

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO di RICERCA in
Psicologia Generale e Clinica

M-PSI/08 Ciclo XXIII

Applicazione della neurodiagnostica avanzata
allo studio dei disturbi psicologici
nelle malattie infiammatorie croniche intestinali

Presentata da: ALESSANDRO AGOSTINI

Coordinatore Dottorato

Professoressa PIERA CARLA CICOGNA

Relatore

Professor MAURO ERCOLANI

Esame finale anno 2011

Abbreviazioni usate nel testo

ACC anterior cingulate cortex

ACH acetilcolina

ACTH ormone corticotropo

Amy amigdala

ANOVA analisi della varianza

BGA brain-gut axis

BOLD blood oxigen level dependent

CAI colitis activity index

CC corteccia cingolata

CD Crohn's disease

CDAI crohn disease activity index

CE central nucleus of amygdala

Cereb cervelletto

CRH corticotropin releasing hormon

DMN dorsal motor nucleus

EEG encefalo elettro grafia

ENS enteric nervous system

fMRI functional magnetic resonance imaging

GC glucocorticoidi

GLM general linear model

GM grey matter

HC ippocampo

HPA axis hypothalamus pituitary adrenal axis

Hypo ipotalamo

IAPS international affective picture system

IBD inflammatory bowel disease

Ins insula

LA lateral nucleus of the amygdala

LC locus ceruleus

MC morbo di Crohn

MCC corteccia cingolata media

MEG magneto elettro grafia

MG materia grigia

MICI malattie infiammatorie croniche intestinali

MTL medial temporal lobe

NA noradrenalina

PANAS positive and negative affective schedule

PFC corteccia prefrontale

PSQ perceived stress questionnaire

PTSD post traumatic stress disorder

Put putamen

PVN paraventricular nucleus

RCU retto colite ulcerosa

RM risonanza magnetica

RN nuclei del rafe

ROI region of interest

SL sistema limbico

SMA sistema medullo adrenale

SNA sistema nervoso autonomo

SNC sistema nervoso centrale

SNP sistema nervoso parasimpatico

SNS sistema nervoso simpatico

SQ symptoms questionnaire

STAI state and trait anxiety index

TE eco time

TNF tumor necrosis factor

TR repetition time

UC ulcerative colitis

VAS visual analogue scale

VBM voxel based morphometry

Indice

Introduzione.....	pagina 6
La retto colite ulcerosa.....	pagina 9
Il morbo di Crohn.....	pagina 12
Lo stress.....	pagina 15
Il ruolo centrale del cervello nello stress.....	pagina 18
La risonanza magnetica funzionale.....	pagina 20
Modificazioni funzionali cerebrali in pazienti con retto colite ulcerosa: uno studio sull'elaborazione nervosa delle emozioni valutata con risonanza magnetica funzionale.....	pagina 27
L'impatto dello stress sulla malattia infiammatoria: uno studio di risonanza magnetica funzionale sull'elaborazione cerebrale dello stress e l'abituazione in pazienti con morbo di Crohn.....	pagina 41
Alterazioni morfologiche cerebrali in pazienti con morbo di Crohn: uno studio sul coinvolgimento del cervello nelle malattie infiammatorie croniche intestinali.....	pagina 57
Bibliografia.....	pagina 65

Appendice

Agostini A, Rizzello F, Ravegnani G, et al. Parental Bonding and Inflammatory Bowel Disease. *Psychosomatics*. 2010; 51:14 –21.

Agostini A, Rizzello F, Ravegnani G, et al. Adult attachment and early parental experiences in patients with Crohn's Disease. *Psychosomatics*. 2010; 51:208 –215.

Introduzione

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) sono patologie idiopatiche, infiammatorie, che comprendono il morbo di Crohn (MC) e la retto colite ulcerosa (RCU). Si calcola che in Italia siano presenti oltre 100.000 pazienti affetti da MICI dei quali circa 40.000 affetti da MC e 60.000 da RCU. La prevalenza è di 13-15 nuovi casi l'anno su 100.000 abitanti. L'eziologia delle MICI è tuttora sconosciuta mentre, dal punto di vista fisiopatologico, è stato chiarito che alla base della patologia esiste una disregolata attività del sistema immunitario con un considerevole aumento di citochine infiammatorie prodotte in larga parte da cellule immunitarie quali i macrofagi e i polimorfonucleati neutrofili. Le MICI esordiscono di norma attorno alla seconda o terza decade mentre l'andamento cronico della patologia è caratterizzato dall'alternarsi di fasi di malattia attiva a fasi di remissione clinica in cui il paziente non presenta segni evidenti di malessere. La comparsa, la durata temporale e la gravità delle recidive di malattia non sono prevedibili. I sintomi delle MICI sono innanzitutto diarrea mucosanguinolenta, dolore addominale, febbre, malassorbimento e calo ponderale. Inoltre una serie di manifestazioni extraintestinali può aggravare il quadro clinico. In corso di malattia possono infatti essere colpiti la cute (eritema nodoso), l'occhio (uveite ed episclerite), le articolazioni (artralgie e spondiliti), il fegato (colangite sclerosante). La terapia medica delle MICI è volta a spegnere la flogosi intestinale e a mantenere lo stato di remissione. Non è escluso il ricorso alla chirurgia che può variare da resezione intestinale con anastomosi alla colectomia o, nei casi più severi, al confezionamento di stomia.

Le MICI si associano con notevole frequenza a sintomi di disagio psicologico di gravità variabile. La presenza di disturbi dell'umore (depressione) e disturbi d'ansia nei pazienti affetti è stata più volte descritta e ribadita. Generalmente l'insorgenza di questi disturbi è ritenuta secondaria alla presenza della condizione medica. La cronicità della malattia, il suo insorgere in età giovanile, l'andamento clinico capriccioso ed imprevedibile, i sintomi che impattano fortemente sulla qualità della vita dei pazienti, la minaccia di ospedalizzazione o di interventi chirurgici, sono ritenuti un insieme di fattori che determina l'insorgenza dei sintomi di disturbi psicologici. D'altra parte la malattia cronica è ritenuta di per sé una condizione depressogena: nel DSM IV infatti, all'interno

dei disturbi dell'umore, viene annoverata e descritta la depressione da cause mediche. Mentre la relazione causale che conduce dalla malattia cronica ai disturbi psicologici trova oggi un ampio consenso, ancora controverso appare il ruolo che lo stress psicologico può giocare nel decorso, o anche nell'insorgenza, della malattia. Negli anni cinquanta del Novecento le MICI vennero definite malattie psicosomatiche, intendendo che specifici conflitti psicologici, o particolari condizioni stressanti, potessero determinare l'insorgenza della malattia infiammatoria cronica. Attualmente, nonostante la teoria eziologica psicosomatica sia stata accantonata, un notevole numero di ricerche si è concentrato sulla relazione fra stress ed infiammazione. L'associazione fra esacerbazioni infiammatorie e periodi particolarmente stressanti risulta infatti un dato ampiamente confermato dall'osservazione clinica dei pazienti. I meccanismi nervosi ed infiammatori che possono rendere possibile questa associazione rappresentano il campo di indagine probabilmente più interessante per i ricercatori che si occupano di stress psicologico e malattia somatica. D'altra parte, il progredire delle conoscenze neuroscientifiche della neurofisiologia delle emozioni e dello stress e le opportunità offerte dalla neurodiagnostica avanzata (neuroimaging) hanno aperto nuove ed affascinanti opportunità per la ricerca e hanno reso oggi possibile notevoli passi in avanti nella comprensione dei meccanismi sottesi alla complessa relazione fra stress e manifestazioni infiammatorie delle MICI.

In questo progetto di ricerca abbiamo utilizzato in un primo momento strumenti psicometrici ed in seguito tecniche di neuroimaging quali la risonanza magnetica funzionale (fMRI). Abbiamo condotto uno studio sul rapporto fra MICI, stress e attaccamento passato (1) ed uno fra MC, stress ed attaccamento attuale (2). Abbiamo quindi realizzato un protocollo fMRI per la valutazione delle emozioni che abbiamo applicato in uno studio caso-controllo che ha coinvolto pazienti con RCU. Infine abbiamo sviluppato un protocollo fMRI che ci ha permesso di studiare la risposta allo stress in pazienti con MC e controlli sani. In questo contesto abbiamo inoltre condotto uno studio di morfometria cerebrale basata sull'analisi dei voxel (voxel based morphometry, VBM) al fine di valutare potenziali differenze morfometriche cerebrali fra pazienti con MC e soggetti sani.

Nelle pagine seguenti vengono descritti sinteticamente le MICI, i concetti alla base della fMRI ed i fondamenti della neurofisiologia dello stress. Infine sono presentati i protocolli

sperimentali, i risultati e le conclusioni degli studi di fMRI applicati alle MICI che sono stati condotti nel contesto di questo progetto di ricerca.

Retto Colite Ulcerosa

Definizione

La retto colite ulcerosa (RCU) è un processo infiammatorio cronico recidivante che coinvolge la mucosa e la sottomucosa del colon. La malattia può interessare solo il retto (proctite), può estendersi fino alla flessura splenica (colite sinistra o distale) o interessare quasi interamente o l'intero colon (colite subtotale o pancolite).

Epidemiologia

La RCU è presente in tutte le regioni del mondo ma la più alta incidenza si registra nelle aree maggiormente sviluppate (America del nord e l'Europa occidentale).

L'incidenza indicata nei vari studi epidemiologici varia da 5 a 18 casi per 100.000 abitanti. In queste zone, nelle ultime due decadi la RCU ha mantenuto un'incidenza relativamente costante. Recenti studi eseguiti in Italia indicano un discreto aumento dell'incidenza negli ultimi 20 anni. Attualmente nel nostro paese si registrano 9 casi per 100.000 abitanti. L'esordio della malattia può avvenire in tutte le età con un picco di incidenza nella seconda o terza decade ed inoltre intorno ai 60 anni. L'aspettativa di vita dei pazienti con RCU è sostanzialmente uguale a quella attesa nella popolazione generale.

Eziologia, patogenesi e Fisiopatologia

L'eziologia della RCU rimane ancora sconosciuta. Le teorie eziologiche attualmente con maggior credito ipotizzano la presenza di uno specifico agente infettivo patogeno, la presenza di una difettosa barriera mucosale (alterazioni del muco, della permeabilità o della riparazione epiteliale), la presenza di una risposta disregolata del sistema immune mucosale a stimoli normalmente presenti.

Quindi, resta ancora aperto il quesito fisiopatologico principale, ovvero il processo infiammatorio cronico ricorrente è conseguente ad una normale risposta ad un persistente stimolo anormale o, viceversa ad una risposta abnormemente prolungata ed aggressiva ad uno stimolo normale. In ogni caso, i componenti del contenuto luminale rappresentano il drive antigenico persistente, in grado di indurre e perpetuare il processo infiammatorio cronico intestinale.

Aspetti anatomopatologici, endoscopici ed istologici

Nei pazienti, a livello colico, si possono evidenziare macroscopicamente delle ulcerazioni che possono variare da piccole erosioni superficiali fino ad ampie aree di completa perdita della mucosa che, talvolta perimetrano delle isole polipoidi di mucosa infiammata ma intatta. Dopo la risoluzione di un attacco severo, i processi riparatori mucosali possono avvenire in modo irregolare e dar luogo alla formazione di estroflessioni della mucosa definite “pseudopolipi infiammatori”.

Microscopicamente, la mucosa mostra un diffuso infiltrato di linfociti e plasmacellule con congestione dei capillari. È presente un elevato numero di neutrofilii che si dispongono soprattutto nel lume delle cripte formando i cosiddetti “ascessi criptici” ed inoltre una riduzione del numero delle cellule caliciformi con distorsione ghiandolare.

Decorso clinico e diagnosi

Clinicamente, la RCU presenta un andamento caratterizzato da periodi di riaccensione infiammatoria alternati a periodi di remissione di lunghezza variabile. La manifestazione clinica più evidente è data dalla modificazione dell'alvo, con aumento del numero delle evacuazioni presenti anche durante il riposo notturno, ma con emissione di scarso materiale fecale, in genere di tipo muco-ematico. La diarrea si accompagna a dolore addominale, calo ponderale.

Diagnostica per immagini

L'endoscopia costituisce l'esame fondamentale per questi pazienti. All'esordio dei sintomi, consente di giungere alla diagnosi sia attraverso l'esame dell'aspetto macroscopico, sia attraverso l'esame istologico effettuato su frustoli della mucosa. Nel follow up del paziente inoltre, permette di stabilire due criteri fondamentali per un corretto approccio terapeutico: i) l'attività endoscopica della malattia, che talora è presente anche in assenza di sintomi (remissione clinica), ii) l'entità del coinvolgimento del colon. L'attività endoscopica può essere suddivisa in 4 gradi di severità.

L'estensione del processo infiammatorio nei diversi segmenti del viscere permette la distinzione in:

- 1- Proctite: malattia estesa ai primi 15 cm dal margine anale
- 2- Retto-sigmoidea: malattia estesa sino alla giunzione sigma-discendente
- 3- Colite sinistra: malattia estesa fino e non oltre la flessura splenica

4- Colite totale o sub-totale: coinvolgimento di tutto o quasi tutto il colon

L'aspetto endoscopico più caratteristico della RCU è dato da: i) eritema, ii) friabilità, iii) granulosità e perdita dell'architettura vascolare normale. Nelle forme più severe si evidenziano erosioni e ulcerazioni talora ampie e confluenti fra loro, fino a conferire un aspetto detto a "carta geografica".

La radiologia rimane ancora fondamentale per la diagnosi e il follow up dei pazienti. Lo studio radiologico della cornice colica con doppio contrasto permette la diagnosi e la valutazione dell'estensione della malattia, evidenziando:

- granulosità della mucosa, dovuta all'edema ed all'iperemia, che conferisce al film di bario sovrapposto, un aspetto come di "strato di sabbia"
- ulcerazioni superficiali che tendono a confluire fra loro, coinvolgendo tutta la mucosa o che si approfondano nello spessore della parete intestinale
- pseudopolipi e tubulizzazione del viscere

La radiografia diretta dell'addome è una spia fondamentale nelle fasi di attività severa della malattia, per una valutazione prognostica.

La presenza di due o più anse ileali dilatate rappresenta un segno prognostico sfavorevole. La dilatazione acuta del colon (megacolon tossico) rappresenta una complicazione particolarmente seria della malattia e pone l'indicazione assoluta al trattamento chirurgico.

L'ecografia è utile soprattutto nelle forme severe. La valutazione ecografica dello spessore della parete colica può fornire ulteriori dati nella valutazione della scelta terapeutica medica o chirurgica.

La terapia

Lo scopo della terapia medica è di spegnere il processo infiammatorio nelle fasi di attività e prevenire le ricadute una volta raggiunta la remissione. Come già accennato, si prendono in considerazione due criteri fondamentali per un corretto approccio terapeutico: i) l'esatta estensione del processo infiammatorio, ii) il grado di severità dell'attacco.

Morbo di Crohn

Definizione

Descritto dal chirurgo tedesco Crohn negli anni trenta del Novecento, il morbo di Crohn (MC) è un processo infiammatorio cronico recidivante che coinvolge l'intera parete dell'intestino.

Epidemiologia

Il MC colpisce in età giovanile: in media, infatti, l'età di insorgenza è attorno alla terza decade anche se sono descritti casi diagnosticati nell'infanzia o dopo i 60 anni. Pur essendo meno diffusa della RCU, la malattia di Crohn appare in continua ascesa nei paesi occidentali. Nel novero dei paesi industrializzati, in Italia ogni anno si registrano 5-6 nuovi casi ogni centomila abitanti, mentre in Scandinavia e Nord Europa, Australia e Stati Uniti si registrano tassi di incidenza ancora maggiori. Da segnalare un lieve sbilanciamento nell'incidenza della malattia verso il sesso femminile, che è colpito con una frequenza maggiore rispetto agli uomini (1,2:1).

Eziologia

Le cause del MC sono ancora sconosciute. Le attuali teorie eziologiche ritengono che sia possibile che, accanto a fattori intrinseci genetici, possano svolgere un ruolo favorente all'insorgenza della patologia la polluzione alimentare, alterazioni infettive e prodotti di degrado alimentare. Esiste una predisposizione familiare maggiore rispetto alla RCU: il 15-20% dei malati ha un parente stretto affetto dalla malattia. Inoltre sono stati valutati e studiati negli anni molti microrganismi ritenuti possibili responsabili della comparsa della malattia (la cosiddetta ipotesi infettiva). Ad oggi prove certe a supporto di questa ipotesi ancora mancano.

E' invece stato acclarato che il fumo peggiori notevolmente l'andamento clinico della malattia e che favorisca la comparsa del MC, aumentandone da 2 a 5 volte il rischio. In definitiva, si ritiene che numerosi fattori possano condurre ad alterazioni della risposta immunitaria e dei meccanismi di regolazione dell'infiammazione che sono sottesi allo sviluppo del MC.

Anatomia patologica

La malattia può colpire tutto l'intestino, sia il tenue (il cosiddetto piccolo intestino) che il colon. Inoltre può comparire ovunque (dalla bocca all'ano) lungo il sistema gastrointestinale. In circa metà dei pazienti l'infiammazione colpisce l'ultimo tratto del tenue e parte o l'intero colon. Un ulteriore 30% di casi presenta la malattia confinata al tenue, mentre il restante 20% di pazienti manifesta la flogosi localizzata solo nel colon. Come accennato, esiste poi una piccola percentuale di malati in cui si possono evidenziare lesioni infiammatorie lungo tutto il tubo digerente. Le lesioni, tipicamente, sono "segmentarie", o "a salto": le zone di volta in volta interessate dalla malattia sono segmenti più o meno estesi di intestino non continui, come invece accade nel caso della RCU. Nelle aree interessate si trovano raccolti infiammatori, edema ed ulcerazioni che interessano tutto lo spessore della parete dell'intestino. Per questa ragione si possono formare nell'ambito del viscere ascessi, stenosi (restringimenti fino ad occlusioni) e fistole ("aperture" anomale della parete intestinale) che mettono in comunicazione l'intestino con l'esterno, nel caso delle fistole anali, o con altri distretti nel caso delle fistole entero-enteriche, entero-vaginali, entero-vescicali. Questo insieme di condizioni patologiche deve essere risolto spesso con manovre chirurgiche. E' stato infatti calcolato che si debba sottoporre a chirurgia il 60% dei malati entro 9 anni dall'esordio del MC.

Clinica

I sintomi più frequenti di MC sono:

- Dolore addominale
- Diarrea con presenza o assenza di sangue nelle feci
- Febbricola
- Calo di peso e astenia
- Sanguinamento rettale e muco, se è interessato il colon
- Lesioni perianali, dolori alle articolazioni, lesioni cutanee, orali e/o oculari
- Nei bambini si può presentare ritardo nella crescita

La presentazione dei sintomi e la loro gravità, dipendono dalla localizzazione, dall'estensione e dall'aggressività stessa del MC. Nel 20% dei casi l'esordio è acuto, ovvero con sintomi forti e inequivocabili, mentre nella maggior parte dei pazienti i prodromi di malattia sono più sfuggenti e i sintomi blandi e poco specifici.

Il decorso clinico tende a recidivare: il 90% dei pazienti torna ad avere un'acuzie entro 5 anni dal primo episodio. Anche per quel che concerne il decorso generale del MC la gravità della malattia risulta variabile: più della metà dei pazienti convive con una patologia di lieve o moderata intensità, mentre il 20-30% dei casi deve affrontare problemi clinici ben più gravi.

La terapia

Lo scopo della terapia medica è di spegnere il processo infiammatorio nelle fasi di attività e prevenire le ricadute una volta raggiunta la remissione.

