

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE VETERINARIE**

**Ciclo XXVII**

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H1

Settore Scientifico disciplinare: VET/01

**Sistema Nervoso Enterico di cane: studio quali-quantitativo e  
modificazioni neurochimiche in corso di infiammazione  
gastroenterica e diabete mellito.**

Presentata da: **Dott.ssa Martina Asti**

Coordinatore Dottorato

Relatore

**Chiar.mo Prof. Carlo Tamanini**

**Chiar.mo Prof. Roberto Chiocchetti**

Esame finale anno 2016

## 1. INDICE

<i>Introduzione</i>	<i>pag. 7</i>
<i>Sistema Nervoso</i>	<i>pag. 9</i>
Centrale	
Periferico	
Autonomo (Simpatico, Parasimpatico, Enterico)	
<i>Sistema Nervoso Enterico (SNE)</i>	<i>pag. 17</i>
Cenni storici	
Plessi Enterici	
Classificazione morfologica, funzionale e neurochimica delle cellule del SNE:	
Motoneuroni	
Interneuroni	
Neuroni sensitivi intramurali	
Glia enterica	
Cellule Interstiziali di Cajal (ICC)	
<i>Anatomia del tratto gastroenterico di cane</i>	<i>pag. 51</i>
Macroscopica	
Microscopica	
<i>Patologie dell'apparato digerente di cane</i>	<i>pag. 63</i>
Patologia infiammatoria intestinale ( <i>Inflammatory bowel disease-IBD</i> )	
Enteriti (virale, batterica, parassitaria, protozoaria)	

Neoplasie

Malattie autoimmunitarie

*Disturbo Endocrino nel cane: Diabete Mellito di tipo I*

*pag. 68*

*Neurotrasmettitori*

*pag. 72*

Marker neuronali Proteina HuC/HuD

Neurotrasmettitori a basso peso molecolare

Ossido Nitrico (NO)

Peptidi neuroattivi

Sostanza P (SP)

Peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP)

Proteina legante il Calcio Calbindina

## 2. PARTE SPERIMENTALE

Fase 1) & Fase2)

*Motivazioni della ricerca pag 86*

*Materiali e metodi* *pag. 87*

Preparazione dei tessuti

Preparazione dei campioni per l' istologia

Preparazione dei campioni per ottenere sezioni al criostato

Immunoistochimica

Caratterizzazione dell'anticorpo: *pag. 90*

Specificità degli anticorpi primari *pag. 93*

Western Blotting

Specificità anticorpi secondari

Analisi morfometriche ed elaborazione statistica dei dati

Statistica

*Risultati Fase 1)* *pag. 98*

*Discussione* *pag. 117*

*Conclusioni* *pag. 134*

*Risultati Fase 2)* *pag. 134*

*Discussione* *pag. 147*

*Conclusioni* *pag. 152*

### **3. BIBLIOGRAFIA**

**Legenda:**

**Calb:** Calbindina

**CGRP:** peptide correlato al gene della calcitonina

**Contrl:** Controllo

**-IR:** immunoreattivo/immunoreattività

**IBD:** Intestinal Bowel Disease

**MP:** Plesso Mioenterico

**SMP:** Plesso Sottomucoso

**nNOS:** ossido nitrico sintasi neuronale

**NO:** ossido nitrico

**NPY:** neuropeptide Y

**PATOL:** Patologico

**PLE:** Protein Loosing Enteropathy

**SNA:** sistema nervoso autonomo

**SNE:** sistema nervoso enterico

**SP:** sostanza P

**VIP:** Peptide intestinale vasoattivo

## INTRODUZIONE

La letteratura riporta come ampiamente siano state studiate le caratteristiche neurochimiche del Sistema Nervoso Enterico (SNE) del tratto gastro-enterico di animali da laboratorio (cavia, ratto e topo) mentre la specie canina si sia dimostrata poco indagata. Nasce da qui la volontà di valutare le caratteristiche morfo-funzionale dei neuroni del plesso mioenterico e sottomucoso di cane al fine di poter ottenere una mappatura degli stessi negli animali sani definiti “controllo” ed una valutazione in corso di patologie gastro-enteriche. Per lo studio anatomico sono state utilizzate tecniche istologiche “classiche” e tecniche di immunistochimica rispettivamente su sezioni di tessuto incluse in paraffina e su criosezioni. Da un punto di vista immunistochimico, diversi markers neuronali sono stati utilizzati per la nostra analisi, al fine di identificare variazioni neurochimiche delle sottopopolazioni neuronali che si instaurano in corso di processi patologici del tratto gastro-intestinale ed ottenere una comparazione con neuroni morfologicamente normali in cani di controllo.

E' stato inoltre indagato anche l'andamento di una particolare sottoclasse di neuroni (i neuroni nitrergici) del plesso mioenterico di stomaco (piloro) ed ileo di cani in corso di una specifica patologia endocrina (diabete mellito). E' noto infatti che l'iperglicemia provoca, nei modelli murini, danni enterici che determinano disfunzioni dell'apparato digerente. I dati sono stati comparati con quelli ottenuti da cani privi di questa affezione endocrina.

Grande attenzione è stata dedicata alla ricerca di marcatori enterici nervosi in grado di identificare le molecole espresse dai neuroni del SNE del cane.

Purtroppo i comuni anticorpi presenti in commercio, utilizzati nella maggior parte degli studi per la marcatura di cellule nervose enteriche e loro componenti cellulari

in animali da laboratorio, si sono rivelati non funzionanti in tessuti gastroenterici di cane.

## IL SISTEMA NERVOSO

Il sistema nervoso assicura i rapporti dell'organismo con il suo ambiente circostante e il coordinamento funzionale di tutti gli altri apparati, è in grado di percepire tutte le variazioni dell'ambiente esterno o interno e risponde ad esse con reazioni appropriate. Il sistema nervoso si suddivide in sistema nervoso della vita di relazione per presiedere ai rapporti dell'organismo con l'ambiente circostante e le risposte che ne conseguono sono le più immediate; e in sistema nervoso autonomo o vegetativo (che presiede all'innervazione della muscolatura liscia viscerale) garantisce il controllo e la regolazione del funzionamento intimo degli organi. Quest'ultimo è composto di tre divisioni: il simpatico, parasimpatico ed enterico.

Da un punto di vista topografico, i centri superiori, localizzati nella cavità cranica e nel canale vertebrale, sono costituiti da una voluminosa massa assiale e governano il sistema nervoso: essi rappresentano il sistema nervoso centrale o nevrasse da cui partono numerosi prolungamenti: i nervi cranici e spinali (Barone e Bortolami, 2006) che escono dall'involucro osseo e si direzionano in tutto l'organismo. Ai nervi sono annessi piccoli centri nervosi accessori: i gangli (Barone e Bortolami, 2006). L'insieme di queste formazioni, situate al di fuori del nevrasse, costituisce il sistema nervoso periferico il quale si distingue in un sistema nervoso somatico, volontario, e viscerale, involontario o autonomo (SNA) (Bernardini, 2002).

Il sistema nervoso centrale si compone di due parti ineguali: il midollo spinale, situato nel canale vertebrale e l'encefalo, accolto nella cavità cranica, più voluminoso e complesso e fa seguito al precedente di cui sembra esserne la derivazione.

L'encefalo comprende numerose divisioni che continuano in senso caudo-rostrale: il romboencefalo, il mesencefalo, il diencefalo e il telencefalo. Nella sua faccia ventrale, si osserva una parte assiale, il midollo allungato, che si continua nel

midollo spinale diventando più larga, più ispessita e più complessa che viene chiamata tronco cerebrale.

Il prolungamento del midollo spinale è il mielencefalo formato soltanto dal midollo allungato, in passato denominato “bulbo rachidiano”. Sulla sua faccia ventrale si evidenzia un rilievo ispessito trasversale chiamato ponte, mentre il cervelletto occupa la sua parte dorsale. Rostralmente al rombencefalo vi è l’archencefalo. La parte che si continua al rombencefalo è denominata mesencefalo, e la sua parte caudale è così ristretta in vicinanza del ponte da essere spesso denominata istmo dell’encefalo. Il prosencefalo costituisce la parte dell’encefalo di gran lunga più voluminosa composta di due parti intimamente associate: quella che si unisce al mesencefalo è il diencefalo, l’altra è il telencefalo, il quale non è altro che il cervello, suddiviso in due emisferi per mezzo di una fessura mediana e longitudinale profonda (Barone e Bortolami, 2006).

Il midollo spinale è il tratto del sistema nervoso centrale contenuto nel canale vertebrale; si possono riconoscere cinque parti: cervicale, toracica, lombare, sacrale e coccigea. Nei Mammiferi domestici si estende dal *foramen magnum* alla regione sacrale. La presenza delle meningi e delle radici dei nervi spinali mantiene il midollo spinale ben distanziato dalle pareti del canale vertebrale, permettendogli così di seguire i movimenti della colonna vertebrale. Il midollo spinale, isolato dai suoi involucri, è un cordone cilindrico di colore bianco lattescente, leggermente appiattito dorso-ventralmente; presenta due intumescenze: cervicale e lombare; queste sono costituite da un grande numero di motoneuroni i cui neuriti vanno a costituire i nervi destinati alla muscolatura degli arti toracici e pelvici (Bortolami *et al.*, 2009).

## IL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Il sistema nervoso periferico è costituito dai nervi cranici e spinali e dai gangli a loro annessi. Esso raccoglie informazioni che tramite neuroni afferenti (o sensitivi) arrivano al sistema nervoso centrale e da questo, mediante neuroni efferenti (neuroni motori), partono le risposte agli organi effettori (via finale comune). I nervi che contengono le componenti sensitiva e motoria vengono detti nervi misti; rientrano in questo gruppo tutti i nervi spinali e la maggior parte dei nervi cranici; quando è presente uno solo dei due tipi di fibre il nervo viene definito, rispettivamente, sensitivo o motore (Dyce *et al*, 2006).

I nervi cranici, in numero di dodici paia, si susseguono in senso rostro-caudale; prendono attacco sul tronco cerebrale ad esclusione del primo paio. Essi dopo un tragitto più o meno lungo dal punto di attacco escono dalla cavità cranica, attraverso fori propri e proseguono con un percorso extracranico per distribuirsi alla periferia (Bortolami *et al.*, 2009). Tra i nervi cranici quello che risulta essere maggiormente coinvolto nell'ambito dell'attività del SNE è il nervo vago; perciò approfondirò il suo decorso e la topografia.

Il n. vago, decimo nervo cranico, è il più lungo dei nervi cranici e possiede il territorio di distribuzione più ampio; si estende, infatti, al di là delle regioni della testa e del collo per portarsi nella cavità toracica e addominale. Le sue radicole, situate tra quelle del nervo glossofaringeo (IX) e quelle del nervo accessorio (XI), sono attaccate alla superficie latero-ventrale del midollo allungato e si riuniscono a formare un tronco unico che, perforata la dura madre, tramite il foro giugulare esce dalla cavità cranica attraverso il foro giugulare. A questo livello presenta il ganglio prossimale con sede dei pirenofori per le afferenze somatiche generali (ASG) e afferenze viscerali generali (AVG) e dopo un breve tratto il ganglio distale con sede delle

afferenze viscerali speciali (AVS) e afferenze viscerali generali (AVG) (Bortolami *et al.*, 2009).

Il nervo vago costeggia insieme al ramo esterno del nervo accessorio, ventralmente al foro giugulare, il margine caudale del ganglio cervicale craniale e, proseguendo in direzione caudale, nel cane, dorsalmente alla carotide interna, passa medialmente all'arteria occipitale. In corrispondenza di quest'ultima il nervo vago si unisce al tronco simpatico cervicale costituendo il tronco vago-simpatico. Questi due nervi, avvolti da una stessa guaina, fiancheggiano dorsalmente l'arteria carotide comune fino alla base del collo, a questo livello il nervo vago lascia il tronco simpatico ed entra in cavità toracica; da qui in poi i nervi vaghi destro e sinistro contraggono rapporti diversi (Bortolami *et al.*, 2009).

Il percorso del nervo vago di destra si sviluppa a partire dall'arteria succlavia omolaterale, passando lateralmente al tronco costo-cervicale e incrociando con direzione ventrodorsale il tronco brachiocefalico, infine raggiunge la faccia laterale della trachea, seguendola fino alla divisione bronchiale. In quest'ultimo tratto è incrociato dalla vena azigos di destra. Due sono le diramazioni del nervo in corrispondenza dell'origine del bronco destro: un ramo dorsale e uno ventrale.

Il nervo vago sinistro passa ventralmente all'arteria succlavia e alla pleura mediastinica corrispondenti, incrocia lateralmente il tronco brachiocefalico e successivamente, prendendo rapporto con la base del sacco pericardico, l'aorta ascendente; raggiunge poi la biforcazione tracheale dividendosi anch'esso in un ramo dorsale e ventrale. I rami dorsali e ventrali del nervo vago destro si uniscono ai loro omologhi del vago sinistro formando due tronchi nervosi che decorrono dorsalmente e ventralmente all'esofago: sono i tronchi vagali dorsale e ventrale. Essi accompagnano quest'ultimo fino in cavità addominale, dove il vago termina il suo decorso distribuendosi ai visceri e partecipando alla formazione del plesso celiaco (Bortolami *et al.*, 2009).

Da un punto di vista topografico il nervo vago si divide in una porzione cranica, cervicale, toracica e addominale. Il decorso addominale è quello di maggior rilevanza per il SNE. In questa regione i tronchi vagali, dorsale e ventrale, seguono l'esofago e con quest'ultimo attraversano lo iato esofageo del diaframma giungendo in cavità addominale; a questo livello sono presenti soltanto fibre AVG ed EVG. Nei monogastrici il tronco vagale dorsale si porta a sinistra del cardias e sulla faccia viscerale dello stomaco concorre alla formazione del plesso gastrico caudale dal quale derivano i rami gastrici viscerali per la corrispondente faccia dello stomaco, i rami celiaci e i rami renali. I rami celiaci si portano al plesso celiaco e, per mezzo di quest'ultimo, raggiungono i plessi pancreatico, epatico, lienale e mesenterico craniale. I rami renali si dirigono ai reni e alle ghiandole surrenali, formando i plessi renali e surrenali, e si ramificano anche nei plessi aortico addominale e mesenterico caudale, con conseguente suddivisione delle fibre vagali che si portano anche alle gonadi e al colon discendente. I rami gastrici parietali per la faccia omonima dello stomaco, il ramo pilorico, i rami duodenali e i rami epatici derivano, invece, dal tronco vagale ventrale che raggiunge la piccola curvatura gastrica e forma il plesso gastrico craniale (Bortolami et al., 2009).

## IL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

Il sistema nervoso autonomo (SNA) detto anche vegetativo, coordina e regola, essenzialmente per via riflessa, le molteplici funzioni organiche senza entrare nella soglia della coscienza. Per questa ragione, un tempo veniva denominato sistema nervoso vegetativo o viscerale in contrapposizione al sistema nervoso della vita di relazione che permette all'organismo di rapportarsi all'ambiente circostante. La sua autonomia non è assoluta perché a livello encefalico esistono dei centri di integrazione delle funzioni viscerali (Bortolami *et al.*, 2009).

Il SNA fornisce ad alcuni nervi cranici e a tutti i nervi spinali la componente EVG e comprende tre componenti: il sistema nervoso simpatico (SNS) e il sistema nervoso parasimpatico (SNP) formati da neuroni pregangliari e gangliari. I neuroni pregangliari sono localizzati nel tronco encefalico (SNP) o nel midollo spinale (SNS e SNP), mentre quelli gangliari sono situati nei gangli autonomi o vegetativi. Una terza componente è costituita dai neuroni che formano gangli e plessi nella parete dell'apparato digerente a partire dall'esofago fino al retto, nel pancreas e nelle vie biliari extraepatiche, prendendo perciò il nome di Sistema Nervoso Enterico (SNE).

Le caratteristiche generali fondamentali sono:

- l'azione è esercitata sulla muscolatura liscia viscerale e sulla muscolatura liscia che non riceve innervazione dal sistema nervoso somatico (es. i vasi sanguigni, i muscoli erettori dei peli, i muscoli costrittori e dilatatori dell'iride, sul tessuto ghiandolare,...) e si manifesta con una risposta motoria o secretiva;
- l'innervazione EVG avviene sempre per mezzo di due neuroni. Il pirenoforo del primo neurone è situato nel midollo spinale toracolombare per il simpatico, nel tratto rombomesencefalico e nel midollo spinale sacrale per il parasimpatico. E' sempre definito neurone pregangliare e il suo neurite mielinico, costituisce la fibra pregangliare che entra in sinapsi con il secondo neurone situato in un ganglio del SNA e perciò definito neurone gangliare. Dal pirenoforo del neurone gangliare parte il neurite amielinico o fibra postgangliare destinata a raggiungere il tessuto od organo effetore. L'unica eccezione a questo comportamento è rappresentata dalla midollare della ghiandola surrenale che è innervata direttamente da fibre pregangliari simpatiche (Bortolami *et al.*, 2009).

Il mediatore chimico della sinapsi tra fibra pregangliare e neurone gangliare è sempre l'acetilcolina; lo stesso mediatore è utilizzato nella terminazione della fibra

postgangliare del parasimpatico, mentre nel simpatico viene liberata noradrenalina. Si distinguono quindi, in base ai mediatori, fibre colinergiche e fibre adrenergiche.

Il numero delle fibre postgangliari è sempre maggiore di quelle pregangliari e il rapporto fibre pre/postgangliari è molto diverso nel simpatico rispetto al parasimpatico. Il numero di cellule gangliari in un dato ganglio varia a seconda della specie ed aumenta in relazione alla taglia dell'animale; il rapporto pre/postgangliare è inoltre legato all'importanza del SNA, per cui nei Primati e ancora di più nell'Uomo è più elevato che in altri mammiferi domestici (Bortolami *et al.*, 2009).

I visceri ricevono, nella maggior parte dei casi, una duplice innervazione EVG, simpatica e parasimpatica, che agisce fisiologicamente in modo antagonista. Questa doppia innervazione viene meno nella midollare del surrene, nel muscolo erettore del pelo, nelle ghiandole sebacee, nei vasi sanguigni, nel muscolo dilatatore della pupilla che ricevono soltanto la componente simpatica e nei muscoli ciliare e sfintere della pupilla che possiedono solo la componente parasimpatica.

## SIMPATICO

Il simpatico è la parte più estesa del SNA ed è costituito dai gangli vertebrali (o paravertebrali), localizzati ventrolateralmente alla colonna vertebrale. I gangli sono connessi tra loro da un cordone bianco-grigiastro detto ramo intergangliare e si estendono dalla I vertebra toracica alla IV-VII vertebra coccigea. Alcuni gangli simpatici detti prevertebrali si trovano in cavità addominale, in stretto rapporto con la faccia ventrale dell'arteria aorta o addirittura si localizzano nella parete di alcuni visceri e sono detti gangli intramurali (Bortolami *et al.*, 2009).

I pirenofori dei neuroni pregangliari costituiscono il nucleo intermedio laterale della lamina VII della sostanza grigia del midollo spinale toracolombare che forma un rilievo detto corno laterale che si estende da T1 (o T2) a L4 nei Carnivori. I neuriti dei neuroni pregangliari, quasi sempre mielinici, escono dal canale vertebrale assieme

alle radici ventrali del nervo spinale, si separano poi dal nervo e, formando il ramo comunicante bianco (per la presenza della mielina), raggiungono il ganglio vertebrale corrispondente, dove le fibre pregangliari contraggono sinapsi con i neuroni gangliari. Da questi ultimi derivano le fibre postgangliari amieliniche che si portano all'organo effettore. Le fibre simpatiche destinate ai visceri superficiali raggiungono nuovamente il nervo spinale costituendo il ramo comunicante grigio (fibre amieliniche) Aguggini *et al.*, 2004; Bortolami *et al.*, 2009). La fibra pregangliare può contrarre sinapsi in gangli vertebrali situati più cranialmente o più caudalmente rispetto alla sua emergenza; i rami comunicanti bianchi compiono, allora, un lungo decorso nel ramo intergangliare e possono raggiungere in tal modo anche i gangli cervicali, gli ultimi lombari, i sacrali e i coccigei. E' importante ricordare inoltre che, un certo numero di fibre pregangliari non si arresta in un ganglio vertebrale, ma lo attraversa per raggiungere i gangli prevertebrali o intramurali dove contrae sinapsi; queste lunghe fibre mieliniche pregangliari costituiscono i nervi splancnici dei vari settori del simpatico. Seguendo un ordine topografico il simpatico viene diviso in cefalico, cervicale, toracico, addominale, pelvico e coccigeo (Bortolami *et al.*, 2009).

#### PARASIMPATICO

Due sono le parti che costituiscono la componente parasimpatica del SNA: una rombomesencefalica e una sacrale. Nel caso del parasimpatico rombomesencefalico i corpi dei neuroni pregangliari sono situati in nuclei del tronco cerebrale specifici e i loro neuriti forniscono la componente EGV ad alcuni nervi cranici e precisamente all'oculomotore (III), all'intermedio-facciale (VII), al glossofaringeo (IX) e al vago (X) (Aguggini *et al.*, 2004; Barone e Bortolami, 2006). I gangli parasimpatici, localizzati nella regione cranica e macroscopicamente evidenziabili, sono: il ganglio ciliare (oculomotore), il ganglio pterigopalatino (facciale), il ganglio otico (glossofaringeo), il ganglio mandibolare (intermedio) e il ganglio sottolinguale (intermedio). Le fibre

nervose poi si portano agli organi effettori impegnandosi anche in rami provenienti dai nervi cranici che non hanno una componente parasimpatica (Barone e Bortolami, 2006).

Per quanto riguarda il tratto del parasimpatico sacrale, i corpi dei neuroni pregangliari sono situati nella sostanza grigia di tutti i segmenti sacrali, alla base del corno ventrale; i loro neuriti si impegnano nei nervi sacrali e vanno a costituire i nervi pelvici che si risolvono nel plesso pelvico; alcune di queste fibre entrano in sinapsi con neuroni di piccoli gangli compresi nel plesso, mentre altre proseguono e terminano nei gangli intramurali dell'organo cui sono destinate. Al plesso pelvico giunge anche una componente simpatica convogliata dal nervo ipogastrico e dai nervi splanchnici sacrali. (Bortolami *et al.*, 2009).

## **SISTEMA NERVOSO ENTERICO**

La terza componente del sistema nervoso autonomo prende il nome di sistema nervoso enterico (SNE) ed è rappresentata da neuroni che si raggruppano a formare gangli e plessi nella parete dell'intestino. È su questa componente del SNA che si articolerà il mio elaborato sperimentale e per questo motivo tratterò la sua classificazione cellulare in maniera dettagliata.

### **CENNI STORICI**

L'intestino per molto tempo è stato considerato una struttura periferica dell'organismo, impiegata a svolgere funzioni secondarie rispetto alle attività svolte da altri organi come cuore e cervello. Wang nel 1992 affermò che la sola medicina cinese aveva riconosciuto il ruolo dell'intestino come coordinatore primario delle

più importanti attività funzionali dell'intero organismo, sostenendo che all'interno dell'addome vi fosse un "secondo cervello".

Alle stesse conclusioni sono arrivati, molti anni dopo, diversi ricercatori occidentali che hanno studiato il sistema nervoso autonomo (o vegetativo), contribuendo perciò, in maniera decisiva, alle attuali conoscenze sul sistema nervoso enterico. Fra i primi studiosi si citano il neuroanatomico Auerbach (1828-1897), che descrisse il plesso mienterico; analogamente, un altro anatomico tedesco, Meissner (1829-1905) descrisse il plesso sottomucoso nel 1858.

A Dogiel (1852-1922), istologo ed embriologo, si deve invece l'identificazione della morfologia individuale dei neuroni enterici e che ad uno specifico "fenotipo" cellulare corrisponda una verosimile caratteristica funzionale. Grazie agli studi di due fisiologi inglesi, Bayliss (1860-1924) e Starling (1866-1927) si ottenne la dimostrazione dell'esistenza della "legge dell'intestino" (poi nota come peristalsi), ossia l'identificazione di riflessi polarizzati che operano nell'intestino indipendentemente da influenze estrinseche.

La classificazione come terza componente del SNE fu adottata da Langley (1852-1925) il quale azzardò che molti neuroni destinati all'innervazione intestinale non fossero connessi al SNC e valutando in vitro l'attività riflessa intestinale ipotizzò che l'intestino dovesse possedere dei neuroni afferenti primari intrinseci, interneuroni e motoneuroni che gli consentissero di funzionare in maniera autonoma da altre divisioni del SNA e di quello centrale (Conti, 2010).

A Kunz (1879-1957), si deve il riconoscimento e la classificazione dei complessi circuiti neuronali del SNE, e a W. Cannon (1871-1945), si devono le osservazioni e la descrizione dei movimenti gastrointestinali in animali non anestetizzati, fondamentale base di lavoro per studi successivi. Con l'utilizzo di tecniche avanzate come l'immunoistochimica, la biologia molecolare, le tecniche di immagine e la microscopia elettronica e confocale, le conoscenze si sono ampliate in maniera

determinante e numerosi studiosi contemporanei hanno contribuito e continuano a contribuire in modo significativo alla chiarificazione dei circuiti neuronali del SNE e dei meccanismi che controllano le funzioni digestive. Gershon (1980) e Wood (1981) hanno definito il SNE come “little brain”, infatti quest’ultimo, pur mantenendo una correlazione con il SNC, possiede un circuito integrativo indipendente ed una attività di controllo autonoma dei sistemi efferenti gastrointestinali.

#### ORGANIZZAZIONE MORFO-FUNZIONALE DEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO

Il SNE è la terza componente del SNA ed è rappresentato da neuroni localizzati nella parete del tratto gastrointestinale dall’esofago alla regione anale, nel tratto biliare extraepatico e nel parenchima pancreatico (De Giorgio e Camilleri, 2004; Furness, 2006).

Il SNE è costituito da una rete neuronale e da cellule di supporto (cellule gliali) che sono organizzate in gruppi denominati gangli enterici, i quali sono interconnessi tra loro tramite fibre nervose intergangliari. Ogni singolo ganglio risulta di piccole dimensioni ma le cellule nervose al suo interno sono milioni (Furness, 2006), paragonabili a quelle del midollo spinale (circa 400 milioni di neuroni) per questo motivo l’intestino viene chiamato anche “little brain” (De Giorgio e Camilleri, 2004; Conti, 2010) o “secondo cervello” (Gershon, 2006). Il SNE comprende neuroni afferenti primari, sensibili a stimoli meccanici e chimici, interneuroni e motoneuroni che agiscono su differenti *targets* come ad esempio la muscolatura liscia, le cellule *pacemaker* (Cellule Interstiziali di Cajal), i vasi sanguigni, le ghiandole dello strato mucoso, l’epitelio e il sistema di cellule implicate nelle risposte immunitarie e nelle funzioni endocrine e paracrine (Furness & Costa, 1987) presiedendo a pressoché tutte le funzioni digestive, di assorbimento e di attività motoria del canale (Furness, 2006). Il SNE, sebbene autonomo, è connesso al SNC e al SNP; questi ultimi, a loro

volta, contribuiscono alla modulazione delle funzioni digestive. L'apparato digerente è innervato attraverso le sue connessioni con il SNC e l'attività del SNE lungo la parete del tratto gastrointestinale e mediante le vie nervose che passano attraverso i gangli simpatici al fine di controllare le funzioni digestive. Questo risulta un sistema bidirezionale di controllo del flusso di informazioni tra SNE e SNC e attraverso il SNE e i gangli simpatici paravertebrali. Le connessioni tra il SNE e SNC avvengono attraverso il nervo vago e il plesso pelvico e le vie simpatiche. I reciproci ruoli del SNE e del SNC differiscono in maniera considerevole lungo il tratto digerente. I movimenti della muscolatura striata esofagea sono controllati dalle vie nervose che sono generate nel SNC. Allo stesso tempo il SNC ha il principale ruolo di controllo nello stato di ripienezza dello stomaco e controlla anche l'attività contrattile e la secrezione acida attraverso i riflessi vago-vagali. In maniera opposta il SNE nel piccolo intestino e colon contiene circuiti riflessi, inclusi i neuroni sensitivi, interneuroni e importanti classi di motoneuroni.

Il tratto gastrointestinale si differenzia rispetto ad altri organi periferici in quanto presenta un sistema nervoso intrinseco (SNE) che può controllare le funzioni del piccolo e grande intestino ed anche se completamente separato topograficamente dal SNC in realtà, l'SNE, non è autonomo. Il controllo neuronale delle funzioni gastrointestinali è un sistema integrato tra i riflessi enterici locali, i riflessi che vengono trasmessi attraverso i gangli simpatici ed i riflessi che passano attraverso l'intestino previo controllo del SNC (Furness *et al*, 2014).

Le connessioni tra l'intestino e il SNC sono convenzionalmente classificate in vagale, spinale toraco-lombare e spinale lombosacrale (pelvica). Ognuna di esse include afferenze sensitive ed efferenze motorie. Le vie efferenti sono costituite da neuroni pre-enterici che terminano nei gangli enterici e controllano o modificano le attività dei neuroni enterici. Le vie nervose che partono dal SNC contengono a loro volta neuroni che innervano direttamente un numero ristretto di effettori

gastrointestinali, come la muscolatura striata esofagea (innervazione vagale), gli sfinteri (innervazione simpatica) e i vasi sanguigni intrinseci (innervazione simpatica), Figura 1

### *Innervazione vagale*

Nell'uomo il tratto di vago addominale contiene circa 40.000-50.000 assoni (Sengupta *et al*, 1994). Queste fibre forniscono un'innervazione sensitiva ed un controllo efferente (motorio) sulle vie nervose di tutto il tratto intestinale alto e degli organi digestivi.

Le vie afferenti vagali includono meccanoceettori mucosali, chemocettori e recettori di distensione nell'esofago, stomaco e piccolo intestino e le terminazioni sensitive su fegato e pancreas. Esiste una minor innervazione afferente vagale anche sul tratto intestinale aborale sul colon prossimale (Raybould, 2010). Le informazioni sensitive riguardanti i contenuti del lume sono rilevati dalle Cellule Enteroendocrine (EEC) le quali rilasciano ormoni che agiscono sulle terminazioni nervose vagali afferenti. Questa indiretta attivazione dei chemocettori è importante per il riconoscimento dei nutrienti e delle sostanze tossiche presenti nel contenuto intestinale. Le funzioni regolate dall'innervazione vagale sensitiva sono l'appetito e la sazietà, la propulsione esofagea, il volume gastrico, l'attività contrattile e la secrezione acida, la contrazione della cistifellea e la secrezione degli enzimi pancreatici (Furness *et al*, 2014).

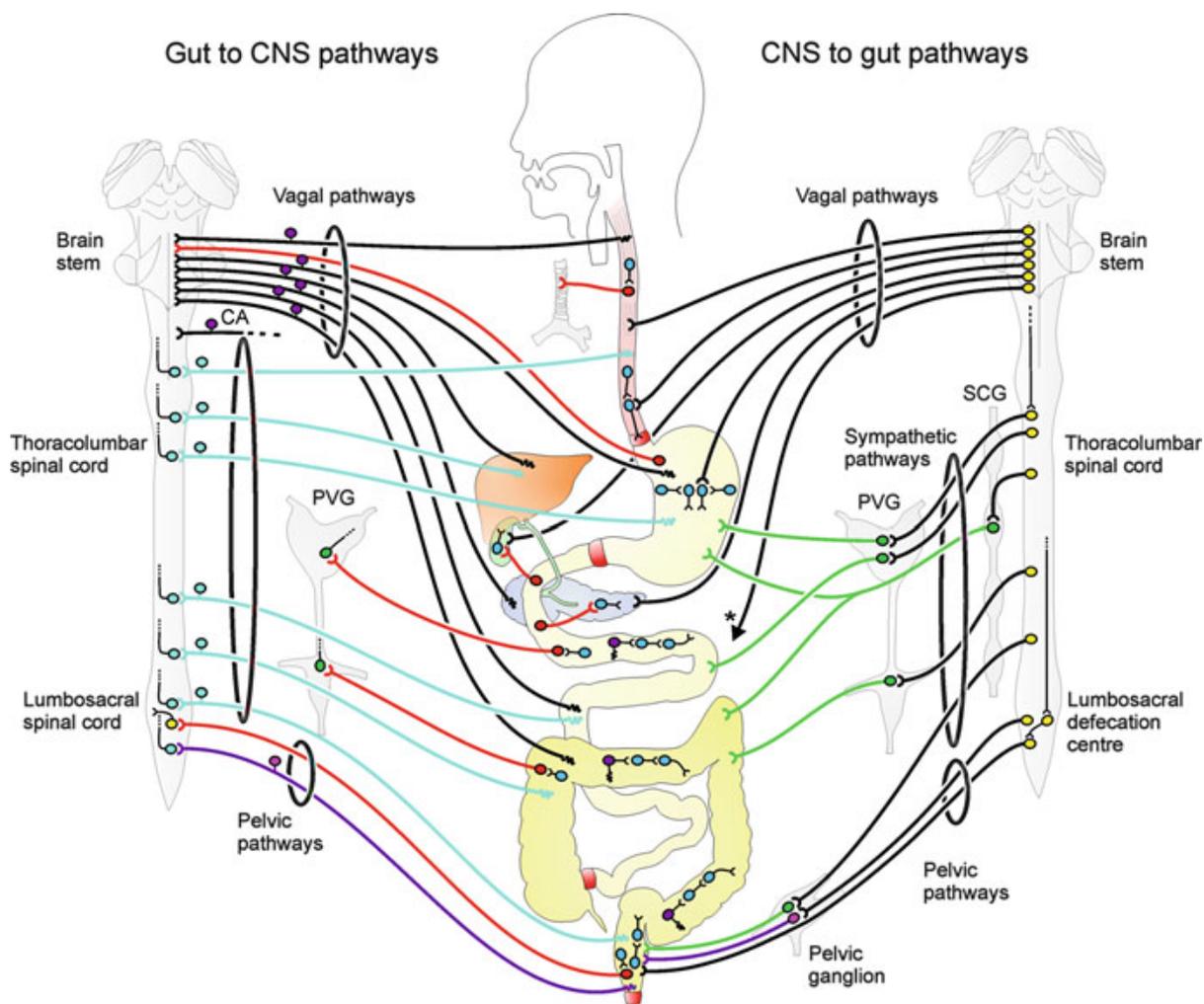


Figura 1: Afferenze ed Efferenze del SNE

Esistono tre distinti tipi di innervazione vagale del tratto gastrointestinale: le terminazioni intragangliari laminari, il gruppo intramuscolare e le terminazioni nervose mucosali varicose (Berthound *et al*, 2004)

Le prime sono un complesso di terminazioni nervose che originariamente sono state descritte nell'esofago e mostravano di avere una origine vagale. Sono presenti nel retto ed alcune di queste sul tratto di colon distale, originarie dai nervi pelvici. Hanno un ruolo nel valutare la riduzione della soglia dei recettori di tensione e nel caso dello stomaco di segnalare il riempimento.

Il gruppo intramuscolare è formato da assoni afferenti singoli che attraversano lo strato di muscolatura circolare al fine di formare un gruppo di fibre

varicose che decorrono parallele ai fasci muscolari (Berthoud *et al*, 1992). Attraverso l'istaurarsi di complessi simil-sinaptici con le cellule interstiziali di Cajal (ICC), è stato supposto che questo gruppo di assoni intramuscolari, assieme alle ICC e alla muscolatura liscia, lavorino in maniera cooperata e sinergica al fine di trasferire specifiche informazioni sulla distensione della muscolatura (Powley *et al*, 2011).

Le afferenze vagali mucosali sono classificate in: terminazioni vagali afferenti sulla mucosa gastrica, afferenze sui villi del piccolo intestino, afferenze delle cripte intestinali. Gli assoni delle afferenze mucosali gastriche formano un'ampia diramazione sulla mucosa al fine di fornire una innervazione che è posta in stretta vicinanza all'epitelio, sono solitamente strutture piatte (lamellari) vicine alle terminazioni nervose (Powley *et al*, 2011). I recettori mucosali gastrici sono stimolati da minime variazioni della mucosa, ma non dalla contrazione o dal rilassamento muscolare, sono altrettanto sensibili a stimoli chimici come l'acidità luminale (Clarke *et al*, 1998; Page *et al*, 2002). Le afferenze mucosali gastriche sono anche coinvolte nel controllo della sazietà: attraverso le variazioni della sensibilità dei meccanocettori vi è un aumento dell'ormone della sazietà, leptina, e la riduzione dell'ormone della fame, grelina; entrambi vengono rilasciati dalle cellule enteroendocrine gastriche che sono in prossimità delle terminazioni nervose mucosali gastriche afferenti (Page *et al*, 2007, Kentish *et al*, 2013) Figura 2.

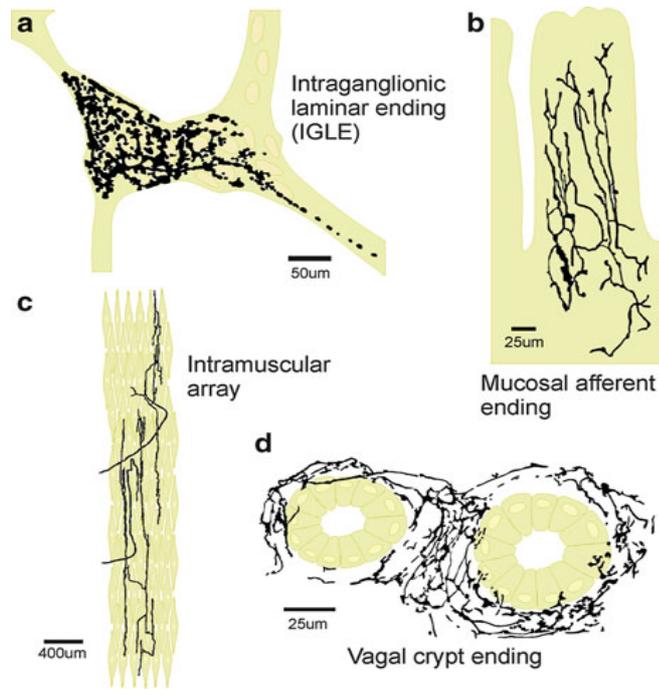


Figura 2: a) terminazioni intragangliari laminari, b) terminazioni varicose mucosali sui villi; c) gruppo intramuscolare; d) terminazioni sensitive attorno alle cripte nel piccolo intestino

Le afferenze dei villi e cripte innervano la mucosa del piccolo intestino. Le afferenze dei villi hanno assoni che proiettano alla porzione apicale del villo dove creano ampie diramazioni. Le branche hanno superfici irregolari che tendono a stare adese alla superficie interna dell'epitelio del villo. Solitamente ogni singola afferenza villosa innerva un gruppo di due o più villi vicini. Queste afferenze sono posizionate in maniera tale da poter rilevare le sostanze rilasciate dall'epitelio, inclusi gli ormoni locali come la colecistochinina (CCK) e la 5 idrossitriptamina (5HT; serotonina) che è noto essere in grado di attivare le terminazioni nervose vagali.

Le afferenze delle cripte formano degli anelli sub-epiteliali con formazione di processi varicosi al di sotto delle giunzioni cripto-villari.

Le vie efferenti vagali derivano dal nucleo motore dorsale del vago e dal nucleo ambiguo. Molti di questi neuroni sono pre-enterici, e formano sinapsi con i neuroni dei gangli enterici, ma alcuni di loro decorrono direttamente sulle cellule muscolari striate dell'esofago (dal nucleo ambiguo)

Il principale ruolo dell'innervazione vagale è quella di controllare la propulsione esofagea al fine di rilassare lo sfintere esofageo distale per permettere di far passare il cibo, nell'aumentare la capacità gastrica, nel facilitare la contrazione dell'antro, nel rilassare il piloro, nell'aumentare la secrezione acida gastrica, nel controllare la contrazione della cistifellea e nel promuovere la secrezione esocrina pancreatico. Attraverso misurazioni microelettriche intracellulari su neuroni enterici gastrici si ha indicazione che, la maggior parte (od almeno i 2/3 ) dei neuroni mioenterici gastrici ricevono direttamente gli input eccitatori colinergici da neuroni vagali pre-enterici (Schemann *et al*, 1992). È possibile che non tutti gli impulsi che giungono ai singoli neuroni determinano effettivamente una loro stimolazione, quindi, la percentuale dei neuroni che riceve direttamente stimoli eccitatori dal vago può essere sottostimata. Studi sperimentali riportano come la maggior parte dei neuroni gastrici riceva input vagali, ciò suggerisce anche che gli input vagali siano in numero maggiore rispetto a quelli che arrivano dai neuroni gastrici intrinseci. Invece solo il 10% dei gangli mioenterici nella porzione di muscolatura striata esofagea riceve impulsi efferenti di tipo vagale (Neuhuber *et al*, 1998).

Studi comparati sembrano non essere stati effettuati sull'innervazione efferente vagale dei neuroni pre-enterici a livello del piccolo intestino ma, ad ogni modo, a seguito delle valutazioni sui traccianti essa risulta essere sparsa su gangli mioenterici e sottomucosi (Holst *et al*, 1997). Coerentemente con una minor influenza vagale sul piccolo intestino, le analisi strutturali e funzionali dei circuiti nervosi hanno indicato che esiste una predominanza di connessioni locali derivanti dai neuroni enterici (Furness, 2006). Al contrario, i neuroni vagali pre-enterici innervano tutti i neuroni intrinseci della cistifellea. Il pancreas esocrino è sotto stretto controllo dell'attività vagale (Mawe *et al*, 1998).

#### *Innervazione toraco-lombare*

L'innervazione toraco-lombare spinale agisce sul tratto gastrointestinale attraverso neuroni afferenti spinali i quali hanno i loro corpi cellulari nei gangli spinali ed attraverso la vie efferenti simpatiche.

