1986; Mason et al, 1970; Greet et al, 1992; Scott e Todhunter, 1985).



FIG. 5.3.4.A Papilla ilealis con ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA.



FIG. 5.3.4.B Papilla ilealis con ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA.

5.4. IMPLICAZIONI CHIRURGICHE IN CASO DI COINVOLGIMENTO DI ILEO ED ICJ IN RESEZIONE E CONSEGUENTE ANASTOMOSI.

In base a quanto precedentemente esposto, appare chiara l'importanza di una diagnosi precoce e di un tempestivo intervento nei casi di congestione acuta o infarto della parete del piccolo intestino.

In questi casi la tecnica chirurgica prevede la resezione del tratto intestinale coinvolto e la successiva anastomosi.

Lesioni da strangolamento del piccolo intestino possono essere osservate anche legate ad eventi di varia natura, ad esempio lo strangolamento in una torsione uterina, l'incarcerazione ed il conseguente strozzamento attraverso lacerazioni del mesometrio, del legamento gastrosplenico, del mesentere del piccolo colon, del legamento laterale della vescica urinaria, della piega cieco colica e del mesentere del grosso colon, dal cordone spermatico e da aderenze omentali. È possibile osservare ostruzioni da strangolamento anche a seguito di castrazioni o ischemia e necrosi della parete in concomitanza ad ematomi mesenteriali di natura sconosciuta (Gift et al, 1993; Collier e Trent, 1983; Boulton e Williamson, 1984).

Nella casistica di lesioni da strangolamento che coinvolgono il tratto ileale, pare che la maggiore prevalenza sia da attribuirsi alle lesioni da strangolamento successive ad intussuscezione (Lowe, 1968; Edwards, 1986; Barclay et al, 1982).

Le alterazioni della motilità segmentaria causate da enterite, la massiccia infestazione da ascaridi, l'infestazione causata da vermi piatti (*Anoplocephala Perfoliata*), l'arterite mesenterica, i bruschi cambiamenti della dieta e le aderenze tra anse intestinali rappresentano i più frequenti fattori predisponenti all'intussuscezione ileo-ileale ed ileo-ciecale (Edwards, 1986; Barclay et al, 1982).

Il coinvolgimento dell'ileo in un'intussuscezione può trarre la sua origine anche da lesioni quali enterotomie trasversali (Lowe, 1968), anastomosi latero-laterali (Frankeny, 1995; Semevolos et al, 2002), termino-terminali e masse mucosali peduncolate come papillomi, leiomiomi e granulomi, carcinoidi delle cellule neuroendocrine (Gift et al, 1993; Edwards, 1986; Collier e Trent, 1983; Boulton e Williamson, 1984).

L'intussuscezione ileo-ciecale rappresenta il 74% delle intussuscezioni del piccolo intestino, di cui il 27% si manifesta in forma cronica intermittente (Ford et al, 1990).

Queste forme croniche coinvolgono generalmente tratti abbastanza brevi del piccolo intestino e non risultano complicate da strangolamento, ma da ostruzioni incomplete (Edwards, 1986; Mason et al, 1970; Greet, 1992; Scott e Todhunter, 1985).

Anche le intussuscezioni ileo-ileali causano in genere forme croniche coinvolgendo brevi tratti di intestino, mentre quelle duodeno-digiuneali coinvolgono in genere tratti più lunghi delle anse

intestinali (fino a 9,1 m) e comportano completo strangolamento (Gift et al, 1993; Scott e Todhunter, 1985).

Alcuni autori descrivono il trattamento con successo di intussuscezioni ileo-ileale ed ileo-ciecale tramite semplice riduzione (Mason et al, 1970; Greet, 1992) o tramite riduzione associata a miotomia (Greet, 1992; Scott e Todhunter, 1985; Horney e Funk, 1971).

Le anastomosi digiuno-ciecale ed ileo-ciecale sono indicate quando una porzione di ileo risulta coinvolta in una lesione da strangolamento. In genere queste tecniche vengono impiegate con una frequenza che oscilla tra il 36% ed il 68% nella casistica delle anastomosi intestinali nel cavallo (Morton e Blikslager, 2002; MacDonald et al, 1989).

I tentativi di ridurre manualmente un'intussuscezione durante l'intervento chirurgico sono in genere futili a causa della tumefazione intramurale del tratto di intestino colpito, si rende quindi necessaria la resezione del tratto di digiuno coinvolto e la conseguente anastomosi (Ford et al, 1990).

Alcuni Autori riportano che nei casi di intussuscezione ileo-ciecale acuta il chirurgo dovrebbe tagliare il piccolo intestino il più distalmente possibile ed effettuare un'anastomosi digiuno-ciecale e che in cavalli con intussuscezioni particolarmente lunghe (fino a 10 m) il chirurgo potrebbe tentare una resezione intra-ciecale (Beard et al, 1992).

In cavalli con intussuscezione ileo-ciecale cronica il chirurgo dovrebbe praticare un bypass digiuno-ciecale "incompleto" evitando di recidere il piccolo intestino. La prognosi è favorevole per cavalli con intussuscezione ileo-ciecale cronica e da riservata ad infausta per soggetti con intussuscezione ileo-ciecale acuta, a seconda della lunghezza dell'ansa intestinale coinvolta (Ford et al, 1990).

Anche l'anastomosi ileo-ciecale può comportare un bypass "incompleto", nei casi in cui rimangano dubbi sull'alterazione meccanica o funzionale del segmento interessato o sul rischio di ricorrenza (Ford et al, 1990; Mason, 1970; Greet, 1992; Scott e Todhunter, 1985).

Si pensa che l'anastomosi digiuno-ciecale latero-laterale crei uno sbocco più agevole per il materiale rispetto all'anastomosi termino-terminale e conseguentemente comporti minori complicazioni post operatorie.

Uno studio ha riportato la comparazione delle due tecniche, evidenziando il successo del 83% dei casi di anastomosi digiuno-ciecale latero-laterale contro il 37% dei casi di anastomosi digiuno-ciecale termino-laterale.

Alcuni autori riportano, a riguardo di questa ultima tecnica, un'ampia casistica di complicazioni post operatorie, quali l'inginocchiamento dell'ansa intestinale sull'anastomosi, aderenze, costipazioni, intussuscezioni dell'anastomosi, volvoli o torsioni.

L'anastomosi dovrebbe in ogni caso essere creata il più vicino possibile alla base del cieco, tra la tenia dorsale e quella mediale, per ridurre la trazione esercitata dal peso del contenuto cecale (Blackwell, 1982).

Le complicazioni più comuni nella chirurgia del piccolo intestino del cavallo sono le ostruzioni anastomotiche, le adesioni e l'ileo post operatorio (POI). Le ostruzioni anastomotiche possono essere causate da costipazione, ematoma, strozzamento, eccessivo accorciamento e trazione del mesentere ed eventuali errori nella tecnica chirurgica. La prolungata persistenza di ostruzioni anastomotiche può condurre ad edema post-anastomotico ed alla formazione di adesioni con probabile rischio di volvolo (Freeman et al, 2000).

Statisticamente le anastomosi digiuno-ciecale ed ileo-ciecale sono associate a maggiori complicazioni post-operatorie rispetto all'anastomosi duodenodigiunale (Freeman et al, 2000; Bladon e Hillyer, 2000; Pankowski, 1987).

Si crede che questo sia dovuto al bypass della valvola ileo-ciecale e ad una neoformata netta transizione tra due segmenti intestinali con funzioni molto diverse. Il digiuno si trova, in questo nuovo quadro, a dover vincere le pressioni intracecali per far progredire il materiale, non potendo più usufruire del meccanismo di controllo e coordinazione dell'ileo e della valvola ileo-ciecale (Roger e Malbert, 1989; Ross et al, 1990).

Un altro fattore che contribuisce a complicare questo quadro post operatorio è la presenza di adesioni al moncone ileale devitalizzato ed al mesentere. Bisogna aggiungere, inoltre, che la distensione a cui è sottoposta l'ansa prestenotica, a causa della tumefazione della parete, potrebbe contribuire a ritardare la completa ripresa della funzionalità (Dabareiner et al, 1993; Dabareiner et al, 2001).

INDIRIZZI DELLE AZIENDE DI PRODUZIONE DEI MATERIALI IMPIEGATI

^a *Sigma-Aldrich Chemie*, Steinheim, Germany

^b *Betadine® A.I.C. Meda-pharma SPA*, Milano, Italy

^c *Tanax® Intervet*, Italia.

^d *Cryomold, Sakura® Finetek Europe B.V.* The Netherlands.

^e *Axioplan epifluorescence microscope, Carl Zeiss*, Oberkochen, Germany.

^f *Filter system A, Carl Zeiss*, Oberkochen, Germany.

^g *Filter set 10 for FITC (450-490 nm excitation filter and 515-565 nm emission filter), Carl Zeiss*, Oberkochen, Germany.

^h *Filter set 00 for Alexa 594 (530-585 nm excitation filter and 615 nm emission filter), Carl Zeiss*, Oberkochen, Germany.

ⁱ *DMC, Polaroid Corp*, Cambridge, Mass.

^j *DMC2, Polaroid Corp*, Cambridge, Mass.

^k *Corel photo paint*, Ottawa, ON, Canada.

^l *Corel draw*, Ottawa, ON, Canada.

^m *Sakura Finetek*, Europe, NL.

ⁿ *Roche*, Switzerland.

^o *Fasth PCPM*, Italy.

^p *Pierce*.

^q *Invitrogen*, USA.

^r *Bio-Rad*, Italy.

^t *Dako*, Denmark.

^s *Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.*

PRIMA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELL'ILEO

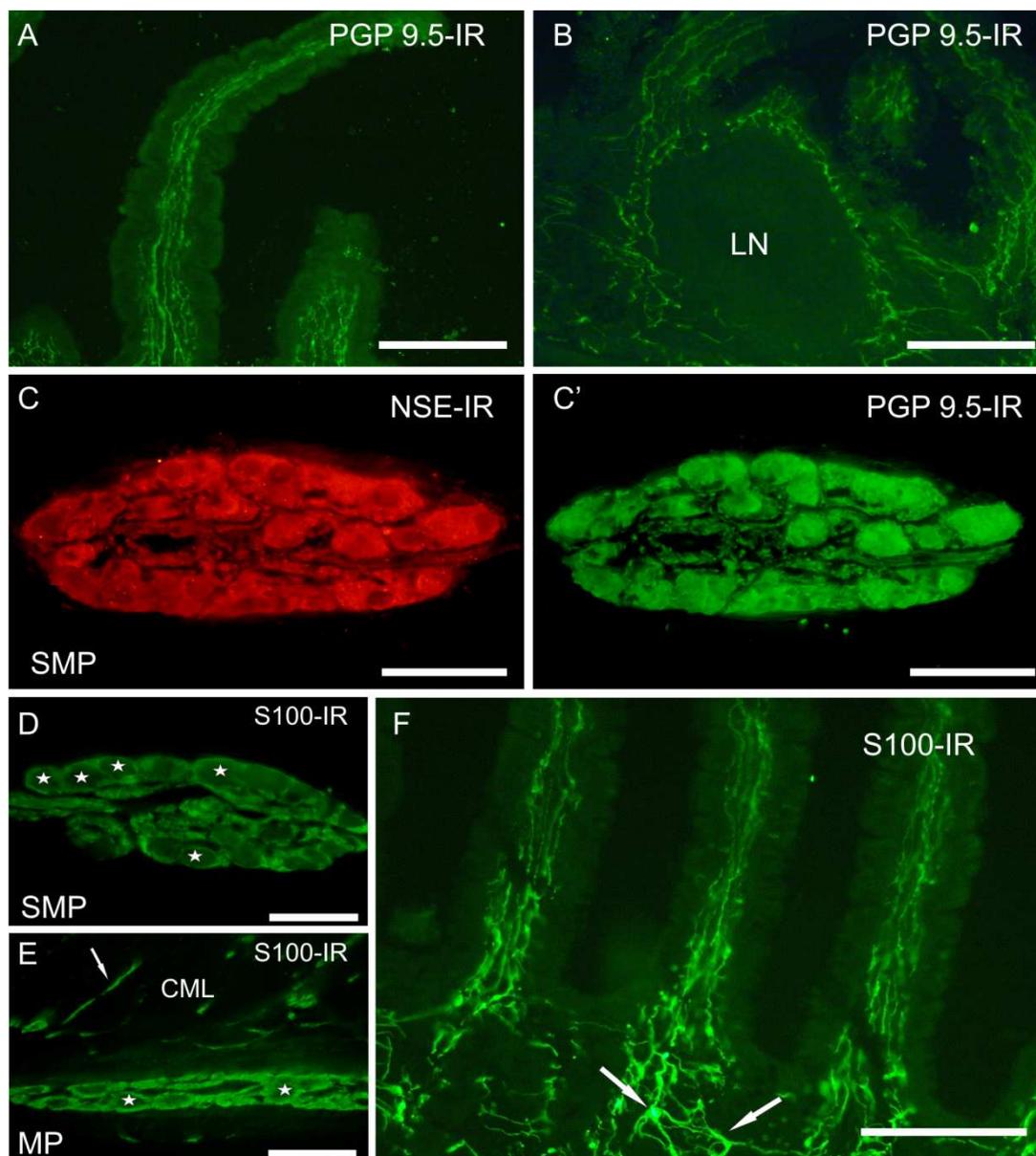


Fig 1 – Innervazione dei villi (A) e di un nodulo linfatico (B) in criosezioni longitudinali della mucosa.