Lo stress

Introduzione

Lo stress è definito la reazione generale dell'organismo, coinvolgente più sistemi biologici, finalizzata a rispondere a stimoli endogeni ed esogeni che possono alterare o compromettere l'equilibrio dell'organismo stesso. Il termine stress è stato introdotto per la prima volta in medicina da Hans Selye nel 1936. (3) Selye intraprese gli studi sullo stress mentre tentava di isolare ormoni sessuali nell'animale. Inoculò alcuni tossici nelle cavie e poté quindi osservare che negli animali si verificava una reazione comune configurata come una sindrome caratterizzata da i) ipertrofia corticosurrenalica, ii) atrofia del timo e ghiandole linfatiche, iii) ulcere gastriche. Osservò inoltre che la stessa reazione biologica, caratterizzata dal comune stato di iperattivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, si presentava in tutti gli animali da esperimento indipendentemente dal tipo di stimolo (stressor). Selye definì l'insieme delle reazioni sistemiche dell'organismo conseguenti ad una prolungata esposizione agli stressors come "sindrome generale di adattamento". Negli anni successivi quindi fiorirono numerose e più articolate ricerche sul "nuovo" concetto di stress. Nel 1975 Mason dimostrò attraverso ricerche condotte sulle scimmie ed in seguito sull'uomo, che l'attivazione corticosurrenalica non fosse il mero risultato dell'esposizione allo stressor di per sé, ma fosse specificamente innescata dalla reazione emozionale agli stimoli stessi. L'attivazione emozionale prevedeva l'attivazione delle strutture del sistema limbico (SL), che, come confermato da autori successivi, è il luogo di coordinamento e di controllo della reazione di stress. Le strutture del SL proiettano abbondantemente verso il sistema ipotalamo-ipofisario. Pertanto, l'attivazione emozionale (arousal) che viene indotta dallo stimolo, viene elaborata a livello del SL e si manifesta da un lato, a livello biologico e somatico mediante modificazioni neurovegetative ed endocrine, dall'altro a livello psicologico ed infine comportamentale con le sequenze motorie dei comportamenti di lotta o di fuga.

La risposta allo stress è cruciale per ogni organismo la fine di adattarsi plasticamente all'ambiente e alle sue richieste (Selye affermava che lo stress è "l'essenza" della vita biologica). Una risposta ottimale è caratterizzata da condizioni che producono un'attivazione e disattivazione rapida dei sistemi biologici, da una sincronia nelle

risposte biologiche e comportamentali, e da un'intensità variabile in rapporto alla risposta individuale.

Le deviazioni dalle caratteristiche ideali di questa risposta di stress ottimale possono essere molteplici. Si possono comunque descrivere alcune caratteristiche comuni e organizzarle nella maniera seguente:

- stress acuto di elevata intensità: è possibile che nella prima fase della risposta generale di adattamento alcune manifestazioni delle reazioni di stress in condizioni acute e particolarmente intense possano essere alla base di reazioni amplificate fino a patologiche.
- lo stress cronico protratto: l'esposizione allo stress prosegue nel tempo al di là delle possibilità di reazione dell'organismo. Corrisponde alla fase di esaurimento descritta da Selye: la fase finale della reazione della sindrome generale di adattamento.
- Lo stress acuto e/o cronico in condizione di blocco d'azione: è presente uno stato di attivazione biologica in mancanza di una effettiva possibilità di reazione comportamentale verso lo stressor. Il blocco della possibilità di agire e inattivare lo stressor, in condizioni sia acute che croniche, si associa in genere ad iperattivazione della risposta di varie funzioni fisiologiche.
- Stress acuto in un sistema con inibizione cronica della reazione di stress: si basa sull'ipotesi che una condizione di stress acuto in un organismo con inibizione cronica della reazione di stress possa produrre effetti particolari, molto più potenti e deleteri, rispetto agli effetti biologici che produrrebbe in un organismo "allenato" allo stress. Studi sperimentali effettuati su animali hanno in effetti mostrato che "proteggendo" a lungo ed artificialmente un organismo dalle normali stimolazioni stressanti, la risposta a normali stressors anche di moderata entità risulta anormale ed eccessiva. Sul piano neurofisiologico si rileva un'iper-risposta dell'asse ipofisi-surrene, mentre sul piano comportamentale si osservano una maggiore disorganizzazione e incapacità a impostare una reazione di lotta/fuga inadeguata. Nell'uomo simili condizioni possono essere prodotte da particolari strutture di personalità (attaccamento evitante) o fattori emotivo-cognitivi (alessitimia), per cui il soggetto organizza uno stile di vita che evita il più possibile gli

stressors o che, in ogni caso, ne filtra e minimizza comunque l'impatto emozionale. Pertanto un'evitazione sistematica dell'attivazione della normale reazione di stress produce uno stato di inibizione cronica dello stress, fin tanto che di fronte ad un evento non evitabile e grave l'organismo subisca una reazione di stress in eccesso, con maggior rischio di sviluppare problematiche stress dipendenti.

Neurofisiologia dello stress

L'ipotalamo (Hypo) rappresenta una struttura cardine del sistema nervoso di elaborazione e risposta allo stress. Nel contesto ipotalamico il nucleo paraventricolare (PVN) è considerato il centro critico per la regolazione e il coordinamento delle risposte neurofisiologiche allo stress. I neuroni residenti nel PVN controllano tre importanti e interconnessi sistemi fisiologici effettori:

- l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, attraverso i neuroni parvocellulari nella regione dorso-mediale (PVNmpd) e parvocellulari anteriori (PVNmpa)
- peptidi neuro-ipofisari ovvero vasopressina e ossitocina, mediante neuroni magnocellulari della regione posteriore (PVNpm), anteriore (PVNpa) e mediale (PVNmm)
- sistema nervoso autonomo (SNA), tramite le proiezioni sui cordoni spinali dei neuroni parvocellulari laterali (PVNlp), dorsali (PVNdp) e ventro-mediale (PVNmpv).

I neuroni parvocellulari dorso-mediali producono CRH ad altri peptidi, come il glutamato. Questo aspetto potrebbe indicare il coinvolgimento di multipli fattori nel segnale neuronale parvocellulare. Inoltre l'AVP è tra i peptidi secreti nel PVNmpd e sinergizza con il CRH nello stimolare la produzione di ACTH. Esistono poi alcune evidenze che mostrano un'azione potenziante da parte dell'ossitocina.

Anche il sistema neurosecretorio magnocellulare gioca un ruolo nella regolazione dello stress. Esistono importanti evidenze che suggeriscono il rilascio di ossitocina in risposta ad acuti stressogeni, mentre appare più controversa la secrezione di vasopressina dai magnocellulari in relazione allo stress. Ad ogni modo entrambi i peptidi sono rilasciati in seguito ad esposizione a stressori anche dal nucleo sopraottico e sono diffusi nel sistema limbico, dove possono influenzare le risposte comportamentali allo stress.

La risposta allo stress: il ruolo centrale del cervello

Il sistema nervoso centrale (SNC) svolge un ruolo chiave nell'elaborazione degli stressor e nell'elicitarne e controllare la risposta allo stress. Infatti, tutti i tipi di stimoli stressanti convergono verso il SNC dove vengono elaborati e da cui partono le risposte allo stress. Notevoli progressi sono stati compiuti recentemente nella scoperta dei correlati nervosi e neuroendocrini che mediano la cascata di reazioni innescate dallo stress.

Quando Selye ha introdotto il concetto di stress, lo ha descritto come una risposta non specifica dell'organismo verso qualsiasi aggressione verso esso stesso (3). Ad oggi, la concettualizzazione di Selye è stata rivista ed alcuni criteri di classificazione degli stimoli stressanti sono stati introdotti (4). I criteri più importanti per classificare i fattori di stress sono il tipo di stress, la durata dello stimolo, le vie nervose coinvolte sia nell'elaborazione che nella risposta allo stimolo.

Di conseguenza, lo stress può essere classificato principalmente come stress fisico e stress psicologico. Inoltre, in base alla loro durata, gli stressori possono anche essere classificati come fattori di stress acuto o cronico, mentre in termini di vie nervose coinvolte, gli stressori possono essere suddivisi in fattori di stress sistemici, che coinvolgono circuiti nervosi "brevi" paucisinaptici (per esempio i riflessi spinali) o che comportano circuiti nervosi "lungi", polisinaptici e la complessa integrazione di aree cerebrali diverse, tra cui centri cerebrali superiori come il sistema limbico e la corteccia cerebrale (5,6).

Il concetto di stress fisico implica che l'organismo sia direttamente esposto ad una minaccia fisica (sistemica). Dolore, caldo/freddo, vibrazioni, rumore, ipoglicemia, emorragia, infiammazione, e le variazioni di tono cardiovascolare sono definiti come fattori di stress fisico. Gli stimoli stressanti fisici attivano recettori meccanici, chimici e nocicettivi e giungono al cervello attraverso le vie somato-viscerosensoriali. L'elaborazione nervosa centrale e la risposta a stressori fisici coinvolgono principalmente i nuclei del tronco cerebrale, il mesencefalo, il locus coeruleus (LC) e i nuclei del rafe (RN) (4,5,7) Questi circuiti nervosi "brevi" consentono una risposta allo stress fisico rapida ma grezza, volta a ristabilire rapidamente l'omeostasi.

D'altra parte, il concetto di stress psicologico implica l'assenza di una concreta minaccia fisica per l'omeostasi. Rapporti problematici con le figure genitoriali, isolamento,

disoccupazione, e molte altre condizioni della vita quotidiana, sono classificati come fattori di stress psicologico. Le regioni “alte” limbiche come l'amigdala, l'ippocampo (HC), la corteccia cingolata (CC) e la corteccia prefrontale (PFC) sono fortemente coinvolte nell'elaborazione nervosa degli stressori psicologici e rappresentano i circuiti complessi coinvolti nell'interpretazione di questi stimoli (4, 5, 8).

Naturalmente la descrizione schematica appena proposta non tiene in considerazione di diverse sovrapposizioni tra le vie nervose descritte. Infatti, anche stimoli fisici, dopo pochi minuti, possono coinvolgere i centri nervosi corticali (cognitivi) e limbici (emotivi) ed assumere naturalmente una coloritura emotiva e cognitiva. D'altra parte, stimoli stressanti di natura psicologica possono provocare rapidamente reazioni fisiche sistemiche (tachicardia, respirazione alterata) mediate da vie nervose riflesse. In definitiva è plausibile pensare che l'eterogeneità degli stimoli stressanti possa comportare la presenza di specifici circuiti nervosi volti a rispondere in modo efficiente a stressori diversi. Infatti, nonostante svariate evidenze indichino che l'attivazione dell'asse HPA e quella dell'asse simpatico-medulla surrenale (SMA) siano i comuni denominatori della risposta allo stress (di ogni tipo di stress), esistono prove a conferma di una certa eterogeneità nella risposta neuroendocrina ai diversi stressori. Infatti, utilizzando cinque tipi diversi di stressori (immobilizzazione, freddo, ipoglicemia, emorragia, dolore), Pacak e Palkovits (4) hanno trovato una spiccata eterogeneità di risposta neuroendocrina. I loro risultati, ottenuti da studi su animali, hanno rafforzato il concetto che ogni fattore di stress può avere il proprio “marchio” neurochimico con associati distinti meccanismi di elaborazione centrale.

Negli esseri umani, lo sviluppo di metodiche di neuroimaging funzionale ha notevolmente arricchito le nostre conoscenze sul ruolo del sistema nervoso centrale nel regolare gli assi dello stress. Recenti studi di neuroimaging funzionale hanno infatti confermato il coinvolgimento diretto di diversi centri nervosi nella risposta allo stress, confermando il contributo determinante della amigdala, HC, PFC (9, 10). La tecnica avanzata di neuroimaging risonanza magnetica funzionale (fMRI) ha consentito ai ricercatori di studiare direttamente negli esseri umani gli effetti di compiti stressanti sulle strutture del cervello. Grazie a questa tecnica, la conoscenza dei circuiti nervosi coinvolti nell'elaborazione e nella risposta allo stress psicologico nell'uomo è stata notevolmente ampliata.

Amygdala

Situata nel lobo temporale mediale e composta da vari sotto-nuclei raggruppati in nuclei corticomediale e nuclei basolaterali, l'amigdala gioca un ruolo cruciale nel monitoraggio delle potenziali minacce e nell'elaborazione delle emozioni. L'amigdala riceve input sensoriali attraverso due vie: (i) una via rapida ma grezza dal talamo sensoriale, e (ii) una via più lenta ma più dettagliata proveniente dalla corteccia sensoriale. Il nucleo laterale (LA) è considerato la sua interfaccia sensoriale, mentre il nucleo centrale (CE) rappresenta la regione da cui partono le efferenze. Efferenze amigdalofughe controllano l'espressione di risposte emozionali ivi comprese le risposte neuroendocrine e autonome. (11) L'amigdala è strettamente interconnessa con l'HC, proietta direttamente al grigio periacqueduttale, ai nuclei vagali del tronco encefalico e all'ipotalamo laterale e, indirettamente raggiunge i neuroni del PVN parvocellulare dell'ipotalamo che rappresentano i principali neuroni effettori dello stress. L'emergere di avanzate tecniche di neuroimaging ha confermato il ruolo "tradizionale" dell'amigdala nelle emozioni di paura e nel rilevamento delle minacce e ha anche rivelato l'importanza di questa struttura neurale per il monitoraggio delle potenziali minacce ambientali. Questo ulteriore ruolo dell'amigdala permette all'organismo di regolare il livello di vigilanza e attivazione emozionale a seconda del valore (negativo o positivo) degli stimoli. (12)

Il ruolo eccitatorio giocato dall'amigdala nell'attivazione dell'asse HPA e nella secrezione di cortisolo è stato ulteriormente consolidato da studi su animali (13). D'altra parte, l'effetto modulatore dell'amigdala sull'asse HPA deve essere ulteriormente chiarito nell'uomo. Kvetnansky et al (14) hanno dimostrato un ruolo modulatore dell'amigdala nella regolazione dell'asse HPA (promozione di sintesi e di rilascio di CRH nel PVN), mentre Pruessner et al (15), utilizzando un paradigma fMRI di stress psicologico, non sono riusciti a stabilire una correlazione diretta tra l'attività dell'amigdala e aumento dei livelli di cortisolo. Sebbene recenti risultati di neuroimaging abbiano suggerito un'iperattività dell'amigdala nel disturbo da stress post-traumatico (PTSD) (16) l'effetto principale dell'esposizione allo stress sembra coinvolgere una disattivazione dell'amigdala (15).

Ippocampo

L'ippocampo (HC) è una struttura limbica che giace nella faccia mediale del lobo temporale in prossimità dell'amigdala e della corteccia entorinale e peririnale. Come nel caso dell'amigdala, ci sono poche prove di proiezioni dirette dall'HC verso il PVN. La stimolazione ippocampale diminuisce l'attività dell'asse HPA e la conseguente secrezione del cortisolo sia negli animali che nell'uomo (17). Questi effetti inibitori dell'HC sull'asse HPA sono stati di solito descritti nel contesto di meccanismi di feedback negativo dei glucocorticoidi (GC) nel sistema nervoso centrale. In effetti, questa struttura limbica possiede un elevato numero di recettori per i GC. In sintesi, dopo l'esposizione a fattori di stress, il cortisolo viene rilasciato tramite l'asse HPA, raggiunge il sistema nervoso centrale dove si lega ai recettori dell'ippocampo ed elicitando l'effetto inibitorio sull'attivazione dell'asse HPA. Questo meccanismo di feedback negativo del cortisolo consente a questa stessa molecola di regolare la sua secrezione ed in definitiva di proteggere l'organismo dagli effetti deleteri dei GC. (18) Una eccessiva esposizione ai GC ha effetti dannosi sul sistema nervoso centrale ed in particolare sull'HC. La prolungata esposizione ai GC, che avviene sia nello stress grave o prolungato sia nelle terapie ad alto dosaggio con corticosteroidi, determina effetti negativi sull'HC. Questi danni sono costituiti da deplezione neuronale e diminuzione dei livelli di recettori ippocampali per i GC (18).

Un recente studio di fMRI ha potuto verificare direttamente la correlazione tra l'attività dell'ippocampo e la liberazione di GC, in risposta ad uno stimolo stressante nell'uomo (15). Inoltre, altri studi morfologici di neuroimaging sono stati in grado di stabilire una correlazione tra volume HC, funzioni dell'asse HPA e prestazioni cognitive. (19) Nuovi sviluppi nelle tecniche di fMRI potrebbero inoltre confermare lo studio pionieristico condotto sui roditori da Liu et al (20) che dimostrò che la deprivazione materna era associata con una diminuita espressione di recettori per i GC nell'HC e con un diminuito feedback negativo.

Corteccia prefrontale

La corteccia prefrontale (PFC) è ritenuta, assieme ad amigdala e HC, strettamente implicata nella regolazione dell'attività dell'asse HPA in seguito a stress. A differenza delle altre strutture limbiche, la PFC rappresenta un centro di elaborazione cognitiva ed

emotiva di ordine superiore. Gli studi di fMRI finora condotti hanno confermato il coinvolgimento della PFC nella risposta cerebrale allo stress e suggerito un ruolo inibitorio della PFC sull'attività dell'asse HPA. In uno studio fMRI che ha esaminato la risposta del cervello agli stimoli stressanti, Pruessner et al hanno concluso che la diminuita attività neurale nella PFC (soprattutto nella porzione orbitofrontale) è associata ad aumento di secrezione di cortisolo. (13)

Risonanza magnetica funzionale (fMRI)

La risonanza magnetica funzionale (fMRI) è una tecnica che consente di studiare la funzionalità del cervello sfruttando i principi della tradizionale risonanza magnetica (RM). La fMRI fornisce una misura indiretta dell'attività neuronale poiché misura i cambiamenti del flusso sanguigno in risposta alle richieste metaboliche dei neuroni attivi. Pertanto la fMRI consente di misurare l'attività neuronale assumendo che esista una stretta associazione tra l'attività neuronale e le variazioni fisiologiche del livello di ossigenazione del sangue. I primi scienziati che hanno colto questa correlazione sono stati Roy e Sherington nel 1890 (20), mentre la prima rudimentale tecnica di "neuroimaging" è stata sviluppata da Mosso che ha registrato la pulsazione della corteccia umana in pazienti con difetti cranici secondo le procedure neurochirurgiche del tempo. Circa un secolo dopo Belliveau et al hanno applicato alla tecnica della risonanza magnetica l'uso di un mezzo di contrasto esogeno (gadolinio-DTPA). Questi autori quindi poterono osservare un aumento di flusso ematico nella corteccia visiva durante la stimolazione con fasci di luce potendo quindi concludere che le variazioni di flusso sono associate a differenti stati di attività cerebrale (21). Il maggiore svantaggio di questo approccio era quello di rilevare i cambiamenti del cervello necessariamente attraverso un mezzo di contrasto esogeno. In seguito tuttavia, Ogawa et al. (22-24) svilupparono una tecnica di RM basata sull'emodinamica che non richiedeva alcun mezzo di contrasto esogeno, ma si basava sulla valutazione di un mezzo di contrasto endogeno: il sangue. Questo metodo si basa sul fatto che ai cambiamenti dell'emoglobina mentre varia da ossigenata a ridotta, si associa un cambiamento del segnale RM. Per questo motivo l'effetto derivato RM è stato nominato effetto BOLD (Blood oxygen level dependent, dipendente dal livello di ossigenazione del sangue). Poco dopo l'osservazione di Ogawa, altri ricercatori hanno confermato la correlazione fra cambiamenti di ossigenazione e differenti livelli funzionali cerebrali. Turner et al. dimostrarono tramite l'utilizzo di una tecnica particolare detta Echo PLANNAR Imaging (EPI) ultra-veloce l'andamento temporale dell'effetto BOLD nell'animale (25). Allo stesso modo, Kwong et al. dimostrarono che era possibile misurare l'attivazione cerebrale usando un compito motorio (26). Da allora l'applicazione del segnale BOLD è diventata il cardine delle tecniche non-invasive di imaging cerebrali funzionali.

