

*Alma Mater Studiorum  
Università degli Studi di Bologna*

---

**Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia**

Area 05 – Scienze Biologiche  
S.S.D. BIO/14 – Farmacologia

**MESSA A PUNTO DI METODI PER LO STUDIO  
DELLA PLASTICITA' NEURONALE DEL  
SISTEMA NERVOSO ENTERICO**

Tesi di dottorato presentata da:  
**Dr. MARCO ALESSANDRI**

**Coordinatore:**  
**Prof. GIORGIO CANTELLI FORTI**

**Docente Guida:**  
**Prof. FABRIZIO DE PONTI**

---

XX ciclo

Esame finale: anno 2008



# SOMMARIO

<b>Riassunto.....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
1.1 IL SISTEMA NERVOSO ENTERICO .....	5
1.2 PLASTICITA' E NEURODEGENERAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO .....	15
1.3 COLTURE CELLULARI DI NEURONI E GLIA ENTERICI .....	21
<b>2. OBIETTIVI DELLA RICERCA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALE E METODI.....</b>	<b>26</b>
3.1 PROCEDURE SPERIMENTALI .....	26
3.2 PROCEDURE OPERATIVE STANDARD (SOP) .....	31
3.3 ANTICORPI UTILIZZATI IN IMMUNOFLUORESCENZA .....	32
3.4 SOLUZIONI, TAMPONI E TERRENI DI COLTURA.....	33
3.5 STRUMENTAZIONE ED EQUIPAGGIAMENTO .....	35
3.6 SOSTANZE UTILIZZATE .....	36
3.7 MATERIALE DI CONSUMO.....	37
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>38</b>
4.1 ALLESTIMENTO E SVILUPPO DI COLTURE DI GANGLI MIENTERICI DI CAVIA .....	38
4.2 ALLESTIMENTO E SVILUPPO DI COLTURE MISTE DI NEURONI MIENTERICI DISSOCIATI DI RATTO.....	46
4.3 SVILUPPO DI COLTURE GLIALI ENTERICHE DI RATTO.....	49
4.4 TOSSICITA DA GLUTAMMATO .....	51
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>59</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>

## Riassunto

Il sistema nervoso enterico (SNE) è una parte del sistema nervoso periferico localizzata interamente all'interno della parete intestinale ed è in grado di controllare la motilità, la secrezione ed il flusso ematico intestinale anche in assenza di innervazione centrale. E' costituito da due plessi ganglionati che contengono un elevato numero di neuroni e cellule gliali strettamente associati tra loro, in modo simile ai tessuti del sistema nervoso centrale (SNC).

Dal momento della nascita e per l'intera durata della vita, il SNE va incontro a modificazioni plastiche adattative e/o neurodegenerative, che risultano particolarmente evidenti durante l'invecchiamento o in associazione a patologie intestinali (malattia di Crohn, colite ulcerosa, colite idiopatica) ed extraintestinali (diabete, Parkinson). Alterazioni plastiche e degenerative a carico dei neuroni enterici sono considerate alla base delle alterazioni funzionali del tratto digerente.

Modelli animali sono comunemente impiegati per lo studio di questi fenomeni e nel tempo hanno fornito informazioni importanti e possibili approcci terapeutici; tuttavia la comprensione dei meccanismi molecolari necessita anche di metodiche in vitro.

La tecnologia delle colture cellulari primarie ha permesso di indagare i meccanismi molecolari alla base di numerose patologie degenerative del SNC, ma fino ad oggi ha fornito contributi modesti alla conoscenza dei fenomeni alla base delle neuropatie enteriche. Tra le cause, sicuramente si riconosce un rilevante limite tecnico-metodologico che non ha ancora consentito di ottenere colture neuronali enteriche pure; inoltre, coltivazioni neuronali da varie parti dell'intestino, da molteplici animali diversi e in differenti fasi di crescita, hanno portato una varietà di modelli sperimentali, che mancano di caratterizzazione e che rendono più ambiguo il confronto dei risultati

Questa ricerca si è posta come obiettivo lo sviluppo di modelli di colture neuronali mienteriche, determinandone le caratteristiche di crescita e di sopravvivenza; inoltre si è proposto il possibile utilizzo delle colture neuronali ottenute per studi di tossicità o come modello di studio della neurodegenerazione enterica.

Sono stati sviluppate due metodiche diverse, una che prevede la coltivazione di gangli mienterici da ileo di cavia adulta e una finalizzata alla coltivazione di neuroni mienterici dissociati da ileo di ratto. Inoltre, una coltura di glia enterica pura al 90% è stata messa a punto. E' stata verificata l'espressione dei marker neuronali più comuni ed è stata caratterizzata la componente cellulare proliferante, costituita prevalentemente da glia con poche contaminazioni di cellule simil-muscolari. A causa del crescente rapporto glia/neuroni, le colture possono essere utilizzate meglio nel breve termine quando la condizione è

paragonabile a quella in vivo; in alternativa possono essere mantenute per tempi più lunghi in presenza di inibitori mitotici, quali ARA C, che mostrano però come svantaggio qualche manifestazione morfologica di tossicità.

La sopravvivenza neuronale è stata verificata contando i neuroni dopo diversi giorni di coltura ed utilizzando approcci statistici diversi a seconda del tipo di coltura. Una mortalità dell'ordine del 20% è stata identificata entro i primi 5 giorni di coltivazione; i pochi altri studi descritti in letteratura relativi alla sopravvivenza neuronale, mostrano mortalità più sostenute, intorno al 50%.

E' stata scelta la tossicità da glutammato come modello sperimentale di neurodegenerazione anche perché, sebbene ampiamente documentata nel SNC, è stata poco studiata a livello enterico. Alte concentrazioni di glutammato sono necessarie per evocare neurotossicità enterica a causa di una abbondante presenza gliale che esprime il trasportatore EAAC1. Forme degenerative più marcate sono state riscontrate in tessuti incubati con glutammato (riduzione di sopravvivenza già significativa a 300uM) piuttosto che sulle colture cellulari (mortalità significativa a 3mM); probabile causa di questo fenomeno è la maggiore proporzione di cellule gliali presenti in coltura, che svolgono funzione protettiva. Almeno in parte, la morte neuronale avviene mediante frammentazione nucleare simil-apoptotica.

Popolazioni di gangli di grandi dimensioni e di piccole dimensioni esibiscono differenze durante lo sviluppo colturale e durante la risposta neurodegenerativa al glutammato; anche in questo caso è probabile che il diverso contenuto di glia influenzi il comportamento neuronale. Nella prospettiva di studi futuri si ritiene utile proporre l'utilizzo di colture neuronali enteriche il cui sviluppo e sopravvivenza in vitro siano state caratterizzate. Inoltre, il raggiungimento di colture con popolazioni gangliari più omogenee, o con ridotta crescita gliale, dovrebbero essere considerate come obiettivi primari al fine di ottenere risultati più facilmente comparabili.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL SISTEMA NERVOSO ENTERICO

Il sistema nervoso enterico (SNE) è una parte del sistema nervoso periferico deputata al controllo del tratto gastrointestinale. Il sistema nervoso enterico è considerato capace di coordinare i riflessi in modo autonomo e dirigere la motilità, la secrezione e il flusso sanguigno intestinale in modo indipendente, anche in assenza di innervazione centrale; queste caratteristiche permettono di classificarlo come divisione del sistema nervoso autonomo<sup>1,2</sup>. In condizioni normali, comunque, le funzioni del SNE sono modulate dai centri superiori attraverso innervazione vagale, mesenterica e pelvica.

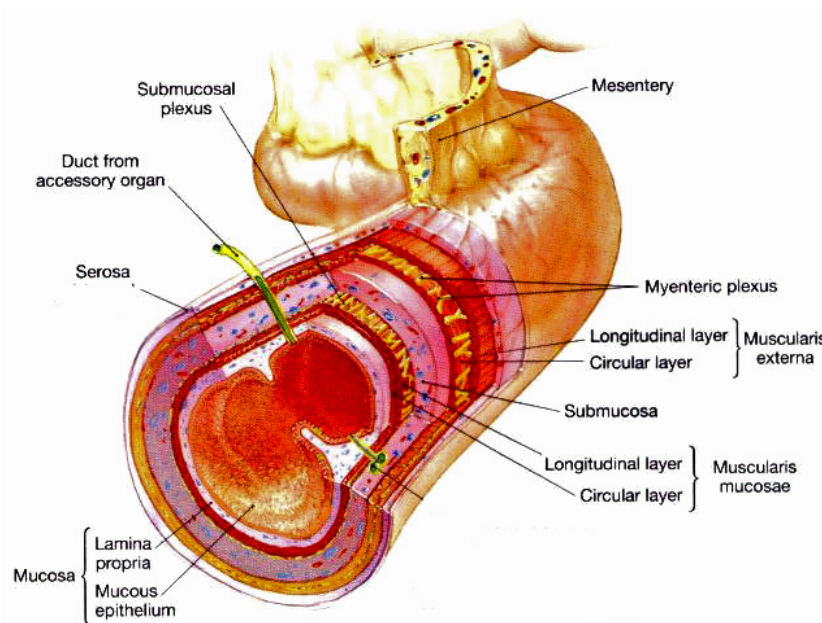
Anatomicamente, il SNE è localizzato entro la parete del tratto gastrointestinale, distribuendosi in tutta la circonferenza e la lunghezza del tubo digerente, dall'esofago all'ano (Fig.1). Strutturalmente appare organizzato in due plessi ganglionati maggiori, il **plesso mienterico** (di Auerbach) ed il **plesso sottomucoso**. Ogni plesso è formato da cellule nervose, dai loro assoni e da cellule gliali enteriche, strettamente interconnessi tra loro a formare una maglia a rete (network); la maggior parte dei corpi cellulari è compresa in gruppi compatti, i gangli, che formano i nodi della rete, mentre gli assoni costituiscono le fibre che interconnettono tra loro i gangli o innervano tessuti effettori, quali muscolo e mucosa<sup>1</sup>.

Il plesso mienterico è situato tra lo strato di muscolatura longitudinale (esterna) e lo strato di muscolatura circolare (interna) che, nel loro insieme, compongono la tonaca muscolare che riveste interamente il tratto digerente (Fig.1,2). La morfologia del network mienterico è variabile in quanto a forma, orientamento e densità gangliare da una parte all'altra dell'intestino. Circa i due terzi dei neuroni del SNE sono ospitati nei gangli mienterici, che pertanto appaiono a più alta densità neuronale rispetto ai gangli sottomucosi. I neuroni mienterici innervano prevalentemente la tonaca muscolare, guidando per gran parte il controllo della motilità intestinale.

Il plesso sottomucoso è localizzato nella tonaca sottomucosa, tra lo strato di muscolatura circolare e la muscolaris mucosae (Fig.1,2). E' costituito da gangli stratificati a diversi livelli e nei mammiferi di grandi dimensioni è spesso descritto come due plessi distinti, quello sottomucoso interno (di Meissner) vicino al lato serosale della muscolaris mucosae, e quello

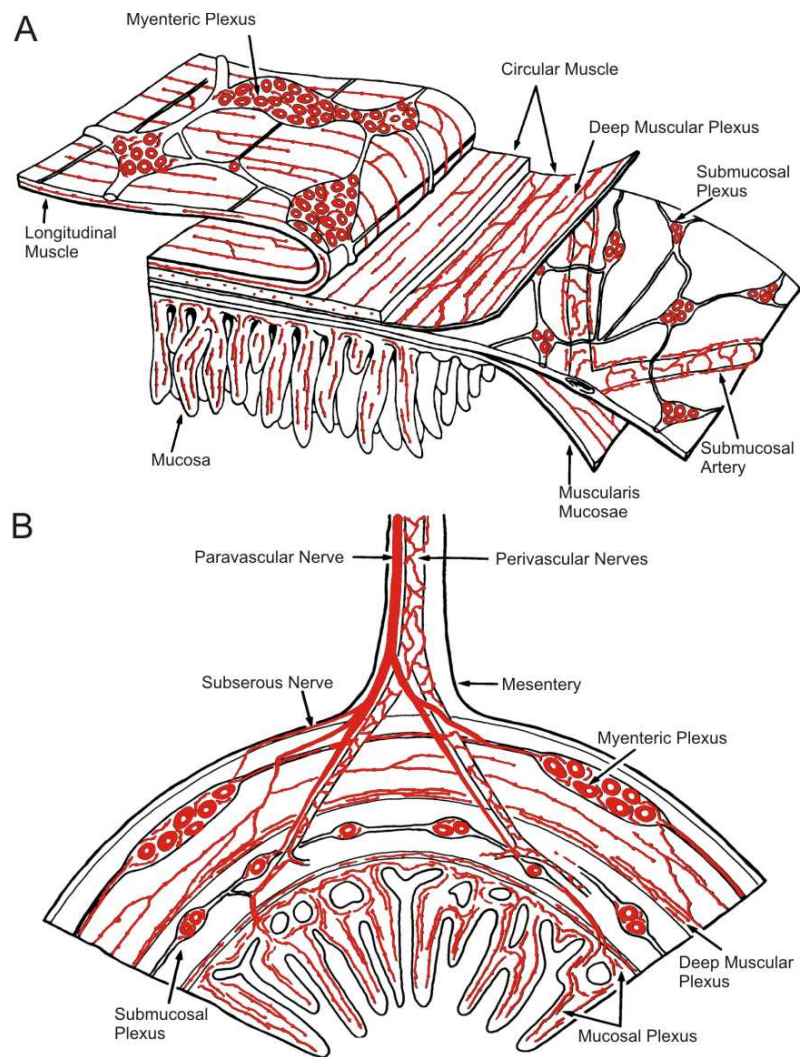
sottomucoso esterno (di Schabadasch). Il plesso sottomucoso è presente nei tratti del piccolo intestino e nel colon; a livello dello stomaco e dell'esofago invece, vi sono pochi gangli distribuiti senza soluzione di continuità e, pertanto, non costituiscono un vero e proprio plesso. I neuroni sottomucosi innervano il muscolo circolare liscio ma soprattutto le strutture della mucosa, i vasi sanguigni sottomucosi e la muscolaris mucosae; di conseguenza il plesso sottomucoso appare più coinvolto nel controllo delle secrezioni e dell'assorbimento.

L'innervazione *intrinseca* del SNE è costituita da fibre che interconnettono i gangli e li congiungono al muscolo, all'epitelio mucoso, alle arteriole, alle ghiandole della mucosa e ad altri effettori; oltre a questa, anche una innervazione *estrinseca* (cioè formata da fibre che originano da neuroni esterni alla parete intestinale) raggiunge il tubo gastrointestinale attraverso il nervo vago, i nervi mesenterici e pelvici. Si tratta di fibre costituite sia da una componente afferente sensoriale, che proietta al sistema nervoso centrale tramite i gangli delle radici dorsali (DRG) ed il midollo spinale, sia da una componente efferente simpatica e parasimpatica, che modula tutte le funzioni gastrointestinali.



**Fig.1** Rappresentazione esemplificativa del tubo gastrointestinale e visualizzazione degli strati che ne compongono la parete.





**Fig.2** Rappresentazione dettagliata degli strati che costituiscono la parete intestinale; in rosso sono raffigurati i neuroni all'interno dei plessi ganglionari e le fibre nervose. **A**, separazione degli strati della parete intestinale; **B**, rappresentazione in sezione trasversale della parete. Adattamento da Ref.1

### 1.1.1 Neuroni enterici

Il numero complessivo dei neuroni enterici in un mammifero è secondo solo al cervello e al midollo spinale (nell'uomo è dell'ordine di  $10^8$ ); la quasi totalità di questi è distribuita nei gangli dei due plessi principali. Nel corso degli anni i neuroni enterici sono stati classificati secondo criteri morfologici, proprietà elettrofisiologiche, colorazioni immunostochimiche e caratteristiche funzionali <sup>1,3</sup>.

Tra il 1895 e il 1899 Dogiel ha messo a punto la prima classificazione morfologica dei neuroni enterici, identificando e illustrando 3 tipi neuronali in base alla forma del corpo cellulare, dei dendriti e degli assoni; successivamente, con l'avvento di tecniche più raffinate (es. dye filling), questa classificazione è stata estesa fino a raggruppare 8 diversi tipi di neuroni in un ampio numero di specie animali <sup>1</sup>.

Studi di elettrofisiologia hanno descritto il potenziale di membrana dei neuroni enterici meno negativo rispetto ai neuroni centrali (da -40 a -70 mV) <sup>3</sup>; come per questi ultimi, correnti depolarizzanti si accompagnano a risposte eccitatorie mentre correnti iperpolarizzanti inducono inibizione. In base a registrazioni elettrofisiologiche intracellulari si sono identificati due tipi di neuroni enterici con diverse proprietà: i neuroni S e AH. I neuroni S sono caratterizzati da elevata eccitabilità e possono esibire veloci potenziali post-sinaptici eccitatori (EPSPs); i potenziali d'azione sono sensibili alla tetrodotossina (TTX) e sono seguiti da una corrente iperpolarizzante di breve durata (20-100 ms), che ripristina velocemente il potenziale di membrana. Al contrario, i neuroni AH mostrano ampi potenziali d'azione (insensibili alla TTX), seguiti da una fase di lenta iperpolarizzazione che dura dai 2 ai 30 secondi e che li rende meno eccitabili <sup>1</sup>.

I neuroni enterici sintetizzano e secernono in modo specifico un'ampia varietà di messaggeri chimici utilizzati nella comunicazione sinaptica, dalle piccole molecole con funzione neurotrasmettitoriale (es. acetilcolina, serotonina), ai neuropeptidi (es. CGRP, somatostatina, sostanza P, VIP), ai gas (es. ossido nitrico). Ogni neurone è in grado di esprimere il proprio 'codice chimico' (chemical coding), cioè un insieme di molecole utilizzate nella neurotrasmissione o nella modulazione dei segnali che lo caratterizza e che può essere identificato mediante tecniche immunostochimiche. L'interazione del neuromediatore con uno specifico recettore è in grado di generare risposte cellulari; si distinguono neurotrasmissioni di tipo eccitatorio (in grado di dare EPSP) e inibitorio (che generano IPSP, potenziali post-sinaptici inibitori), eventi di inibizione o facilitazione presinaptica <sup>3</sup>.