Gli assoni afferenti toraco-lombari sono quasi tutti fibre demielinizzate di tipo C. Una grande percentuale di queste fibre risulta essere immunoreattiva al peptide correlato al gene calcitonina (CGRP) e alla tachichinina. Una elevata percentuale di fibre afferenti è presente attorno alle arteriole nella parete dell'intestino. Gli assoni dei neuroni afferenti spinali inoltre forniscono una rete assonale varicosa nei gangli del plesso mioenterico (Gibbins *et al*, 1985). Le terminazioni delle afferenze toraco-lombari si ramificano all'interno della lamina propria della mucosa nel tratto gastrointestinale, anche se le loro caratteristiche non sono state definite (Brooks *et al*, 2013). Rare fibre afferenti toraco-lombari sono state riscontrate negli strati muscolari. Una volta passati attraverso i gangli simpatici prevertebrali, gli assoni dei neuroni spinali afferenti forniscono collaterali che creano sinapsi con i corpi cellulari dei neuroni post-gangliari.

Studi sperimentali hanno indicato che l'infiammazione sia responsabile di cambiamenti a lungo termine sulle caratteristiche delle afferenze spinali, che causano neuroni non responsivi a diventare sensibili e neuroni responsivi a diventare ipersensibili (Beyak, 2010; Feng *et al*, 2012).

L'innervazione simpatica efferente toraco-lombare arriva a livello di: gangli mioenterici, gangli sottomucosi, vasi sanguigni e la componente muscolare., Figura 3. I neuroni pregangliari simpatici hanno i loro corpi cellulari nel nucleo intermedio-laterale del midollo spinale. I neuroni postgangliari responsabili della vasocostrizione si trovano nella catena simpatica e nei gangli prevertebrali. I neuroni postgangliari (pre-enterici) hanno i loro corpi cellulari nei gangli prevertebrali e forniscono una fitta innervazione del ganglio mioenterico e sottomucoso. In entrambi i casi hanno azione inibitoria; l'innervazione simpatica dei gangli mioenterici inibisce gli effetti

eccitatori dei neuroni enterici nella muscolatura di stomaco ed intestino, riducendo il passaggio dei contenuti nel tratto gastrointestinale (Furness e Costa, 1974). L'innervazione simpatica dei gangli sottomucosi inibisce l'attività neuronale secromotoria. L'innervazione simpatica dei neuroni post gangliari contrae gli sfinteri del tratto g.i., attraverso i quali, come per l'innervazione dei gangli mioenterici, inibisce il transito del contenuto (Furness *et al*, 2014).

### *Innervazione pelvica*

Il tratto di colon distale e retto sono innervati da via afferenti ed efferenti attraverso i nervi del plesso pelvico e sacrale.

I nervi pelvici sono normalmente considerati come responsabili dell'innervazione del tratto distale di intestino quanto il vago per il tratto prossimale di intestino.

A differenza dei nervi afferenti del vago, le afferenze pelviche includono fibre nocicettive. La distensione colon-rettale causa un riflesso visceromotore dei muscoli addominali (nel topo), in risposta ad una conseguente stimolazione delle vie dolorifiche. Il riflesso visceromotore non risente della sua attività se recisi i nervi lombare o ipogastrico, ma viene alterato se recisi i nervi pelvici (rettali). È stabilito che i nervi pelvici trasportano informazioni afferenti a seguito di una variazione minima della soglia dei meccanocettori. Questi sono stati classificati come le afferenze vagali del primo tipo (terminazioni intragangliari laminari), come avviene nello stomaco ed esofago. Queste terminazioni rilevano una variazione dello stiramento all'interno di un ampio *range* includendo le sensazioni dolorifiche. I meccanocettori mucosali nel grosso intestino sono simili a quelli dello stomaco e della porzione prossimale del piccolo intestino che rispondono a variazioni sulla mucosa ma non sulla distensione o contrazione.

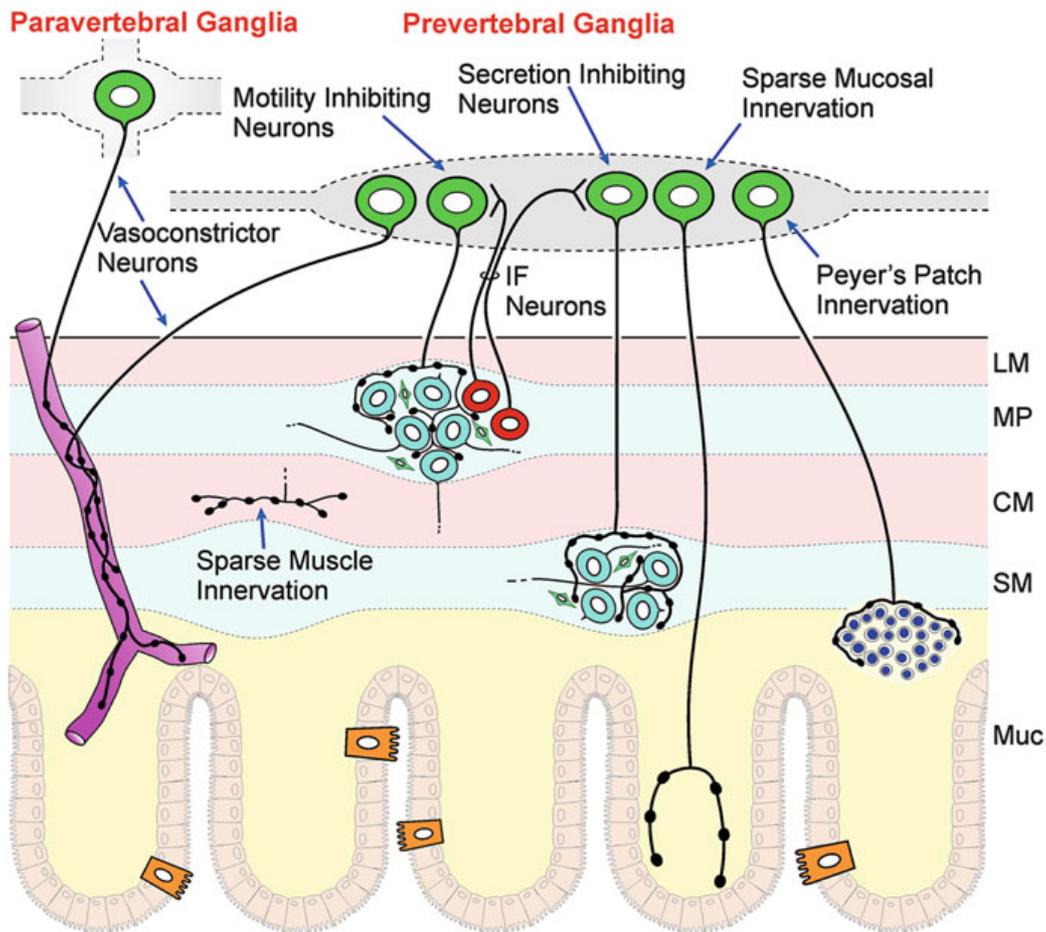


Figura 3: :innervazione simpatica del tratto gastrointestinale (non nella porzione dove ci sono gli sfinteri)

Le vie efferenti dei nervi pelvici forniscono innervazione ai gangli enterici del tratto distale di colon e retto. Traccianti retrogradi indicano che le cellule nervose nel tratto spinale sacrale proiettano direttamente al colon e che ci sono anche cellule nervose che inviano fibre dai gangli pelvici al colon; ciò suggerisce che i neuroni pre-enterici si trovano sia nel midollo spinale che nei gangli pelvici (vedi Fig. all'inizio)

L'innervazione dei gangli enterici, per il controllo della motilità, parte dai centri della defecazione che si trovano lungo il midollo spinale nel tratto compreso tra L5 e S3 (con variabilità legata alla specie). Per esempio, nel ratto il centro della defecazione è localizzato tra L6-S1 e nella cavia tra S1-S2. I riflessi che partono da questo centro possono essere stimolati dall'irritazione e distensione del retto; persistono anche dopo resezione in più tratti nella parte del midollo spinale rostrale ma vengono

meno a seguito del tagli dei nervi pelvici o delle emergenze sacrali (Furness et al, 2014).

### *Afferenze cervicali spinali*

Sebbene l'intestino non riceva impulsi efferenti dal tratto cervicale spinale, i neuroni afferenti che innervano la porzione di esofago craniale di muscolatura striata, hanno connessioni a questo livello. È probabile che queste vie trasportino i segnali dolorifici dell'esofago.

L'importanza del SNE è confermata dagli effetti mortali di alcune neuropatie che lo colpiscono. Al contrario, l'interruzione di connessioni vagali o simpatiche con il tratto intestinale ha minor effetti sulla funzione gastrointestinale.

Il SNE origina da cellule delle creste neurali che colonizzano il tratto gastrointestinale durante il periodo della gestazione intrauterina e procede nel suo sviluppo durante tutta la gravidanza; nell'uomo, la sua funzionalità è già completa nell'ultimo trimestre e terminerà dopo la nascita (Furness *et al*, 2014). Con l'età, si verificano alterazioni in termini di numero e dimensioni dei neuroni e sono associabili a queste variazioni morfologiche anche variazioni funzionali (Conti, 2010). Le funzioni dell'apparato gastrointestinale sono controllate da numerosi riflessi del sistema nervoso autonomo che sono implicati nel generare la peristalsi. I riflessi mediati dal sistema nervoso autonomo generano risposte viscerali che, nel caso della secrezione ghiandolare o delle risposte dell'apparato gastrointestinale all'assunzione di cibo, sono lente.

Gli organi dell'apparato digerente ricevono parte di questi riflessi da segnali provenienti dalle fibre parasimpatiche per gli impulsi secretori e motori mentre le fibre simpatiche inviano gli impulsi inibitori. Altri riflessi sono presieduti dal controllo locale da parte del sistema nervoso enterico. Infatti quell'onda di contrazione muscolare che si propaga lungo tutto l'intestino e favorisce la progressione del contenuto intestinale fino all'ano, detta peristalsi intestinale, è

appunto controllata dal sistema nervoso enterico. Il meccanismo di controllo è dato dal fatto che il cibo entra nell'intestino, distende la parete intestinale determinando lo stiramento dei neuroni sensitivi localizzati nella parete. Raggiunto un sufficiente livello di stiramento, questi neuroni permettono di attivare interneuroni e motoneuroni del plesso mienterico che assicurano la progressione del cibo.

La peristalsi prende inizio con l'attivazione dei motoneuroni eccitatori i cui assoni proiettano in senso orale e provocano la contrazione delle fibre muscolari circolari dell'estremità prossimale del tratto intestinale disteso. La contemporanea attivazione riflessa di motoneuroni inibitori, i cui assoni proiettano in senso anale, determinano il rilasciamento delle fibre muscolari circolari dell'estremità distale del tratto intestinale disteso. Le onde che si susseguono di contrazione e rilasciamento della parete intestinale garantiscono la progressione del contenuto intestinale. Durante questo riflesso le fibre parasimpatiche eccitano i neuroni enterici tramite recettori nicotinici e fanno contrarre invece le fibre muscolari lisce attivando i recettori muscarinici. L'ossido nitrico sembra mediare il rilasciamento della muscolatura liscia (Kandel *et al*, 2007).

Le fibre parasimpatiche dirette allo stomaco e all'intestino sono secretorie e motorie. La stimolazione del nervo vago determina un aumento della peristalsi, della secrezione gastrica e intestinale e il rilasciamento degli sfinteri. Il retto e la parte distale del colon ricevono l'innervazione parasimpatica dal midollo sacrale. L'azione del simpatico sul tubo digerente è, in senso lato, inibitorio. Una stimolazione del simpatico determina una ridotta peristalsi e secrezione con contemporaneo aumento del tono degli sfinteri. Gli stimoli psichici, gustativi e olfattivi che agiscono sulla peristalsi e sulla secrezione gastrica sono mediati dal nervo vago. E' stato provato che, a seguito di resezione dei due nervi vaghi e dei nervi splancnici, lo stomaco e la peristalsi continuano a mantenere un' importante attività motoria che è attribuita alla residua attivazione delle cellule nervose e dai

plessi contenuti nell'organo (plessi di Meissner e Auerbach) (Miani A., Pizzini G. *et al*, 1983). L'innervazione del tratto gastrointestinale avviene anche tramite nervi non adrenergici e non colinergici (NANC) che permettono di controllare la secrezione, il flusso sanguigno e la peristalsi (Lars *et al*, 1997)

L'apparato gastroenterico è l'unico tra gli organi addominali che è esposto ad una varietà di stimoli fisico-chimici provenienti dall'esterno in forma di cibo ingerito. Di conseguenza, l'intestino ha sviluppato movimenti coordinati grazie al suo apparato muscolare per garantire un appropriato rimescolamento e la propulsione dei suoi contenuti durante la digestione, l'assorbimento e l'escrezione (Costa *et al*, 1998). I movimenti dell'intestino sono il risultato dell'interazione dell'apparato nervoso e muscolare (Costa *et al*, 1996).

L'apparato muscolare è organizzato in strati muscolari costituiti da un elevato numero di cellule muscolari lisce interconnesse mediante giunzioni al fine di operare in una unica unità funzionale e meccanica (Sanders *et al*, 1996).

L'apparato neuronale è costituito da un grande numero di neuroni enterici che vengono classificati sulla base della loro localizzazione, neurochimica, connessione, forma e funzione. Importanti ricerche di neurofisiologia sull'intestino di cavia, associate a tecniche di immunistochemica, elettrofisiologia, utilizzo di traccianti retrogradi ed analisi farmacologiche hanno permesso di ottenere una descrizione completa di tutte le classi funzionali dei neuroni enterici (Costa *et al*, 1996),

## PLESSI

Il SNE è composto da *plessi gangliari e agangliari* che si estendono lungo tutto il tratto del tubo digerente, dall'esofago allo sfintere anale interno. I *plessi gangliari* sono ammassi di cellule e fibre nervose: un plesso è localizzato nella tonaca muscolare e prende il nome di plesso mioenterico (MP), scoperto da Auerbach nel

1864; è maggiormente implicato nella regolazione della motilità gastroenterica e contribuisce al controllo secretivo e motorio della mucosa. Il secondo plesso è localizzato nella sottomucosa e prende il nome di plesso sottomucoso (SMP), anche chiamato plesso di Meissner, dal nome del suo scopritore che lo identificò nel 1840; svolge prevalentemente un ruolo di controllo sulla funzione secretoria (Furness, 2006; Conti, 2010) e di assorbimento intestinale (Furness, 2006).

I *plessi agangliari* sono costituiti da fibre nervose che innervano le varie porzioni del tratto gastrointestinale (Conti, 2010).

Il plesso mioenterico è disposto tra lo strato di muscolatura longitudinale esterno e circolare interno (descritto, oltre che da Auerbach 1864, anche da Schabadash 1930, Stohr 1930, Li 1940 e molti altri ancora). Esso invia numerose proiezioni verso il plessi sottomucoso e i gangli localizzati ad esempio nella colecisti e nel pancreas o verso i gangli simpatici prevertebrali (Conti, 2010). I gangli che lo compongono variano per dimensioni, forma e distribuzione a seconda della specie e del tratto di intestino considerato. Nell'ileo di cavia il numero di cellule nervose per ganglio varia da 5 ad oltre 200. Si possono riscontrare occasionalmente alcuni neuroni al di fuori del plesso principale, normalmente vicini ad un fascio nervoso. I gangli possono essere localizzati nei nodi del plesso, cioè nei punti di giunzione dei fasci nervosi che vengono perciò chiamati internodali o intergangliari. I gangli seguono i movimenti del muscolo deformandosi; quindi nella valutazione di caratteristiche come forma e densità si deve tener conto dello stato di contrazione della parete intestinale (Gabella e Trigg, 1984). Il plesso mioenterico può essere suddiviso in tre parti: una struttura primaria, una secondaria ed una terziaria. La prima è costituita da gangli e grossi fasci nervosi che li uniscono (rami intergangliari). La seconda è formata da fasci più sottili, che corrono paralleli alla muscolatura e spesso incrociano i rami internodali. La struttura terziaria infine è costituita da finissimi rami che corrono

negli spazi creati dalla componente primaria (Furness, 2006); si ritiene che le fibre del plesso terziario siano destinate alla muscolatura intestinale.

Il plesso sottomucoso, situato nella sottomucosa, è costituito da tessuto connettivo interposto fra la muscolatura circolare e la *muscularis mucosae* nel tratto del piccolo e grosso intestino, risulta assente a livello esofageo e poco presente a livello gastrico, Figura 4. Le cellule gangliari che lo compongono si portano all'epitelio ghiandolare, alla *muscularis mucosae*, alle cellule endocrine intestinali ed ai vasi sanguigni (Conti, 2010).

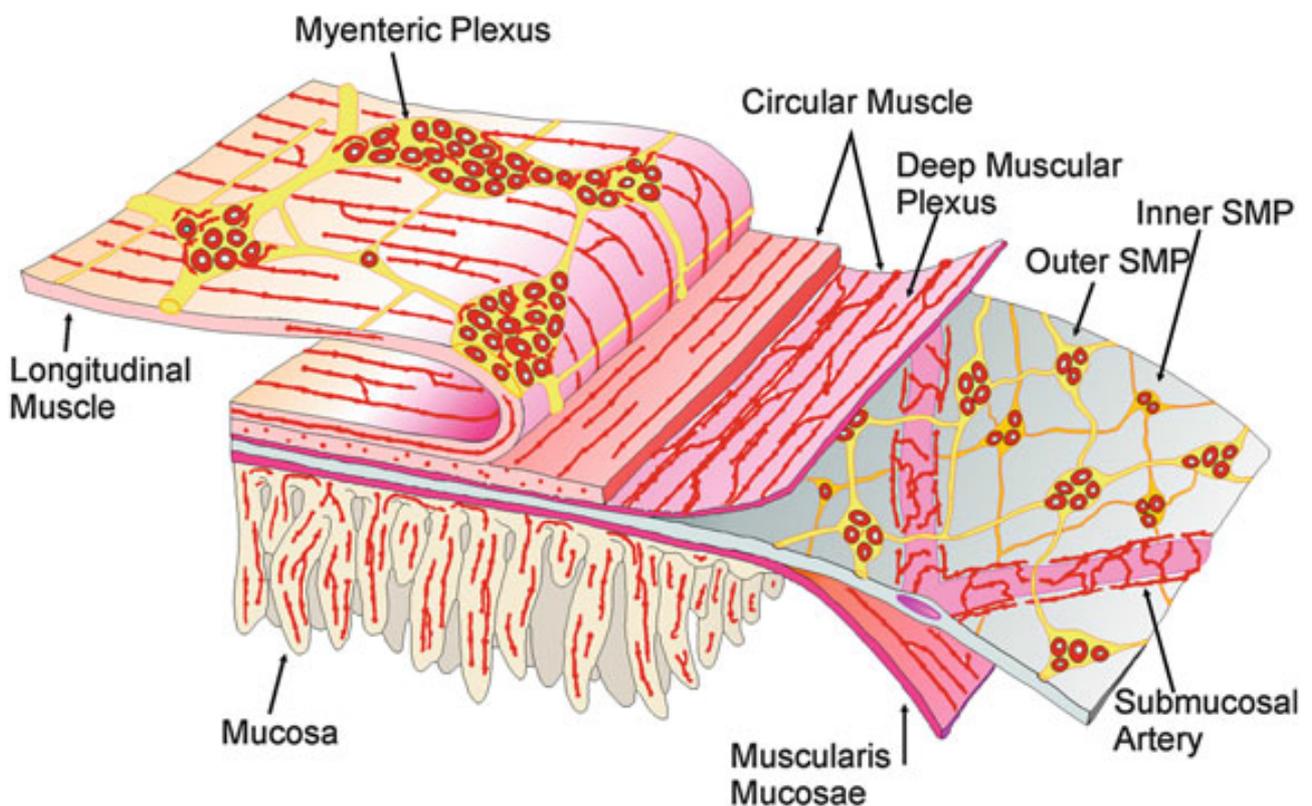


Figura 4: Rappresentazione dettagliata degli strati che costituiscono la parete intestinale; in rosso sono raffigurati i neuroni all'interno dei plessi gangliari e le fibre nervose

Il plesso sottomucoso, comparato al MP, è formato da gangli di minor dimensione e da rami internodali più sottili (Furness, 2006) e risulta (Furness *et al*, 2014) . La densità neuronale, inoltre, è inferiore rispetto a quella del MP. I neuroni che si rinvencono nei due plessi variano per morfologia e per caratteristiche

neurochimiche. Mentre negli animali di piccola taglia, come la cavia, il topo e il ratto, il plesso sottomucoso è unico, nei mammiferi di grossa mole possono essere distinti due tipi di plesso sottomucoso: uno interno, localizzato nel versante sieroso della *muscularis mucosae*, o plesso di Meissner propriamente detto, e uno esterno che si trova sul versante luminale della muscolatura circolare (Furness *et al*, 2014; Conti, 2010), noto come plesso di Henle (Conti, 2010). Il plesso sottomucoso più esterno gioca un ruolo importante nell'innervazione della muscolatura.

I *plessi agangliari*, formati solo da fasci di fibre nervose, sono localizzati a livello sottosieroso (fibre di connessione tra nervi estrinseci e plessi intramurali), muscolare profondo (piccoli fasci nervosi connessi principalmente al plesso mioenterico), mucoso (fine rete di fibre nervose che innervano le cellule epiteliali ed endocrine della tonaca mucosa) e vascolare (rete di fibre nervose che innervano i vasi sanguigni) (Conti, 2010).

E' stata dimostrata, inoltre, la presenza di piccoli gruppi di cellule nervose localizzate nella lamina propria della mucosa (*gangli della mucosa*) nell'intestino tenue e crasso e, raramente, nello stomaco (Furness, 2006); già nel 1934 Stohr ipotizzò che queste cellule fossero la dislocazione (ectopia) di neuroni appartenenti al plesso sottomucoso. Queste cellule nervose sono localizzate, quasi sempre, in prossimità della *muscularis mucosae* negli animali dotati di un doppio plesso (Furness, 2006).

Il *plesso sottosieroso* è un plesso di fasci nervosi molto sottile localizzato nel tessuto connettivo posto sul versante esterno degli organi digestivi, ad esempio tra lo strato muscolare esterno dell'intestino e il rivestimento sieroso della cavità peritoneale. Questi fasci nervosi connettono i nervi estrinseci e i nervi degli strati più profondi della parete intestinale, com'è stato riconosciuto e descritto da Auerbach. I gangli di piccole dimensioni a volte si evidenziano nel plesso sottosieroso, in particolare nell'esofago, nello stomaco e in prossimità dell'inserzione mesenteriale dell'ultimo tratto dell'intestino. Alcuni gangli sottosierosi si trovano all'interno o nelle

immediate vicinanze dei rami del nervo vago al suo ingresso nelle pareti dell'esofago e dello stomaco (Furness, 2006).

L'innervazione è caratteristica di ogni strato muscolare: l'innervazione della muscolatura longitudinale è data dal plesso muscolare longitudinale, che consiste di sottili fasci di fibre nervose che decorrono paralleli all'interno dello strato o dalla componente terziaria del plesso mioenterico. L'innervazione di questo strato è in relazione al suo spessore: infatti in animali di grandi dimensioni e in animali di piccola taglia in cui questo strato muscolare è ispessito si osserva il plesso muscolare longitudinale; nelle specie in cui lo strato muscolare è sottile (spessore uguale a dieci cellule muscolari lisce) l'innervazione è a carico delle fibre nervose della componente terziaria (Furness, 2006). L'innervazione della muscolatura circolare è a carico di sottili fasci nervosi che decorrono paralleli alla lunghezza dello strato muscolare, venendosi a trovare nello spessore della muscolatura circolare. Questi fasci sono a contatto con la componente primaria e secondaria del plesso mioenterico e con il plesso muscolare profondo nell'intestino tenue. Nei piccoli mammiferi, la maggior parte degli assoni del plesso muscolare circolare deriva da motoneuroni del plesso mioenterico; sono anche presenti alcune fibre provenienti da cellule nervose localizzate nel plesso sottomucoso esterno. Le fibre che hanno origine da gangli sottomucosi sono più numerose nelle grandi specie (Furness, 2006). Il plesso muscolare profondo e il plesso sottomuscolare sono un'aggregazione di fasci di fibre nervose che si trova vicino alla porzione interna dello strato muscolare circolare dell'intestino tenue (Li 1937, 1940; Taxi 1965; Gabella 1972, 1974) e del crasso (Stach 1972; Fausone-Pellegrini e Cortesini 1984, 1985). I fasci nervosi dei plessi muscolare profondo e sottomuscolare formano una rete continua attorno alla circonferenza e lungo tutto l'intestino. L'orientamento dei fasci nervosi è parallelo alla direzione delle cellule della muscolatura circolare (Furness, 2006).

## CLASSIFICAZIONE DEI NEURONI DEL SNE

La densità dei neuroni è maggiore nel plesso mioenterico rispetto al sottomucoso; ad esempio nella cavia, i neuroni mioenterici dell'intestino tenue sono 2.750.000, mentre quelli del plesso sottomucoso sono circa 950.000 (Conti, 2010). I neuroni enterici, Figura 5, vengono classificati su base morfologica, funzionale, sulle proprietà chimiche, sulle proiezioni alle cellule bersaglio. Approssimativamente vengono distinte circa 20 tipi di cellule nervose enteriche raggruppate in tre principali gruppi: tipo I, tipo II e tipo III; questa descrizione, proposta da Dogiel già nel 1895, in base alle caratteristiche del corpo cellulare, dell'assone e dei dendriti, è stata, nel complesso, sempre ritenuta valida (De Giorgio *et al*, 2009; Furness *et al*, 2014).

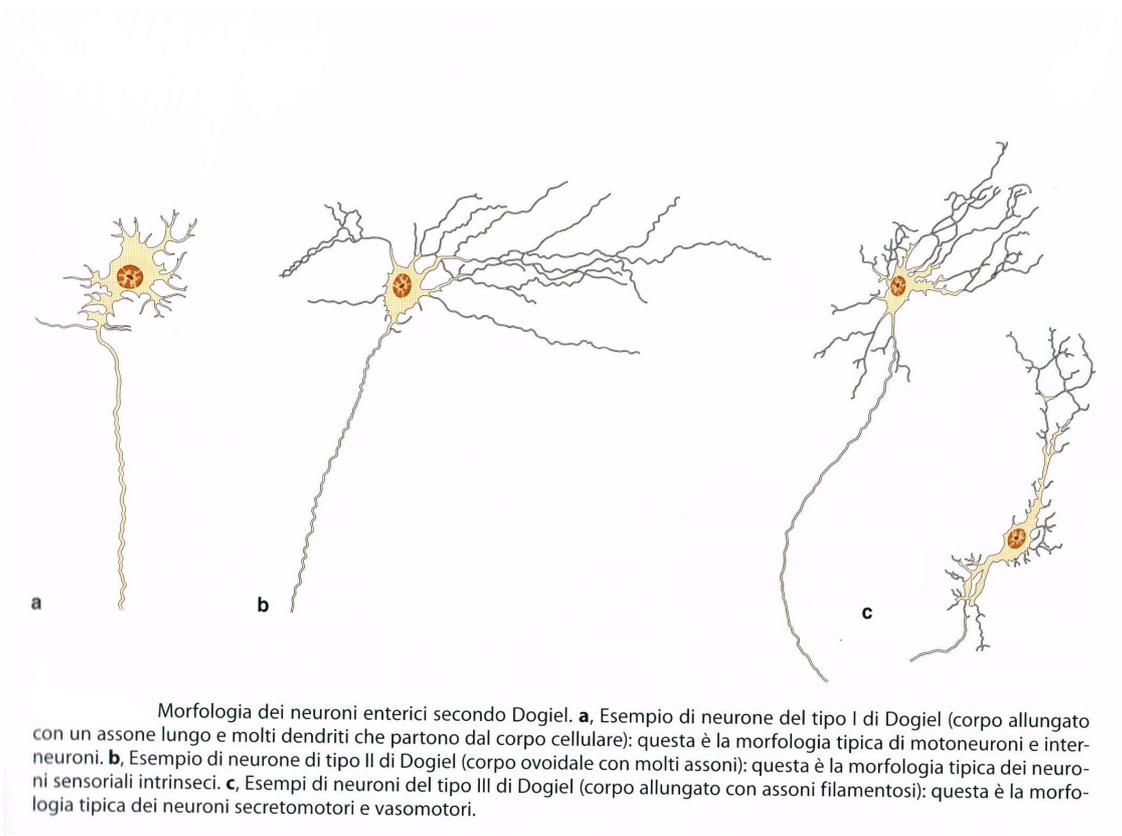


Figura 5: Morfologia dei neuroni enterici.

I neuroni del *tipo I di Dogiel* sono multidendritici (da 4 a 20 dendriti) e uniassonali, sono caratterizzati da una forma appiattita, allungata e da un profilo stellato. La loro funzione non è omogenea: alcuni, infatti, sono motoneuroni eccitatori o inibitori, altri ancora interneuroni ascendenti e discendenti (Furness, 2006). Nel caso in cui si comportino come motoneuroni essi stimolano o inibiscono la muscolatura gastrointestinale evocandone rispettivamente la contrazione o il rilasciamento (De Giorgio *et al.*, 2009). I neuroni appartenenti al tipo I di Dogiel che innervano la muscolatura liscia, sono dotati di elevata eccitabilità in risposta a diversi stimoli e vengono definiti tipo S (*synaptic*) poiché essi sono maggiormente responsabili della trasmissione sinaptica nicotinic gangliare.

I neuroni del *tipo II di Dogiel* sono stati descritti come cellule dal profilo liscio, dotati di numerosi dendriti (da 3 a 10 dendriti) e con un unico assone; è stato successivamente appurato elettrofisiologicamente che tutti i processi principali di queste cellule si comportino come assoni (Furness, 2006). Alcune cellule appartenenti a questa classe presentano invece l'aspetto dei classici neuroni pseudounipolari. I neuroni di tipo II oltre a creare connessioni tra i plessi, proiettano a livello della mucosa. Nella cavia (Furness *et al.*, 1990) e nella pecora (Chiocchetti *et al.*, 2004) è stato dimostrato che la gran parte dei neuroni di tipo II mostrano immunoreattività nei confronti della Calbindina (Calb), una proteina legante il calcio. Questi neuroni sono in grado di percepire gli stimoli luminali e di attivare un'adeguata risposta motoria, secretoria o vascolare attraverso l'interposizione di interneuroni per via indiretta o per via diretta attraverso il contatto con i neuroni motori (muscolari, secromotori e vasomotori). Questi neuroni vengono definiti neuroni afferenti primari intrinseci (*IPANs: Intrinsic Primary Afferent Neurons*) (Furness *et al.*, 1998). I neuroni di tipo II hanno una lunga fase di ineccitabilità in risposta ad un singolo stimolo e vengono definiti tipo AH (*After Hyperpolarization*), ossia un'iperpolarizzazione della membrana neuronale che segue il singolo

potenziale d'azione e che rende il neurone temporaneamente ineccitabile (De Giorgio *et al*, 2009).

I neuroni del *tipo III di Dogiel* comprendono neuroni dotati di dendriti (da 2 a 10 dendriti) simili a quelli di tipo II (Conti, 2010), ma relativamente più corti che terminano all'interno del ganglio di origine (Furness, 2006). L'assone, che può emergere dal cono di emergenza o direttamente da un dendrite (Furness, 2006), decorre in un fascio di fibre che connettono i plessi mioenterici tra loro (Conti, 2010). Queste cellule sono chiamate neuroni con dendriti filamentosi.

Dogiel ipotizzò che la morfologia di questi neuroni fosse correlata alla loro funzione: quelli di tipo I sono stati considerati motoneuroni, quelli di tipo II neuroni sensitivi (Dogiel, 1895; Dogiel, 1896; Dogiel, 1899) e quelli di tipo III neuroni secretomotori e vasomotori (Conti, 2010).

Su base funzionale i neuroni enterici, suddivisi in sensitivi, interneuroni e motoneuroni e collegati tra loro tramite sinapsi, formano i microcircuiti del SNE. È grazie a questi circuiti che il SNE presiede al controllo delle funzioni digestive motorie, secretive e al flusso ematico (Furness *et al*, 2014).

Nei gangli si riscontra la presenza di cellule gliali (glia enterica) che hanno caratteristiche simili a quelle degli astrociti del SNC. Queste cellule costituiscono la barriera ematoenterica, con funzione di supporto, ma hanno anche il ruolo di limitare il contatto tra neuroni enterici e molecole di vario genere presenti nel compartimento extracellulare. Intervengono nella modulazione della risposta infiammatoria intestinale producendo interleuchine ed esprimendo *de novo* antigeni di istocompatibilità della classe II (Conti, 2010) ed interagiscono con il sistema immunitario intrinseco del tratto gastroenterico (Furness *et al*, 2014).

Neuroni sensitivi intramurali (IPANs e IFANs)

## Neuroni sensitivi afferenti primari (IPANs)

I neuroni sensitivi che hanno il corpo cellulare intrinseco al SNE sono anche noti come neuroni primari afferenti intrinseci IPAN o neuroni AH/tipo II di Dogiel (multiassonali), rispondono a cambiamenti chimici intraluminari, variazioni meccaniche della mucosa e variazioni meccaniche dei loro assoni sulla muscolatura esterna (Furness *et al*, 2014). Le cellule nervose multiassonali IPAN risultano essere in percentuale tra il 10% e il 30% dei neuroni dei gangli sottomucoso e mioenterico nel piccolo e grosso intestino. Non sono stati ritrovati a livello esofageo in quanto, le funzioni motorie dell' esofago, sono controllate a partire dal tronco cerebrale (nucleo ambiguo del nervo vago). Questi neuroni sensitivi, come già detto appartenenti al tipo II di Dogiel/AH (ovvero neuroni multipolari dotati di numerosi assoni), prendono rapporto tra loro tramite potenziali postsinaptici eccitatori lenti e con i motoneuroni intrinseci o con gli interneuroni intrinseci attraverso potenziali postsinaptici eccitatori lenti e veloci (Furness *et al*, 1998; Conti, 2010). Questi ultimi comunicano con i neuroni motori che inducono la risposta degli effettori (muscolatura, ghiandole e vasi sanguigni) (Conti, 2010). E' possibile che gli IPAN siano implicati nei cambiamenti patologici delle funzioni enteriche che si instaurano a seguito di infiammazione (Furness *et al*, 2004).

È opportuno sottolineare che attualmente non c'è accordo su quale sia la terminologia più corretta per questi neuroni sensitivi intrinseci. Il problema con la definizione di neuroni sensitivi o IPAN è che questi neuroni, in realtà, non trasmettono sensazioni vere e proprie (Conti, 2010), ma piuttosto informazioni sullo stato di tensione della parete muscolare e sul contenuto chimico intraluminale ai motoneuroni sia direttamente sia tramite gli interneuroni. Loro reagiscono a questi segnali di cambiamento con appropriati riflessi di controllo delle funzionalità inclusa la motilità, la secrezione e il flusso sanguigno (Furness *et al*, 2014). Inoltre, questi

neuroni intrinseci differiscono dai neuroni afferenti primari dei gangli vagali e spinali dal momento che sono multipolari e non comunicano direttamente con il SNC e non sono sensibili alla capsaicina, una neurotossina selettiva per i neuroni afferenti nocicettivi vagali e spinali. Alcuni autori sostengono che il termine più corretto sia di neuroni enterici AH o tipo II di Dogiel che si basa sulle caratteristiche elettrofisiologiche e l'aspetto morfologico (Conti, 2010).

La liberazione di serotonina, da parte delle cellule enterocromaffini intestinali permette di attivare gli IPANs. Pare che la sensibilità a stimoli meccanici a livello intestinale sia una proprietà condivisa anche da interneuroni (Spencer e Smith, 2004) e motoneuroni (Mazzuoli e Schemann, 2009) e di conseguenza, gli IPANs, non siano più le sole cellule in grado di iniziare un circuito riflesso a livello gastroenterico. Differentemente dai neuroni afferenti primari dei gangli vagali e spinali gli IPANs ricevono sinapsi a livello dei corpi cellulari.

Da un punto di vista fisiologico sono stati identificati tre tipi di neuroni sensitivi intrinseci: quelli del plesso sottomucoso che sono attivati a seguito della stimolazione meccanica e chimica della mucosa, quelli del plesso mioenterico attivati da stimoli chimici ed infine quelli attivati dalla contrazione muscolare. Questi stimoli determinano riflessi motori, secretomotori e vasomotori. C'è una relazione reciproca fra neuroni intrinseci e muscolatura poiché un incremento di tensione muscolare attiva i neuroni sensitivi intrinseci, mentre un rilasciamento muscolare riduce l'attivazione di questi neuroni (Conti, 2010).

I neuroni sensitivi che hanno il corpo cellulare al di fuori del SNE sono neuroni sensitivi estrinseci; i loro corpi cellulari si trovano nei gangli vagali o spinali. Attraverso i processi assonali centrali, che partono dai corpi cellulari gangliari, l'informazione viene trasmessa al SNC e, tramite circuiti interneuronali del SNC, a neuroni pregangliari simpatici e parasimpatici che agiscono sul tratto gastrointestinale (Conti, 2010).

## Neuroni intestinofugali (intestinofugal neurons, IFAN)

Questi neuroni, localizzati nel MP e anche nel SMP (a seconda della specie), inviano i loro prolungamenti ai gangli prevertebrali dove entrano in sinapsi con i neuroni gangliari simpatici (Kuntz, 1938; Szurszewski e Miller, 1994). I neuroni intestinofugali, nel piccolo intestino di cavia, sono piccole cellule Dogiel di tipo I con dendriti di breve lunghezza lamellari e filamentosi (Tassicker *et al*, 1999). Essi presentano immunoreattività per VIP/ChAT nella cavia, nel cane per il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), ma a differenza di quelli presenti nel grosso intestino non sono immunoreattivi verso l'ossido nitrico sintasi (nNOS) (Anderson *et al*, 1995; Mann *et al*, 1995). I neuroni simpatici che vengono innervati dagli IFAN inibiscono la motilità così come la secrezione (Furness, 2006).

## Interneuroni

Gli interneuroni del plesso mioenterico sono localizzati nella via sia ascendente (orale) sia discendente (aborale) (Conti, 2010) e hanno pirenofori di dimensioni medio-grandi con morfologia di Dogiel tipo I con dendriti lamellari e una singola proiezione assonale (Furness, 2006). Quelli ascendenti proiettano fino a 14 mm oralmente (Furness, 2006), inviano e ricevono input sia da neuroni intrinseci sensitivi contenenti calbindina (70%) sia da altri interneuroni ascendenti (circa 15%) (Conti, 2010). Essi sembrano essere coinvolti nel riflesso locale motorio ascendente formando collegamenti polisinfaptici sia nicotinici (infatti la loro trasmissione sinaptica è prevalentemente colinergica) che tachichininerfici (Furness, 2006).

Da un punto di vista neurochimico, gli interneuroni ascendenti contengono diverse combinazioni di sostanze neurochimiche come l'acetilcolina, la colina

acetiltransferasi (ChAT), la sostanza P (SP), il neurofilamento (NFP) e l'encefalina (ENK) (Conti, 2010). Nel piccolo intestino di cavia sono stati classificati tre classi di interneuroni ascendenti tutte immunoreattive per il ChAT, il che dimostra come i riflessi ascendenti nel colon utilizzino una trasmissione neuronale colinergica (Lomax e Furness, 2000).

Gli interneuroni discendenti comprendono quattro classi di neuroni e possono avere proiezioni in direzione aborale molto lunghe (25 mm). Una classe comprende degli interneuroni colinergici che contengono neurofilamento e serotonina (coniglio, cavia,..); altre due classi di interneuroni colinergici contengono somatostatina o VIP. Infine l'ultima classe comprende interneuroni che contengono acetilcolina ed ossido nitrico (NO) assieme a peptidi e possono o meno contenere ATP (Conti, 2010). Benché la loro trasmissione sinaptica sia anche colinergica, come indicato dalla loro reattività per il ChAT, la trasmissione nei riflessi locali non è puramente colinergica (Furness, 2006). Gli interneuroni che contengono somatostatina hanno proiezioni molto lunghe (fino a 70 mm) e sembra che oltre all'innervazione del plesso mioenterico alcuni innervino anche il sottomucoso. Questi ultimi interneuroni sono responsabili di potenziali sinaptici inibitori non-adrenergici (Conti, 2010). Recenti studi hanno dimostrato che alcune classi di interneuroni del colon sono meccanoceettori, e che i riflessi che ne possono derivare sono attivati dallo stiramento (Furness *et al*, 2014).

### Motoneuroni

I neuroni enterici motori eccitatori ed inibitori controllano la motilità e comprendono:

-motoneuroni che proiettano alla muscolatura circolare e longitudinale;

- secretomotoneuroni coinvolti nella regolazione dei processi secretivi che proiettano alle ghiandole secretorie;
- neuroni vasomotori (vasodilatatori; la vasocostrizione è simpatica), responsabili del flusso ematico splanchnico, che innervano i vasi sanguigni (Conti, 2010);
- motoneuroni che innervano le cellule enteroendocrine e follicoli linfoidi (Furness *et al*, 2014).

I motoneuroni si possono classificare sia in eccitatori che inibitori; innervano lo strato muscolare longitudinale, circolare e la *muscularis mucosae* lungo tutto il tratto digerente. Sono motoneuroni uni-assonali che ricevono prevalentemente potenziali eccitatori rapidi. I neuroni motori hanno la morfologia del tipo I di Dogiel. Il corpo cellulare dei neuroni motori eccitatori è più piccolo di quello dei neuroni inibitori; inoltre i neuroni inibitori discendenti con proiezioni lunghe presentano un soma più grande di quelli con proiezioni corte. Questa differenza morfologica è associata al contenuto neurochimico di questi neuroni. Infatti, i neuroni motori discendenti con proiezioni lunghe e corpo cellulare grande contengono la proteina *neurofilamentous protein* (NFP), che è assente in quelli a corpo cellulare piccolo e con proiezioni corte (Conti, 2010).

I principali trasmettitori dei motoneuroni eccitatori sono l'acetilcolina e le tachichinine. I neuroni inibitori hanno molteplici trasmettitori: per la trasmissione inibitoria sono l'ossido nitrico (NO), il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e l'adenosintrifosfato (ATP); responsabile della trasmissione eccitatoria sono l'acetilcolina e le tachichinine, in primis la sostanza P (Furness *et al*, 2014).