A - Fibre PGP-9.5-IR che si estendono lungo l'asse maggiore dei villi dalla base dell'apice.

B - Fibre PGP-9.5-IR concentrate attorno al nodulo linfatico (LN)

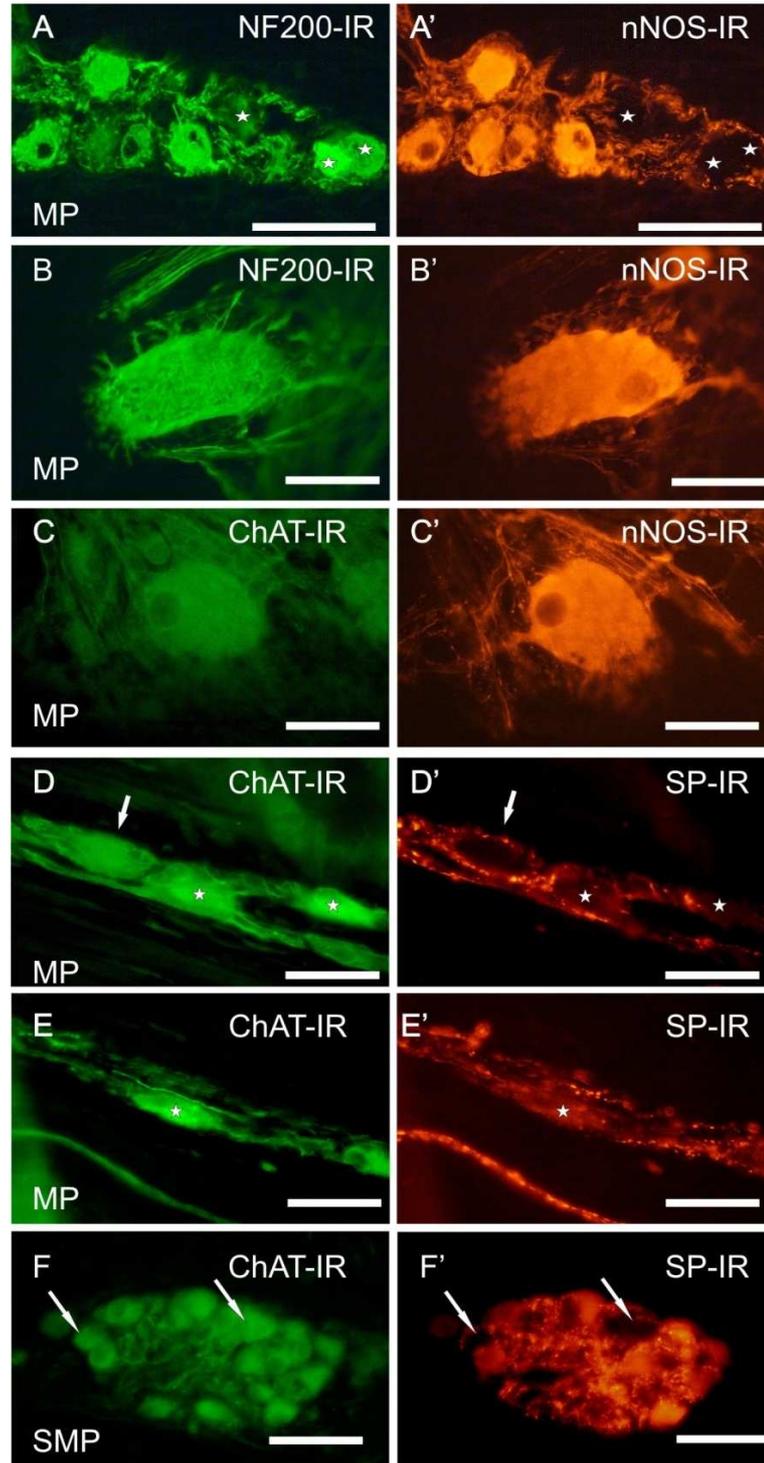
C-C' - Neuroni del SMP marcati simultaneamente per NSE (C) e PGP9.5 (C').

D-F - S100-IR nel plesso sub-mucosale SMP (D), mio-enterico (MP) (E) e mucosa (F).

Le stelle (D-E) mostrano alcuni neuroni S100-negativi avvolti da cellule enterogliai S100-IR e dai loro processi; la freccia (E) un processo S100-IR a livello dello strato muscolare circolare (CML).

F -Tre villi in cui la glia enteric è risultata S100-IR. La glia enterica forma un'estesa rete di cellule nella mucosa intestinale, in stretta vicinanza alle cellule epiteliali intestinali. Da notare le cellule gliali (freccie) alla base dei villi ed i loro processi lungo l'intera estensione dei villi.

Scala (A, B, F) = 200 μ m; Scala (C-E) = 50 μ m

**Fig 2**

A-A' – Neuroni del plesso mioenterico (MP) contemporaneamente marcati per *neurofilament 200kDa* (NF200) (A) e *nitric oxide synthase* (nNOS) (A'). Le stelle indicano 3 neuroni NF200-IR non nNOS-IR. Si noti che i neuroni hanno mostrato una morfologia Dogiel di tipo I, caratterizzata da un profilo irregolare.

B-B' – Criosezione tangenziale in cui un grande neurone del MP co-esprime NF200- (B) e nNOS-IR (B').

C-C' - Criosezione tangenziale in cui un grande neurone del MP ChAT-IR (C) co-esprime nNOS-IR (C').

D-E' - Criosezione longitudinale in cui le stelle indicano gli stessi neuroni del MP fortemente ChAT-IR (D, E) lievemente SP-IR (D', E'); la freccia indica un neurone colinergico intensamente marcato (D) SP-negativo (D').

F-F' – Lo stesso ganglio del SMP ChAT-IR (F) e SP-IR (F'); la freccia indica neuroni ChAT-IR (F), ma non SP-IR (F')

Scala (A-A') = 100 μ m; Scala (B-F') = 50 μ m

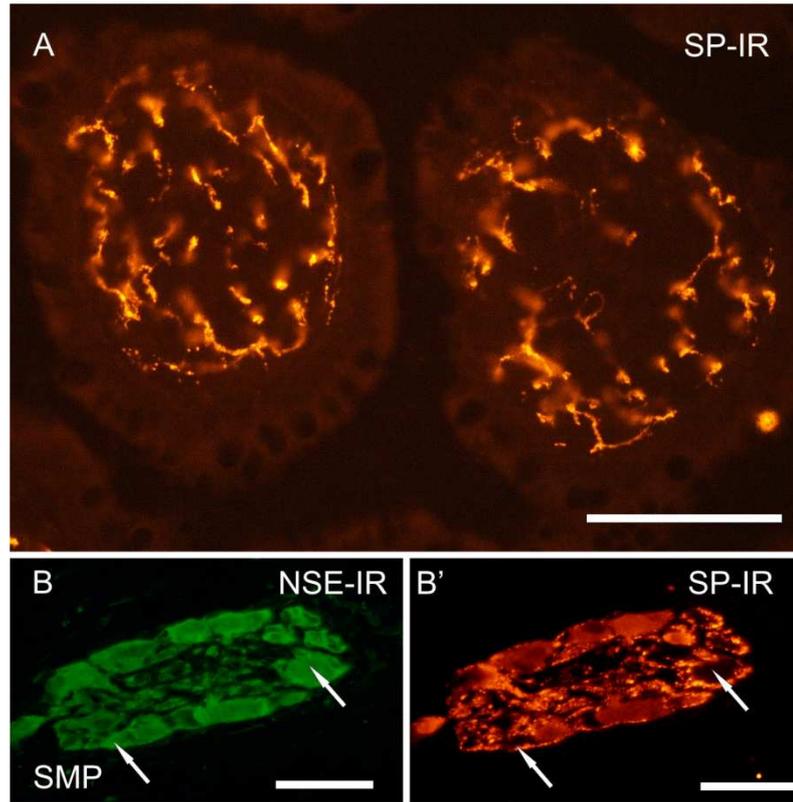


Fig. 3

A – Sezione trasversale di due villi con numerose fibre SP-IR.

B-B' – Ganglio del SMP; NSE-IR (**B**) e SP-IR (**B'**). Le frecce mostrano due neuroni NSE-IR (**B**) non SP-IR (**B'**).

Scala (A) = 100 μ m; Scala (B-B') = 50 μ m.

Tavola 1.

Dettagli degli anticorpi primari utilizzati (aziende produttrici: *Biogenex*, San Ramon, CA, U.S.A.; *Chemicon International*, Temecula, CA, U.S.A.; BD Transduction Lab., Lexington, KY 40511; *Sigma*, Saint Louis, Missouri, U.S.A.)

Tissue antigen	Host species	Serum code	Dilution	References or source
CGRP	Rabbit	T-4032 (IHC 6006)	1:1000	Peninsula (Chiocchetti et al., 2006)
ChAT	Rabbit	P3YEB	1:250	Schemann et al., 1983
NF 200kDa	Rabbit	4142	1:500	Sigma (Domeneghini et al., 2004)
nNOS	Mouse	N31020	1:40	BD Transduction Laboratories (Pfannkuche et al., 2002)
NSE	Mouse	AM-055-5M	1:6	Biogenex (Milne et al., 2005)
PGP 9.5	Rabbit	AB5925	1:1000	Chemicon
SP	Rat	10-S15	1:500	Fitzerald (Pfannkuche et al., 2002)
S100	rabbit	PC157	1:50	Oncogene

Tavola 2.

Dettagli degli antisieri secondary utilizzati (aziende produttrici: *Calbiochem-Novabiochem Corporation*, San Diego, CA, U.S.A.; *Molecular Probes*, Eugene, Ore., USA; *FITC fluorescein isothiocyanate*).

Antibody	Dilution	Source
Goat anti-mouse IgG Alexa 594	1:200	Molecular Probes
Goat anti-rabbit IgG FITC	1:40	Calbiochem
Donkey anti-rat IgG 594	1:50	Molecular Probes

Tavola 3.

Analisi del codice chimico dei neuroni enterici dell'ileo equino. Le percentuali delle sottoclassi dei neuroni osservati in entrambe le preparazioni sono espresse come media \pm della deviazione standard. (n = numero dei soggetti considerate)

A. Le percentuali delle sottoclassi dei neuroni enterici nella popolazione neuronale totale è stata ricercata tramite l'utilizzo di anticorpi anti-PGP 9.5 o anti-NSE.

1 Immunoreattività	MP	SMP
NSE/ChAT	66 \pm 7% (437/665); $n=3$	74 \pm 15% (520/649 cellule); $n=3$
PGP 9.5/nNOS	38 \pm 7% (161/438 cellule); $n=3$	5 \pm 1% (15/307 cellule); $n=3$
NSE/SP	14 \pm 13% (21/137 cellule); $n=2$	66 \pm 8% (563/824 cellule); $n=3$
NSE/CGRP	0% (0/200 cellule); $n=3$	43 \pm 6% (124/277 cellule); $n=3$
NSE/NF200	61 \pm 15 (151/243 cellule); $n=3$	91 \pm 10 (330/382 cellule); $n=3$

B. Sono espote le percentuali di neuroni marcati con il primo anticorpo ed il second anticorpo indicati

2 Immunoreattività	MP	SMP
CGRP/SP	0% (0/22 cellule); <i>n</i> =3	93±7% (176/190 cellule); <i>n</i> =3
SP/CGRP	0% (0/0 cellule); <i>n</i> =3	95±10% (147/158 cellule); <i>n</i> =3
CGRP/nNOS	0% (0/100 cellule); <i>n</i> =3	0% (0/16 cellule); <i>n</i> =3
nNOS/CGRP	0% (0/0 cellule); <i>n</i> =3	0% (0/120 cellule); <i>n</i> =3
ChAT/SP	26±6% (39/149 cellule); <i>n</i> =3	68±10% (335/494 cellule); <i>n</i> =3
SP/ChAT	100% (43/43 cellule); <i>n</i> =3	98±2% (197/199 cellule); <i>n</i> =3
ChAT/nNOS	30±11% (104/426 cellule); <i>n</i> =3	4±1% (13/327 cellule); <i>n</i> =3
nNOS/ChAT	42±14% (99/322 cellule); <i>n</i> =3	69±11% (21/35 cellule); <i>n</i> =3
nNOS/NF200	74±13% (113/155 cellule); <i>n</i> =4	51±8% (10/20 cellule); <i>n</i> =2
NF200/nNOS	39±15% (91/255 cellule); <i>n</i> =4	0-12% (5/224) ; <i>n</i> =3
SP/NF200	-	98±2% (214/219 cellule); <i>n</i> =2
NF200/SP	-	86±12% (226/270 cellule); <i>n</i> =2

Tavola 4.

Valutazione semiquantitativa dell'immunoreattività dei differenti *markers* neuronali.

^C = corpi cellulari, ^f = fibre.