Anche se la maggior parte delle informazioni disponibili sui neuroni enterici sono relative all'ileo di cavia, che tradizionalmente è il modello animale più utilizzato, è possibile correlare le diverse caratteristiche classificative per identificare categorie funzionali di neuroni che trovano equivalenza in molte altre specie di mammifero. Funzionalmente si distinguono

neuroni sensoriali, neuroni motori, interneuroni, neuroni secretomotori e vasomotori (le caratteristiche sono riassunte in Tab.1 e Fig.3).

I neuroni sensoriali rispondono ad una grande varietà di eventi, dalla distensione della parete agli stimoli chimici e meccanici nella mucosa; possono essere afferenti estrinseci (EPANs, enteric primari afferent neurons), o intrinseci (IPANs, intrinsic primary afferent neuron): i primi, con il corpo cellulare esterno all'intestino, portano le informazioni di sensibilità verso il SNC attraverso le fibre vagali o i gangli delle radici dorsali; gli IPANs invece, presenti sia nei gangli mienterici che sottomucosi, probabilmente guidano i circuiti dei riflessi locali. Morfologicamente gli IPANs sono Dogiel di tipo II e mostrano le caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni AH; come trasmettitori utilizzano tachichinine (TK), acetilcolina (ACh) e CGRP (calcitonin gene related peptide)<sup>1-4</sup>.

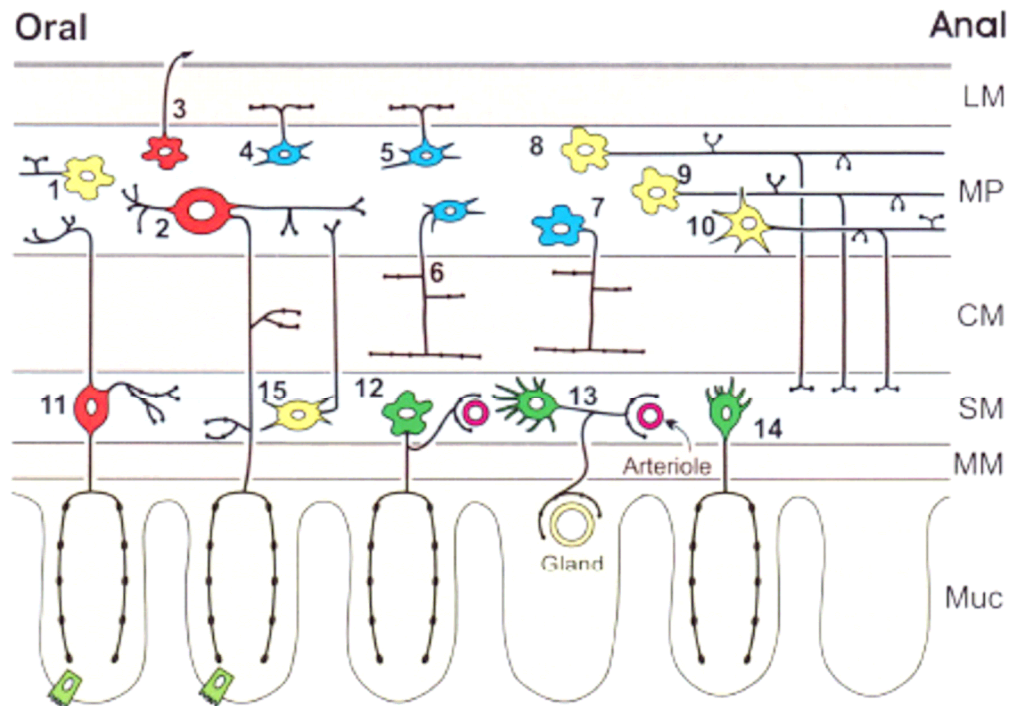
Gli interneuroni sono coinvolti nella formazione di circuiti locali; se ne distinguono tre classi con proiezioni discendenti ed una ascendente. Gli interneuroni ascendenti sono colinergici, così come i discendenti, che però hanno un 'chemical coding' più complesso: alcuni contengono in aggiunta somatostatina, altri serotonina, altri ancora NOS.

I neuroni motori muscolari sono eccitatori o inibitori e innervano il muscolo circolare, longitudinale e la muscolaris mucosae determinandone la contrazione o il rilassamento; hanno morfologia uni-assonale ed elettrofisiologicamente corrispondono al tipo S. I motoneuroni che innervano il muscolo circolare hanno per la maggior parte il corpo cellulare nel plesso mienterico; si distinguono gli eccitatori, che utilizzano ACh e TK e proiettano in senso orale, dagli inibitori, che utilizzano NO (ossido nitrico) e VIP (vasoactive intestinal peptide) e hanno proiezioni discendenti (dirette in senso anale). Questa disposizione consente di generare risposte muscolari polarizzate in seguito ad una stimolazione regionale: contrazione in direzione orale e rilassamento in senso anale; la coordinazione spazio temporale di queste risposte dà luogo alla peristalsi<sup>1-4</sup>. I motoneuroni che innervano il muscolo longitudinale hanno il corpo cellulare nel plesso mienterico e numericamente ne rappresentano il 25% della popolazione; la distribuzione dei tipi eccitatori e inibitori è variabile nei diversi tratti del tubo digerente<sup>1-4</sup>.

Neuroni secretomotori e vasomotori controllano principalmente le secrezioni ed il flusso ematico locale. La localizzazione è prevalente nei gangli sottomucosi e in piccola percentuale in quelli mienterici, e l'innervazione è diretta alla mucosa e alle arteriole sottomucose. Si distinguono neuroni vasomotori/secretomotori non-colinergici (VIP immunoreattivi) e colinergici (calretinina immunoreattivi); un terzo gruppo di neuroni, solo secretomotore, è di tipo colinergico e contiene neuropeptide Y (NPY).

Definizione Funzionale	Proporzione	Morfologia	Chemical coding	Trasmittitore/Cotrasmittitore
<i>Plesso mienterico</i>				
Motoneuroni eccitatori del musc. circolare (6)	12%	Dogiel I	corti: ChAT/ TK/ ENK/ GABA lunghi: ChAT/ TK/ ENK/ NFP	primario: ACh, cotrasmittitore: TK
Motoneuroni inibitori del musc. circolare (7)	16%	Dogiel I	corti: NOS/ VIP/ PACAP/ ENK/ NPY/ GABA lunghi: NOS/ VIP/ PACAP/ dinorfina/ BN/ NFP	vari cotrasmittitori (NO, ATP, VIP)
Motoneuroni eccitatori del musc. longitudinale (4)	25%	Dogiel I	ChAT/ calretinina/ TK	primario: ACh, cotrasmittitore: TK
Motoneuroni inibitori del musc. longitudinale (5)	2%	Dogiel I	NOS/ VIP/ GABA	vari cotrasmittitori (NO, ATP, VIP)
Interneuroni Ascendenti (1)	5%	Dogiel I	ChAT/ calretinina/ TK/ ENK	primario: ACh, cotrasmittitore: TK
Interneuroni Discendenti (8)	5%	Dogiel I	ChAT/ NOS/ VIP-BN-NPY	primario: ACh, cotrasmittitore: ATP?
Interneuroni Discendenti (9)	2%	Dogiel I	ChAT/ 5-HT	primario: ACh, cotrasmittitore: 5-HT
Interneuroni Discendenti (10)	4%	Dogiel III	ChAT/ SOM	primario: ACh
IPAN mienterici (2)	26%	Dogiel II	ChAT/ TK/ orexina/ IB4/ NK <sub>3</sub> rec./ NeuN/ calbind.	primario: TK, ACh o CGRP
Neuroni che proiettano fuori dall'intestino (3)	<1%	Dogiel I	ChAT/ BN/ VIP/ NOS/ CCK/ ENK	primario: ACh, cotrasmittitore: VIP
<i>Plesso Sottomucoso</i>				
Secretomotori/Vasomotori non-colinergici (12)	45%	Dogiel I	VIP/ CRF/ GAL/ PACAP	primario: VIP
Secretomotori/Vasomotori colinergici (13)	15%	Stellato	ChAT/ calretinina/ dinorfina	primario: ACh
Secretomotori colinergici, non vasomotori (14)	29%	Dogiel IV	ChAT/ NPY/ CCK/ SOM/ CGRP/ dinorfina	primario: ACh
Neuroni che proiettano al plesso mienterico (15)	1%	Uni-assonale	VIP/ NOS?	
IPAN sottomucosi (11)	11%	Dogiel II	ChAT/ TK/ orexina/ IB4/ NeuN/ calbindina	primario: ACh, forse TK, CGRP

**Tab1.** Tipi di neuroni enterici. Ach, acetilcolina; BN, Bombesina; CCK, colecistochinina; ChAT, colina acetiltransferasi; CGRP, calcitonin gene related product; CRF, corticotrophin-releasing factor; ENK, enkefalina; GABA, acido  $\gamma$ ammino butirrico; GAL, galanina; 5-HT, serotonina; IB4, isolectina B4; NK, neurokinina; NOS, ossido nitrico sintasi; NPY, neuropeptide Y; PACAP, pituitary adenylyl ciclase activating peptide; SOM, somatostatina; TK, tachichinine; VIP, vasoactive intestinal peptide. *Adattamento da Ref.1.*



**Fig.3** Rappresentazione dei tipi di neuroni enterici, classificati secondo funzione e ‘chemical coding’. I numeri fanno riferimento a quelli indicati in Tab.1 Adattamento da Ref.1

Il numero di neurotrasmettitori/neuropeptidi utilizzato dai neuroni enterici nella neurotrasmissione è molto ampio. Il ruolo di alcuni mediatori come acetilcolina, ossido nitrico, serotonina, tachichinine e VIP sembra svolgere un ruolo di primo piano nella comunicazione neuronale; altre sostanze come glutammato e GABA che hanno ampia diffusione nel SNC, rivestono una funzione minore – o non ancora del tutto caratterizzata – a livello enterico.

E’ interessante notare come molti neuropeptidi rappresentino un ‘linguaggio’ parlato non solo dai neuroni ma da altri tipi cellulari presenti nelle strette vicinanze, in particolar modo cellule immunitarie e cellule enteroendocrine.

La lamina propria e l’epitelio della mucosa intestinale ospitano al loro interno il tessuto linfoide associato all’intestino (‘gut associated lymphoid tissue’ o GALT) che comprende oltre un elevato numero di linfociti e cellule epiteliali specializzate sulle placche di Peyer, anche mastociti, macrofagi e granulociti<sup>5</sup>. Alcune di queste cellule esprimono i recettori per i principali neuropeptidi e generano risposte cellulari se stimolate. Sono stati descritti sia effetti inibitori sulla proliferazione dei linfociti (CGRP, somatostatina e VIP) sia effetti stimolatori (met-enkefalina e SP)<sup>5</sup>; inoltre, alcuni neuropeptidi possono regolare la secrezione di citochine da parte dei linfociti T ed influenzare il differenziamento in senso Th1 o Th2<sup>5</sup>;

infine, VIP, somatostatina e SP controllano la sintesi delle IgA prodotte dalle cellule B<sup>5</sup>. In alcuni casi la comunicazione neurone-immunocita è bidirezionale; per esempio il neuropeptide regola la produzione di citochine da parte del linfocita e del macrofago e le stesse citochine influenzano l'attività del neurone; i mastociti possono rispondere alla stimolazione con neuropeptidi rilasciando istamina, che eccita i neuroni.

Le cellule enteroendocrine sono cellule specializzate, localizzate nella mucosa dell'intero tratto digestivo, in particolare nel duodeno; sono ricche di uno specifico corredo di neurotrasmettitori ma soprattutto neuropeptidi, diverso a seconda della regione intestinale in cui sono situate<sup>3</sup>. Stimoli meccanici, osmotici e prodotti batterici possono attivare in queste cellule il rilascio dei mediatori, tra cui serotonina, somatostatina, colecistochinina<sup>3</sup>. L'esocitosi delle cellule enteroendocrine attiva le terminazioni nervose presenti nelle vicinanze.

La comunicazione dei neuroni enterici con altri tipi cellulari, probabilmente attraverso meccanismi non sinaptici, rappresenta pertanto un'importante caratteristica di queste cellule, che le differenzia dai neuroni del SNC.

### **1.1.2 Cellule Gliali enteriche**

Le cellule gliali enteriche rappresentano la più numerosa popolazione cellulare del sistema nervoso enterico. Al pari dei neuroni, la glia enterica origina dagli stessi progenitori della cresta neurale; durante lo sviluppo embrionale, infatti, cellule progenitrici con proprietà staminali migrano attraverso il tratto gastrointestinale in via di formazione, colonizzandolo e differenziandosi successivamente in neuroni e glia, in un microambiente strettamente controllato<sup>6,7</sup>.

Nell'intestino adulto la glia enterica è localizzata per la maggior parte nei gangli dei due plessi principali, dove occupa i ristretti spazi interneuronali e avvolge i neuroni; cellule gliali sono presenti anche lungo le fibre nervose di connessione intergangliare. Inoltre, corpi cellulari e processi gliali sono stati osservati anche a livello del plesso mucoso (o plesso sottomucoso interno), alla base delle cripte, dove stabiliscono contatti con le cellule epiteliali della mucosa<sup>6</sup>.

Morfologicamente le cellule gliali appaiono di forma 'stellata', costituite da numerosi processi; mentre in vivo esibiscono una complessa architettura tridimensionale, quando sono coltivate in monostrato assumono diverse forme, da simil-epiteliale con citoplasma esteso a multipolare con processi lunghi e sottili. Possono essere identificate immunoistochimicamente tramite due marcatori considerati specifici nel SNE: S100, proteina nucleare e citoplasmatica in grado di legare il Ca<sup>2+</sup> e GFAP, filamento intermedio costituente

del citoscheletro <sup>6</sup>. I livelli d'espressione di questi marcatori non sono però costanti: sia nel SNE che nel SNC l'espressione di GFAP è modulata dall'infiammazione, in particolare dall'Interleukina-1 <sup>8,17</sup>; la stessa citochina appare coinvolta anche nella regolazione dei livelli di S100, almeno negli astrociti del SNC <sup>9</sup>. Sembra pertanto che la regolazione dinamica dei livelli di GFAP rispecchi uno stato funzionale della cellula, anche se le funzioni esatte di GFAP non sono state del tutto chiarite.

Alcune osservazioni sperimentali fanno pensare che la popolazione di cellule gliali non sia del tutto omogenea. Tra la glia enterica, per esempio, è stata proposta la presenza di due sottopopolazioni, una GFAP positiva e una negativa, o perlomeno a bassa espressione del marker <sup>8,6</sup>; precedentemente, anche tra gli astrociti del SNC era stata descritta una distribuzione eterogenea di GFAP, associata ad una distribuzione di canali ionici altrettanto eterogenea <sup>10</sup>. E' possibile che simili osservazioni derivino soltanto da artefatti sperimentali, oppure che la glia abbia un'elevata plasticità. Bisogna però considerare che, essendo l'identificazione di una cellula gliale basata sulla presenza dei marker S100 o GFAP, nel momento in cui la riproducibilità della marcatura è messa in dubbio altrettanto incerta ne risulta la classificazione. Un'ipotesi affascinante – lontano dall'essere dimostrata – è che le sottopopolazioni di cellule che esprimono diversamente i due marker rappresentino diversi stadi di maturazione. Nel SNC infatti, è stato recentemente osservato come l'espressione di S100b all'interno di una popolazione GFAP+ di cellule staminali neuronali correli con la perdita del fenotipo multipotente e l'acquisizione di uno stadio maturo <sup>11</sup>.

Secondo molti ricercatori, le cellule gliali enteriche condividono numerose caratteristiche morfologiche e funzionali con gli astrociti del SNC. Oltre a svolgere ruolo di supporto strutturale, che a livello enterico significa contenere le numerose stimolazioni meccaniche, hanno un'importante funzione trofica, dimostrata dalla produzione di neurotrofine come GDNF e NT-3 <sup>6</sup>. Modelli murini di ablazione condizionale della glia enterica, condotti con diversi approcci transgenici <sup>12-15</sup>, mostrano come la rimozione delle cellule gliali enteriche produca una infiammazione fulminante, che si sviluppa a partire dalla perdita di integrità mucosale e vascolare. Sulla base di queste osservazioni è stato suggerito un ruolo determinante della glia enterica nella regolazione di una 'barriera' di permeabilità intestinale, che rievoca la funzione degli astrociti centrali nella barriera ematoencefalica <sup>16</sup>. Questa affermazione non si riferisce solo all'evidenza di un'interfaccia glia-endotelio nei capillari che affiancano i gangli <sup>6</sup>, ma sottolinea la funzione della glia di stabilire contatti con l'epitelio mucoso e di regolarne la sopravvivenza e l'integrità attraverso una comunicazione mediata da fattori solubili (GDNF, TGF $\beta$ , s-nitrosoglutazione, ..) <sup>6,15,16</sup>

Da un lato quindi, la glia enterica appare coinvolta nella costruzione attiva di un microambiente protettivo per l'integrità del SNE; dall'altro lato, numerose evidenze

sostengono una partecipazione gliale alla neurotrasmissione, con un ruolo simile agli astrociti del SNC, ancora in gran parte da comprendere. Cellule gliali contribuiscono alla sintesi e rimozione di neurotrasmettitori, per es. rimuovendo il GABA attraverso il trasportatore GAT2 e riciclando il glutammato tramite la glutammina sintetasi, che restituisce una sorgente di glutammina per la neo-sintesi neuronale di neurotrasmettitori<sup>6</sup>; la glia costituisce inoltre una fonte di L-arginina, precursore essenziale per la sintesi neuronale di ossido nitrico<sup>6</sup>. E' stata rilevata la presenza di recettori  $\alpha 2a$  adrenergici mediante immunistochimica<sup>19</sup> e l'espressione di subunità recettoriali per il glutammato mediante RT-PCR<sup>18</sup>, anche se non ne è stata accertata la funzionalità né un ruolo sinaptico. Cellule gliali enteriche inoltre, possono rispondere ad agonisti comuni della trasmissione neuronale, come ATP, serotonina, istamina; alcune di queste molecole inducono incrementi di  $Ca^{2+}$  citosolico, che si propagano da una cellula all'altra in onde citoplasmatiche, attraverso gap-junction<sup>6</sup>. Infine, come i neuroni, segnalano eventi precoci di attivazione tramite espressione di *c-fos*: ciò avviene in seguito a stimolazione meccanica<sup>6</sup> o in risposta a citochine pro-infiammatorie come Interleukina-1<sup>17</sup>. Un'idea della complessa interrelazione tra neuroni e glia nel SNE giunge da un recente lavoro, in cui viene indotta ablazione di glia enterica in un modello murino, mediante cellule CD8+ attivate, senza coinvolgimento infiammatorio: in questo sistema si è osservato un cambiamento del 'chemical coding' neuronale enterico senza aver osservato alcuna diminuzione del numero complessivo di neuroni<sup>14</sup>. Non è chiaro il meccanismo responsabile di questo evento, né la funzione gliale mancante che lo possa aver determinato: è evidente però l'influenza delle cellule gliali nella normale trasmissione neuronale.