La maggior parte dei neuroni che innerva la parte circolare della muscolare ha il corpo cellulare localizzato nei gangli mioenterici (Furness *et al*, 2014). Infatti, nella cavia e nei piccoli mammiferi, come il topo ed il ratto, sono tutti localizzati nel MP (Wilson *et al*, 1987); in altre specie, come nel cane (Sanders e Smith, 1986; Furness *et al*, 1990), nel suino, probabilmente nell'uomo (Timmermans *et al*, 2001) e nel

cavallo (Chiocchetti *et al*, 2009) una componente dell'innervazione della muscolatura circolare proviene dai gangli sottomucosi (SMP esterno). Circa i tre quarti dei neuroni che innervano la muscolatura circolare sono eccitatori colinergici e i loro corpi cellulari sono localizzati aboralmente rispetto alla sede di innervazione muscolare mentre il rimanente quarto di neuroni motori, destinato alla muscolatura circolare, è inibitorio e i corpi cellulari sono localizzati oralmente rispetto alla sede di innervazione. Il corpo dei motoneuroni che innervano la componente di muscolatura longitudinale risulta essere localizzato nel plesso mioenterico, nei piccoli animali. Nel maiale e probabilmente nei grandi animali, la maggior parte dei corpi cellulari sono nel MP, ma alcuni motoneuroni della muscolatura longitudinale hanno il corpo nel plesso sottomucoso esterno. Come per gli altri tipi di muscolatura, anche la *muscularis mucosae*, è innervata da motoneuroni eccitatori ed inibitori. L'asportazione dei gangli enterici nel piccolo intestino e colon di cane ha dimostrato l'assenza di cambiamenti dell'innervazione dello strato di *muscularis mucosae*, ciò va a confermare che l'innervazione derivi da cellule nervose localizzate nei gangli sottomucosi. Nell'esofago e nello stomaco, dove è scarsamente presente, l'innervazione parte dai gangli mioenterici. Le terminazioni nervose dei neuroni motori vagali, i cui corpi cellulari sono localizzati nel nucleo ambiguo, vanno ad innervare le cellule muscolari (Furness *et al*, 2014).

### Glia enterica

Le cellule gangliari enteriche e le fibre nervose sono in rapporto con numerose cellule gliali. Le cellule gliali enteriche (CGE) (Furness, 2006) o enteroglia (Conti, 2010) costituiscono una ricca popolazione del SNE. Si tratta di cellule numerose (4 volte di più dei neuroni), di piccole dimensioni, con processi di varia lunghezza e forma che conferiscono loro un aspetto stellato. Sono cellule nucleate satelliti che si

distribuiscono attorno al corpo dei neuroni e dei loro assoni nei gangli enterici e furono descritte per prime da Dogiel (1899).

Nei gangli, queste cellule si trovano a stretto contatto con i neuroni e li isolano dalle cellule extragangliari mediante numerosi e sottili prolungamenti (Bassotti *et al*, 2007). Esse costituiscono un'estesa rete cellulare anche e con i loro processi raggiungono gli enterociti nella mucosa intestinale e i vasi sanguigni nella sottomucosa (Savidge *et al*, 2007). E' importante sottolineare il fatto che le CGE hanno un'origine neuroectodermica, in contrapposizione alla microglia del SNC di derivazione mesodermica (Bassotti *et al*, 2007). Si suppone che queste cellule siano funzionalmente simili agli astrociti del SNC. Le cellule gliali in parte circondano il corpo e gli assoni delle cellule nervose nei gangli, lasciando nude vaste aree della membrana neuronale sulle superfici dei gangli (Furness, 2006).

Esiste una netta differenza nei rapporti tra le cellule gliali e gli assoni dei neuroni dei Mammiferi di piccola e grande mole. Nei Mammiferi di piccole dimensioni (cavia e topo) i processi delle cellule gliali non penetrano in tutti gli interstizi tra i corpi e gli assoni delle cellule nervose, poiché la maggior parte dei processi nervosi ha un contatto diretto tra una membrana e l'altra e le cellule gliali intervengono a separarli in gruppi e raramente si forma una guaina intorno all' assone individuale (Furness, 2006). Al contrario, nei gangli enterici di uomo e scimmia, gli assoni sono separati l'uno dall'altro, grazie alla presenza dei processi delle cellule gliali. Auerbach nel 1864 aveva riconosciuto questa diversità dei rapporti neuriti e cellule di sostegno nell'uomo e in altre specie animali (Furness, 2006).

Le cellule gliali del plesso mioenterico dei piccoli Mammiferi danno luogo a lamelle radianti che dividono gli assoni in fasci di grandi dimensioni fino a 600 neuriti. I nuclei delle cellule gliali possono essere facilmente distinti da quelli dei neuroni: i nuclei gliali presentano voluminose zolle di cromatina, particolarmente vicine alla

membrana nucleare e la superficie nucleare mostra spesso profonde invaginazioni (Furness, 2006).

La caratteristica più importante che contraddistingue la maggior parte delle cellule gliali enteriche è la presenza di numerosi gliofilamenti di 10 nm. Il citoplasma contiene anche un reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, numerosi ribosomi liberi, mitocondri, lisosomi e microtubuli. Gruppi di gliofilamenti attraversano il corpo cellulare parallelamente ai lunghi processi cellulari e risultano, infine, ancorati ad un denso aggregato di materiale in rapporto alla membrana plasmatica (Furness, 2006).

Le CGE, oltre a svolgere un'importante funzione trofica risultano infatti particolarmente ricche di glicogeno, si interpongono tra i vasi sanguigni e le cellule nervose enteriche (Maudlej e Hanani, 1992). E' stato dimostrato che, anche nei plessi enterici come per i neuroni del SNC, non si verifica un contatto diretto delle cellule nervose con i vasi sanguigni, sebbene non esista una vera e propria barriera paragonabile a quella ematoencefalica (Koizumi, 1974). Queste cellule hanno la capacità di regolare l'omeostasi di ioni, soprattutto potassio, evitandone l'accumulo nello spazio perineurale, al fine di non alterare la trasmissione sinaptica (Newman, 1993; Bassotti *et al*, 2007). Il GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) (Bar *et al*, 1997), che aumenta durante i processi infiammatori dell'intestino, e il TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-  $\beta$  isoform*), prodotti dalla glia enterica, svolgono un'importante azione di protezione nei confronti dell'epitelio intestinale risultando perciò degli importanti fattori neurotrofici (Savidge *et al*, 2007). Le cellule gliali regolano la permeabilità intestinale, garantendo una difesa nei confronti della mucosa (Rühl, 2005) e prevengono una possibile iperproliferazione dell'epitelio in corso di patologie infiammatorie, neoplastiche ed infettive (Neunlist *et al*, 2003).

Il ruolo fondamentale della glia ai fini della sopravvivenza dei neuroni è dimostrato dal fatto che la loro ablazione selettiva determina degenerazione neuronale (Bush *et al*, 1998). Inoltre, sembra che forniscano alle cellule nervose anche alcuni substrati

per la sintesi di neurotrasmettitori come il GABA (Kaneko, 1988) e l'ossido nitrico (Bush *et al*, 1998). Bassotti *et al*, (2007) hanno dimostrato che alterazioni della motilità intestinale nell'uomo (megacolon, diverticolosi e forte costipazione) sono associate ad una riduzione significativa delle CGE e delle cellule interstiziali di Cajal a livello dei plessi enterici. Questi dati sono stati confermati in animali da laboratorio dove disordini della motilità intestinale sono correlati ad un'alterazione della funzionalità delle cellule gliari enteriche (Savidge *et al*, 2007). Sempre nell'uomo, le cellule gliali probabilmente sembrano partecipare in modo attivo all'evento infiammatorio, come suggerisce l'espressione sulla loro superficie di molecole MHC di classe II, riscontrata nei pazienti con IBD; inoltre, come nel SNC, l'infiammazione provoca proliferazione gliale (Ruhl, 2005). La rimozione di queste cellule, ottenuta in topi con approcci transgenici, conduce ad infiammazione fulminante con esito fatale. E' stato proposto un ruolo protettivo della glia nel mantenimento dell'integrità dell' SNE e della barriera mucosale (Ruhl, 2005; Savidge, 2007) probabilmente la glia enterica svolge altre funzioni non ancora identificate, dal momento che un altro modello di ablazione gliale porta a modifiche plastiche del 'chemical coding' dei neuroni (Aubè *et al*, 2006).

#### Cellule interstiziali di Cajal (interstitial cells of Cajal, ICC)

Le ICC sono state identificate istologicamente da Cajal (1892 e 1893), mediante colorazione con il blu di metilene e con l'impregnazione argentea (metodo di Golgi), e successivamente da La Villa (1898) e da Dogiel (1899). Poiché venivano usate le medesime tecniche di colorazione del tessuto nervoso, si suppose fossero cellule stellate del tutto simili alle cellule nervose (Furness, 2006). Nel 1982 Thunenberg confermò l'esistenza delle ICC mentre il significato funzionale di cellule *pacemaker* fu introdotto, qualche anno dopo, da Sanders e Ward, che studiarono le onde elettriche prodotte nella muscolatura intestinale. Le ICC sono considerate vere e

proprie cellule pacemaker, (Thunenberg, 1982; Ward, 2000; Kazuhide *et al*, 2003; Feldman *et al*, 2006; Komuro, 2006) per la contrazione delle cellule muscolari lisce della tonaca muscolare, in quanto determinano il ritmo delle contrazioni intestinali generando, come il tessuto di conduzione cardiaco, un vero e proprio ritmo elettrico di base altresì noto come “onde lente” (Thunenberg, 1982; Standring, 2009).

Le ICC non si ritrovano solo nell'intestino; sono presenti, infatti, in altre strutture dotate di attività contrattile ritmica, come la vena porta e la cistifellea (Huizinga *et al*, 2005). In merito all'origine delle ICC, indagini immunoistochimiche hanno evidenziato la positività all'anticorpo c-kit prima e dopo l'arrivo delle cellule delle creste neurali, dimostrando perciò la loro origine mesodermica (Young *et al*, 1996).

Da un punto di vista ultrastrutturale sono cellule provviste di piccoli corpi e lunghi processi, presentano numerosi mitocondri e abbondanti filamenti intermedi; l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico rugoso e liscio sono poco sviluppati. Le ICC prendono contatto con le fibre nervose tramite varicosità (Komuro, 1999; 2006) e costituiscono una rete diffusa negli strati muscolari e anche nella sottomucosa del tratto gastroenterico, dal cardias fino alla sfintere anale interno (Negreanu *et al*, 2008). La loro posizione varia a seconda della porzione del tratto gastroenterico considerato. Nell'esofago e nello stomaco, le ICC sono disperse tra le cellule dello strato muscolare circolare; nell'intestino tenue si trovano tra gli strati interno ed esterno della muscolatura circolare; nel grosso intestino si localizzano oltre che attorno al plesso mioenterico e al plesso sottomucoso, sul versante luminale della componente circolare della tonaca muscolare (Standring, 2009).

Nello specifico, le ICC del plesso mioenterico (ICC-MP) si trovano in stretto rapporto con le terminazioni nervose tramite diverse varicosità; la loro principale funzione è quella di pacemaker o di modulazione dell'azione delle fibre nervose sulle cellule muscolari (Thunenberg, 1989; Sanders, 1996; Huizinga *et al*, 1997; Komuro *et al*, 1999; Ward e Sanders, 2001). Per quanto concerne la prima, a livello di stomaco e

intestino tenue, le ICC sono in grado di generare una periodica depolarizzazione ed una caratteristica frequenza in ciascuno di questi organi. Questo determina una ritmica variazione del calcio intracellulare e l'attivazione di canali ionici di membrana che causano la depolarizzazione (Huizinga *et al*, 2009).

Le ICC svolgono anche un'importante attività neuromediatrice, fungendo da amplificatori del rapporto fibra nervosa/muscolatura liscia e potenziando la contrazione o il rilassamento del muscolo (Ward, 2000). La liberazione di ossido nitrico da parte delle cellule nervose dei neuroni inibitori agisce sulle ICC le quali potenziano l'azione di questa sostanza attraverso una propria produzione (Gershon, 2006). Le ICC presentano anche recettori per alcuni neurotrasmettitori e ormoni: neurochinina-1 (NK-1) (Sternini *et al* 1995; Grady *et al*, 1996; Portbury *et al*, 1996; Vannucchi *et al* 1997; Lavin *et al*, 1998; Grady *et al*, 1999), il polipeptide vasoattivo intestinale (VIP), la somatostatina (Sternini *et al*, 1997) e la colecistochinina (CCK)-A (Patterson *et al* 2001) che possono stimolare una maggior formazione e rilascio di ossido nitrico (Gershon, 2006).

Studi fisiologici sulle ICC, nelle diverse porzioni del tratto gastrointestinale, hanno suggerito che i trasmettitori rilasciati dai motoneuroni enterici si leghino in primo luogo a recettori espressi dalle ICC stesse, ed esse risultino i principali bersagli dei motoneuroni eccitatori ed inibitori che controllano la motilità del tratto gastroenterico (Furness, 2006). Altri studi di Richardson (1958) nel coniglio, Imaizumi e Hama (1969) negli uccelli, Fausone-Pellegrini *et al* (1977) nello stomaco di uomo, Daniel e Posey-Daniel (1984) nell'esofago di opossum, Berezin *et al* (1990) nel colon di cane, Rumessen *et al* (1992) nell'intestino tenue di uomo, Toma *et al* (1999) nell'intestino tenue e nel colon di cavia; Vanderwinden, (1999) e Wang *et al*, (1999) nell'intestino tenue di cavia, hanno dimostrato che alcuni tipi di ICC sono situate vicino alle fibre nervose enteriche e agiscono come mediatori di *input* neuronali. E' stato inoltre dimostrato in vari tratti dell'apparato gastroenterico che,

in assenza di stimolazione elettrica intrinseca ed estrinseca, queste cellule riescono a generare un'attività elettrica e meccanica spontanea anche se non sufficiente a creare dei veri e propri movimenti peristaltici (Feldman *et al*, 2006).

## ANATOMIA DELL'APPARATO GASTRO-ENTERICO DI CANE

### Anatomia macroscopica

Il tratto gastroenterico di cane inizia dalla porzione di esofago post-diaframmatico (addominale). Questa parte, a differenza delle precedenti porzioni di esofago cervicale e toracico, risulta di lunghezza ridotta ed è immediatamente avvolta, assieme ai suoi vasi e nervi satelliti, dai fasci fibrosi e dal peritoneo del legamento gastro-frenico; passa attraverso il fegato e termina direttamente nello stomaco.

*Lo stomaco* è un organo muscolo-ghiandolare ed è la porzione più dilatata del tubo digerente che segue all'esofago a livello del cardia e si continua in corrispondenza del piloro mediante l'intestino tenue. È il primo degli organi essenziali per la digestione nel quale iniziano i fenomeni chimici e meccanici. Rappresenta un serbatoio piegato su se stesso, sospeso caudalmente al fegato, al centro della cupola diaframmatica. Lo stomaco trattiene gli alimenti, prima di inviarli nell'intestino e ci agisce in maniera complessa.

La sua mucosa secerne succo gastrico, ricco di acido cloridrico ed enzimi, di cui il principale è il pepsinogeno (attivato dal pH acido a pepsina) che agisce sulle sostanze proteiche.

Lo stomaco è dilatabile nel cane e la sua capacità può variare da 0,5 a 7 litri ed è variabile non solo a seconda della razza ma anche della taglia dell'animale e la quantità di peso ingerito può raggiungere 1/5 del peso corporeo (Barone, 2003). Topograficamente risulta celato, quando vuoto, sotto l'ipocondrio sinistro, formando un sacco allungato, leggermente appiattito dall'avanti all'indietro e orientato trasversalmente di modo che la parte sinistra, più voluminosa, è situata più in alto di quella di destra la quale si continua con il duodeno. Presenta una forma a C aperta dorsalmente a destra, ed è posto, per la maggior parte, a sinistra del

piano mediano. A causa della sua forma, lo stomaco presenta a considerare: una grande curvatura, rivolta a sinistra; una piccola curvatura, rivolta a destra e verso l'alto; una faccia anteriore o parietale; una faccia posteriore o viscerale (Bortolami *et al*, 2000).

Nello stomaco di cane si possono riconoscere: un fondo, che sovrasta il cardia; una parte pilorica che corrisponde alla porzione inferiore ripiegata dello stomaco e che a sua volta si divide in un antro pilorico e in un canale pilorico al quale fa seguito il piloro. Il fondo gastrico forma un fondo cieco arrotondato che si eleva a sinistra, al di sopra del cardia. Esso determina assieme all'inserzione dell'esofago, una specie di solco, l'incisura cardiaca, poco marcata in questa specie. La parte pilorica si restringe, portandosi verso destra e più o meno verso l'alto. Termina mediante il piloro, segnato da un leggero restringimento anulare e da una maggiore consistenza. L'inserzione dei due omenti continua oltre questo punto fino al primo tratto di duodeno. Un piccolo restringimento suddivide la parte pilorica in due segmenti, talvolta poco distinti: quello che continua il corpo dello stomaco è il più largo e detto antro pilorico e serve da vestibolo; la parte più stretta che termina nel piloro è detta canale pilorico (Barone, 2003).

La grande curvatura è convessa, molto lunga e dà attacco al grande omento; inizia in corrispondenza del cardia e termina a livello del piloro, a destra del piano mediano.

La piccola curvatura è concava ed è molto più breve della precedente, dà attacco al legamento epato-gastrico di derivazione del piccolo omento.

I rapporti topografici dello stomaco con gli altri organi sono: mediante la faccia anteriore con il lobo sinistro del fegato e con una piccola porzione di diaframma. Il fondo cieco prende rapporto inoltre con la milza, con il pancreas e con il rene sinistro. Lo stomaco è mantenuto in situ dalla sua continuità con l'esofago, cranialmente, e con l'intestino tenue, caudalmente, e dalla pressione dei visceri che lo circondano. Sulla piccola curvatura, come già detto, prende attacco una lamina

peritoneale, che si porta fino al fegato ed è denominato piccolo omento. In quest'ultimo si evidenziano due parti tra loro in continuità: il legamento epato-gastrico e il legamento epato-duodenale. Ed infine esiste anche il legamento gastro-frenico che dal fondo dello stomaco si porta sul pilastro sinistro del diaframma. Il grande omento (epiplon), prende origine sulla grande curvatura dello stomaco ed è un estesa membrana peritoneale, fenestrata ed infiltrata di grasso che si estende per tutta la cavità addominale. Esso presenta due dipendenze: il legamento gastro-lienale, che unisce la milza allo stomaco e il legamento gastro-colico che va dall'epiplon al colon trasverso (Bortolami *et al*, 2000).

L'intestino è la parte del tubo digerente che inizia dal piloro e termina all'ano. Si suddivide in due grandi parti: l'intestino tenue e l'intestino crasso.

*L'intestino tenue* fa seguito allo stomaco e si estende dal piloro all'ostio ileale; si presenta come lungo tubo cilindroide, di calibro uniforme nel quale si effettuano le fasi più importanti della digestione. Si distinguono tre segmenti successivi: duodeno, digiuno, ileo. Le dimensioni variano molto a seconda della razza della taglia e dei soggetti. La lunghezza complessiva varia da 2 a 7 metri. La capacità media è di circa 1,6 lt per il tenue e 0,7 lt per il crasso. Solo il primo segmento risulta delimitato e presenta una topografia costante. Gli altri tratti non sembrano distinguibili perciò si può parlare di digiuno-ileo. Nell'intestino tenue avvengono prevalentemente funzioni digestive mediante i secreti esocrini che vengono versati (prodotti da fegato e pancreas) e quelli prodotti dalla sua mucosa, che permettono di trasformare il contenuto intestinale in una massa fluida o chilo, che viene poi assorbita dalla mucosa. L'assorbimento è particolarmente attivo a livello digiuno-ileo. Il duodeno è il primo tratto dell'intestino tenue che è compreso dal piloro e la curvatura duodeno-digiunale. È fissato alla parete lombare destra mediante un meso, descrive un anello più o meno allungato in senso cranio-caudale. Il duodeno presenta una parete relativamente sottile e molle e progredisce mantenendo il lato destro del

corpo, poi caudalmente, contornando la radice del mesentere che sostiene il digiuno-ileo, ritorna verso sinistra in direzione craniale. La parte craniale è relativamente breve, dal piloro si porta a destra e termina nella curvatura craniale, presenta all'origine una modesta ampolla duodenale (Barone, 2003). A seguire, il tratto discendente si porta in direzione caudale, nel fianco destro e sul margine destro della regione lombare; nel cane è molto sviluppato e termina nella curvatura caudale; riceve alla sua origine il condotto pancreatico accessorio e si porta dapprima caudalmente contro il lobo del fegato, quindi tra la parete del fianco destro e il grande omento, il quale lo separa dal cieco, dal colon ascendente e dal digiuno. La parte trasversa si porta verso sinistra, la sua lunghezza è ridotta nei carnivori e descrive una curva che si continua nella parte ascendente; quest'ultima presenta uno sviluppo proporzionalmente inverso alla precedente, è situata a sinistra della radice del mesentere, a concavità craniale, situata caudalmente al cieco e alla radice del mesentere fino all'altezza della quinta vertebra lombare. La parte ascendente si porta in direzione craniale e sinistra, ponendosi a sinistra della radice del mesentere, sulla faccia mediale del colon discendente. La curvatura duodeno-digiunale è situata a livello del polo craniale del rene sinistro.

La parte dell'intestino duodeno-digiunale è appesa ad un ampio mesentere ed è molto più lunga e mobile del duodeno; inizia dalla curvatura duodeno-digiunale e termina all'ostio ileale. La divisione classica in digiuno-ileo è arbitraria, sebbene la parte terminale, formata dall'ileo, presenti particolarità morfologiche e funzionali abbastanza nette che compaiono in maniera graduale e per cui non è presente un limite preciso tra le due parti. Questo tratto dell'intestino risulta un tubo cilindroide, la cui superficie è rivestita da peritoneo e perfettamente liscia; occupa tutta la regione del ventre e le parti adiacenti ai fianchi. Il digiuno descrive otto larghe circonvoluzioni, quando è vuoto appare appiattito in quanto le sue pareti si addossano le une sulle altre; quando è modicamente repleto presenta una forma

perfettamente circolare e leggermente incurvato. La parte concava è la sede di inserzione del mesentere e costituisce il margine mesenterico definito piccola curvatura; dalla parte opposta si trova il margine libero o antimesenteriale, convesso; i due margini sono uniti da due facce, lisce e convesse. La contrazione o il rilassamento non si verificano mai nello stesso momento e questa alternanza irregolare di movimenti dilatati costituiscono i movimenti peristaltici mediante i quali avviene la progressione degli alimenti (Barone, 2003).

L'*intestino crasso* è la parte del tubo digerente che fa seguito all'intestino tenue e che termina con l'ano, orificio mediante il quale si apre verso l'esterno. È suddiviso in tre segmenti: cieco, colon e retto al quale segue il canale anale. Nell'intestino crasso si completa la digestione, nonostante la mancanza di villi, l'assorbimento è elevato. Il secreto della mucosa è finalizzato a diluire il contenuto intestinale e a garantire tramite questo lavaggio l'estrazione dei principi digestivi. Nel tratto finale si accumulano tutte le scorie che devono poi essere eliminate mediante la defecazione. Nei Carnivori è breve e molto semplice.

Il cieco costituisce la parte iniziale dell'intestino crasso e si mostra come un fondo cieco, per l'appunto, tra ileo e colon; è piccolo, liscio e spiroide, sembra essere un diverticolo del colon il quale si continua direttamente nell'ileo. Ha una lunghezza media di 5-6 cm e un diametro di 1-2 cm. È situato sul fianco destro a livello di terza-quarta vertebra lombare. La piega ileo-ciecale si inserisce solo nei suoi primi centimetri; è nel colon che sbocca l'ileo mediante una papilla ileale appena rilevata e provvista di uno sfintere appena sviluppato. L'orificio cieco colico, di lato a questa papilla, ha un diametro di 8-10 mm ed è provvisto di uno sfintere proprio.

Il colon ha un diametro di soli 2-3 cm e una lunghezza di 25-60 cm. Si presenta liscio e di conformazione semplice e le sue diverse parti sono appena distinguibili perché le curvature a malapena accennate. Si divide in: ascendente, trasverso, discendente. Il colon ascendente è breve e situato a livello delle prime due vertebre lombari,

medialmente al duodeno da cui è separato tramite il grande omento. È in rapporto dorsalmente con il rene destro e medialmente con la radice del mesentere. Il colon trasverso è breve e contorna la radice del mesentere; è separato dallo stomaco mediante la parete profonda del grande omento. Il colon discendente è il più distinto e lungo, presentandosi quasi rettilineo. Dapprima coperto dalla milza e dal tratto craniale del grande omento, diventa poi superficiale nella parte dorsale del fianco sinistro. Il suo meso è più ampio rispetto alle due parti precedenti, prende origine comune alla radice del mesentere.

Il retto ha una lunghezza di 4-6 cm e un diametro di circa 3 cm e si estende dall'entrata del bacino fino all'inizio della quarta vertebra coccigea. L'ampolla rettale è appena abbozzata. Il mesoretto non supera 1 cm di altezza.

Il canale anale è l'ultima breve parte del tubo digerente che fa comunicazione con il retto all'esterno, ove si apre mediante l'ano; misura 10-12 mm di lunghezza ed è situato a livello della quarta vertebra coccigea. È caratterizzato dal cambiamento di struttura del rivestimento interno e dalla presenza, nella sua parete, di un doppio sfintere liscio e striato la cui tonicità lo mantiene chiuso, a riposo (Barone, 2003).

### Anatomia microscopica

Lo *stomaco* si compone, procedendo dall'interno verso l'esterno, di quattro tonache: mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa.

La tonaca sierosa è costituita dal peritoneo viscerale e si continua, a livello delle curvature, con i vari mesenterici. È formata da due foglietti, distinti in anteriore e posteriore, tra i quali è accolto il viscerale. Ogni foglietto aderisce molto intimamente alla faccia corrispondente ed è impossibile da dividere. Solo lungo il decorso dei vasi e nervi si osserva una sottosierosa. A livello della piccola curvatura, la sierosa è

rivestita di tessuto elastico che sembra aver il compito di mantenere ravvicinate tra loro le due estremità dello stomaco.

La tonaca muscolare si presenta costituita di due tonache: una superficiale longitudinale ed una profonda circolare. La mucosa gastrica è formata da un epitelio, da una lamina propria e da una *muscularis mucosae*; si divide in ghiandolare e in aghiandolare. È molle, rossastra o rosea e forma delle pieghe regolari e numerose che scompaiono con la distensione, le pieghe gastriche (Barone, 2003). La componente nervosa del tratto gastrico si organizza, come nell'intestino, a formare due plessi: plesso mioenterico che invia le sue fibre alla muscolatura regolando tono e motilità e plesso sottomucoso.

L'*intestino tenue* presenta una struttura microscopica molto simile. La sierosa è costituita dal foglietto viscerale del peritoneo ed è in continuità con i diversi mesenterici, si presenta come un involucro sottile che aderisce in maniera intima alla tonaca muscolare, sulle facce e sul margine libero del condotto. A livello dello strato sottosieroso assume uno sviluppo sotto forma di tessuto connettivo elastico accolto nell'inserzione del mesenterio. La tonaca muscolare si compone di due piani di fasci di cellule muscolari lisce: lo strato longitudinale, più superficiale, che è sempre più sottile, riveste in maniera uniforme il viscerale; lo strato circolare è profondo e molto più ispessito. A livello duodenale, lo strato circolare è leggermente più sviluppato del longitudinale; tende a ispessirsi nel digiuno dove lo strato circolare arriva a quasi il doppio delle dimensioni. Entrambi gli strati diventano più spessi a livello dell'ileo. Per tutta l'estensione del digiuno-ileo, la tonaca muscolare è leggermente più ispessita a livello dell'inserzione mesenteriale rispetto al margine libero.

Lo strato sottomucoso è formato da tessuto connettivo fibroso contenente fibre elastiche, i cui fascetti di fibre hanno una disposizione spiralata. Invia una sorta di asse all'interno di ogni piega della mucosa, è in continuità con il connettivo della tonaca muscolare e con quello della *muscularis mucosae*. Questo strato è da

supporto a una ricca rete vascolare, linfatica e ospita un plesso nervoso molto sviluppato. Lo strato mucoso è costituito da un insieme di strutture che sono responsabili delle sue molteplici funzioni. La faccia libera presenta una miriade di piccoli rilievi, i villi, tra i quali sboccano microscopici orifizi ghiandolari. Si osservano anche noduli linfatici che si raggruppano in certi punti formando i noduli linfatici aggregati. La mucosa è a sua volta suddivisa in tonaca propria, epitelio e villi.

La prima è formata da connettivo reticolare infiltrato di linfociti ed eosinofili che migrano dai capillari sanguigni. La sua parte profonda, contiene, al limite della sottomucosa, la *muscularis mucosae* i cui fasci di cellule muscolari si dispongono a formare due piani: uno superficiale longitudinale ed uno profondo circolare. Tutti gli elementi che costituiscono la tonaca propria, comprese le cellule muscolari lisce che derivano dalla *muscularis mucosae* si prolungano nei villi formando il loro supporto assiale. L'epitelio riveste i villi quanto le ghiandole della mucosa; è costituito da un solo strato di cellule che presentano un orletto cuticolare, tra le quali sono interposte in numero ridotto le cellule caliciformi, enterocromaffini e cellule migranti. Le cellule con orletto cuticolare o cellule assorbenti sono gli elementi fondamentali di questo epitelio: sono alte e irregolarmente prismatiche e poggiano su una membrana sottile alla quale aderiscono mediante un espansione. Il loro nucleo è voluminoso e ovoidale ed è situato sulla parte media o verso la base; la loro estremità libera si presenta striata ed è formata da fitti microvilli che hanno il ruolo fondamentale di assorbimento. Le cellule caliciformi sono meno numerose e si localizzano a intervalli regolari tra le precedenti; anche questo tipo cellulare prende contatto con la membrana basale, come le precedenti, tramite un prolungamento e la loro metà risulta dilatata e rigonfia come un calice chiaro all'interno del quale sono contenuti dei granuli di muco; sono vere e proprie ghiandole unicellulari. Le cellule enterocromaffini, si presentano di forma ovoidale, sono meno numerose dei tipi precedenti e sono ricche di granuli; secernono la serotonina, noradrenalina e la

bradichinina. Le cellule migranti sono linfociti provenienti dalla tonaca propria che si dirigono verso il lume intestinale facendosi spazio tra le cellule epiteliali (Barone, 2003).

I villi intestinali nel cane sono lunghi e robusti e sono responsabili dell'assorbimento nell'intestino tenue, sono considerati papille pleomorfe molli e contrattili. Ogni villo si compone di uno stroma che deriva dalla tonaca propria e rivestito di epitelio e di elementi contrattili, di una rete sanguigna di vasi linfatici e nervi. Lo stroma è costituito da fibre reticolari ed è ricco di cellule migranti. L'apparecchio contrattile è una dipendenza della *muscularis mucosae* e s'ispessisce attorno al singolo vaso linfatico centrale; la sua contrazione restringe il villo e assicura lo svuotamento dei vasi linfatici. La rete sanguigna prende origine da una piccola arteriola che proviene dalla rete sottomucosa; questo vaso si porta fino alla sommità del villo, alimentando una ricca rete capillare che si estende fino a sotto l'epitelio e che viene drenata da una vena efferente.

Il vaso linfatico centrale, assicura il drenaggio linfatico. Nasce a fondo cieco dalla sommità del villo e percorre quest'ultimo in modo assiale terminando nella rete linfatica della tonaca propria. I nervi sono rappresentati dalle ramificazioni terminali del plesso sottomucoso e sono accompagnati da cellule nervose isolate.

L'apparato ghiandolare è costituito da ghiandole intestinali e duodenali. Le prime venivano chiamate una volta "ghiandole del di Lieberkün", si estendono dalla superficie della mucosa alla *muscularis mucosae*, sono localizzate su tutta l'estensione dell'intestino, dal piloro al canale anale e secernono enzimi digestivi (lipasi, disaccarasi, nucleotidasi). Questo tipo di ghiandole sono tubulari semplici a decorso rettilineo o sinuoso; hanno la base a contatto con la *muscularis mucosae* mentre l'estremità opposta si apre tra la base dei villi. Si riscontra la presenza di un numero esiguo di cellule granulose denominante una volta "cellule di Paneth", disseminate nella parte più distale delle ghiandole; sono ghiandole che contengono

granuli acidofili enzimatici e versano il loro contenuto nel lume ghiandolare. Le ghiandole duodenali in passato chiamate “ghiandole di Brunner”, tendono a scomparire prima della curvatura duodeno-digiunale e alle volte sin dall’inizio della parte discendente di duodeno; sono ghiandole tubulari ramificate ad andamento flessuoso, che derivano da un invaginamento sia dell’epitelio superficiale sia del fondo delle ghiandole intestinali. Hanno una membrana basale su cui poggia un unico strato di cellule prismatiche, di natura mucosa con nucleo basale. Sboccano in una fossetta dell’epitelio superficiale. La maggior parte di queste ghiandole si trova situata nella sottomucosa. I noduli linfatici si presentano molto numerosi lungo l’intestino e possono essere solitari o aggregati a “placche del Peyer” (Barone, 2003).

L’*intestino crasso* presenta una struttura microscopica abbastanza uniforme in ogni suo tratto, con le quattro tonache proprie. La sierosa è sottile e rappresenta il foglietto viscerale del peritoneo, molto aderente in quanto il connettivo sottosieroso è scarso ed in continuità con il tessuto interfascicolare della tonaca muscolare. La sierosa forma un corto freno che rende solidali le diverse flessuosità e una breve piega cieco-colica, sul lato antimesenteriale del colon. La sierosa non prosegue fino alla terminazione dell’intestino crasso: il retto è rivestito dal peritoneo in maniera incompleta, caudalmente al quale il retto è circondato solo da connettivo denso che forma una vera e propria avventizia. Lo strato muscolare si compone di due piani di fasci: lo strato circolare, interno, forma un piano continuo e sottile; lo strato longitudinale è altrettanto continuo, regolare e più sottile del precedente.

La tonaca sottomucosa presenta le stesse caratteristiche dell’intestino tenue, anche se è più ispessita nel cieco e nel retto; la parte vicino alla mucosa è infiltrata di linfociti e contiene noduli linfatici, molto numerosi soprattutto nel cieco e retto.

La mucosa dell'intestino crasso è ispessita e più resistente rispetto a quella dell'intestino tenue, priva di villi e di colore grigio-rossastro. La tonaca propria si appoggia su una *muscularis mucosae* ispessita e ricca di linfociti; i noduli linfatici solitari sono voluminosi e invadono la sottomucosa in maniera più estesa rispetto al tenue ma, a differenza di esso, non si trovano noduli aggregati. Anche l'epitelio somiglia molto a quello dell'intestino tenue: le ghiandole intestinali (di "Lieberkühn") sono molto numerose e sviluppate (circa due-tre volte quelle del tenue), si dispongono in maniera perpendicolare fino in prossimità della *muscularis mucosae* e sono ricche di cellule caliciformi. Queste ultime si riscontrano maggiormente nel colon e retto. La mucosa rettale è caratterizzata da abbondanti e voluminosi noduli linfatici i quali determinano su di essa una miriade di piccole depressioni. La mucosa anale fa seguito a quella rettale con un cambiamento brusco caratterizzato dalla presenza di una linea ano-rettale. Se la mucosa intestinale è di origine entodermica, quella dell'ano è di origine ectodermica caratterizzata dal suo epitelio pavimentoso stratificato. Il rivestimento del canale anale viene suddiviso in una parte craniale con una mucosa rettale ed in una parte caudale chiamata mucosa anale e suddivisa in tre zone successive: la colonnare, l'intermedia e la cutanea. La prima è caratterizzata dalla presenza delle colonne anali, delimitata da una marcata linea ano-rettale. Le colonne anali sono caratterizzate da una ventina di piccole pieghe, la cui porzione caudale è delimitata dai seni anali poco profondi. La mucosa di questa zona è simile a quella della bocca o dell'esofago: una tonaca propria di connettivo denso con papille rivestite da epitelio pavimentoso stratificato non cheratinizzato. L'epitelio invia alla sottomucosa ghiandole tubulo-alveolari a decorso sinuoso e di tipo sudoriparo modificato: le ghiandole anali. La zona intermedia è molto ricca, come la precedente, di ghiandole anali a secrezione gassosa e molto ricca di linfociti e noduli linfatici; si unisce alla successiva a livello della linea ano-cutanea. La zona cutanea termina in un ano non rilevato ed è caratterizzata da epitelio pavimentoso

stratificato e cheratinizzato. Le ghiandole ivi presenti sono sebacee, sudoripare e le ghiandole circumanali che tendono a ipertrofizzare con l'età e molto presenti nel cane. Si riscontrano anche seni para-anali arrotondati e situati tra lo sfintere liscio e striato, si aprono nel canale anale tramite un condotto breve e largo. Sono tappezzate da epitelio cheratinizzato e la loro parete è rivestita da uno strato di ghiandole sudoripare apocrine dette ghiandole del seno para-anale (Barone, 2003).

## **PATOLOGIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO DI CANE RESPONSABILI DI ALTERAZIONI SUL SNE**

Tra le patologie enteriche primarie direttamente responsabili di alterazioni del SNE, si devono menzionare la malattia intestinale infiammatoria o *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*, le enteriti (di origine virale, batterica, parassitaria, protozoaria), le neoplasie e le malattie autoimmunitarie.

### Patologia infiammatoria intestinale (Inflammatory Bowel disease-IBD)

La sintomatologia che accomuna queste diverse patologie che colpiscono sia il piccolo che grosso intestino variano, sulla base dell'entità della malattia sottostante, in vomito, diarrea, inappetenza e perdita di incremento ponderale.

“IBD” è un acronimo utilizzato in medicina umana e veterinaria, per definire un importante gruppo di patologie croniche, a carattere idiopatico, caratterizzato da sintomi gastroenterici persistenti o ricorrenti; sono interessati tutti i distretti del tratto gastroenterico nella cui mucosa si ritrovano addensamenti di particolari cellule infiammatorie (linfociti, plasmacellule, eosinofili, neutrofili, macrofagi PAS-positivi) (Ettinger e Feldman, 2005). Spesso le IBD e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) vengono confuse. L'IBS (*irritable bowel syndrome*), acronimo utilizzato in medicina umana, è una patologia derivante da stress di vario tipo, che può presentarsi con vari segni clinici (costipazione, diarrea) ma in assenza di lesioni intestinali patologiche (Ettinger e Feldman, 2005; De Lorenzi *et al*, 2006).

In relazione alla localizzazione anatomica e alla tipologia di infiltrato in corso di IBD, le lesioni vengono classificate in: gastriti, duodeniti, coliti, gastro-duodeniti o enterocoliti linfoplasmacellulari, eosinofiliche, neutrofiliche e granulomatose. Sebbene l'eziopatogenesi delle IBD rimanga ad oggi poco definita, si ritiene che alla base della malattia vi sia un disordine immunomediato associato alla

compartecipazione di fattori ambientali (antigeni batterici e/o alimentari). Si ritiene che sia fondamentale la compromissione della tolleranza immunitaria agli antigeni luminali (batteri o componenti del cibo), che ha forse origine dal sovvertimento della barriera mucosale, da un sistema immunitario non controllato o da disturbi nella microflora intestinale. Di conseguenza, gli antigeni derivati dalla microflora endogena sembrano avere un ruolo importante nella patogenesi della malattia perciò è stato definito un ruolo fondamentale alla dieta per il trattamento di alcuni casi di IBD (De Lorenzi *et al*, 2006). In medicina umana è chiaramente riconosciuta, nell'insorgenza delle IBD, una predisposizione genetica e le associazioni maggiori sono con i geni del MHC (complesso maggiore di istocompatibilità) umano (antigene leucocitari umano). In particolare nei soggetti affetti da Morbo di Crohn, è stata identificata un'anomalia del gene NOD2 sul cromosoma 16; tale prodotto genetico rileva i polisaccaridi batterici e può attivare il fattore di trascrizione proinfiammatorio NF- $\kappa$ B. Questa spiegazione patogenetica può spiegare lo sviluppo di risposte immunitarie aberranti verso i batteri da parte di alcuni soggetti. Ciò sembra verosimile in medicina veterinaria per quanto concerne la colite istiocitaria ulcerativa (HUC), segnalata con maggiore frequenza nel cane Boxer o in razze con comune origine ancestrale come il Bulldog Francese, o per l'enteropatia proteino-disperdente del Basenji e del Lundehund, in cui è chiaramente riconosciuta una componente familiare. Secondo recenti ricerche il Pastore Tedesco, il Weimaraner, il Border collie e il Boxer sembrano maggiormente predisposti a sviluppare IBD (Ettinger e Feldman, 2005).

Le manifestazioni cliniche dell'IBD possono variare in dipendenza della regione del tratto gastroenterico colpita e alla cronicità della patologia; esse sono rappresentate da diarrea cronica (più di 3 settimane), vomito, perdita di peso, modificazioni dell'appetito, muco e sangue nelle feci (Ettinger e Feldman, 2005). È più frequente negli animali adulti rispetto ai giovani anche se i sintomi si presentano già in giovane

età ma la patologia rischia di non essere precocemente diagnosticata in quanti i sintomi vengono controllati in maniera variabile dalla manipolazione dietetica. La sintomatologia, che può peggiorare o migliorare ciclicamente, è correlata anche a fattori stressanti o cambi di dieta; nelle forme più gravi si verifica perdita di peso e perdita di proteine con conseguente ipoproteinemia e ascite. Tendenzialmente l'animale mantiene l'appetito e sulla base delle fasi della patologia può diventare polifagico nonostante il calo ponderale o anoressico (nelle forme più gravi dell'infiammazione). Contrariamente all'uomo, le manifestazioni extraintestinali (oculari, renali e articolari) risultano scarsamente documentate (De Lorenzi *et al*, 2006)

La diagnosi definitiva si ottiene mediante il campionamento biptico intestinale e dalle informazioni ottenute dall'anamnesi, dai segni clinici, dagli esami emato-biochimici e dalla diagnostica per immagini. Da un punto di vista ematologico, l'emocromo non ha indicazioni precise; si può assistere talvolta a neutrofilia o eosinofilia, mentre la sierologia può presentare variazioni delle proteine totali con ipoalbuminemia o ipoglobulinemia se sussiste una concomitante enteropatia proteino-disperdente. Si possono osservare alterazioni degli enzimi epatici secondari ad epatopatia reattiva (Ettinger e Feldman, 2005).