La rilevazione del segnale BOLD si basa su un principio fisico chiamato risonanza magnetica T2*. Senza addentrarci nella descrizione di questo complesso fenomeno fisico si può affermare brevemente che T2* registra le disomogeneità del campo magnetico.

Da un punto di vista fisiologico, il segnale BOLD si basa sul presupposto che, per assicurare il supporto metabolico necessario ad una popolazione di neuroni in attività, avviene una vasodilatazione a carico dei vasi in prossimità dei neuroni, che rende disponibile una quantità di sangue addirittura maggiore di quella richiesta. Così l'attivazione di una certa area del cervello produce "naturalmente" quei cambiamenti fisiologici che modificano i parametri di registrazione RM: aumento del flusso sanguigno, aumento del consumo di ossigeno, aumento di ossi-emoglobina e viceversa diminuzione della deossi-emoglobina. Nelle zone attive, il flusso di sangue può aumentare fino al 30-50%, mentre l'estrazione dell'ossigeno aumenta solo del 5%. Questo meccanismo conduce a due effetti: l'aumento della concentrazione di ossi-emoglobina, che ha proprietà diamagnetiche e la riduzione della desossi-emoglobina, che ha proprietà paramagnetiche. In definitiva i cambiamenti nel rapporto ossi-/deossi-emoglobina nel tessuto cerebrale vengono considerati le caratteristiche fisico-chimiche alla base della fMRI. O meglio, in altre parole, la presenza di elementi paramagnetici nel sangue fa sì che questi agiscano come marcatori vascolari e quindi mezzi di contrasto endogeni (27).

Il "picco iniziale negativo" compare circa un secondo dopo l'attivazione neuronale e consiste in una lieve diminuzione dell'intensità del segnale dalla linea di base (28) (Figura 1). Si ritiene che questo effetto avvenga a causa del repentino aumento di deossi-emoglobina, a seguito di un aumento del consumo di ossigeno che a sua volta segue immediatamente l'attivazione neuronale, che è temporalmente disaccoppiata con la risposta circolatoria. La "risposta BOLD positiva" che segue è un marcato aumento di intensità del segnale causato dall'aumento del flusso sanguigno in quel distretto e dal diminuito rapporto ossi-/deossi-emoglobina. Durante questa fase viene raggiunto il picco del segnale. All'inizio della "risposta positiva BOLD" si possono spesso apprezzare ("overshoot"): un improvviso aumento del segnale BOLD presumibilmente a causa di meccanismi di lenta regolazione del volume sanguigno cerebrale di fronte al rapido aumento di flusso (29). Lo stesso principio vale per la terza fase ("undershoot"), dove il termine della stimolazione viene seguito da un brusco calo di flusso sanguigno cerebrale

ma da un volume ematico cerebrale persistentemente elevato, che richiede più tempo per ritornare a valori basali.

Una tipica risposta BOLD basata su un esperimento con design a blocchi di solito dura in totale tra i 20 e 30 secondi: tra i 6 e 9 secondi sono necessari per raggiungere il picco di attività, e tra gli 8 e 20 secondi per tornare al livello basale. I cambiamenti di segnale BOLD associati all'attività neuronale sono in genere piccoli, dell'ordine di 2-5%, e dipendono fortemente dalla forza del campo magnetico utilizzato. Inoltre, l'intensità del segnale BOLD rilevabile sembra variare tra le differenti regioni del cervello (30). Esistono aree, come quelle visive, "dotate" di forte segnale BOLD, ed altre aree, come quelle temporali e orbito-frontali più inaccessibile all'indagine, in quanto più difficili da studiare con sequenze RM tradizionale per la perdita del segnale RM, la disomogeneità di campo ed artefatti (31). Il principale svantaggio nell'utilizzo del segnale BOLD per rilevare l'attività neuronale è il fatto che questo segnale richieda un periodo di costante di tempo prima che raggiunga il suo picco mentre l'attivazione del neurone, a seguito di un determinato stimolo, avviene in un intervallo di pochi millisecondi. Tuttavia, nonostante la recente messa a punto di RM che acquisiscono immagini del cervello ogni 50-100 millesimi di secondo, il ritardo del segnale BOLD necessario per raggiungere il picco, attribuibile all'emodinamica vascolare, rappresenta la maggiore limitazione della tecnica fMRI. Tuttavia, rispetto ad altre tecniche di imaging funzionale, come l'elettroencefalografia (EEG) e la magnetoencefalografia (MEG), la fMRI conserva un notevole vantaggio di risoluzione spaziale. Finora, grazie all'fMRI è stato possibile costruire mappe di attivazioni cerebrali con un segnale BOLD relativamente robusto per funzioni ben definite, come il linguaggio (32, 33), il sistema motorio (34), il sistema uditivo (35) e la memoria (36). Inoltre è stato possibile "mappare" i sistemi neuronali sottesi a funzioni complesse come il lutto e l'empatia (37, 38). Infine, una delle applicazioni più complicate di questa tecnologia riguarda lo studio dell'efficacia clinica dei farmaci (39).

Gli aspetti maggiormente problematici per quel che concerne l'utilizzo del segnale BOLD riguardano l'interpretazione del segnale stesso. In primo luogo si ritiene che i cambiamenti del segnale BOLD possano essere generati dall'attività sinaptica oltre che l'attività del corpo cellulare del neurone (40). Ciò implica che le regioni del cervello apparentemente "attive" durante gli esperimenti fMRI potrebbero essere localizzate

anche non in prossimità dal vero sito di attivazione neuronale. Inoltre, visto che l'attività sinaptica può essere sia eccitatoria che inibitoria, l'interpretazione dei risultati fMRI potrebbe essere molto complessa e problematica (41, 42).

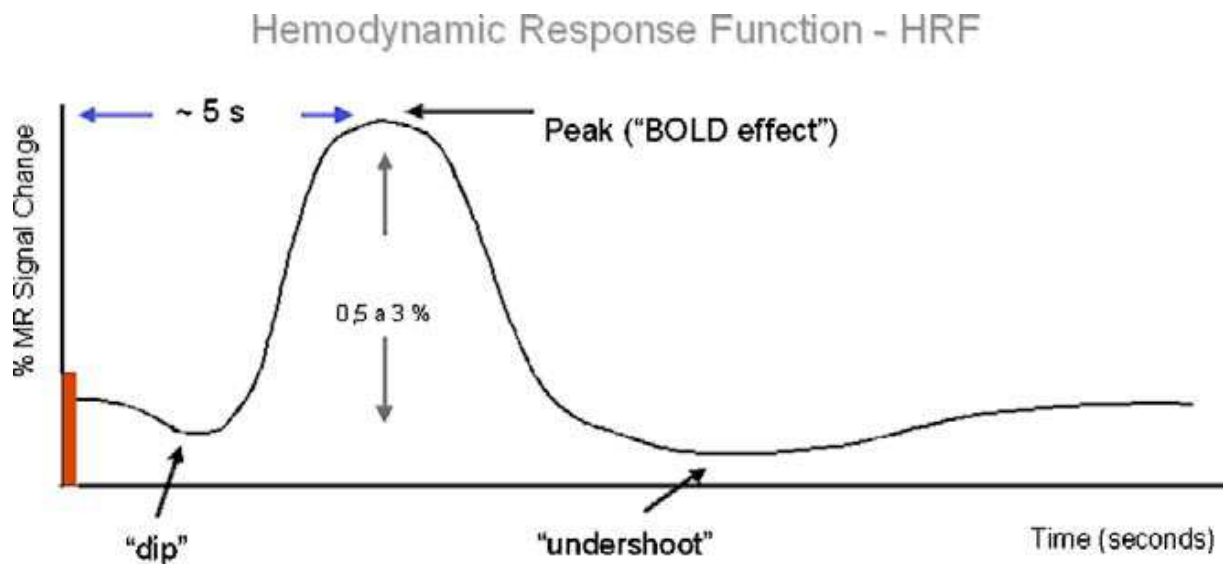


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'andamento del segnale BOLD dopo stimolazione neuronale.

Modificazioni funzionali cerebrali in pazienti con retto colite ulcerosa: uno studio sull'elaborazione nervosa delle emozioni valutata con risonanza magnetica funzionale.

Introduzione

La retto colite ulcerosa (RCU) è una patologia del grosso intestino idiopatica, infiammatoria, cronica, caratterizzata principalmente da episodi di diarrea sanguinolenta di gravità variabile. Il decorso clinico della malattia alterna periodi di remissione a recidive infiammatorie ed ha un impatto fortemente negativo sul benessere psicologico dei pazienti. (43-45) I risultati di studi recenti, ottenuti tramite questionari psicometrici, hanno chiaramente dimostrato un alterato funzionamento emotivo in gruppi di pazienti con RCU e morbo di Crohn (MC). (45-47) A tutt'oggi, questi risultati non sono stati supportati da studi di neuroimaging funzionale.

Il complesso rapporto fra emozioni e patologia può essere compreso alla luce del modello biopsicosociale di malattia. Questo quadro concettuale afferma che la malattia è in grado di modificare lo stato psicologico, lo stato emotivo e l'adattamento sociale del paziente affetto. Viceversa, fattori psicologici, emotivi e sociali possono influenzare il decorso clinico della malattia stessa. (48) Emozioni e malattia, quindi, sono legate da un rapporto causale circolare o anche detto bidirezionale. Questo approccio teorico alla malattia appare particolarmente calzante nel contesto della RCU. Infatti, la cronicità, l'incertezza e l'imprevedibilità dei sintomi della malattia hanno senza dubbio un impatto negativo sul funzionamento psicologico dei pazienti (49) e, viceversa, le emozioni negative e lo stress psicologico possono influenzare negativamente il decorso della malattia e la comparsa delle sue esacerbazioni. (50)

Il concetto di asse cervello-intestino (brain-gut axis, BGA) fornisce il quadro teorico per comprendere la reciproca interazione fra fattori biologici da un lato ed emotivi dall'altro nella RCU. (51) Il concetto di BGA implica che sussista un collegamento diretto, realizzato tramite i nervi del sistema simpatico e parasimpatico, tra le regioni cerebrali del sistema limbico (ad esempio amigdala, talamo, insula) ed il sistema nervoso enterico (enteric nervous system, ENS), ovvero la fitta rete di neuroni che innerva e controlla il tratto gastrointestinale. (52) Si comprende quindi come il concetto di BGA dia ulteriore

supporto alla concezione biopsicosociale della malattia, dato che corrobora l'idea che le emozioni possano influenzare le funzioni del tratto gastrointestinale e queste, a loro volta, possano influenzare le emozioni del paziente. (53)

Precedenti studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI) hanno dimostrato che le regioni cerebrali votate all'elaborazione delle emozioni e che appartengono al BGA includono la corteccia prefrontale, la corteccia cingolata anteriore e altre regioni limbiche sottocorticali come il talamo e l'amigdala. (54, 55) In particolare, l'amigdala è ritenuta una struttura cardine del BGA. E' stato ampiamente dimostrato infatti che questa struttura limbica svolga un ruolo primario nella elaborazione nervosa delle emozioni (56-58) ed inoltre che rappresenta il centro nervoso che innesca le modificazioni corporee viscerali "rimappate" in seguito nel cervello e che sono esse stesse parte integrante dell'esperienza emotiva. (59) Nei pazienti con RCU la malattia cronica determina il persistere di segnali corporei viscerali alterati per lo più provenienti dalle zone intestinali infiammate. In accordo con il concetto di BGA quindi, abbiamo ipotizzato che nei pazienti con RCU, rispetto ad un gruppo di soggetti sani, il disturbo intestinale si associ a modificazioni funzionali delle aree limbiche del BGA. Abbiamo quindi condotto uno studio esplorativo, utilizzando la tecnica fMRI, per valutare i processi nervosi di elaborazione emotiva in 10 pazienti con RCU e in 10 soggetti sani. Lo scopo di questo studio è di verificare se nei pazienti con RCU, rispetto ai controlli sani, gli stimoli emotigeni neutri, negativi o positivi attivino in maniera differente le strutture limbiche associate al concetto di BGA.

Materiali e metodi

Reclutamento dei partecipanti: Questo studio è stato condotto con l'approvazione del locale Comitato Etico e tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato. I partecipanti allo studio sono stati visitati e valutati da medici gastroenterologi specializzati nella cura dei pazienti con RCU e MC.

Pazienti con RCU: Criteri di inclusione: 1) arco di età compreso tra i 18 e 40 anni, 2) destrimani, 3) remissione clinica da almeno 6 mesi (indice di attività della colite (CAI) (60) <2). Criteri di esclusione: 1) uso di corticosteroidi e farmaci psicotropi nei precedenti 90 giorni, 2) storia pregressa o presenza attuale di malattie neurologiche o psichiatriche, 3) storia pregressa di neurochirurgia, trauma cranico, insulto cerebrale o

trauma cerebrali con la perdita di coscienza, 4) difficoltà di apprendimento, 5) claustrofobia, 6) presenza di residui metallici nel corpo. Abbiamo chiesto a 12 pazienti ambulatoriali consecutivi afferenti il centro per le malattie infiammatorie intestinali (IBD) dell'ospedale S. Orsola-Malpighi di Bologna, e che soddisfacevano i criteri di inclusione e di esclusione di partecipare allo studio. Due pazienti hanno rifiutato mentre 10 sono stati arruolati.

Gruppo di controllo: un gruppo di 10 soggetti sani volontari, omogenei per età, sesso e educazione rispetto ai pazienti, è stato selezionato tra gli studenti e il personale dell'Università di Bologna. Sono stati sottoposti alle stesse procedure di screening dei pazienti ed hanno preso parte allo studio come gruppo di controllo.

Le caratteristiche socio-demografiche dei partecipanti sono riportate nella tabella 1.

Questionari psicometrici: Tutti i partecipanti hanno compilato una batteria di questionari psicometrici al fine di controllare potenziali fattori di confondimento. Sintomi d'ansia o depressivi potrebbero infatti determinare difficoltà di interpretazione per i risultati di uno studio con fMRI sulle emozioni. (61) Sono stati utilizzati i seguenti questionari:

- Symptom Questionnaire (SQ) (62): questionario con 92 item suddivisi in quattro sottoscale (depressione, ansia, rabbia, ostilità e sintomi somatici).
- State and Trait Anxiety Inventory (STAI) (63): questionario che fornisce informazioni sull'ansia di stato (percepita al momento della compilazione) e sull'ansia di tratto (stabile predisposizione all'ansia).

Inoltre, al fine di valutare e confrontare tra i due gruppi lo stato emotivo all'inizio dell'esperimento, tutti i partecipanti hanno compilato il questionario positive and negative affective schedule (PANAS). (64) La scala PANAS è composta da 10 aggettivi positivi e 10 negativi e valuta lo stato d'animo del soggetto al momento della compilazione.

Protocollo Neuroimaging: gli scan sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Neuroradiologia dell'Università di Bologna con uno scanner 3 Tesla Signa Excite dotato di bobina a 8 canali. Il protocollo di neuroimaging ha incluso sequenze funzionali e strutturali, con i seguenti parametri:

fMRI: TR = 3000 ms, TE = 30 ms, flip angle = 90°, campo di visione = 220 dimensione mm, voxel = 3x3x4 mm, tempo di acquisizione = 8'24".

MRI strutturale: TR = 7,3 ms, TE = 3.2 ms, flip angle = 10°, campo di visione = 290 dimensione mm, voxel = 1 mm isotropo, tempo di acquisizione = 6'35".

Paradigma Sperimentale (task): 24 immagini negative, 24 positive e 24 neutre sono state selezionate dalla libreria international affective picture system (IAPS) (65) e utilizzate come stimoli visivi in un paradigma a blocchi contenente 16 blocchi a loro volta composti da 6 immagini negative o positive o neutre. Ogni immagine è stata presentata per 4,5 s ed era seguita da un periodo di riposo (schermo nero con una croce bianca centrale) di 0,5 s. Ciascun blocco, a sua volta, era seguito da un ulteriore periodo di riposo (schermo nero con una croce centrale bianca) di 12 s. I blocchi sono stati presentati in una sequenza pseudocasuale (stessa sequenza casuale per tutti i soggetti) mentre il protocollo è durato 8 minuti e 24 s. (Figura 1) All'interno dello scanner gli stimoli visivi sono stati mostrati ai partecipanti utilizzando occhiali non magnetici. Infine, ai partecipanti venne detto che, dopo la sessione di scan, sarebbe stato chiesto loro di riconoscere e dare un punteggio in termini di valenza (piacevole/spiacevole) e di attivazione emozionale (arousal) a tutte le immagini presentate.

Analisi delle immagini: l'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il programma FSL (FMRIB Software Library, www.fmrib.ox.ac.uk/FSL).

Analisi fMRI dell'intero cervello: questa analisi è stata condotta utilizzando FEAT (FMRI Expert Analysis Tool v. 5,98, <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/feat5/>). La pre-elaborazione consisteva in correzione del movimento della testa, estrazione dei volumi cerebrali, smussamento (smoothing) spaziale usando un kernel gaussiano di FWHM (larghezza a metà altezza) 6 mm, e filtraggio temporale equivalente a 140 s. L'analisi delle serie temporali statistica è stata condotta con la correzione di autocorrelazione locale. Un boxcar per la funzione emodinamica (risposta gamma) (HRF) e la sua derivata temporale è stato utilizzato per modellare i dati. I contrasti di interesse utilizzato sono stati: "negative vs riposo", "positive vs riposo", "neutrale vs riposo". I volumi fMRI sono stati co-registrati alle immagini anatomiche (immagini standardizzate) utilizzando uno strumento di registrazione non-lineare (FNIRT). Un'analisi di livello superiore (fra i due gruppi) è stata effettuata con lo strumento FSL (FLAME). (66) Inoltre, al fine di ridurre gli effetti della presenza di valori molto lontani dalla media (outlier) è stato applicato uno strumento di ponderazione outlier automatico. (67)

Il modello generale lineare (GLM), ha incluso i due gruppi (controlli e pazienti). Abbiamo valutato le medie dentro il gruppo e le differenze tra i gruppi per ciascuno dei contrasti di interesse.

Analisi fMRI basata sulla regione di interesse (ROI): Poichè eravamo specificamente interessati ad indagare fra i gruppi le differenze di attività dell'amigdala, abbiamo valutato le differenze funzionali di questa struttura (sia a destra che a sinistra) utilizzando una maschera anatomica. Entrambe le maschere dell'amigdala (sinistra e destra) sono state create utilizzando l'atlante anatomico del cervello Harvard-Oxford.

MRI strutturale: l'analisi dell'intero cervello è stata effettuata con FSL-VBM (una voxel-based analisi per gli studi di morfometria) (68), utilizzando le impostazioni predefinite dal programma, come descritto in www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslvbm/. In sintesi, sono stati eseguiti l'estrazione e la segmentazione dei tessuti cerebrali e le immagini risultanti del volume parziale della materia grigia (GM) sono stati allineati alla norma, prima con lo spazio lineare (FLIRT) e quindi non-lineare (FNIRT). Le immagini risultanti sono state arrangiate e smussate. Infine, è stato applicato un GLM voxelwise con prova di permutazioni non parametriche (5000 permutazioni), e correzione spaziale per confronti multipli.