## 1.2 PLASTICITA' E NEURODEGENERAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO

Il sistema nervoso enterico durante la vita va incontro a numerosi cambiamenti, che iniziano già alla nascita, quando lo sviluppo neuronale e gliale non è ancora terminato e una certa percentuale di neuroni non ha ancora raggiunto il differenziamento neurochimico definitivo<sup>7,59</sup>; la ridefinizione plastica delle strutture, della forma e delle funzioni dei neuroni prosegue “silenziosamente” nel corso della vita adulta e della vecchiaia, in cui appare evidente nelle modalità dell’invecchiamento cellulare e della neurodegenerazione. Patologie intestinali (malattia di Crohn, colite ulcerosa, costipazione idiopatica, displasia neuronale, achalasia) o extraintestinali (diabete, malattia di Parkinson) rappresentano probabilmente situazioni estreme, esemplificative dei cambiamenti adattativi e/o degenerativi a cui può andare incontro nel tempo il SNE<sup>59</sup>.

In condizioni non patologiche, da dove giungono gli stimoli e i cambiamenti che promuovono le risposte plastiche? Uno degli aspetti più affascinanti dello studio della plasticità del SNE riguarda l’importanza strategica della localizzazione, e quanto quest’ultima influenzi le funzioni neuronali. I neuroni enterici sono continuamente soggetti a stimoli che giungono dall’ambiente esterno, attraverso gli afferenti sensoriali (IPANs), e stimoli interni, modulatori, che provengono dall’innervazione autonoma. Inoltre, il microambiente costituito dalla parete intestinale è uno tra i più complessi che si possa immaginare, dove trovano spazio oltre ai neuroni e alla glia anche cell. muscolari, cell. interstiziali di Cajal e cell. immunitarie. Tutti questi tipi cellulari sono in grado di comunicare tra loro a con modalità sinaptiche o paracrine, in quanto esprimono un corredo parzialmente condiviso di neuromediatrici, neuropeptidi, neurotrofine e citochine<sup>5</sup>; questo ‘cross-talk’ modula continuamente lo stato funzionale dei neuroni<sup>59</sup>, influenzando lo svolgimento delle funzioni motorie, digestive e secretive. Infine, non bisogna dimenticare l’importanza che svolgono i nutrienti assunti con la dieta e la flora batterica; i continui cambiamenti di questi due fattori esercitano un ruolo fondamentale nelle modificazioni della permeabilità mucosale, nell’attivazione di cellule enteroendocrine residenti nella mucosa<sup>4</sup> e nella modulazione immunitaria, fenomeni che indirettamente esercitano un’azione anche sul SNE.

Non sorprende quindi che il sistema nervoso enterico sia soggetto a fenomeni plastici come risposta adattativa spazio-temporale alle condizioni esterne che cambiano, ed esibisca in situazioni patologiche eventi degenerativi.

### 1.2.1 Invecchiamento e SNE

L'invecchiamento in assenza di patologie è una delle cause di morte neuronale enterica meglio documentate, anche se, al pari degli altri fenomeni di senescenza cellulare, i meccanismi responsabili non sono stati del tutto compresi. La perdita di neuroni enterici può essere causa dei disturbi gastrointestinali e della costipazione cronica frequenti nei soggetti anziani.

Nell'uomo, sono state riportate evidenze di diminuzione del numero di neuroni mienterici confrontando biopsie intestinali di individui di diversa età; tra gruppi di 20-40 anni e gruppi di over 65 si è osservata una riduzione del contenuto di neuroni mienterici del 34% nel piccolo intestino<sup>23</sup> e del 37% nel colon<sup>22</sup>. In modo simile, Hanani descrive un incremento di gangli 'anomali', ossia gangli contenenti cavità al loro interno, correlato con l'età<sup>24</sup>.

Numerosi studi su animali hanno evidenziato che la neurodegenerazione enterica associata all'invecchiamento è una caratteristica comune a molte specie<sup>20,21</sup>. Phillips e colleghi hanno condotto ricerche dettagliate sulla densità neuronale enterica in ratti Fischer 344 di diversa età, identificando, in entrambi i plessi, un andamento lineare continuo di scomparsa neuronale con l'invecchiamento che inizia a 12 mesi<sup>20</sup>. Il grado di severità della neurodegenerazione aumenta percorrendo il tubo digerente in direzione aborale: è più moderato nello stomaco, si amplifica nell'intestino ed è massimo nel colon<sup>20</sup>. Oltre alla scomparsa dei corpi neuronali nei gangli enterici sono state osservate fibre nervose "gonfie" e ipertrofiche nei SNE senescenti.

La perdita di neuroni non si manifesta in modo indiscriminato o casuale, bensì riguarda sottopopolazioni ben definite. Neuroni colinergici sembrano essere il principale bersaglio della degenerazione<sup>20,21,25</sup>; tra questi, i neuroni che esprimono proteine leganti il Ca<sup>2+</sup> quali calbindina e calretinina mostrano le perdite più sostenute, associate a degenerazione degli assoni<sup>20,21</sup>. Al contrario, i neuroni nitrergici sono ben conservati durante l'invecchiamento, pur manifestando modificazioni plastiche quali segni di rigonfiamento assonale e diminuzione della sintesi di ossido nitrico sintasi<sup>20,21</sup>.

Le cellule gliali enteriche diminuiscono di numero parallelamente ai neuroni, anche se il rapporto glia/neuroni aumenta. Le relazioni che intercorrono tra la perdita dei neuroni e della glia sono in gran parte inesplorate, in particolare non è chiaro se vi sia un nesso causa-effetto oppure se i fenomeni siano indipendenti<sup>20</sup>.

Al presente, l'unica condizione in grado di rallentare la perdita neuronale enterica dovuta all'invecchiamento sembra essere la restrizione calorica<sup>25</sup>.

### 1.2.2 Diabete e neuropatia enterica

Il diabete è una delle più frequenti cause di neuropatie periferiche; i sintomi gastrointestinali riportati da numerosi pazienti (dolore addominale, costipazione, alterazione della funzione motoria) sono considerati spesso una conseguenza di neuropatia enterica. In realtà esistono pochi studi realizzati sul SNE di pazienti diabetici; in uno studio case-report è stata compiuta un'analisi morfologica che descrive una diminuzione di fibre nervose PGP9.5-immunoreattive associata ad una riduzione di innervazione inibitoria (nNOS, VIP, PACAP)<sup>27</sup>; un altro studio su un campione più ampio fornisce evidenze di una riduzione di immunoreattività per nNOS e SP, senza tuttavia fornire evidenze di morte neuronale<sup>28</sup>.

I modelli animali di diabete sono stati spesso utilizzati per comprendere le modificazioni a cui è soggetto il sistema nervoso enterico; bisogna però tenere conto che ogni modello ha caratteristiche diverse<sup>26</sup> e le modificazioni descritte a carico del SNE, talvolta contraddittorie, possono riguardare il modello utilizzato piuttosto che la malattia. Numerosi studi, comunque, descrivono una riduzione del numero di neuroni nello stomaco, ileo e colon di ratti trattati con streptozotocina (STZ), a cui si accompagnano segni di rigonfiamento assonale e ipertrofia<sup>29</sup>.

Le alterazioni del SNE sembrano riguardare prevalentemente la componente inibitoria: un deterioramento della funzioni nitrgergiche e una diminuzione dell'espressione di nNOS sono state descritte in topi trattati con STZ<sup>30</sup>, topi NOD (non obese diabetici)<sup>30</sup>, e topi BB/W<sup>31</sup> che sviluppano spontaneamente la patologia. La riduzione del contenuto di nNOS dovrebbe essere intesa, almeno inizialmente, come una modifica plastica e reversibile non necessariamente associata a neurodegenerazione<sup>30,32</sup>; tuttavia, con la progressione del diabete, danni strutturali ai nervi e perdita di neuroni diventano evidenti<sup>32</sup>.

Studi effettuati su colture cellulari e organotipiche suggeriscono qualche meccanismo molecolare in grado di spiegare le osservazioni precedenti. Colture primarie di neuroni provenienti dai gangli dorsali (DRG) di ratti trattati con STZ vanno incontro frequentemente ad apoptosi, con meccanismi dipendenti da disfunzioni mitocondriali<sup>33</sup>. Anche la riproduzione di condizioni diabetiche, come l'iperglicemia, direttamente su colture primarie di neuroni enterici embrionali causa apoptosi; tale condizione coinvolge la fosforilazione di Akt ed è revertita dalla neurotrofina GDNF<sup>34</sup>. In condizioni fisiologiche di glucosio, linee cellulari e colture primarie di neuroni DRG trattate con siero di pazienti affetti da neuropatia diabetica esibiscono apoptosi secondo un meccanismo  $Ca^{2+}$ -dipendente indotto, secondo gli autori, dalla presenza di autoanticorpi<sup>35</sup>. Diversi fattori possono quindi contribuire alla morte apoptotica dei neuroni enterici durante il diabete; un recente studio invece dimostra come la riduzione plastica dell'espressione di nNOS, precedentemente descritta, possa essere dovuta all'interazione di AGEs (prodotti di glico-ossidazione di macromolecole indotti da

iperglicemia) con lo specifico recettore RAGE<sup>36</sup>, che sembra giocare un ruolo di rilievo nelle neuropatie diabetiche<sup>29</sup>.

### **1.2.3 Infiammazione intestinale e sistema nervoso enterico**

Infiammazioni del tratto gastrointestinale possono dipendere da infezioni, lesioni chimiche, fenomeni autoimmuni oppure derivano da condizioni non ancora identificate, come avviene per le malattie infiammatorie intestinali con carattere cronico (IBD) quali morbo di Crohn (CD) e colite ulcerosa (UD)<sup>37,38</sup>.

Nei tessuti dei pazienti con IBD si osservano alterazioni nell'architettura dei plessi ganglionari e sono state riportate sia ipertrofia che iperplasia delle fibre nervose<sup>37</sup>; esaminazioni ultrastrutturali hanno rivelato danneggiamenti a livello degli assoni, 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<sup>39</sup>. Sorprendentemente, nei confronti dei corpi cellulari dei neuroni prevalgono le osservazioni che riportano iperplasia piuttosto che degenerazione e riduzione numerica<sup>37</sup>. Accanto alle anomalie strutturali riscontrate in CD e UD, infiltrati di cellule infiammatorie che comprendono macrofagi, mastociti, linfociti e plasmacellule sono stati individuati nelle strette vicinanze delle fibre nervose e dei gangli enterici<sup>37</sup>.

Molti modelli animali di infiammazione intestinale sono stati messi a punto nel corso degli anni, ciascuno con caratteristiche distintive dal punto di vista immunitario<sup>40</sup>; tra i modelli più utilizzati, l'induzione di colite mediante TNBS o DNBS permette di ottenere una infiammazione che interessa tutta la parete intestinale e genera una risposta immunitaria di tipo Th1, simile a quanto avviene in CD<sup>40</sup>. Utilizzando questo modello con diversi animali, alcuni studi hanno riportato evidenze di neurodegenerazione nella regione intestinale interessata al danno da TNBS<sup>41-43</sup>; in particolare è stata riscontrata una diminuzione nel numero di neuroni in entrambi i plessi, di entità compresa tra il 20%<sup>43</sup> ed il 50%<sup>41</sup>, con un andamento temporale che correla con il picco di neutrofili infiltrati<sup>42</sup>. È stata valutata la possibilità di morte cellulare per apoptosi, ma solo una percentuale minima (1-2%) di neuroni segue questo percorso<sup>42</sup>. Si può perciò speculare sul fatto che la scomparsa di neuroni enterici rappresenti per la maggior parte un evento passivo, dipendente dalla tossicità del trattamento oppure dalla massiva infiltrazione di fagociti. Almeno in parte, questa idea è sostenuta dal fatto che non vi siano specifici sottotipi neuronali più sensibili di altri, ma che la perdita neuronale avvenga in modo del tutto indiscriminato<sup>43</sup>.

Forme di plasticità neuronale sono comuni nei processi infiammatori più degli eventi degenerativi e producono un ampio spettro di alterazioni funzionali. Tessuti di pazienti affetti

da IBD mostrano anomalie del comparto neuro-muscolare ed un'elevata risposta contrattile alla stimolazione elettrica<sup>44,45</sup>, che spiega i disturbi di motilità intestinale caratteristici della patologia. Studi in modelli animali descrivono alterazioni nella contrazione muscolare e differenze nel rilascio di neurotrasmettitori in seguito a stimolazione, modifiche esibite anche da segmenti intestinali lontani dalle zone di infiammazione<sup>44,45</sup>. Misurazioni elettrofisiologiche dimostrano come alcuni neuroni intestinali durante l'infiammazione possano cambiare le proprie caratteristiche di eccitabilità: neuroni AH in particolare diventano ipereccitabili, incrementano il numero di potenziali d'azione e di attività spontanea<sup>46-48</sup>; considerando che questi neuroni sono afferenti primari (IPAN), le modifiche di eccitabilità registrate si traducono in riflessi motori, che possono contribuire alle dismotilità intestinali. In aggiunta, registrazioni elettrofisiologiche sui neuroni S sottomucosi (probabilmente secretomotori) rivelano che in condizioni infiammatorie sono soggetti a più frequenti EPSPs<sup>48</sup>; questo aumento di eccitabilità può condurre alle alterazioni di secrezione e flusso ematico tipiche delle IBD.

Un'altra manifestazione di plasticità neuronale indotta dall'infiammazione riguarda i cambiamenti di espressione di neuropeptidi, la sintesi di neurotrasmettitori, di neurotrofine e dei rispettivi sistemi recettoriali. Molti ricercatori hanno rivolto le loro indagini su due neuropeptidi principalmente, SP e VIP; evidenze raccolte con diverse tecniche, sia in modelli di infiammazione sperimentale che in campioni di pazienti affetti da colite ulcerosa, dimostrano un significativo aumento dell'espressione delle tachichinine, accompagnate da anomalie nell'espressione dei relativi recettori (NK-1, NK-2, NK-3)<sup>44,45</sup>. Un simile fenomeno è stato descritto anche per VIP, che incrementa nei neuroni enterici dei pazienti affetti da Crohn e nei modelli di infiammazione da TNBS<sup>44,45</sup>; tuttavia questi risultati sembrano non essere definitivi, poiché altri studi hanno riportato evidenze contrastanti<sup>45</sup>. Un ruolo importante, ma nello stesso tempo poco compreso, è giocato dalle neurotrofine, che nel SNC oltre a svolgere funzioni essenziali per lo sviluppo e la sopravvivenza/mortalità dei neuroni possono partecipare alla plasticità sinaptica attività-dipendente a breve termine<sup>49</sup>. Durante l'infiammazione sono stati misurati incrementi di espressione di NGF ed NT-3 sia in modelli animali che in IBD<sup>50-52</sup> ed è stato attribuito loro un ruolo protettivo, dal momento che la loro neutralizzazione incide sulla severità della colite da TNBS<sup>53</sup>.

Le cellule gliali probabilmente partecipano in modo attivo all'evento infiammatorio, come suggerisce l'espressione sulla loro superficie di molecole MHC di classe II, riscontrata nei pazienti con IBD<sup>6</sup>; inoltre, come nel SNC, l'infiammazione provoca proliferazione gliale<sup>6</sup>. La rimozione di queste cellule, ottenuta in topi con approcci transgenici<sup>12,13</sup>, conduce a infiammazione fulminante con esito fatale. E' stato proposto un ruolo protettivo della glia nel mantenimento dell'intergrità del ENS e della barriera mucosale<sup>6,16</sup>; 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<sup>14</sup>.

Questa moltitudine di eventi plastici e degenerativi è stata studiata, negli ultimi anni, anche utilizzando metodologie in vitro, al fine di identificare il ruolo fisiologico/farmacologico dei mediatori chimici coinvolti ed i meccanismi responsabili della loro azione. L'interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e l'interleukina-6 rappresentano i mediatori dell'inflammatione meglio caratterizzati; studi di elettrofisiologia hanno dimostrato che sono in grado di aumentare l'eccitabilità dei neuroni enterici depolarizzandone la membrana<sup>54,55</sup>, mimando gli effetti di risposte eccitatorie sinaptiche<sup>54</sup>. Questi effetti dell'interleukina-1 $\beta$  sono in parte sovrapponibili a quelli della prostaglandina E2<sup>55</sup>, sintetizzata dall'enzima COX2, che a sua volta è indotto da IL-1 $\beta$  e incrementa in condizioni infiammatorie. L'effetto attivante di IL-1 $\beta$  nei confronti dei neuroni enterici 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, e nel plesso mienterico mienterico coincide con neuroni nitrergici<sup>17</sup>. E' stata osservata anche una attivazione di c-fos a livello della glia enterica<sup>17</sup>, che coltivata in vitro, è in grado di rispondere alla stimolazione da citochine pro-infiammatorie anche incrementando la sintesi di GFAP<sup>8</sup> e secernendo le neurotrofine GDNF<sup>56</sup> ed NGF<sup>57</sup>.