	FB	TH	DBH	NNOS	NF200	CGRP	SP	NPY	CCK
DRG	+			++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	++ ^{C,F}		+ ^{C,F}
ILC	-	-	-	+++ ^{C,F}	-	++ ^F	+++ ^F	-	+ ^F
TSC	+	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	+ ^{C,F}		++ ^F	+ ^F		
SG	+	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	+ ^{C,F}		++ ^F	+ ^F		
CG	+++	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	++ ^F	++ ^{C,F}	++ ^F	+ ^F	+ ^{C,F}	
CMG	+	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	++ ^F		++ ^F + ^C	+ ^F	+ ^{C,F}	+ ^F
CAUDMG	++	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	++ ^F		+++ ^F	+ ^F	++ ^{C,F}	+ ^F
MP	+++	+++ ^F	++ ^F	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	++ ^F	+ ^C +++ ^F	+ ^F	-
SMP	+	++ ^F	++ ^F	+ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	+++ ^{C,F}	+ ^{C,F}	-
CML	-	++ ^F	++ ^F	++ ^F	++ ^F	-	+++ ^F	+ ^F	-
LML	-	+ ^F	+ ^F	+ ^F	+ ^F	-	+ ^F	+ ^F	-

SECONDA FASE DELLO STUDIO: INNERVAZIONE INTRINSECA DELLA ICJ

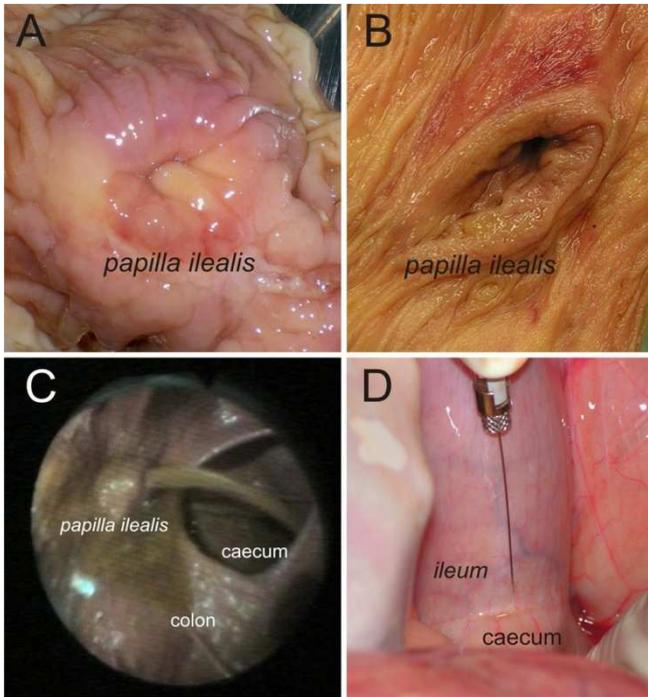


Fig. 1

A – La *papilla ilealis* di un cavallo proveniente dal macello statale, senza l'effetto miorelaxante causato dal protocollo anestesiológico; l'apertura ileale mostra una prominenza edematosa dovuta alla contrazione della muscolatura ed alla componente vascolare della ICJ.

B – La *papilla ilealis* del soggetto sottoposto ad iniezione del tracciante FB a livello della ICJ, in un'immagine *post-mortem* (PM); l'apertura ileale mostra una prominenza appiattita per l'effetto miorelaxante della xilazina (protocollo anestesiológico) e della nicardipina (protocollo PM).

C – Immagine tratta da una visione endoscopica intracieciale che mostra l'apertura della *papilla ilealis* durante il passaggio di materiale liquido dall'ileo alla base del cieco.

D – Iniezione di tracciante retrograde neuronale FB nella parete della ICJ tramite microsiringa Hamilton.

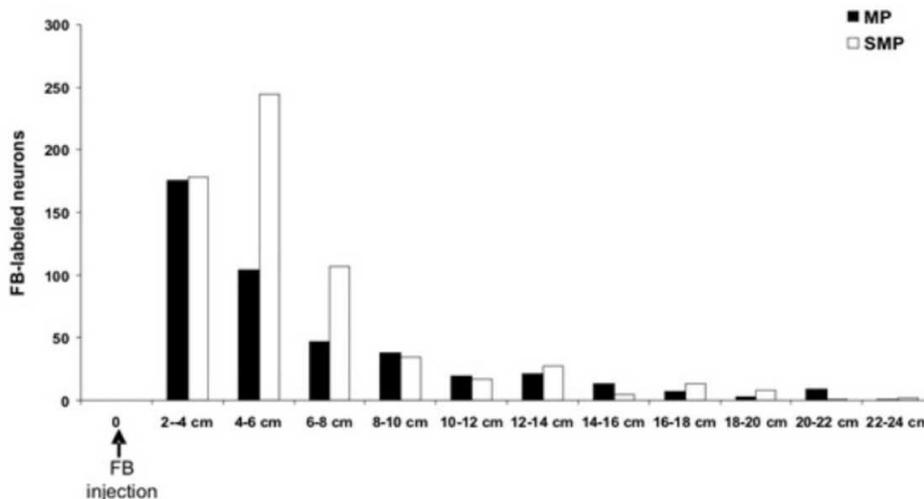


Fig 2 - Il grafico mostra il numero di neuroni marcati FB nel plesso mio enterico (MP) e sub-mucosale (SMP) contati in aree di preparati *wholemout* di 2 cm² contati a diverse distanze dal sito di iniezione (0). Sono stati contati 438 neuroni nel MP e 635 neuroni nel SMP. Questi dati si riferiscono al soggetto di 2,5 anni nel quale sono state osservate le proiezioni maggiori.

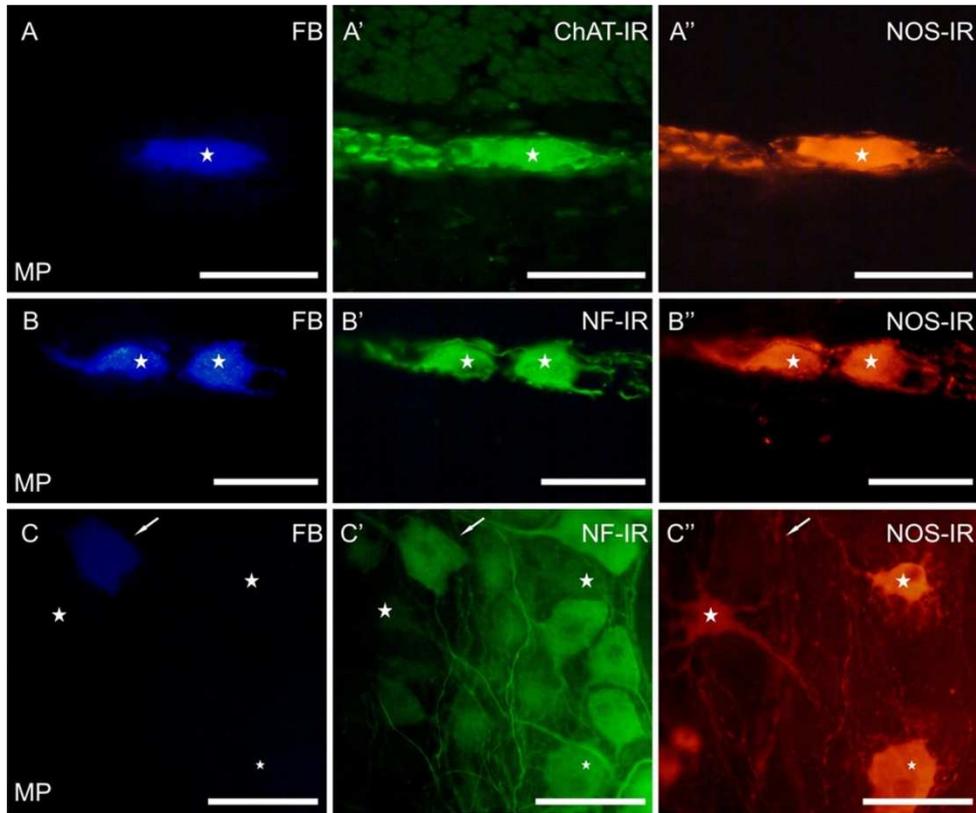


Fig 3 - Immunoreattività (IR) per *choline acetyltransferase* (ChAT)-, *nitric oxide synthase* (nNOS)-, *neurofilament* (NF)- nei neuroni del plesso mio-enterico (MP) marcati FB in modo retrogrado dopo l'iniezione del tracciante fluorescente a livello della IGJ

A-A'' – Criosezioni in cui la stella indica i neuroni del MP (A) marcati FB, a 4-6 cm dal sito di iniezione del FB, fortemente ChAT- (A') e nNOS-IR (A'').

B-B'' – Criosezioni in cui la stella indica 2 neuroni del MP (B) marcati FB coesprimenti NF- (B') e nNOS-IR (B''). Scala A-B'' = 50 μ m.

C-C'' – Preparazione *wholemout* in cui la stella indica neuroni (C) marcati FB esprimenti NF-IR (C'), ma non nNOS-IR (C''), con fibre Dogiel di tipo II ed allocati a 6-8 cm dal sito di iniezione del FB. Le stelle indicano 2 neuroni FB- e NF-negativi con morfologia Dogiel di tipo I. La stella più piccola indica un neurone FB-negativo, ma NF- e nNOS-IR con morfologia Dogiel di tipo I. Scala C-C' = 100 μ m.

TERZA FASE DELLO STUDIO: CONTROLLO NERVOSO ESTRINSECO (COMPONENTE SIMPATICA) NEL
TRATTO DISTALE DI ILEO E NELLA ICJ

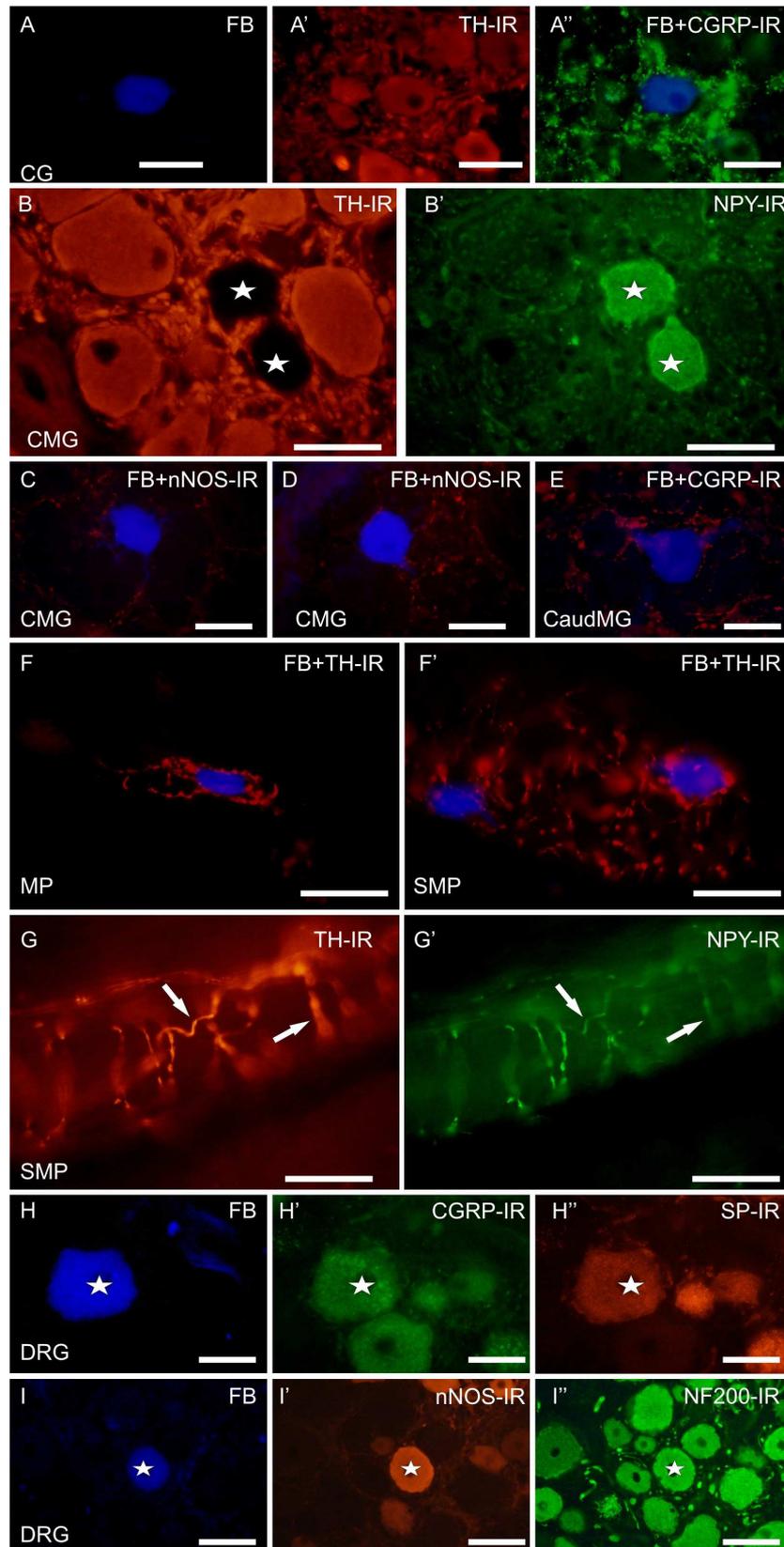


Fig. 1

A-A'-A'' – Neuroni del ganglio celiaco (CG) FB-positivi (**A**), che esprimono TH-IR (**A'**) ed FB-positivi CGRP-IR (**A''**). Scala **A-A'-A''** = 50 μm

B-B' – Neuroni del ganglio mesenterico craniale (CMG) esprimenti TH-IR (**B**) e NPY-IR (**B'**). Scala **B-B'** = 100 μm