Una delle complicazioni in corso di IBD risulta essere l'enteropatia proteino-disperdente (PLE); alcuni studi hanno indicato casi di PLE associati a sole lesioni delle cripte intestinali senza altre evidenze sottostanti, pertanto l'eziologia rimane sconosciuta. La PLE è caratterizzata dalla perdita di proteine nel lume intestinale, che risulta essere maggiore rispetto alla loro sintesi inducendo, quindi, uno stato di ipoproteinemia. Tra le cause di PLE si riscontrano anche il linfoma e la linfoangectasia. Quest'ultima è caratterizzata da notevoli dilatazione e disfunzione dei vasi linfatici intestinali. I linfatici anormali perdono linfa ricca di proteine nel lume intestinale causando ipoproteinemia. Può essere un disordine primario (disfunzione limitata

all'intestino) o svilupparsi a seguito di ostruzione dei linfatici intestinali (per infiltrazione od ostruzione dei linfatici, per ostruzione del dotto toracico o per insufficienza cardiaca destra) (Ettinger e Feldman, 2005).

### Enteriti (virale, batterica, parassitaria, protozoaria)

Il gruppo delle enteriti è classificato sulla base dell'agente eziologico, si suddividono in: virali, batteriche, parassitarie e protozoarie. La maggior parte delle enteriti virali del cane, specialmente le infezioni da *parvovirus*, causano diarrea acuta, di solito autolimitante, tranne nei casi gravi in pazienti immunocompromessi o nei giovani con possibile esito fatale. L'infezione da *parvovirus* canino è la forma più frequente e contagiosa.

Alla maggior parte delle enteriti di origine batterica è associata diarrea acuta e sostenuta da batteri che talvolta possono essere isolati da animali sani e da soggetti con diarrea cronica. Questo rilievo causa una certa confusione in merito alla significatività di questi microrganismi. Batteri entero-invasivi come *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Yersinia enterocolitica* possono potenzialmente essere patogeni e nonostante ciò essere isolati da animali in assenza di sintomi. L'incidenza dell'infezione è maggiore negli animali giovani, immunocompromessi o residenti nei canili; la sintomatologia risulta essere subclinica o manifestarsi in maniera cronica.

Le enteriti di origine parassitaria e protozoaria sono invece legate ad infestazioni da elminti (Ascaridi, Ancilostomi, Cestodi) e protozoi (*Isospora spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*) che tendono a colpire solitamente animali giovani o animali adulti che vivono a contatto con altri animali non sottoposti ad una regolare profilassi antiparassitaria. Le forme enteriche secondarie sono curabili a seguito di diagnosi confermata da una positività all'esame delle feci (per arricchimento,

flottazione e striscio o nel caso della Giardia tramite ELISA).

## Neoplasie

Tra le neoplasie intestinali i linfomi, adenocarcinomi e leiomiomi sono i tumori più frequenti che colpiscono il gastroenterico. Il linfoma è caratterizzato da infiltrati a livello mucosale, sottomucosale e/o epiteliale di linfociti neoplastici. Gli altri due tipi tumorali tendono ad essere meno frequenti e si sviluppano comunque in animali adulti/anziani (adenocarcinoma ha localizzazione tendenzialmente duodenale) (Ettinger e Feldman, 2005).

## DISORDINE ENDOCRINO NEL CANE: IL DIABETE MELLITO DI TIPO I

Tra le patologie endocrine che affliggono il cane, le alterazioni sul SNE dovute al diabete mellito sono state approfondite in questa sperimentazione. La funzione endocrina del pancreas è svolta da raggruppamenti cellulari, le isole di Langerhans, che nell'animale adulto costituiscono circa l'1-2% della massa pancreatica totale e sono sparse in modo irregolare nel tessuto esocrino. Sono composti da 4 principali tipi cellulari: le cellule  $\beta$  che producono insulina e amilina; le cellule  $\alpha$  che producono glucagone; le cellule  $\delta$ , che producono somatostatina; le cellule PP che producono polipeptide pancreatico (Rijnberk e Kooistra, 2010). Il diabete mellito è uno dei disturbi endocrini più comuni nel cane che origina da una deficienza di insulina, assoluta o relativa, dovuta ad insufficiente secrezione da parte delle cellule  $\beta$  del pancreas endocrino (Ettinger e Feldman, 2005). In molti cani la malattia è simile al diabete mellito di tipo I dell'uomo che è caratterizzata da una distruzione autoimmune delle cellule  $\beta$  del pancreas mediata dai linfociti T (immunità cellulare) o dalla formazione di autoanticorpi (immunità anticorpale) in individui geneticamente predisposti. La predisposizione genetica di alcune razze, in veterinaria, è stata dimostrata recentemente attraverso diversi studi compiuti legati alla manifestazione degli aplotipi dell'antigene linfocitario del cane (DLA). Il diabete mellito si presenta in età medio avanzata, nella maggior parte dei casi a partire dai 5 anni di età. Le razze predisposte sono il Samoiedo, i Terrier, Beagle, lo Schnauzer Nano e il Barbone. L'insorgenza di segni clinici, oltre ai più comuni come la poliuria, polidipsia, polifagia, perdita di peso e cataratta, è legato alla gravità del diabete, alla durata, alla tempestività del trattamento insulinico, oltre a concomitanti infezioni o pancreatiti. Nell'uomo affetto da diabete, si verificano complicanze croniche che incidono in maniera considerevole sulla qualità ed aspettativa di vita ed interessano il sistema vascolare, nervoso, la cute ed il cristallino. Gli studi di microscopia

elettronica sui nervi periferici hanno dimostrato che oltre il 90% dei cani e gatti diabetici presenta neuropatie simili a quelle dell'uomo. Nel cane, la neuropatia diabetica è associata a debolezza degli arti posteriori, difficoltà a saltare, la plantigradia è difficilmente riconosciuta clinicamente, a differenza del gatto dove questi segni sono comuni (Rijnberk e Kooistra, 2010). Due tipi di neuropatia colpiscono l'uomo e i mammiferi domestici: 1) la neuropatia periferica caratterizzata da danni a carico dei nervi sensitivi e motori, che causano parestesie, ipoestesia, danni trofici, neuropatie dolorose acute; 2) la neuropatia a carico del sistema nervoso autonomo e sintomi gastrointestinali come vomito, nausea, dolore addominale, diarrea, costipazione e ritardato svuotamento gastrico (Campieri, 1997; Chandrasekharan e Srinivasan, 2007; Rijnberk e Kooistra, 2010). La patogenesi delle alterazioni gastrointestinali secondarie a diabete mellito è ancora in fase di studio ma le alterazioni sul SNE e sui suoi trasmettitori, in corso di diabete mellito, ha assunto un ruolo sempre più determinante negli ultimi anni (Chandrasekharan e Srinivasan, 2007).

Queste forme di neuropatia sono conseguenti ad uno stato di iperglicemia cronica che provoca alterazioni metaboliche e biochimiche dei tessuti. Tra le ipotesi che sono state avanzate per spiegare l'insorgenza di queste complicazioni, rientrano:

- la formazione di prodotti finali di glicazione avanzata (AGE, Advanced Glycation End-products), gli AGE derivano dalla glicazione delle proteine, cioè dal legame di precursori dicarbonilici derivati dal glucosio ai gruppi amminici delle proteine; determinando una alterazione della loro conformazione e funzionalità. Il processo di glicazione è irreversibile. Gli AGE possono stimolare reazioni infiammatorie e alterare la composizione dell'endotelio vasale, con ispessimento dell'intima (microangiopatia) e aterosclerosi (macroangiopatia).

L'attività di glicazione è direttamente proporzionale alla glicemia (Campieri, 1997; Korenaga *et al*, 2006; Bagyanszki e Bodi, 2012) Figura 6.

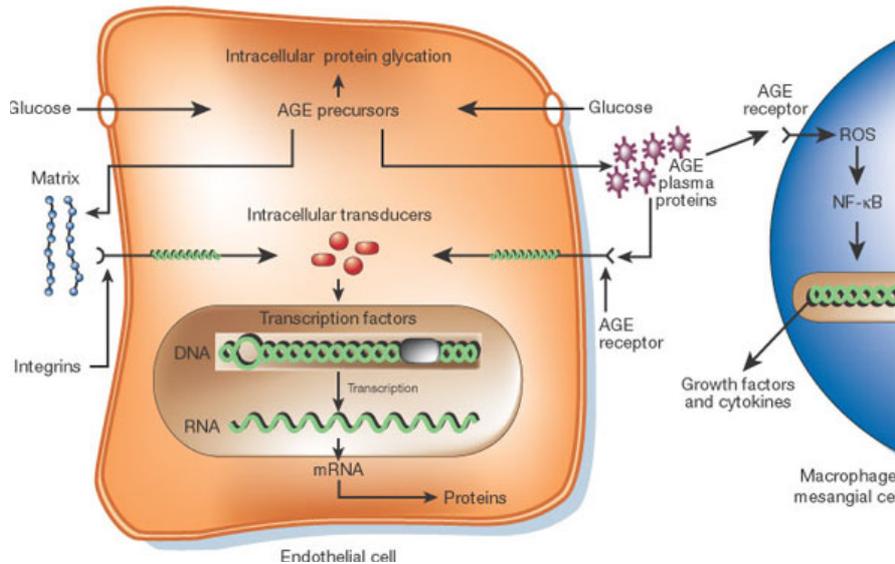


Figura 6: Glicazione non enzimatica delle proteine intracellulari con alterazione del trasporto assonale e interazione degli AGE con i RAGE con attivazione dell'NF-κB e successiva alterazione dell'espressione genica che conduce a processi infiammatori e apoptosi.

- Attivazione della via dei polioli: la saturazione delle esochinasi (enzima iniziatore della glicolisi) attiva l'enzima aldoso reduttasi, con trasformazione, a spese dell'NADH, di glucosio in sorbitolo. Quindi: la diminuzione di NADH determina diminuzione di glutazione ridotto, incremento dello stress ossidativo e conseguente danno cellulare (Campieri, 1997; Cellek *et al*, 2004) Figura 7.

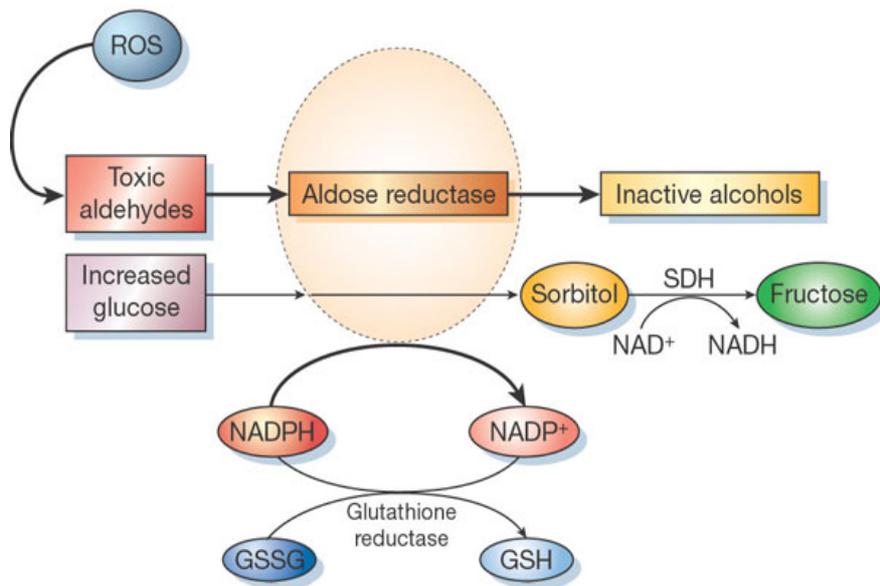
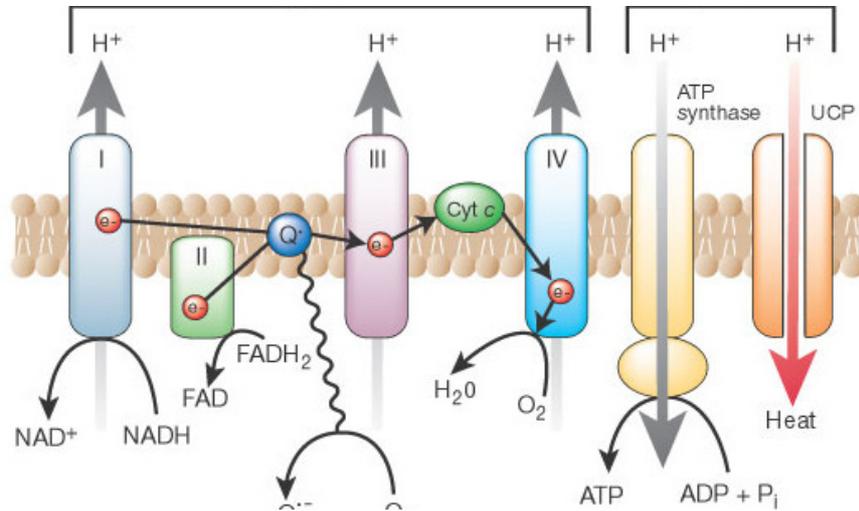


Figura 7: Conseguenze dell'attivazione della via dei polioli sono la diminuzione del contenuto di mioinositolo e taurina; la riduzione dell'attività della pompa Na/K ATPasi, la riduzione di NADPH

- Stress ossidativo: aumentata produzione di ione superossido a livello della catena

respiratoria mitocondriale, di radicali liberi, con diminuzione di NO (Korenaga *et al*, 2006; Campieri, 1997) Figura 8.



*Figura 8: L'iperglicemia determina un aumento di produzione di radicali liberi per aumentato flusso attraverso il ciclo di Krebs. Inoltre l'aumento dello stress ossidativo danneggia il DNA e le membrane mitocondriali.*

## NEUROTRASMETTITORI

Il concetto di neurotrasmettitore divenne nozione comune intorno agli anni '30, dopo che Otto Loewi osservò la liberazione dell'acetilcolina (Ach) dalle terminazioni vagali del cuore di rana e dopo la pubblicazione dei lavori di Henry Dale sulla trasmissione adrenergica e colinergica. Con questi due tipi di trasmissione si indica un neurone che usa norepinefrina o Ach come neurotrasmettitore. In generale, si può definire neurotrasmettitore una sostanza che viene liberata da una cellula nervosa a livello di una sinapsi e che esercita la propria influenza, in maniera specifica, su una cellula postsinaptica, sia essa un neurone o un organo effettore come una cellula muscolare o una ghiandola. Quindi si può dire che i neurotrasmettitori differiscono dagli ormoni in quanto il bersaglio è già presente a livello della sinapsi e non deve essere raggiunto tramite il torrente circolatorio. Accade, tuttavia, che anche i neurotrasmettitori possano agire su bersagli localizzati a qualche distanza dal sito del loro rilascio. I neurotrasmettitori differiscono dagli autocoidi in quanto i primi agiscono su cellule diverse da quelle dalle quali sono stati liberati mentre gli autocoidi agiscono sulla stessa cellula dalla quale hanno preso origine. (Kandel *et al*, 2000). A livello di alcune sinapsi, molte sostanze riconosciute come neurotrasmettitori, attivano anche autorecettori localizzati sulla stessa terminazione dalla quale sono stati liberati. Questi autorecettori modulano la risposta sinaptica e permettono di limitare un ulteriore rilascio di neurotrasmettitore (Kandel *et al*, 2000).

Gli effetti dei neurotrasmettitori hanno durata limitata (da millisecondi a pochi minuti), ma esistono esempi di modificazioni di lungo termine che possono durare ore e giorni nelle cellule bersaglio. In generale, una sostanza non è un neurotrasmettitore se non soddisfa questi 4 criteri:

1. Viene sintetizzata dal neurone;

2. È presente nella terminazione presinaptica e viene liberata in quantità sufficiente per esercitare una attività definita su un neurone postsinaptico o un organo effetore;
3. Quando viene introdotta dall'esterno (come un farmaco) in concentrazioni opportune, è in grado di riprodurre esattamente l'azione del neurotrasmettitore liberato per via endogena;
4. Esiste un meccanismo specifico per il suo smaltimento dal sito dove esercita la propria attività (la fessura sinaptica) (Kandel *et al*, 2000).

Oltre ai neurotrasmettitori, il sistema nervoso utilizza anche un'altra classe di sostanze per inviare messaggi: i neuropeptidi, che presentano le seguenti differenze rispetto ai primi:

- i neurotrasmettitori sono contenuti in vescicole piccole e chiare; i neuropeptidi sono contenuti in vescicole grandi a centro denso. Le prime sono liberate per esocitosi a livello delle zone attive  $Ca^{2+}$  dipendenti, le seconde sono liberate per esocitosi semplice;
- le vescicole grandi possono contenere al loro interno sia neurotrasmettitori di basso peso molecolare che neuropeptidi; sono tipiche dei neuroni catecolaminergici e serotoninergici (granuli simili si ritrovano nella midollare del surrene);
- le vescicole piccole sono tipiche di neuroni che utilizzano neurotrasmettitori come l'acetilcolina (ACh), glutammina, GABA e glicina (Kandel *et al*, 2000).

Sono stati descritti neuroni contenenti più di una sostanza potenzialmente capace di fungere da messaggero chimico. Tale condizione, chiamata coesistenza, comporta in generale la presenza di un neurotrasmettitore a basso peso molecolare accanto ad un polipeptide neuroattivo. È possibile anche che lo stesso neurone liberi insieme diversi peptidi neuroattivi.

Il sistema nervoso utilizza due grandi classi di sostanze chimiche per inviare i propri messaggi:

- Neurotrasmettitori costituiti da molecole di basso peso molecolare;
- Peptidi neuroattivi costituiti da brevi catene di amminoacidi (Kandel *et al*, 2000).

## NEUROTRASMETTITORI A BASSO PESO MOLECOLARE

Il gruppo dei neurotrasmettitori classici è composto da otto sostanze di basso peso molecolare. Sono tutte amine e sette di loro sono amminoacidi o derivati di questi ultimi. Il gruppo è costituito da: acetilcolina, amine biogene (dopamina, norepinefrina, serotonina, istamina) e amminoacidi (glicina, glutamato). Sono tutte molecole a basso peso molecolare che si formano attraverso vie biosintetiche brevi, vengono sintetizzate da precursori che derivano dai principali substrati del metabolismo intermedio dei carboidrati. La sintesi dei neurotrasmettitori classici è catalizzata da enzimi che, a parte la dopamina  $\beta$ -idrossilasi, sono localizzate nel citoplasma cellulare. La presenza di enzimi biosintetici è la condizione necessaria, ma non sufficiente, a determinare la specificità del neurotrasmettitore usato da un neurone. Essenziale è l'intervento di altri processi biochimici, come l'immagazzinamento del neurotrasmettitore nelle vescicole che mediano la sua liberazione a livello sinaptico (Kandel *et al*, 2000).

L'acetilcolina è il principale mediatore del sistema nervoso periferico oltre ad essere presente in vari distretti del sistema nervoso centrale. Al gruppo delle amine biogene appartengono le catecolamine, che derivano dall'aminoacido tirosina (dopamina, norepinefrina, epinefrina), la serotonina che deriva dall'aminoacido triptofano e l'istamina che deriva dall'imidazolo. L'acetilcolina e le amine biogene sono sostanze che non fanno parte delle comuni vie del metabolismo intermedio, e vengono prodotte solo in determinate cellule nervose; al contrario esiste un gruppo di amminoacidi che vengono liberati come neurotrasmettitori, ma che sono

costituenti cellulari universalmente distribuiti. I più comuni sono: la glicina, il glutammato e l'aspartato (Kandel *et al*, 2000).

## PEPTIDI NEUROATTIVI

Come già detto gli enzimi deputati alla biosintesi dei neurotrasmettitori a basso peso molecolare sono presenti in tutta la cellula, possono infatti formarsi in ogni parte del neurone e, soprattutto, nelle terminazioni nervose. I peptidi neuroattivi, al contrario, prendono origine da modificazioni strutturali di proteine secretorie che si formano, nel pirenoforo, da ribosomi aderenti al versante citoplasmatico del reticolo endoplasmatico. Realizzandosi in sede ribosomiale, la loro sintesi avviene in modo più complesso che non quella dei neurotrasmettitori classici perché improntata da un RNA messaggero. Solitamente viene prodotto un pro-ormone, biologicamente inattivo e di peso molecolare superiore a quello del prodotto finale dotato invece di attività biologica. Successivamente i polipeptidi, all'interno di vescicole, subiscono una definitiva modificazione a livello dell'apparato di Golgi da dove vengono liberate sotto forma di granuli di secrezione. Infine all'interno di grosse vescicole, i peptidi, di cui formano il granulo denso centrale, si portano nei terminali assonici per poi, essere esocitati. Una volta liberato il peptide viene demolito da enzimi presenti nella fessura sinaptica senza subire processi di riassorbimento. Nei neuroni sono stati identificati circa 50 peptidi a catena corta attivi che possono provocare fenomeni di eccitazione, inibizione o entrambi quando agiscono su particolari neuroni bersaglio. In alcuni tessuti possono comportarsi anche da ormoni capaci di provocare i loro effetti su cellule bersaglio situate al di fuori del sistema nervoso (gastrina o angiotensina).

Peptidi neuroattivi classificati in base al tessuto di provenienza

Peptidi gastrointestinali	Bombesina
	Colecistochinina
	Gastrina
	Glucagone
	Insulina
	Leu-encefalica
	Met-encefalica
	Motilina
	Neurotensina
	Ormone liberante la tireotropina
	Polipeptide intestinale vasoattivo (VIP)
	Secretina
	Somatostatina
	Sostanza P
	Ormoni Ipotalamici
Ormone liberante le gonadotropine	
Ormone liberante la corticotropina	
Ormone liberante l'ormone della crescita	
Cuore	Ormone natriuretico atriale
Ormoni neuroipofisari	Vasopressina
	Ossitocina
Ormoni Ipofisari	Ormone adrenocorticotropico
	$\beta$ -endorfina
	Ormone- $\gamma$ -melanocitostimolante
	Prolattina
	Ormone luteinizzante
	Ormone della crescita

	Tirotropina
Altri polipeptidi	Angiotensina II
	Bradichinina
	Peptidi del sonno
	Calcitonina
	Peptide correlato al gene calcitonina (CGRP)
	Neuropeptide Y
	Neuropeptide Yy
	Galanina
	Sostanza K (Neurochinina A)

I peptidi neuroattivi sono profondamente diversi l'uno dall'altro, ma vengono comunemente raggruppati in famiglie i cui membri contengono lunghe sequenze di aminoacidi più o meno simili (Gastrine, Insuline, Oppioidi, Peptidi neuroipofisari, Secretine, Somatostatine, Tachichinine) (Conti, 2010).

Come tutti i neuroni anche quelli del SNE possiedono la capacità di sintetizzare, immagazzinare e rilasciare, in risposta a stimoli adeguati, una diversa gamma di messaggeri chimici. Tuttavia, il numero di sostanze biologicamente attive (oltre quaranta), a tutt'oggi identificate, fa sì che il SNE sia l'unica divisione del SNP ad avere un così vasto patrimonio neurochimico comparabile solo a quello dei neuroni del SNC (Furness e Costa, 1987; Gershon, 1990; Goyal e Hirano, 1996; Tonini *et al*, 2002; De Giorgio *et al*, 2009).

La classificazione delle sostanze biologicamente attive non peptidiche e peptidiche che possono agire come neurotrasmettitori o come neuromodulatori avviene secondo il codice chimico, al morfotipo cellulare di Dogiel, alle caratteristiche elettrofisiologiche ed alla polarità assonale. Queste distinzioni permettono l'identificazione di sottopopolazioni di neuroni enterici. Ad esempio, i motoneuroni eccitatori contengono, fra le numerose sostanze biologicamente attive, acetilcolina

(Ach) e tachichinine (sostanza P, neurochinina A); i motoneuroni inibitori presentano un profilo neurochimico più eterogeneo, rappresentato da una serie di neurotrasmettitori che includono NO, polipeptide VIP, pituitary-adenilate cyclase activating polypeptide (PACAP) e adenosintrifosfato (ATP). Esempi simili possono essere applicabili ad altre classi di neuroni funzionalmente specializzate (De Giorgio *et al*, 2009). Mediante tecniche immunoistochimiche è possibile o evidenziare i diversi neurotrasmettitori o come avviene più di frequente, gli enzimi che degradano queste molecole (Kandel *et al*, 2000).

Di seguito verranno trattati i neurotrasmettitori e i relativi enzimi coinvolti nel loro metabolismo che sono stati utilizzati come *neuronal markers* nella parte sperimentale di questo progetto di ricerca: nNOS, VIP, Sostanza P, peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), Calbindina e la Proteina HuC/HuD.

### Proteina HuC/HuD

La proteina HuC/HuD appartiene alla famiglia delle proteine Elavlike (*embryonic lethal abnormal vision*) leganti RNA. Gli anticorpi anti-HuC/HuD furono isolati, in origine, da pazienti affetti da encefalomieliti paraneoplastiche, una rara patologia specifica del tessuto nervoso associata a piccole formazioni carcinomatose a livello polmonare. Le proteine Hu C e Hu D sono espresse esclusivamente dai neuroni e sono state ampiamente utilizzate come *pan-neuronal markers* (Lin *et al*, 2002) di queste cellule nel SNE e negli altri distretti del sistema nervoso (Chiocchetti *et al*, 2009). Gli anticorpi anti-HuC/HuD marcano esclusivamente il pirenoforo di tutti i neuroni reattivi. L'immunoreattività per l'HuC/HuD viene espressa sia dal nucleo che dal citoplasma. I processi nervosi non esprimono HuC/HuD-IR, questo rende più semplice l'identificazione e il conteggio neuronale. Recenti studi (Desmet *et al*, 2014) hanno dimostrato che l'HuC/HuD non è da considerarsi meramente un *pan-*

*neuronal marker* e che la sua unica localizzazione a livello nucleare può essere un indicatore di sofferenza neuronale in corso di particolari condizioni patologiche come infiammazioni, alterazioni metaboliche e stati di carenza di ossigeno.

### Calbindina (Calb)

Molti dei neurotrasmettitori e degli ormoni del tratto gastroenterico che sono sintetizzati da e agiscono su cellule nervose ed endocrine, espletano i loro effetti a seguito di variazioni della concentrazione di calcio intracellulare. I fattori che determinano una variazione di calcio intracellulare sono diversi e complessi e includono: la regolazione del calcio in entrata e uscita attraverso la membrana citoplasmatica, il sequestro ed il rilascio di calcio intracellulare e il legame con le proteine leganti il calcio intracellulari. Una di queste proteine leganti il calcio è la Calbindina D-28k (Calb) che è stata evidenziata su cellule neuroendocrine in diverse specie: cavia, uomo, ratto (Buchan & Baimbridge, 1988; Furness *et al*, 1988; Resibois *et al*, 1988; Furness *et al*, 1989; Furness *et al*, 1990; Walters *et al*, 1993). Originariamente questa proteina è stata descritta come una proteina dipendente alla Vitamina D nelle cellule epiteliali dell'intestino di gallina (Wasserman & Taylor, 1966). Diversi studi hanno confermato la presenza della Calbindina D-28k nelle cellule renali, nel SNC e nelle cellule endocrine; essa appartiene ad una grande famiglia di proteine che hanno elevata affinità di legame per il calcio, che mediano la concentrazione di calcio intracellulare ed attraverso questa azione presumibilmente influenzano il segnale intracellulare. La Calb, gioca un ruolo fondamentale sia nel facilitare la diffusione intracellulare di calcio sia nel modulare la neurotrasmissione. All'interno dei neuroni i potenziali d'azione sono influenzati in parte anche dal flusso di Calcio. Nel SNC questa proteina e le altre proteine leganti il calcio vengono usate come *markers* di sottopopolazioni neuronali e le sue variazioni di immunoreattività

sono state descritte in stadi gravi di diverse patologie. In uno dei primi studi sulla Calbindina, viene riportata la variazione della concentrazione di questa proteina nell'ippocampo di ratto in un modello di epilessia (Miller e Balmbridge, 1983). L'immunoreattività per la Calbindina è riportato essere ridotta in diverse patologie degenerative dell'uomo come la sindrome di Huntington, Parkinson e Alzheimer (Heizmann e Braun, 1992). È indicativo che la diminuzione del legame di queste proteine al calcio porti ad una compromissione dell'omeostasi del calcio ed una citotossicità calcio mediata. Nel piccolo intestino di cavia e uomo l'immunoreattività per la Calb risulta maggiormente localizzata a livello di plesso mioenterico con poche fibre presenti negli strati muscolari. Queste cellule immunoreattive sono state classificate come cellule di Dogiel di tipo II, perciò sono neuroni sensitivi multipolari con processi sensitivi che proiettano sulla mucosa e su altri neuroni mioenterici (Walters *et al*, 1993).

#### Peptide correlato al gene della Calcitonina (Calcitonin gene related peptide-CGRP)

Studi neuroanatomici e farmacologici hanno messo in evidenza che il peptide correlato al gene della calcitonina origina da mutazioni del gene stesso e svolge un ruolo cruciale nel regolamentare, da un punto di vista fisiologico e patologico, diverse funzioni del sistema nervoso enterico tra cui il controllo della motilità gastrointestinale, delle funzioni sensitive, della microcircolazione intestinale, della secrezione, dell'assorbimento di amminoacidi e della microcircolazione linfatica (Chiocchetti *et al*, 2006). Tra i tessuti periferici immunoreattivi per il CGRP ricordiamo: il tratto prossimale dell'apparato digerente e alcune aree degli apparati urinario, respiratorio e cardiovascolare; in tali distretti l'azione della capsaicina (un alcaloide estratto dal *Capsicum acuminatum*), che provoca una selettiva distruzione

delle afferenze sensitive amieliniche di piccolo diametro A $\delta$  e C, distrugge le fibre CGRP immunoreattive che quindi, per tale motivo, sono considerate di natura sensitiva. Nei Mammiferi il CGRP è presente anche a livello dei neuroni motori e delle placche motrici dove attiva l'adenilciclasi che a sua volta, aumentando il livello dell'AMPC, potenzia la contrazione della muscolatura; si deve poi ricordare come questa sostanza abbia anche un potente effetto vasodilatatore (Kandel *et al*, 2000). L'immunoreattività al CGRP è stata dimostrata dapprima nel suino (Scheuermann *et al* 1987, 1991) e successivamente nell'uomo (Timmermans *et al*, 1992). Lo studio condotto sull'intestino tenue di uomo (Timmermans *et al*, 1992) ha indicato che la positività al CGRP si ha principalmente in neuroni simili a quelli CGRP positivi localizzati nell'intestino tenue di suino (Scheuermann *et al*, 1987, 1991) e nel colon di topo (Furness *et al*, 2004). Neuroni CGRP positivi di forma ovoidale con aspetti multipolari, bipolari e pseudo-unipolari sono stati individuati nell'ileo di agnello; queste cellule presentavano da quattro a cinque processi visibili spesso originatesi dal soma. Anche se la descrizione di tutte queste cellule è riconducibile alla morfologia dei neuroni Dogiel di tipo II (Chiocchetti *et al*, 2006), Brehmer *et al*. nel 2002 hanno evidenziato che, le cellule CGRP immunoreattive nel plesso mioenterico dell'ileo di suino, corrispondono ad un diverso tipo di neuroni enterici: neuroni di tipo V.

### Ossido nitrico

Nel 1980 è stato identificato un fattore che deriva dall'endotelio che dilata in maniera rapida i vasi sanguigni. Tale sostanza si è rivelata essere l'ossido nitrico (ON). L'ossido nitrico si forma nei neuroni ad opera della ossido nitrico sintasi, in risposta all'azione del glutammato su recettori NMDA (N-metil-D-aspartato) e in presenza di Ca<sup>2+</sup>. Analogamente ad altri messaggeri l'ON non è presente soltanto nei

neuroni, ma si forma ed è attivo anche in altre cellule dell'organismo; è infatti presente nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni e, agendo come un ormone, determina il rilasciamento della muscolatura liscia e la dilatazione delle pareti vasali (Berezin *et al*, 1994; Kandel *et al*, 2000). Rientra, assieme al VIP, tra i principali responsabili della trasmissione inibitoria delle fibre non adrenergiche e non colinergiche (NANC), determinando un rilassamento della muscolatura liscia del tratto gastroenterico (Berezin *et al*, 1994; Takahashi *et al*, 1997; Ny *et al*, 1997).

L'ossido nitrico non viene né rilasciato mediante esocitosi, né immagazzinato nelle cellule, né interagisce con specifici recettori di membrana. È una molecola di natura gassosa, che diffonde liberamente attraverso le membrane per cui non è sottoposto al rigido controllo quantico tipico della trasmissione mediata da vescicole (Standring, 2008). Si lega alla guanilato ciclasi che induce rilassamento della muscolatura liscia attraverso le seguenti azioni: 1) aumento del cGMP, che inibisce l'ingresso del calcio nelle cellule; 2) attivazione dei canali del potassio che inducono iperpolarizzazione e rilassamento; 3) stimolazione della proteina chinasi cGMP dipendente che attiva la fosfatasi della miosina a catena leggera, enzima che, defosforilando la miosina stessa, induce rilassamento muscolare. Queste sue caratteristiche fanno in modo di evocare segnali anterogradi e ortogradi nelle sinapsi (Sian *et al*, 1999).

L'ossido nitrico possiede emivita inferiore ai 30 secondi e si trasforma spontaneamente in nitrito, per cui la sua inattivazione è sostanzialmente passiva. Differisce, perciò, dagli altri trasmettitori convenzionali anche perché non esistono processi attivi che ne interrompano l'azione (Zigmond *et al*, 1999). La sintesi di NO consiste in un solo passaggio mediato da un enzima che è l'ossido nitrico sintasi (NOS) e non utilizza ATP. La conversione avviene da L-arginina in NO e citrullina. Tre differenti isoforme dell'enzima NOS sono state identificate: iNOS, presente nei monociti/macrofagi e nelle microglia, nNOS nei neuroni e eNOS nell'endotelio dei vasi. L'isoforma neuronale nNOS è stata reperita sia a livello centrale che a livello

periferico, SNE incluso (Knowles e Moncada, 1994). Nel SNE di cavia il nNOS si trova per la maggior parte nei motoneuroni inibitori (Furness, 2006). È stato ulteriormente dimostrato che nel SNE le cellule gliali rappresentano una delle maggiori fonti di L-arginina a disposizione dei neuroni enterici (Cabarrocas *et al*, 2003).

### Sostanza P (SP)

La sostanza P prende il nome da *powder*, cioè polvere, ed è stato il primo peptide ad essere identificato come neuromediatore gastrointestinale (Standring, 2009). I primi ricercatori hanno osservato che la polvere determinava la contrazione della muscolatura liscia dell'intestino degli Equidi. La sostanza P è costituita da 11 aminoacidi ed appartiene alla famiglia delle tachichinine, un gruppo di peptidi che condividono una sequenza di 6 aminoacidi a livello del terminale carbossilico. La scoperta di questa molecola risale al 1931, ma solamente dopo circa 40 anni, Chang riuscì ad identificare la sequenza amminoacidica. All'epoca si riteneva che la SP fosse l'unico peptide appartenente alla famiglia delle tachichinine nei Mammiferi, ma successivamente furono identificati ed inclusi nella stessa famiglia altri due peptidi: la neurochinina A e la neurochinina B. Successivamente fu isolata un'altra tachichinina, il neuropeptide K. La SP è localizzabile, oltre che a livello centrale, anche in distretti periferici del corpo, nel sistema cardiovascolare e in numerosi visceri (localizzata nei neuroni) (Furness, 2006). L'intestino è uno degli organi in cui la SP è maggiormente presente, sia a livello del plesso mioenterico che del plesso sottomucoso; è co-trasmittitore eccitatorio a livello muscolare e neuronale assieme all'ACh; ha azione pro-secretoria a livello della mucosa; è coinvolto nei meccanismi di trasmissione dei neuroni sensitivi intrinseci (De Giorgio *et al*, 2009; Margolis e Gershon, 2009) e nei neuroni estrinseci che innervano l'apparato gastroenterico

(Pernow, 1983; Margolis e Gershon, 2009). La mucosa è molto ricca di fibre SP-IR che derivano da neuroni del SMP; anche lo strato di muscolatura circolare risulta essere molto innervato da fibre SP-IR che originano da neuroni presenti nel MP (Daniel *et al*, 1987). Anche le cellule immunitarie come monociti, macrofagi, eosinofili e linfociti esprimono la SP. I tre recettori collegati alla proteina G, neurochinina 1-2 e 3 mediano gli effetti della SP. Tra questi il recettore neurochinina 1 ha l'affinità maggiore per la SP ed è il più espresso in corso di infiammazione. I recettori neurochinina 1 sono abbondantemente espressi nel piccolo e grosso intestino, non solo dai neuroni enterici ma anche dalla muscolatura liscia, cellule endoteliali, effettori immunitari e cellule epiteliali della mucosa (Koon *et al*, 2005; Margolis e Gershon, 2009)

Tra le azioni della SP è indicato anche l'effetto contrattile sulla muscolatura liscia e quello ipotensivo. La sua funzione eccitatoria è nota dal 1976 come neurotrasmettitore o neuromodulatore nella trasmissione degli impulsi nocicettivi a livello centrale.

#### Peptide Intestinale Vasoattivo (*Vasoactive Intestinal Peptide- VIP*)

È un neuropeptide di 28 amminoacidi presente sia nel sistema nervoso centrale che periferico. Rientra, assieme al NO, tra i principali responsabili della trasmissione inibitoria delle fibre non adrenergiche e non colinergiche (NANC), agendo sulla muscolatura liscia del tratto gastroenterico (Berezin *et al*, 1994; Ny *et al*, 1997); nell'intestino di cane e di cavia NO e VIP hanno azione di inibizione della motilità e co-localizzano su fibre nervose inibitorie (Berezin *et al*, 1994). In tutti gli strati del colon sono presenti neuroni VIP, ma la concentrazione maggiore di questo neuropeptide si trova a livello del MP e della muscolatura circolare (Berezin *et al*, 1994; Margolis e Gershon, 2009). I neuroni intrinseci VIP-ergici innervano cellule

target che si trovano non solo all'interno del SNE, ma anche ad effettori enterici come i muscoli e le cellule delle cripte epiteliali. Il VIP è liberato dai motoneuroni al fine di rilasciare la muscolatura circolare (Storr *et al*, 2008) e dai neuroni secretomotori al fine di stimolare la secrezione da parte dell'epitelio di acido cloridrico (Assimakopoulos *et al*, 2008). Il VIP esercita i suoi effetti tramite il legame con una coppia di recettori G proteici: VPAG1 e VPAG2 (Karagiannides *et al*, 2008). Un altro ruolo importante del VIP è quello di agire come immunomodulatore e soppressore dell'attività anti-infiammatoria inibendo il rilascio dei macrofagi e dei linfociti T negli organi linfoidi, inibendo l'attività dei neutrofili e riducendo la migrazione dei linfociti e l'attività delle cellule natural killer (Koon *et al*, 2008). Riduce anche l'attività delle citochine e dei mediatori chimici dell'infiammazione come IL-6, TNF, IL-12, NO e le chemochine.

È stato dimostrato che il rilascio di VIP determina una riduzione nella produzione delle chemochine e dell'espressione dei recettori delle chemochine. Il VIP esercita anche un ruolo protettivo stimolando i linfociti T a produrre fattori neurotrofici come, ad esempio, il fattore neurotrofico cerebrale (Bindu *et al*, 2013).

Il Vip è prodotto non solo dai neuroni ma anche dalle cellule T-helper di tipo II (Th2) a seguito della stimolazione da parte di un antigene. Il VIP inibisce le cellule Th1 mediate a seguito di una induzione delle cellule CD4 al fine di esprimere le citochine dei Th2 piuttosto di esprimere le citochine Th1 (Margolis e Gershon, 2009). Il ruolo del VIP negli stati di infiammazione intestinale è contraddittorio. Sebbene i principali studi depongano per un'azione antinfiammatoria, il VIP, per esempio, stimola lo sviluppo, in risposta agli antigeni, delle cellule T della memoria e delle cellule effettrici Th17. I Th17 sono cellule con un potente effetto stimolatore dell'infiammazione e studi condotti su topi da laboratorio confermano che i Th17 siano coinvolti nell'autoimmunità (Newman *et al*, 2005; Spiller, 2007).

## SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare, mediante un'accurata analisi morfo-funzionale, i neuroni del plesso mioenterico e sottomucoso di cane al fine di poter ottenere una mappatura del SNE negli animali senza patologie del tratto gastroenterico definiti "controllo" ed una valutazione negli animali in corso di due particolari patologie.

Il progetto sperimentale viene quindi suddiviso in due fasi che verranno affrontate separatamente:

- Fase 1) nella prima fase, sono state eseguite reazioni di immunistochemica con il fine di caratterizzare, dal punto di vista neurochimico, i neuroni del SNE dell'ileo di cane in animali affetti da patologie gastroenteriche, rispetto ad animali controllo; nello specifico sono stati usati sei diversi anticorpi diretti contro i seguenti marcatori neuronali: HuC/HuD (Hu), CGRP, SP, nNOS, VIP e Calbindina.

- Fase 2) nella seconda fase, sono state eseguite reazioni di immunistochemica al fine di valutare la variabilità dei neuroni del SNE dell'atro pilorico e dell'ileo di cane in animali affetti da diabete mellito di tipo I, rispetto ad animali controllo; nello specifico sono stati usati due diversi anticorpi diretti contro i seguenti marcatori neuronali: Hu e nNOS.

Per lo studio anatomico sono state utilizzate, in entrambi i casi, tecniche istologiche "classiche" e tecniche di immunistochemica rispettivamente su sezioni di tessuto incluse in paraffina e su criosezioni.

## FASE 1)

### MATERIALI E METODI

#### Preparazione dei tessuti

Per il primo progetto di ricerca sono stati utilizzati tessuti di ileo di n° 13 cani senza distinzione di sesso, razza o età. Sono stati creati due gruppi: un gruppo costituito da tessuti prelevati da n° 5 cani controllo (CTRL) definiti tali in quanto assenti segni clinici riferibili a patologie gastrointestinali o alterazioni macroscopiche e microscopiche confermate all'esame anatomopatologico; un altro gruppo caratterizzato da n° 8 cani definiti patologici (PATOL) in quanto presenti segni clinici e sintomi gastroenterici o alterazioni macroscopiche e microscopiche confermate all'esame anatomopatologico.