Gli effetti delle citochine pro-infiammatorie e delle prostaglandine direttamente sui neuroni e sulla glia spiegano una buona parte degli effetti plastici precedentemente illustrati e osservati in vivo. E' interessante invece uno studio condotto su colture di neuroni mienterici, che mostra l'effetto neurotossico del lipopolisaccaride (LPS)<sup>58</sup>, come già era stato descritto nei neuroni del SNC; sebbene non sia stato indagato il meccanismo di tossicità, risulta evidente un aumento percentuale di neuroni VIP-ergici come conseguenza del trattamento: questo potrebbe significare una maggior resistenza di questa sottopopolazione oppure sottolineare una modifica plastica indotta da LPS.

### 1.3 COLTURE CELLULARI DI NEURONI E GLIA ENTERICI

Il sistema nervoso enterico è organizzato in gangli, che costituiscono strutture estremamente compatte contenenti unicamente glia e neuroni in uno stretto rapporto di vicinanza (dell'ordine di decine di nanometri); né tessuto connettivo né vasi sanguigni vi sono contenuti. Questa caratteristica organizzazione strutturale fa apparire i gangli enterici simili al tessuto del SNC<sup>1,3,60</sup>, e ne rende l'isolamento e la coltivazione un interessante strumento di indagine selettiva. Infatti, decontestualizzare il tessuto nervoso dal complesso contorno che lo racchiude offre la possibilità di svolgere studi sulle sue peculiari caratteristiche biologiche, elettrofisiologiche e farmacologiche.

Il primo lavoro che descrive l'espianto e la coltivazione di neuroni partendo da intestino embrionale o neonatale di cavia risale al 1978, a cui segue una serie di tre pubblicazioni che offrono un dettagliato resoconto della metodica impiegata ed una descrizione morfologica, ultrastrutturale e biochimica della coltura<sup>60-62</sup>. Gli autori riferiscono della presenza di neuroni, glia e fibroblasti in proporzioni variabili, che crescono nell'area circostante i frammenti tissutali espantati e coltivati. La glia esibisce differenti morfologie, estrema plasticità e svolge un'intensa attività di fagocitosi; cellule gliali possono avvolgere parzialmente i neuroni o i loro assoni<sup>60-62</sup>. I neuroni coltivati sono di diversa grandezza e appartengono ai tipi Dogiel I e II, contengono terminazioni ricche di vescicole granulari e non granulari e sono in grado di formare sinapsi<sup>60-62</sup>. Anche in base all'espressione di alcuni marker correlati con il metabolismo dei neurotrasmettitori, gli autori suggeriscono che la coltivazione non alteri il differenziamento cellulare ma mantenga un consistente grado di somiglianza con le proprietà morfologiche e citologiche del tessuto intatto<sup>60-62</sup>. Lavori successivi, dedicati a colture neuronali mienteriche provenienti da ratti neonati, hanno dimostrato con mezzi elettrofisiologici e immunoistochimici che i neuroni coltivati conservano molte – ma non tutte – delle caratteristiche presenti nel tessuto *in situ*<sup>63-66</sup>. Secondo alcuni ricercatori questo fenomeno potrebbe dipendere anche dal fatto che le colture sono state sviluppate solo a partire da animali neonati<sup>66</sup>, che avendo un SNE non del tutto formato esibiscono migliori possibilità di coltivazione ma caratteristiche differenti dal SNE maturo. Hanani e colleghi hanno ottenuto le prime colture di gangli mienteriche da cavie adulte e ne hanno in parte descritto la morfologia e l'elettrofisiologia<sup>66</sup>. Le caratteristiche di crescita sembrano molto simili a quelle neonatali anche se si osservano differenti sviluppi del materiale espantato a seconda della dimensione iniziale dei *clusters*<sup>66</sup>: in particolare, glia e neuroni evolvono in forme diverse a seconda che i cluster iniziali siano ridotti (meno di 10 neuroni) o estesi; una interessante differenza descritta dagli autori, inoltre, riguarda la presenza di numerosi neuroni

di tipo elettrofisiologico AH<sup>66</sup>, che rappresentavano una popolazione presente con bassa incidenza nelle colture da animali neonati<sup>64,65</sup>; infine, in queste colture è stata riportata una minor presenza di fibroblasti, rilevabile solo dopo due settimane di coltura<sup>66</sup>.

Colture neuronali enteriche sono state ottenute da diverse specie di mammiferi, che includono conigli, maiali, ratti, cavie, topi e uomo; in riferimento all'età dell'animale, sono state descritte colture da feti, da neonati e da adulti; inoltre, sono state impiegate sia colture di gangli integri che neuroni dissociati. Ogni tipologia di coltura sperimentata mostra tratti morfologici comuni con quelli precedentemente descritte, ma possiede probabilmente anche diversità che sono state scarsamente caratterizzate, rendendo talvolta difficile il confronto dei risultati. Al presente, non sono state ottenute colture neuronali pure da nessuno dei modelli animali utilizzati; ciò potrebbe essere dovuto a difficoltà tecniche ancora insormontate nel processo di isolamento, oppure, a differenza di quanto avviene nel sistema nervoso centrale, per un diverso ruolo trofico e/o protettivo della glia, non sostituibile dai terreni di coltura disponibili in commercio.

Le colture neuronali rappresentano un sistema interessante per studiare i meccanismi coinvolti nelle forme di plasticità e neurodegenerazione.

La stessa condizione colturale può essere uno stimolo sufficiente per causare modificazioni plastiche delle caratteristiche neuronali e/o influenzarne la sopravvivenza. È stata descritta una consistente riduzione del numero di neuroni mienterici durante la coltivazione<sup>67,69</sup>, ma anche un incremento della proporzione dei neuroni contenenti NOS e VIP, visualizzata in due tipologie diverse di colture<sup>68</sup>; è difficile dire se vi sia stata una modifica dell'espressione genica che ha indotto un cambiamento di 'chemical coding' oppure se neuroni nitrergici e VIP-ergici abbiano una migliore sopravvivenza alle condizioni colturali. Quest'ultima ipotesi sembra più probabile, dal momento che la coltivazione in presenza di VIP o donatori di NO (come SNAP) aumenta il tasso neuronale di sopravvivenza, e al contrario l'immunoneutralizzazione di VIP o l'inibizione della sintesi di NO ne causano una riduzione<sup>67</sup>. Il ruolo dell'ossido nitrico e di VIP nella sopravvivenza neuronale e nelle forme di plasticità è stato più volte considerato, soprattutto in relazione al diabete<sup>29</sup> o al morbo di Crohn<sup>44,45</sup>. In aggiunta, anche altri neuropeptidi potrebbero svolgere funzioni importanti per la sopravvivenza neuronale: in colture neuronali mienteriche di colon è stato osservato infatti un incremento della proporzione dei neuroni contenenti CGRP, neuropeptide Y, somatostatina e, nuovamente, VIP<sup>69</sup>.

Colture neuronali enteriche hanno consentito di valutare il potenziale neurotossico di alcune condizioni comunemente associate a patologie più complesse. Un esempio riguarda gli autoanticorpi anti-HuD, la cui presenza è stata ritrovata nel siero di pazienti con sindromi



paraneoplastiche, che sono risultati in grado di indurre apoptosi nei neuroni enterici coltivati<sup>70</sup>, fornendo una possibile chiave di lettura alle dismotilità intestinali comuni in questa sindrome.

Degenerazione neuronale è stata descritta anche in seguito ad esposizione delle colture a LPS batterico<sup>58</sup> oppure ad elevato glucosio<sup>34</sup>, condizioni che si propongono come semplici modelli in vitro per lo studio della neurodegenerazione in corso patologie complesse come le IBD e il diabete (vedi, ad esempio 1.2.2 e 1.2.3).

Molti studi condotti in colture neuronali del SNC hanno posto l'accento sull'importante ruolo del  $Ca^{2+}$ , che rappresenta un secondo messaggero cellulare accoppiato all'attività neuronale, alla plasticità sinaptica e alla regolazione dell'espressione genica; alterazioni nell'omeostasi del  $Ca^{2+}$  sono state associate a manifestazioni tossiche e a forme di morte cellulare programmata<sup>78,83</sup>.

I neuroni enterici coltivati rispondono con picchi intracellulari di  $Ca^{2+}$  alla stimolazione elettrica nei processi nervosi<sup>71</sup> e all'esposizione a neuroligandi<sup>72</sup>, in modo simile a ciò che avviene nei neuroni del SNC. Bradichinina, bombesina, glutammato, ATP, SP, 5-HT, colecistochinina e ACh sono in grado di evocare incrementi di  $Ca^{2+}$  in una percentuale variabile di neuroni<sup>72</sup>, probabilmente anche in modo concentrazione-dipendente<sup>76</sup>; un neurone è in grado di rispondere a molteplici ligandi diversi<sup>72</sup>. L'istamina pur generando risposte eccitatorie, non evoca picchi di calcio<sup>72</sup>. La galanina, invece, esercita effetti inibitori diminuendo i picchi di  $Ca^{2+}$  indotti da SP e 5-HT<sup>73</sup>, e al contrario, il BDNF promuove l'eccitabilità neuronale incrementando i transienti di  $Ca^{2+}$  indotti da SP e 5-HT<sup>74</sup>.

L'entrata di  $Ca^{2+}$  extracellulare può derivare da canali attivati da ligando oppure da canali voltaggio dipendenti (VOCCs). L'ACh determina transienti di  $Ca^{2+}$  costituiti da due componenti, una veloce, dovuta all'influsso diretto attraverso il recettore nicotinico (canale ionico misto responsabile degli EPSPs rapidi), ed una lenta mediata dal recettore muscarinico M1<sup>75,76</sup>. La serotonina produce influssi di  $Ca^{2+}$  diretti attraverso il recettore-canale 5-HT<sub>3</sub><sup>75,76</sup>. La maggior parte degli altri neuroligandi, comunque, interagendo con recettori accoppiati a proteine G modula il 'calcium signaling' sia tramite flussi extracellulari (attraverso VOCCs di vari sottotipi), che tramite il rilascio dai depositi intracellulari<sup>75</sup>. Tra gli effetti dipendenti dall'incremento di  $Ca^{2+}$  mediato dai VOCCs, è stato descritto sia il rilascio di VIP da parte di sinaptosomi, sia un incremento di sintesi di ossido nitrico<sup>77</sup>.

Nelle patologie neurodegenerative del SNC, il ruolo dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$  e delle sue alterazioni è stato ampiamente indagato e sembra svolgere un ruolo di primo piano<sup>78,83</sup>; tuttavia, la sua funzione nella neurodegenerazione enterica è stata scarsamente approfondita<sup>79</sup>.

E' noto che l'esposizione dei neuroni del SNC a concentrazioni elevate o protratte di glutammato (il principale neurotrasmettitore eccitatorio centrale) causa un deregolato afflusso intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>79,83</sup>, che si traduce in morte neuronale per apoptosi o per necrosi <sup>80</sup>. Anche nel SNE il glutammato è considerato a tutti gli effetti un neurotrasmettitore <sup>81</sup>, ma il suo ruolo nella neurotrasmissione è probabilmente marginale o ancora poco compreso. Un unico studio dimostra il potenziale eccitotossico del glutammato nei neuroni enterici <sup>82</sup>; probabilmente a causa di numerosi trasportatori presenti sulla glia è richiesta una concentrazione alta dell'amminoacido (> 3mM) per visualizzare morte neuronale, che sembra avvenire sia tramite apoptosi che necrosi.

## **2. OBIETTIVI DELLA RICERCA**

Durante l'invecchiamento e in presenza di diverse patologie, tra cui infiammazioni croniche intestinali, diabete e Parkinson si manifestano con una certa incidenza disfunzioni intestinali. Numerose possono essere le cause, e non tutte sono state identificate; è stato però osservato frequentemente il coinvolgimento del sistema nervoso enterico. I neuroni enterici possono andare incontro a modificazioni plastiche, e talvolta degenerative, che sono considerate alla base delle alterazioni funzionali del tratto digerente. Modelli animali sono comunemente impiegati per lo studio di questi fenomeni e nel tempo hanno fornito informazioni importanti e possibili terapie; tuttavia la comprensione dei meccanismi molecolari necessita anche di metodiche in vitro, in analogia a quanto avviene nello studio della neurodegenerazione nel sistema nervoso centrale.

La tecnologia delle colture cellulari primarie ha permesso di indagare i meccanismi molecolari alla base di numerose patologie del SNC, ma fino ad oggi ha dato un modesto contributo agli studi sul SNE. Tra le cause, sicuramente si riconosce un importante divario tecnico e metodologico che non ha ancora consentito di ottenere colture neuronali enteriche pure; inoltre, coltivazioni neuronali da varie parti dell'intestino, da molteplici animali diversi e in differenti fasi di crescita, hanno portato a una frammentazione dei modelli sperimentali, che mancano di caratterizzazione e che rendono più complesso il confronto dei risultati.

Obiettivo primario di questa ricerca è lo sviluppo di modelli di colture neuronali mienteriche, determinandone le caratteristiche di crescita e la sopravvivenza. Si vogliono individuare criticamente vantaggi e limiti dei diversi modelli, indicando i possibili miglioramenti tecnici per ottenere colture affidabili e riproducibili.

Come obiettivo secondario ci si propone di verificare la possibilità di utilizzo delle colture neuronali ottenute per studi di tossicità o come possibile modello per lo studio della neurodegenerazione enterica. Per fare ciò è necessario identificare composti neurotossici e ricercare metodi adeguati di valutazione del danno.

### **3. MATERIALE e METODI**

#### **3.1 PROCEDURE SPERIMENTALI**

##### **3.1.1 Animali**

Sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley di peso 130 – 200 g e cavie Dunkin-Hurtley di peso 250 – 300 g, di sesso maschile, acquistati dalla Harlan Italia. I ratti e le cavie sono stati sacrificati mediante decapitazione, previa anestesia indotta da cloroformio (per i ratti, autorizzazione DM 38/2005-B; per le cavie, approvazione del Comitato Etico-Scientifico dell'Università di Bologna, Prot.29250-X/6 del 16 maggio 2005).

##### **3.1.2 Colture di gangli mienterici da cavia adulta**

I gangli mienterici sono stati ottenuti per dissociazione enzimatica da ileo di cavia, in modo simile come descritto da De Giorgio et al<sup>70</sup>. In seguito al sacrificio dell'animale si è prelevato l'ileo (circa 20 cm), mantenendolo in condizioni ipotermiche in soluzione Krebs sterile ossigenata (NaCl 120.9mM, KCl 5.9mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, Glucosio 11.5mM NaHCO<sub>3</sub> 14.4mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM). Con l'ausilio di una siringa da 50 ml riempita con soluzione Krebs si è rimosso il contenuto dell'intestino prelevato. Dopo aver tagliato l'ileo in segmenti di dimensioni di un centimetro circa, si è dissociato da ciascuno lo strato di muscolo longitudinale a cui, di norma, rimane adeso il plesso mienterico sottostante. Per la dissociazione si è proceduto inserendo nel lume dei segmenti di ileo una pipetta di diametro adeguato come supporto, praticando un'incisione a livello del bordo mesenterico, e successivamente separando lo strato superiore del tessuto con pinzette fini, sotto controllo ottico. Questa procedura è stata eseguita nelle migliori condizioni di sterilità possibile, indossando guanti chirurgici e utilizzando ferri sterilizzati.

I pezzi di tessuto isolati sono stati trasferiti in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS senza Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>), tagliati in pezzi più piccoli, quindi digeriti in soluzione di dissociazione agitando per 30 min a 37°C. La sospensione digerita è stata successivamente trasferita in ghiaccio, centrifugata a 400×g ed il pellet lavato 2 volte con HBSS. Dopo l'ultimo lavaggio si è risospeso il pellet in medium 199. I gangli sono stati prelevati sotto controllo ottico allo stereomicroscopio tramite una pipetta automatica a cui è stato applicato come puntale un catetere i.v. sterile. I gangli isolati sono quindi stati seminati su vetrini coprioggetto pretrattati

con poly-ornitina o poly-lisina (10-20 gangli per vetrino), e mantenuti in incubatore ad atmosfera umidificata (95% aria, 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. Come terreno di coltura si è utilizzato medium 199 completo, sostituendolo ogni 2 giorni.

### **3.1.3 Colture di neuroni mienterici dissociati da ratto adulto**

I neuroni mienterici sono stati ottenuti per dissociazione enzimatica da ileo di ratto. In seguito al sacrificio dell'animale si è prelevato l'ileo, si è rimosso il contenuto e si è mantenuto l'organo in condizioni ipotermiche in soluzione Krebs sterile ossigenata (NaCl 120.9mM, KCl 5.9mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, Glucosio 11.5mM NaHCO<sub>3</sub> 14.4mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM); dopo aver tagliato l'ileo in segmenti di pochi centimetri, si è separato da ciascuno lo strato di muscolo longitudinale contenente il plesso mienterico. La dissociazione è avvenuta nelle migliori condizioni di sterilità possibile, indossando guanti chirurgici e utilizzando ferri sterilizzati. I pezzi di tessuto isolati sono stati trasferiti in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS senza Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>), frammentati meccanicamente e digeriti in soluzione di dissociazione per 30 min a 37°C, in agitazione. La sospensione digerita è stata successivamente trasferita in ghiaccio, tritata con una pipetta Pasteur e centrifugata a 400×g. Il surnatante è stato scartato ed il pellet lavato 2 volte con medium 199. Dopo l'ultimo lavaggio il pellet è stato risospeso in pochi millilitri di medium 199 completo ed è stato ulteriormente tritato mediante passaggio attraverso un ago (22G). Uguali volumi (50uL) sono stati seminati su vetrini coprioggetto pretrattati con poly-ornitina o poly-lisina, e mantenuti in incubatore ad atmosfera umidificata (95% aria, 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C per 30 minuti prima di aggiungere un adeguato volume di terreno completo. Il mezzo di coltura è stato sostituito dopo circa 12h dalla semina e successivamente ogni 2 giorni.