C-D - Neuroni del ganglio mesenterico craniale (CMG) esprimenti FB-positività e nNOS-IR. Scala **C-D** = 50 μm

E - Neuroni del ganglio mesenterico caudale (CaudMG) esprimenti FB-positività e CGRP-IR. Scala **E** = 50 μm

F-F' – Espressione di FB-positività e TH-IR da parte di neuroni del plesso mio enterico (MP) (**F**) e neuroni del plesso sottomucoso (SMP) (**F'**). Scala **F-F'** = 50 μm

G-G' – Neuroni del plesso sottomucoso (SMP) esprimenti TH-IR (**G**) e NPY-IR (**G'**). Scala **G-G'** = 100 μm

H-H'-H'' – Neuroni dei gangli delle radici dorsali marcati FB (**H**), esprimenti CGRP-IR (**H'**) e SP-IR (**H''**). Scala **H-H'-H''** = 50 μm

I-I'-I'' - Neuroni dei gangli delle radici dorsali marcati FB (**I**), esprimenti nNOS-IR (**I'**) e NF200-IR (**I''**). Scala **I-I'-I''** = 50 μm

Scala (A-A') = 100 μm ; Scala (B-F') = 50 μm

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, S.B., Lamar, C.H., Masty, J. (1984) Motility of the distal portion of the jejunum and pelvic flexure in ponies: effects of six drugs. *Am J Vet Res.* 45(4):795-9.
- Allen, D.J., White, N.A., Tyler, D.E. (1988) Morphologic effects of experimental distention of equine small intestine. *Vet Surg.* 17:10-14.
- Anderson, C.R., Edwards, S.L., Furness, J.B., Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1993) The distribution of nitric oxide synthase-containing autonomic preganglionic terminals in the rat. *Brain Res.* 614:78-85.
- Anderson, R.L., Jobling, P., Gibbins, I.L. (2001) Development of electrophysiological and morphological diversity in autonomic neurons. *J Neurophysiol.* 86:1237-1251.
- Anlauf, M., Schäfer, M.K., Eiden, L., Weihe, E. (2003) Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol.* 459:90-111.
- Archer, D.C., Proudman, C.J., Pinchbeck, G., Smith, J.E., French, N.P., Edwards, G.B. (2004) Entrapment of the small intestine in the epiploic foramen in horses: a retrospective analysis of 71 cases recorded between 1991 and 2001. *Vet Rec.* 18-25;155(25):793-7.
- Baez, S. (1959) Microcirculation in the intramural vessels of the small intestine in the rat. *In* Reynolds SWM (Ed), *Microcirculation*. Urbana, University of Illinois Press. p 144.
- Bałuk, P., Gabella, G. (1987) Fine structure of the autonomic ganglia of the mouse pulmonary vein. *J Neurocytol.* 16:169-184.
- Barbiers, M., Timmermans, J.P., Adriaansen, D., De Groodt-Lasseel, M.H., Scheuermann, D.W. (1993) Topographical distribution and immunocytochemical features of colonic neurons that project to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *J Auton Nerv Syst.* 44:119-127.
- Barclay, W.P., Phillips, T.N., Foerner, J.J. (1982) Intussusception associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in five horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1;180(7):752-3.
- Barone, R. (1993) *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*. Vol. 5 *Angiologia, parte I Cuore e Arterie*. Edagricole. p 304-311.

- Basmajian, J.V. (1975) Method of anatomy. Baltimore, Williams & Wilkins. p 223.
- Bass, P. (1968) In vivo electrical activity of the small bowel. *In* Code CF (Ed), Handbook of Physiology. Washington, DC, Am Physiol Soc. p 2051.
- Bass, P., Wiley, J.N. (1965) Electrical and extraluminal contracts of force activity of the duodenum of the dog. *Am J Dig Dis.* 10:183.
- Baxter, G.M., Broome, T.E., Moore, J.N. (1989) Abdominal adhesions after small intestinal surgery in the horse. *Vet Surg.* 18(6):409-14.
- Bayliss, W.M. (1902) On the local regulation of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol.* 28:220.
- Bayliss, W.M., Starling, E.H. (1900) The movements and innervation of the large intestine. *J Physiol (Lond).* 26:107-18.
- Beani, L., Bianchi, C., Crema, A. (1969) The effect of catecholamines and sympathetic stimulation on the release of acetylcholine from the guinea-pig colon. *Br J Pharmacol.* 36:1-17.
- Beard, W.L., Byrne, B.A., Henninger, R.W. (1992) Ileocecal intussusception corrected by resection within the cecum in two horses. *J Am Vet Med Assoc.* 15;200(12):1978-80.
- Beghelli, V. (1992) Sistema nervoso centrale e periferico. In: Aguggini, G., Beghelli, V., Giulio, L.F. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Utet. p 112-123.
- Bernard, W.V., Reef, V.B., Reimer, J.M., Humber, K.A., Orsini, J.A. (1989) Ultrasonographic diagnosis of small-intestinal intussusception in three foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1;194(3):395-7.
- Bertaccini, G., Coruzzi, G. (1987) Receptors in the gastrointestinal tract. *Pharmacol Res Commun.* 19(2):87-118.
- Bishop, A.E., Hodson, N.P., Major, J.H., Probert, L., Yeats, J., Edwards, G.B., Wright, J.A., Bloom, S.R., Polak, J.M. (1984) The regulatory peptide system of the large bowel in equine grass sickness. *Experientia.* 40:801-806.
- Bishop, A.E., Hodson, N.P., Major, J.H., Probert, L., Yeats, J., Edwards, G.B., Wright, J.A., Bloom, S.R. and Polak, J.M. (1984) The regulatory peptide system of the large bowel in equine grass sickness. *Experientia* 40:801-806.

- Blackwell, R. (1982) Jejunocaecostomy in the horse: A comparison of two techniques. *Proc Equine Colic Symp.* 1:288.
- Bladon, B.M., Hillyer, M.H. (2000) Effect of extensive ileal resection with a large resulting mesenteric defect and stapled ileal stump in horses with a jejunocecostomy: a comparison with other anastomotic techniques. *Equine Vet J (Suppl.)* (32):52-8.
- Blikslager, A.T., Bowman, K.F., Levine, J.F., Bristol, D.G., Roberts, M.C. (1995) Evaluation of factors associated with postoperative ileus in horses: 31 cases (1990-1992) *J Am Vet Med Assoc.* 15;206(8):1176
- Bloom, S.R., Mitznegg, P., Bryant, M.G. (1976) Measurement of human plasma motilin. *Scand J Gastroenterology.* 11:47.
- Bornstein, J.C., Furness, J.B. (1988) Correlated electrophysiological and histochemical studies of submucous neurons and their contribution to understanding enteric neural circuits. *J Auton Nerv Syst.* 25(1):1-13.
- Bornstein, J.C., Hendriks, R., Furness, J.B. and Trussell, D.C. (1991) Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J. Comp. Neurol.* 314:437-451.
- Bornstein, J.C., Hendriks, R., Furness, J.B., Trussell, D.C. (1991) Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol.* 314:437-451.
- Bortolami, R., Callegari, E. (1999) Neurologia ed estesiologia degli animali domestici. Edagricole. p 16-19,159-165.
- Botella, A., Delvaux, M., Berry, P., Frexinos, J., Bueno, L. (1992) Cholecystokinin and gastrin induce cell contraction in pig ileum by interacting with different receptor subtypes. *Gastroenterology.* 102:779-86.
- Boulton, C.H., Williamson, L. (1984) Cryptococcal granuloma associated with jejunal intussusception in a horse. *Equine Vet J.* 16(6):548-51.

- Boyd, H.D., McLachlan, E.M., Keast, J.R., Inokuchi, H. (1996) Three electrophysiological classes of guinea pig sympathetic postganglionic neurone have distinct morphologies. *J Comp Neurol.* 369:372-87.
- Brookes, S.J., Song, Z.M., Ramsay, G.A. and Costa, M. (1995) Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci.* 15:4013-4022.
- Browning, K.N., Zheng, Z., Kreulen, D.L., Travagli, R.A. (1999) Two populations of sympathetic neurons project selectively to mesenteric artery or vein. *Am J Physiol.* 276:H1263-1272.
- Bueno, L., Praddaude, F., Ruckebusch, Y. (1979) Propagation of electrical spiking activity along the small intestine, intrinsic versus extrinsic neural influences. *J Physiol.* 292:15-26.
- Burns, G.A. and Cummings, J.F. (1991) Equine myenteric plexus with special reference to the pelvic flexure pacemaker. *Anat. Rec.* 230:417-424.
- Burns, G.A. and Cummings, J.F. (1993) Neuropeptide distributions in the colon, cecum, and jejunum of the horse. *Anat. Rec.* 236:341-350.
- Burns, G.A., Cummings, J.F. (1991) Equine myenteric plexus with special reference to the pelvic flexure pacemaker. *Anat. Rec.* 230:417-424.
- Burns, G.A., Cummings, J.F. (1993) Neuropeptide distributions in the colon, cecum, and jejunum of the horse. *Anat. Rec.* 236:341-350.
- Burns, G.A., Karcher, L.F., Cummings, J.F. (1990) Equine myenteric ganglionitis: a case of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Cornell Vet.* 80:53-63.
- Burnstock, G., Campbell, G., Bennet, M., Holman, M.E. (1963) Inhibition of the smooth muscle on the tenia coli. *Nature* 200:581-582.
- Burnstock, G., Campbell, G., Bennet, M., Holman, M.E. (1964) Innervation of the guinea-pig taenia coli: are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves? *Int J Neuropharmacol.* p 163-166.
- Campbell, M.L., Colahan, P.C., Brown, M.P., Grandstedt, M.E., Peyton, L.C. (1984) Cecal impaction in the horse. *J Am Vet Med Assoc.* 15;184(8):950-2.

- Cervero, F., Iggo, A. (1980) The substantia gelatinosa of the spinal cord-A critical review. *Brain*. 103:717-772.
- Chaffin, M.K., Fuenteabla, I.C., Schumacher, J., Welch, R.D., Edwards, J.F. (1992) Idiopathic muscular hypertrophy of the equine small intestine: 11 cases (1980-1991). *Equine Vet J*. 24(White e Lessard, 24:372-378.
- Chiocchetti, R., Bombardi, C., Mongardi-Fantaguzzi, C., Russo, D., Venturelli, E., Montoneri, C., Spadari, A., Romagnoli, N., Grandis, A. (2009) Intrinsic innervation of the ileocaecal junction in the horse. *Equine Vet Journal*. (in press).
- Chiocchetti, R., Grandis, A., Bombardi, C., Lucchi, M.L., Dal Lago, D.T., Bortolami, R. and Furness, J.B. (2006) Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum. A morphometric and neurochemical investigation. *Cell Tissue Res*. 323:183-196.
- Chiocchetti, R., Grandis, A., Bombardi, C., Lucchi, M.L., Tadini Dal Lago D., Bortolami, R., Furness, J.B. (2006) Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum. A morphometric and neurochemical investigation. *Cell Tissue Res*. 323:183-196.
- Chiocchetti, R., Grandis, A., Bombardi, C., Lucchi, M.L., Tadini, Dal Lago D., Bortolami, R., Furness, J.B. (2006) Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum. A morphometric and neurochemical investigation. *Cell Tissue Res*. 323:183–196.
- Chiocchetti, R., Mazzuoli, G., Albanese, V., Mazzoni, M., Clavenzani, P., Lalatta-Costerbosa, G., Lucchi, M.L., Di Guardo, G., Marruchella, G., Furness, J.B. (2008) Anatomical evidence for ileal Peyer's patches innervation by enteric nervous system: a potential route for prion neuroinvasion? *Cell and Tissue Res*. 332:185-194.
- Chiocchetti, R., Poole, D.P., Kimura, H., Aimi, Y., Robbins, H.L., Castelucci, P., Furness, J.B. (2003) Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. *Cell Tissue Res*. 311:11-22.

- Chiocchetti, R., Poole, D.P., Kimura, H., Aimi, Y., Robbins, H.L., Castelucci, P. and Furness, J.B. (2003) Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. *Cell. Tissue Res.* 311:11-22.
- Clarke, L.L., Argenzio, R.A., Roberts, M.C. (1990b) Effect of meal feeding on plasma volume and urinary electrolyte clearance in ponies. *Am J Vet Res.* 51(4):571-6.
- Clarke, L.L., Roberts, M.C., Argenzio, R.A. (1990a) Feeding and digestive problems in horses. Physiologic responses to a concentrated meal. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 6(2):433-50.
- Clayton, H.M. (1986) Ascarids: recent avances. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2:313-328.
- Clerc, N., Furness, J.B., Li, Z.S., Bornstein, J.C., Kunze, W.A.A. (1998) Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. *Neuroscience.* 86:679-694.
- Code, C.F., Marlette, J.A. (1975) The interdigestive myoelectric complex of the stomach and small bowel of dogs. *J physiol.* 246:289.
- Collier, M.A., Trent, A.M. (1983) Jejunal intussusception associated with leiomyoma in an aged horse. *J Am Vet Med Assoc.* 15;182(8):819-21.
- Condon, R.E., Sanra Sushil, K. (1975) Motility after abdominal surgery. *Clin Gastroenterol.* 11:609.
- Costa, M., Furness, J.B. (1984) Somatostatin is present in a subpopulation of noradrenergic nerve fibres supplying the intestine. *Neuroscience.* 13:911-9.
- Cottrell, D.F., McGorum, B.C. and Pearson, G.T. (1999) The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanisms. *Neurogastroenterol. Motil.* 11:79-92.
- Cottrell, D.F., McGorum, B.C., Pearson, G.T. (1999) The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanisms. *Neurogastroenterol. Motil.* 11:79-92.
- Cowen, T., Johnson, R.J., Soubeyre, V., Santer, R.M. (2000) Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut.* 47:653-660.
- Crowhurst, R.C., Simpson, D.J., McEnery, R.J., Greenwood, R.E. (1975) Intestinal surgery in the foal. *J S Afr Vet Assoc.* 46(1):59-67.