Valutazione post-scan: terminato lo scan, i partecipanti hanno riconosciuto e valutato tutte le immagini IAPS utilizzate nel task visivo in termini di arousal e di valenza. Lo scopo di questa procedura è stato i) garantire che i partecipanti avessero effettivamente visionato tutte le immagini presentate, ii) considerare potenziali differenze cognitive tra i due gruppi nella valutazione degli stimoli visivi. E' stata utilizzata una scala analogica visiva (VAS) a 10 punti in cui, per la valenza, 1 corrispondeva a "estremamente spiacevole" e 10 corrispondeva a "estremamente piacevole", mentre per l'arousal 1 corrispondeva a "non suscita alcuna emozione" e 10 corrispondeva a "estremamente emozionante".

Analisi statistiche: le analisi statistiche delle variabili non-imaging sono state effettuate utilizzando il software SPSS (SPSS, Inc., Chicago). Considerato il basso numero di soggetti partecipanti allo studio, abbiamo utilizzato un test non parametrico per le variabili continue, mentre il χ^2 (chi quadrato) è stato utilizzato per le variabili categoriche.

Risultati

Partecipanti: i 10 pazienti con RCU arruolati per questo studio erano tutti in remissione (CAI<2) da almeno 6 mesi. In aggiunta alle valutazioni cliniche, tutti i pazienti arruolati avevano eseguito una colonscopia con conferma istologica di remissione.

Non vi erano differenze significative tra pazienti e controlli nelle variabili socio-demografiche (Tabella 1). Non vi erano differenze fra i due gruppi nemmeno per tutte le variabili psicometriche indagate con i questionari SQ, STAI, PANAS (Tabella 1).

Analisi fMRI dell'intero cervello: Nel gruppo di controllo gli stimoli emotigeni hanno correttamente attivato le regioni del sistema limbico. In particolare, un aumento del segnale BOLD è stato osservato bilateralmente nelle regioni del lobo temporale mediale (MTL) comprendente sia l'amigdala che l'ippocampo, nei nuclei sottocorticali (talamo, putamen e caudato), nelle regioni frontali (corteccia frontale orbitale, mediale e inferiore), in aree associative e nei lobi occipitali (Figura 2). Abbiamo registrato un maggiore segnale BOLD nei controlli sani, rispetto ai pazienti con RCU, per il contrasto "positive vs riposo" all'interno del MTL di sinistra [viene segnalato qui e di seguito, il massimo punteggio z, la dimensione del cluster in voxel e il picco di coordinate nello spazio standard: 3,44, 657, (-18 -8 -22)] nel talamo bilateralmente [3,46, 969, (14 -22 10)] e in regioni del cervelletto (nucleo dentato) [5.01, 1045, (-6 -72 -24)] (Figura 3A). Rispetto ai controlli, i pazienti hanno mostrato un minore segnale BOLD in ogni area del cervello. Nessuna differenza significativa è stata rilevata nei due altri contrasti di interesse ("negative vs riposo", "neutre vs riposo"). Parametri di movimento assoluti e relativi si sono dimostrati simili tra i due gruppi e l'inclusione nel modello statistico di queste covariate non ha modificato i risultati.

Analisi fMRI basata sulla ROI: l'analisi specifica delle regioni dell'amigdala ha mostrato differenze fra i due gruppi (controlli>pazienti) per il contrasto "positive vs riposo" (Figura 3B e Figura 4). In dettaglio, due cluster bilaterali sono stati individuati: amigdala sinistra [3,31, 115, (-20 -8 -22)], amigdala destra [3.48, 150, (26 2 -26)].

Analisi morfologica del cervello: Non sono state riscontrate differenze tra i due gruppi nella concentrazione di GM utilizzando la tecnica di morfometria voxel-based (FSL-VBM). (69)

Al fine di tener conto delle differenze di gruppo sotto-soglia della materia grigia (grey matter, GM), le mappe anatomiche sono state aggiunte come covariate nel modello di

analisi fMRI. Le differenze di segnale BOLD osservate e in precedenza descritte, tra i controlli ed i pazienti, non sono state modificate dall'aggiunta di queste covariate e sono viceversa sopravvissute come chiare differenze tra i due gruppi.

Valutazione post scan: pazienti e controlli hanno riconosciuto tutte le immagini e valutato in maniera simile la valenza e l'arousal degli stimoli visivi proposti (Tabella 1).

Discussione

La tecnica di neuroimaging fMRI è stata utilizzata per indagare l'elaborazione nervosa delle emozioni in un gruppo di pazienti con RCU in remissione e per compararla a quella di un gruppo di controlli sani. Le nostre analisi hanno evidenziato una diminuzione del segnale BOLD nei pazienti rispetto ai controlli per il contrasto "positive vs riposo" nel MTL sinistro (un'area che comprende sia amigdala che ippocampo), nel talamo bilaterale e in alcune regioni del cervelletto. Inoltre, l'analisi ROI ha mostrato una riduzione bilaterale del segnale BOLD nell'amigdala dei pazienti con RCU rispetto ai controlli sani. I nostri risultati di fMRI possono essere interpretati escludendo la presenza di fattori di confondimento legati alla morfologia del cervello e allo stato emotivo di base. Infatti le differenze del segnale BOLD per il contrasto "positive vs riposo" sono state individuate in assenza di differenze di volumi di GM ed in assenza di differenze nello stato emotivo di base come rivelato dai punteggi dei questionari psicometrici compilati dai partecipanti prima della sessione di scan.

I nostri risultati hanno quindi evidenziato un legame tra la RCU, una malattia intestinale, e modificazioni cerebrali funzionali nelle strutture chiave del BGA. L'amigdala infatti gioca un ruolo fondamentale nella elaborazione nervosa delle emozioni (57, 58) ed è inoltre una struttura cardine del BGA: il substrato anatomo-funzionale per le influenze bidirezionali tra emozioni e funzioni gastrointestinali. (51-53) L'amigdala riceve informazioni sensoriali attraverso due vie: i) afferenze paucisinaptiche, "rapide" ma grezze, dal talamo sensoriale e ii) afferenze polisinnaptiche più "lente" dalle aree corticali sensoriali. (54-56) Il nucleo laterale dell'amigdala (LA) rappresenta la sottostruttura di convergenza delle afferenze sensoriali mentre il nucleo centrale dell'amigdala (CE) rappresenta l'area da cui partono le vie efferenti amigdalofughe.

I segnali provenienti dal tratto gastrointestinale raggiungono il LA dell'amigdala attraverso vie afferenti cortico-talamiche. Il CE, a sua volta, elicitava l'insieme delle

cosiddette “risposte emozionali” associate all’arousal, ovvero quell’insieme di modificazioni comportamentali, neuroendocrine, autonome e gastrointestinali associate alle emozioni. (54-56, 59) In particolare, le abbondanti interconnessioni nervose tra il CE dell'amigdala e nuclei vagali del tronco encefalico, da cui partono le fibre parasimpatiche che innervano l’intestino, rappresentano il circuito neurale che permette l’attuarsi delle modificazioni gastrointestinali associate all’arousal emozionale. Nonostante l’attivazione dell'amigdala sia generalmente associata alle emozioni negative e al monitoraggio delle potenziali minacce ambientali (70), precedenti studi di neuroimaging hanno riscontrato che questa struttura limbica svolge un ruolo significativo anche nell’elaborazione degli stimoli emotivi positivi. (71) E’ stato infatti definito che il ruolo giocato dall'amigdala nell’elaborazione delle emozioni positive sia ascritto al contesto della memoria, codifica e recupero di eventi gratificanti. (72) In definitiva, la significativa riduzione di attivazione dell'amigdala nei pazienti con RCU rispetto ai controlli, in risposta a stimoli emotivi positivi, suggerisce che la RCU sia associata ad una disfunzione emotiva caratterizzata da una diminuzione di sensibilità alle emozioni positive di gioia e di benessere.

Il disegno sperimentale trasversale di questo studio non permette di stabilire nessi causali fra la disfunzione che abbiamo evidenziato e la malattia infiammatoria. La precedente attività infiammatoria intestinale dei pazienti con RCU potrebbe aver contribuito a determinare le alterazioni funzionali dell'amigdala che abbiamo trovato. Viceversa, la disfunzione dell'amigdala potrebbe essere considerata un elemento preesistente, o addirittura favorente, lo sviluppo della RCU. E’ stato appurato che le citochine infiammatorie, che si riversano abbondantemente nel torrente circolatorio in caso di RCU, possano accedere direttamente al cervello attraverso meccanismi di trasporto attivo. All’interno del sistema nervoso centrale (SNC), le citochine possono interagire con il metabolismo dei neurotrasmettitori e mettere in atto meccanismi di plasticità sinaptica. (73) In aggiunta a questo meccanismo umorale, i segnali provenienti dall’intestino infiammato, mediati dalla presenza delle citochine, possono raggiungere il cervello tramite l’attivazione del BGA. Il BGA fornisce una via di collegamento anatomica “solida” e diretta tra le regioni cerebrali del sistema limbico e la rete neurale intrinseca di cui è fornito tratto gastrointestinale (ENS). D'altra parte, non possiamo trascurare il fatto che la disfunzione dell'amigdala dei pazienti con RCU associata alle emozioni

positive possa influenzare il decorso clinico di questa malattia infiammatoria. Recentemente è stato riportato che la consuetudine alle emozioni positive sia associata ad un miglioramento delle funzioni immunitarie. (74, 75)

Questo studio esplorativo ha alcuni potenziali limiti. Al fine di evocare correttamente il segnale BOLD nelle zone libiche di nostro interesse, abbiamo sviluppato un protocollo che alternava rapidamente le immagini neutre, positive e negative in ordine pseudocasuale. Questo protocollo non ci ha permesso di esaminare nei partecipanti, mentre eseguivano lo scan, alcuna funzione intestinale o parametri neuroendocrini e immunitari associati alle diverse emozioni. Inoltre i nostri risultati dovranno essere replicati in campioni più ampi, estendendo questo protocollo sperimentale anche a pazienti con MC o con altri disturbi infiammatori. Un paradigma event-related potrebbe essere più indicato del disegno a blocchi che abbiamo utilizzato per studiare l'elaborazione nervosa delle emozioni. Infine, tra i due gruppi, non sono state riscontrate differenze significative nell'attività cerebrale in risposta a stimoli neutri o negativi.

In conclusione, il nostro studio di fMRI rappresenta la prima prova sperimentale dell'esistenza di cambiamenti neurobiologici in pazienti affetti da RCU. Questi risultati, sebbene preliminari, potrebbero essere la base per dischiudere nuovi scenari per la ricerca sul rapporto tra emozioni, malattia cronica e infiammazione intestinale.

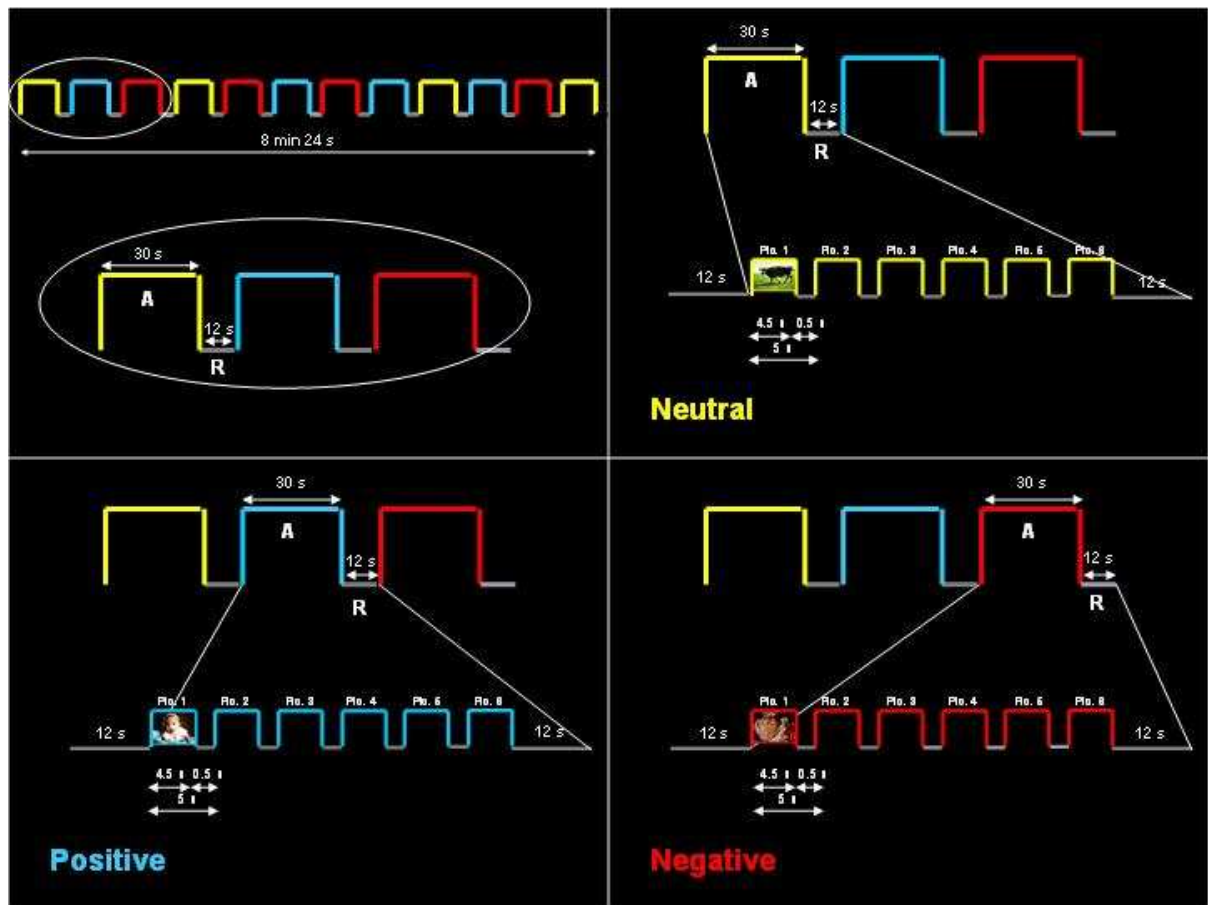


FIGURA 1. Schema del paradigma sperimentale (task visivo emozionale).

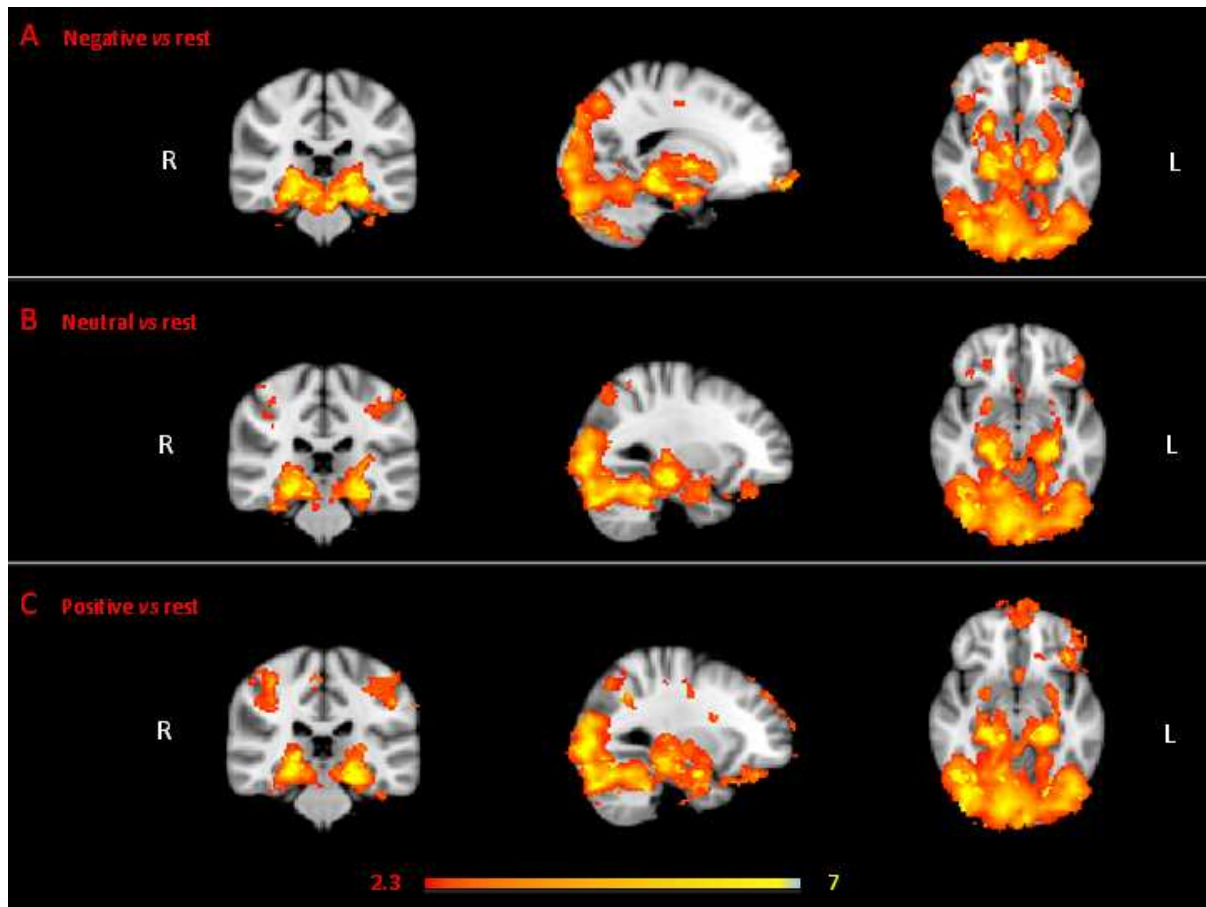


FIGURA 2. Risultati fMRI nei soggetti sani di controllo per le condizioni sperimentali “negative” (A), “neutre” (B), “positive” (C) vs “riposo”. Aumenti di segnale BOLD sono stati trovati bilateralmente nel MTL (ippocampo e amigdala), nuclei sottocorticali (talamo, caudato e putamen), regioni frontali (corteccie orbitali e mediali) e lobo occipitale ($p < 0.05$ corretta per comparazioni multiple). Il colore varia da rosso a giallo (massima attivazione) in base all’aumento di attivazione cerebrale. R, emisfero destro, L emisfero sinistro.