Di seguito vengono riportate le tabelle, Tabella 1 e Tabella 2, che riassumono le informazioni inerenti alla razza, sesso, età e causa di decesso/eutanasia degli animali sottoposti ad indagine. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare, mediante un'accurata analisi morfo-funzionale, i neuroni del plesso mioenterico e sottomucoso di cane al fine di poter ottenere una mappatura del SNE negli animali sani definiti "controllo" ed una valutazione negli animali in corso di patologie infiammatorie intestinali.

Cane	Razza	Sesso	Età	Causa del Decesso
CTRL 1	PT	M	10 anni	Eutanasia a seguito di grave e progressivo deterioramento fisico
CTRL 2	PT	M	10 anni	Neoplasia cardiaca
CTRL 3	BOXER	M	8 anni	Patologia cardiovascolare
CTRL 4	PT	M	10 anni	Patologia cardiovascolare
CTRL 5	CHIHUAUHA	F	8 mesi	Trauma cranico

*Tabella 1: Segnalamento e causa di decesso dei soggetti che sono stati inclusi nello studio.*

*Abbreviazioni: CTRL, Controllo; M, Maschio; F, Femmina.*

Cane	Razza	Sesso	Età	Causa del Decesso
PATOL 1	METICCIO	F	8 mesi	Patologia degenerativa neurologica ed enterite catarrale
PATOL 2	CORSO	M	6 anni	Neoplasia cardiaca
PATOL 3	ALANO	F	2 anni	Peritonite ed enterite secondaria a torsione gastrica
PATOL 4	HOWAWART	M	11 anni	Mielopatia degenerativa
PATOL 5	PASTORE BELGA	M	9 anni	Eutanasia per paraplegia
PATOL 6	GOLDEN RETRIEVER	M	8 anni	Neoplasia bulbo olfattivo
PATOL 7	METICCIO	F	11 anni	Cushing non trattato, Mastocitoma
PATOL 8	METICCIO	F	8 anni	Grave edema polmonare e PLE

*Tabella 2: Segnalamento e causa di decesso dei soggetti che sono stati inclusi nello studio. Abbreviazioni: Patol, Infiammato; M, Maschio; F, Femmina.*

Tutti i tessuti sono stati ottenuti da animali deceduti per morte naturale o sottoposti ad eutanasia per gravi patologie e condizioni cliniche irreversibili e a seguito di consenso informato da parte dei proprietari. In accordo con la Direttiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo e con la delibera del concilio del 22 settembre 2010 in ambito della protezione degli animali usati a fini scientifici, la legislazione italiana (D. Lgs. N. 26/2014) non richiede nessuna approvazione da parte del Comitato Etico.

Per ogni animale è stato prelevato il pacchetto gastro-intestinale per intero entro due ore dal decesso (onde evitare alterazioni legate ai fenomeni di autolisi *post-mortem*) a seguito di taglio laparatomico dal processo xifoideo dello sterno alla regione pubica. Sono state valutate le caratteristiche macroscopiche degli organi addominali prima del loro isolamento (presenza di versamento, aderenze, fibrina,

reattività dei tessuti ecc). Una volta posizionato su tavolo settorio sono stati identificati e riconosciuti i vari tratti dell'apparato digerente, ed è stato isolato l'ileo, che è stato sezionato longitudinalmente lungo il margine mesenterico e prelevato un campione di circa 3/4 cm di lunghezza. Il campione è stato adagiato, con la mucosa rivolta verso l'alto, su pezzettini di legno di balsa e fissato al supporto tramite l'utilizzo di spilli in ottone. L'intestino dei cani controllo non presentava apparenti alterazioni a livello di mucosa come iperemia o lesioni infiammatorie, mentre, l'ileo dei cani affetti da patologie gastroenteriche mostrava segni di iperemia della mucosa ed alterazioni della sierosa (reattività).

Immediatamente i campioni sono stati fissati per 12 ore in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato (0,1M, pH 7,2) a 4°C. I tessuti sono stati in seguito risciacquati *overnight* in PBS (0,15M NaCl in 0,01M di tampone sodio fosfato, pH 7,2) e stoccati a 4°C in PBS contenente saccarosio (30%) e sodio azide (0,1%). Il giorno seguente i campioni sono stati trasferiti in una soluzione di PBS-Saccarosio-Azide e *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Sakura Finetek Europe, Alphen an den Rijn, The Netherlands) in rapporto 1:1 per altre 24 ore prima di essere immersi in OCT al 100% in vaschette di plastica per congelamento (Cryomold, Sakura Finetek Europe). I tessuti sono stati congelati utilizzando 2-metil-butano (isopentano) raffreddato in azoto liquido. Criosezioni longitudinali (2.0 cm x 0.5 cm) e tangenziali (1.0 cm x 1.0cm) seriate (16µm di spessore), ottenute al criostato, sono state montate su vetrini gelatinizzati. Le sezioni ottenute, prive di coprioggetto, successivamente sono state stoccate a -80°C in attesa delle successive analisi (IHC).

Per quanto riguarda i campioni che sono stati prelevati per l'esecuzione di tecniche istologiche classiche, a seguito del prelievo i campioni sono stati inclusi e fissati per 24-48 h in soluzione di BOUIN. A seguire sono stati inclusi in paraffina e sottoposti a taglio per ottenere delle sezioni di 4-6 micrometri di spessore. Di conseguenza i vetrini sono stati preparati e sparaffinati per l'esecuzione della colorazione istologica

classica Ematossilina-Eosina. Tali campioni di animali controllo e patologico, sono stati sottoposti alla valutazione anatomo-patologica per conferma di uno stato di alterazione infiammatoria dei tessuti sottoposti allo studio, Tabella 3

<b>Cane</b>	<b>Referto Anatomopatologico</b>
Patol 1	
Patol 2	
Patol 3	
Patol 4	Enterite linfoplasmocitaria cronica moderata
Patol 5	Enterite eosinofilica cronica
Patol 6	Enterite linfoplasmocitaria cronica grave
Patol 7	Enterite linfoplasmocitaria ed eosinofilica moderata
Patol 8	Enterite linfoplasmocitaria cronica grave/ Linfoma intestinale mucosale

*Tabella 3: Referti dell'esame istologico eseguito dal dipartimento di Anatomia patologica (Prof. Bettini) dell'ileo dei soggetti con infiammazione del tratto gastrointestinale che sono stati inclusi nello studio e sui cui sono state eseguite le reazioni di immunoistochimica. Nell'ileo dei soggetti di controllo non è stato rilevato alcun tipo di infiltrato infiammatorio (quadro istologico nella norma).*

## IMMUNOISTOCHIMICA

Utilizzando la metodica di immunofluorescenza indiretta si è eseguito uno studio di doppia marcatura. Per abbattere il *background* (colorazione di fondo), grazie ai risultati di studi preliminari sulla stessa specie, si è deciso di utilizzare, nella pre-incubazione e in tutte le soluzioni anticorpali, siero normale al 20% ottenuto dalla specie animale da cui proveniva l'anticorpo secondario. Le criosezioni, dopo lavaggi in PBS (3 x 10 min), venivano pre-incubate con una soluzione composta da PBS,

normal goat serum al 10%, Triton X-100 all'1% (favorisce la permeabilizzazione del tessuto agli anticorpi), BSA per un'ora a temperatura ambiente (RT). I tessuti sono stati successivamente incubati in camera umida per 24 ore RT con una soluzione composta dall'anticorpo primario mouse anti-HuC/HuD associato a:

- ✓ Mouse anti-nNOS;
- ✓ Rabbit anti-nNOS;
- ✓ Rat anti-SP;
- ✓ Rabbit anti-CGRP
- ✓ Rabbit anti-VIP
- ✓ Rabbit anti-Calbindina Tabella 4 e Tabella 5

ANTICORPO PRIMARIO	CODICE	SPECIE	DILUIZIONE FINALE	DITTA PRODUTTRICE
HuC/HuD	A21271	Mouse	IHC 1:200	Molecular Probes
nNOS	sc-5302	Mouse	IHC 1:80	Santa Cruz
CGRP	C8198	Rabbit	IHC 1:5000	Sigma-Aldrich
SP	10-S15A	Rat	IHC 1:400	Fitzgerald
Calbindina D-28K	CB-38A	Rabbit	1:2000	Swant
VIP	7913	Rabbit	1:2500	Sternini UCLA

**Tabella 4:** primari utilizzati, codice specie, relative diluizioni e ditta produttrice

ANTICORPO SECONDARIO	CODICE	SPECIE	DILUIZIONE FINALE	DITTA PRODUTTRICE
Anti- mouse IgG Alexa Fluor	A11005	Goat	IHC 1:200	Molecular Probes
Anti –mouse IgG 488	20010	Donkey	IHC 1:100	Biotium
Anti- rabbit IgG FITC	401314	Goat	IHC 1:200	Calbiochem- Novabiochem
Anti- rat IgG ALEXA Fluor	A21209	Donkey	IHC 1:50	Molecular Probes
Anti- rabbit IgG ALEXA Fluor	AB150132	Goat	IHC 1:200	Molecular Probes
Anti- rat IgG ALEXA Fluor	20023	Goat	IHC 1:100	Biotium
Anti-mouse IgG 488	20010	Goat	IHC 1:200	Biotium

Tabella 5: Anticorpi secondari utilizzati, codice specie, relative diluizioni e ditta produttrice

Dopo lavaggio in PBS (3 x 10 min), i preparati venivano incubati per 3 ore in camera umida a RT con una soluzione contenente gli anticorpi secondari associati nel seguente modo: (Tabella 1b). Infine dopo 3 x 10 min lavaggi in PBS i preparati sono stati montati con vetrino coprioggetto utilizzando il montante tampone glicerolo pH 8.6 e DAPI.

Le sezioni sono state quindi incubate *overnight* in camera umida a RT in una miscela di due anticorpi primari elencati nella Tabella 2.

#### OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Le criosezioni sono state osservate con un microscopio *Nikon Eclipse Ni* equipaggiato con appositi filtri per l'immunofluorescenza. Le immagini sono state

acquisite mediante la camera DQ-Qi1Nc ed elaborate tramite il programma NIS Elements BR 4.20.01 (*Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands*).

## CARATTERIZZAZIONE E SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI PRIMARI

Gli anticorpi primari sono stati tutti caratterizzati mediante precedenti esperimenti di specificità basati su immunoblocking su tessuti di varie specie animali, sia mediante *western blot*. La specificità di alcuni anticorpi utilizzati in questa ricerca, (mouse anti nNOS, rabbit anti nNOS) sono stati testati mediante l'analisi Western Blot, che ha indicato la loro specificità per i tessuti di cane mentre gli altri (Mouse anti HuC/HuD, rat anti SP, rabbit anti VIP, rabbit anti CGRP, rabbit anti Calbindina) sono già stati precedentemente testati da altri autori.

Per quanto riguarda la specificità dell'anticorpo monoclonale rat anti SP (utilizzato ad una diluizione di 1:400; Fitzgerald Industries International, INC, Chelmsford, Mass., USA) non ha mostrato crossreattività nei confronti di Leu o Met- ENK, somatostatina o b-END e come riportato nell'articolo Talmage et al., 1995 è risultato specifico. L'anticorpo inoltre è in grado di rilevare la neurochinina A. Perciò probabilmente l'immunoreattività rilevata con questo anticorpo rappresentava i siti di espressione della preprotachichinina mRNA b-PPT-A e g-PPT-A che solitamente risulta in maggior parte espressa dai neuroni periferici e con il quale codifica sia per la SP che per la Neurochinina A (Krause *et al*, 1987; McCarson and Krause 1994; Sternini 1991).

In merito alla specificità dell'anticorpo monoclonale Rabbit anti-VIP ( #7913), è stata utilizzata una diluizione finale 1:2500. Questo anticorpo è stato fatto reagire verso una coppia di Vip sintetico e l'emocianina; in radioimmunologia ha mostrato la maggior affinità per la parte C-terminale del VIP (Furness *et al*, 1981).

L'immunoreattività con l'anticorpo non si verifica quando l'anticorpo viene pre-assorbito a 1.0mM del peptide attivato adenilato ciclasasi pituitaria, ma viene a mancare quando l'anticorpo è pre-assorbito con 1.0mM del peptide VIP (Wells *et al*, 1995).

Per quanto riguarda la specificità dell'anticorpo monoclonale rabbit anti Calb (utilizzato ad una diluizione di 1:2000; Swant) è già stata precedentemente testata su tessuto di cane da Hoon *et al*, 2010.

La specificità dell'anticorpo monoclonale rabbit anti Calb (utilizzato ad una diluizione di 1:5000; Sigma-Aldrich) è stata precedentemente testata da Sternini *et al*, 1992.

## WESTERN BLOTTING

I tessuti campionati sono stati congelati in azoto liquido, stoccati a -80°, successivamente scongelati e sottoposti ad omogeneizzazione. La componente proteica è stata estratta utilizzando un reagente che permette di estrarre le proteine dai tessuti T-PER in presenza di una soluzione che inibisce l'attività delle proteasi (Thermo Scientific, Italy, Europe), in accordo con le istruzioni del produttore. La quantificazione della componente proteica è stata ottenuta mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Italy, Europe). Ogni aliquota conteneva 50 ug di proteine denaturate e riscaldate a 95°C per 5 minuti in tampone Laemmli, separate attraverso SDS-PAGE (12,5% per testare la specificità HuC/HuD e 7,5% per testare quella nNOS), fatte migrare all'interno di membrane di nitrocellulosa (GE Healthcare, UK, Europe). Dopo il trattamento con il blocco, le membrane sono state incubate a 4°C per una notte con l'anticorpo primario diluito in soluzione Tris tamponante salina T20 (TBS-T20 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 125 0.1% T-20) . Dopo i lavaggi, ogni pozzetto è stato messo in incubazione

con i rispettivi anticorpi secondari. Le bande immunoreattive sono state visualizzate utilizzando substrato chemiluminescente (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, Italy, Europe). L'intensità del segnale di luminescenza è stata acquisita mediante C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner using Image Studio Digits Software Ver 3.1(LI-COR Biotechnology, UK, Europe). Per l'anticorpo HuC/HuD, due bande di ~42 kDa e ~40 kDa sono state evidenziate (theoretical molecular weight 41,770 kDa for HuD and 39,547 kDa for HuC, respectively) (<http://www.uniprot.org/>)

La banda relativa all'anticorpo di nNOS mostrava un peso di ~155 kDa nell'ileo (theoretical molecular weight 160,970) kDa. Quella dell'anticorpo monoclonale (mouse anti nNOS) era molto più chiara e definita rispetto a quella ottenuta dall'anticorpo policlonale (rabbit anti nNOS); a seguito della perfetta co-localizzazione dei due anticorpi anti nNOS nel siero utilizzato, abbiamo considerato quindi utilizzabile per questa ricerca, l'anticorpo policlonale.

#### CARATTERIZZAZIONE E SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI SECONDARI

La specificità degli anticorpi secondari è stata valutata applicandoli sul tessuto senza la presenza degli anticorpi primari. In seguito all'omissione degli anticorpi primari non vi sono state marcature di fibre e pirenofori.

Nei protocolli di doppia marcatura sono stati eseguiti anche esperimenti di controllo per verificare l'eventuale presenza di legami non specifici degli anticorpi secondari con gli anticorpi primari omettendo entrambi gli anticorpi primari. Per escludere eventuali *cross*-reattività tra gli anticorpi primari e secondari si è eseguito un ulteriore esperimento incubando il tessuto con due anticorpi primari seguiti da un solo anticorpo secondario. Infine, è stata eseguita la stessa procedura incubando ciascun anticorpo primario con l'anticorpo secondario appropriato, per assicurare che il *pattern* di marcatura per ogni anticorpo nelle sezioni doppiamente marcate

fosse in accordo con quello osservato nelle sezioni a singola marcatura. Non è stata trovata prova di legami aspecifici. La specificità degli anticorpi secondari è stata testata come descritto in un precedente lavoro (Sadeghinezhad *et al*, 2013).

#### ANALISI QUANTITATIVA

Per l'analisi quantitativa, sono stati sottoposti a valutazione numerica i neuroni MP su sezioni tangenziali e i neuroni SMP su sezioni longitudinali di ileo per ogni singolo marker indagato

Dopo la doppia marcatura eseguita utilizzando anticorpi HuC/HuD e mouse anti-nNOS, HuC/HuD e rat anti-SP, HuC/HuD e rabbit anti-CGRP, HuC/HuD e rabbit anti-VIP, HuC/HuD e rabbit anti-Calb su sezioni tangenziali e longitudinali sono stati contati il numero totale dei neuroni immunoreattivi nNOS-IR, SP-IR, CGRP-IR, VIP-IR e Calb-IR e il loro rapporto sul totale dei neuroni HuC/HuD sono stati espressi in percentuale  $\pm$  deviazione standard.

Per ogni animale sono stati valutati e contati almeno 100 neuroni per ogni marcatore utilizzato, in ogni combinazione di doppia marcatura.

#### ANALISI STATISTICA

La percentuale dei neuroni CGRP, VIP, nNOS, Calb, SP-IR sul totale di neuroni HuC/HuD-IR quantificati nei cani affetti da patologie gastroenteriche, sono stati comparati a quelli rilevati nei cani controllo.

In accordo con la distribuzione Gaussiana (Kolmogorov-Smirnoff test), i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software commerciale statistico (Graphpad Prisma 5 per Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data la presenza di due gruppi non omogenei (animali patologici e controlli), l'analisi statistica è stata effettuata mediante l' *unpaired t-test* per valori parametrici. Il livello di confidenza è

stato fissato come  $p < 0.05$ . I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (*ds*).

## DENSITA' DELLE FIBRE NERVOSE NELLA MUCOSA E NELLA TONACA MUSCOLARE

Le sezioni longitudinali di tessuto trattato con i vari markers sono stati sottoposti a valutazione densitometrica. Per ottenere tale valutazione sono state eseguite n° 3 foto della mucosa (precisamente su tre diversi villi intestinali), n°3 foto diverse della componente di muscolatura circolare (CML), n° 3 foto diverse della componente di muscolatura longitudinale (LML). Le immagini ottenute sono state sottoposte ad elaborazione tramite il programma Image J (programma di rielaborazione delle immagini scientifiche) che permette di ottenere il valore dell'area (rappresentata dalle fibre immunoreattive), espressa in percentuale sul totale. Il valore definitivo è dato quindi dalla media delle tre percentuali ottenute espresso in percentuale  $\pm$  deviazione standard (*ds*).

Questa valutazione ci permette di confrontare la variazione della percentuale di fibre immunoreattive per ogni *marker*, presenti nei tre distretti indagati e il loro andamento nei soggetti controllo e patologico. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software commerciale statistico (Graphpad Prisma 5 per Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data la presenza di due gruppi non omogenei (animali patologici e controlli), l'analisi statistica è stata effettuata mediante l' *unpaired t-test* per valori parametrici. Il livello di confidenza è stato fissato come  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

Gli studi morfologici e quantitativi sono stati effettuati su criosezioni di ileo ottenuti da 5 cani controllo e 8 cani patologici. E' stato utilizzato l'anticorpo anti-HuC/HuD dal momento che, tale *pan-neuronal marker*, permette di evidenziare solo il pericario neuronale, facilitando così la valutazione numerica dei neuroni immunoreattivi. Nei preparati esaminati i singoli gangli sembrano apparentemente formati dalla fusione di gangli di più piccole dimensioni. I neuroni HuC/HuD-IR si dispongono a formare dei gangli di piccole e grandi dimensioni i quali possono presentare una forma poligonale o allungata.

### NEURONI nNOS IMMUNOREATTIVI

#### CANI CONTROLLO

La percentuale di neuroni nNOS-IR del plesso mioenterico MP di ileo dei cani controllo è risultata pari a  $33\pm 15\%$  (178/639 cellule, n=5)

I neuroni di ileo Hu-IR mostravano una marcatura omogenea senza frammentazione con un'intensità maggiormente concentrata a livello di nucleo rispetto al citoplasma; l'immunoreattività nNOS era fortemente espressa dai pirenofori e dalle fibre nervose. La percentuale di neuroni Hu/nNOS-IR nel plesso sottomucoso nei cani controllo è risultata pari a  $8\pm 5\%$  (40/527 cellule, n=5), Figura 10.

#### CANI PATOLOGICI

La percentuale di neuroni nNOS-IR nel MP dei cani patologici era  $24\pm 5\%$  (528/2031 cellule, n=7) Figura 9 ; quella nel SMP era  $7\pm 2\%$  (69/1007 cellule, n=4), Figura 11.

In un soggetto con sofferenza tissutale, secondaria a patologia infiammatoria in corso, si riscontrano neuroni nNOS-IR che non colocalizzano con neuroni HuC/HuD-IR in quanto in corso di patologia quest'ultimo tendeva a presentare una

nuclealizzazione della marcatura. La fluorescenza nNOS risultava ben mantenuta anche nei patologici con la presenza di un evidente ispessimento perigangliare. La morfologia nNOS-IR risponde al fenotipo Dogiel di tipo I.

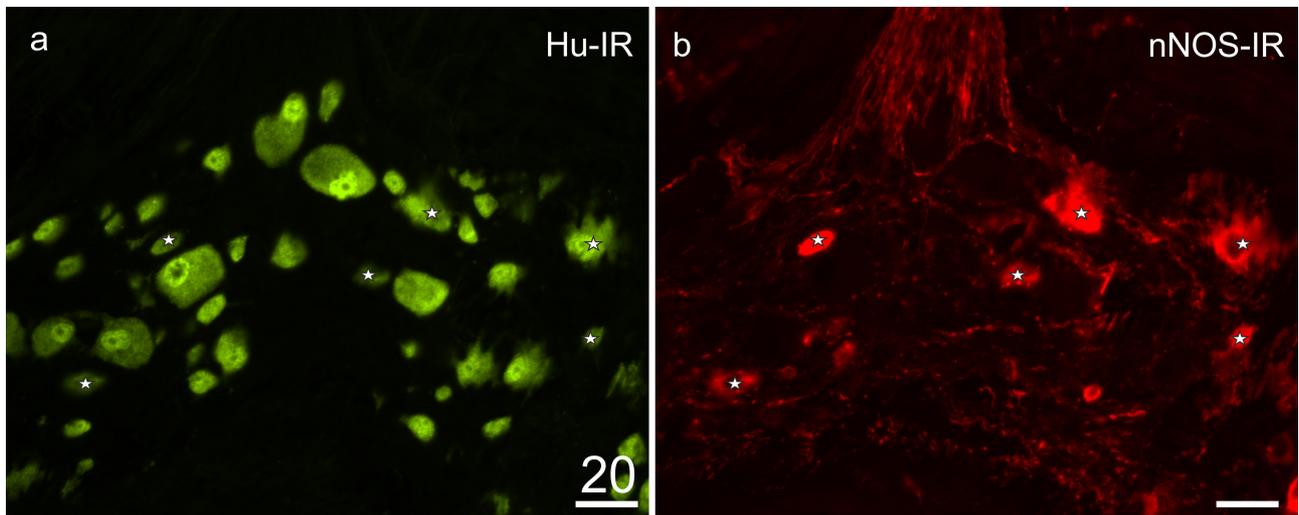


Figura 9: Plesso mieenterico di ileo cane con enteropatia proteinodisperdente (PLE) in cui l'immunoreattività alla proteina Hu (Hu-IR) è ancora ben conservata (a), così come quella per l'enzima ossido nitrico sintasi (nNOS) (b). Le stelle indicano alcuni neuroni Hu-IR che coesprimevano nNOS-IR. Barra= 20 micrometri.

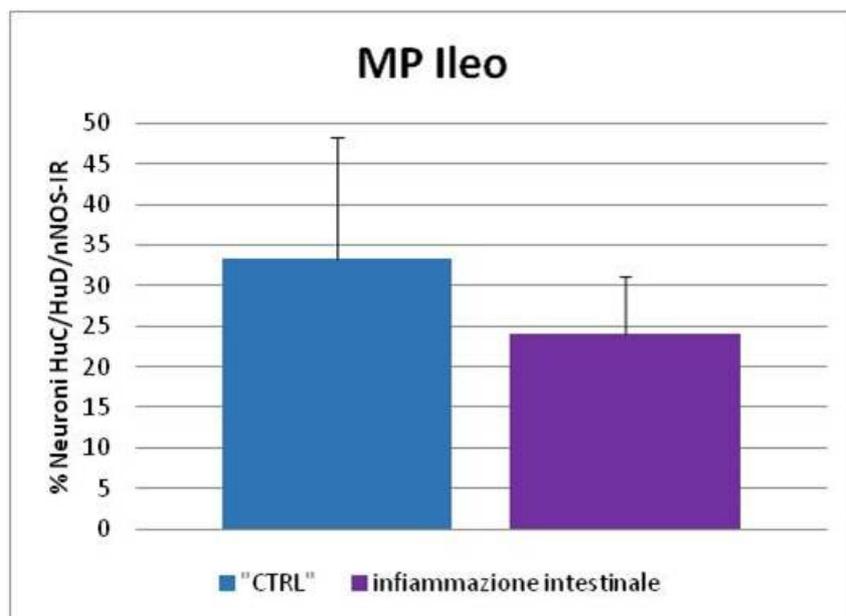


Figura 10: MP ileo, nNOS-IR

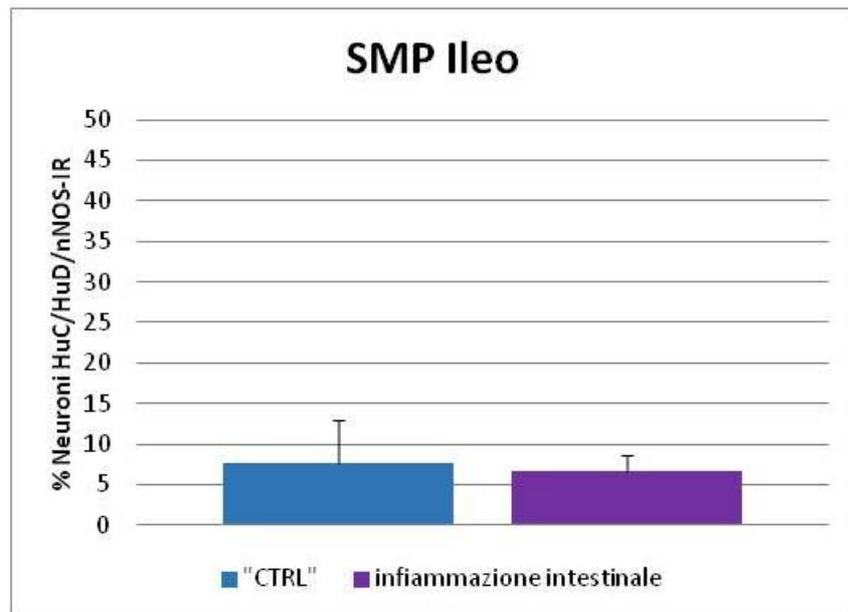


Figura 11: SMP ileo, nNOS-IR

#### DENSITA' DELLE FIBRE nNOS NELL'ILEO DI CANI CONTROLLO VS CANI PATOLOGICI

La quantificazione delle fibre nNOS-IR a livello di mucosa non è stata possibile in quanto la reattività veniva osservata solo a livello di *muscularis mucosae*.

La quantificazione delle fibre nNOS-IR a livello di dello strato di muscolatura circolare (CML) nei soggetti ctrl era di  $1,31 \pm 0,36\%$  (n=4) mentre nei soggetti patol era  $0,89 \pm 0,46\%$  (n=4) (P=0,20, differenza non significativa); nella muscolatura longitudinale (LML) dei ctrl era  $0,29 \pm 0,15\%$  (n=4) mentre nei patol era  $0,24 \pm 0,13\%$  (n=4) (P=0,60, differenza non significativa).

Una rete di fibre nNOS-IR con piccole varicosità è riscontrabile a livello di MP. Nodi di fibre nNOS-IR sono organizzate a formare intrecci di nervi primari, secondari e terziari. Il primo è caratterizzato da fibre che decorrono in ordine parallelo all'asse principale dello strato di muscolatura longitudinale. Questi intrecci di fibre primari sono correlati a intrecci secondari che sono spesso orientati perpendicolarmente. Il terzo intreccio di fibre è orientato sia parallelamente che perpendicolarmente al secondo intreccio.

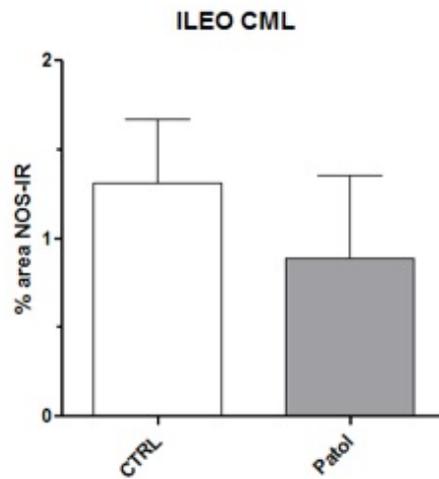


Figura 12: Densità fibre CML NOS-IR

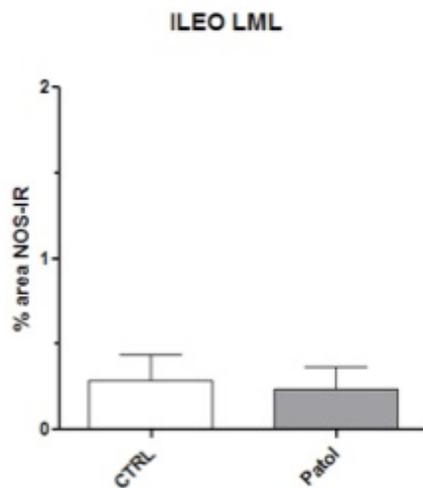


Figura 13: Densità fibre LML nNOS-IR

### NEURONI VIP IMMUNOREATTIVI

#### CANI CONTROLLO

La percentuale di neuroni VIP-IR nel MP è risultata essere nei cani controllo  $6 \pm 4\%$  (69/993 cellule, n=5), Figura 14.

La percentuale di neuroni HuC/HuD/VIP-IR nel SMP è risultata essere nei cani controllo  $29 \pm 8\%$  (300/993 cellule, n=5) Figura 15 . Molte fibre distribuite all'interno del SMP.

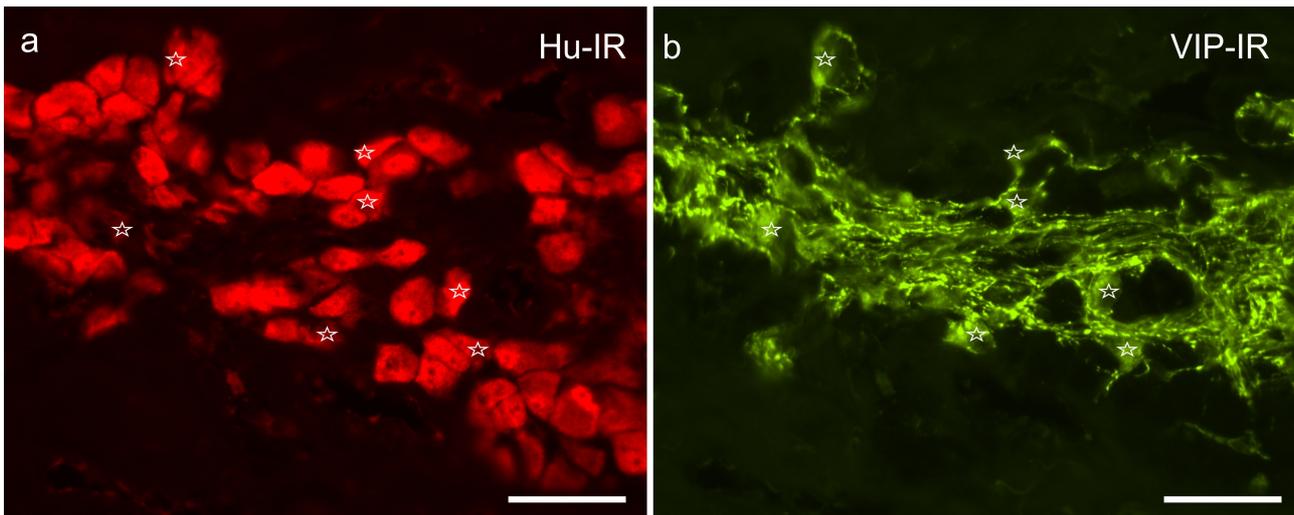


Figura 14: Cane ctrl 3 Hu/VIP-IR. Plesso mioenterico di ileo non affetto da patologia intestinale. a) l'immunoreattività della proteina Hu (Hu-IR) è ben conservata. (b) dettaglio di immunoreattività fibre VIP-R. Le stelle indicano alcuni neuroni marcati Hu-IR attorno ai quali le fibre VIP-IR si dispongono. Barra= 50 micrometri.

#### CANI PATOLOGICI

La percentuale di neuroni HuC/HuD/VIP-IR MP è risultata nei cani controllo pari a  $16, \pm 9\%$  (281/1958 cellule, n=8).

Per quanto riguarda la percentuale SMP nei controlli è risultata  $30 \pm 13\%$  (522/1630 cellule, n=7), Figura 16. Vi è una differenza statisticamente significativa tra la percentuale di neuroni marcati nell' MP dei cani patologici che risulta statisticamente significativa\*.

I gangli si presentavano contenenti un numero maggiore di neuroni-IR rispetto ai cani controllo; all'aspetto morfologico si presentavano con alterazioni e di dimensioni allungate. La reattività risultava maggiormente evidente sui villi, sul SMP e sulla lamina a livello della muscolatura circolare mentre risultava ridotta a differenza dello strato longitudinale. Il morfotipo evidente dei neuroni marcati è stato rappresentato da Dogiel di tipo II. Le fibre VIP-IR risultavano molto presenti in

entrambe le componenti muscolari anche se in maggior quantità a livello della circolare con la presenza di elevatissimi intrecci di fibre.

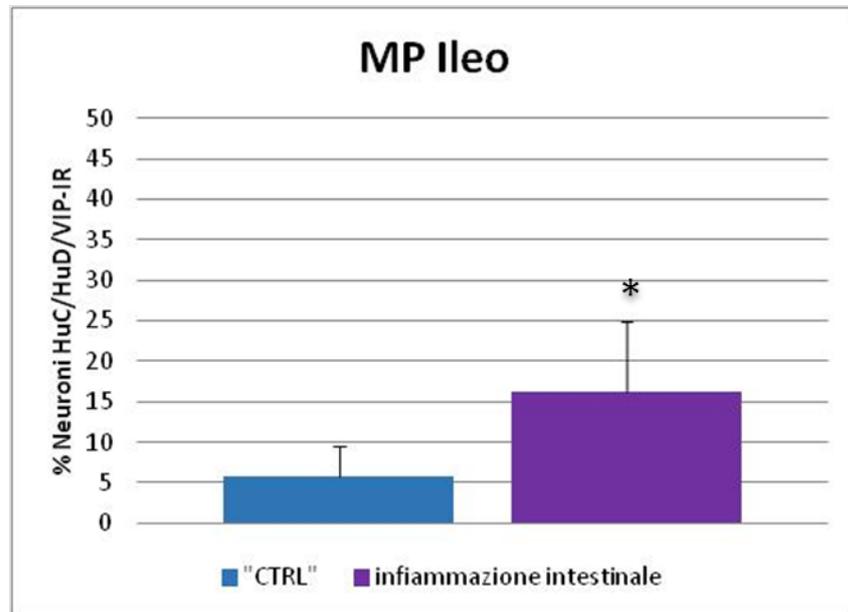


Figura 15: MP ileo, VIP-IR

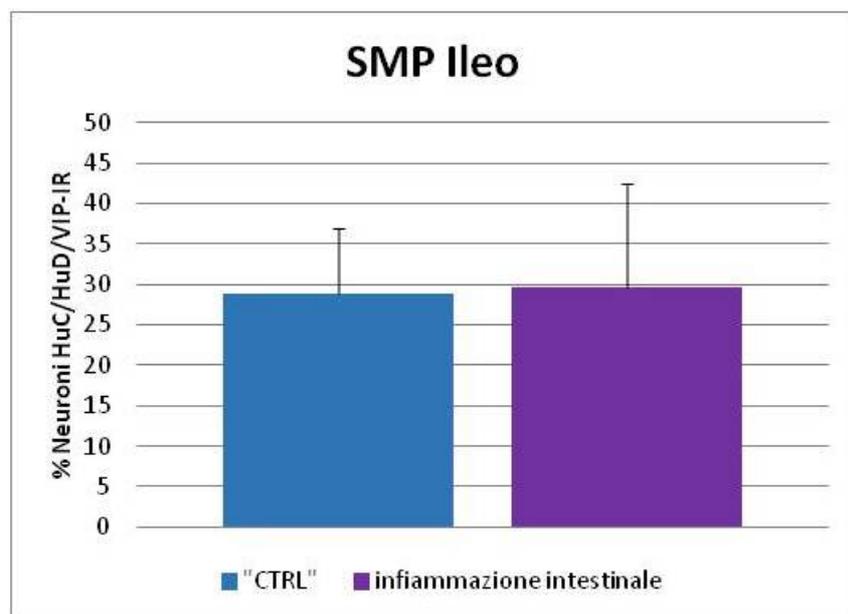


Figura 16: SMP ileo, VIP-IR

#### 1.1.1. DENSITA' DELLE FIBRE VIP NELL'ILEO DI CANI CONTROLLO VS CANI PATOLOGICI

La quantificazione delle fibre VIP-IR a livello dello strato mucoso nei cani ctrl era di  $1,36 \pm 1,20\%$  (n=3) mentre nei cani patol era di  $1,73 \pm 0,65\%$  (n=4) (P=0,61, differenza

non significativa); la quantificazione delle fibre VIP-IR a livello dello strato di muscolatura circolare era di  $0,45 \pm 0,16\%$  (n=3) mentre nei cani patol di  $0,63 \pm 0,61\%$  (n=4) (P=0,59, differenza non significativa); a livello di dello strato di muscolatura longitudinale dei cani ctrl era di  $0,43 \pm 0,04\%$  (n=3) vs mentre nei cani patol era di  $0,45 \pm 0,43\%$  (n=4) (P=0,96, differenza non significativa).

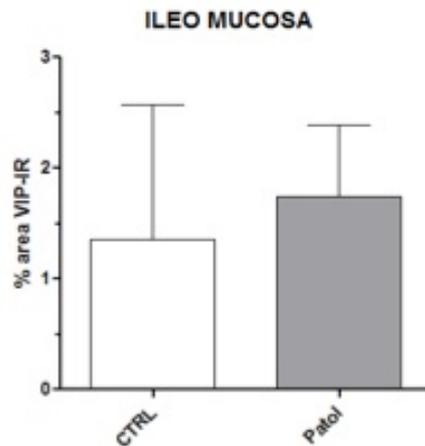


Figura 17: Densità fibre mucosa VIP-IR

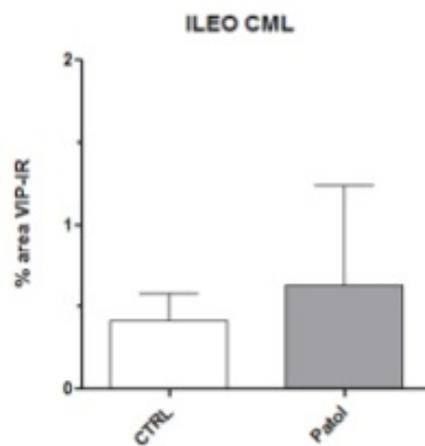


Figura 18: Densità fibre CML VIP-IR

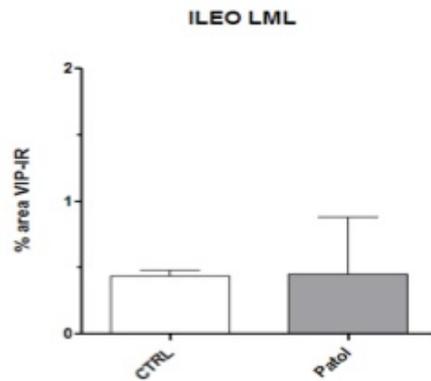


Figura 19: Densità fibre LML VIP-IR

### NEURONI SP IMMUNOREATTIVI

#### CANI CONTROLLO

La percentuale di neuroni SP-IR nel MP è risultata essere nei cani controllo  $15 \pm 8\%$  (209/1332 cellule, n=5), Figura 20. Per quanto riguarda la percentuale SMP è risultata di  $26 \pm 7\%$  (464/1598 cellule, n=5).

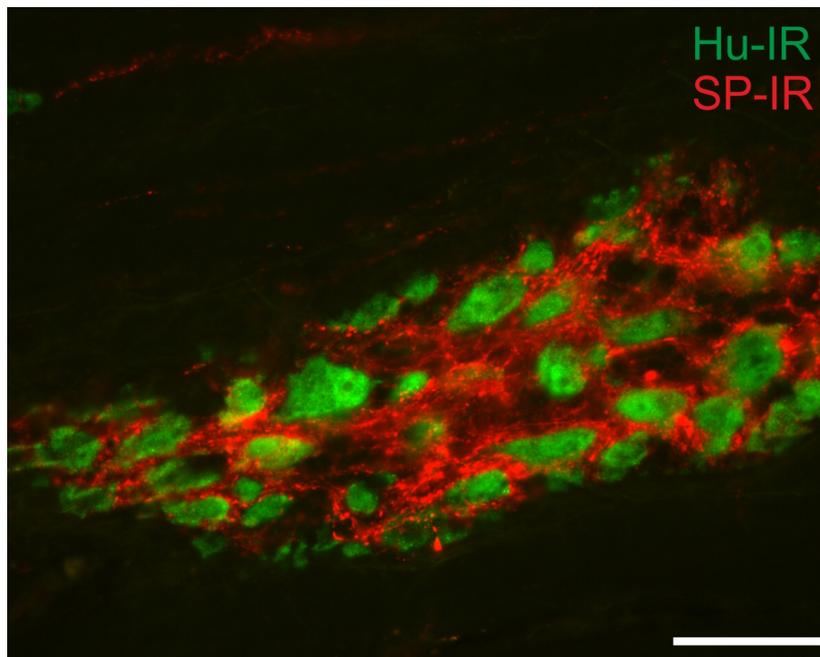


Figura 20: Cane ctrl 3 MP Hu/SP. Sezione tangenz. Merge. Plesso mionterico di cane non affetto da patologia intestinale in cui l'immunoreattività alla proteina Hu (Hu-IR) è ben mantenuta (marcatura in Fitc). Le abbondanti fibre SP-IR si dispongono attorno ai neuroni Hu-IR a formare strutture baskets-like. Barra= 50 micrometri

#### CANI PATOLOGICI

La percentuale di neuroni SP-IR nel MP è risultata nei cani patologici di  $17\pm 9\%$  (437/2053 cellule, n=8), mentre nel SMP di  $24\pm 13\%$  (592/2024 cellule, n=6).