- Cserni, T., Paran, S., Puri, P. (2007) New hypothesis on the pathogenesis of ileocecal intussusceptions. *J. Pediatric Surg.* 42:1515–1519.
- Dabareiner, R.M., Sullins, K.E., Snyder, J.R., White, N.A. 2nd, Gardner, I.A. (1993) Evaluation of the microcirculation of the equine small intestine after intraluminal distention and subsequent decompression. *Am J Vet Res.* 54(10):1673-82.
- Dabareiner, R.M., Sullins, K.E., Snyder, J.R., White, N.A. 2nd, Gardner, I.A. (1993) Evaluation of the microcirculation of the equine small intestine after intraluminal distention and subsequent decompression. *Am J Vet Res.* 54(10):1673-82.
- Dabareiner, R.M., Sullins, K.E., White, N.A., Snyder, J.R. (2001) Serosal injury in the equine jejunum and ascending colon after ischemia-reperfusion or intraluminal distention and decompression. *Vet Surg.* 30(2):114-25.
- Davidoff, M.S., Galabov, P.G., Kaufmann, P. (1986) Localization of substance P-like immunoreactive fibers in the thoracic spinal cord of guinea pig. *Cell Tissue Res.* 246:653-65.
- De Fontgalland, D., Wattchow, D.A., Costa, M., Brookes, S.J. (2008) Immunohistochemical characterization of the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels. *Neurogastroenterol Motil.* 20:1212-26.
- De Giorgio, R., Stanghellini, V., Barbara, G., Corinaldesi, R., De Ponti, F., Tonini, M., Bassotti, G., Sternini, C. (2000) Primary enteric neuropathies underlying gastrointestinal motor dysfunction. *Scand J Gastroent.* 35:114-22.
- De Winter, B.Y., Boeckxstaens, G.E., De Man, J.G., Moreels, T.G., Herman, A.G. and Pelckmans, P.A. (1997) Effects of adrenergic and nitrergic blockade on experimental ileus in rats. *Br. J. Pharmacol.* 120:464-468.
- De Winter, B.Y., Boeckxstaens, G.E., De Man, J.G., Moreels, T.G., Herman, A.G., Pelckmans, P.A. (1997) Effects of adrenergic and nitrergic blockade on experimental ileus in rats. *Br. J. Pharmacol.* 120:464-468.
- Defaveux, V., Dorban, G., Antoine, N., Piret, J., Gabriel, A., Jacqmot, O., Falisse-Poirier, N., Flandroy, S., Zorzi, D., Heinen, E. (2007) Neuroimmune connections in jejunal and ileal Peyer's patches at various bovine ages: potential sites for prion neuroinvasion. *Cell Tissue Res.* 329:35-44.

Dogiel, A.S. (1899) Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt.* p 130-158.

Domeneghini, C., Radaelli, G., Arrighi, S., Bosi, G. and Dolera, M. (2004) Cholinergic, nitrenergic and peptidergic Substance P- and CGRP-utilizing; innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.* 19:357-370.

Domeneghini, C., Radaelli, G., Arrighi, S., Bosi, G., Dolera, M. (2004) Cholinergic, nitrenergic and peptidergic Substance P- and CGRP-utilizing; innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 19:357-370.

Domeneghini, C., Radaelli, G., Arrighi, S., Bosi, G., Dolera, M. (2004) Cholinergic, nitrenergic and peptidergic Substance P- and CGRP-utilizing; innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.* 19:357-370.

Domoto, T., Teramoto, M., Tanigawa, K., Tamura, K., Yasui, Y. (1995) Origins of nerve fibers containing nitric oxide synthase in the rat celiac-superior mesenteric ganglion. *Cell Tissue Res.* 281:215-221.

Doxey, D.L., Pearson, G.T., Milne, E.M., Gilmour, J.S. and Chisholm, H.K. (1995) The equine enteric nervous system--neuron characterization and distribution in adults and juveniles. *Vet. Res. Commun.* 19:433-449.

Doxey, D.L., Pearson, G.T., Milne, E.M., Gilmour, J.S., Chisholm, H.K. (1995) The equine enteric nervous system-neuron characterization and distribution in adults and juveniles. *Vet. Res. Commun.* 19:433-449.

Dyce, K.M., Hartman, W. (1973) An endoscopic study of the caecal base of the horse. *Tijdschr Diergeneeskd.* 15:98(20):957-63.

Dyce, K.M., Hartman, W., Aalfs, R.H. (1976) A cinefluoroscopic study of the caecal base of the horse. *Res Vet Sci.* 20(1):40-6.

Edwards, G.B. (1981) Obstruction of the ileum in the horse, a report of 27 clinical cases. *Equine Vet J.* 13(3):158-66.

Edwards, G.B. (1981) Obstruction of the ileum in the horse: a report of 27 clinical cases. *Equine Vet. J.* 13:158-166.

- Edwards, G.B. (1981) Obstruction of the ileum in the horse: a report of 27 clinical cases. *Equine vet. J.* 13:158-166.
- Edwards, G.B. (1981) Obstruction of the ileum in the horse: a report of 27 clinical cases. *Equine Vet J.* 13(3):158-66.
- Edwards, G.B. (1986) Surgical management of intussusception in the horse. *Equine Vet J.* 18(4):313-21.
- Edwards, G.B. (1986) Surgical management of intussusception in the horse. *Equine Vet J.* 18(4):313-21.
- Edwards, G.B. (1986) Surgical management of intussusception in the horse. *Equine Vet J.* 18(4):313-21.
- Edwards, G.B., Proudman, C.J. (1994) An analysis of 75 cases of intestinal obstruction caused by pedunculated lipomas. *Equine Vet J.* 26(1):18-21.
- Elliott, TR. (1904) On the innervation of the ileo-colic sphincter. *J Physiol.* 31:157-168.
- Engelbert, T.A., Tate, L.P., Bowman, K.F. (1993) Incarceration of the small intestine in the epiploic foramen: Report of 19 cases (1983-1992). *Vet Surg.* 22:57.
- Erkert, R.S., Crowson, C.L., Moll, H.D., Bentz, B.G., Confer, A.W., Blaik, M.A. (2003) Obstruction of the cecocolic orifice by ileocecolic intussusception following jejunocecostomy in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:1743-5:1707.
- Erkert, R.S., Crowson, C.L., Moll, H.D., Bentz, B.G., Confer, A.W. and Blaik, M.A. (2003) Obstruction of the cecocolic orifice by ileocecolic intussusceptions following jejunocecostomy in a horse. *J. Am. vet. med. Ass.* 222:1743-1745,1707.
- Felten, D.L., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Olschowaka, J.A., Livnat, S. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol.* 135:S755-765.
- Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J., Polak, J.M. (1982) Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature.* 297:409–410.

- Fleckenstein, P., Bueno, L., Fioramonti, J., Ruckebusch Y. (1982) Minute rhythm of electrical spike bursts of the small intestine in different species. *Am. J. Physiol.* 42:654–659.
- Fleming, B.P., Gibbins, I.L., Morris, J.L., Gannon, B.J. (1989) Noradrenergic and peptidergic innervation of the extrinsic vessels and microcirculation of the rat cremaster muscle. *Microvasc Res.* 38:255-268.
- Ford, T.S., Freeman, D.E., Ross, M.W., Richardson, D.W., Martin, B.B., Madison, J.B. (1990) Ileocecal intussusception in horses: 26 cases (1981-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1;196(1):121-6.
- Ford, T.S., Freeman, D.E., Ross, M.W., Richardson, D.W., Martin, B.B., Madison, J.B. (1990) Ileocecal intussusception in horses: 26 cases (1981-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1;196(1):121-6.
- Forehand, C.J. (1985) Density of somatic innervation on mammalian autonomic ganglion cells is inversely related to dendritic complexity and preganglionic convergence. *J Neurosci.* 5:3403-3408.
- Forehand, C.J. (1987) Ultrastructural analysis of the distribution of synaptic boutons from labeled preganglionic axons on rabbit ciliary neurons. *J Neurosci.* 7:3274-3281.
- Frankeny, R.L., Wilson, D.A., Messer, N.T.4th, Campbell-Beggs, C. (1995) Jejunal intussusception: a complication of functional end-to-end stapled anastomoses in two ponies. *Vet Surg.* 24(6):515-7.
- Freeman, D.E. (2006) Small intestine. In: Auer JA, Stick JA, *Equine surgery*. Saunders Elsevier:406-417.
- Freeman, D.E. (2006) Small intestine. In: *Equine surgery*, 3rd edn., Ed: J.A. Auer and J.A. Stick, Saunders Elsevier, Philadelphia. p 406-417.
- Freeman, D.E., Hammock, P., Baker, G.J., Goetz, T., Foreman, J.H., Schaeffer, D.J., Richter, R.A., Inoue, O., Magid, J.H. (2000) Short- and long-term survival and prevalence of postoperative ileus after small intestinal surgery in the horse. *Equine Vet J Suppl.* (32):42-51.
- Freytag, C., Seeger, J., Siegemund, T., Grosche, J., Grosche, A., Freeman, D.E., Schusser, G.F., Härtig, W. (2008) Immunohistochemical characterization and quantitative analysis of neurons in the myenteric plexus of the equine intestine. *Brain Res.* 1244:53-64.

- Fujinaga, Y. (2006) Transport of Bacterial Toxins into Target Cells: Pathways Followed by Cholera Toxin and Botulinum Progenitor Toxin. *J. Biochem.* 140:155–160.
- Furness, J.B, Costa, M., Emson, P.C., Håkanson, R., Moghimzadeh, E., Sundler, F., Taylor, I.L., Chance, R.E. (1983) Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea-pig digestive tract. *Cell Tissue Res.* 234:71-92.
- Furness, J.B. (2003) Intestinofugal neurons and sympathetic reflexes that bypass the central nervous system. *J Comp Neurol.* 455:281-4.
- Furness, J.B. (2006) Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 125:81–85.
- Furness, J.B. (2006) Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 125:81–85.
- Furness, J.B. (2006) *The Enteric Nervous System*, Blackwell Publishing, Oxford. p 88-93.
- Furness, J.B. (2006a) The enteric nervous system. Oxford: Blackwell Publishing. 1.
- Furness, J.B. (2006b) The enteric nervous system. Oxford: Blackwell Publishing. 29-40.
- Furness, J.B. (2006c) The enteric nervous system. Oxford: Blackwell Publishing. 109–111.
- Furness, J.B., Costa, M. (1987) *The Enteric Nervous System*. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., Clerc, N. (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progr. in Neurobiol.* 72:143-164.
- Gamse, R., Saria, A. (1985) Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol.* 114:61-66.
- Gerard, M.P., Bowman, K.F., Blikslager, A.T., Tate, L.P. Jr., Bristol, D.G. (1996) Jejunocolostomy or ileocolostomy for treatment of cecal impaction in horses: nine cases (1985-1995). *J Am Vet Med Assoc.* 1;209(7):1287-90.

- Gershon, M.D. (1990) The enteric nervous system: neurotransmitters and neuromodulators. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 3: 517-22.
- Gershon, M.D., Gide, S.M. (1980) The nervous system of the gut. *Gastroenterology*. 80:1751.
- Ghoshal, N.G. (1975) The anatomy of the domestic animal. Philadelphia, W.B. Saunders Company. p 496.
- Gibbins, I.L., Matthew, S.E. (1996) Dendritic morphology of presumptive vasoconstrictor and pilomotor neurons and their relations with neuropeptide-containing preganglionic fibres in lumbar sympathetic ganglia of guinea-pigs. *Neuroscience*. 70:999-1012.
- Gibbins, I.L., Rodgers, H.F., Matthew, S.E., Murphy, S.M. (1998) Synaptic organisation of lumbar sympathetic ganglia of guinea pigs: serial section ultrastructural analysis of dye-filled sympathetic final motor neurons. *J Comp Neurol*. 402:285-302.
- Gibbins, I.L., Teo, E.H., Jobling, P., Morris, J.L. (2003) Synaptic density, convergence, and dendritic complexity of prevertebral sympathetic neurons. *J Comp Neurol*. 455:285-298.
- Gibson, S.J., Polak, J.M., Bloom, S.R., Abate, I.M., Mulderry, P.M., Gatei, M.A., McGregor, G.P., Morrison, J.F.B., Kelly, J.S., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. (1984) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci*. 4:3101-3111.
- Gift, L.J., Gaughan, E.M., DeBowes, R.M., Pintchuk, P.A., Nickels, F.A., Foreman, J.H. (1993) Jejunal intussusception in adult horses: 11 cases (1981-1991). *J Am Vet Med Assoc*. 1;202(1):110-2.
- Gift, L.J., Gaughan, E.M., DeBowes, R.M., Pintchuk, P.A., Nickels, F.A., Foreman, J.H. (1993) Jejunal intussusception in adult horses: 11 cases (1981-1991). *J Am Vet Med Assoc*. 1;202(1):110-2.
- Goyal Ray, K., Hirano, I. (1996) The enteric nervous system: mechanism of disease. *New Engl J Med* 25:1106-15.
- Granger, D.N., Kviety, P.R. (1981) The splanchnic circulation, intrinsic regulation. *Annu Rev Physiol*. 43:409.
- Granger, D.N., Kviety, P.R., Montillar, N.A., et al. (1980) Effect of luminal distention on intestinal transcapillary fluid exchange. *Am J Physiol*. 239:G516.