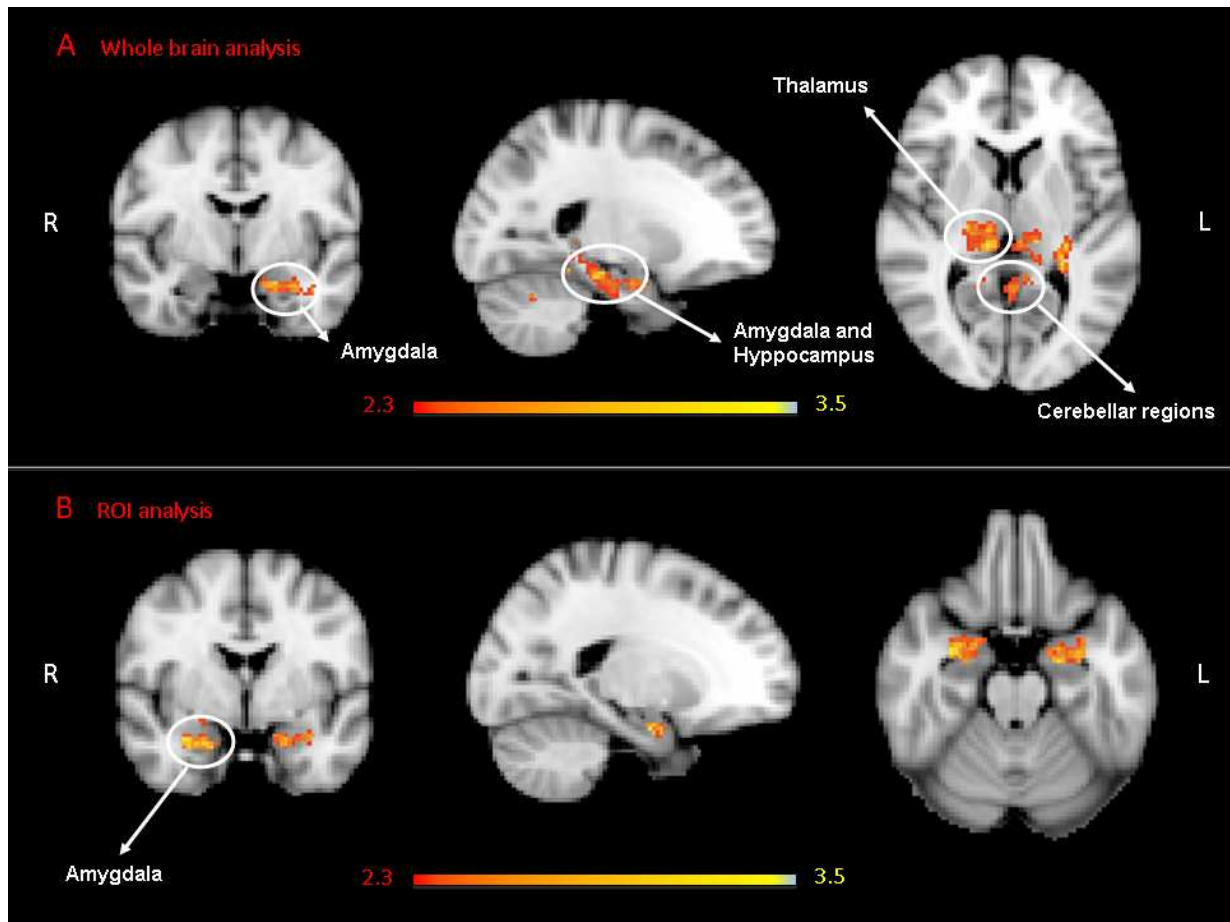


FIGURA 3. Differenze di gruppo fra pazienti con RCU e controlli sani per il contrasto “positive vs riposo”. A: l’analisi dell’intero cervello ha mostrato una diminuzione di attivazione nei pazienti all’interno del MTL (ippocampo e amigdala), nel talamo bilateralmente e regioni cerebellari. B: l’analisi ROI nell’amigdala ha rivelato una diminuzione di segnale BOLD bilateralmente ($p < 0.05$ corretta per comparazioni multiple). Il colore varia da rosso a giallo (massima attivazione) in base all’aumento di attivazione cerebrale. R, emisfero destro, L emisfero sinistro.

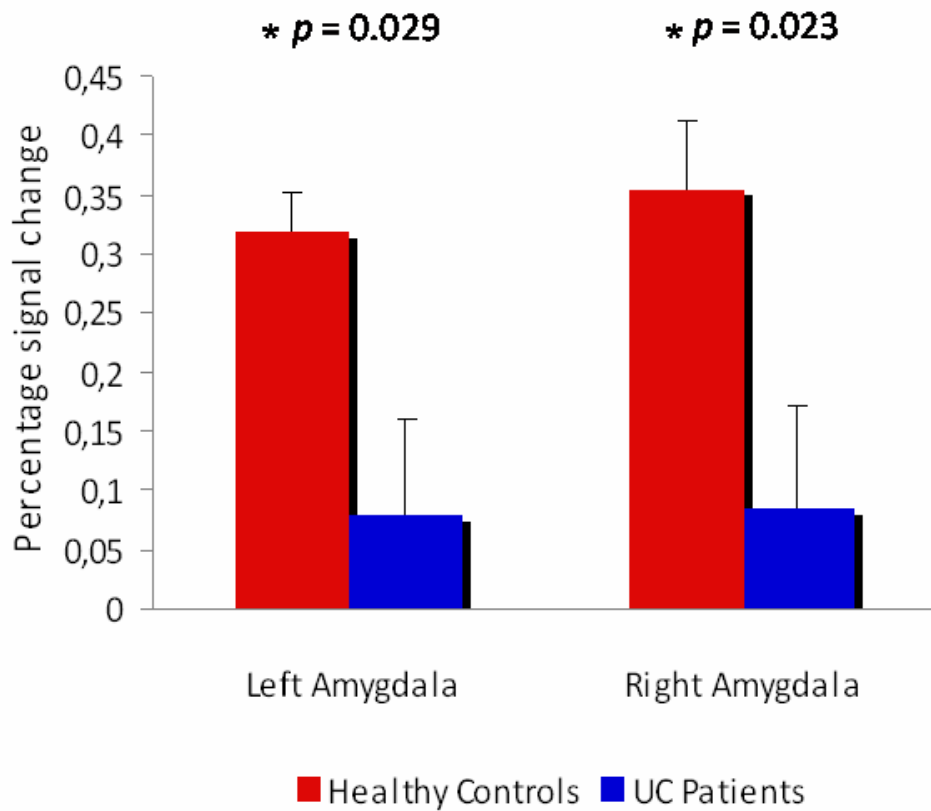


FIGURA 4. Percentuale di variazione di segnale BOLD per il contrasto “positive vs riposo” nell’amigdala. Gli istogrammi rossi rappresentano il valore medio (errore standard) per i controlli sani. Gli istogrammi blu rappresentano il valore medio (errore standard) per i pazienti con RCU.

Tabella 1. Risultati socio-demografici, psicometrici, per i due gruppi. I valori denotano le medie (\pm Deviazione Standard) o il numero dei soggetti.

	Controlli	Pazienti	P
	N=10	N=10	
<i>Socio-demografici</i>			
Età (anni)	28.2 (\pm 2.82)	29.4 (\pm 2.37)	0.3
Educazione (anni)	15.5 (\pm 2.64)	15.0 (\pm 3.45)	0.7
Sesso (Maschi/Femmine)	5/5	5/5	1
<i>Risultati psicometrici</i>			
STAI 1 (ansia di stato)	30.90 (\pm 7.04)	36.78 (\pm 11.18)	0.2
STAI 2 (ansia di tratto)	39.20 (\pm 4.21)	37.89 (\pm 7.20)	0.8
SQ Ansia	5.00 (\pm 3.39)	7.44 (\pm 4.69)	0.2
SQ Depressione	3.80 (\pm 3.26)	2.67 (\pm 1.66)	0.7
SQ Sintomi somatici	5.50 (\pm 3.21)	8.78 (\pm 7.24)	0.7
SQ Ostilità	3.90 (\pm 4.17)	5.33 (\pm 5.09)	0.8
PANAS Positivi	34.5 (\pm 4.53)	36.11 (\pm 6.09)	0.5
PANAS Negativi	18.7 (\pm 4.64)	20.44 (\pm 7.57)	0.7
<i>Valutazioni post scan</i>			
Valenza Negative	1.98 (\pm 0.68)	2.69 (\pm 0.75)	0.06
Arousal Negative	6.93 (\pm 1.05)	6.49 (\pm 1.66)	0.8
Valenza Neutre	5.62 (\pm 0.57)	5.35 (\pm 0.45)	0.4
Arousal Neutre	3.29 (\pm 1.20)	4.12 (\pm 1.21)	0.2
Valenza Positive	8.40 (\pm 0.59)	7.96 (\pm 1.01)	0.3
Arousal Positive	6.61 (\pm 1.37)	6.84 (\pm 1.67)	0.7

L'impatto dello stress sulla malattia infiammatoria. Uno studio di risonanza magnetica funzionale sull'elaborazione cerebrale dello stress e l'abituazione in pazienti con morbo di Crohn.

Introduzione

La malattia di Crohn (MC) è una patologia dell'intestino idiopatica, infiammatoria, recidivante e remittente, caratterizzata da iperproduzione di citochine infiammatorie. Fattori immunologici e numerosi fattori ambientali, tra cui lo stress psicologico, sono ritenuti capaci di influenzare il decorso clinico del MC e favorirne le riacutizzazioni infiammatorie. (76) Nonostante numerose evidenze cliniche suggeriscano che lo stress possa favorire le recidive nei pazienti, il ruolo dello stress e i sottesi meccanismi fisiopatologici restano ancora da chiarire.

Il cervello riveste un ruolo centrale nell'elaborazione degli stimoli stressanti e nella promozione di quel complesso di risposte comportamentali, nervose, endocrine, immunitarie, definito sinteticamente "risposta allo stress". (77) Gli stimoli stressanti (stressori) sono percepiti ed elaborati in centri nervosi alti che elicitano e controllano la cascata neuroimmune e neuroendocrina dello stress. La risposta cerebrale allo stress coinvolge l'integrazione complessa di centri cognitivi corticali e centri subcorticali comprendenti una serie di aree limbiche che include l'insula (Ins), l'amigdala (Amy), e l'ippocampo (HC). (78) Recenti studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI), hanno dimostrato che il risultato più pronunciato determinato a livello cerebrale dallo stress è la disattivazione di un gruppo di strutture limbiche quali l'Amy e l'HC. Inoltre, la disattivazione dell'HC è stata correlata al meccanismo neuroendocrino di regolazione del rilascio di cortisolo: il principale ormone dello stress negli esseri umani. (79)

Abbiamo ipotizzato che, rispetto ad un gruppo di controlli sani, i pazienti con MC presentassero differenze nell'elaborazione cerebrale degli stressori e nei meccanismi nervosi votati a ripristinare l'equilibrio (omeostasi) perturbato a seguito dell'esposizione a stress. Abbiamo sviluppato un protocollo di studio al fine di osservare nei partecipanti i processi di abituazione allo stress, ovvero la dinamica della risposta neurale a stressor ripetuti. Nel contesto dello stress, l'abituazione ha un ruolo protettivo per l'organismo perché consente di ripristinare e di mantenere l'omeostasi e quindi di

evitare gli effetti dannosi dell'esposizione prolungata ai mediatori dello stress, tra i quali si annoverano le citochine proinfiammatorie. Abbiamo effettuato in un gruppo di 20 pazienti con MC ed in uno di 18 volontari sani una serie di scan fMRI durante l'esecuzione di una versione modificata dello Stroop color test, adattata allo scopo di indurre stress psicologico nell'ambiente fMRI. (80) Lo scopo di questo studio è studiare la risposta nervosa allo stress nei pazienti con MC e quindi confrontarla a quella dei controlli sani.

Materiali e metodi

Reclutamento dei partecipanti: Due Unità per lo studio e cura delle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) collaboranti (Ospedale S. Orsola-Malpighi di Bologna e Ospedale Policlinico di Modena) hanno reclutato 20 pazienti con MC (11 femmine) con diagnosi stabilita che soddisfacevano i criteri di esclusione e di inclusione. I medici delle Unità MICI hanno esaminato tutti i partecipanti. Inoltre uno psicologo ha visitato tutti i partecipanti per valutare la presenza di disturbi psichiatrici attuali e pregressi. Il mancino è stato valutato mediante l'Inventario Edimburgo (Oldfield, 1971). Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato scritto a prendere parte allo studio, il quale era stato precedentemente approvato dal Comitato Etico locale.

Pazienti con MC: I criteri di inclusione erano: arco di età compresa tra i 18 e 48 anni, MC diagnosticato da almeno tre anni, remissione clinica (Crohn's Disease Activity Index (CDAI) (81) <150) da almeno 6 mesi, destrimani. I criteri di esclusione erano: indice di massa corporea (BMI) > 31, uso di corticosteroidi, uso di farmaci biologici e farmaci psicotropi negli ultimi 6 mesi, storia pregressa o attuale di malattie neurologiche o psichiatriche, claustrofobia, presenza di impianti metallici nel corpo.

Gruppo di controllo: Un gruppo di 18 soggetti sani volontari (10 femmine), è stato reclutato tramite annunci tra gli studenti e il personale dell'Università di Bologna. Sono stati sottoposti alle stesse procedure di screening e hanno preso parte allo studio come gruppo di controllo.

Procedure: Ogni partecipante si è astenuto dal mangiare, bere e consumare prodotti contenenti caffeina e tabacco 3 ore prima dello scan. Una volta entrati nella struttura ospedaliera, i partecipanti hanno avuto una completa descrizione del protocollo sperimentale, un modulo di consenso da firmare, e questionari psicometrici (vedi sotto).

I partecipanti hanno compilato i questionari e, al fine di familiarizzare con il compito da eseguire durante lo scan, hanno eseguito tre prove dello Stroop color test (vedi sotto). Dopo la pratica, i partecipanti sono stati condotti nella sala MRI. Terminato lo scan è stato chiesto loro di valutare quanto l'esperimento era stato da loro percepito stressante.

Questionari psicometrici: Allo scopo di valutare e confrontare tra i due gruppi lo stato emotivo di base all'inizio dell'esperimento fMRI, tutti i partecipanti hanno compilato:

- STAI (State Anxiety Index) (82) un questionario che fornisce informazioni sullo stato emotivo transitorio di tensione e di apprensione.

- PSQ (Perceived Stress Questionnaire) (83): Il PSQ è stato sviluppato per la ricerca clinica psicosomatica per valutare lo stress soggettivamente percepito a livello cognitivo.

Protocollo di neuroimaging: l'acquisizione dei dati è stata effettuata presso il Nuovo Ospedale Estense Civile S. Agostino a Baggiovara, Modena con uno scanner Philips Intera a 3.0 Tesla con una bobina a otto canali. Il protocollo di neuroimaging include sequenze di risonanza magnetica funzionale e strutturale.

MRI strutturale: dati ad alta risoluzione 3D T1-weighted MRI sono stati acquisiti per ogni partecipante. Tempo di ripetizione (TR) = 9.9 ms, tempo di eco (TE) = 4.6 ms; 170 sezioni sagittali; dimensione del voxel = 1x1x1 mm.

fMRI: i dati fMRI sono stati acquisiti utilizzando un gradiente echo planar imaging (EPI), [TR = 2000 ms, TE = 35 ms, flip angle (FA) = 12, campo visivo (FOV) = 240 mm, matrice 80x80, 30 fette di 3 millimetri ciascuna con un divario di 1 mm, numero totale dei volumi acquistati = 240].

Protocollo sperimentale (task): i partecipanti hanno completato uno Stroop color test modificato per l'ambiente fMRI. (81) Due run, ognuno composto di 4 blocchi sono stati mostrati ai partecipanti. Ogni blocco rappresentava una delle due condizioni sperimentali che abbiamo chiamato "congruente" e "incongruente". (Figura 1) In ogni tavola una parola target appariva in alto nel riquadro, mentre quattro parole identificatrici apparivano in una riga in basso.

Nella condizione congruente la parola target è comparsa in un colore congruente con la parola bersaglio (rosso scritto con inchiostro rosso), e del resto, tutte le parole identificatrici apparivano in quello stesso colore. Al contrario, nella condizione incongruente la parola target è comparsa in un colore incongruente con la parola target

(rosso scritto con inchiostro blu) ed anche le quattro parole identificatrici apparivano in colori incongruenti con i colori evocati dalla parola.

I partecipanti sono stati istruiti ad identificare il colore con cui è stata mostrata la parola target, selezionando una delle quattro parole identificatrici il più accuratamente possibile. I partecipanti potevano scegliere la risposta premendo uno dei quattro pulsanti corrispondenti su una pulsantiera che abbiamo fornito loro e ancorata alla mano destra. Lo stesso protocollo è stato ripetuto due volte (due run) una dopo l'altra con pochi minuti di pausa tra le due sequenze.

Valutazione post scan: I partecipanti, fuori lo scanner, hanno valutato quanto stressante era stato l'esperimento utilizzando una scala visiva analogica (VAS) di 10 punti, in cui 1 corrispondeva a "per nulla stressante" e 10 corrispondeva a "estremamente stressante".

Analisi statistica per le variabili imaging e non-imaging: L'analisi statistica di variabili non-imaging è stata effettuata utilizzando il software SPSS (SPSS, Inc., Chicago). T-test sono stati utilizzati per le variabili socio-demografiche, il test di Fisher è stato usato per le variabili categoriche. Variabili imaging: una misura ANOVA a due vie con una via rappresentata dal contrasto "run 1 vs run 2" e la seconda rappresentata dal contrasto "pazienti vs controlli" è stata utilizzata per analizzare le misure di variazione di percentuale del segnale BOLD. Gli anni di studio ed i volumi di sostanza grigia (GM) sono stati aggiunti al modello ANOVA come covariate.

Analisi delle immagini: L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software FSL (FMRIB Software www.fmrib.ox.ac.uk/FSL) (84, 85).

Risonanza magnetica funzionale: L'analisi è stata effettuata utilizzando fMRI FEAT FMRI (Tool v. 5,98, <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/feat5/>). Ogni run per ogni partecipante è stato prima analizzato singolarmente e poi inserito nel gruppo di più alto livello di analisi. Nel dettaglio, la pre-elaborazione consisteva in correzione del movimento della testa, l'estrazione del volume del cervello, smussamento (smoothing) spaziale usando un kernel gaussiano di FWHM (larghezza a metà altezza) 6 mm, e passato al filtro temporale equivalente ad un periodo di 160 s. I dati funzionali sono stati allineati alle immagini strutturali (dello stesso soggetto) utilizzando lo strumento di registrazione lineare (Linear FMRIB's Image Registration Tool, FLIRT) (86). Questa trasformazione è stata poi ulteriormente ottimizzata per una precisione ancora maggiore con un Boundary-Based. In dettaglio, si allinea l'immagine funzionale con l'immagine

strutturale, massimizzando la differenza funzionale su tutta la superficie anatomicamente definita tra la sostanza grigia corticale e la sostanza bianca (87). Le immagini strutturali sono state trasformate in uno spazio standard utilizzando uno strumento di registrazione non-lineare (FNIRT). L'analisi a livello di gruppo è stata effettuata utilizzando l'analisi locale FMRIB di effetti misti (FLAME) (66). Il contrasto principale di interesse è stato "incongruente rispetto congruente". Il modello generale lineare (GLM) prevedeva due principali fattori: task (Run1 vs Run2) e gruppo (pazienti vs controlli) e la loro interazione. Per ridurre i potenziali effetti attribuibili a valori molto lontani dalle medie (outlier), uno strumento automatico "deweighting outlier" è stato inoltre applicato (67).

MRI strutturale: l'analisi di tutto il cervello è stata effettuata utilizzando un'analisi morfometrica voxel-based (FSL-VBM), utilizzando le impostazioni predefinite, come descritto in www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslvbm/ (68). In breve, sono stati eseguiti l'estrazione e la segmentazione dei tessuti cerebrali. Le immagini di volume parziale sono state allineate alla norma, prima con lo spazio lineare (FLIRT) e quindi non-lineare (FNIRT). Le immagini risultanti sono state mediate, modulate e smussate con un kernel sigma gaussiana isotropa di 4 mm (~ 9 millimetri FWHM) per creare un modello di studio specifico, e le immagini di GM ri-registrate con la modulazione della curvatura di campo Jacobiano.

Analisi per regione di interesse (ROI): Per l'interpretazione delle differenze di gruppo, delle differenze significative durante il compito fMRI sono state create delle maschere anatomiche per ogni soggetto. Le variazioni percentuali di segnale nelle ROI sono state registrate utilizzando Featquery (parte di FSL) per il contrasto di interesse ("incongruente rispetto congruente"). Le ROI sono state ispezionate visivamente sul piano coronale per garantire l'accuratezza.

Covariate: le immagini strutturali sono state utilizzate come covariate supplementari su un modello voxel-by-voxel (69). Le immagini relative alla GM di ciascun soggetto sono state registrate, armonizzate e aggiunte come regressori nel GLM. Allo stesso modo, poiché i due gruppi avevano un livello di istruzione significativamente differente (vedi Tabella 1), questo parametro è stato aggiunto come covariata al modello fMRI. Le differenze di segnale BOLD non hanno registrato variazioni con l'aggiunta di queste covariate.