È stata evidenziata una maggioranza di fibre marcate rispetto alla marcatura dei nuclei SP. Le fibre SP-IR si dispongono attorno ai nuclei HuC/HuD-IR creando strutture *baskets-like*. Le fibre SP arrivano ad innervare molto intensamente la porzione più interna della *muscularis mucosae*.

La SP-IR si è riscontrata a livello di MP e SMP e nelle varicosità delle fibre, le quali sono distribuite sulla mucosa, sottomucosa e strati muscolari (soprattutto a livello di muscolatura circolare).

Sono evidenti alcuni neuroni SP positivi immersi in una densa rete di fibre intensamente immunoreattive le quali, partendo dai gangli, tendono a dirigersi alla periferia circondando anche gangli circostanti. Le fibre lungo il loro decorso presentano numerose varicosità e in corrispondenza dei gangli formano numerosi baskets attorno a neuroni immunoreattivi e non immunoreattivi.

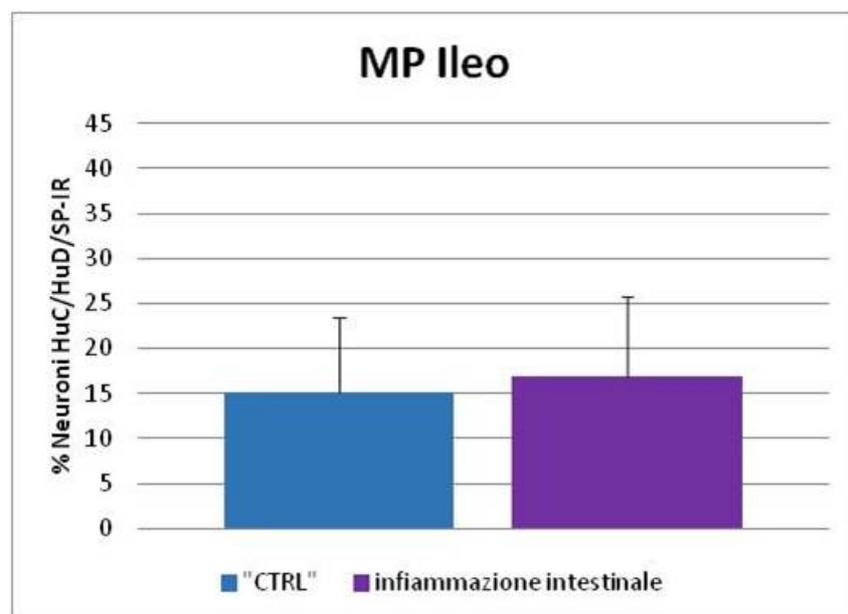


Figura 21: MP ileo, SP-IR

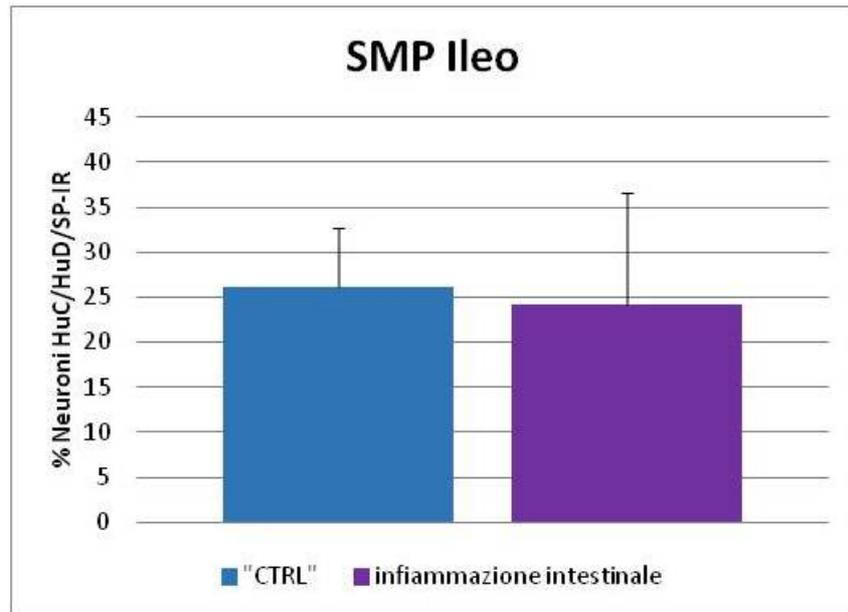


Figura 22: SMP ileo, SP-IR

#### DENSITA' DELLE FIBRE SP NELL'ILEO DI CANI CONTROLLO VS CANI PATOLOGICI

La quantificazione delle fibre SP-IR a livello dello strato mucoso dei cani ctrl era di  $2,50 \pm 1,07\%$  (n=3) mentre nei patol era di  $1,07 \pm 0,01\%$  (n=4) (P=0,04,\* differenza SIGNIFICATIVA); a livello dello strato di muscolatura circolare era nei cani controllo di  $0,24 \pm 0,11\%$  (n=3) mentre nei cani patol era di  $0,21 \pm 0,06\%$  (n=4) (P=0,79, differenza non significativa); mentre nello strato di muscolatura longitudinale era di  $0,16 \pm 0,03\%$  (n=3) nei ctrl mentre nei cani patol era di  $0,16 \pm 0,02\%$  (n=4) (P=0,91, differenza non significativa).

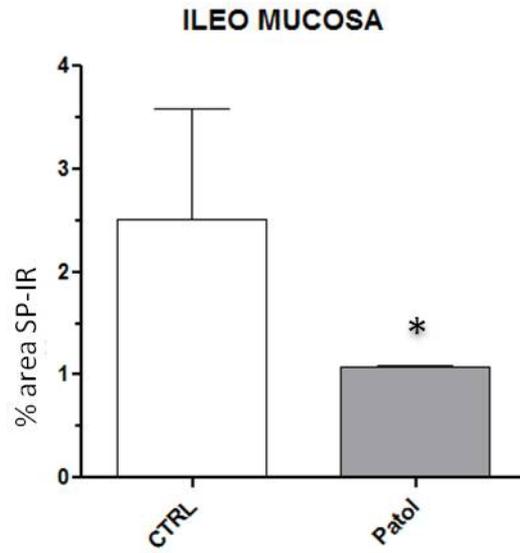


Figura 23: Densità fibre mucosa SP-IR

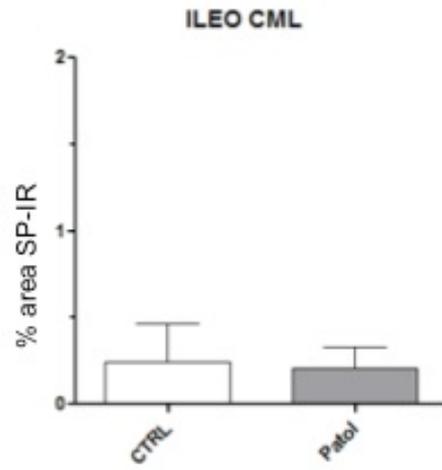


Figura 24: Densità fibre CML SP-IR

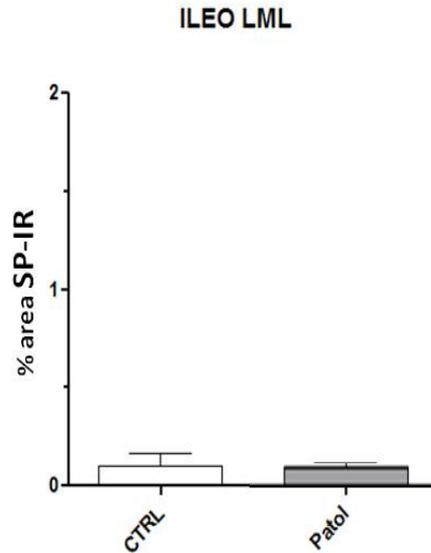
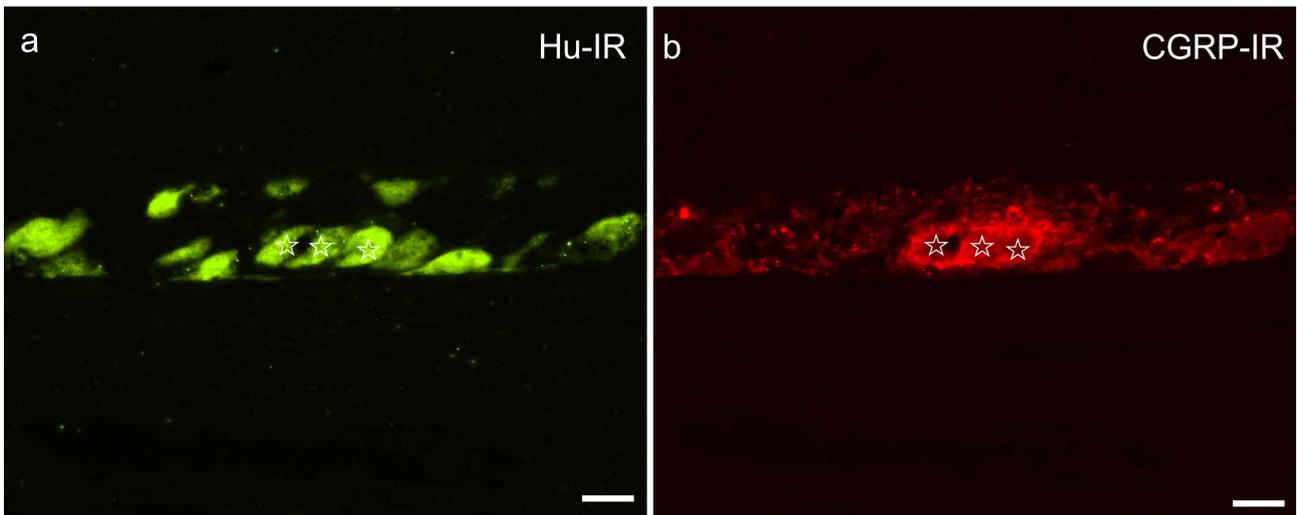


Figura 25: Densità fibre LML SP-IR

### NEURONI CGRP IMMUNOREATTIVI

#### CANI CONTROLLO

La percentuale di neuroni CGRP-IR MP è risultata nei cani controllo di  $8 \pm 9\%$  (41/543 cellule, n=5) Figura 26, per quanto riguarda la percentuale SMP nei controlli di  $7 \pm 8\%$  (32/754 cellule, n=5), le cellule CGRP-IR appartenengono al morfotipo Dogiel di tipo II perciò sono neuroni sensitivi IPANs; questo tipo di neuroni provvede a fornire una buona innervazione alla mucosa ed ai gangli enterici ed una scarsa innervazione a livello dello strato muscolare circolare e longitudinale. Si distribuisce attorno ai neuroni formando strutture baskets-like Figura 27.



*Figura 26: Cane ctrl Chihuahua MP sezione longitudinale. Plesso mioenterico di cane non affetto da patologia infiammatoria. a) l'immunoreattività alla proteina Hu (Hu-IR) è ancora ben conservata b) così come quella per il CGRP. Le stelle indicano alcuni neuroni Hu-IR che coesprimevano CGRP-IR. Notare le fibre CGRP-IR che si dispongono attorno ai neuroni Hu-IR a formare strutture baskets-like. Barra= 20 micrometri.*

#### CANI PATOLOGICI

La percentuale di neuroni CGRP-IR MP è risulta nei cani patologici pari a  $16 \pm 11\%$  (259/1444 cellule, n=8), mentre nel SMP di  $14 \pm 12\%$  (194/1138 cellule, n=7), Figura 28. La CGRP-IR risultava maggiormente espressa nei patologici ma unicamente a livello mucosale e non dello strato circolare e longitudinale.

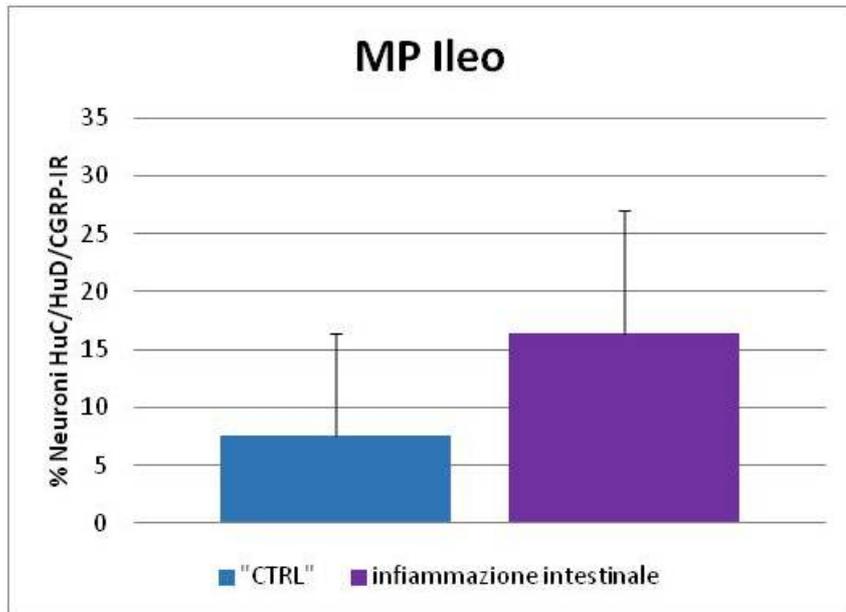


Figura 27: MP ileo, CGRP-IR

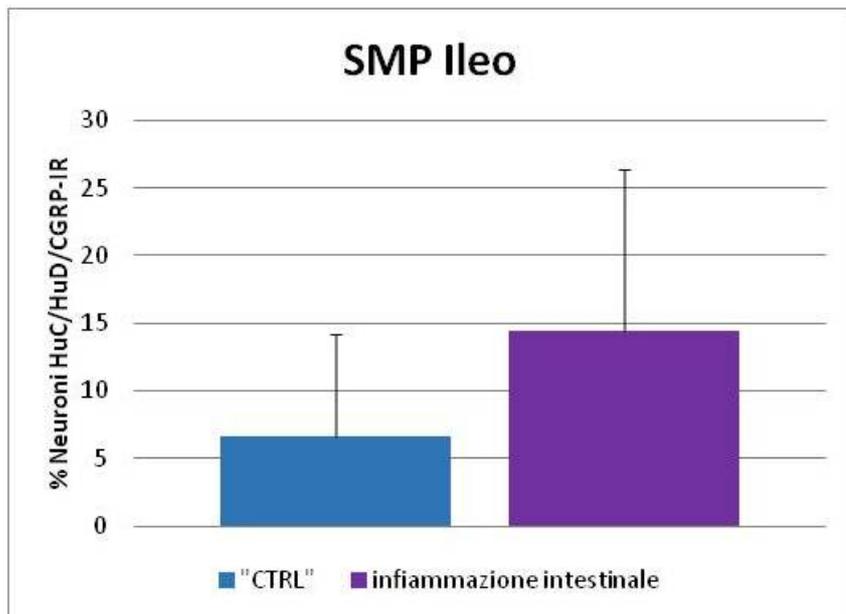


Figura 28: SMP ileo, CGRP-IR

#### DENSITÀ DELLE FIBRE CGRP NELL'ILEO DI CANI CONTROLLO VS CANI PATOLOGICI

La quantificazione delle fibre CGRP-IR a livello dello strato mucoso nei cani ctrl era di  $2,05 \pm 0,96\%$  (n=4) mentre nei patol era di  $1,03 \pm 0,41\%$  (n=4) (P=0,09, differenza non significativa); la quantificazione a livello di strato di muscolatura circolare nei cani ctrl era di  $0,23 \pm 0,26\%$  (n=4) mentre nei cani patologici il dato non è stato rilevato in quanto non sono state evidenziate fibre-IR; a livello dello strato di muscolatura

longitudinale era nei cani ctrl di  $0,2 \pm 0,2\%$  (n=4) ed anche qui nei patologici le non risultavano fibre-IR.

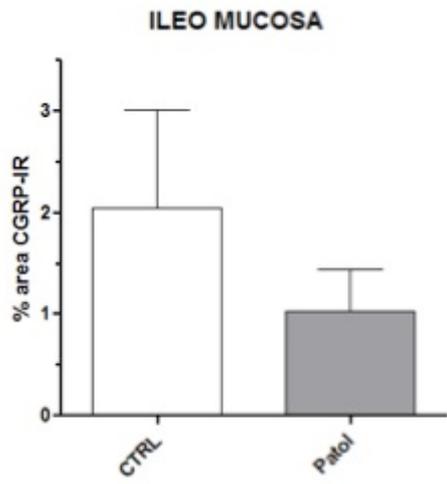


Figura 29: Densità fibre mucosa CGRP-IR

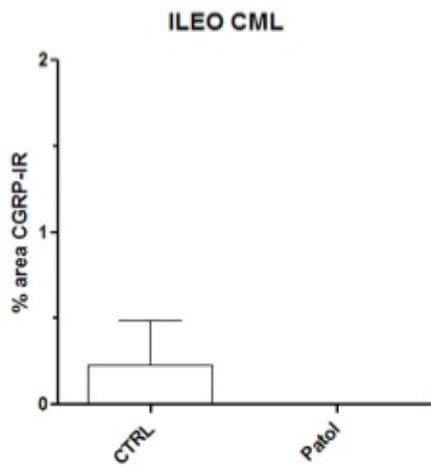


Figura 30: Densità fibre CML CGRP-IR

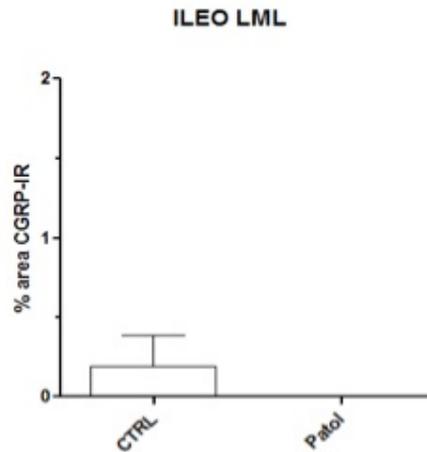


Figura 31: Densità fibre LML CGRP-IR

### NEURONI CALB IMMUNOREATTIVI

#### CANI CONTROLLO

Nei cani controllo la percentuale di neuroni Calb-IR MP è risultata di  $14 \pm 9\%$  (76/580 cellule, n=5), Figura 32. Per quanto riguarda la percentuale SMP nei controlli è risultata  $21,6 \pm 7,4\%$  (218/975 cellule, n=5),

Da un punto morfologico si evidenziano caratteristiche ascrivibili a neuroni DOgiel di tipo II. L'immuoreattività nei cani controllo è distribuita principalmente nella muscolatura circolare e molto meno nella longitudinale. A livello di mucosa la marcatura delle fibre Calb positive era molto rappresentata soprattutto all'interno dei villi; la marcatura risultava evidente soprattutto a carico delle cellule enterocromaffini e si disponeva anche attorno alle cripte della mucosa. Allo stesso modo la sottomucosa presentava discreta presenza di fibre-IR. La marcatura dei corpi cellulari risultava molto presente a livello di MP rispetto a SMP.

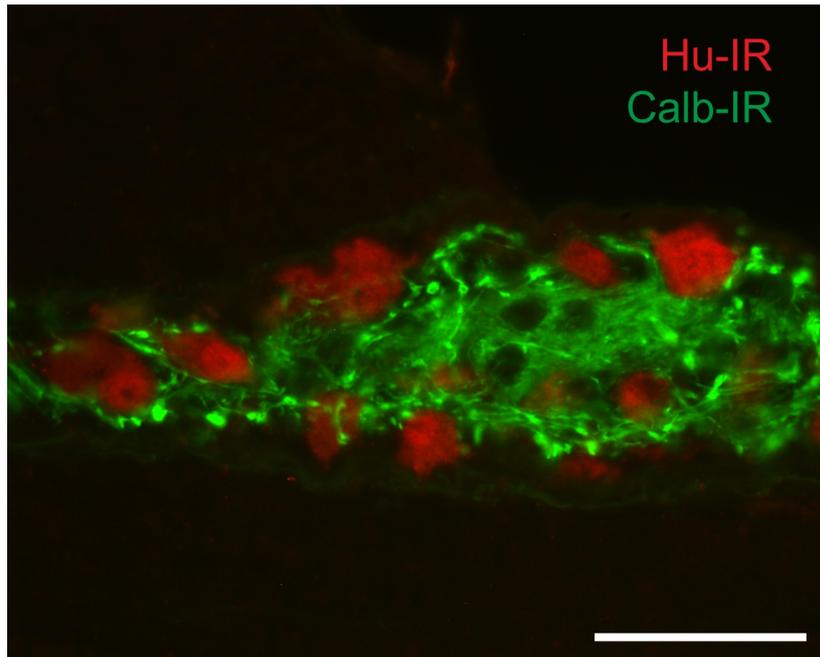


Figura 32: Plesso mieenterico di cane in assenza di patologia infiammatoria. Sezione tangenziale. Merge. L'immunoreattività alla proteina Hu (Hu-IR Tritc) è ancora ben conservata, le fibre CALb-IR, molto presenti, si dispongono uniformemente in tutto il ganglio nervoso e attorno a neuroni Hu-IR. Barra= 50 micrometri.

#### CANI PATOLOGICI

La percentuale di neuroni Calb-IR è risultata nei patol di  $16\pm 7\%$  (324/2055 cellule, n=8), mentre nel SMP di  $23\pm 7\%$  (261/1207 cellule, n=7), Figura 34

Nei cani patologici, la morfologia dei neuroni calb-ir risulta alterata con un allungamento della forma del nucleo.

In questi animali patologici la Calb-IR risultava molto sviluppata a livello dello strato sottomucoso con fibre che raggiungevano la mucosa e la *muscularis mucosae*, marcando le cellule enterocromaffini. La marcatura era molto limitata nello strato muscolare (minore a livello di strato longitudinale rispetto a quello circolare).

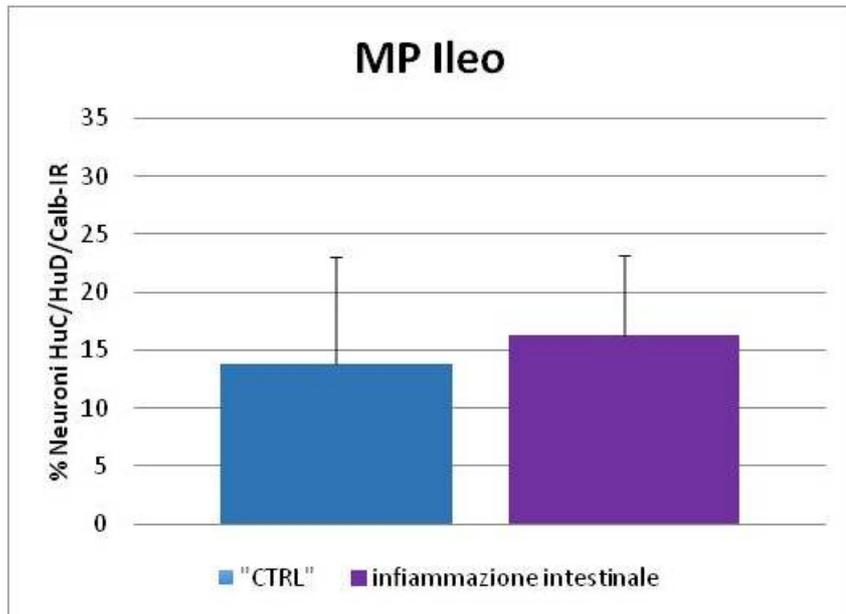


Figura 33: MP ileo, Calb-IR

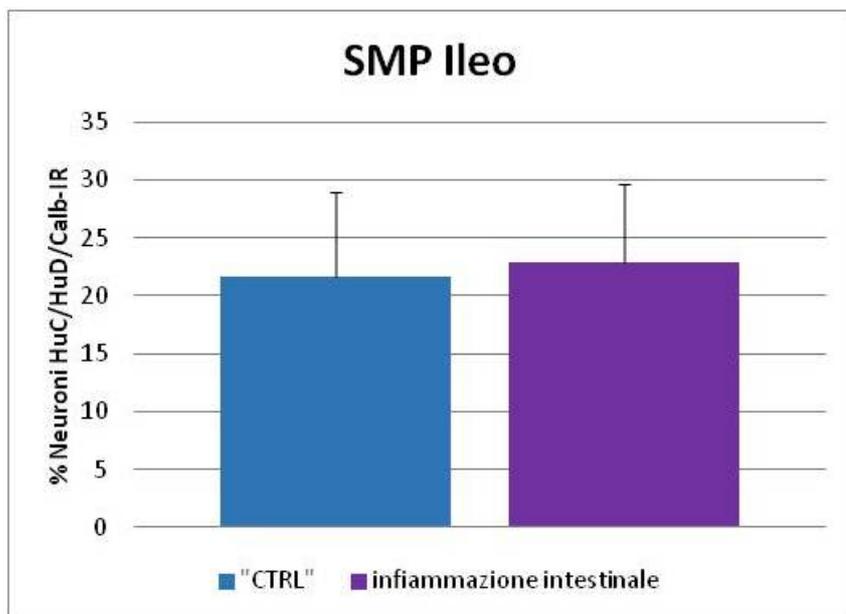


Figura 34: SMP ileo, Calb-IR

#### DENSITA' DELLE FIBRE CALB NELL'ILEO DI CANI CONTROLLO VS CANI PATOLOGICI

La quantificazione delle fibre Calb-IR a livello dello strato mucoso nei cani ctrl è risultata di  $0,72 \pm 0,36\%$  (n=4) mentre nei cani patol di  $0,54 \pm 0,32\%$  (n=4) (P=0,49, differenza non significativa); a livello dello strato di muscolatura circolare nei cani controllo la percentuale era di  $0,15 \pm 0,11\%$  (n=3) mentre nei cani patol era di  $0,24 \pm 0,24\%$  (n=3) (P=0,65, differenza non significativa); la quantificazione delle fibre a livello dello strato longitudinale dei cani controllo era di  $0,10 \pm 0,06\%$  (n=3) mentre

nei patol era di  $0,05 \pm 0,06\%$  ( $n=3$ ) ( $P=0,36$ , differenza non significativa)., Figura e  
Figura 35

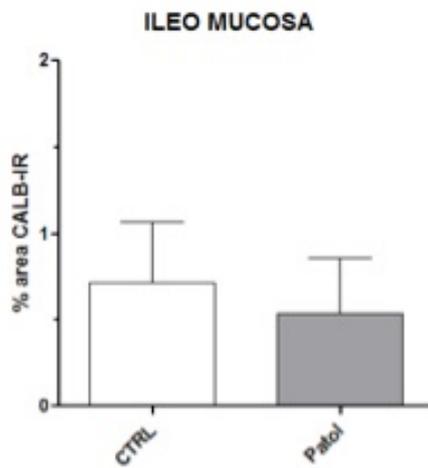


Figura 35: Densità fibre mucosa CALB-IR

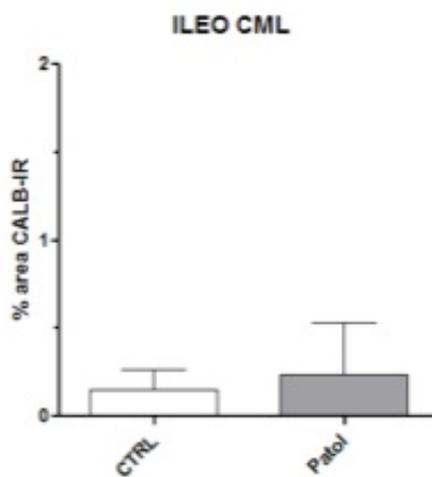


Figura 36: Densità fibre CML CALB-IR

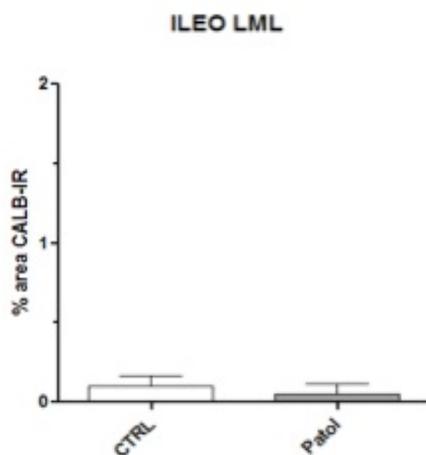


Figura 37: Densità fibre LML CALB-IR

## DISCUSSIONE

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di descrivere le caratteristiche morfologiche e neurochimiche dei neuroni del plesso mioenterico di ileo in cani privi di patologie enteriche ed in cani affetti da patologia infiammatoria intestinale.

### STATO DELL'ARTE

La letteratura fornisce molte informazioni inerenti le caratteristiche neurochimiche e strutturali dei neuroni coinvolti in processi infiammatori ed immunomediati che colpiscono l'uomo e gli animali da laboratorio (a seguito di IBD indotte).

Nell'uomo, le infiammazioni del tratto gastrointestinale possono dipendere da infezioni, lesioni chimiche dirette, malattie autoimmunitarie oppure derivano da condizioni non ancora chiarite, come avviene per le malattie infiammatorie intestinali di carattere cronico (IBD) quali il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. Nei tessuti dei pazienti con IBD si osservano alterazioni nell'architettura dei plessi gangliari e sono state riportate alterazioni come ipertrofia ed iperplasia dei neuroni ed iperplasia della glia enterica (Geboes & Collins, 1998). Valutazioni ultrastrutturali hanno evidenziato danni a livello assonale, che appaiono come strutture rigonfie, vuote e lucenti, private del loro contenuto di organelli e neurotubuli: questo insieme di caratteristiche è stato descritto come necrosi assonale (De Giorgio *et al*, 2004). Di contro, a livello dei corpi cellulari dei neuroni prevalgono alterazioni come l'iperplasia piuttosto che la degenerazione e riduzione numerica dei neuroni. Accanto alle anomalie strutturali riscontrate nelle forme di colite ulcerosa e nel morbo di Chron, infiltrati di cellule infiammatorie (macrofagi, mastociti, linfociti e plasmacellule) sono stati individuati nelle strette vicinanze delle fibre nervose e dei gangli enterici (Geboes & Collins, 1998).

Molti modelli animali (cavia, ratto, topo) di infiammazione intestinale sono stati messi a punto nel corso degli anni; tra i modelli più rappresentati vi è quello di colite indotta mediante 2,4,6- acido trinitrobenzenesulfonico (TNBS) (Jurjus et al, 2004) che è in grado di generare un quadro infiammatorio diffuso a tutta la parete dell'intestino e con caratteristiche di neurodegenerazione sovrapponibili ai quadri tipici del morbo di Chron nell'uomo (Sanovic et al, 1999). Le alterazioni riscontrate in questi animali, sono correlate ad una riduzione (da 20% fino a quasi al 50% del totale) del numero dei neuroni del plesso mioenterico, riduzione percentuale che tende a peggiorare con il richiamo delle cellule infiammatorie ed una degenerazione apoptotica di circa 1-2% (Boyer et al, 2005). Gli studi sul tratto di colon di cavia riportano che la percentuale legata al fenomeno di neuroni che vanno incontro ad apoptosi sembra riguardare tutti i sottotipi neuronali e quindi non ci siano tipi neuronali maggiormente sensibili (Linden et al ,2005). Alterazioni a carico dei neuroni sono più frequenti nei processi infiammatori rispetto a quelli degenerativi: le principali caratteristiche di neuroplasticità all'interno del sistema enterico riguardano alterazioni strutturali (come iperplasia, ipertrofia) fino ad arrivare alla deplezione di gangli nervosi (Vasina et al, 2006), alla degenerazione assonale (Lomax et al, 2005), e alterata sintesi e rilascio dei neurotrasmettitori secondo il meccanismo dell'aumento o della diminuzione della regolazione del sistema recettoriale. Si è potuto constatare che in queste alterazioni sono coinvolti anche tratti di intestino distanti dalla sede di infiammazione e non direttamente coinvolti dalla patologia sottostante (ad esempio l'ileo può presentare alterazioni di neuroplasticità in corso di colite) (Vasina et al,2006). In particolar modo, gli studi eseguiti da diversi autori si sono concentrati sull'espressione di due importanti neuropeptidi, la SP e il VIP, mentre la percentuale di neuroni colinergici rimane inalterata (Lomax et al, 2005). Nei modelli animali di infiammazione indotta, si è potuto constatare un significativo aumento dell'espressione delle tachichinine e dei

suoi recettori (NK-1, NK-2, NK-3); anche il VIP incrementa nei neuroni enterici di entrambi i plessi in modelli di infiammazione indotta da TNBS (Lomax *et al*, 2005; Vasina *et al*, 2006). Questi risultati però non sono considerati definitivi perché altri studi hanno riportato evidenze contrastanti (Lomax *et al*, 2005).

Grazie a misurazioni elettrofisiologiche si è potuto monitorare le caratteristiche di eccitabilità neuronale; ad esempio, nella cavia è stato dimostrato che alterazioni dei neuroni sottomucosi in condizione di infiammazione (IBD) sono soggetti a più frequenti attività post sinaptiche eccitatorie determinando alterazione di secrezione e flusso ematico; altri tipi di neuroni, gli AH, cioè i neuroni afferenti primari intrinseci (IPANs), diventano più ipereccitabili, quindi più facilmente stimolabili, aumentando la loro attività spontanea che viene convertita in riflessi motori che a loro volta sono responsabili di dismotilità intestinale (Linden *et al*, 2003).

Tra le cellule del SNE che risultano avere un ruolo attivo negli stati infiammatori ci sono le cellule gliali; l'idea che queste cellule siano coinvolte nell'eziopatogenesi della IBD è stata promossa da studi eseguiti su animali da laboratorio (Lomax *et al*, 2005; Ruhl *et al* 2005) come cavia, ratto e più recentemente topo (Lomax *et al*, 2005) e su cui si è notato che le alterazioni a carico della glia insorgono molto precocemente. Mediante l'espressione sulla loro superficie di molecole di istocompatibilità di classe II (MHC II), esse interagiscono con neuroni, cellule endoteliali, cellule immunitarie e cellule dell'epitelio intestinale. Le MHC II sono importanti per la presentazione antigenica ai linfociti T, meccanismo che sembra essere in qualche modo correlato alla risposta da parte delle componenti nervosa nei confronti delle cellule infiammatorie (Lomax *et al*, 2005). L'infiammazione stessa a sua volta promuove la proliferazione gliale (Ruhl *et al*, 2005).

Uno studio molto importante su topi transgenici (Bush *et al*, 2005) ha dimostrato come la rimozione di queste cellule determini una infiammazione fulminante con esito fatale; il ruolo della glia probabilmente ancora non è stato completamente

chiarito perché in altri studi l'ablazione della glia sembra apportare delle modifiche del codice chimico dei neuroni e sembra avere un ruolo di protezione nel mantenere integrità del SNE (Savidge *et al*, 2007; Ruhl *et al*, 2005).

Tra i mediatori chimici dell'infiammazione, i meglio caratterizzati e studiati sono l'interleukina-1 beta (IL-1B) e l'interleukina 6 che sono in grado di aumentare l'eccitabilità dei neuroni enterici depolarizzando la membrana (Xia *et al*, 1999). L'interleukina- 1 beta risulta molto elevata nei pazienti affetti da IBD e nei modelli animali di IBD (cavia). L'interleukina 1 beta è in grado di determinare cambiamenti nelle funzioni gastrointestinali, inibendo la motilità intestinale post prandiale stimolando invece l'attività motoria cieco-colica che determina dismotilità. Di recente è stata evidenziata l'azione eccitatoria sui neuroni dei due plessi a livello di ileo, sembra che il meccanismo che determini questo effetto sia mediato dalle prostaglandine PGE2. La produzione delle prostaglandine tende ad aumentare nei modelli animali con IBD indotta (cavia) ed è noto che determinino rilassamento della muscolatura circolare e contrazione di quella longitudinale (Kelles *et al*, 2002). La maggior parte dei neuroni che rispondono alla stimolazione da parte dell'interleukina 1-B sono i neuroni inibitori di tipo VIPergico a livello del plesso sottomucoso e di neuroni di tipo nitrgico a livello del plesso mioenterico (Tjwa *et al*, 2003).

Per quanto concerne i risultati ottenuti dalla nostra sperimentazione, lo stato di infiammazione a carico dell'apparato digerente dei soggetti patologici ha determinato alcune variazioni del fenotipo (neurochimica) in entrambi i plessi, come di seguito discusso:

#### *HuC/HuD-IR:*

è importante sottolineare che il marker HuC/HuD non può essere unicamente considerato un *pan neuronal marker*; infatti studi riportano l'internalizzazione nel

nucleo di questa proteina in neuroni appartenenti al MP di topo durante l'induzione sperimentale di infezioni, danni ischemici e/o da ri-perfusione e danni metabolici (Lawson *et al*, 2010; Thacker *et al*, 2011; Rivera *et al*, 2014). In alcuni gangli di cani patologici sottoposti a questo studio, si sono riscontrate alterazioni simili riferibili ad una non omogenea distribuzione nel citoplasma e nel nucleo, alla frammentazione e all'internalizzazione della proteina a livello nucleare (Desmet *et al*, 2014). Le condizioni di stress del microambiente che coinvolgono sia neuroni che le cellule gliali in condizioni di alterata omeostasi, come nel caso di infiammazioni, può esitare in una traslocazione attiva di HuC/HuD a livello di nucleo. Sebbene Desmet *et al*, 2014 nel loro studio abbiano valutato, tra le varie cause di internalizzazione nel nucleo della proteina Huc/HuD, anche l'influenza delle citochine infiammatorie (in particolar modo di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ - le quali giocano un ruolo fondamentale in molti disordini gastrointestinali), è riportato avere un effetto attivante sui neuroni enterici e sulla glia e determina anche un aumento dell'espressione del gene c-Fos (Tjwa *et al*, 2003)

L'attivazione precoce del gene c-Fos può coincidere con la localizzazione a livello nucleare della proteina HuC/HuD (Tjwa *et al*, 2003; Desmet *et al*, 2014).

#### *nNOS-IR:*

L'analisi statistica non ha mostrato differenze statisticamente significative tra la percentuale dei neuroni nNOS-IR osservati nell'ileo dei due gruppi. A livello di MP dei cani di ctrl la percentuale era  $33 \pm 15\%$  (178/639 cellule, n=5) mentre nei cani del gruppo patol era  $24 \pm 5\%$  (528/2031 cellule, n=7) (P=0,156, differenza non significativa). Per quanto concerne la percentuale di nNOS-IR a livello del SMP nei cani di ctrl era  $8 \pm 5\%$  (40/527 cellule, n=5) mentre nei cani del gruppo patol era  $7 \pm 2\%$  (69/1007 cellule, n=4) (P= 0,735, differenza non significativa).

L'ossido nitrico è presente nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni e, agendo come un ormone, determina il rilassamento della muscolatura liscia e la dilatazione delle pareti vasali (Berezin *et al*, 1994; Kandel *et al*, 2000). L'ossido nitrico rientra, assieme al VIP, tra i principali responsabili della trasmissione inibitoria delle fibre nervose non adrenergiche e non colinergiche (NANC), determinando un rilassamento della muscolatura liscia del tratto gastroenterico (Berezin *et al*, 1994; Takahashi *et al*, 1997; Ny *et al*, 1997). Oltre a livello muscolare l'ossido nitrico è espresso anche negli interneuroni, nei neuroni intestino-fugali e nelle proiezioni della sottomucosa che controllano la secrezione elettrolitica (Schemann & Neunlist 2004).

Numerosi studi riportati in letteratura su varie specie animali sono rivolti verso la sottopopolazione dei neuroni nitrergici in entrambi i plessi.

In diverse specie animali sono riportate le percentuali dei neuroni nNOS-IR di ileo: negli animali da laboratorio la percentuale varia da 24% della cavia (Furness, 2006) al 29% del topo (Lawson *et al*, 2010; Sadeghinezhad *et al*, 2013) – 32% (Li *et al*, 2015), nel maiale è di circa il 19% (Brehmer *et al*, 2004), nel cavallo è di circa il 28% (Chiocchetti *et al*, 2009), nella pecora circa il 33% (Chiocchetti *et al*, 2006), e nello scoiattolo persiano la percentuale è intorno al 41% (Sadeghinezhad *et al*, 2013)

La maggior parte di questi neuroni presentano il fenotipo Dogiel di tipo I.

Nella cavia, la specie più indagata, i neuroni nNOS-IR includono motoneuroni inibitori discendenti ed interneuroni discendenti (Furness, 2006); nel topo circa il 90% dei neuroni nNOS-IR del plesso mioenterico sono motoneuroni inibitori della muscolatura e il 10% sono interneuroni (Sang and Young, 1998).

Il presente studio risulta essere il primo contributo inerente alla valutazione quantitativa della componente nervosa inibitoria nel cane di controllo ed affetto da disturbi intestinali.

Per quanto concerne la percentuale dei neuroni nNOS-IR nel SMP di animali controllo, sono pochi i dati riportati in bibliografia e sono riferiti al cavallo  $5 \pm 1\%$

(Chiocchetti *et al*, 2009), 0% nell'ileo di cavia (McConalogue & Furness 1993)

Per quanto riguarda i cani patologici si è potuto evidenziare una diminuzione dell'espressione dei neuroni nNOS nel MP: diversi autori hanno descritto questa diminuzione in animali da laboratorio.