- Granger, D.N., Richardson, P.D.I., Kvietys, P.R., et al. (1980) Intestinal blood flow. *Gastroenterology*. 78:837.
- Granger, H.J., Shepard, A.P. (1979) Dynamics and control of the microcirculation. *Adv Biomed Eng*. 7:1.
- Gray, H. (1966) Anatomy of the human body. Philadelphia, Lea & Febinger. p 1230.
- Greet, T.R. (1992) Ileal intussusception in 16 young thoroughbreds. *Equine Vet J*. 24(2):81-3.
- Greet, T.R. (1992) Ileal intussusception in 16 young thoroughbreds. *Equine Vet J*. 24(2):81-3.
- Grivel, M.L., Ruckebusch, Y. (1972) The propagation of segmental contractions along the small intestine. *J Physiol*. 227(2):611-25.
- Gulbenkian, S., Merighi, A., Wharton, J., Varndell, I.M., Polak, J.M. (1986) Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea-pig. *J Neurocytol*. 15:535-542.
- Guyton, A.C. (1981) Textbook of medical physiology. Philadelphia, W.B. Saunders Company. P 764.
- Hackett, M.S., Hackett, R.P. (1989) Chronic ileocecal intussusception in horses. *Cornell Vet*. 79:353.
- Han, S., Yang, C.L., Chen, X., Naes, L., Cosx, B.F., Westfall, T. (1998) Direct evidence for the role of neuropeptide Y in sympathetic nerve stimulation-induced vasoconstriction. *Am. J. Physiol*. 274:H290-294.
- Hanson, R.R., Schumacher, J., Humburg, J., Dunkerley, S.C. (1996) Medical treatment of horses with ileal impactions: 10 cases (1990-1994). *J Am Vet Med Assoc*. 15;208(6):898-900.
- Hanson, R.R., Wright, J.C., Schumacher, J., Baird, A.N., Humburg, J., Pugh, D.G. (1998) Surgical reduction of ileal impactions in the horse: 28 cases. *Vet Surg*. 27(6):555-60.
- Hilbert, B.J., Little, C.B., Bolton, J.R., McGill, C.A. (1987) Caecal overload and rupture in the horse. *Aust Vet J*. 64(3):85-6.

- Holzer, P. (2007) Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr Opin in Pharmacology*. 7:563-569.
- Holzer, P. (2007) Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr. Opin in Pharmacology*. 7:563-569.
- Holzer, P. (2007) Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr. Opin in Pharmacology* 7:563-569.
- Horney, F.D., Funk, K.A. (1971) Ileal myotomy in the horse. *Mod Vet Pract*. 52:49.
- Horowitz, B., Ward, S.M., Sanders, K.M. (1999) Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu Rev Physiol*. 61:19-43.
- Howell, J.Mc.C., Baker, J.R., Ritchie, H.E. (1974) Observations on the coeliaco-mesenteric ganglia of horses with and without grass sickness. *Br. Vet. J.* 130:265-270.
- Hudson, N.P.H., Pearson, G.T. and Mayhew, I.G. (2000) Tissue culture of the enteric nervous system from equine ileum. *Vet. Res. Comm.* 24:299-307.
- Hudson, N.P.H., Pearson, G.T., Mayhew, I.G. (2000) Tissue Culture of the Enteric Nervous System from Equine Ileum. *Vet. Res. Commun.* 24:299-307.
- Huskamp, B., Toth, J. (1998) The pathogenesis and surgical treatment of nodular volvulus. *Magyar Allatorvosok Lapja*. 120:10.
- Iwamatsu, T. (1964) Electromyographic observation of intestinal movement during intestinal obstruction. *Tohoku J Exp Med*. 4:282.
- Jansson, G., Martinson, J. (1965) Some quantitative considerations on vagally induced relaxation of gastric smooth muscle in the cat. *Acta Physiol Scand*. 63:351-357.
- Jansson, N. (2000) Spontaneous correction of a nonstrangulating ileal obstruction caused by a lipoma in a 14-year-old pony. *Equine Vet Educ*. 12:183.
- Jobling, P., Gibbins, I.L., Morris, J.L. (2003) Functional organization of vasodilator neurons in pelvic ganglia of female guinea pigs: comparison with uterine motor neurons. *J Comp Neurol*. 459:223-41.

- Jobling, P., Messenger, J.P., Gibbins, I.L. (2001) Differential expression of functionally identified and immunohistochemically identified NK(1) receptors on sympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 85:1888-98.
- John, H.A., Creighton, A.J., Baird, A. (2001) Thoracic sympathetic chain ganglion neuronal abnormalities that may explain some of the clinical signs of grass sickness. *Vet Rec.* 148:180-182.
- Johnson, P.C. (1959) Myogenic nature of increase in intestinal vascular resistance with venous pressure elevations. *Circ Res.* 6:992.
- Kalff, J.C., Carlos, T.M., Schraut, W.H., Billiar, T.R., Simmons, R.L., Bauer, A.J. (1999) Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology.* 117(2):378-87.
- Keef, K.D., Kreulen, D.L. (1988) Convergence of noncholinergic afferent neurons in the inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. *Neurosci. Lett.* 95:161-166.
- Klohn, A., Vachon, A.M., Fischer, A.T. Jr. (1996) Use of diagnostic ultrasonography in horses with signs of acute abdominal pain. *J Am Vet Med Assoc.* 1;209(9):1597-601.
- Kondo, H., Yui, R. (1981) An electron microscopic study on substance P-like immunoreactive nerve fibers in the celiac ganglion of guinea pigs. *Brain Res.* 222:134-7.
- Kotzé, S.H. (1988) The arrangement of the muscle layers at the equine ileocaecal junction. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 59:67-72.
- Kotzé, S.H. (1988a) The arrangement of the muscle layers at the equine ileocaecal junction. *J S Afr Vet Assoc.* 59,67-72.
- Kotzé, S.H. (1988a) The pattern of venous drainage of the equine ileocaecal junction. *J. S. Afr. vet. Ass.* 59:131-133.
- Kotzé, S.H. (1988a) The pattern of venous drainage of the equine ileocaecal junction. *J. S. Afr. vet. Ass.* 59:131-133.
- Kotzé, S.H. (1988b) The arrangement of the muscle layers at the equine ileocaecal junction. *J. S. Afr. vet. Ass.* 59:67-72.

- Kotzé, S.H. (1988b) The arrangement of the muscle layers at the equine ileocaecal junction. *J. S. Afr. vet. Ass.* 59:67-72.
- Kotzé, S.H. (1988b) The pattern of venous drainage of the equine ileocaecal junction. *J S Afr Vet Assoc.* 59,131-133.
- Kotzé, S.H. and van Aswegen, G. (1990) An immunohistochemical study of various peptide containing endocrine cells and neurones at the equine ileocaecal junction. *Onderstepoort J. vet. Res.* 57:13-17.
- Kotzé, S.H. and van Aswegen, G. (1990) An immunohistochemical study of various peptide containing endocrine cells and neurones at the equine ileocaecal junction. *Onderstepoort J. vet. Res.* 57:13-17.
- Kotzé, S.H., Van Aswegen, G. (1990) An immunohistochemical study of various peptide containing endocrine cells and neurones at the equine ileocaecal junction. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 57:13-17.
- Kreulen, D.L., Peters, S. (1986) Non-cholinergic transmission in a sympathetic ganglion of the guinea-pig elicited by colon distension. *J. Physiol. London.* 374:315–334.
- Krishnamurthy, S., Schuffer, M.D. (1987) Pathology of neuromuscular disorders of the small intestine and colon. *Gastroenterology.* 93:610-39.
- Lacroix, J.S., Stjärne, P., Anggård, A., Lundberg, J.M. (1988) Sympathetic vascular control of the pig nasal mucosa (2): Reserpine-resistant, non-adrenergic nervous responses in relation to neuropeptide Y and ATP. *Acta Physiol Scand.* 133(2):183-97.
- Lalatta-Costerbosa, G., Mazzoni, M., Clavenzani, P., Di Guardo, G., Mazzuoli, G., Marruchella, G., De Grossi, L., Agrimi, U., Chiochetti, R. (2007) Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-d histochemistry in the enteric nervous system of Sarda breed sheep with different PrP genotypes in whole-mount and cryostat preparations. *J Histochem Cytochem.* 55:387-401.
- Langley, J.N., Anderson, H.K. (1895) On the Innervation of the Pelvic and Adjoining Viscera: Part I. The Lower Portion of the Intestine. *J Physiol.* 18:67-105.

- Lee, Y., Hayashi, N., Hillyard, C.J., Girgis, S.I., MacIntyre, I., Emson, P.C., Tohyama, M. (1987) Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive sensory fibers form synaptic contact with sympathetic neurons in the rat celiac ganglion. *Brain Res.* 407:149-151.
- Lee, Y., Hayashi, N., Hillyard, C.J., Girgis, S.I., MacIntyre, I., Emson, P.C., Tohyama, M. (1987) Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive sensory fibers form synaptic contact with sympathetic neurons in the rat celiac ganglion. *Brain Res.* 407:149-151.
- Lenz, H., Blömer, A., Düx, A. (1971) Analysis of the propulsive movements of the small intestine. Cineradiographic and experimental studies. *Am J Dig Dis.* 16(12):1107-15.
- Lester, G.D., Bolton, J.R., Cullen, L.K., Thurgate, S.M. (1992) Effects of general anesthesia on myoelectric activity of the intestine in horses. *Am J Vet Res.* 53(Bertaccini e Coruzzi, 1987):1553-7.
- Lester, G.D., Merritt, A.M., Neuwirth, L., Vetro-Widenhouse, T., Steible, C., Rice, B. (1998) Effect of alpha 2-adrenergic, cholinergic, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on myoelectric activity of ileum, cecum, and right ventral colon and on cecal emptying of radiolabeled markers in clinically normal ponies. *Am J Vet Res. Mar.* 59(3):320-7.
- Li, M.Z., Masuko, S. (1997) Neuronal circuitry between the inferior mesenteric ganglion and lower intestine of the dog. *Arch Histol Cytol.* 60(4):391-404.
- Li, Z.S., Fox-Threlkeld, J.E. and Furness, J.B. (1998) Innervation of intestinal arteries by axons with immunoreactivity for the vesicular acetylcholine transporter VACHT. *J. Anat.* 192:107-117.
- Li, Z.S., Fox-Threlkeld, J.E., Furness, J.B. (1998) Innervation of intestinal arteries by axons with immunoreactivity for the vesicular acetylcholine transporter VACHT. *J Anat.* 192:107-117.
- Li, Z.S., Pham, T.D., Tamir, H., Chen, J.J., Gershon, M.D. (2004) Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci.* 24:1330-1339.
- Li, Z.S., Pham, T.D., Tamir, H., Chen, J.J., Gershon, M.D. (2004) Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci.* 24:1330-9.
- Lim, E.C., Seet R.C. (2007) Botulinum toxin, Quo Vadis? *Med Hypotheses.* 69:718-823.
- Lindh, B., Hökfelt, T., Elfvin, L.G. (1988) Distribution and origin of peptide-containing nerve fibers in the celiac superior mesenteric ganglion of the guinea-pig. *Neuroscience.* 26:1037-71.

- Lindh, B., Hökfelt, T., Elfvin, L.G., Terenius, L., Fahrenkrug, J., Elde, R., Goldstein, M. (1986) Topography of NPY-, somatostatin-, and VIP-immunoreactive, neuronal subpopulations in the guinea pig celiac-superior mesenteric ganglion and their projection to the pylorus. *J Neurosci.* 6:2371-2383.
- Llewellyn Smith, I.J., Furness, J.B., Gibbins, I.L. (1988) Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea-pig small intestine. *J. Comp. Neurol.* 272:139-148.
- Loesch, D.A., Rodgerson, D.H., Haines, G.R. and Watt, B.C. (2002) Jejunoileal anastomosis following small intestinal resection in horses: seven cases (1999- 2001). *J. Am. vet. med. Ass.* 221:541-545.
- Lomax, A.E., O'Reilly, M., Neshat, S. and Vanner, S.J. (2007) Sympathetic vasoconstrictor regulation of mouse colonic submucosal arterioles is altered in experimental colitis. *J. Physiol.* 583:719-730.
- Lomax, A.E., O'Reilly, M., Neshat, S., Vanner, S.J. (2007) Sympathetic vasoconstrictor regulation of mouse colonic submucosal arterioles is altered in experimental colitis. *J Physiol.* 583:719-730.
- Lowe, J.E. (1968) Intussusception in three ponies following experimental enterotomy. *Cornell Vet. Apr*;58(2):288-92.
- Lowe, J.E., Sellers, A.F., Brondum, J. (1980) Equine pelvic flexure impaction: a model used to evaluate motor events and compare drug respons. *Cornell Vet.* 70:401-412.
- Luckensmeyer, G.B., Keast, J.R. (1994) Projections from the prevertebral and major pelvic ganglia to the ileum and large intestine of the male rat. *J Auton Nerv Syst.* 49(3):247-59.
- Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T., Goldstein, M. (1983) High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett.* 42:167-172.
- Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T., Martling, C.R., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J., Bloom, S., Goldstein, M. (1982) Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand.* 116(4):477-480.
- Lundgren, D. (1967) Studies on blood flow distribution and countercurrent exchange in the small intestine. *Acta Physiol Scand (Suppl).* 303:1.