Risultati

Partecipanti: le caratteristiche socio-demografiche di tutti i partecipanti e le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate nella Tabella 1. Tutti i partecipanti erano destrimani. Non sono emerse differenze tra i controlli (n = 18) e pazienti (n = 20) per età, sesso, BMI, e questionari psicometrici. Il livello di istruzione è risultato significativamente differente (p=0.040) tra i controlli ed i pazienti (Tabella 1).

Risonanza magnetica funzionale: per il contrasto "incongruente rispetto congruente" differenze significative nel segnale BOLD sono state trovate in tre gruppi distinti di regioni cerebrali. Queste comprendono i) regioni del lobo destro mediale-temporale (MTL) comprendenti la testa dell'ippocampo, l'amigdala il giro paraippocampale, la corteccia orbito-frontale e temporale fusiforme) [segnaliamo qui di seguito, il punteggio massimo z, la dimensione dei cluster in voxel, (picco x, y, z coordinate nello spazio di serie): 4.51, 1035, (28 14 -22)], ii) l'insula sinistra e il putamen [3.33, 196, (20 4 4)] e iii) nelle regioni cerebellari [3,74, 452, (26 -46 -30)] (Figura 1). Le differenze significative nella variazione percentuale di segnale BOLD tra i gruppi per il contrasto "incongruente rispetto congruente" sono riportate in Tabella 2. I valori statistici delle differenze trovate sono: MTL: F = 22.7, p <0.0001, putamen e insula: F = 11.7, p = 0.002, regioni del cervelletto: F = 8,4 p = 0.006.

MRI strutturale e covariate: Nessuna differenza è stata riscontrata tra i 2 gruppi di studio della concentrazione di GM, utilizzando FMRIB Software Library (FSL) morfometria voxel-based (VBM) (84). GM e livello di istruzione (espresso in anni) sono stati aggiunti come covariate per il modello di analisi fMRI. In questo modo le eventuali differenze potenziali sotto soglia di GM sono state contabilizzate nella nostra analisi fMRI. Le differenze di segnale BOLD osservate tra controlli e pazienti non sono state alterate dall'aggiunta di queste covariate, ma sono sopravvissute come chiare differenze tra i 2 gruppi.

Valutazione post-scan: pazienti con MC e controlli hanno percepito il protocollo sperimentale stressante in maniera simile. (Tabella 1).

Discussione

In questo studio abbiamo mostrato differenze significative tra i pazienti con MC e

controlli sani nell'elaborazione nervosa dello stress. Rispetto ai controlli, i pazienti con MC hanno mostrato una dinamica inversa dell'abituazione agli stimoli stressanti in tre gruppi di strutture cerebrali coinvolte sia nell'elaborazione nervosa dello stress che nei meccanismi di regolazione delle vie effettrici dello stress.

Una volta elaborato a livello del SNC, lo stress può influenzare i processi infiammatori periferici attraverso tre vie effettrici interconnesse: la cosiddetta via autonoma neuroimmunitaria che comprende i) il sistema nervoso simpatico (SNS) e ii) il sistema nervoso parasimpatico (SNP) e iii) la via neuroendocrina che coinvolge l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). (88) I mediatori delle vie effettrici dello stress ovvero la noradrenalina (NA), l'acetilcolina (ACH), il cortisolo, controllano la produzione delle citochine infiammatorie legandosi direttamente ai recettori specifici esposti dai macrofagi, granulociti, linfociti e altre cellule immunitarie.

Il SNS innerva riccamente i tessuti linfoidei. I neurotrasmettitori del SNS possono raggiungere le cellule immunitarie bersaglio sinapticamente, ed inoltre nonsinapticamente: per diffusione dalla terminazione nervosa alla cellula bersaglio situata in più sedi lontane. Infine i mediatori del SNS possono raggiungere le cellule immunitarie per via umorale, attraverso il torrente circolatorio.

La via effettrice parasimpatica (SNP) coinvolge principalmente il nervo vago. Il nervo vago esercita un'attività inibitoria tonica sulla liberazione da parte dei macrofagi tissutali del tumor necrosis factor (TNF) α : un potente agente pro-infiammatorio coinvolto pesantemente nella fisiopatologia del MC. In sintesi, questo meccanismo immunomodulatorio acetilcolinergico, mediato dal nervo vago, mira a mantenere l'equilibrio omeostatico nella produzione di citochine periferiche, ed è stato denominato riflesso infiammatorio. (89)

La terza via coinvolge l'attività dell'asse HPA e la relativa cascata neuroendocrina che culmina con il rilascio da parte dei surreni, dell'ormone cortisolo: un potente immunomodulatore.

Le principali anomalie funzionali cerebrali che abbiamo registrato nei pazienti con MC in risposta allo stress hanno riguardato l'Amy e l'HC, la corteccia insulare e il cervelletto. L'Amy esercita un ruolo primario nella reazione di paura e nelle emozioni negative ed è in grado di controllare le vie effettrici dello stress. Attraverso le sue robuste interconnessioni con i nuclei del tronco encefalico e dell'ipotalamo, l'Amy innesca la

risposta simpatica (SNS) allo stress. Inoltre, l'Amy può controllare il riflesso infiammatorio attraverso le sue fitte proiezioni al nucleo motore dorsale (DMN) del nervo vago. (90) Infine, l'Amy svolge un ruolo eccitatorio nella regolazione dell'attività dell'asse HPA e nella conseguente produzione di ormoni dello stress. (91)

L'HC ha un ruolo di primo piano nel controllo della risposta neuroendocrina allo stress. Precedenti studi funzionali hanno dimostrato che l'HC esercita un'attività inibitoria tonica sull'asse HPA e sulla conseguente secrezione di cortisolo. (79) Inoltre i numerosi recettori per i corticosteroidi (CS) espressi dai neuroni ippocampali, consentono all'HC di mantenere l'omeostasi per gli ormoni dello stress attraverso meccanismi di feed-back. La corteccia dell'insula è una neocorteccia con funzioni visceromotorie e nocicettive che rappresenta l'interfaccia tra le emozioni e le funzioni viscerali. Recenti studi di neuroimaging hanno dimostrato che l'attivazione della corteccia insulare, evocata dallo stress, è associata con le variazioni del tono del SNS. (91) Inoltre la corteccia insulare è coinvolta attivamente nei meccanismi nervosi di regolazione della risposta immunitaria. (REF) Analogamente all'Ins, anche il Cervelletto svolge un ruolo di mediatore della risposta simpatica allo stress (91).

La diversa di abitudine allo stress che abbiamo trovato nei pazienti con MC suggerisce che in questo gruppo di soggetti i meccanismi nervosi che permettono di ristabilire l'omeostasi dopo l'esposizione allo stress, siano inadeguati. Appare di notevole interesse il fatto che le strutture cerebrali che hanno abituato allo stress in modo diverso nei pazienti controllino le vie effettrici dello stress e quindi le interazioni fra stress, sistema nervoso e sistema immunitario. In definitiva, è plausibile pensare che le vie effettrici dello stress siano alterate nei pazienti con MC e che quest'insieme di fattori possa favorire le esacerbazioni infiammatorie della patologia intestinale. Nel complesso, i nostri risultati corroborano l'ipotesi che lo stress possa giocare un ruolo nel decorso clinico del MC e suggeriscono inoltre plausibili meccanismi fisiopatologici sottesi a questa relazione. Se confermati e ampliati, i nostri risultati potrebbero far luce sull'impatto dello stress nel MC e aprire la strada a nuove ricerche e nuove strategie terapeutiche per i pazienti affetti da MICI.

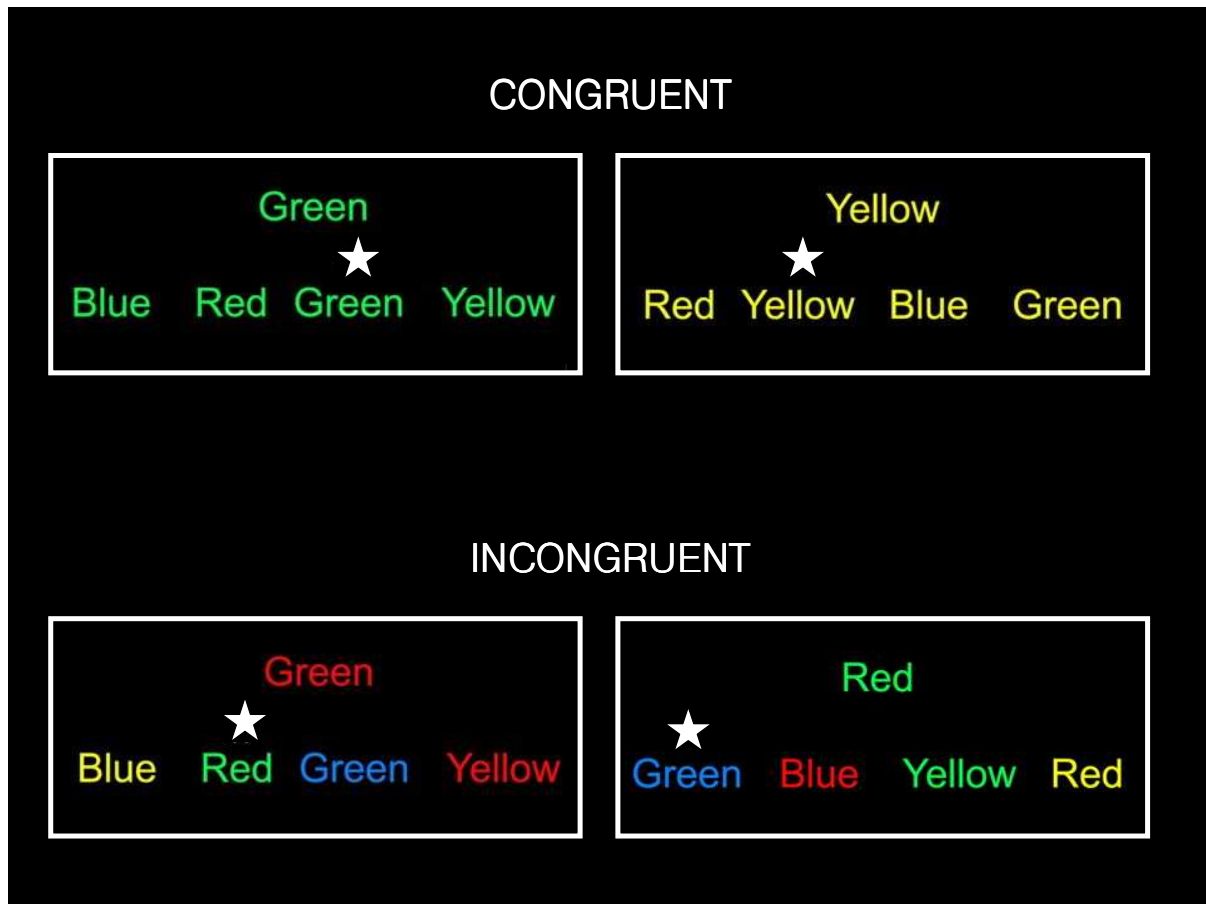


Figura 1. Schema del protocollo visivo (Stroop color test modificato per fMRI) utilizzato nello studio fMRI. In alto sono rappresentati due pannelli congruenti mentre in basso due incongruenti. L'asterisco indica la risposta esatta che il soggetto doveva riconoscere durante lo scan.

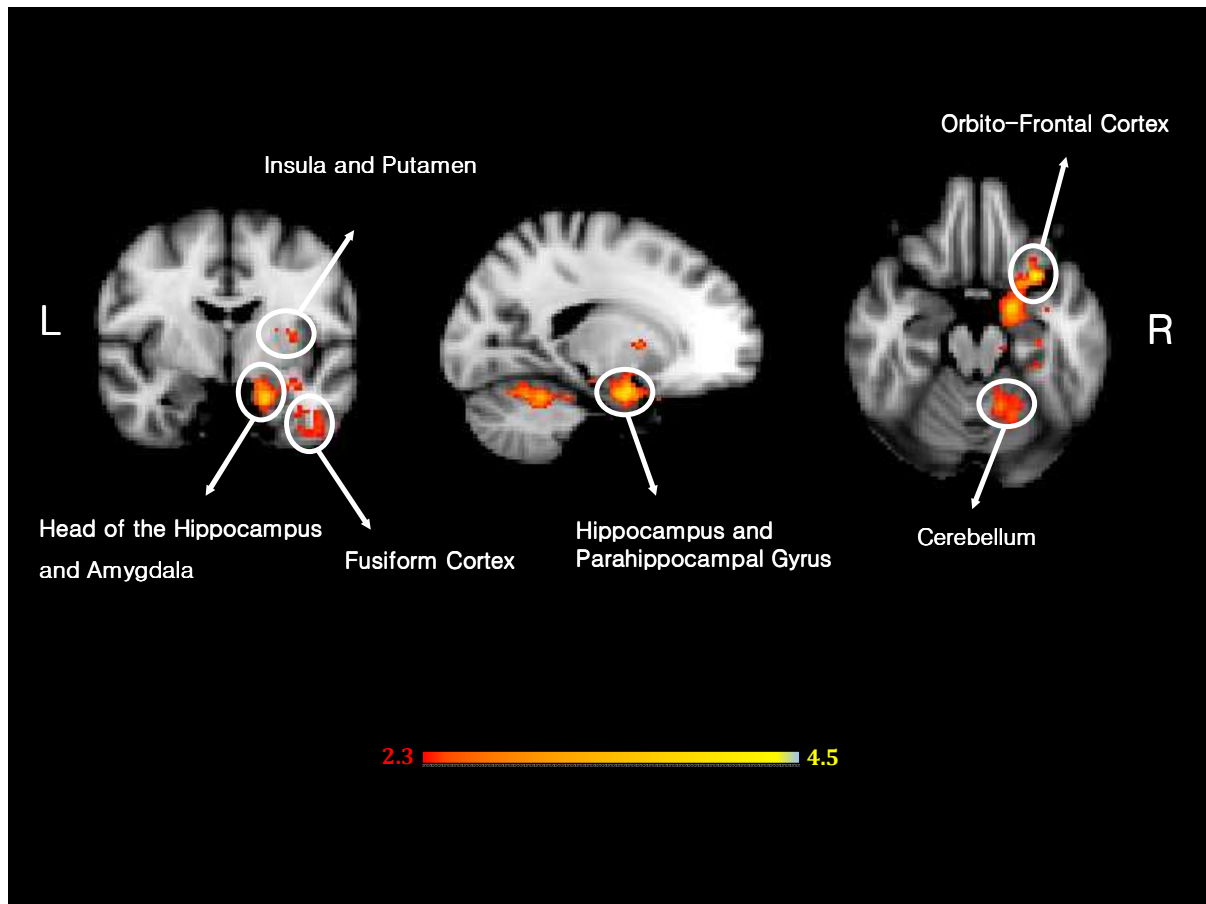


Figura 2. Aree cerebrali la cui attivazione è risultata significativamente differente nel modello statistico elaborato per studiare l'attivazione e abitudine allo stress fra i pazienti con morbo di Crohn e controlli sani. Il colore varia da rosso a giallo (massima attivazione) in base all'aumento di attivazione cerebrale. R, emisfero destro, L emisfero sinistro.

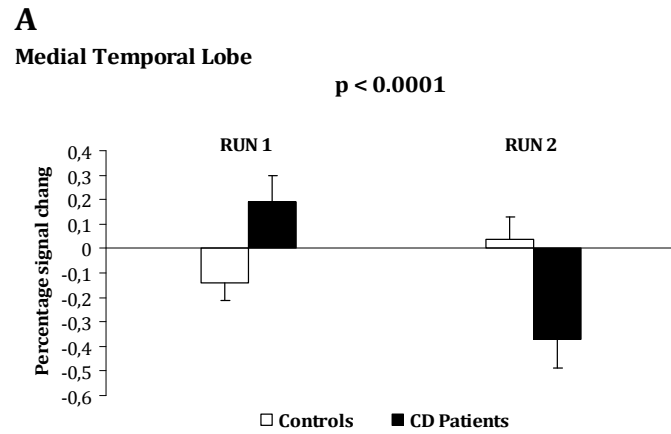


Figura 3A. Gli istogrammi mostrano l'attivazione (percentuale di cambiamento di segnale BOLD e errore standard) nel lobo temporale mediale nei due run dei pazienti con morbo di Crohn (istogramma in nero) e controlli (istogramma in bianco). Si può notare che l'andamento dell'attivazione cerebrale è opposto fra i due gruppi ($p < 0.0001$).

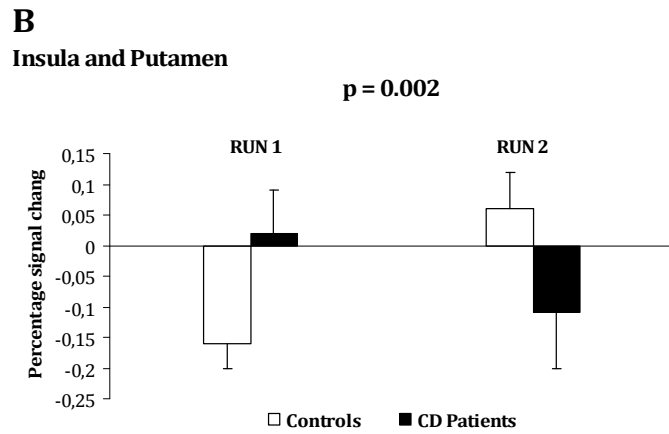


Figura 3B. Gli istogrammi mostrano l'attivazione (percentuale di cambiamento di segnale BOLD e errore standard) nell'insula e nel putamen nei due run dei pazienti con morbo di Crohn (istogramma in nero) e controlli (istogramma in bianco). Si può notare che l'andamento dell'attivazione cerebrale è opposto fra i due gruppi ($p < 0.002$).

C

Cerebellum

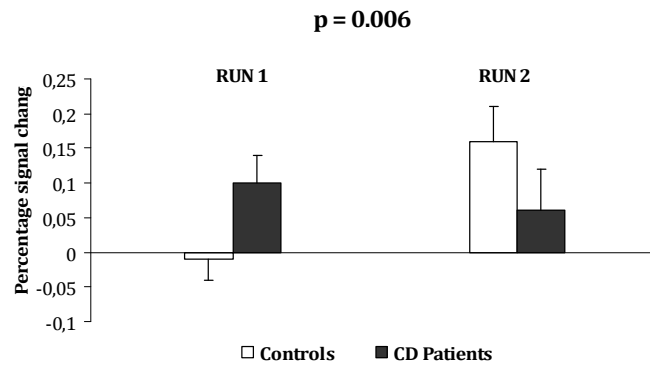


Figura 3C. Gli istogrammi mostrano l'attivazione (percentuale di cambiamento di segnale BOLD e errore standard) nel cervelletto nei due run dei pazienti con morbo di Crohn (istogramma in nero) e controlli (istogramma in bianco). Si può notare che l'andamento dell'attivazione cerebrale è opposto fra i due gruppi ($p < 0.006$).

Tabella 1. Caratteristiche socio-demografiche e cliniche e risultati psicometrici dei due gruppi. I valori indicano la media (\pm Deviazione Standard) o il numero dei soggetti.