### **3.1.4 Colture di cellule gliali da ratto adulto**

In seguito al sacrificio dell'animale si è prelevato un tratto di ileo e lo si è diviso in segmenti di pochi centimetri (4-6), mantenendolo in soluzione Krebs sterile ossigenata. Ogni segmento è stato posto in una petri rivestita di sylgard e si è dissociato lo strato di muscolo longitudinale contenente il plesso mienterico in modo molto accurato, sotto il controllo di uno stereomicroscopio. Il segmento di ileo è stato aperto lungo l'asse longitudinale seguendo il bordo mesenterico, poi steso con il lato della mucosa rivolto verso il basso; tramite aghi di diametro sottile si è ancorato il tessuto alla petri estendendolo fino alla massima tensione; in queste condizioni si è pelato lo strato di muscolo longitudinale con l'ausilio di pinzette sottili. L'operatore ha indossando guanti sterili, maschera chirurgica e ha utilizzato ferri sterilizzati per minimizzare le contaminazioni.

Il tessuto prelevato è stato digerito in HBSS contenente proteasi e collagenasi a 37°C per 20-30 minuti in lieve agitazione. La sospensione è stata successivamente centrifugata a 400×g per raccogliere il materiale digerito; il pellet è stato lavato con DMEM completo, vortexato e nuovamente centrifugato a 400×g per 10 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante si è aggiunto nuovo terreno completo, si è risospeso bene il pellet e si sono lasciati decantare i frammenti di grosse dimensioni non digeriti per pochi minuti. Il surnatante contenente cellule dissociate è stato piastrato in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> e mantenuto in incubatore con atmosfera umidificata (95% aria, 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. Il terreno è stato sostituito ogni 2 giorni. Le cellule possono essere staccate dalle fiasche mediante tripsina e sottocoltivate per almeno 40 giorni.

*Procedura opzionale per migliorare la purezza:*

Prima della sottocoltivazione si possono eliminare i fibroblasti contaminanti utilizzando una procedura di lisi mediata da complemento. Le cellule in sospensione sono incubate con una diluizione 1:100 di anticorpo monoclonale anti-rat Thy 1.1, a 37°C per 30 minuti, poi trattate con complemento di guinea pig (diluito 1:50) a 37°C per 20 minuti. Le cellule rimanenti sono state lavate con HBSS e nuovamente piastrate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup>.

*La procedura di isolamento e coltivazione delle cellule gliali è stata appresa nei laboratori del Prof. Schemann, presso la Technischen Universität München*

### **3.1.5 Colture organotipiche**

In seguito al sacrificio dell'animale si è prelevato un tratto di ileo, lo si è pulito del contenuto e lo si è diviso in segmenti di pochi centimetri (4-6), mantenendolo in soluzione Kreb's sterile ossigenata. Ogni segmento è stato posto in una petri rivestita di sylgard al fine di dissociare lo strato di muscolo longitudinale contenente il plesso mienterico. Sotto il controllo di uno stereomicroscopio, l'ileo è stato aperto lungo l'asse longitudinale seguendo il bordo mesenterico, poi steso con il lato della mucosa rivolto verso il basso; tramite aghi di diametro sottile si è ancorato il tessuto alla petri estendendolo; in queste condizioni si è pelato accuratamente lo strato di muscolo longitudinale con l'ausilio di pinzette sottili. Si sono minimizzate le contaminazioni indossando mascherina chirurgica e utilizzando ferri sterilizzati. Il tessuto isolato è stato poi ancorato con aghi sottili a petri rivestite di sylgard, precedentemente sterilizzate; si è lasciato per un'ora con DMEM completo (con doppia concentrazione di antibiotici) a 37°C, in incubatore ad atmosfera umidificata (95% aria, 5% CO<sub>2</sub>). Successivamente il terreno è stato sostituito con altro DMEM completo. Le colture sono state mantenute per 2-3 giorni.

### **3.1.6 Trattamenti con Glutammato**

Il glutammato è stato sciolto in medium completo alla concentrazione di 50 mM; a seconda degli esperimenti è stato diluito in volumi opportuni di terreno completo a raggiungere la concentrazione di 300µM, 1mM, 3mM e 10 mM. Colture cellulari o tissutali sono state esposte al glutammato. Il terreno di coltura è stato rimosso ed è stato aggiunto il terreno contenente glutammato alla concentrazione stabilita; le colture sono state mantenute in incubatore a 37°C per 1 ora. Allo scadere del tempo il medium di incubazione è stato allontanato, si è effettuato un lavaggio con PBS e si è aggiunto terreno completo fresco. Le colture sono state nuovamente incubate per tempi di recupero variabili.

### **3.1.7 Preparazione di whole mount di plesso mienterico da tessuto fissato in PFA**

Il segmento di ileo da dissezionare è stato precedentemente aperto lungo il bordo mesenterico, steso con la mucosa rivolta verso il basso su una petri rivestita di sylgard e fissato in paraformaldeide 4%; durante il fissaggio il tessuto è stato mantenuto in aperto ed in estensione tramite da aghi sottili ancorati al sylgard.

Dopo avere lavato il tessuto con PBS, lo si posiziona su una petri rivestita di sylgard in modo da esporre la mucosa verso l'alto; con pinzette a punta fine si rimuove progressivamente lo strato di mucosa, sottomucosa e muscolatura circolare, facendo attenzione a non ledere lo strato sottostante. Rimovendo con cautela i vari strati si ottiene una preparazione di muscolo longitudinale contenente la maggior parte dei gangli che compongono il plesso mienterico.

### **3.1.8 Immunofluorescenza su cellule**

Le cellule cresciute sui vetrini coprioggetto sono state fissate con formaldeide 4% per 20 minuti e conservate in PB01. Per la colorazione in immunofluorescenza i vetrini sono stati incubati 30 minuti in PB01 contenente Normal Donkey Serum 5% (NDS), Triton-X 0,1%, per permeabilizzare le membrane e bloccare i siti aspecifici. Una miscela di anticorpi primari è stata diluita opportunamente in NDS/Triton-X/PB01 e applicata ai vetrini per tutta la notte a 4°C in camera umidificata. Dopo tre lavaggi in NDS/Triton-X/PB01, necessari a rimuovere gli anticorpi primari in eccesso, si sono incubati i vetrini con i rispettivi anticorpi secondari accoppiati a molecole fluorescenti (opportunamente diluiti in NDS/Triton-X/PB01) per 2 ore, a temperatura ambiente; questo passaggio si è svolto in assenza di sorgenti di luce diretta. Infine, dopo accurati lavaggi in PB01 i vetrini sono stati montati con Moviol, capovolti su portaoggetti e osservati al microscopio. I vetrini così ottenuti si conservano a 4°C oppure a -20°C per lunghi periodi.

### **3.1.9 Immunofluorescenza su whole mount**

Le whole mount sono state lavate in PB01 ed incubate con una miscela di in PB01, Normal Donkey Serum 7% (NDS), Triton-X 0,5% per 2h in costante agitazione, al fine di permeabilizzare il tessuto e bloccare i siti aspecifici. Successivamente il tessuto è stato trasferito in una microprovetta assieme ad una miscela di anticorpi primari opportunamente diluiti in NDS/Triton-X/PB01; l'incubazione è avvenuta in continua agitazione, a 4°C per circa due giorni. Il tessuto è stato poi sottoposto a 3 lavaggi con NDS/Triton-X/PB01 della durata di 10 minuti ciascuno, quindi incubato nuovamente con la miscela di anticorpi secondari (diluiti in NDS/Triton-X/PB01), per 4 ore a temperatura ambiente e in agitazione; questo passaggio si è svolto in assenza di sorgenti di luce diretta. Infine, le whole mount sono state lavate per 3 volte con PB01, accuratamente stese su vetrini portaoggetto insieme a poche gocce di Moviol e ricoperte da vetrini coprioggetto. I vetrini così ottenuti si conservano a 4°C oppure a -20°C per lunghi periodi.

### **3.1.10 TUNEL e immunofluorescenza**

Si è utilizzato il saggio TUNEL per l'identificazione di nuclei in fase terminale di morte programmata. L'esperimento è stato svolto su cellule fissate in PFA 4%, seguendo le procedure del kit *DeadEND™ Fluorometric TUNEL System* (Promega) e utilizzando i reagenti forniti. Brevemente, le cellule sono state lavate prima in PBS poi incubate con PBS/Triton-X 0.2% per 5 minuti; successivamente sono state equilibrate per 10 min con *Equilibration Buffer* (fornito dal kit) ed incubate con la *miscela di reazione* (fornita dal kit) per un'ora, al buio. In seguito, la miscela di incubazione è stata rimossa e le cellule lavate con *SSC 2%* (fornito dal kit) per 15 minuti, poi in PBS. A questo punto, la procedura di TUNEL è stata spesso seguita da una immunofluorescenza (vedi 2.1.6) per identificare i tipi cellulari coinvolti nella morte programmata. Sono stati adottati alcuni accorgimenti rispetto alla procedura già descritta: il tampone PB01 è stato sostituito con PBS e i tempi di incubazione con anticorpi sono stati accorciati a 2 ore per l'anticorpo primario e 45 minuti per il secondario.



## **3.2 PROCEDURE OPERATIVE STANDARD (SOP)**

### **3.2.1 Preparazione di Petri da dissezione rivestite di Sylgard**

Si sono rivestite di polimero sylgard sia petri in vetro che in plastica; le petri in vetro sono state precedentemente lavate con etanolo al 70%. I due componenti del kit sylgard 184<sup>®</sup> sono stati mescolati in rapporto di peso 10:1 sotto costante agitazione per circa 10 minuti. Il gel risultante è stato versato nelle diverse petri formando uno strato di 3-5 mm, evitando quanto possibile la formazione di bolle. Le petri sono state lasciate riposare su un piano orizzontale per qualche ora, poi trasferite in stufa a temperatura di 80°C per 3-4 ore.

### **3.2.2 Inattivazione del siero fetale bovino (FBS)**

Il siero è stato scongelato a temperatura ambiente all'interno della sua confezione. La bottiglia scongelata e ben chiusa è stata trasferita in un bagnetto pre-riscaldato a 56°C e lasciata in condizioni di moderata agitazione per 30 minuti. Dopo l'inattivazione il siero è stato diviso in aliquote in condizioni di sterilità ed immediatamente congelato a -20°C.

### **3.2.3 Preparazione dei vetrini coprioggetto e trattamento con poly-lisina o poly-ornitina**

I vetrini coprioggetto della dimensione prescelta sono stati lasciati per un giorno in modesta agitazione sommersi da etanolo 95%; successivamente sono stati lavati due volte con acqua deionizzata sterile, separati singolarmente tramite pinzette e riposti tra fogli di carta da filtro. Infine sono stati sterilizzati in stufa a 200°C per due ore.

Ad ogni esperimento i vetrini necessari sono stati trasferiti in piastre multi-pozzetto in condizioni di sterilità. Ogni vetro è stato trattato con soluzione di poly-ornitina o poly-lisina precedentemente filtrata (0,22 µm) per il tempo indicato dal produttore (Sigma-Aldrich). In seguito i vetrini, all'interno delle piastre, sono stati lasciati asciugare sotto il flusso laminare della cappa per almeno due ore. Le piastre sono state poi esposte alla luce UV per un'ora a tutela della sterilità.

### 3.3 ANTICORPI UTILIZZATI IN IMMUNOFLUORESCENZA

#### 3.3.1 Anticorpi primari

<b>Antisiero</b>	<b>Fornitore</b>	<b>Diluizione di utilizzo</b>
Mouse Anti Hu	<i>Invitrogen</i>	1:100 – 1:500
Goat Anti Hu	<i>Santa Cruz</i>	1:50 – 1:100
Mouse Anti NSE	<i>Chemicon</i>	1:100 – 1:200
Mouse Anti PGP 9.5	<i>Biomed</i>	1:100 – 1:250
Mouse Anti GFAP	<i>Pharmingen, BD Biosciences</i>	1:80 – 1:200
Rabbit Anti GFAP	<i>Sigma</i>	1:100 – 1:300
Rabbit Anti S100	<i>Dako Cytomation</i>	1:10000
Mouse Anti Smooth Muscle Actin Cy3-coniug.	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:150 – 1:300

#### 3.3.2 Anticorpi secondari

<b>Antisiero</b>	<b>Fornitore</b>	<b>Diluizione di utilizzo</b>
Donkey Anti Mouse Alexafluor 488	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	1:800 – 1:1000
Goat Anti Mouse Cy3	<i>Chemicon</i>	1:300 – 1:600
Goat Anti Rabbit TRITC	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:300 – 1:600
Donkey Anti Rabbit Alexafluor 488	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	1:800 – 1:1000
Donkey Anti Goat Alexafluor 555	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	1:1000

### 3.4 SOLUZIONI, TAMPONI E TERRENI DI COLTURA

Soluzione	Metodo di preparazione	Commenti
PBS (Phosphate-buffered saline)	Disciogliere 8 g di NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 950ml di H <sub>2</sub> O. Aggiustare il pH a 7.2 con NaOH oppure HCl. Portare a 1L con H <sub>2</sub> O.	Sterilizzare tramite autoclave. Dividere in aliquote e conservare a + 4°C.
PB05 (Phosphate Buffer 0.5 M)	Preparare una soluzione A sciogliendo 89 g di Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O in 1L di H <sub>2</sub> O; preparare una soluzione B sciogliendo 17.2 g di NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O in 250 ml. Portare la soluzione A a pH 7.42 utilizzando la soluzione B.	Conservare a + 4°C. Per preparare PB01 diluire 5:1 con H <sub>2</sub> O.
Krebs Buffer	Disciogliere g di 7.07g NaCl, 0.44 g KCl, 2.08 g Glucosio, 1.22 g NaHCO <sub>3</sub> , 0.17 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 950 ml di H <sub>2</sub> O, gorgogliando aria durante lo scioglimento dei sali. Aggiungere 1.2 ml di MgCl <sub>2</sub> 1M e 2.5 ml di CaCl <sub>2</sub> 1M. Aggiustare il volume a 1L con H <sub>2</sub> O. Sterilizzare per passaggio attraverso filtri da 0.2 µm. Ossigenare la soluzione con miscela O <sub>2</sub> (95%) / CO <sub>2</sub> (5%) per almeno 30 min.	Preparare lo stesso giorno di utilizzo.
MgCl <sub>2</sub> 1M	Disciogliere 20.3 g di MgCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O in 80 ml di H <sub>2</sub> O. Aggiustare il volume a 1L con H <sub>2</sub> O.	
CaCl <sub>2</sub> 1M	Disciogliere 14.7 g CaCl <sub>2</sub> in 80 ml di H <sub>2</sub> O. Aggiustare il volume a 1 L con H <sub>2</sub> O.	
Soluzione di Dissociazione	Disciogliere 37.5 mg di Collagenasi (Sigma), 30 mg di Dispasi (Sigma) e 0.12 g di Albumina bovina (Sigma) in 30 ml di HBSS senza Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup> (Gibco). Sterilizzare mediante filtrazione (0,2 µm).	Preparare lo stesso giorno di utilizzo
Paraformaldeide 4% (PFA)	Riscaldare 500 ml di H <sub>2</sub> O a 55 C e disciogliervi 40 g di Para-formaldeide in agitazione continua. Aggiungere poche gocce di NaOH fino a rendere la soluzione trasparente. Filtrare e aggiungere 200 ml di PB05. Aggiungere H <sub>2</sub> O fino a 980 ml circa, quindi portare a pH 7.42. Aggiustare il volume a 1 L con H <sub>2</sub> O.	Pesare la polvere con apposita maschera. Preparare utilizzando cappa chimica. La soluzione può essere divisa in aliquote e congelata a – 20°C.

---

Mowiol (circa 50 ml)	Mescolare 4.8 g di mowiol, 12 g di glicerolo e 12 ml di H <sub>2</sub> O, lasciando in agitazione per molte ore; aggiungere 24 ml di Tris 0.2 M, pH 8.5 e scaldare a 50°C per 10 min circa, mescolando di tanto in tanto fino a quando tutto il mowiol appare sciolto. Rimuovere le particelle rimaste centrifugando a 5000g per 15 minuti. Dividere in aliquote e congelare a -20°C.	
NGF (Nerve Growth Factor)	In condizioni sterili, sciogliere 100 µg di NGF 7s in 1 ml di DMEM. Dividere in aliquote da 100 µl in microtubi sterili.	Conservare congelato a -20°C; una volta aperto mantenere a + 4°C.
M199 completo	Sciogliere 2,7 g di glucosio in una pochi millilitri di M199 (Gibco); aggiungere a 450 ml di M199 il glucosio sciolto, 50 ml di FBS inattivato (Invitrogen), 5 ml di Pennicillina-Streptomicina (Sigma), 2.5 ml di Gentamicina (Sigma). Sterilizzare mediante unità di filtrazione con poro da 0,2 µm e successivamente dividere in aliquote da 50 ml.	Conservare per poche settimane a + 4°C. Prima dell'utilizzo aggiungere a ciascuna aliquota 25 µl di NGF (100 ng/µl) ottenendo una concentrazione finale di 50 ng/ml
DMEM completo	Aggiungere 50 ml di FBS inattivato a 450 ml di DMEM (Gibco); aggiungere 5 ml di Pennicillina-Streptomicina, 2.5 ml di Gentamicina. Sterilizzare mediante unità di filtrazione con poro 0,2 µm e successivamente dividere in aliquote da 50 ml.	Conservare per poche settimane a + 4°C.