- MacDonald, M.H., Pascoe, J.R., Stover, S.M., Meagher, D.M. (1989) Survival after small intestine resection and anastomosis in horses. *Vet Surg.* 18(6):415-23.
- MacHarg, M.A., Adams, S.B., Lamar, C.H., et al. (1986) Electromyographic, myomechanical, and intraluminal pressure changes associated with acute extraluminal obstruction of the jejunum in conscious ponies. *Am J Vet Res.* 47:7-11.
- Mair, T.S., Lucke, V.M. (2000) Ileal muscular hypertrophy and rupture in a pony three years after surgery for ileocaecal intussusception. *Vet Rec.* 15;146(16):472-3.
- Malone, E.D., Brown, D.R., Trent, A.M. and Turner, T.A. (1996) Influence of adrenergic and cholinergic mediators on the equine jejunum *in vitro*. *Am. J. vet. Res.* 57:884-890.
- Malone, E.D., Brown, D.R., Trent, A.M., Turner, T.A. (1996) Influence of adrenergic and cholinergic mediators on the equine jejunum *in vitro*. *Am. J. Vet. Res.* 57:884-890.
- Malone, E.D., Kannan, M.S. and Brown, D.R. (2000) Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum. *Am. J. vet. Res.* 61:1178-1184.
- Malone, E.D., Kannan, M.S., Brown, D.R. (2000) Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.* 61:1178-1184.
- Malone, E.D., Kannan, M.S., Brown, D.R., Turner, T.A. and Trent, A.M. (1999) Adrenergic, cholinergic, and nonadrenergic-noncholinergic intrinsic innervations of the jejunum in horses. *Am. J. vet. Res.* 60:898-904.
- Malone, E.D., Kannan, M.S., Brown, D.R., Turner, T.A., Trent, A.M. (1999) Adrenergic, cholinergic, and nonadrenergic-noncholinergic intrinsic innervation of the jejunum in horses. *Am. J. Vet. Res.* 60:898-904.
- Malone, E.D., Kannan, M.S., Brown, D.R., Turner, T.A., Trent, A.M. (1999) Adrenergic, cholinergic, and nonadrenergic-noncholinergic intrinsic innervation of the jejunum in horses. *Am J Vet Res.* 60(7):898-904.
- Mann, P.T., Furness, J.B., Pompolo, S., Mäder, M. (1995) Chemical coding of neurons that project from different regions of intestine to the coeliac ganglion of the guinea pig. *J Auton Nerv Syst.* 56:15-25.

- Mason, T.A., Johnston, D.E., Wallace, C.E., Christie, B.A. (1970) Laparotomy in equine colic: A report of thirteen clinical cases. *Aust Vet J.* 46(8):349-55.
- Mason, T.A., Johnston, D.E., Wallace, C.E., Christie, B.A. (1970) Laparotomy in equine colic: A report of thirteen clinical cases. *Aust Vet J.* 46(8):349-55.
- Masuko, S., Chiba, T. (1988) Projection pathways, co-existence of peptides and synaptic organization of nerve fibers in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 253:507-16.
- Matthews, M., Cuello, C. (1982) Substance.P-immunoreactive peripheral branches of sensory
- Matthews, M.R., Cuello, AC. (1984) The origin and possible significance of substance P immunoreactive networks in the prevertebral ganglia and related structures in the guinea-pig. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 306:247-276.
- Mazzuoli G., Mazzoni M., Albanese V., Clavenzani P., Lalatta Costerbosa G., Lucchi M.L., Furness, J.B., Chiocchetti, R. (2007) Morphology and chemical coding of descending and ascending myenteric plexus neurons of sheep ileum. *Anat. Rec.* 290:1480–1491.
- Mazzuoli, G., Mazzoni, M., Albanese, V., Clavenzani, P., Lalatta-Costerbosa, G., Lucchi, M.L., Furness, J.B. and Chiocchetti, R. (2007) Morphology and chemical coding of descending and ascending myenteric plexus neurons of sheep ileum. *Anat. Rec.* 290:1480-1491.
- McCraw, B.M., Slocombe, J.O. (1985) *Strongylus equinus*: development and pathological effects in the equine host. *Can J Comp Med.* 49(4):372-83.
- McGladdery, A.J. (1992) Ultrasonography as an aid to the diagnosis of equine colic. *Equine Vet Educ.* 4:248–251.
- McLean, A.A., Church, S., Dike, T.M., et al. (1991) An alternative approach for treatment of irreducible ileocecal intussusceptions in six horses. *Equine Vet Educ.* 3:10.
- Merighi, A., Kar, S., Gibson, S.J., Ghidella, S., Gobetto, A., Peirone, S., Polak, J.M. (1990) The immunocytochemical distribution of seven peptides in the spinal cord and dorsal root ganglia of horse and pig. *Anat Embryol (Berl).* 181:271-280.

- Merighi, A., Kar, S., Gibson, S.J., Ghidella, S., Gobetto, A., Peirone, S., Polak, J.M. (1990) The immunocytochemical distribution of seven peptides in the spinal cord and dorsal root ganglia of horse and pig. *Anat Embryol (Berl)*.181:271-280.
- Merritt, A.M., Panzer, R.B., Lester, G.D., Burrow, J.A. (1995) Equine pelvic flexure myoelectric activity during fed and fasted states. *Am J Physiol*. 269(2 Pt 1):G262-8.
- Messenger, J.P., Anderson, R.L., Gibbins, I.L. (1999) Neurokinin-1 receptor localisation in guinea pig autonomic ganglia. *J Comp Neurol*. 412:693-704.
- Milne, E.M., Fintl, C., Hudson, N.P., Pearson, G.T., Mayhew, I.G., Hahn, C.N. (2005) Observations on the interstitial cells of Cajal and neurons in a recovered case of equine dysautonomia grass sickness. *J. Comp. Pathol*. 133:33-40.
- Milne, E.M., Fintl, C., Hudson, N.P., Pearson, G.T., Mayhew, I.G. and Hahn, C.N. (2005) Observations on the interstitial cells of Cajal and neurons in a recovered case of equine dysautonomia grass sickness. *J. comp. Pathol*. 133:33-40.
- Mitznegg, P., Bloom, S.R., Christafides, N., et al. (1976) Relas of motilin in man. *Scand J Gastroenterology*. 11:53.
- Mongardi Fantaguzzi, C., Thacker, M., Chiocchetti, R., Furness, J.B. (2009) Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse small intestine. *Cell and Tissue Research* (in press).
- Morris, J.L., Gibbins, I.L., Holmgren, S. (1992) Galanin is more common than NPY in vascular sympathetic neurons of the brush-tailed possum. *Regul Pept*. 37:101-109.
- Morris, J.L., König, P., Shimizu, T., Jobling, P., Gibbins, I.L. (2005) Most peptide-containing sensory neurons lack proteins for exocytotic release and vesicular transport of glutamate. *J Comp Neurol*. 483:1-16.
- Morton, A.J., Blikslager, A.T. (2002) Surgical and postoperative factors influencing short-term survival of horses following small intestinal resection: 92 cases (1994-2001). *Equine Vet J*. 34(5):450-4.
- Munro, A.F. (1951) The effect of adrenaline on the guinea-pig intestine. *J Physiol*. 112:84-94.

Murray, A., Pearson, G.T., Cottrell, D.F. (1997) Light microscopy of the enteric nervous system of horses with or without equine dysautonomia grass sickness: its correlation with the motor effects of physostigmine. *Vet. Res. Commun.* 21:507-520.

Murray, M.J., Parker, G.A., White, N.A. (1988) Megacolon with myenteric hypoganglionosis in a foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192:917-919.

Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., Aoki, E. (2001) L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* 10:336-340.

Nasu, T., Sueishi, A., Morimoto, M. (2003) Neuropeptide distribution in the stellate ganglia of the domestic animal. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 94:338-46.

neurons innervate guinea pig sympathetic neurons. *Proc. NatL Acad Sci USA.* 79:1668-1672

New York: Taylor & Francis. p 213-294.

Nishizaki, K., Nakao, K., Ishii, H., Yamanaka, H., Tokunaga, A., Nakagawa, K., Yamamura, T., Noguchi, K. (2003) Induction of neuronal nitric oxide synthase by sympathetic denervation is mediated via alpha 2-adrenoceptors in the jejunal myenteric plexus. *Brain Res.* 7;965(1-2):121-9

Nishizaki, K., Nakao, K., Ishii, H., Yamanaka, H., Tokunaga, A., Nakagawa, K., Yamamura, T., Noguchi, K. (2003) Induction of neuronal nitric oxide synthase by sympathetic denervation is mediated via alpha 2-adrenoceptors in the jejunal myenteric plexus. *Brain Res.* 7;965(1-2):121-9.

Nunn, F.G., Pirie, R.S., McGorum, B., Wernery, U., Poxton, I.R. (2007) Preliminary study of mucosal IgA in the equine small intestine: specific IgA in cases of acute grass sickness and controls. *Equine Vet. J.* 39:457-460.

Okamura, H., Umehara, K., Tadaki, N., Hisa, Y., Esumi, H., Ibata, Y. (1995) Sympathetic preganglionic neurons contain nitric oxide synthase and project to the superior cervical ganglion: combined application of retrograde neuronal tracer and NADPH-diaphorase histochemistry. *Brain Res Bull.* 36:491-4.

Oku, R., Satoh, M., Fujii, N., et al. (1987) Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res.* 403:350-354.

- Pairet, M., Ruckebusch, Y. (1989) On the relevance of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the prevention of paralytic ileus in rodents. *J Pharm Pharmacol.* 41(11):757-61.
- Palmer, J.M., Schemann, M., Tamura, K. and Wood, J.D. (1986) Calcitonin generelated peptide excites myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 132:163-170.
- Palmer, J.M., Schemann, M., Tamura, K., Wood, J.D. (1986) Calcitonin gene-related peptide excites myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 132:163–170.
- Pankowski, R.L. (1987) Small intestinal surgery in the horse: A review of ileo and jejunocecostomy. *J Am Vet Med Assoc.* 190:1608.
- Parker, J.E., Fubini, S.L., Todhunter, R.J. (1989) Retrospective evaluation of repeat celiotomy in 53 horses with acute gastrointestinal disease. *Vet Surg.* 18(6):424-31.
- Paton, W.D., Vizi, E.S. (1969) The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol.* 35:10-28.
- Pearson, G.T. (1994) Structural organization and neuropeptide distributions in the equine enteric nervous system: an immunohistochemical study using whole-mount preparations from the small intestine. *Cell Tissue Res.* 276:523-534.
- Pearson, G.T. (1994) Structural organization and neuropeptide distributions in the equine enteric nervous system: an immunohistochemical study using wholemout preparations from the small intestine. *Cell. Tissue. Res.* 276:523-534.
- Pearson, H., Pinsent, P.J., Denny, H.R. and Waterman, A. (1975) The indications for equine laparotomy – an analysis of 140 cases. *Equine vet. J.* 7:131-136.
- Pearson, H., Pinsent, P.J., Denny, H.R., Waterman, A. (1975) The indications for equine laparotomy – an analysis of 140 cases. *Equine Vet. J.* 7:131-136.
- Pfannkuche, H., Schemann, M., Gäbel, G. (2002) Ruminal muscle of sheep is innervated by non polarized pathways of cholinergic and nitregric myenteric neurones. *Cell Tissue Res.* 309:347–354.
- Phillips, R.J., Powley, T.L. (2007) Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton. Neurosci.* 136:1-19.

- Phillips, R.J., Rhodes, B.S., Powley, T.L. (2006) Effects of age on sympathetic innervation of the myenteric plexus and gastrointestinal smooth muscle of Fischer 344 rats. *Anat Embryol.* 211:673–683.
- Phillips, T.J., Walmsley, J.P. (1993) Retrospective analysis of the results of 151 exploratory laparotomies in horses with gastrointestinal disease. *Equine Vet J.* 25(White e Lessard, 1986):427–431.
- Pogson, D.M., Doxey, D.L., Gilmour, J.S., Milne, E.M., Chisholm, H.K. (1992) Autonomic neurone degeneration in equine dysautonomia grass sickness. *J. Comp. Pathol.* 107:271-283.
- Polak, J.M., Heitz, P., Pearse, A.G. (1976) Differential localisation of substance P and motilin. *Scand J Gastroenterol (Suppl).* 39:39-42.
- Posser, C.L., Bartoff, A. (1968) Electrical activity of intestinal muscle under in vitro conditions. *In* Code CF (Ed), *Handbook of Physiology.* Washington, DC, Am Physiol Soc. p 2025.
- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J. (1998) Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet J.* 30(3):194-9.
- Proudman, C.J., Smith, J.E., Edwards, G.B., French, N.P. (2002) Long-term survival of equine surgical colic cases. Part 2: modelling postoperative survival. *Equine Vet J.* 34(5):438-43.
- Purves, D., Snider, W.D., Voyvodic, J.T. (1988) Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature.* 336:123-128.
- Quinson, N., Robbins, H.L., Clark, M.J., Furness, J.B. (2001) Locations and innervation of cell bodies of sympathetic neurons projecting to the gastrointestinal tract in the rat. *Arch Histol Cytol.* 64:281-94.
- Rakestraw, P.C., Snyder, J.R., Woliner, M.J., Sanders, K.M. and Shuttleworth, C.W. (1996) Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in equine jejunum. *Am. J. vet. Res.* 57,1206-1213.
- Rakestraw, P.C., Snyder, J.R., Woliner, M.J., Sanders, K.M., Shuttleworth, C.W. (1996) Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.* 57:1206-1213.