	Pazienti N=20	Controlli N=18	P
<i>Socio-demografiche</i>			
Età (anni)	32.8 (\pm 7.22)	29.3 (\pm 5.63)	0.1
Educazione (anni)	14.1 (\pm 3.23)	15.8 (\pm 2.41)	0.04
Sesso (M/F)	9/11	8/10	1
<i>Caratteristiche cliniche</i>			
BMI	22.54 (3.69)	22.53 (2.54)	0.9
Durata di malattia (anni)	10.33 (5.94)		
Durata di remissione (anni)	4.12 (4.23)		
Localizzazione	Ileo 10 Ileo-colica 6 Ileo-cecale 2		
Complicanze Extraintestinali	Artralgia 4 Eritema Nodoso 1 Nessuna 13		
Chirurgia (resezione e anastomosi)	Trattati 8 Mai trattati 10		
Uso di biologici	Trattati 6 Mai trattati 12		
<i>Questionari psicometrici</i>			
STAI	31.80 (\pm 7.03)	35.48 (\pm 10.18)	0.2
PSQ	65.11 (\pm 12.74)	62.56 (\pm 7.33)	0.4
<i>Valutazione Post scan</i>			
VAS	5.82 (\pm 1.88)	6.12 (\pm 2.06)	0.6

Tabella2. Valori di percentuale di cambiamento di segnale BOLD durante l'esecuzione dello Stroop color test nei due gruppi divisi per i due run. Sono stati estratti i valori per le interazioni significative Task x Gruppo per il contrasto di interesse "incongruente vs congruente" nel lobo temporale mediale (MTL), insula e putamen (In+Pu) e cervelletto (Cereb). I valori di *p* indicano i risultati dell'ANOVA per le interazioni Task x Gruppo. I valori indicano la media (\pm Errore Standard).

	<i>Controlli</i>		<i>Pazienti</i>		<i>P</i>
	<i>N = 18</i>		<i>N = 20</i>		
	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2	
MTL	-0.14 (± 0.07)	0.04 (± 0.09)	0.19 (± 0.11)	-0.37 (± 0.12)	< 0.0001
Ins+Pu	-0.16 (± 0.04)	0.06 (± 0.06)	0.02 (± 0.07)	-0.11 (± 0.09)	0.002
Cereb	-0.01 (± 0.03)	0.16 (± 0.05)	0.10 (± 0.04)	0.06 (± 0.06)	0.006

Alterazioni morfologiche cerebrali in pazienti con morbo di Crohn: uno studio sul coinvolgimento del cervello in corso di malattie infiammatorie croniche intestinali.

Introduzione

Il morbo di Crohn (MC) è una malattia infiammatoria, cronica, recidivante e remittente dell'intestino che, insieme alla retto colite ulcerosa (RCU), appartiene al gruppo delle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI, in inglese inflammatory bowel disease, IBD). Un insieme di evidenze cliniche e sperimentali suggerisce il coinvolgimento del cervello a livello morfologico (92-94) e funzionale (95) in questi disturbi infiammatori intestinali. Nel contesto del MC, caratterizzato dalla presenza di infiammazione intestinale florida e da una miriade di mediatori della flogosi circolanti e rilasciati dai tessuti, le citochine infiammatorie possono giocare un ruolo nello sviluppo di modificazioni neuroplastiche cerebrali. Infatti, le citochine possono avere accesso al sistema nervoso centrale (SNC), interagire con i neuroni di svariate strutture cerebrali comprese le aree limbiche (96) e indurre, a loro volta, la produzione di nuovi mediatori infiammatori da parte delle cellule gliali del cervello. (97, 98) Oltre a questo meccanismo umorale, i segnali infiammatori di provenienza intestinale possono raggiungere il cervello attraverso l'attività di una struttura anatomica "solida": l'asse cervello intestino (brain-gut axis, BGA). (99) Il concetto di BGA, che comprende le vie nervose parasimpatiche (vagali) e simpatiche, è stato recentemente proposto per descrivere la comunicazione bidirezionale anatomo-funzionale tra il SNC e il tratto gastroenterico. Il BGA fornisce un collegamento diretto tra la rete di neuroni intrinseca del tratto gastrointestinale: il sistema nervoso enterico (enteric nervous system, ENS), e le regioni cerebrali appartenenti al sistema limbico.

La corteccia cingolata (CC) è una struttura limbica posta sulla parete mediale del lobo frontale a circondare il corpo calloso. Le differenze nell'architettura cellulare e recenti studi funzionali hanno portato a suddividere la CC in quattro regioni. (100) Queste regioni e delle loro suddivisioni sono: i) corteccia cingolata anteriore (ACC) (s, subgenuale [area di Brodmann (BA) 25], p, pregenuale [BA 33, 24 bis, 24 ter, 24cv, 24cd,

e 32]), ii) corteccia cingolata mediale (MCC) (a, anteriore [BA 33, 24 bis, a24b', a24c'v, a24c'd], p, posteriore [p24a BA ', p24b', 24dv, 24dd]), iii) corteccia cingolata posteriore (PCC), e iv) corteccia retrospleniale (RSC). (101) (Figura 1) Le abbondanti interconnessioni esistenti fra i nuclei vagali nel tronco encefalico e quelli della regione rostrale-mediale della CC (pACC/aMCC,) attestano che queste aree limbiche sono strutture critiche del BGA. Inoltre, sono state osservate in questa stessa area disfunzioni sia morfologiche (92,93) che funzionali (94) nei pazienti con sindrome dell'intestino irritabile (irritable bowel syndrome, IBS), il principale disturbo funzionale intestinale. Infine, recenti studi di neuroimaging, che indagavano l'attività cerebrale in corso di infiammazione, hanno dimostrato che i processi infiammatori periferici si associano ad attività nervosa nella pACC/aMCC. (112,113)

Le citochine prodotte dall'infiammazione periferica potrebbero indurre danni tissutali cerebrali attraverso meccanismi neuroplastici, di neurodegenerazione e di rimodellamento strutturale delle aree limbiche. (96) Tuttavia, nei pazienti con MC, non è ancora stata effettuata un'analisi approfondita della morfologia cerebrale. Di conseguenza non è stata ancora chiarificata la presenza di plausibili modificazioni neuroplastiche del sistema limbico.

Abbiamo ipotizzato che, rispetto ai controlli sani, i pazienti con MC possono presentare la differenza nella concentrazione della materia grigia (GM) nelle strutture limbiche associate al BGA. Alla luce della possibilità che l'esposizione di queste aree limbiche ai mediatori infiammatori abbia provocato effetti dannosi, abbiamo ipotizzato di trovare una diminuita densità di GM nei pazienti con MC. Abbiamo quindi condotto studio di morfometria voxel based (VBM) in un gruppo di 18 pazienti con MC in fase di remissione e in un gruppo di 18 controlli sani. Lo scopo di questo studio era di valutare e confrontare la morfologia cerebrale tra questi due gruppi di soggetti.

Materiali e metodi

Reclutamento Partecipanti: Questo studio è stato condotto con l'approvazione del Comitato Etico locale ed un consenso informato scritto è stato firmato da tutti i partecipanti. Due collaboranti Unità IBD (Ospedale S.Orsola-Malpighi, Bologna e Ospedale Policlinico, Modena) hanno reclutato 18 pazienti con MC sulla base di criteri di

esclusione ed inclusione elencati sotto. Uno psicologo ha visitato tutti i partecipanti per valutare la presenza di disturbi psichiatrici.

Pazienti con MC: Criteri di inclusione: arco di età compresa tra i 18 e 46 anni, remissione clinica (Crohn's Disease Activity Index (CDAI) (81) <150) da almeno 6 mesi. Criteri di esclusione: terapia corrente con corticosteroidi, biologici e farmaci psicotropi negli ultimi 6 mesi, presenza o anamnesi di malattie neurologiche o psichiatriche, claustrofobia, presenza di residui metallici nel corpo.

Abbiamo chiesto di partecipare allo studio a 22 pazienti consecutivi ambulatoriali delle due Unità IBD che soddisfacevano i criteri di inclusione e di esclusione. Quattro pazienti hanno rifiutato di partecipare, mentre 18 (10 femmine) sono stati arruolati per lo studio.

Gruppo di controllo: un gruppo di 18 soggetti sani (10 femmine), sono stati reclutati con annunci tra gli studenti e il personale dell'Università di Bologna e di Modena. Hanno subito le procedure di selezione dei pazienti e hanno preso parte allo studio come gruppo di controllo.

Protocollo Neuroimaging: Gli scan sono stati eseguiti presso il dipartimento di neuroradiologia dell'università di Modena con uno scanner 3.0 Tesla. Le immagini anatomiche sono state acquisite in 30 sezioni attraverso una serie di assiale spin-echo T2 pesate (TR = 3000 ms, matrice di acquisizione = 230 x 230 spessore dello strato, = 3). Alla fine di ogni sessione, per ciascun soggetto, immagini anatomiche 3D sono state acquisite in 170 sessioni attraverso una serie spin-echo T1 pesate (TR = 9.900 msec, TE = 46 msec, FOV = 256x256 mm, acquisizione spessore fetta matrice = 256x256, = 1 mm). Questo volume è stato utilizzato per studiare la correlazione di morfometria voxel based (VBM).

Risultati

Differenze di densità della sostanza grigia (GM) fra pazienti e controlli sono emerse nella aMCC e nelle circonvoluzioni frontali mediali superiori ed inferiori. Nei pazienti si evidenzia sempre una diminuita densità di GM rispetto ai controlli sani (Tabella 1 e Figura 2).

I risultati dell'analisi di correlazione eseguita fra la durata della malattia espressa in anni e la densità di GM hanno mostrato correlazioni positive significative fra durata ed un vasto gruppo di strutture corticali e subcorticali (Tabella 2 e Figura 3).

Discussione

In questo studio abbiamo riscontrato differenze cerebrali morfometriche tra pazienti con MC e controlli sani. Rispetto ai controlli, i pazienti con MC esibiscono un volume ridotto di GM nell'aMCC. Questa zona limbica rappresenta l'interfaccia tra processi emotivi e funzioni intestinali. Dal punto di vista funzionale, l'aMCC è coinvolta in processi cognitivi-emotivi (attenzione, monitoraggio di errori, regolazione affettiva) (101) e processi di sensibilità viscerale. Recenti studi di neuroimaging hanno evidenziato attività nervosa nella CC rostro-mediale in risposta a stimolazioni meccaniche intestinali. (105) D'altra parte, anomalie morfologiche a carico dell'aMCC, caratterizzate da diminuzione di densità della GM, sono state trovate in soggetti vittime di violenze fisiche (106), pazienti con disturbi di panico (107) e pazienti affetti da IBS. (93, 94)

Le citochine infiammatorie promuovono processi di rimodellamento neuronale attraverso diversi meccanismi quali l'induzione di apoptosi negli astrociti e oligodendrociti, la diminuita neurogenesi, l'aumento del metabolismo glutammatergico e l'aumento dello stress ossidativo. (98) Nel contesto del MC il cervello risulta essere cronicamente esposto ai potenziali effetti dannosi delle citochine prodotte nei tessuti periferici. Questi mediatori flogistici sono polipeptidi dal peso molecolare relativamente grande. Nonostante siano praticamente incapaci di attraversare la barriera emato-encefalica (blood brain barrier, BBB), i segnali delle citochine possono raggiungere il SNC attraverso varie vie, tra cui: il passaggio attraverso le regioni di alta permeabilità della BBB, meccanismi di trasporto attivo, l'attivazione delle cellule endoteliali, gliali o macrofagi perivascolari. (97, 98) All'interno del cervello, le citochine possono interagire con le più svariate attività metaboliche del neurone. Possono infatti modificare il metabolismo dei neurotrasmettitori, indurre fenomeni di plasticità neurale e possono inoltre indurre la produzione di altre citochine da parte delle cellule della microglia e quindi generare ulteriori processi infiammatori.

Inoltre, attraverso la via anatomica strutturale fornita dal BGA, le citochine inviano i loro segnali al nucleo vagale del tratto solitario (NST) nel tronco encefalico legando i recettori periferici delle fibre afferenti del nervo vago. Successivamente, questi segnali sono proiettati alle aree limbiche ovvero alla stessa aMCC.

Altri meccanismi plausibili coinvolti nello sviluppo di rimodellamento neurale includono lo stress ed i suoi mediatori. Il MC rappresenta una condizione cronica stressante per i pazienti affetti, capace potenzialmente di promuovere disordini psicologici come depressione e ansia. (1, 2, 76) E' stata dimostrata una marcata plasticità e cambiamenti strutturali nell'aMCC in animali sottoposti a stress cronico(108). Lesioni simili, caratterizzate da ridotta densità di GM nell'aMCC, sono state evidenziate in individui con bassa posizione socioeconomica. (108) Inoltre il cortisolo, ovvero il principale ormone dello stress nell'uomo è stato identificato come un agente neurotossico in grado di indurre atrofia delle strutture limbiche. (109)

Il disegno sperimentale del nostro studio non ci permette di inferire relazioni causali tra il MC e le anomalie morfologiche cerebrali che abbiamo trovato nei pazienti. Dobbiamo sottolineare la possibilità che la ridotta densità di GM che abbiamo trovato nei pazienti, potrebbe essere una condizione preesistente, un fattore di rischio per lo sviluppo di CD, piuttosto che una conseguenza della malattia infiammatoria cronica. Infatti, la CC rostro-mediale è considerata come la struttura limbica visceromotoria. (109) Questa struttura nervosa è robustamente interconnessa con i maggiori centri del controllo autonomico e neuroendocrino: il nucleo motore dorsale (DMN) del vago, l'ipotalamo, e le regioni di controllo omeostatico del tronco encefalico. Studi precedenti hanno associato un ridotto volume di GM nell'aMCC, a disregolate attività neuroendocrine e alterazioni del sistema immunitario. (103, 110)

Ulteriori studi, in particolare studi longitudinali saranno necessari per confermare l'esistenza di queste anomalie cerebrali strutturali nei pazienti con MC e per tentare di determinarne l'origine. Occorre comunque notare che la correlazione negativa che abbiamo trovato fra la durata di malattia e la densità di GM suggerisce che un'esposizione prolungata del sistema nervoso centrale di questa malattia infiammatoria possa compromettere seriamente il cervello dei pazienti. Il MC è una malattia multisistemica che potenzialmente può interessare il fegato, la pelle, l'occhio e le articolazioni. Nel loro insieme i nostri risultati suggeriscono che il cervello possa essere considerato un altro organo colpito. Se convalidati, questi risultati potrebbero condurre ad una riconsiderazione della natura sistemica del MC, inducendo ad inserire il cervello fra i potenziali organi colpiti. Inoltre, i risultati delle analisi di correlazione hanno interessato molte strutture limbiche, come noto, coinvolte nella elaborazione

delle e mozioni. Quest'ultimo risultato potrebbe gettare nuova luce sul rapporto tra MC e disturbi psicologici osservati nei pazienti affetti.

Ulteriori studi prospettici VBM longitudinale al momento della diagnosi di MC e negli anni successivi saranno necessari per tentare di chiarire la relazione fra la condizione infiammatoria cronica e i cambiamenti morfologici cerebrali.

Le anomalie morfologiche che abbiamo trovato nei pazienti con MC potrebbero dischiudere una nuova interpretazione del coinvolgimento del cervello dei pazienti affetti. Potrebbero inoltre gettare luce sulle disfunzioni limbiche in corso di malattia infiammatoria cronica e condurre a considerare sotto questo aspetto anche i frequenti disturbi psicologici dei pazienti affetti.

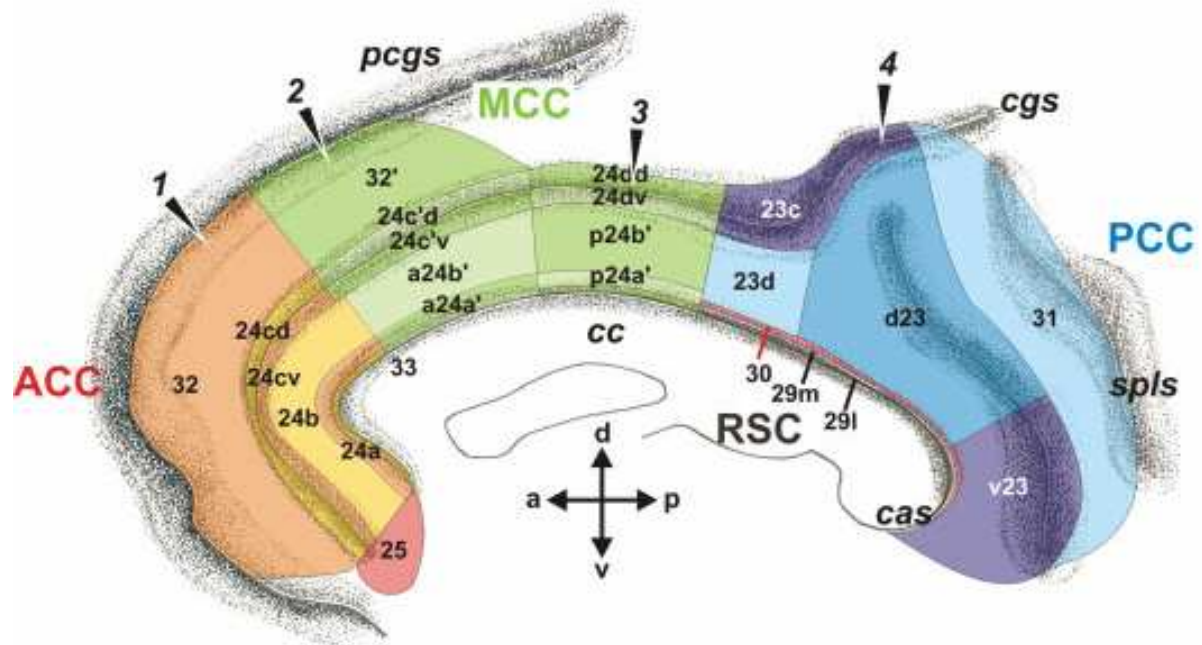


Figura 1. Suddivisione anatomo-funzionale della corteccia cingolata. ACC = corteccia cingolata anteriore, MCC = corteccia cingolata media, PCC = corteccia cingolata posteriore, RSC = corteccia retrosplenica. I numeri indicano le aree di Brodmann (BA). A = anteriore, p= posteriore, d = dorsale, v = ventrale.