---

### 3.5 STRUMENTAZIONE ED EQUIPAGGIAMENTO

<b>Strumento</b>	<b>Articolo e Produttore</b>
Cappa a flusso laminare di classe II	VBH Compact, <i>Steril</i>
Incubatore a CO <sub>2</sub>	Forma Direct Heat CO <sub>2</sub> Incubator, <i>Thermo Electron Corporation</i>
Microscopio ottico invertito	Eclipse TS100, <i>Nikon</i>
Stereo microscopio	SMZ645, <i>Nikon</i>
Centrifuga Refrigerata	PK120R, <i>ALC</i>
Microcentrifuga refrigerata	Microfuge 22R, <i>Beckman Coulter</i>
Frigorifero e Freezer Classe A	<i>Whirlpool</i>
Frigorifero e Freezer Classe A	<i>Ignis</i>
pH-metro	Basic 20, <i>Crison</i> con elettrodo LIQ-GLASS, <i>Hamilton</i>
Piastra agitatore riscaldata	ARE Heating magnetic stirrer, <i>VELP Scientifica</i>
Vortex (agitatore vibrante)	Zx <sup>3</sup> , <i>VELP Scientifica</i>
Microscopio a fluorescenza	Eclipse 90i, <i>Nikon</i>
Bagnetto riscaldato oscillante	Bagnomaria Dubnoff, Modello 750, <i>ASAL</i>
Vetreteria	<i>Schott Duran</i>
Pipette automatiche da 20µl, 200µl, 1000µl	<i>Eppendorf Research</i>
Pipette da 10µl, 100µl, 1000µl, 5000µl.	Nichipet, <i>Nichiryo</i>
Pipette da 10µl, 100µl, 1000µl.	m-line, <i>Biohit</i>
Pipettatore automatico	<i>Desaga, Sarstedt Group</i>
Bilancia	Mark, <i>BEL Engineering</i>
Bilancia analitica	AE163, <i>Mettler</i>
Pinzette punta fine	Dumont #5, <i>Fine Science Tool</i>
Pinzette punta curva	Dumont #7b, <i>Fine Science Tool</i>
Forbici Angolari	<i>Fine Science Tool</i>
Pinzette e forbici di varie dimensioni	Vari produttori
Aghi sottili	Insect Pins, <i>Fine Science Tool</i>

### 3.6 SOSTANZE UTILIZZATE

<b>Sostanza</b>	<b>Produttore</b>
Albumina Bovina	<i>Sigma-Aldrich,</i>
ARA C (Citosina Arabinofuranoside)	<i>Sigma-Aldrich,</i>
CaCl <sub>2</sub>	<i>ICN Biomedicals</i>
Collagenasi IA	<i>Sigma-Aldrich</i>
DAPI	<i>Fluka, Sigma-Aldrich</i>
Dispasi	<i>Sigma-Aldrich</i>
Etanolo 96%	<i>Fluka, Sigma-Aldrich</i>
FBS (Fetal Bovine Serum)	<i>Gibco,Invitrogen</i>
Gentamicina	<i>Sigma-Aldrich</i>
Glicerolo	<i>Shelton Scientific</i>
Glucosio	<i>ICN Biomedicals</i>
Glutammato	<i>Sigma-Aldrich</i>
HBSS (Hank's Balanced Buffered Saline) senza Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	<i>Gibco,Invitrogen</i>
HCl	<i>Carlo Erba Reagenti</i>
Isoflurano	<i>Abbott SPA</i>
KCl	<i>Sigma-Aldrich</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>ICN Biomedicals</i>
NaHCO <sub>3</sub>	<i>Sigma-Aldrich</i>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>ICN Biomedicals</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>ICN Biomedicals</i>
NaCl	<i>Sigma-Aldrich</i>
NaOH	<i>Carlo Erba Reagenti</i>
NGF 7s	<i>Invitrogen</i>
Media per colture cellulari (M199, Neurobasal, DMEM)	<i>Gibco,Invitrogen</i>
MgCl <sub>2</sub>	<i>Sigma-Aldrich</i>
Mowiol 4-88	<i>Calbiochem</i>
Normal Goat Serum	<i>Chemicon</i>
Normal Donkey Serum	<i>Genetex, Inc</i>

Paraformaldeide	<i>ICN Biomedicals</i>
Penicillina-Streptomicina	<i>Sigma-Aldrich</i>
Poly-Lisina	<i>Sigma-Aldrich</i>
Poly-Ornitina	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tripsina-EDTA 10X	<i>Sigma-Aldrich</i>

---

### 3.7 MATERIALE DI CONSUMO

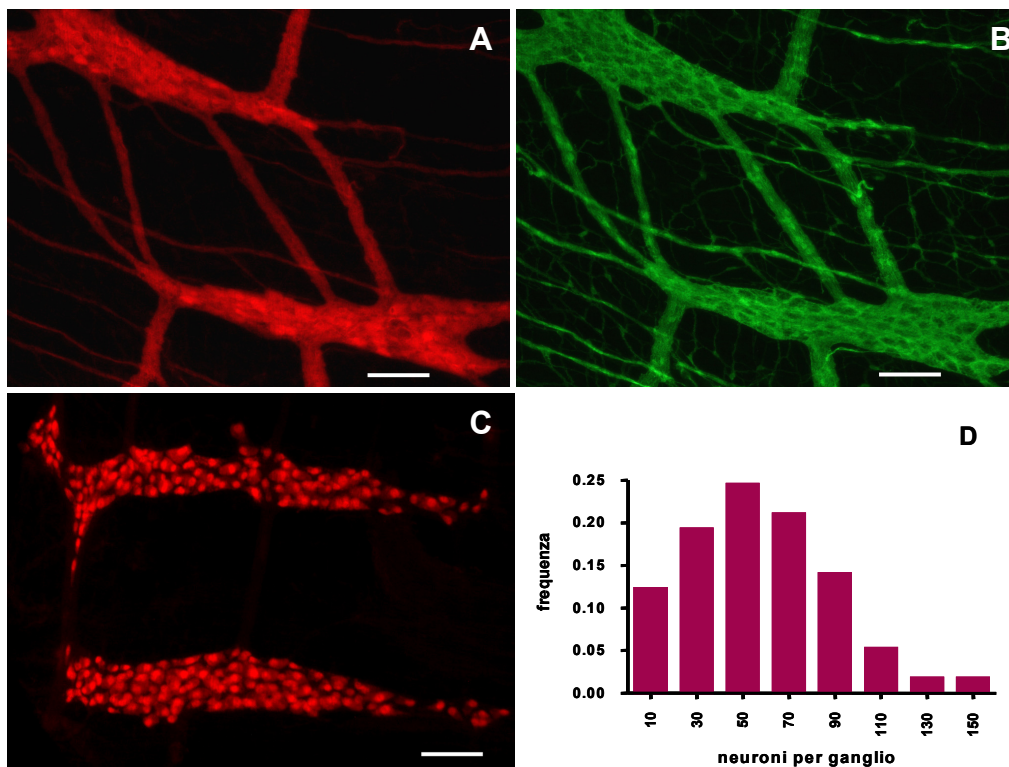
<b>Materiale</b>	<b>Articolo e Produttore</b>
Vetrini portaoggetto	Super Frost, <i>Menzel-Gläser</i>
Vetrini coprioggetto: circolari Ø 12mm, 25mm e rettangolari 24×60	Coverslips, <i>Menzel-Gläser</i>
Pipette monouso sterili da 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Serological Pipette, <i>Sarstedt</i>
Pipette pasteur plastica	Vari produttori
Fiasche da 25cm <sup>2</sup> e 75cm <sup>2</sup>	Tissue Culture Flask, <i>Sarstedt</i>
Piastre da 6 e 24 pozzetti	Tissue Culture Plate Multiwell, <i>Sarstedt</i>
Unità di filtrazione 0,2 µm, 500ml	Filtropur V50, <i>Sarstedt</i>
Filtri 0,22 µm	Millex GP, <i>Millipore</i>
Filtri separatori sterili da 70 µm	Cell strainer, <i>BD Falcon</i>
Puntali da 10µl, 200µl e 1000µl	Vari produttori
Provette da 15ml e 50ml	15ml- 50ml- tube, <i>Sarstedt</i>
Microprovette da 0,5ml e 0,2ml	Multiply Microtube, <i>Sarstedt</i>
Microprovette da 1,5ml	LINBRO Microtube, <i>MP Biomedicals, Inc</i>
Piastre Petri Ø 35mm	Cell Culture Dish, <i>Corning</i>
Piastre Petri Ø 60mm	Cell Culture Dish, <i>Cellstar, Greiner bio-one</i>
Piastre Petri Ø 100mm	Cell Culture Dish, <i>Sarstedt</i>
Guanti	Vari produttori
Guanti sterili	COMPIT Surgical Gloves, <i>WRP</i>
Siringhe da 5ml, 10 ml, 50 ml	Vari produttori
Catetere Intravascolare 18GA	Insyte, <i>BD Biosciences</i>

---

## 4. RISULTATI

### 4.1 ALLESTIMENTO E SVILUPPO DI COLTURE DI GANGLI MIENTERICI DI CAVIA

Il materiale di partenza, ottenuto da ileo di cavia adulta, (come descritto in materiale e metodi) consiste di piccoli frammenti di tessuto di muscolo longitudinale a cui sono adesi i gangli del plesso mienterico. Parte del tessuto è stato colorato per immunofluorescenza con marker neuronali (PGP9.5, HuC/D) e gliali (S100) per verificare la presenza di gangli e stimarne il contenuto neuronale (Fig.4).



**Figura 4.** Gangli di plesso mienterico di cavia. **A, B.** Doppia immunofluorescenza per PGP9.5 (A), marker pan-neuronale distribuito sia nel soma che nei processi delle cellule nervose, e S100 (B) marker gliale. **C.** Immunofluorescenza per HuC/D, marker pan-neuronale distribuito solo nel soma neuronale; è stato utilizzato per contare il numero di neuroni. Barra=100µm. **D.** Distribuzione dei neuroni nei gangli di plesso mienterico di ileo di cavia; 2 animali utilizzati, circa 100 gangli contati.



Secondo la procedura descritta in materiale e metodi, i gangli sono stati dissociati dal tessuto, raccolti e seminati in numero di 15-20 su vetrini (giorno 0). Morfologicamente l'andamento della coltura è stato seguito nei giorni successivi utilizzando gli stessi marker neuronali e gliali provati sul tessuto integro.

Al *giorno 1* i gangli piastrati appaiono come strutture compatte, di forma globulare, costituite di neuroni e glia. Fuori dal conglomerato di cellule gangliari si osservano poche altre cellule, negative sia ad S100 che HuC/D.(Fig.5A,B)

Al *giorno 3* i gangli perdono la compattezza iniziale ed aumenta la distanza tra i neuroni. Altri tipi cellulari, in maggior parte S100 positivi, aumentano di numero ed allungano i processi oltre i confini originari. Gangli di piccole dimensioni e con pochi neuroni sembrano diradarsi ed espandersi precocemente rispetto ai gangli più grandi (Fig.5C,D).

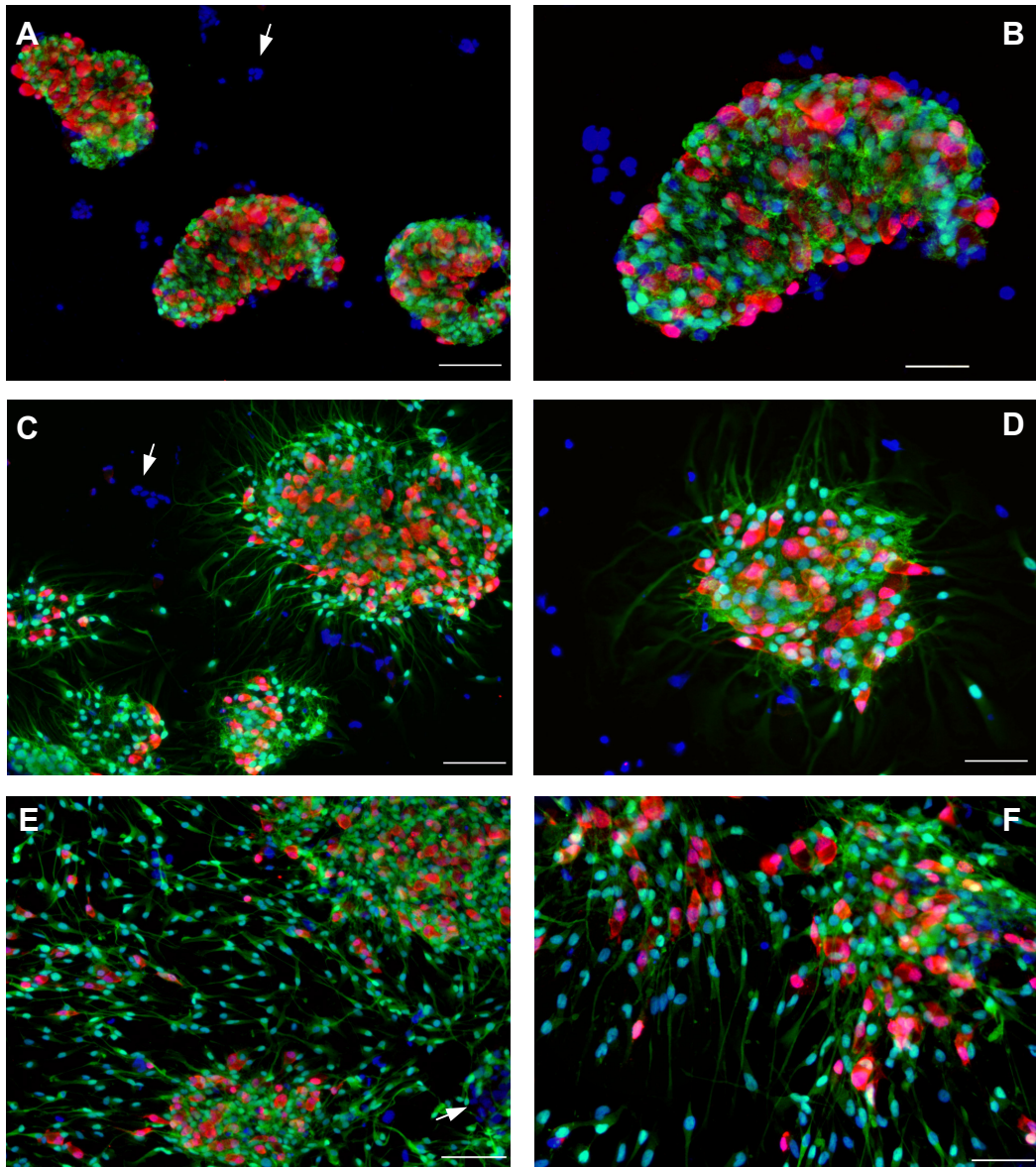
Al *giorno 5* i gangli appaiono sempre più espansi e i loro confini sono più difficili da identificare. Le cellule S100 positive proliferano negli spazi intergangliari formando *un continuum* tra un ganglio e l'altro. Gangli con pochi neuroni sembrano essere distribuiti su un ampio spazio, mentre i gangli più ricchi di neuroni rimangono compatti e costituiscono le zone con maggiore densità cellulare .(Fig.5E,F).

#### **4.1.1 Distribuzione neuronale nei gangli e sopravvivenza in coltura**

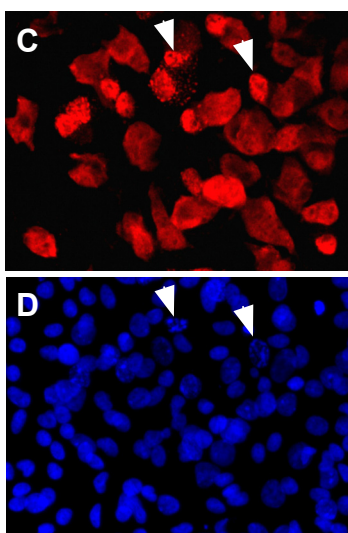
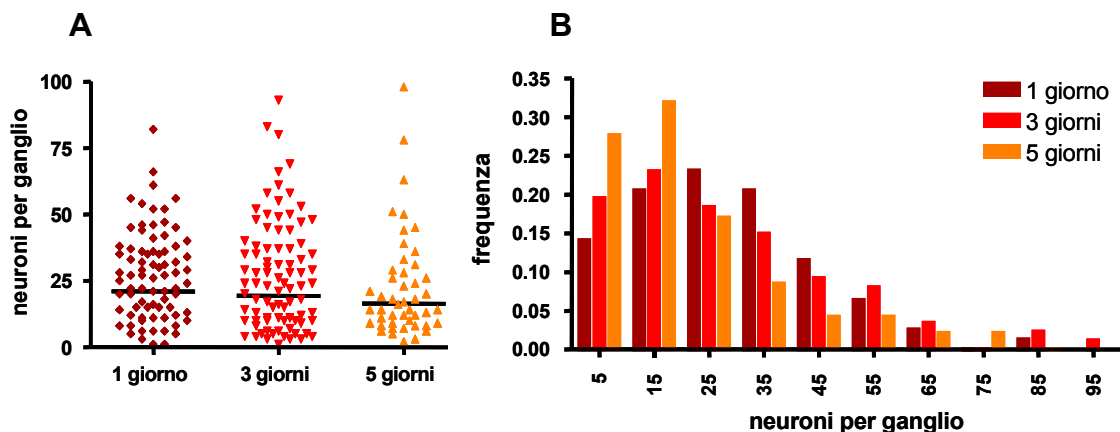
I gangli piastrati sono costituiti da un numero di neuroni compreso tra i 2 e i 100, con una media geometrica che tende a diminuire dal primo al quinto giorno di coltura (Fig.6A). Questo fenomeno può essere studiato meglio osservando la distribuzione dei neuroni nei gangli: mentre al giorno 1 il centro della distribuzione si attesta sui 20-30 neuroni per ganglio, al giorno 5 risultano molto più numerosi i gangli con meno di 20 neuroni (Fig.6B).

L'apparente incremento di gangli con pochi neuroni potrebbe essere dovuto a morte neuronale. Infatti, in ogni giorno di osservazione sono visibili cellule HuC/D immunoreattive con nucleo condensato e frammentato, segno caratteristico di morte cellulare programmata.(Fig.6C,D)

Una mortalità neuronale indiscriminata potrebbe spiegare lo spostamento della distribuzione verso sinistra, in accordo con quanto osservato. In alternativa, la morte programmata potrebbe interessare preferenzialmente i neuroni dei gangli più grandi, che esibendo maggiore compattezza avranno più difficoltà negli scambi gassosi e nella penetrazione dei nutrienti; in questa eventualità non è da escludere il distacco di interi gangli a causa di estesa mortalità.