- Rakestraw, P.C., Snyder, J.R., Woliner, M.J., Sanders, K.M., Shuttleworth, C.W. (1996) Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in equine jejunum. *Am J Vet Res.* 57(Horowitz, 1999):1206-13.
- Re, G., Belloli, C., Badino, P., Arioli, F., Novelli, A., Girardi, C., Beretta, C. (1997) Identification of beta-adrenergic receptor subtypes mediating relaxation in isolated equine ileum. *Am J Vet Res.* 58(6):621-5.
- Reef, V.B. (1998) *Equine Diagnostic Ultrasound*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders. p 273–363.
- Rendle, D.I., Woodt, J.L., Summerhays, G.E., Walmsley, J.P., Boswell, J.C. and Phillips, T.J. (2005) End-to-end jejuno-ileal anastomosis following resection of strangulated small intestine in horses: a comparative study. *Equine vet. J.* 37,356-359.
- Rhodin, J.A. (1974) *Histology, A text and atlas*. New York, Oxford press. p 554.
- Roger, T., Malbert, C.H. (1989) Caracteristiques anatomo-fonctionnelles de la jonction ileocaecale du poney. *Revue de Medecine Veterinaire.* 140:8-9,851-855.
- Roger, T., Malbert, C.H. and Ruckebusch, Y. (1990) Functional role of the equine ileocecal sphincter. *J. Gastrointest. Motil.* 2:224-229.
- Roger, T., Malbert, C.H., Ruckebusch, Y. (1990) Functional role of the equine ileocecal sphincter. *J Gastrointest Motil.* 2:224–229.
- Rooney, J.R. and Jeffcott, L.B. (1968) Muscular hypertrophy of the ileum in a horse. *Vet. Rec.* 83:217-219.
- Rooney, J.R., Jeffcott L.B. (1968) Muscular hypertrophy of the ileum in a horse. *Vet. Record.* 83:217-219.
- Ross, M.W. (1989) Surgical diseases of the equine cecum. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.* 2:363-375.
- Ross, M.W., Cullen, K.K., Rutkowski, J.A. (1990) Myoelectric activity of the ileum, cecum, and right ventral colon in ponies during interdigestive, nonfeeding, and digestive periods. *Am J Vet Res.* 51(4):561-6.

- Ross, M.W., Donawick, W.J., Sellers, A.F., Lowe, J.E. (1986) Normal motility of the cecum and right ventral colon in ponies. *Am J Vet Res.* 47(8):1756-62.
- Ross, M.W., Martin, B.B., Donawick, W.J. (1985) Cecal perforation in the horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1;187(3):249-53.
- Ross, M.W., Rutkowski, J.A., Cullen, K.K. (1989) Myoelectric activity of the cecum and right ventral colon in female ponies. *Am J Vet Res.* 50(3):374-9.
- Rothstein, R.D., DeRiso, J., Ouyang, A. (1990) Ileocecal sphincter contraction to colonic distension: a tachykinin-mediated spinal reflex. *Am J Physiol.* 258:G585-G590.
- Ruckebusch, Y., Fioramonti, J. (1980) Colonic myoelectrical spiking activity: major patterns and significance in six different species. *Zentralbl Veterinarmed A.* 27(1):1-8.
- Rühl, A. (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 17:777–790.
- Sang, Q., Williamson, S., Young, H.M. (1997) Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. *J. Anat.* 190 (209–222).
- Savidge, T.C., Sofroniew, M.V., Neunlist, M. (2007) Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab. Invest.* 87:731-736.
- Schemann, M., Sann, H., Schaf, C., Mäder, M. (1983) Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am. J. Physiol.* 265:G1005-G1009.
- Scheuermann, D.W., Stach, W., De Groodt-Lasseel, M.H., Timmermans J.P. (1987) Calcitonin gene-related peptide in morphologically well-defined type II neurons of the enteric nervous system in the porcine small intestine. *Acta Anat.* 129:325–328.
- Schummer, A. (1953) Morphologische untersuchungen über die funktionzustände del ileums. *Tierärztliche Umschau* 8:244-247.
- Schummer, A., Nickel, R., Sack, W.O. (1979) Viscera of the domestic mammal. *New York, Springer Verlag.* p185
- Schummer, A., Nickel, R., Sack, W.O. (1979b) Viscera of the domestic mammal. *New York, Springer Verlag.* p188.

- Schusser, G.F., White, N.A. (1994) Density of myenteric plexuses and neurons in the large and transverse colon of one-day-old foals. *Equine Vet. J.* 26:337-339.
- Scott, E.A., Todhunter, R. (1985) Chronic intestinal intussusception in two horses. *J Am Vet Med Assoc.* 15;186(4):383-5.
- Scott, E.A., Todhunter, R. (1985) Chronic intestinal intussusception in two horses. *J Am Vet Med Assoc.* 15;186(4):383-5.
- Sellers, A.F., Lowe, J.E., Cummings, J.F. (1985) Trials of serotonin, substance P and alpha 2 adrenergic receptor effects on the equine large colon. *Cornell Vet.* 75(2):319-23.
- Sellers, A.F., Lowe, J.E., Rendano, V.T., et al (1982) The reservoir function of the equine cecum and ventral large colon: Its relation to chronic nonsurgical obstructive disease with colic. *Cornell Vet.* 75:233.
- Semevolos, S.A., Ducharme, N.G., Hackett, R.P. (2002) Clinical assessment and outcome of three techniques for jejunal resection and anastomosis in horses: 59 cases (1989-2000). *J Am Vet Med Assoc.* 15;220(2):215-8.
- Shikata, J., Shidea, T., Amino K., et al. (1973) Experimental studies on the hemodynamics of the small intestine following increase in intraluminal pressure. *Surg Gynecol Obstet.* 156:155.
- Singaram, C., Ashraf, W., Gaumnitz, E.A., Torbey, C., Sengupta, A., Pfeiffer, R., Quigley, E.M. (1995) Dopaminergic defect of enteric nervous system in parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet.* 346(8979):861-4.
- Sisson, S., Grossman, J.D. (1953) The anatomy of the domestic animal. Philadelphia, W.B. Saunders Company. p 421.
- Sisson, S., Grossman, J.D. (1953b) The anatomy of the domestic animal. Philadelphia, W.B. Saunders Company. p 483.
- Sjöqvist, A., Hallerbäck, B., Glise, H. (1985) Reflex adrenergic inhibition of colonic motility in anesthetized rat caused by nociceptive stimuli of peritoneum. An alpha 2-adrenoceptor-mediated response. *Dig Dis Sci.* 30(Horowitz, 1999):749-54.

- Sonea, I.M., Wilson, D.V., Bowker, R.M., Robinson, N.E. (1997) Tachykinin receptors in the equine pelvic flexure. *Equine Vet J.* 29(4):306-12.
- Spanner, R. (1932) Neue befunde über die blutwege der darmwand und ihre funktionelle bedeutung. *Morph Jb.* 69:394.
- Stanghellini, V., De Giorgio, R., Corinaldesi, R. (1966) Neural control of intestinal motility. In: Barbara L, Editor. *Chronic Constipation*. London: WB Saunders. p 51-64.
- Stephen, J.O., Corley, K.T., Johnston, J.K., Pfeiffer, D. (2004) Small intestinal volvulus in 115 horses: 1988-2000. *Vet Surg.* 33(4):333-9.
- Sternini, C. (1991) Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 298:39–51.
- Sternini, C. (1996) Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 298:39-51.
- Summers, R.W., Dusdieker, N.S. (1981) Patterns of spike burst spread and flow in the canine small intestine. *Gastroenterology.* 81(4):742-50.
- system. In: Brookes, S., Costa, M., eds. (2002) *Innervation of the Gastrointestinal Tract*. London,
- Szurszewski, J.H. (1969) A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol.* 217:1757-63.
- Szurszewski, J.H. (1981) Physiology of mammalian prevertebral ganglia. *Annu. Rev. Physiol.* 43:53–68.
- Szurszewski, J.H., Miller, S.M. (1994) Physiology of prevertebral ganglia. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press p 795–877.
- Timmermans, J.P., Barbiers, M., Scheuermann, D.W., Stach, W., Adriaensen, D., DeGroot-Lasseel, M.H.A. (1993) Occurrence distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tiss Res.* 272: 49–58.
- Timmermans, J.P., Scheuermann, D.W., Barbiers, M., Adriaensen, D., Stach, W., Van Hee, R., De Groot-Lasseel, M.H. (1992) Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the human small intestine. *Acta Anat.* 143:48–53.

Tonini, M., De Ponti, F., Frigo, G., Crema, F. Pharmacology of the enteric nervous

Türler, A., Moore, B.A., Pezzone, M.A., Overhaus, M., Kalff, J.C., Bauer, A.J. (2002) Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann Surg.* 236(1):56-66.

Vachon, A.M., Fisher, A.T. (1995) Small intestinal herniation through the epiploic foramen: 53 cases (1987-1993). *Equine Vet J.* 27:373.

Vanner, S. (1994) Co-release of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in the guinea-pig ileum. *Am. J. Physiol.* 267:650–655.

Vanner, S. (1994) Co-release of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in the guinea-pig ileum. *Am. J. Physiol.* 267:650-655.

Vanner, S. and Surprenant, A. (1996) Neuronal reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am. J. Physiol.* 271:223-230.

Vanner, S., Surprenant, A. (1996) Neuroal reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 271:223-230.

Vantrappen, G., Janssens, J., Peeters, T.L., Bloom, S.R., Christofides, N.D., Hellemans, J. (1979) Motilin and the interdigestive migrating motor complex in man. *Dig Dis Sci.* 24(7):497-500.

Vasey, J.R. (1988) Incarceration of the small intestine in the epiploic foramen in fifteen horses. *Can Vet J.* 29:378.

Vatistas, N.J., Snyder, J.R., Wilson, W.D., Drake, C., Hildebrand, S. (1996) Surgical treatment for colic in the foal (67 cases): 1980-1992. *Equine Vet J.* 28(2):139-45.

Vonderfecht, S.L., Bowling, A.T., Cohen, M. (1983) Congenital intestinal aganglionosis in white foals. *Vet. Pathol.* 20:65-70.

Vulchanova, L., Casey, M.A., Crabb, G.W., Kennedy, W.R., Brown, D.R. (2007) Anatomical evidence for enteric neuroimmune interactions in Peyer's patches. *J. Neuroimmun.* 185:64–74.

Watson, D.W., Sodeman, W.A. (1974) The small intestine. In Sodeman WA, Sodeman WA Jr (Eds), Pathologic physiology, mechanism of disease. Philadelphia, W.B. Saunders Company. P 734.

- Weidemen, M. (1963) Patterns of the arteriovenous pathways. *In* Hamilton WF (Ed), Handbook of physiology. Washington, DC, Am Physiol Soc. p 891.
- White, N.A., Lessard, P. (1986) Risk factors and clinical signs associated with cases of equine colic. *Proc Am Assoc Equine Pract.* 32:637-644.
- Wienbreck, M., Ereckenbrecht, J. (1982) The control of gastrointestinal motility by GI hormones. *Clin Gastroenterol.* 11:523.
- Willis, W.D., Coggeshall, R.E. (1978) Sensory mechanisms of the spinal cord. John Wiley & Sons, Inc., New York. p. 165
- Wilson, T.H. (1962) Intestinal absorption. Philadelphia, W.B. Saunders Company. p 134.
- Wingate ,D.L., Ruppin, H., Green, W.E., Thompson, H.H., Domschke, W., Wunsch, E., Demling, L., Ritchie, H.D. (1976) Motilin-induced electrical activity in the canine gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol (Suppl).* 39:111-8.
- Wood, J.D. (2000) Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system. *Chin J Physiol.* 31;43(1):48.
- Wright, H.K., O'Brien, J.J., Tilsen, M.D. (1971) Water absorption in experimental cloud segment obstruction in man. *Am J Surg.* 121:G6.
- Yamamoto, H., Kuwahara, A., Yamamoto, I. (1999) Motor activity of vascularly perfused rat duodenum. 1. Characteristics of spontaneous movement. *Neurogastroenterol. Motil.* 11:227-234.
- Zheng, Z.L., Travagli, R.A., Kreulen, D.L. (1999) Patterns of innervation of sympathetic vascular neurons by peptide-containing primary sensory fibers. *Brain Research.* 827:113-121.
- Zittel, T.T., Meile, T., Hüge, A., Kreis, M.E., Becker, H.D., Jehle, E.C. (2001) Preoperative intraluminal application of capsaicin increases postoperative gastric and colonic motility in rats. *J Gastrointest Surg.* 5(5):503-13.