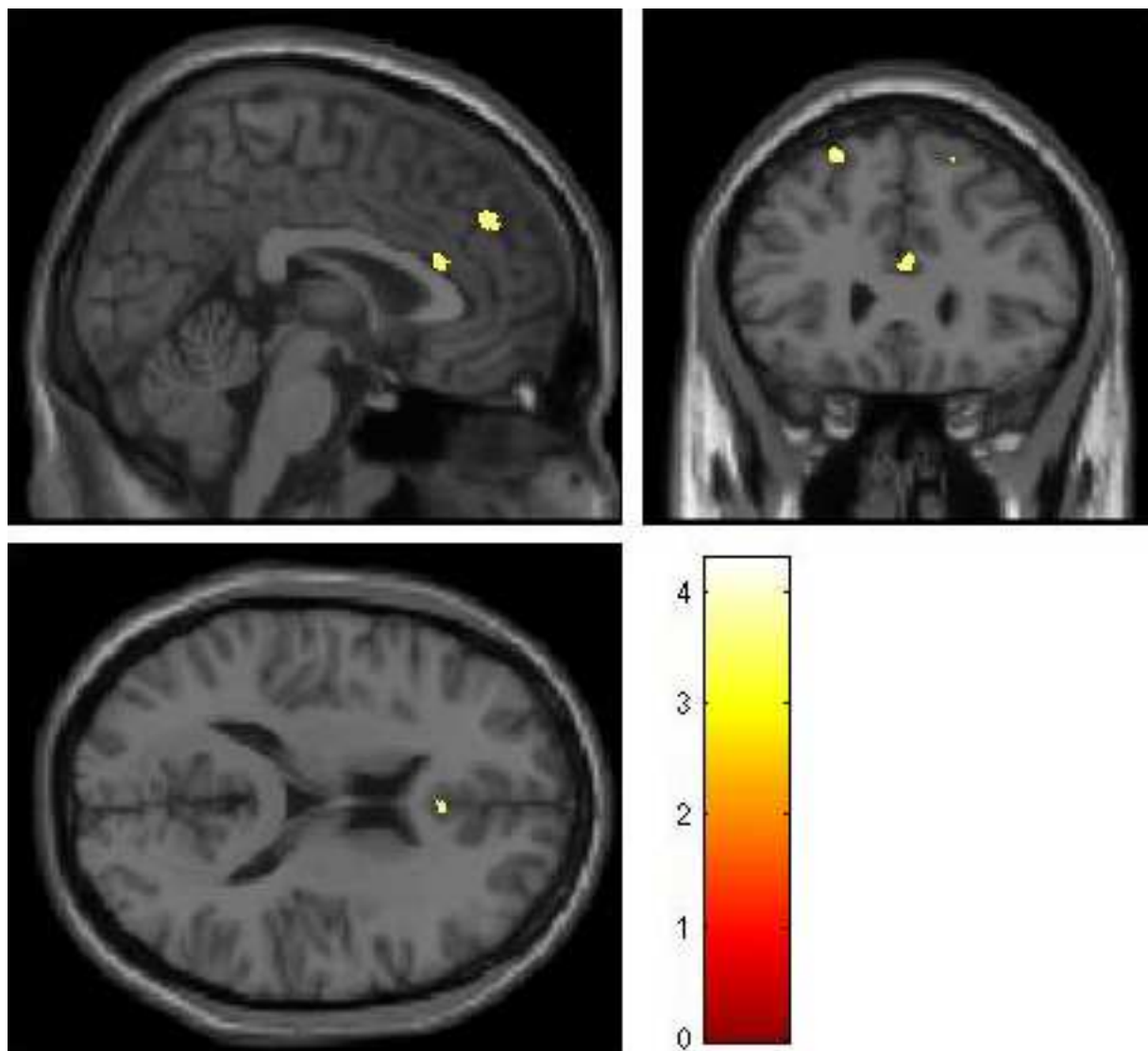


Figura 2. Differenze morfologiche ottenute con analisi VBM fra pazienti con morbo di Crohn e controlli sani. Una minore densità di materia grigia è evidenziata nella aMCC e nel lobo frontale.

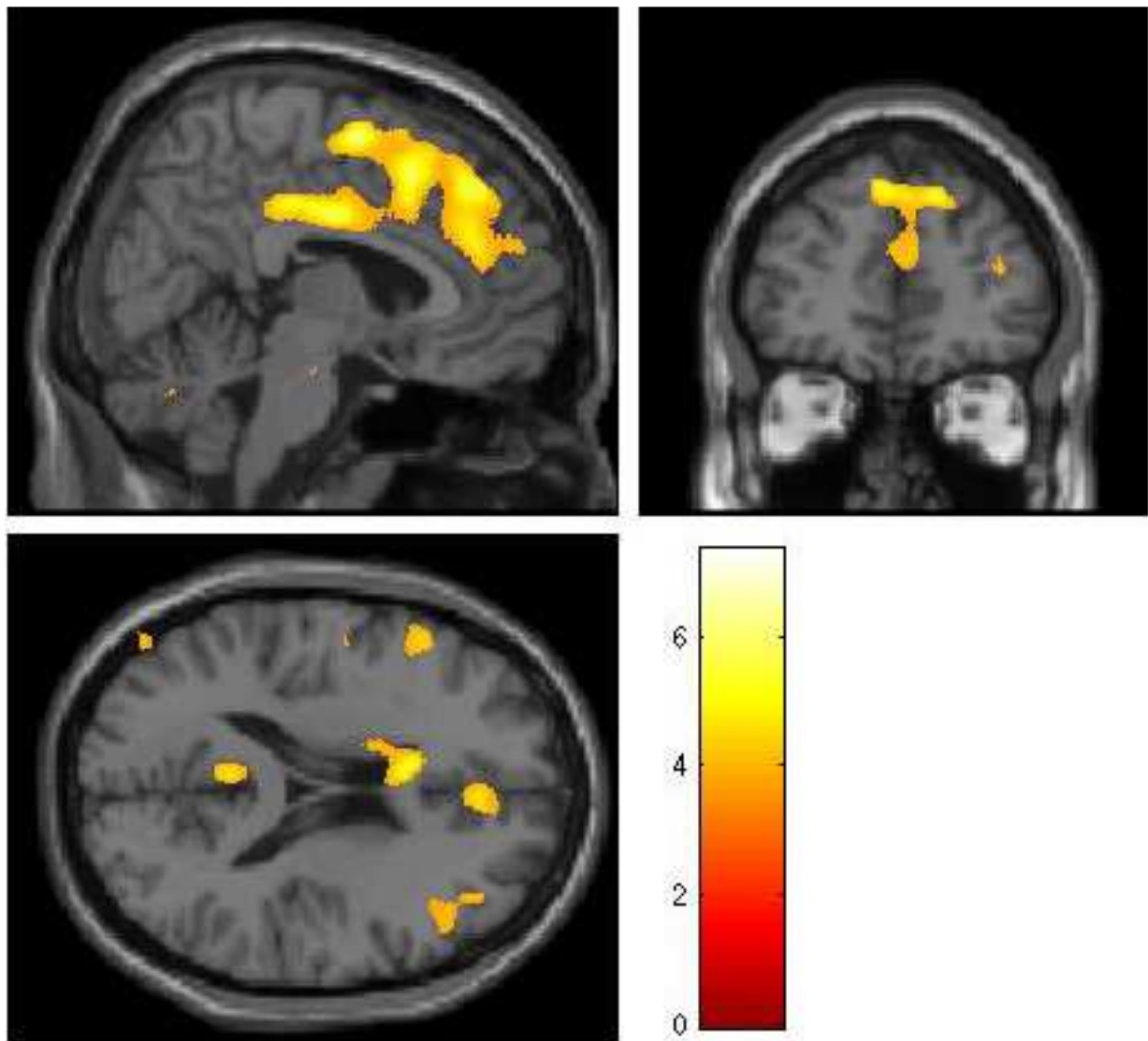


Figura 3. Correlazione fra durata di malattia espressa in anni e densità di materia grigia in pazienti con morbo di Crohn. Appare interessato un ampio gruppo di aree cerebrali.

Bibliografia

1. Agostini A, Rizzello F, Ravegnani G , et al. Parental Bonding and Inflammatory Bowel Disease. *Psychosomatics*. 2010; 51:14 –21.
2. Agostini A, Rizzello F, Ravegnani G , et al. Adult attachment and early parental experiences in patients with Crohn's Disease. *Psychosomatics*. 2010; 51:208 – 215.
3. Selye H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*.1:38-42 (1936)
4. Pacak K. and Palkovits. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*. 22:502-548 (2001).
5. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84 (1997).
6. Herman JP, Figueireido H, Muller NK et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180 (2003).
7. Herman JP, Ostander MM, Mueller NK, et al. Lymbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog neuropsychopharmacol Biol psychiatry* 29:1201-1213 (2005).
8. Pruessner JC, Dedovic K, Pruessner M et al. Stress regulation in the central nervous system: Evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations. *Psychoneuroendocrinology*. In press (2009).
9. Dedovic K, Duchesne A, Andrews J, et al. The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage* In press (2009).
10. Griffiths TD, Uppenkamp S, Johnsrude I, et al. Encoding of the temporal regularity of sound in the human brainstem. *Nat Neurosci* 4:633-637 (2001).

11. LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23:727-738 (2003).
12. Murray EA, Bussey TJ, Saksida IM. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. *Annu Rev Neurosci*. 30:99-122 (2007).
13. Carrasco GA, Van der Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*. 463, 235-272 (2003).
14. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 89:535-606 (2009).
15. Pruessner JC, Dedovic K, Khalili-Mahani N et al. Deactivation of the limbic system during acute psychosocial stress: evidence from positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging studies. *Biol Psychiatry* 63:234-240 (2008).
16. Liberzon I, Sripada CS. The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Prog Brain Res*. 167:151-169 (2008).
17. Herman JP, Schafer MK-H, Young EA et al. Evidence for hippocampal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurosci*. 9:3072-3082 (1989b).
18. Wolf OT, Convit A, de Leon MJ, et al. Basal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and corticotropin feedback in young and older man: relationship to magnetic resonance imaging -derived hippocampus and cingulate gyrus volume. *Neuroendocrinology* 75:241-249 (2002).
19. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662 (1997).
20. Roy CS, Sherrington CS. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol* 1890;11(1-2):85-158 17.

21. Belliveau JW, Kennedy DN, Jr., McKinstry RC, et al. Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* 1991;254(5032):716-9.
22. Ogawa S, Lee TM. Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: in vivo and in vitro measurements and image simulation. *Magn Reson Med* 1990;16(1):9-18.
23. Ogawa S, Lee TM, Kay AR, et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(24):9868-72.
24. Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med* 1990;14(1):68-78.
25. Turner R, Le Bihan D, Moonen CT, et al. Echo-planar time course MRI of cat brain oxygenation changes. *Magn Reson Med* 1991;22(1):159-66.
26. Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, et al. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(12):5675-9.
27. Pauling L, Coryell CD. The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1936;22(4):210-6.
28. Menon RS, Ogawa S, Tank DW, et al. Tesla gradient recalled echo characteristics of photic stimulation-induced signal changes in the human primary visual cortex. *Magn Reson Med* 1993;30(3):380-6.
29. Mandeville JB, Marota JJ, Ayata C, et al. MRI measurement of the temporal evolution of relative CMRO(2) during rat forepaw stimulation. *Magn Reson Med* 1999;42(5):944-51.
30. Birn RM, Saad ZS, Bandettini PA. Spatial heterogeneity of the nonlinear dynamics in the FMRI BOLD response. *Neuroimage* 2001;14(4):817-26.

31. Yang QX, Wang J, Smith MB, et al. Reduction of magnetic field inhomogeneity artifacts in echo planar imaging with SENSE and GESEPI at high field. *Magn Reson Med* 2004;52(6):1418-23.
32. Binder JR. Neuroanatomy of language processing studied with functional MRI. *Clin Neurosci* 1997;4(2):87-94.
33. Binder JR, Swanson SJ, Hammeke TA, et al. Determination of language dominance using functional MRI: a comparison with the Wada test. *Neurology* 1996;46(4):978-84.
34. Kim SG, Ashe J, Georgopoulos AP, Merkle H, et al. Functional imaging of human motor cortex at high magnetic field. *J Neurophysiol* 1993;69(1):297-302.
35. Schlosser MJ, Aoyagi N, Fulbright RK, et al. Functional MRI studies of auditory comprehension. *Hum Brain Mapp* 1998;6(1):1-13.
36. Stern CE, Corkin S, Gonzalez RG, et al. The hippocampal formation participates in novel picture encoding: evidence from functional magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(16):8660-5.
37. Gundel H, O'Connor MF, Littrell L, et al. Functional neuroanatomy of grief: an fMRI study. *Am J Psychiatry* 2003;160(11):1946-53.
38. Singer T, Seymour B, O'Doherty J, et al. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science* 2004;303(5661):1157-62.
39. Wise RG, Tracey I. The role of fMRI in drug discovery. *J Magn Reson Imaging* 2006;23(6):862-76.
40. Logothetis NK. The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;357(1424):1003-37.

41. Lassen NA, Kanno I. The metabolic and hemodynamic events secondary to functional activation--notes from a workshop held in Akita, Japan. *Magn Reson Med* 1997;38(4):521-3.
42. Arthurs OJ, Boniface S. How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? *Trends Neurosci* 2002;25(1):27-31.
43. Graff LA, Walker JR, Clara I, et al. Stress Coping, Distress, and Health Perceptions in Inflammatory Bowel Disease and Community Controls. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(12):2970-2982.
44. Graff LA, Walker JR, Bernstein CN. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: a review of comorbidity and management. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(7):1105-1118.
45. Bernklev T, Jahnsen J, Lygren I, et al. Health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease measured with the short form-36: psychometric assessments and a comparison with general population norms. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11(10):909-918.
46. Turnbull G, Vallis T. Quality of life in inflammatory bowel disease: the interaction of disease activity with psychosocial function. *Am J Gastroenterol.* 1995;90(9):1450-1454.
47. Bielefeldt K, Davis B, Binion DG. Pain and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(5):778-788.
48. Engel GL. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science.* 1977 8;196(4286):129-136.
49. Pizzi L, Weston CM, Goldfarb NI, et al. Impact of chronic conditions on quality of life in patient with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:47-52.
50. Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implication. *Gut.* 2005;54:1481-1491.

51. Wilhelsen J. Brain-gut axis as an example of the bio-psycho-social model. *Gut*. 2000;47:iv5-7.
52. Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut*. 1999;45:II6-16.
53. Van Oudenhove L, Demyttenaere K, Tack J, et al. Central nervous system involvement in functional gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(4):663-680.
54. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:155-184.
55. Gallagher M, Chiba A. The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6(2):221-227.
56. LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(4-5):727-738.
57. Sergerie K, Chochol C, Armony JL. The role of amygdala in emotional processing: a quantitative meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(4):811-830.
58. Costafreda SG, Brammer MJ, David AS, et al. Predictors of amygdala activation during the processing of emotional stimuli: a meta-analysis of 385 PET and fMRI studies. *Brain Res Rev*. 2008;58(1):57-70.
59. Bechara A, Damasio H, Damasio AR. Role of the amygdala in decision-making. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;985:356-369.
60. Farup PG, Hinterleitner TA, Lukas M, et al. Mesalazine 4 g daily given as prolonged-release granules twice daily and four times daily is at least as effective as prolonged-release tablets four times daily in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2001;7(3):237-242.

61. Stein MB, Simmons AN, Feinstein JS, et al. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. *Am J Psychiatry*. 2007;164(2):318-327.
62. Kellner R. A symptom questionnaire. *J Clin Psychiatry*. 1987;48(7):268-274.
63. Spielberger CD. Manual for the state-trait anxiety inventory (Form Y) ("Self-evaluation questionnaire") Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press; 1983.
64. Watson D, Clark LA, Tellegen A. Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *J Pers Soc Psychol*. 1988;54(6):1063-1070.
65. Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN. International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings. Gainesville, FL: NIMH Center for the Study of Emotion and Attention, University of Florida 1997.
66. Woolrich MW, Behrens TEJ, Beckmann CF, et al. Multilevel linear modelling for fMRI group analysis using Bayesian inference. *Neuroimage*. 2004;21(4):1732-1747.
67. Woolrich MW Robust group analysis using outlier inference. *NeuroImage*. 2008;41(2):286-201.
68. Douaud G, Smith S, Jenkinson M, et al. Anatomically-related grey and white matter abnormalities in adolescent-onset schizophrenia. *Brain*. 2007;130:2375-2386.
69. Oakes TR, Fox AS, Johnstone T, Chung MK, et al. Integrating VBM in General Linear Model with voxelwise anatomical covariates. *NeuroImage*. 2007;34(2):500-508.
70. Britton JC, Phan KL, Taylor SF, et al. Neural correlates of social and nonsocial emotions: An fMRI study. *Neuroimage*. 2006; 31(1):397-409.

71. Phelps EA. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14(2):198-202.
72. Hamann SB, Ely TD, Hoffman JM, et al. Ecstasy and agony: activation of the human amygdala in positive and negative emotion. *Psychol Sci.* 2002;13(2):135-141.
73. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents. The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 2009;65(9):732-741.
74. Marsland AL, Cohen S, Rabin BS, et al. Trait positive affect and antibody response to hepatitis B vaccination. *Brain Behav Immun.* 2006;20(3):261-269.
75. Matsunaga M, Isowa T, Kimura K, et al. Associations among positive mood, brain, and cardiovascular activities in an affectively positive situation. *Brain Res.* 2009 31;1263:93-103.
76. Lix LM, Graff LA, Walker JR, et al. Longitudinal study of quality of life and psychological functioning for active, fluctuating, and inactive disease patterns in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(11):1575-1584.
77. McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2010;1186:190–222.
78. LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol.* 2003;23(4-5):727-738.
79. Pruessner JC, Dedovic K, Pruessner M, et al. Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35(1):179-189.
80. Gianaros PJ. Individual differences in stressor-evoked blood pressure reactivity vary with activation, volume, and functional connectivity of the amygdala. *J Neurosci* 2008;28(4): 990-999.

81. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. (March). "Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study". *Gastroenterology*. 1976;70(3):439-44
82. Spielberger CD. *Manual for the state-trait anxiety inventory (Form Y) ("Self-evaluation questionnaire")* Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press; 1983.
83. Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Berto E, Luzi C et al. 1993. Development of the Perceived Stress Questionnaire: a new tool for psychosomatic research, *J Psychosom Res* 37 19-32.
84. Woolrich MW, Behrens TEJ, Beckmann CF, et al. Multilevel linear modelling for fMRI group analysis using Bayesian inference. *Neuroimage*. 2004;21(4):1732-1747.
85. Smith SM et al. Tract-based statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 2006;31(4):1487-505.
86. Woolrich MW, Behrens TE, Smith SM. Constrained linear basis sets for HRF modelling using Variational Bayes. *Neuroimage* 2004;21(4):1748-61
87. Greve F, Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(20):11050-5.
88. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:155-184.
89. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-859.
90. Phelps EA. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*. 2004;14(2):198-202.
91. Stein MB, Simmons AN, Feinstein JS, et al. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. *Am J Psychiatry*. 2007;164(2):318-327.

92. Elsenbruch S, Rosenberger C, Bingel U, et al. Patients with irritable bowel syndrome have altered emotional modulation of neural responses to visceral stimuli. *Gastroenterology* 2010;139(4):1310-1319.
93. Blankstein U, Chen J, Diamant NE, et al. Altered brain structure in irritable bowel syndrome: potential contributions of pre-existing and disease-driven factors. *Gastroenterology* 2010;138(5):1783-1789.
94. Seminowicz DA, Labus JS, Bueller JA, et al. Regional gray matter density changes in brains of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2010;139(1):48-57.
95. Agostini A, Filippini N, Cevolani D, et al. Brain functional changes in patients with Ulcerative Colitis: an fMRI study on emotional processing. *Inflamm Bowel Dis* 2010.
96. Ericsson A, Liu C, Hart RP, et al. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* 1995;30;361(4):681-698.
97. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(1):46-56.
98. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 2009; 1;65(9):732-741.
99. Wilhelmsen J. Brain-gut axis as an example of the bio-psycho-social model. *Gut* 2000;47:5-7.
100. Vogt BA. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(7):533-544.

101. Palomero-Gallagher N, Vogt BA, Schleicher A, et al. Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. *Hum Brain Mapp* 2009;30(8):2336-2355.
102. Harrison NA, Brydon L, Walker C, et al. Neural origins of human sickness in interoceptive responses to inflammation. *Biol Psychiatry* 2009;1;66(5):415-422.
103. O'Connor MF, Irwin MR, Wellisch DK. When grief heats up: pro-inflammatory cytokines predict regional brain activation. *Neuroimage* 2009;47(3):891-896.
104. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70(3):439-444.
105. Moisset X, Bouhassira D, Denis D, et al. Anatomical connections between brain areas activated during rectal distension in healthy volunteers: a visceral pain network. *Eur J Pain* 2010;14(2):142-148.
106. Comoda A, Suzuki H, Rabi K, et al. Reduced prefrontal cortical gray matter volume in young adults exposed to harsh corporal punishment. *Neuroimage* 2009;47:66-71.
107. Asami T, Hayano F, Nakamura M, et al. Anterior cingulate cortex volume reduction in patients with panic disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2008;62: 322-330.
108. McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2010;1186:190-222.
109. Pruessner JC, Dedovic K, Pruessner M, et al. Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35(1):179-189.

110. Slavich GM, Way BM, Eisenberger NI, et al. Neural sensitivity to social rejection is associated with inflammatory responses to social stress. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(33):14817-14822.