**Figura 5.** Sviluppo e crescita dei gangli mienterici in coltura dopo 1 giorno (A, B), 3 giorni (C, D), 5 giorni (E, F). Sono marcate in rosso le cellule HuC/D positive (neuroni) e in verde le cellule S100 immunoreattive (glia); in blu, colorazione nucleare fluorescente con dapi. La barra corrisponde a 100 $\mu$ m in A,C,E, a 50 $\mu$ m in B,D,F. Durante la crescita, progressivamente i processi gliali si espandono al di fuori del ganglio ed il nucleo originario perde di compattezza (B,D,F). Si può notare la diversa velocità di espansione dei gangli di grandi e piccole dimensioni (C,E). Le frecce nelle figure A, C, E evidenziano la permanenza in coltura di piccoli gruppi di cellule negativi ai marker utilizzati.

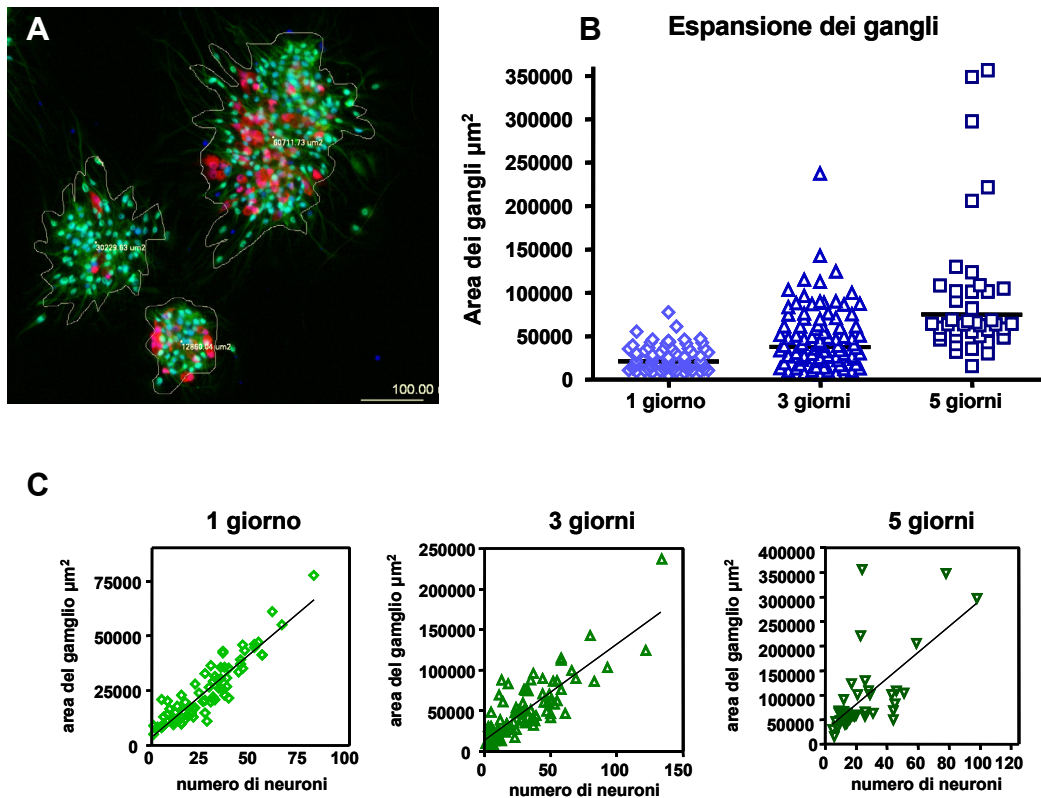


**Figura 6.** Visualizzazione grafica della distribuzione dei neuroni nei gangli durante la crescita in coltura (**A**, **B**). In **A** si osserva come la distribuzione dei punti sperimentali si concentri progressivamente verso un basso numero di neuroni con l'aumentare dei giorni di coltura, causando un modesto decremento della media geometrica. Gli stessi dati, graficati in **B**, mostrano come l'intera distribuzione neuronale si sposti verso sinistra con l'aumentare dei giorni di coltura: mentre a 1 giorno più del 60% dei gangli piastrati reca 15-35 neuroni, al giorno 5 la stessa quota di gangli è costituita da 5-15 neuroni (50-90 gangli valutati, 1000-2000 neuroni totali). In riferimento alla Fig.1D, i gangli coltivati presentano una media di neuroni molto più bassa di quelli tissutali, forse anche in seguito a frammentazione dei gangli durante la messa in coltura. Evidenze di morte cellulare durante la crescita della coltura: immunofluorescenza per HuC/D (**C**) e dapi (**D**) al giorno 3 mostrano degradazione neuronale e formazione strutture nucleari caratteristiche di morte cellulare programmata (freccie).

#### 4.1.2 Espansione dei gangli

Misurando l'area dei gangli mediante software di analisi grafica (vedi Fig.7A) si osserva un incremento dell'area media dei gangli durante i cinque giorni di coltura. Mentre il giorno 1 i gangli si presentano compatti e con aree dello stesso ordine di grandezza, già al giorno 3 e ancora più evidentemente al giorno 5 si riscontra un'ampia dispersione dei valori di superficie (Fig.7B). Questa valutazione è in accordo con l'osservazione morfologica secondo cui non tutti i gangli si espandono alla stessa velocità, mentre i gangli più piccoli aumentano velocemente la propria superficie, quelli più grandi mantengono maggiore compattezza.

Si è deciso quindi di valutare se l'espansione dei gangli è dipendente dal contenuto neuronale. Mettendo in grafico l'area di ciascun ganglio in funzione del suo numero di neuroni si osserva una modesta correlazione al giorno 1 ( $r^2 = 0.87$ ), che si riduce drasticamente fino a scomparire al giorno 5 ( $r^2 = 0.44$ ) (Fig.7C). Neanche considerando soltanto gangli con ridotto numero di neuroni si ottiene una correlazione efficace (dati non mostrati); di conseguenza, si conclude che non esiste una relazione lineare tra il numero di neuroni e l'area di espansione del ganglio. L'ampliamento dell'area gangliare è dovuta sostanzialmente alla crescita della glia e non appare probabile un coinvolgimento neuronale attivo in questo fenomeno.

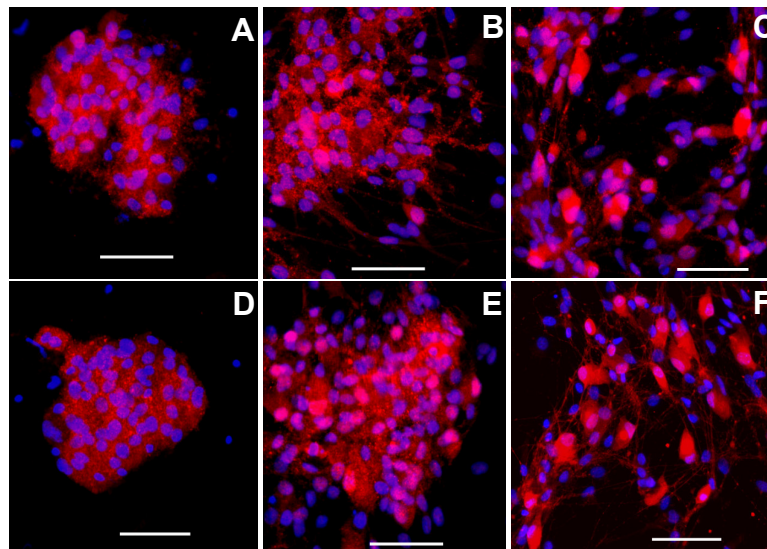


**Figura 7.** Espansione dei gangli. Figura esemplificativa del metodo utilizzato per la misurazione della superficie gangliare (A); per la descrizione dei colori vedi Fig.5. Incremento dell'area media dei gangli durante la coltivazione (B): distribuzione dei punti sperimentali e individuazione della media geometrica. In C è mostrata la relazione tra il numero dei neuroni presenti in un ganglio e la sua area: una certa linearità è presente solo dopo 1 giorno di crescita e riflette la situazione caratteristica dei gangli in tessuto; già nei giorni seguenti si perde la correlazione a causa di una crescita gliale che appare tuttora poco prevedibile.

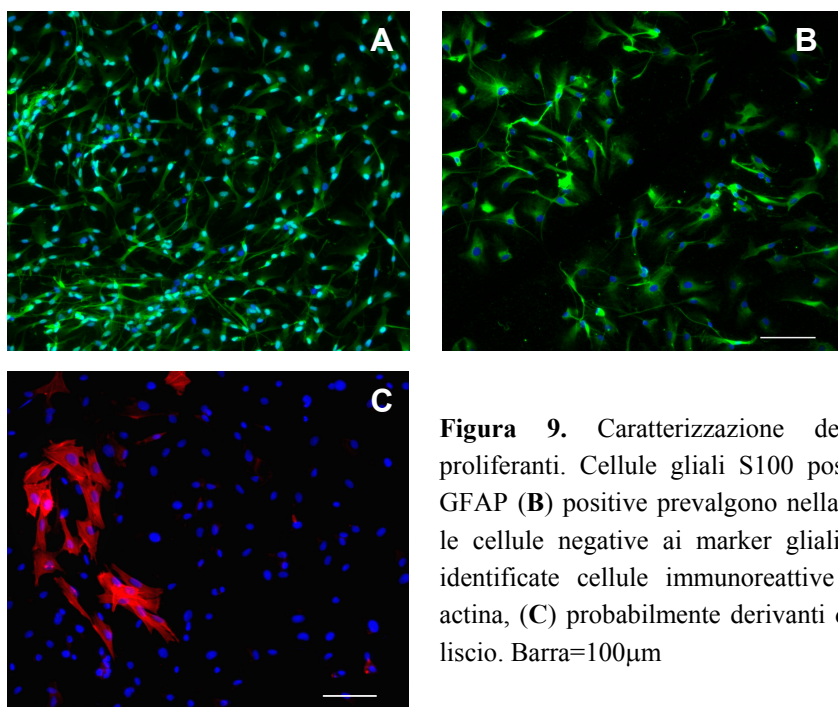
#### 4.1.3 Caratterizzazione delle cellule coltivate ed espressione dei marker

Le cellule neuronali sono state identificate, sia in tessuto che in coltura cellulare, con marker pan-neuronali come HuC/D, PGP9.5 e NSE. E' interessante notare che mentre l'espressione di HuC/D rimane costante dal tessuto al passaggio in coltura, l'espressione di PGP9.5 e di NSE non consente di identificare i neuroni durante le prime fasi di coltura (confronta Fig.8 e Fig.5); comunque, coltivando le cellule per periodi più lunghi, progressivamente entrambi i marker riappaiono.

Al giorno 1 la maggior parte dei nuclei, visualizzati con dapi, appartiene a cellule HuC/D positive oppure S100 positive; soltanto i pochi nuclei distribuiti al di fuori dei gangli non risultano positivi per i marker considerati (Fig.5). Al giorno 7, in seguito ad una intensa fase di proliferazione, sono stati caratterizzati i tipi cellulari presenti; oltre ai neuroni, visualizzati come cellule HuC/D o PGP positive, sono presenti numerose cellule gliali, identificate con immunoreattività ad S100 o a GFAP (Fig.9A,B). Piccoli gruppi di cellule che non esibiscono questi marker risultano positive per l'alfa-actina di tipo muscolare (Fig.9C). Non è stata evidenziata la presenza di immunoreattività a c-kit, marker specifico per cellule intestiziali di Cajal (dato non mostrato). Poiché le caratterizzazioni per immunofluorescenza sono state condotte utilizzando solo due marker contemporaneamente (più dapi) non è possibile escludere del tutto la presenza di altri tipi cellulari non ricercati.



**Figura 8.** Espressione dei marker neuronali NSE (A-C) e PGP9.5 (E-F) durante la crescita, al giorno 1 (A,D), giorno 3 (B,E) e giorno 5 (C,F). In rosso, l'immunoreattività per il marker neuronale, in blu, colorazione nucleare con dapi. La barra corrisponde a 100µm in A,D, a 50µm in B,C,D,E,F. In confronto all'espressione di HuC/D, che rimane costante dal tessuto alla coltura (vedi Fig.4 e 5), l'espressione degli altri marker neuronali non permette di effettuare una caratterizzazione fino al giorno 5.

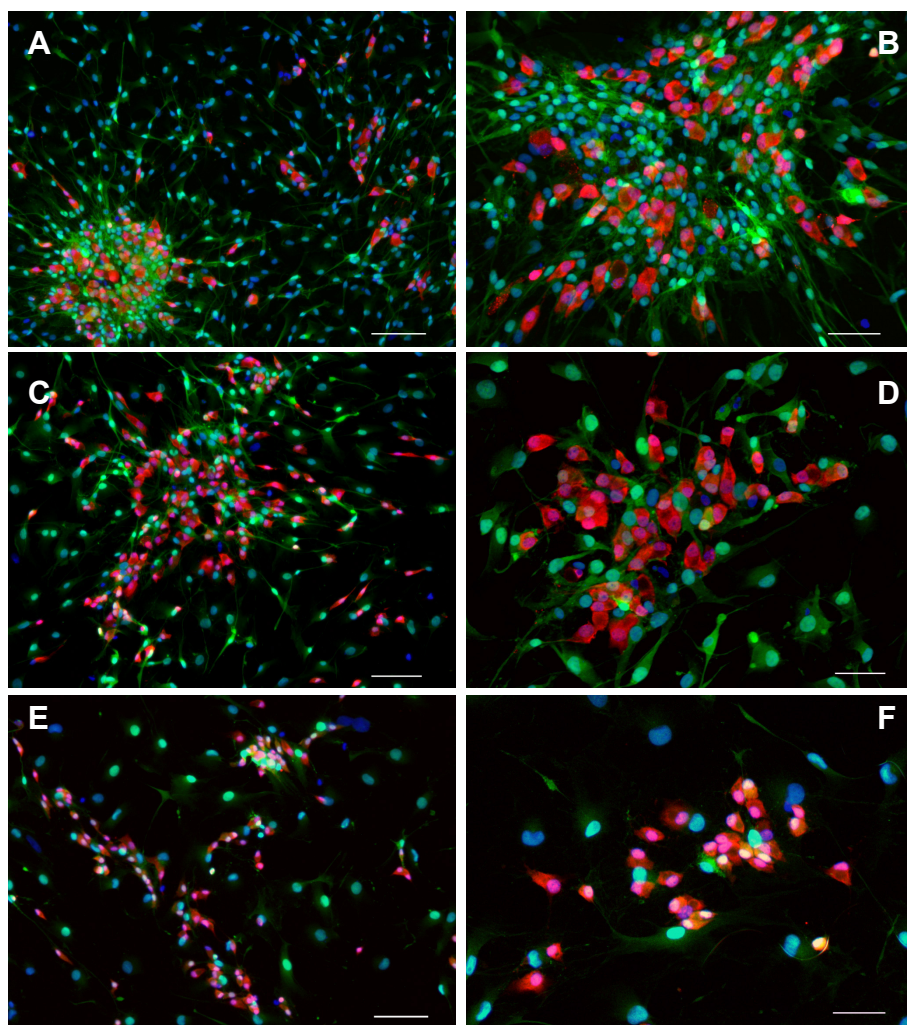


**Figura 9.** Caratterizzazione delle cellule proliferanti. Cellule gliali S100 positive (A) e GFAP (B) positive prevalgono nella coltura; tra le cellule negative ai marker gliali sono state identificate cellule immunoreattive per l'alfa-actina, (C) probabilmente derivanti dal muscolo liscio. Barra=100 $\mu$ m

#### 4.1.4 Colture di gangli a lungo termine

Le colture fin qui presentate sono state utilizzate entro 7 giorni dalla messa in coltura. Già dal giorno 5 la proliferazione gliale occupa gli spazi vuoti tra i gangli e nel lungo termine diventa il tipo cellulare prevalente, assieme a cellule muscolari o miofibroblasti egualmente proliferanti.