Aubè *et al*, 2006 riporta la riduzione pari al 31% rispetto ai controllo di neuroni nNOS-IR in topi come modello transgenico di infiammazione. Anche Li *et al* (2015) riporta come vi sia una riduzione dei neuroni nitrergici a livello di MP rispetto ai soggetti di controllo dei neuroni nNOS in ratti usati come modello di infiammazione intestinale (23%).

In uno studio di modello di sindrome intestinale infiammatoria (IBS) di ratto, vengono riportate alterazioni della motilità intestinale non solo a livello di colon distale e retto ma anche a livello di piccolo che contribuisce alla comparsa della diarrea in questi ratti (Li *et al*, 2015). Qualsiasi evento stressante o di alterazione del microambiente intestinale consegue con un effetto predominante sulla liberazione di NO, come trasmettitore inibitore, dai neuroni muscolo-motori che agiscono a livello della giunzione neuro-muscolare (Li *et al*, 2015). La riduzione dell'inibizione dei neuroni motori che agiscono sulla muscolatura liscia determinando un rallentamento della loro contrazione e questo rallentamento potrebbe essere correlato ad un aumento della peristalsi riscontrato in animali affetti in quanto l'inibizione determina una successiva onda propulsiva (Wood, 2008; Wood, 2011).

#### *VIP-IR:*

L'analisi statistica ha mostrato *differenze statisticamente significative* tra la percentuale dei neuroni VIP-IR osservati nel plesso mioenterico dell'ileo dei due gruppi. A livello di MP dei cani ctrl, la percentuale era di  $6\pm 4\%$  (69/993 cellule), mentre nei cani con infiammazione era  $16\pm 9\%$  (281/1958 cellule, n=8) ( $P=0,027$  \* *differenza significativa*). A livello di SMP non si è evidenziata differenza statisticamente significativa: nei cani ctrl la percentuale era  $29\pm 8\%$  (300/993 cellule)

mentre nei patol  $30 \pm 13\%$  (522/1630 cellule, n=7) (P=0,891, differenza non significativa).

Molti ricercatori negli ultimi anni hanno rivolto le loro indagini nei confronti di questo neuropeptide, sia in modelli di infiammazione sperimentale che in campioni di pazienti affetti da colite ulcerosa è stato dimostrato un significativo aumento dei neuroni VIP-IR. Tra i primi è stato Bishop *et al*, che nel 1980 ha messo in evidenza come in corso di morbo di Crohn, si evidenzi un aumento della immunoreattività del VIP in campioni di tessuto di uomo affetti da questa patologia. E' stato riscontrato che il VIP aumenta anche nei neuroni enterici dei pazienti affetti da Crohn e nei modelli di infiammazione da TNBS (Lomax *et al*, 2005; Vasina *et al*, 2006). Probabilmente, questo aumento è correlato all'effetto attivante di una citochina (IL-1 $\beta$ ) nei confronti dei neuroni enterici ed è stato dimostrato anche valutando l'espressione del fattore di trascrizione c-fos: la maggior parte dei neuroni responsivi nel plesso sottomucoso corrisponde alla popolazione VIP-ergica di neuroni secretomotori (Tjwa *et al*, 2003). Tuttavia questi risultati sembrano non essere definitivi, perchè pare che il ruolo del VIP negli stati di infiammazione intestinale sia contraddittorio (Vasina *et al*, 2006). Sebbene i principali studi depongano per un'azione antinfiammatoria (che viene esercitata mediante l'azione da immunoeffettore, la soppressione dei macrofagi e delle cellule T a livello dei linfonodi e l'inibizione dell'attività delle cellule natural-killer), altri studi riportano come il VIP, per esempio, stimoli lo sviluppo, in risposta agli antigeni, delle cellule T della memoria e delle cellule effettrici Th17. I Th17 sono cellule con un potente effetto stimolatore dell'infiammazione e studi condotti su topi da laboratorio confermano che i Th17 siano coinvolti nell'autoimmunità (Newman *et al*, 2005; Spiller, 2007).

I risultati ottenuti dal nostro studio su cani affetti da patologia intestinale confermano quanto riportato in bibliografia dalla maggior parte degli autori: la

concentrazione di questi neuroni secromotori era incrementato nel MP in maniera statisticamente significativa in cani affetti da patologia (ctrl  $6\pm 4\%$  vs patol  $16\pm 9\%$ ,  $P=0,027$  \*); anche nel SMP era incrementato ma non in maniera significativa (ctrl  $29\pm 8\%$  vs patol  $30\pm 13\%$   $P=0,891$ ).

L'aumento della secrezione di questo peptide (Lomax *et al*, 2005; Vasina *et al*, 2006) determina un rilascio della muscolatura circolare (Storr *et al*, 2008) ed una stimolazione dei neuroni secromotori con conseguente aumento della secrezione da parte dell'epitelio di acido cloridrico (Assimakopoulos *et al*, 2008). Pertanto gli animali affetti da patologia infiammatoria, come nel nostro caso, manifestano un incremento di VIP che promuove la secrezione intestinale peggiorando la sintomatologia clinica (ad es. diarrea, dismotilità intestinale con aumento del transito intestinale); ciò viene confermato da un recente lavoro di Li *et al*, del 2015 su un modello di IBD di ratto dove la percentuale di neuroni del SMP VIP-IR è pari a  $40.5\pm 5.9\%$ , rispetto ai controlli  $28.9\pm 3.7\%$ . In un altro articolo la percentuale di neuroni VIP-IR nel MP di digiuno di modello di topo transgenico è di circa il 43% rispetto al 63% dei controlli; a livello di SMP la percentuale è sovrapponibile tra i due gruppi ed è circa il 30% (Aubè *et al*, 2006).

Per quanto concerne la valutazione della densità delle fibre nervose VIP-IR, come evidenziato nei risultati, esse tendono ad aumentare notevolmente a livello di mucosa ed a livello dello strato di muscolatura circolare negli animali patologici. Anche questi dati sono coerenti con quanto riportato in letteratura in merito alla principale localizzazione delle fibre VIP- a livello di SMP (Kishimoto *et al*, 1992) ed a livello di muscolatura circolare (Berezin *et al*, 1994; Margolis e Gershon, 2009). Considerate le evidenze da noi rilevate e quanto presente in bibliografia, si può affermare che il VIP giochi un ruolo fondamentale nella patofisiologia delle infiammazioni intestinali. In bibliografia non sono riportati valori di riferimento della % dei neuroni VIP-IR di MP e SMP nella specie canina e quello da noi eseguito risulta

il primo studio, ad oggi, che coinvolge cani affetti da patologie gastroenteriche.

#### *SP-IR:*

L'analisi statistica non ha mostrato differenze statisticamente significative tra la percentuale dei neuroni SP-IR osservati nell'ileo dei due gruppi sia a livello di MP dei cani ctrl, con percentuale pari a  $15\pm 8\%$  (209/1332 cellule, n=5) rispetto ai cani patol con percentuale di  $17\pm 9\%$  (437/2053 cellule, n=8) ( $P=0,741$ , differenza non statisticamente significativa).

Per quanto concerne il SMP la percentuale di SP-IR nei cani ctrl era di  $26\pm 7\%$  (464/1598 cellule, n=5) mentre nei patol era di  $24\pm 13\%$  (592/2024 cellule, n=6) ( $P=0,752$ , differenza non significativa).

Come precedentemente detto, la SP è molto rappresentata a livello di intestino in entrambi i plessi; la SP è co-trasmittitore eccitatorio (insieme all'Ach) a livello muscolare e neuronale. La SP è un neurotrasmettitore primario dei neuroni IPANs (Furness, 2006); ha azione pro-secretoria a livello della mucosa, è coinvolta nei meccanismi di trasmissione dei neuroni sensitivi intrinseci (De Giorgio *et al*, 2009; Margolis e Gershon, 2009) e nei neuroni estrinseci che innervano l'apparato gastroenterico (Pernow, 1983; Margolis e Gershon, 2009). La SP è coinvolta nella regolazione della motilità del ratto (Mitsui, 2011) e nell'intestino di cavia (Johnson *et al*, 1998; Weber *et al*, 2001). La reattività SP nel MP è stata valutata nel piccolo intestino di topo (Mitsui, 2011), cavia (Brookes, 2001), topo (Aubè *et al*, 2006), come nell'ileo dello scoiattolo del persiano (Sadeghinezhad *et al*, 2013), cavallo (Chiocchetti *et al*, 2009) e maiale (Pidsudko *et al*, 2008). Altri autori hanno riportato unicamente la presenza di fibre SP-IR nel cavallo (Bishop *et al*, 1984; Pearson, 1994; Domeneghini *et al*, 2004).

Il recettore per la Neurokinina-1 è espresso sia nel piccolo che nel grosso intestino non solo dai neuroni enterici ma anche dalle cellule muscolari, dalle cellule

endoteliali, da effettori immunitari e da cellule della mucosa epiteliale.

In bibliografia è riportata una conflittualità sul ruolo della SP e del suo recettore NK-1: in alcuni studi sia in corso di infiammazione sperimentale indotta, che in campioni di pazienti affetti da colite ulcerosa, la percentuale della SP risulta notevolmente aumentata rispetto ai controlli (Lomax *et al*, 2005; Vasina *et al*, 2006); viceversa in alcuni studi può risultare uguale o diminuita (Derocq *et al*, 1996; Navari, 2008).

La spiegazione di queste variazioni può essere chiarita sulla base della severità della patologia sottostante, del trattamento in corso o delle varie tecniche che sono state utilizzate per la quantificazione del marker.

Studi in modelli animali riportano che la SP ha un ruolo cruciale in corso di patologie infiammatorie che colpiscono il tratto gastro-intestinale (Eyesselein & Nast, 1991; Margolis & Gherson, 2004; Gross, Pothoulakis *et al*, 2007): si riscontra, infatti, un aumento dell'espressione dei recettori della SP nei piccoli vasi distribuiti lungo tutti gli strati dell'intestino.

I livelli di SP sono aumentati nel sangue periferico di ratti in cui è stata indotta la colite e sono aumentati anche nella parete intestinale di topi in cui è stata indotta infiammazione mediante TNBS (Million *et al*, 1990; Margolis & Gherson, 2009)

A supporto del fatto che la SP sia pro-infiammatoria vi è che gli antagonisti del recettore NK1 permettono di migliorare lo stato della patologia e/o sopprimere le forme sperimentali multiple di colite indotta. Meccanicamente la SP attiva la trasduzione di molecole che sono associate con la stimolazione dell'infiammazione. Queste molecole a loro volta determinano la liberazione di potenti citochine proinfiammatorie (IL-1beta, IL-6-8). La SP ha in aggiunta la capacità di stimolare la rigenerazione della mucosa. Come la SP possa promuovere la guarigione o promuovere l'infiammazione non è ancora chiaro anche se sembra influire la gravità della patologia sottostante: quando la colite è stata indotta in maniera acuta su topi da laboratorio affetti geneticamente da deficienza di neurochinina-1, l'accumulo di

neutrofili e i reperti istologici di infiammazione risultavano minori rispetto ai topi controllo; quando invece la colite veniva indotta in maniera cronica, sia l'intensità dell'infiammazione che la % di mortalità dei topi affetti da deficienza di neurochinina-1, risultavano molto maggiori in % rispetto ai controlli (Margolis & Gherson, 2009).

La percentuale di neuroni SP-IR nel MP di ileo di arvicola è di  $21 \pm 5\%$ , nello scoiattolo persiano la % è di  $6 \pm 3\%$  nel MP e  $2 \pm 2\%$  nel SMP (Sadeghinezhad *et al*, 2013). A conferma dei dati riportati in bibliografia, la SP risulta essere maggiormente rappresentata a livello di SMP rispetto al MP. Nonostante ciò mantiene un trend di positività nel MP di cani affetti da patologia e tende a rimanere stabile/decretere nel SMP dei patologici.

Nel nostro studio preliminare, che raccoglie i primi dati sulla percentuale di neuroni SP-IR di MP e SMP di cani affetti da patologia intestinale si può affermare che la SP non si comporta come molecola "pro-infiammatoria classica" in quanto le percentuali dei neuroni SP-IR ottenute tra i due gruppi rimangono più o meno costanti. Una motivazione potrebbe essere legata al fatto che, come riportato da alcuni autori (Margolis & Gherson, 2009), in corso di patologia infiammatoria intestinale avanzata/cronica la SP-IR possa promuovere la guarigione rispetto ad uno stato di infiammazione. Se così fosse probabilmente i nostri campioni patologici erano prevalentemente affetti da patologie intestinali insorte da tempo. Altre motivazioni al momento non sono state identificate ma, se si considera questo studio uno studio preliminare, probabilmente l'aumento del numero dei patologici o la standardizzazione dei criteri di inclusione (come ad esempio definire la durata della patologia intestinale in corso) potrebbero permettere di ottenere altri dati a supporto.

Nel nostro studio, la densità di fibre SP-IR è maggiormente rappresentata a livello di strato di muscolatura circolare e mucosa rispetto allo strato muscolare

longitudinale. La reattività delle fibre va incontro ad un decremento statisticamente significativo ( $P=0,04$  \*) nello strato di mucosa dei patologici e si riduce anche a livello di strato circolare anche se non in maniera significativa. Questi risultati sono concordi ai dati riportati in bibliografia sulle altre specie animali. Negli animali da laboratorio, la SP-IR è riscontrata a livello di MP e SMP e nelle varicosità delle fibre (Costa *et al*, 1980; Furness *et al*, 1995; Fausone-Pellegrini, 2006) le quali sono distribuite sulla mucosa, sottomucosa e strati muscolari (soprattutto a livello di muscolatura circolare).

#### *CGRP-IR:*

L'analisi statistica non ha mostrato differenze statisticamente significative tra la percentuale dei neuroni CGRP-IR osservati nell'ileo dei due gruppi sia a livello di MP, con percentuale per i cani ctrl di  $8\pm 9\%$  (41/543 cellule,  $n=5$ ) rispetto ai cani patol  $16\pm 11\%$  (259/1444 cellule,  $n=8$ ) ( $P=0,152$ , differenza non significativa). Per quanto concerne il SMP, la percentuale dei neuroni CGRP-IR nei cani ctrl era di  $7\pm 8\%$  (32/754 cellule,  $n=5$ ) mentre nei patol era di  $14\pm 12\%$  (194/1138 cellule,  $n=7$ ) ( $P=0,230$ , differenza non significativa).

Esistono evidenze neuroanatomiche e farmacologiche che il CGRP giochi un ruolo cruciale in diverse funzioni fisiologiche del SNE, incluse la regolazione della contrazione della muscolatura liscia (Palmer *et al.*, 1986), le funzioni sensitive/motorie (Sternini, 1991) e la microcircolazione (Vanner, 1994). È coinvolto nello sviluppo e nel mantenimento del dolore ed è altrettanto descritto come un potente regolatore della risposta infiammatoria. A livello gastrointestinale ha il ruolo di partecipare alla regolazione della secrezione acida e della motilità intestinale. Il rilascio di CGRP dalle terminazioni nervose e dalle cellule immunitarie è indotto dall'attivazione di un recettore transiente vanilloide (TRPV1).

Nel piccolo intestino di topo i neuroni CGRP-IR rappresentano approssimativamente

il 28% dei neuroni del MP (Qu *et al*, 2008); nello scoiattolo persiano la percentuale di neuroni CGRP-IR (Sadeghinezhad *et al*, 2013) è del 13%, circa il 6% nella pecora (Chiocchetti *et al*, 2006), circa il 15% nel suino (Pidsudko *et al*, 2008) e nell'arvicola 21% ( Sadeghinezhad *et al*, 2013).

Nel SMP i neuroni CGRP-IR sono molto numerosi, come è già stato dimostrato da altri autori (Kotzé and Van Aswegen, 1990; Domeneghini *et al*, 2004) e la loro distribuzione è stata studiata nel maiale (Scheuermann *et al*, 1987), uomo (Timmermans *et al*, 1992), pecora (Chiocchetti *et al*, 2006) e cavallo (Burns and Cummings, 1993; Domeneghini *et al*, 2004).

In questo primo studio di cane, la percentuale dei neuroni CGRP-IR di MP e SMP risulta aumentare nei patologici. Numerosi studi sono stati condotti al fine di capire il ruolo del CGRP nei modelli sperimentali di colite indotta. Gli effetti sistemici della somministrazione di CGRP e del suo antagonista, hCGRP, sono stati testati nei modelli di ratti TNBS indotta. Sembra che la somministrazione per via endovenosa di CGRP protegga la mucosa del colon dall'infiammazione TNBS- indotta. Dall'altro lato, il contributo dei TRPV1 nell'infiammazione intestinale è ancora controverso. È stato ad esempio visto che, nei topi modello di colite privati di TRPV1, la gravità della patologia era ridotta perché probabilmente l'attivazione del TRPV1 era promotore dell'infiammazione (Mazelin *et al*, 1998) .

Al contrario si è potuto valutare un miglioramento dei sintomi a seguito della somministrazione della capsaicina, agonista del TRPV1, nei ratti affetti da colite indotta (Evangelista *et al*, 1993). Considerando il possibile coinvolgimento del CGRP nella patogenesi della IBD, diversi autori hanno raccolto dati clinici in pazienti affetti da colite ulcerosa e sindrome di Chron (Szitter *et al*, 2010). Uno studio mostrava la riduzione delle cellule CGRP positive a livello dello strato muscolare di questi pazienti, ma uno *report* più recente non confermerebbe la riduzione del livello di CGRP nei tessuti affetti da moderata o grave colite

(Giovangiulo *et al* ,2015). Le caratteristiche fenotipiche dei neuroni CGRP-IR sono ascrivibili a quelle dei neuroni Dogiel di tipo II, che sono considerati neuroni sensitivi IPANs; questo tipo di neuroni provvede a fornire una buona innervazione alla mucosa ed ai gangli enterici ed una scarsa innervazione a livello dello strato muscolare circolare (Bornstein *et al*, 1991). I dati ottenuti dalla valutazione della densità delle fibre CGRP-IR di cane confermano quanto citato: la reattività negli strati muscolari è ridottissima, mentre a livello della mucosa sono molto presenti nei controlli e in misura minore nei patologici.

#### *Calb-IR:*

L'analisi statistica non ha mostrato differenze statisticamente significative tra la percentuale dei neuroni Calb-IR osservati nell'ileo dei due gruppi a livello di MP dei cani ctrl con percentuale pari a  $14\pm 9\%$  (76/580 cellule, n=5) rispetto ai patol  $16\pm 7\%$  (324/2055 cellule, n=8)(P=0,596, differenza non significativa).

Per quanto concerne il SMP la percentuale dei neuroni Calb-IR era nei cani ctrl di  $22\pm 7\%$  (218/975 cellule, n=5) mentre nei patologici di  $23\pm 7\%$  (261/1207 cellule, n=7) (P=0,767, differenza non significativa).

Walter *et al*, 1993 hanno dimostrato per la prima volta la presenza di calretinina e calbindina a livello di SNE di uomo. La calbindina si riscontra anche a livello di specifiche cellule endocrine (cellule enterocromaffini) a livello sia di stomaco che di ileo di uomo. Queste cellule sono state osservate anche nel nostro studio. La comparazione tra la presenza di calbindina nelle diverse specie permette di chiarire il suo ruolo nel tratto gastro intestinale. Nell'intestino di cavia, come evidenziato in quello di uomo, vi è una maggior reattività a livello di MP, circa 1/3 di cellule sono Calb- IR, mentre relativa è la presenza di fibre Calb-IR a livello degli strati muscolari (Walters *et al*, 1993).

Nell'ileo di arvicola la percentuale di neuroni MP Calb-IR è di circa  $6\pm 2\%$ , nello scoiattolo del Caucaso è rispettivamente di  $22\pm 8\%$  nel MP e di  $56\pm 14\%$  nel SMP

(Sadeghinezhad et al, 2013), negli agnelli e nelle pecore la % varia tra il 20-25% nel MP e 65-75% nel SMP (Chiocchetti et al, 2004). Nel ratto, invece, è stato evidenziato che le cellule Calb-IR sono maggiormente rappresentate a livello di plesso sottomucoso e co-localizzano con VIP e NPY ma non con SP e somatostatina (Walters et al, 1993). Le cellule marcate sono di tipo Dogiel di tipo II e sono perciò neuroni sensitivi multipolari con prolungamenti assonali sensitivi che raggiungono lo strato mucoso ed innervano gli altri neuroni del MP (Furness et al, 1998; Furness et al, 1990).

A seguito di questi ed altri studi, le proteine leganti il calcio, possono essere utilizzate come *neuronal markers* per valutare le variazioni in corso di stati patologici del tratto gastrointestinale. Ad esempio, un lavoro di Bishop et al (1980) ha messo in evidenza come in corso di morbo di Crohn, si evidenzia un aumento della immunoreattività del VIP e un aumento dell'immunoreattività di Calb in campioni di tessuto di uomo affetti da questa patologia.

Sicuramente nel nostro studio, la percentuale di neuroni di cane di controllo Calb-IR non è sovrapponibile a quella riportata da Walters nell'uomo e nel ratto (circa il 33%) e questi neuroni sembrano essere meno rappresentati in questa specie animale e in altre studiate. All'interno dei due plessi, però, la marcatura è maggiore nel SMP, come nelle altre specie indagate, a conferma del ruolo rappresentato da queste cellule di neuroni sensitivi multipolari.

Negli animali patologici con alterazioni intestinale, seppure non in maniera statisticamente significativa, i neuroni Calb-IR mantengono un trend positivo, aumentando percentualmente sia a livello di MP che di SMP come confermato nello studio di (Bishop et al, 1980).

Lo studio della densità delle fibre evidenzia una marcatura a livello di strato mucoso dei cani controllo che risulta particolarmente accentuata soprattutto a carico delle cellule enterocromaffini, marcatura che tende a ridursi nei patologici nei vari strati

ad eccezione di quello della muscolatura circolare che è localizzato più vicino al SMP e per tanto molto ricco di fibre.

## CONCLUSIONI

In bibliografia non sono presenti riferimenti in merito alle caratteristiche neurochimiche del SNE di cane e, al momento, non è ancora presente una mappatura dei vari sottotipi neuronali sia in cani privi da patologia che affetti da patologia infiammatoria intestinale. Questo studio risulta essere il primo contributo in tale direzione; è perciò uno studio preliminare il quale potrebbe essere ampliato con l'aumento del numero dei campioni dei due gruppi che potrebbero sviluppare una significatività statistica che ancora non risultava evidente nel confronto tra i vari *markers*. Vista la numerosità dei sottotipi neuronali indagati, questo progetto offre un'ampia panoramica sulle alterazioni che si verificano in corso di patologie infiammatorie nel cane.

## FASE 2)

### MATERIALE E METODI

Per il secondo progetto di ricerca sono stati utilizzati i tessuti ottenuti da n° 13 cani appartenenti allo stomaco ed intestino (ileo). Sono stati creati due gruppi: un gruppo costituito da tessuti prelevati dallo stomaco e dall'ileo di n° 5 cani controllo (CTRL) definiti tali in quanto assenti segni clinici riferibili a patologie gastrointestinali e un altro gruppo caratterizzato da n° 8 cani non obesi definiti patologici (PATOL) in quanto affetti da diabete mellito di tipo I; il quale è stato diagnosticato in questi animali attraverso la raccolta anamnestica e gli esami completi emato-biochimici.

Di seguito vengono riportate le tabelle riassuntive su razza, sesso, età e causa del decesso / durata della terapia insulinica nei cani diabetici, Tabella 6 e Tabella 7.

Cane	Razza	Sesso	Età	Causa del decesso
CTRL 1	PT	Mc	10 anni	Eutanasia a seguito di grave e progressivo deterioramento fisico
CTRL 2	PT	M	9 anni	Neoplasia cardiaca
CTRL 3	BOXER	Mc	8 anni	Patologia cardiovascolare
CTRL 4	PT	M	10 anni	Patologia cardiovascolare
CTRL 5	SIBERIAN HUSKY	Mc	16 anni	Patologia neurologica centrale
CTRL 6	SETTER INGLESE	F	2 anni	Trauma da investimento
CTRL 7	CHIHUAHUA	F	8 mesi	Trauma cranico
CTRL 8	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	M	17 anni	Neoplasia intracranica

Tabella 6: Segnalamento e causa di decesso dei soggetti che sono stati inclusi nello studio. Abbreviazioni: CTRL, Controllo; M, Maschio; F, Femmina

Cane	Razza	Sesso	ETà	Durata del trattamento insulinico
DM 1	CAIRN TERRIER	Fs	15 anni	2,5 anni
DM 2	LABRADOR RETRIEVER	F	12 anni	4 anni
DM 3	METICCIO	M	11 anni	6 mesi
DM 4	PASTORE TEDESCO	Fs	13 anni	3 anni
DM 5	BULL TERRIER NANO	F	4 mesi	1 mese

Tabella 7: Segnalamento e causa di decesso dei soggetti che sono stati inclusi nello studio. Abbreviazioni: Patol, Infiammato; M, Maschio; F, Femmina

Tutti i tessuti sono stati ottenuti da animali deceduti per morte naturale o sottoposti

ad eutanasia per gravi patologie e condizioni cliniche irreversibili e dietro consenso informato da parte dei proprietari. In accordo con la Direttiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo e con la delibera del concilio del 22 settembre 2010 in ambito della protezione degli animali usati a fini scientifici, la legislazione italiana (D. Lgs. N. 26/2014) non richiede nessuna approvazione da parte del comitato etico.

Per ogni animale è stato prelevato il pacchetto gastro-intestinale per intero entro le due ore dal suo decesso (questo per evitare alterazioni legate ai fenomeni *post-mortem*).

Una volta riconosciuti ed isolati i vari tratti dell'apparato digerente, lo stomaco è stato poi tagliato longitudinalmente lungo la grande curvatura mentre l'ileo è stato sezionato lungo il margine mesenterico. Quindi campionati la parte pilorica di stomaco e l'ileo.

Ad una prima valutazione macroscopica, lo stomaco e l'intestino dei cani controllo non presentava apparenti alterazioni a livello di mucosa (come iperemia o lesioni infiammatorie), mentre, l'ileo dei cani affetti da DM mostrava una grave iperemia in due cani e moderata in tre cani.

Un campione di circa 3.0 cm x 3.0 cm di porzione pilorica dello stomaco e di ileo, sono stati prelevati e adagiati su legno di balsa e sottoposti a procedure di fissazione come riportato nella Fase 1) del progetto, fino ad ottenere delle sezioni seriate di 16µm di spessore tagliate al criostato, tangenziali (1.0 cm x 1.0 cm) e longitudinali (2.0 cm x 0.5 cm), montate su vetrini gelatinizzati. Le sezioni ottenute, prive di coprioggetto, successivamente sono state stoccate a -80°C in attesa delle successive analisi (IHC).

## OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Le criosezioni sono state osservate con un microscopio *Nikon Eclipse Ni* equipaggiato con appositi filtri per l'immunofluorescenza. Le immagini sono state acquisite mediante la camera DQ-Qi1Nc ed elaborate tramite il programma NIS Elements BR 4.20.01 (*Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands*). Le modificazioni di contrasto e luminosità sulle immagini ottenute sono state eseguite mediante Corel Photo Paint, invece quando le immagini erano già corrette è stato utilizzato il programma Draw (Corel Photo Paint and Corel Draw, Ottawa, ON, Canada).

### IMMUNOISTOCHEMICA

La procedura di preparazione dei campioni è stata precedentemente descritta nella FASE 1). L'anticorpo HuC/HuD è stato utilizzato come *pan-neuronal marker* per identificare i neuroni enterici. I neuroni nitregici e le fibre nervose sono stati caratterizzati tramite indagine immunocistochimica utilizzando due tipi di anticorpi verso l'enzima nitrico ossido sintasi neuronale.

Nelle tabelle sottostanti vengono riportati gli anticorpi primari e secondari utilizzati, Tabella 8 e Tabella 9.

ANTICORPO PRIMARIO	CODICE	SPECIE	DILUIZIONE FINALE	DITTA PRODUTTRICE
HuC/HuD	A21271	Mouse	IHC 1:400; WB 1:200	Life Technologies
nNOS	sc-5302	Mouse	IHC 1:50; WB 1:200	Santa Cruz
nNOS	AB5380	Rabbit	IHC 1:500; WB 1:1000	Merck Millipore

Tabella 8: Anticorpi primari: elenco degli anticorpi primari utilizzati e rispettivo codice, specie di appartenenza diluizione e produttore

ANTICORPO SECONDARIO	CODICE	SPECIE	DILUIZIONE FINALE	DITTA PRODUTTRICE
Anti-mouse IgG	A11005	Goat	IHC 1:200	Life Technologies
Anti-rabbit IgG	401314	Goat	IHC 1:200	Merck Millipore
Anti-mouse IgG	A2304	Goat	WB 1:1000	Sigma Aldrich
Anti-mouse IgG	A0545	Goat	WB 1:3000	Sigma Aldrich

*Tabella 9: Anticorpi secondari: elenco degli anticorpi primari utilizzati e rispettivo codice, specie di appartenenza diluizione e produttore*

#### SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI PRIMARI

La specificità degli anticorpi utilizzati in questa ricerca (Mouse anti HuC/HuD, mouse anti nNOS e rabbit anti nNOS) sono stati testati mediante l'analisi Western Blot, che ha indicato la loro specificità per i tessuti di cane. Inoltre i due anticorpi anti-nNOS utilizzati sono stati testati attraverso l'utilizzo di un protocollo a doppia colorazione e co-localizzavano completamente.

#### WESTERN BLOT

I tessuti campionati sono stati congelati in liquido di azoto e stoccati a -80°. Successivamente scongelati e sottoposti ad omogeneizzazione. La componente proteica è stata estratta utilizzando un reagente che permette di estrarre le proteine dai tessuti T-PER in presenza di una soluzione che inibisce l'attività delle proteasi (Thermo Scientific, Italy, Europe), in accordo con le istruzioni del produttore. La quantificazione della componente proteica è stata ottenuta mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Italy, Europe). Ogni

aliquota conteneva 50 ug di proteine denaturate e riscaldate a 95°C per 5 minuti in tampone Laemmli, separate attraverso SDS-PAGE (12,5% per testare la specificità HuC/HuD e 7,5% per testare quella nNOS), fatte migrare all'interno di membrane di nitrocellulosa (GE Healthcare, UK, Europe). Dopo il trattamento con il blocco, le membrane sono state incubate a 4°C per una notte con l'anticorpo primario diluito in soluzione Tris tamponante salina T20 (TBS-T20 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 125 0.1% T-20) . Dopo i lavaggi, ogni pozzetto è stato messo in incubazione con i rispettivi anticorpi secondari. Le bande immunoreattive sono state visualizzate utilizzando substrato chemiluminescente (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, Italy, Europe). L'intensità del segnale di luminescenza è stata acquisita mediante C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner using Image Studio Digits Software Ver 3.1(LI-COR Biotechnology, UK, Europe). Per l'anticorpo HuC/HuD, due bande di ~42 kDa e ~40 kDa sono state evidenziate (theoretical molecular weight 41,770 kDa for HuD and 39,547 kDa for HuC, respectively) (<http://www.uniprot.org/>)

La banda relativa alle due varianti anticorpali di nNOS mostrava un peso di ~155 kDa nell'ileo (theoretical molecular weight 160,970) kDa. Quella dell'anticorpo monoclonale (mouse anti nNOS) era molto più chiara e definita rispetto a quella ottenuta dall'anticorpo policlonale (rabbit anti nNOS); a seguito della perfetta co-localizzazione dei due anticorpi anti nNOS nel siero utilizzato, abbiamo considerato quindi utilizzabile per questa ricerca, l'anticorpo policlonale.

#### SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI SECONDARI

La specificità degli anticorpi secondari è stata testata come nella Fase 1) precedentemente descritta e come riportato in una precedente pubblicazione (Sadeghinezhad et al., 2013).

## ANALISI QUANTITATIVA

Non meno di 300 neuroni HuC/HuD- IR sono stati contati per ogni tratto gastroenterico indagato per ogni animale. La doppia marcatura data dall'utilizzo degli anticorpi HuC/HuD e rabbit-nNOS su sezioni tangenziali ha permesso di quantificare la percentuale dei neuroni nitrergici. Il rapporto tra neuroni nNOS-IR e HuC/HuD-IR è stato espresso nella relativa percentuale.

## ANALISI STATISTICA

La percentuale dei neuroni nitrergici quantificati nei cani affetti da DM è stata comparata con quella osservata nei cani controllo. In accordo con la distribuzione Gaussiana (Kolmogorov-Smirnoff test), il test t di Student è stato utilizzato per analizzare le differenze tra la percentuale dei neuroni nitrergici nell'antro ed ileo nei due gruppi di cani (CTRL vs DM). I risultati sono stati espressi in percentuale  $\pm$  deviazione standard. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software commerciale statistico (Graphpad Prism 5 per Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data la presenza di due gruppi non omogenei (animali patologici e controlli), l'analisi statistica è stata effettuata mediante l' *unpaired t-test* per valori parametrici. Il livello di confidenza è stato fissato come  $p < 0.05$ .

## ANALISI DENSITOMETRICA

Ogni sezione longitudinale di ogni singolo campione di tessuto con doppia marcatura è stato sottoposto ad una valutazione densitometrica. Per ottenere tale valutazione sono state eseguite n° 3 foto della mucosa (precisamente su tre diversi villi), n°3 foto diverse della componente di muscolatura circolare, n° 3 foto diverse della componente di muscolatura longitudinale. Le immagini ottenute sono state sottoposte ad elaborazione tramite il programma Image J (programma di rielaborazione delle immagini scientifiche) che permette di ottenere il valore

dell'area (rappresentata dalle fibre immunoreattive), espressa in percentuale sul totale. Il valore definitivo è dato quindi dalla media delle tre percentuali ottenute espresso in percentuale  $\pm$  deviazione standard.

Questa valutazione ci permette di confrontare la variazione della percentuale di fibre immunoreattive per ogni marker, presenti nei tre distretti indagati e il loro andamento nei soggetti controllo e patologico.

## **RISULTATI**

### **CANI CONTROLLO**

I neuroni di stomaco ed ileo HuC/HuD-IR mostravano una colorazione omogenea senza frammentazione con un'intensità maggiormente concentrata a livello di citoplasma rispetto al nucleo; l'immunoreattività nNOS è stata fortemente espressa su neuroni e fibre, Figura 36.

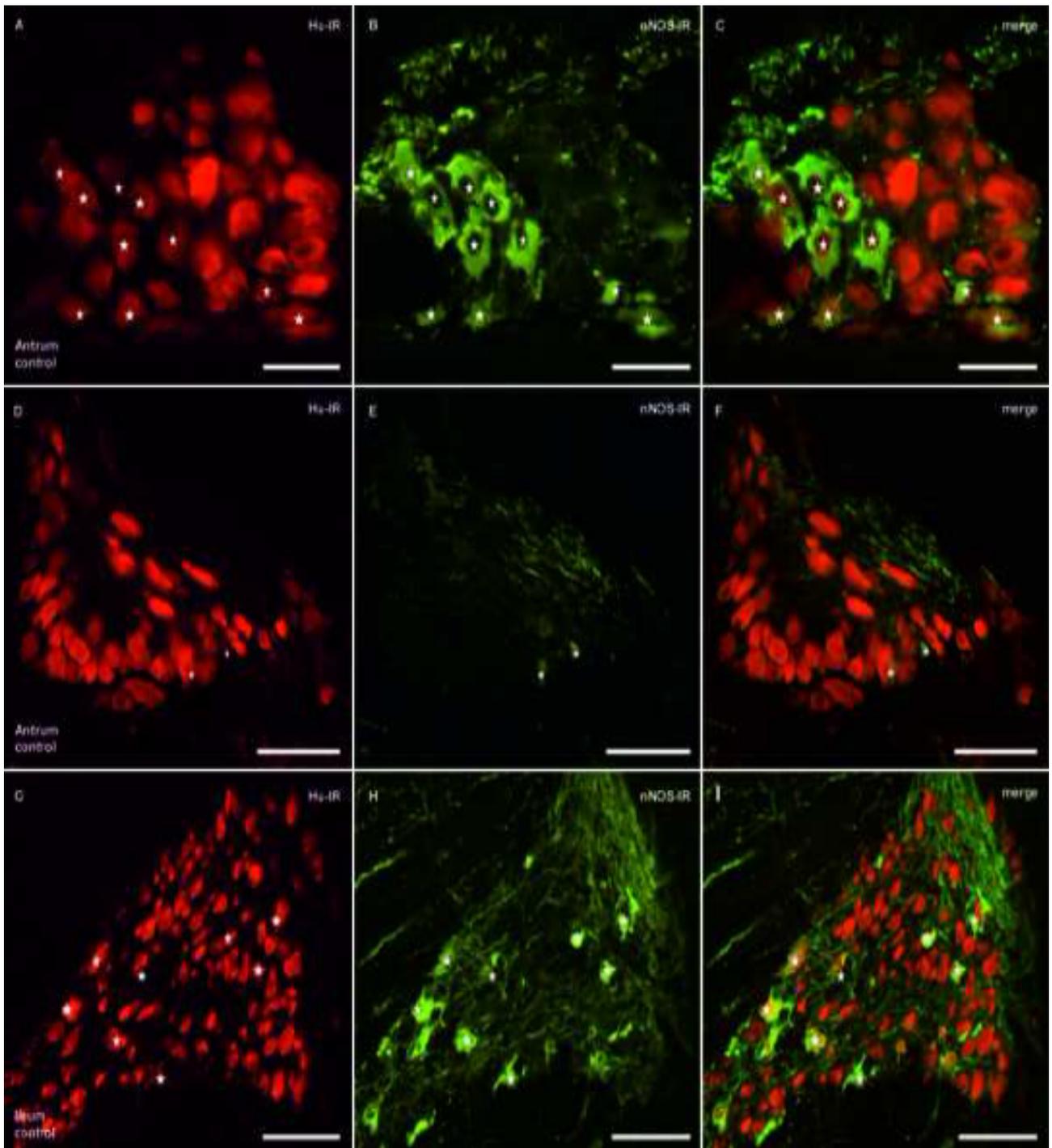


Figura 36 Immagini al microscopio di gangli di neuroni di stomaco ed ileo di cani controllo

Le sezioni tangenziali hanno consentito di osservare che, nello stomaco, alcuni gangli contenevano numerosi neuroni nitreggici, in alcuni casi raggruppati in cluster (Fig. 2 A-C) mentre altri gangli erano completamente privi di corpi cellulari nNOS-IR (Fig. 2 D-F); nell'antro pilorico la percentuale di neuroni nNOS-IR risultava essere di  $30 \pm 6\%$  (902/3129 cellule) sul totale della popolazione neuronale. I gangli dell'ileo si

mostravano, in generale, di maggiori dimensioni rispetto a quelli gastrici e quasi tutti contenevano in maniera omogenea neuroni nitrergici (Fig. 2 G-I), nella percentuale di  $29\pm 5\%$  (795/2800 cellule) sul totale della popolazione neuronale.

#### CANI DIABETICI

Nei cani affetti da DM, a prescindere dall'età del campione, dalla durata dello stato di iperglicemia, dalla gravità della patologia diabetica una caratteristica comune riscontrata è stata un addensamento del tessuto connettivo attorno ai gangli, che risultava limitato nello stomaco ma molto pronunciato a livello dell'ileo (Fig. 3 A-L). nella maggior parte dei gangli colpiti, questo connettivo mostrava autofluorescenza (Fig. 3 D-L). se l'immunoreattività HuC/HuD e nNOS risultava piuttosto preservata nello stomaco (Fig. 3 A-C), in alcuni gangli dell'ileo la HuC/HuD-IR risultava compromessa, mostrando cambiamenti morfologici di questi neuroni (Fig. 3 D-F). In alcuni casi il soma del neurone risultava a mala pena identificabile (Fig. 3 D-E) e la colorazione HuC/HuD risultava dispersa in granuli (Fig. 3 F) e confinata unicamente a livello del nucleo e non più anche nel citoplasma. nei casi in cui la nNOS-IR era intensamente espressa dal corpo cellulare e dalle fibre nervose, i neuroni HuC/HuD-IR non erano invece identificabili (Fig. 3 G-I). Nell'ileo, la nNOS-IR, risultava alterata anche a livello di fibre nervose, che apparivano spesso danneggiate o discontinue (Fig 3 J-L). nello stomaco la percentuale dei neuroni nNOS-IR risultava di  $25\pm 2\%$  (727/2926 cellule), mentre nell'ileo era di  $19\pm 5\%$  (308/1508 cellule), Figura 40

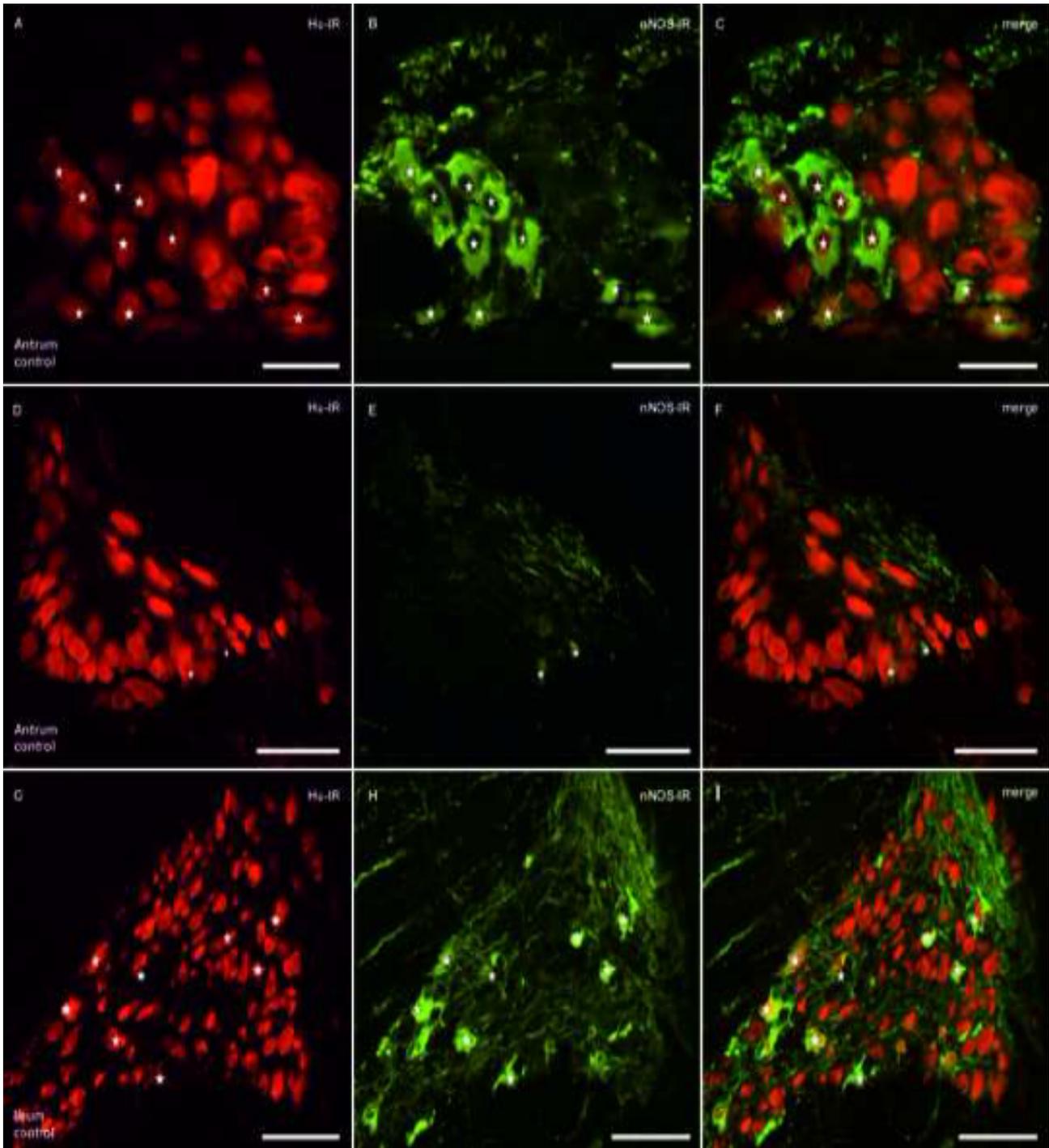


Figura 37: Immagini al microscopio di gangli di neuroni di stomaco ed ileo di cani DM

#### COMPARAZIONE TRA CANI CONTROLLO E DIABETICI

L'analisi statistica non mostrava differenze statisticamente significative della percentuale dei neuroni nitroergici a livello di antro pilorico tra i due gruppi controllo CTRL=  $30 \pm 6\%$  e patologico DM=  $25 \pm 2\%$  ( $P = 0.112$ ). al contrario invece, la percentuale dei neuroni nitroergici a livello di ileo si mostrava una differenza

statisticamente significativa tra il gruppo controllo CTRL= 29±5% e patologico DM= 19±5% (P= 0.006). I risultati vengono riportati nell'istogramma sottostante Figura 38:

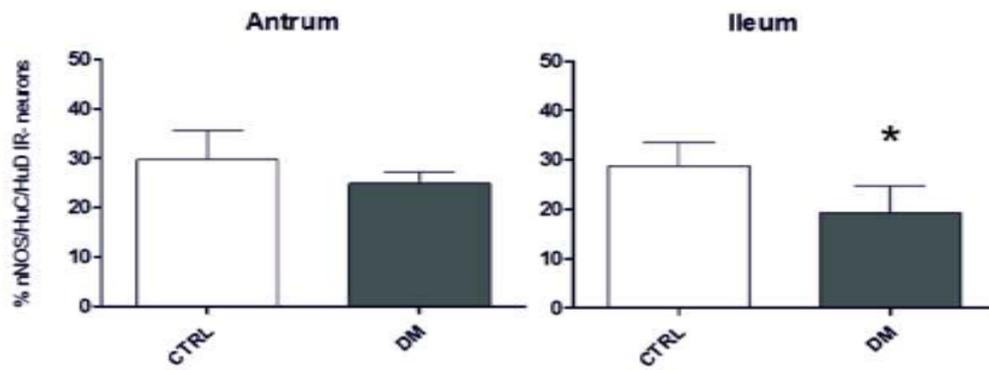


Figura 38: Analisi statistica dei neuroni nNOS-IR in antro ed ileo di cani ctrl e DM

## DISCUSSIONE

Il diabete è una delle più frequenti patologie che è responsabile anche di un tipo di neuropatia a carico del sistema nervoso autonomo (neuropatia enterica) che determina dei sintomi gastrointestinali come vomito, nausea, dolore addominale, diarrea, costipazione e ritardato svuotamento gastrico (Campieri, 1997; Chandrasekharan e Srinivasan, 2007; Rijnberk e Kooistra, 2010).

Gli effetti del diabete mellito di tipo I sul SNE sono dovuti allo stato di iperglicemia persistente. In questa ricerca sono stati eseguiti studi specifici di quantificazione di una specifica sottopopolazione neuronale particolarmente sensibile all'iperglicemia diabetica, rappresentata dai motoneuroni inibitori, che utilizzano l'ossido nitrico come neurotrasmettitore.

I risultati ottenuti nei cani controllo mostravano una percentuale di neuroni immunoreattivi simile, quasi sovrapponibile, rispettivamente intorno al 30% nell'antro pilorico e 29% nell'ileo.

I dati presenti in bibliografia riportano come la % dei neuroni nNOS-IR in animali da laboratorio sia circa il 20% per lo stomaco (Furness, 2006) e in percentuale variabile tra il 24%-29% per l'ileo (Lawson et al., 2010; Sadeghinezhad et al., 2013).

La bibliografia, ad oggi, risulta essere sprovvista di dati in merito alla percentuale dei neuroni nitrergici presenti nell'antro pilorico dei grossi animali. Solo valutazioni limitate al tratto intestinale di ileo sono state condotte da diversi autori che riportano le seguenti percentuali nei rispettivi animali: circa 19% sono neuroni nNOS-IR nel maiale (Brehmer et al., 2004), circa il 28% nel cavallo (Chiocchetti et al., 2009) e circa il 33% nella pecora (Chiocchetti et al., 2006).

In questa parte di progetto è stata primariamente calcolata la percentuale di una sottoclasse di neuroni del SNE, i neuroni nitrergici, in animali sani; successivamente

è stata calcolata la percentuale, della stessa classe di neuroni, in animali affetti da una particolare condizione patologica: il Diabete Mellito. I risultati ottenuti sono stati quindi messi a confronto.

In merito agli effetti del DM sui neuroni nitrergici, i risultati da noi ottenuti permettono di affermare che, nello stomaco di animali diabetici la percentuale dei neuroni risulta diminuita ma non in maniera significativa (circa 25%). Al contrario, invece, risulta diminuita in maniera statisticamente significativa la percentuale dei neuroni inibitori nel tratto di ileo (circa 19%).

Il presente studio risulta essere il primo contributo inerente alle forme di neuropatia enterica secondarie a diabete mellito di tipo I nel cane. Path et al. (Phat et al., 1978) furono i primi a documentare le alterazioni del SNE nell'uomo in corso di DM.

Le alterazioni del SNE sembrano riguardare prevalentemente la componente inibitoria: un deterioramento della funzione nitrergica ed una diminuzione dell'espressione di nNOS sono state descritte in animali da laboratorio con diabete mellito indotto da streptozotocina (STZ) (Fregonesi et al., 2001; Yoneda et al., 2001; Celtek et al., 2003; Alves et al., 2006; Izbeki et al., 2008; Watkins et al., 2000), topi NOD (non obese diabetic) (Watkins et al., 2000) e topi BB/W che sviluppano spontaneamente la patologia (Takahashi et al., 1997). Oltre a diminuzione dei neuroni in differenti tratti dell'apparato gastroenterico (Fregonesi et al., 2001; Furlan et al., 2002; Alves et al., 2006) sono stati evidenziati da questi autori segni di degenerazione. Le sottopopolazioni di neuroni enterici, è risaputo, reagiscono in maniera differente in presenza di diabete: alcuni vanno incontro a degenerazione assonale, rigonfiamento, altri mostrano variazioni nella neurotrasmissione in assenza di degenerazione ed altri ancora non mostrano segni di alterazione (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007).

Negli stadi iniziali di diabete mellito che colpisce gli animali (Takahashi et al., 1997; Celtek et al., 1999; Celtek et al., 2003; Takahashi, 2003; Celtek et al., 2004; Demedts

et al., 2013) e l'uomo (Miller et al., 2008; Chandrasekharan et al., 2011) sembrano essere coinvolti solo una sottoclasse di neuroni: i neuroni nitrergici.

Inoltre è importante sottolineare come il diabete mellito nell'uomo sembra determinare anche problemi clinici che colpiscono l'intestino tenue, mentre l'intestino crasso sembra non essere coinvolto (Schvarcz et al., 1996). I risultati ottenuti da questo progetto fanno sorgere il dubbio sul perchè la sottopopolazione nitrergica di stomaco ed ileo risulta essere colpita in maniera differente a seconda dello stadio della patologia diabetica sottostante.

La risposta a ciò è data dagli studi neuroanatomici di Takeda (Takeda et al., 2001) and Onoma (Onoma et al., 2008): questi ricercatori hanno osservato che il ritardo dello svuotamento gastrico in cani con DM indotto da streptozotocina si verifica solo nei casi in cui la patologia sia presente da lungo tempo (variabilmente 18-60 mesi). Nel presente studio, il tempo medio di durata dello stato di iperglicemia in cani DM in terapia con insulina è pari a 20 mesi (range tra 1 e 48 mesi). A ragione di ciò, probabilmente, questo tempo limitato non risulta essere sufficiente per garantire l'insorgenza anche di alterazioni gastriche.

Un'altra spiegazione potrebbe essere correlata alla terapia insulinica a cui sono stati sottoposti i cani dello studio in oggetto: come è dimostrato nei ratti, la somministrazione di insulina può stimolare l'espressione nNOS a livello gastrico (Watkins et al., 2000). Non vi è un supporto di studi funzionali presenti in letteratura che possano spiegare la significativa riduzione dei neuroni nitrergici a livello di ileo di cani diabetici. La riduzione percentuale dei neuroni nitrergici dovrebbe essere intesa, almeno inizialmente, come una alterazione reversibile in seguito a trattamento insulinico precoce e non per forza essere associata a neurodegenerazione; tuttavia, con la progressione del diabete, si verificano danni strutturali ai nervi e perdita di neuroni evidente (Cellek et al., 2003; Watkins et al., 2000).

Per quanto concerne l'immunoreattività HuC/HuD, è stato rilevato che, in alcuni gangli dell'ileo di cani diabetici, essa presentasse delle alterazioni riferibili ad una non omogenea distribuzione su citoplasma e nucleo, alla frammentazione, ad una debolezza di segnale e all'internalizzazione a livello nucleare. È importante sottolineare che il marker HuC/HuD non può essere unicamente considerato un *pan neuronal marker*; infatti studi riportano l'internalizzazione nel nucleo di questa proteina in neuroni appartenenti al MP di topo durante l'induzione sperimentale di infezioni, danni ischemici e/o da riperfusione e danni metabolici (Lawson et al., 2010; Thacker et al., 2011; Rivera et al., 2014). Altri studi confermano invece che, la localizzazione dell' HuC/HuD-IR a livello subcellulare riflette lo stato di salute dei neuroni mentre le modificazioni intracellulari a cui può andare incontro sono principalmente correlate ad una situazione di privazione di ossigeno secondaria a danni da perfusione (Desmet et al., 2014). Si può affermare con certezza che, in corso di patologia diabetica, molti gangli potrebbero andare incontro a condizioni di ipossia. Sono diversi i meccanismi che sembrano essere implicati nella patogenesi del danno nervoso in animali affetti da DM (Voukali et al. 2011).

In corso di diabete, lo stress ossidativo e la formazione dei prodotti finali della via della glicazione (*advanced glycation end products- AGEs*) giocano un ruolo fondamentale nella patofisiologia delle alterazioni a carico dei vasi sanguigni e delle variazioni che si verificano a carico del SNE (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007; Bagyanszki and Bodi, 2012). Il ruolo dello stress ossidativo nello sviluppo di neuropatie e nelle alterazioni a carico dei neuroni nitrergici in corso di DM, è associato all' assenza dell'enzima antiossidante eme ossigenasi-2 (HO-2); infatti i neuroni nNOS-IR risultano essere molto suscettibili, in assenza dell'enzima HO-2, alle variazioni derivanti dallo stato di diabete; i neuroni che invece contengono l'enzima HO-2, sembrano essere "protetti" da fenomeni degenerativi che sono responsabili di neuropatia (Shotton and Lincoln, 2006). In merito alla presenza di

HO-2 nel tratto gastrointestinale, Ny e colleghi (Ny et al., 1997), dimostravano che la percentuale dei neuroni nitrergici che coesprimevano HO-2 nell'antro pilorico e nell'ileo era la stessa; questo risultato non permette di capire il motivo della differenza percentuale che è stata osservata nei cani diabetici oggetto di questo studio. L'apoptosi dei neuroni nNOS-IR in corso di diabete nel SNE sembra essere mediata dagli AGEs, attraverso l'interazione specifica con il recettore per gli AGE che prende il nome di RAGE (*receptor advanced glycation end products*), espresso dai neuroni nitrergici del MP (Korenaga et al., 2006; Voukali et al 2011). I prodotti finali della glicazione e i loro recettori sembrano essere responsabili dei danni vascolari che si verificano a seguito di DM (Yamamoto et al., 2000); l'accumulo di AGEs a livello tissutale, sembra rappresentare l'evento scatenante della deplezione di nNOS; questo meccanismo d'azione suggerisce che l'apoptosi è causata da un insieme di eventi legati ad un irreversibile accumulo di AGE a livello ematico e di conseguenza ad un accumulo a livello tissutale. Al momento non ci sono studi pubblicati che parlino degli effetti degli AGEs nell'apparato gastroenterico di cane o nella distribuzione dei RAGE a livello microvascolare e neuronale.

E' importante menzionare una valutazione che, da un punto di vista macroscopico, sembrava accumunare tutti i cani diabetici campionati nel nostro studio: si è potuto evidenziare un grado di infiammazione intestinale -da moderato a grave- con presenza di iperemia della sierosa, reattività peritoneale che è potenzialmente da considerarsi secondario ai danni che il diabete determina a livello di vasi sanguigni (Bodi et al 2012) e di conseguenza al SNE (o viceversa) (Brierley and Linden, 2014; Uranga-Ocio et al., 2015).

È necessario precisare che questo è risultato uno studio preliminare dove si è deciso di indagare solo un'unica sottopopolazione di neuroni enterici. È plausibile supporre che, altre classi di neuroni possono essere coinvolti e subire variazioni in corso di DM (come ad es i neuroni colinergici) e sarebbero quindi necessari altri

approfondimenti in merito per poter capire in maniera più globale e completa, l'impatto dello stato di iperglicemia sul SNE.

## **CONCLUSIONI**

A seguito di questo studio preliminare possiamo concludere che alterazioni della motilità del tratto intestinale di ileo, sono potenzialmente verificabili in cani affetti da diabete mellito di tipo I.

## BIBLIOGRAFIA

Aguggini Giovanni, Beghelli Biscardo, Giulio Ludovico (2004): Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Seconda Edizione, Utet Torino.

Anderson CR, Furness JB, Woodman HL, Edwards SL, Crack PJ, Smith AI (1995): Characterisation of neurons with nitric oxide synthase immunoreactivity that project to prevertebral ganglia. *J Auton Nerv Syst.*, 52: 107-116

Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M (2006): Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption; 55(5):630-7

Bagyanszki and Bodi, 2012 (2012): Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World journal of diabetes* 3, 80-93.

Barone R, (2006). *Anatomia comparata dei mammiferi domestici* , Vol. VI – Neurologia , Sistema nervoso centrale

Barone R, (2006). *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, Vol III – Splancnologia, Apparato digerente e respiratorio. pp.347-352;pp 416-422

Bassotti G, Villanacci V, Bisogni S, Rossi E, Baronio P, Clerici C, Maurer CA, Cathomas G., Antonelli E. (2007): Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. *World J. Gastroenterol.*, 13: 4035-4041

Berezin I, Snyder SH, Bredt DS, Daniel EE, (1994): Ultrastructural localization of nitric oxide synthase in canine small intestine and colon. *The American Physiological Society*

Bernardini M, (2002): Neurologia del cane e del gatto. Manuali pratici di veterinaria

Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes JH, Grundy D (2004): Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 16:28–33

Berthoud HR, Powley TL (1992): Vagal afferent innervation of the rat Fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. *J Comp Neurol* 319:261–276

Beyak MJ (2010) Visceral afferents – determinants and modulation of excitability. *Auton Neurosci* 153:69–78

Bindu Chandrasekharan, Behtash Ghazi Nezami, and Shanthi Srinivasan (2013): Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP

Bishop AE, Polak JM, Bryant MG, Bloom SR, Hamilton SH. (1980): Abnormalities of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in Crohn's disease. *Gastroenterology*;79:853-8

Bishop, AE, Hodson, NP, Major, JH, Probert, L, Yeats, J, Edwards, GB, Wright, JA, Bloom, SR, Polak, JM, (1984): The regulatory peptide system of the large bowel in equine grass sickness. *Experientia* 40, 801–806.

Bortolami, Callegari, Beghelli (2009): Anatomia e fisiologia degli animali domestici Editore: Edagricole , Edizione: III , Volume: Unico

Bortolami R., Callegari E., Clavanzani P., Beghelli V., (2009). Nuova edizione. Anatomia e fisiologia degli animali domestici. Edagricole – Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE Business Media s.r.l., Milano.

Bornstein, JC, Hendriks, R, Furness, JB, Trussell, DC, (1991): Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J. Comp. Neurol.* 314, 437–

Brehmer A , Schrodler F, Neuhuber W, Tooyama I, Kimura H, (2004): Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat* 27, 33-41.

Brierley, SM, Linden, DR, (2014): Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 611-627.

Brookes SJH, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP (2013): Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:286–296

Buchan AMJ, Baimbridge KG, (1988): Distribution and co-localization of calbindin D28k with VIP and neuropeptide Y but not somatostatin, galanin and substance P in the enteric nervous system of the rat. *Peptides*:333-338

Bush TG, Sadvige TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1998): Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell*, 93: 189-201

Burns, GA, Cummings, JF, (1991). Equine myenteric plexus with special reference to the pelvic flexure pacemaker. *Anat. Rec.* 230, 417–424

Burns, G.A., Cummings, J.F., 1991. Equine myenteric plexus with special reference to the pelvic flexure pacemaker. *Anat. Rec.* 230, 417–424.

Brookes SJH, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP (2013) Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:286–296

Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS (2003): Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia*. Jan;41(1):81-93. Review.

Julian R, Walters F, Bishop A, Facer P, Lawson E, Rogers J, Pollak J (1983): Calretinin and Calbindin D28k Immunoreactivity in the Human Gastrointestinal Tract, Departments of Medicine and Histochemistry, Royal Postgraduate Medical School, London, England;

Campieri M., (1997): *Manuale di Fisiopatologia Medica*. Editore: Esculapio, Bologna

Chiocchetti R, Grandis A, Bombardi C, Clavenzani P, Costerbosa GL, Lucchi ML, Furness JB (2004): Characterisation of neurons expressing calbindin immunoreactivity in the ileum of the unweaned and mature sheep, *Cell Tissue Res*. 2004 Nov;318(2):289-303. Epub 2004 Aug 24

Cellek S, Foxwell NA, Moncada S. (2003): Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52(9):2353-62

Cellek (2004): Point of NO return for nitrenergic nerves in diabetes: a new insight into diabetic complications. *Curr Pharm Des*. 2004;10(29):3683-95. Review.

Cellek, S, Qu W, Schmidt A, Moncada S, (2004): Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: a new insight into selective nitrenergic neuropathy in diabetes. *Diabetologia* 47, 331-339

Cellek, S., Rodrigo, J., Lobos, E., Fernandez, P., Serrano, J., Moncada, S., 1999. Selective nitrenergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide

dependent phenomenon. *Br J Pharmacol* 128, 1804-1812.

Chandrasekharan B, Srinivasan S, (2007): Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 19, 951-960

Chiocchetti R1, Grandis A, Bombardi C, Clavenzani P, Costerbosa GL, Lucchi ML, Furness JB.: (2004): Characterisation of neurons expressing calbindin immunoreactivity in the ileum of the unweaned and mature sheep. *Cell Tissue Res.* 2004 Nov;318(2):289-303. Epub 2004 Aug 24

Chiocchetti R, Grandis A, Bombardi C, Lucchi M, Tadini Dal Lago D, Bortolami R, Furness J, (2006): Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. *Cell Tissue Res* 323: 183-196

Chiochetti R, Bombardi C, Mongardi-Fantaguzzi C, Venturelli E, Russo D, Spadai A, Montoneri C, Romagnoli N, Grandis A (2009): Intrinsic innervation of the horse ileum. *Res.vet.science*, 87: 177-185

Clarke GD, Davison JS (1978): Mucosal receptors in the gastric antrum and small intestine of the rat with afferent fibres in the cervical vagus. *J Physiol* 284:55–6

Conti, autori vari a cura di Fiorenzo Conti, (2010): *Fisiologia medica*, Vol II. Seconda Edizione, Edi-Ermes - Arti Grafiche Stefano Pinelli, Milano

Costa M, Cuello AC, Furness JB, Franco R. (1980): Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*; 5: 323–31

Costa M, Hennig GW, Brookes SJH (1998) Intestinal peristalsis: A mammalian motor pattern controlled by enteric neural circuits. in Neuronal mechanisms for generating locomotor activity. eds Keihn RMH-WO, Jordan LM, Hultborn H, et al. (New York Academy of Sciences, New York), 860:464–466. Google Scholar

Costa M, Brookes SJH, Steele PA, et al.(1996) Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75:949–967. [CrossRef][Medline][Web of Science]Google Scholar

Costa M, Brookes SJH, Song Z-M (1996): From enteric neurons to peristalsis. in *Molecular mechanisms of neuronal communication*. Wenner-Gren International Series, vol. 68. eds Fuxe K, Hockfelt T, Olson L, et al. (Elsevier, Amsterdam), pp 89–110. Google Scholar

Di Giovangiulio M , Verheijden S , Goele Bosmans G, Nathalie Stakenborg N, Guy E. Boeckxstaens E Matteoli G, (2015): The Neuromodulation of the intestinal immune System and its Relevance in inflammatory Bowel Disease.

De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA, Mawe GM (2004): Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology*. Jun;126(7):1872-83

De Giorgio R., Camilleri M., (2004): Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 16, 515-531

De Giorgio R., Fustini E., Barbara G., Stanghellini V., Tonini M., Salvioli B., Guerrini S., De Ponti F., Stermini C., Corinaldesi R. (2009) “Il cervello “intestinale”: Neurologia e neurobiopatologia dell’apparato digerente”, Running Title: Fisiologia e Fisiopatologia dell’Innervazione Enterica

De Lorenzi D, Elliot D, Mc Neill E, Freiche V, Rodriguez C, Tams T, (2006): *Insidie diagnostiche e terapeutiche nei disordini gastrointestinali del cane*. Waltham focus, editore Royal Canin

Derocq JM, Se´gui M, Blazy C, (1996): Effect of substance P on cytokine production by human astrocytic cells and blood mononuclear cells: characterization of novel tachykinin receptor antagonists. *FEBS Lett*; 399:321–325

Demedts, I, Masaoka, T, Kindt, S, De Hertogh, G, Geboes, K, Farre, R, Vanden Berghe, P, Tack, J, (2013): Gastrointestinal motility changes and myenteric plexus alterations in spontaneously diabetic biobreeding rats. *J Neurogastroenterol Motil* 19, 161-170.

Desmet, AS, Cirillo, C, Vanden Berghe, P, (2014): Distinct subcellular localization of the neuronal marker HuC/D reveals hypoxia-induced damage in enteric neurons. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 26, 1131-1143

Dogiel A.S. (1885): Zur frage über die Ganglion der Darmgeflechte bei den Säugethiere. *Anat. Anz.*, 10: 517-528

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

Dogiel A.S. (1899): Über den Bau der Ganglien in den Geflechtends Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig Anat. Abt.* Jg 130-158

Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G., (2006): Testo di anatomia veterinaria, terza edizione. Antonio Delfino Editore, Roma

Ettinger S.J. e Feldman E.C., (2005): Clinica Medica Veterinaria, malattie del cane e del gatto. Sesta edizione, Volume II. Casa editrice: Elsevier Masson

Eysselein VE, Nast CC.Z 1991. Neuropeptides and inflammatory bowel disease Gastroenterol Verh. Mar;26:253-7

Evangelista S, Tramontana M. Involvement of calcitonin gene-related peptide in rat experimental colitis. *J Physiol Paris* (1993) **87**(4):277–80. doi:10.1016/0924257(93)90017-N

Faussone Pellegrini M.S., Cortesini (1984): Ultrastructural peculiarities of the inner portion of the circular layer of colon. I Research in human. *Acta Anat.* 120:185-189

Faussone-Pellegrini MS, (2006): Relationships between neurokinin receptor-expressing interstitial cells of Cajal and tachykininergic nerves in the gut, *Jan-Mar;10*(1):20-32

Feldman M., Friedman Lawrence S., Brandt Lawrence J., (2006): Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver disease. Casa Editrice Saunders Elsevier, Philadelphia. Vol I, II, ottava edizione. pp. 227

Feng B, La JH, Schwartz ES, Gebhart GF (2012): Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G1085–G1098

Ferri A, Blennerhassett P, Wang L, Bercik P, Verdu EF, Marzio L et al (2002) The

relationship between chronic colonic inflammation and mechanosensitivity. *Gastroenterology* 122:A-528

Fregonesi, CE, Miranda-Neto, MH, Molinari, SL, Zanoni, JN,(2001): Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq Neuropsiquiatr* 59, 50-53.

Furness J.B., Lloyd K.C., Sternini C., Walsh J.H. (1990a): Projection of substance P, vasoactive intestinal peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special referente to the innervation of the circular muscle. *Arch. Histol. Cytol.*, 53(2): 129-140

Furness J.B., Padbury R.T.A., Baimbndge K.C., Skinner J.M., Lawson D.E.M., (1998): Calbindin immunoreactivity IS a characteristic of enterochromaffin- like cells (ECL cells) of the human stomach. *Histochemistry* 92:449-45 1

Furness J.B., Trussel D.C., Pompolo S., Bornstein J.C., Smith T.K. (1990b): Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell. Tiss. Res.*, 260(2): 261-272

Furness JB, Costa M (1974) The adrenergic innervation of the gastrointestinal tract. *Ergeb Physiol* 69:1–51

Furness JB, Keast JR, Pompolo S. Bornstern JC, Costa M, Emson PC, Lawson DEM. Immunohistochemical evidence for the presence of calcium-binding proteins in enteric neurons. *Cell Tissue Res* 1988;252:79-87

Furness JB. Padbury RTA, Baimbndge KC, Skinner JM, Lawson DEM. Calbindin immunoreactivity IS a characteristic of enterochromaffin-like cells (ECL cells) of the human stomach. *Histochemistry* 1989;92:449-45

Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Smith TK.  
Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell Tissue Res*

Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WAA, McConalogue K. (1995): Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology*; 108: 554–63

Furness JB. Padbury RTA, Baimbridge KC, Skinner JM, Lawson DEM. Calbindin immunoreactivity is a characteristic of enterochromaffin-like cells (ECL cells) of the human stomach. *Histochemistry* 1989;92:449-451

Furness, JB, Li, ZS, Young, HM, Forstermann, U, (1994): Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res* 277, 139-149.

Furness JB., Costa M., (1987): *The Enteric Nervous System*. Edinburgh, New York. Churchill Livingstone

Furness John B., 2006. *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing Inc., 350 Main Street, Malden, Massachusetts, USA

Gabella G., (1972): Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111:69-97

Gabella G., (1974): Special muscle cells and their innervation in the mammalian small intestine. *Cell Tissue Res.* 153: 63-77

Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis (1998): *Neurogastroenterol Motil.* 1998;10(3):189-202.

Gershon 2006: *Il Secondo Cervello*, II edizione. Utet edizione Torino

Gershon MD (1990): The enteric nervous system: neurotransmitters and neuromodulators. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 3:517-522

Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, Girgis S (1985): Co-localization of calcitonin gene related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea-pigs. *Neurosci Lett* 57:125–130

Goyal Ray K., Hirano I., (1996): The enteric nervous system: mechanism of disease. *New Engl. J. Med.*, 25:1106-15

Grady EF., Baluk P., Bhm S., Gamp PD., Wong H., Payan DG., Ansel J., Portbury AL., Furness JB., McDonald DM., Bunnett NW (1996): Characterization of antisera specific to NK1, NK2 and NK3 neurokinin receptors and their utilisation to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. *J Neurosci* 16:6975-6986

Gross KJ1, Pothoulakis C. (2007): Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* Jul;13(7):918-32

Heizmann CW, Braun K. (1992): Changes in Ca-binding proteins In human neurodegenerative disorders. *Trends Neuroscr* 1992; 15:259-264

Holst MC, Kelly JB, Powley TL (1997): Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 381:81–100

Horiguchi K., Sanders K.M., Ward S.M., (2003): Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum. *Cell Tissue Res* (2003) 311: 299-313.

Huizinga J.D., Thuneberg L., Vanderwinden J.M., Rumessen J.J., (1997): Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological Huizinga Jan D., Zarate N., Farrugia G., (2009): Physiology, Injury, and Recovery of Interstitial Cells of Cajal: Basic and Clinical Science. *Gastroenterology* 2009; 137: 1548-1556

Iacopino AM, Christakos S. Specific reduction of calctum-binding protein (28-kilodalton calbrndin-D) gene expressron in aging and neurodegenerative disease *Proc Nab Acad SCI USA* 1990;87: 4078-4082.

Takahaschi T., Nakamura K.,Itoh I., Anders A., Owyan C.: Glimpaired Expression of Nitric Oxide Synthase in the Gastric Myenteric Plexus of Spontaneously Diabetic Rats

J. Sadeghinezhad, C. Sorteni, G. Di Guardo, C. D'Agostino, U. Agrimi, R. Nonno, R. Chiocchetti (2013): Neurochemistry of myenteric plexus neurons of bank vole (*Myodes glareolus*) ileum

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (2000): Principles of neural science. Fourth edition, cap. 15: Neurotransmitters. McGraw-Hill

Kaneko T., Shigemoto R., Mizuno M. (1988): Metabolism of glutamate and ammonia in astrocyte: an immunocytochemical study. *Brain. Res.*, 457: 160-164. Kazuhide et al 2003

Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S, et al. Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis (1992)*Dig Dis Sci* 1992;37:1729-1737.

Kentish SJ, O'Donnell TA, Isaacs NJ, Young RL, Li H, Harrington AM et al (2013) Gastric vagal afferent modulation by leptin is influenced by food intake status. *J Physiol* 591:1921–1934

Knowles R.G., Moncada S., (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, 298: 249-258

Koizumi J. (1974): Glycogen in the central nervous system. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 6: 1-35

Komuro T., (2006): Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract., *J Physiol* 576.3 (2006) pp 653-658

Korenaga, K., Micci, M.A., Tagliatela, G., Pasricha, P.J., 2006. Suppression of nNOS expression in rat enteric neurones by the receptor for advanced glycation end-products. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 18, 392-400

Kotzé, S.H., Van Aswegen, G., 1990. An immunohistochemical study of various peptide-containing endocrine cells and neurones at the equine ileocaecal junction. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 57, 13–17.

Kuntz A. (1938): The structural organization of the celiac ganglia. *J. Comp. Neurol.*, 69: 1-12

Le Roux CW, Neary NM, Halsey TJ, Small CJ, Martinez-Isla AM, Ghatei MA et al (2005): Ghrelin does not stimulate food intake in patients with surgical procedures involving vagotomy. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4521–4524

Li P.L., (1940): The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. *J. Anat.* 74:348-359

Li S1,2, Fei G1, Fang X1, Yang X1, Sun X1, Qian J1, Wood JD3, Ke M1 (2015) Changes in enteric neurons of small intestine in a rat model of irritable bowel syndrome with diarrhea. *J Neurogastroenterol Motil.*

Lin Z., Gao N., Hu H.Z., Liu S., Gao C., Kim G., Ren J., Xia Y., Peck O.C: Wood J.D. (2002): Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurons in guinea pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.*, 14: 197-204

Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, Mawe GM. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(5):751-60. Erratum in: *Neurogastroenterol Motil.*2005;17(6):884.

Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol.* 2003 Mar 1;547(Pt 2):589-601

Lomax A.E.G., Furness J.B. (2000): Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res.*, 302: 59-73

Lomax AE, Fernández E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(1):4-15

Mann P.T., Furness J.B., Pompolo S., Mader M. (1995): Chemical coding of neurons that project from different regions of intestine to the celiac ganglion of the guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 56: 15-25

Margolis KG1, Gershon MD, (2009): Neuropeptides and inflammatory bowel disease, *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 Nov;25(6):503-11. doi: 10.1097/MOG.0b013e328331b69e

Maudlej N., Hanani M. (1992): Modulation of dye-coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexus of the guinea- pig. *Brain Res.*, 578: 94-98

Mawe GM (1998): Nerves and hormones interact to control gallbladder function. *News Physiol Sci* 13:84–90

Mazelin L, Theodorou V, More J, Fioramonti J, Bueno L. (1998): Protective role of vagal afferents in experimentally-induced colitis in rats. *J Auton Nerv Syst* 73(1):38– 45. doi:10.1016/S0165-1838(98)00113-1

Mazzuoli G., Schemann M. (2009): Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J. Physiol.*, 587: 4681-4694

Miani A., Pizzini G., Tredici G., Zaccheo D., (1983): *Neuroanatomia Clinica di Brodal* terza edizione, Edi- Ermes, Milano

Miller JJ, Balmbridge KG. Biochemical and immunohistochemical correlates of kindling-induced epilepsy: role of calcium-binding protein. *Brain Res* 1983;278:322-326

Navari RM. Fosaprepitant: a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention

Negreanu L.M., Assor P., Mateescu B., Circstoin C. (2008): Interstitial cells of Cajal in the gut – A gastroenterologist’s point of view. *World J. Gastroenterol.*, 14: 6285-6288

Neuhuber WL, Kressel M, Stark A, Berthoud HR (1998): Vagal efferent and afferent innervation of the rat esophagus as demonstrated by anterograde Dil and DiA tracing: focus on myenteric ganglia. *J Auton Nerv Syst* 70:92–102

Neulist M., Toumi F., Oreschkova T., Denis M., Leborgne J., Laboisie C.L., Galmiche J.P., Jarry A. (2003): Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction- associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am.J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 285: 1028-1036

Newman E.A. (1993): Inward- rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J. Neurosci.*, 13: 3333-3345

Newman R, Cuan N, Hampartzoumian T, et al. (2005): Vasoactive intestinal peptide impairs leucocyte migration but fails to modify experimental murine colitis. *Clin Exp Immunol*; 139:411–420

Ny I, Alm Per, Larsson B, Andersson Karl Erik (2008): Morphological relations between haem oxygeanes, no- synthase and vip in the canine and feline gastrointestinal tracts, *Jopurnal of the autonomic nervous system of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Expert Rev Anticancer, Ther* 2008; 8:1733–1742

Page AJ, Martin CM, Blackshaw LA, (2002): Vagal mechanoreceptors and chemoreceptors in mouse stomach and esophagus. *J Neurophysiol* 87:2095–2103

Page AJ, Slattery JA, Milte C, Laker R, O’Donnell T, Dorian C et al (2007): Ghrelin

selectively reduces mechanosensitivity of upper gastrointestinal vagal afferents. *Am J Physiol* 292:G1376–G138420

Palmer, JM, Schemann, M, Tamura, K, Wood, JD, (1986): Calcitonin gene-related peptide excites myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 132, 163–170

Patterson LM., Zheng H., Ward SM., Berthoud HR (2001): Immunohistochemical identification of cholecystokinin A receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle, and enteric neurons in the rat pylorus. *Cell Tissue Res* 305: 11-23

Pernow B., (1983): Substance P. *Pharmacol. Rev.*, 35:85-141

Pidsudko Z1, Kaleczyc J, Wasowicz K, Sienkiewicz W, Majewski M, Zajac W, Lakomy M Distribution and chemical coding of intramural neurons in the porcine ileum during proliferative enteropathy. *J Comp Pathol.* 2008 Jan;138(1):23-31. Epub 2007 Dec 3.

Portbury AL., Furness JB., Young HM., Southwell BR., Vigna SR (1996): Localisation of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of guinea-pig gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 367: 342-351

Powley TL, Phillips RJ (2011) Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs, *Neuroscience* 186:188–200

Powley TL, Spaulding RA, Haglof SA (2011) Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: chemoreceptor and mechanoreceptor architecture. *J Comp Neurol* 519:644–660

Raybould HE (2010) Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. *Auton Neurosci* 153:41–46

Resibots A, Vienne G, Pochet R. (1988): CalbindinD28k and the peptidergic neuroendocrine system in rat gut: an immunohistochemical study. *Biol Cell*;63:67-75

Rijnberk A. e Kooistra HS, (2010): *Endocrinologia clinica del cane e del gatto*, seconda edizione. Casa editrice: Elsevier Masson

Rivera, LR, Leung, C, Pustovit, RV, Hunne, BL, Andrikopoulos, S, Herath, C, Testro, A., Angus, P.W., Furness, J.B., (2014): Damage to enteric neurons occurs in mice that develop fatty liver disease but not diabetes in response to a high-fat diet. *Neurogastroenterol Motil* 26, 1188-1199.

Rühl A. (2005): Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil.*, 17: 777-790

Sadeghinezhad J, Sorteni C, Di Guardo G, D'Agostino C, Agrimi U, Nonno R, Chiocchetti R. *Res Vet Sci.* (2013): Neurochemistry of myenteric plexus neurons of bank vole (*Myodes glareolus*) ileum, Dec;95(3):846-53. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.07.028. Epub 2013 Aug 6

Sadeghinezhad J, Tootian Z, Latorre R, Sorteni C, Chiocchetti R. *Anat Histol Embryol* (2013): Intrinsic innervation of the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*) ileum, Jun;42(3):201-12. doi: 10.1111/ahe.12003. Epub 2012 Sep 4

Sanders K.M., Smith T.K. (1986): Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. *J. Physiol.*, 380: 293-310

Sanders KM (1996): A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 11:492-515. [CrossRef] Google Scholar

Savidge T.C., Sofroniew M.V., Neunlist M. (2007): Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab. Invest.*, 87: 731-736

Schemann M, Grundy D (1992) Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am J Physiol* 263:G709–G718

Sengupta JN, Gebhart GF (1994): Gastrointestinal afferent fibers and sensation. In: Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd edn. Raven Press, New York, pp 483–519 Gastrointestinal afferent fibers and sensation

Sian J., Youndim M.B.H., Rieder P., Gerlach M., (1999): Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. cap.45

Siegal G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Sesta Edizione. Lippicott, Williams & Wilkins, Philadelphia

Szitter I, Pozsgai G, Sandor K, Elekes K, Kemeny A, Perkecz A, et al. (2010): The role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in dextran sulfate-induced colitis in mice. *J Mol Neurosci* (2010) **42**(1):80–8. doi:10.1007/s12031-010-9366-5

Spencer N.J., Smith T.K. (2004): Mechanosensory S-neurons rather than AH-neurons appear to generate a rhythmic motor pattern in guinea-pig distal colon. *J. Physiol.*, 558: 577-596

Spiller R, Garsed K (2009): Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136: 1979–1988

Spiller R. (2007): Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterol Motil* 19 (Suppl 2):25–31

Spiller R, Garsed K (2009): Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136: 1979–1988

Stach W., (1972): Der plexus entericus extremus des Dickdarmes und seine Beziehungen zu den interstitiellen Zellen Cajal. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 85:245-272

Sternini, C., 1991. Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 298, 39–51.

Sternini C., Su D., Gamp PD., Bunnet NW., (1995): Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 358: 531-540

Szurszewski J.H., Miller S.M. (1994): Physiology of prevertebral ganglia. In: Johnson L.R. (ed) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, USA, pp 795-877

Takahashi T, Nakamura K, Itoh H, Sima AA, Owyang C. Impaired expression of

nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. *Gastroenterology*. 1997;113(5):1535-44 Takahashi 2003

Talmage Erin K., Wendy A. Pouliot , Michael Schemann , Gary M. Mawe (1996): Structure and chemical coding of human, canine and opossum gallbladder ganglia

Tassicker B.C., Henning G.W., Costa M., Brookes S.J. (1999): Rapid anterograde and retrograde tracing from mesenteric nerve trunks to the guinea-pig small intestine in vitro. *Cell Tissue Res.*, 295: 437-452

Taxi J., (1965): Contribution a l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 12: 413-674

Thuneberg L., (1982) : Intertistial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 71: 1-130

Tjwa ET, Bradley JM, Keenan CM, Kroese AB, Sharkey KA (2003): Interleukin-1beta activates Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Dec;285(6):G1268-76. Epub 2003 Jul 24. PMID: 12881225

Tonini M., De Ponti F., Frigo G., Crema F., (2002): Pharmacology of the enteric nervous system. In: Brookes S, Costa M, eds. *Innervation of the Gastrointestinal Tract*. London, New York:Taylor & Francis, 213-294

Vannucchi MG., De Giorgio R., Fausone-Pellegrini MS., (1997): NK1 receptor expression in the interstitial cells of Cajal and neurons and tachynins distribution in rat ileum during development. *J Comp Neurol* 383: 153-162

Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci.* 2006;126-127:264-72

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

Walters, Bishop, Facer, Lawson ,Roger, Polak (1993): Calretinin and Immunoreactivity in the Human Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology*

Ward S.M. (2000): Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut (Supl IV)*, 47: iv40- iv43

Wasserman RH, Taylor AN, (1966): Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa . *Science* 1966; 152:79 I-793

Watkins CC, Sawa A, Jaffrey S, Blackshaw S, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD (2000): Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabeticgastropathy. *J Clin Invest*; 106: 373-84

Wood JD. (2008): Enteric nervous system 2008;: reflexes, pattern generators and motility. *Curr Opin Gastroenterol*

Wood JD. (2011): Enteric nervous system (the brain-in-the-gut). Morgan & Claypool Life Sciences Series. New Jersey

Young HM, McConalogue K, Furness JB, De Vente J.(1993): Nitric oxide targets in the guinea-pig intestine identified by induction of cyclic GMP immunoreactivity. *Neuroscience*. 1993 Jul;55(2):583-96.

Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Robert J.L., Squire L.R., (1999): *Fundamental neuroscience*.