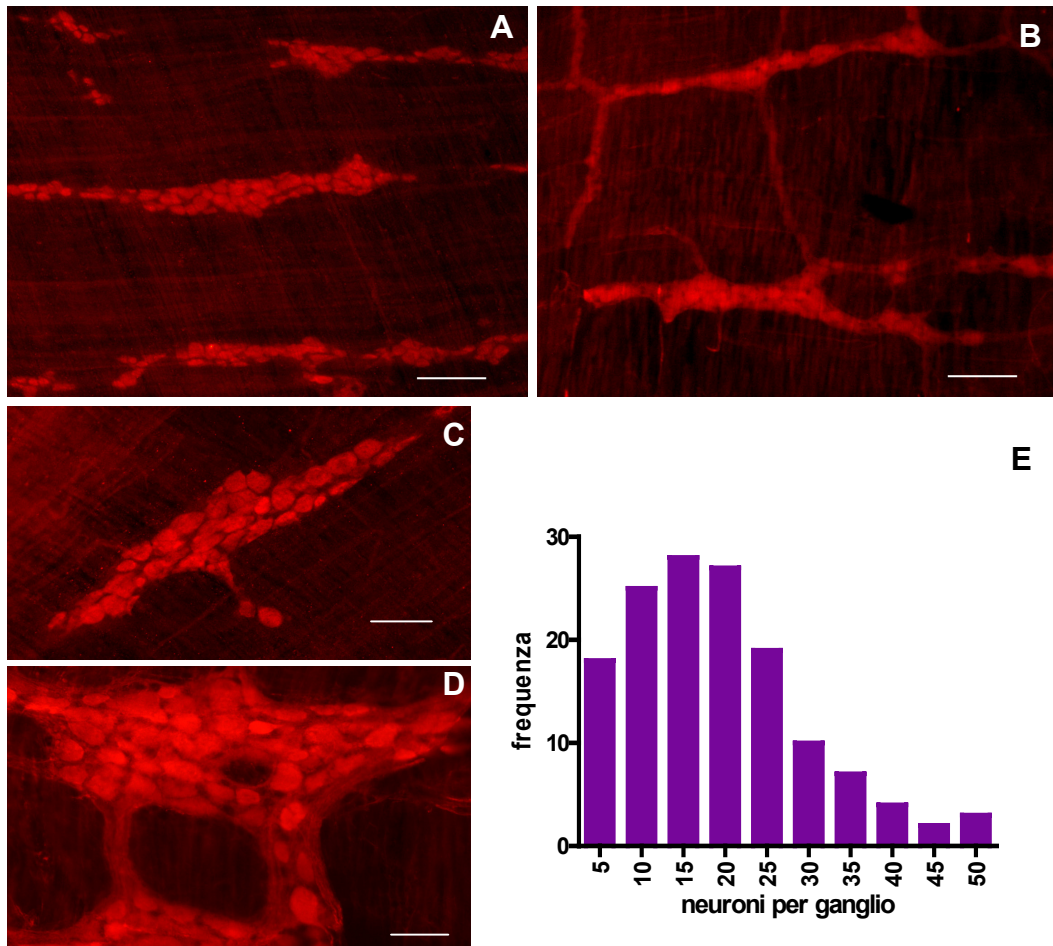
Per evitare questa condizione al giorno 3 è stato aggiunto citosina arabinofuranoside (ARA C) 5 $\mu$ M, un nucleoside tossico per le cellule proliferanti, al fine di limitarne la crescita. Al giorno 7, colture di gangli esposte ad ARA C e colture non esposte sono state confrontate (Fig.10). Oltre alla riduzione del numero di cellule gliali nei dintorni dei gangli sono evidenti alcuni cambiamenti morfologici a carico delle cellule restanti come espansione del citoplasma e ingrandimento dei nuclei. Non è noto se vi siano cambiamenti funzionali associati a questi fenomeni.



**Figura 10.** Mantenimento dei gangli a lungo termine. Colture di 7 giorni (A,B), 7 giorni in presenza di ARA C e 14 giorni in presenza di ARA C. I marker ed i colori utilizzati sono gli stessi riportati in Fig.2. La barra equivale a 100 $\mu$ m in A,C,E, a 50 $\mu$ m in B,D,F.

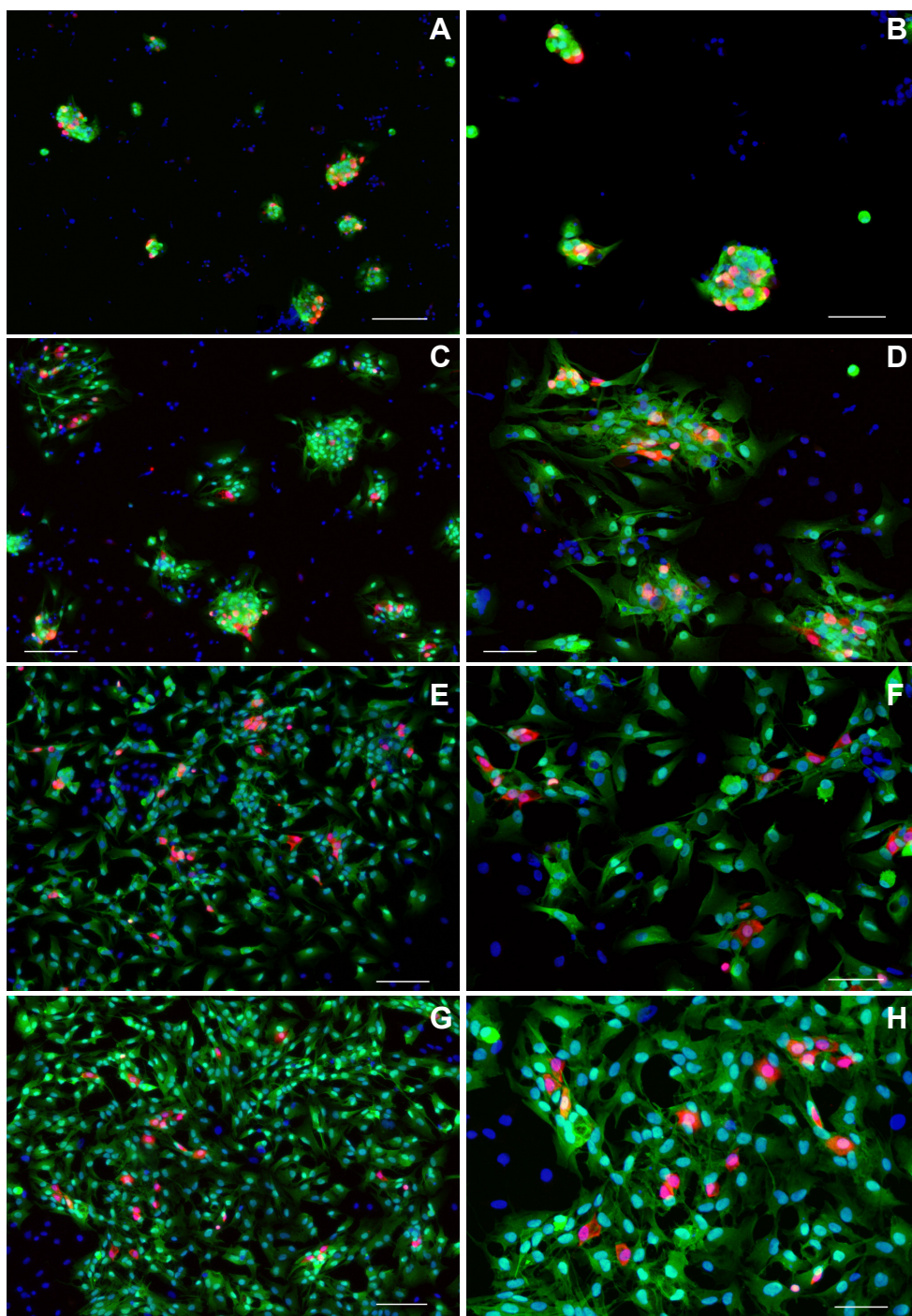
## 4.2 ALLESTIMENTO E SVILUPPO DI COLTURE MISTE DI NEURONI MIENTERICI DISSOCIATI DI RATTO

Le colture sono state ottenute come descritto in materiale e metodi. Il tessuto di partenza, costituito da frammenti di muscolo longitudinale e plesso mienterico di ratto adulto, è stato colorato per immunofluorescenza al fine di valutare la presenza di gangli e stimarne il contenuto neuronale. (Fig.11)



**Figura 11.** Gangli di plesso mienterico di ratto. Immunofluorescenza per i marker pan-neuronali HuC/D (A, C) e PGP9.5 (B, D). La barra corrisponde a 100 $\mu$ m in A, B e 50 $\mu$ m in C, D. Distribuzione dei neuroni nei gangli di plesso mienterico di ileo di ratto (E); 2 animali utilizzati, circa 150 gangli contati. Confrontando con Fig.4 si nota come i gangli mienterici di ratto siano più piccoli e con una media di neuroni inferiore a quelli di cavia.





**Figura 12.** Sviluppo e crescita delle colture di neuroni mienterici dopo 1 giorno (**A, B**), 2 giorni (**C, D**), 3 giorni (**E, F**) e 5 giorni (**G, H**). Sono visualizzate in rosso le cellule HuC/D positive (neuroni) e in verde le cellule S100 immunoreattive (glia); in blu, colorazione nucleare con dapi. La barra corrisponde a 100 $\mu$ m in A,C,E,G a 50 $\mu$ m in B,D,F,H.

Al giorno 1 sono evidenti frammenti gangliari costituiti da piccoli gruppi di cellule, prevalentemente HuC/D positive (neuroni) e S100 positive (glia); anche altre cellule non caratterizzate sono presenti. Rapidamente i cluster cellulari si disassemblano e la componente gliale proliferata prendendo il sopravvento. I neuroni appaiono isolati oppure organizzati in piccoli gruppi. Le cellule sono tra loro ben separate e crescono quasi perfettamente in monostrato.

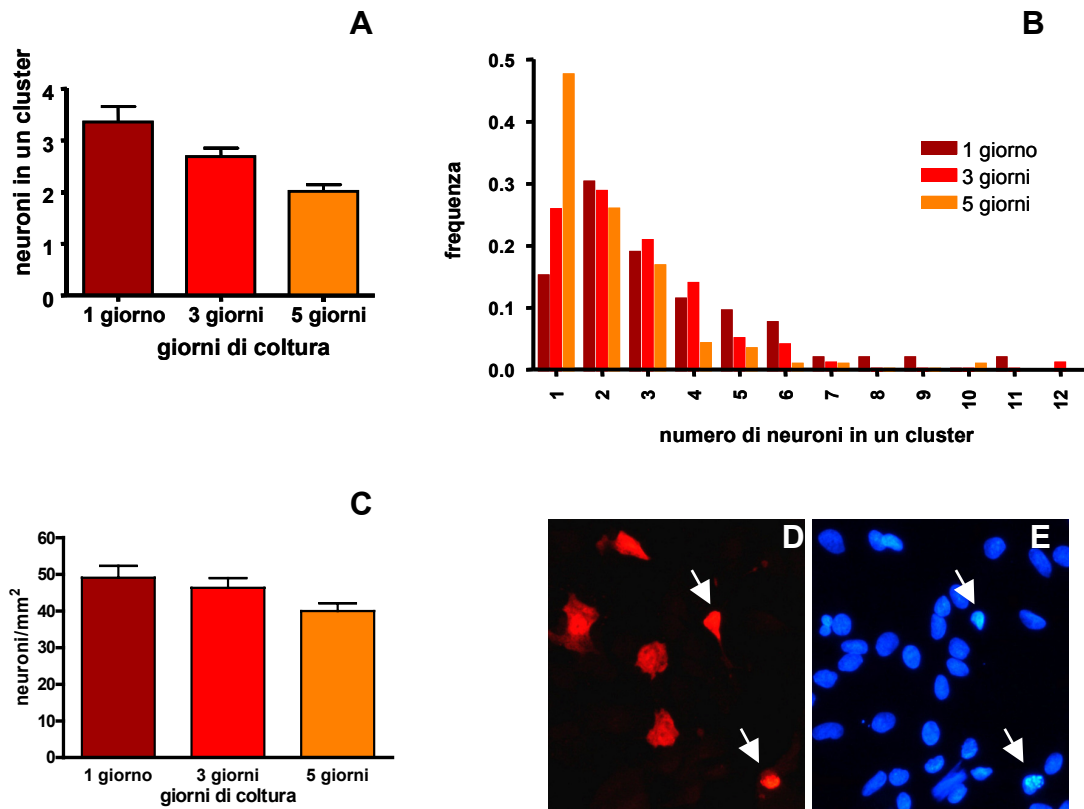
La coltura è stata seguita nei primi giorni di crescita con gli stessi marker utilizzati su tessuto e sulle colture precedentemente descritte. Al giorno 1 (Fig.12A,B) sono evidenti piccoli aggregati cellulari contenenti neuroni (cellule HuC/D positive) o glia (S100 positiva); poiché il tessuto è stato ripetutamente frammentato i cluster hanno grandezza omogenea. A partire dal giorno 2 (Fig.12C,D) i cluster cellulari perdono compattezza e la componente proliferante, costituita da glia e altre cellule non caratterizzate, comincia a colonizzare gli spazi vuoti. Al giorno 3 (Fig.12E,F) la glia costituisce il tipo cellulare numericamente preponderante ed i neuroni risultano isolati o distribuiti in piccoli gruppi, dispersi tra le cellule proliferanti. Al giorno 5 (Fig.12G,H) la componente neuronale della coltura costituisce meno di un decimo del totale e risulta dispersa in uno strato omogeneo di glia. I tipi cellulari identificati come neuroni e glia tramite marcatura con HuC/D ed S100 sono stati confermati utilizzando altri marker noti, come NSE e GFAP (dato non mostrato).

#### **4.2.1 Sopravvivenza dei neuroni in coltura**

Per valutare la sopravvivenza dei neuroni nelle condizioni colturali si è contato il numero di cellule nei progressivi giorni di coltura, utilizzando due approcci diversi.

Poiché la frammentazione dei gangli e la semina del materiale senza preventiva selezione hanno portato ad una dispersione dei neuroni casuale, si è deciso di contare il numero di neuroni per unità di superficie in campi microscopici 20X, corrispondenti a 0.14 mm<sup>2</sup>. Con questo approccio si registra una diminuzione del 19% di neuroni per unità di superficie al quinto giorno di coltura (Fig.13C)

In modo alternativo si sono contati i neuroni presenti in ogni piccolo gruppo di cellule (o cluster) isolato, facilmente distinguibile durante la crescita. In questo modo si rileva una diminuzione media del numero di neuroni per cluster durante la crescita (Fig.13B); inoltre, l'analisi della distribuzione dei neuroni nei cluster evidenzia un forte incremento di neuroni singoli, accompagnato da una diminuzione di neuroni accorpati in cluster più numerosi (Fig.13C). La diminuzione dei neuroni potrebbe essere dovuta anche a morte neuronale: durante la coltivazione, infatti, si osservano in tutti i giorni di crescita nuclei condensati, caratteristici di morte cellulare programmata



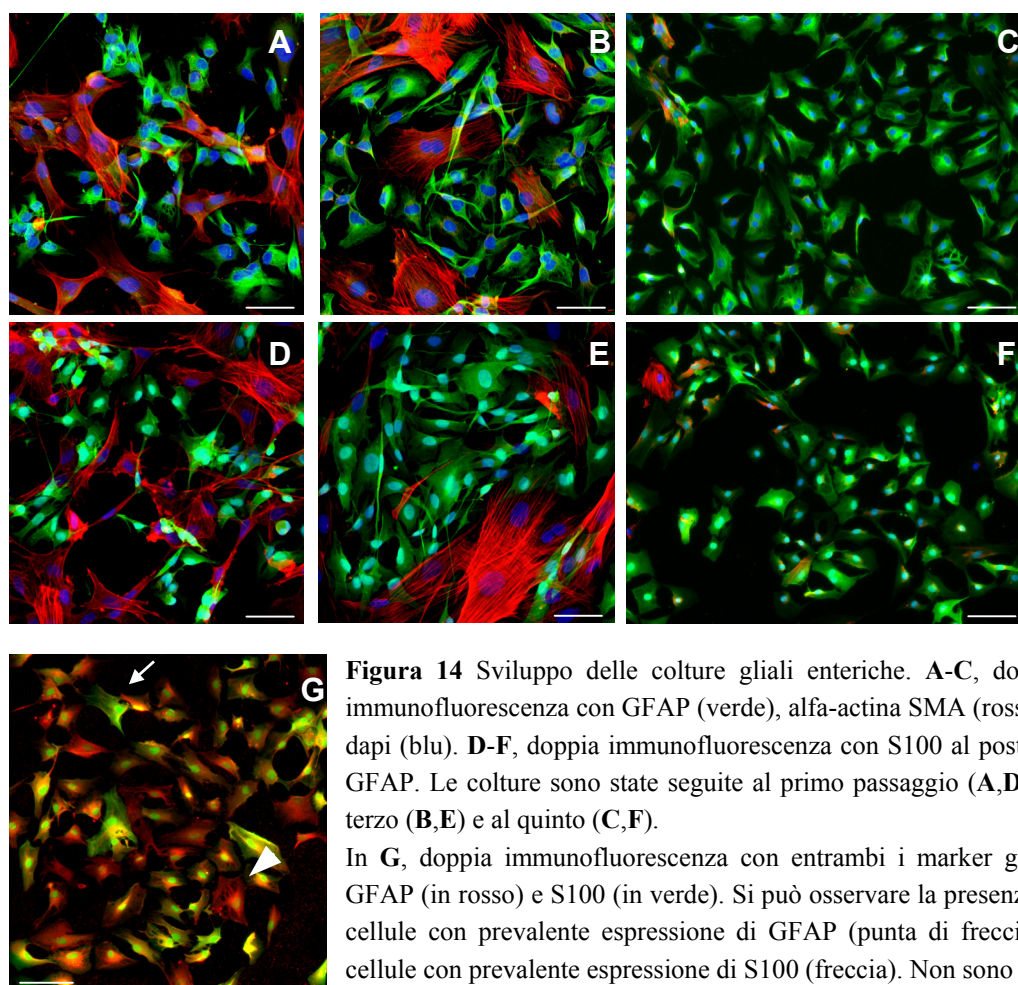
**Figura 13** Conteggio dei neuroni durante la coltivazione. Diminuzione del numero medio di neuroni che compongono un cluster durante la crescita (A). Cambiamento della distribuzione dei neuroni in cluster dal giorno 1 al giorno 5 (B); in particolare si nota l'incremento dei neuroni isolati (un neurone per cluster) e la diminuzione dei cluster con più neuroni (sono stati considerati circa 100 cluster per ogni punto sperimentale). In C è visualizzata la diminuzione del numero di neuroni per unità di superficie (sono stati valutati almeno 300 neuroni, e più di 50 campi 20X). Fenomeni di mortalità neuronale durante la coltivazione sono riconoscibili per la condensazione nucleare (D, E). In rosso, colorazione immunofluorescente per HuC/D, in blu, dapi.

### 4.3 SVILUPPO DI COLTURE GLIALI ENTERICHE DI RATTO

Colture primarie di cellule gliali sono state ottenute dal plesso mienterico di ratto, secondo il protocollo descritto in materiale e metodi. La coltura inizialmente contiene anche neuroni, che vengono progressivamente persi con il progredire della crescita e durante le procedure di sotto-coltivazione. Le cellule proliferanti sono state seguite durante la crescita per 5 passaggi (Fig.14), ossia per cinque cicli di sottocoltivazione. In questa fase non è stato utilizzato nessun accorgimento per selezionare una popolazione cellulare.

Al passaggio 1 (Fig.14A, D) sono presenti cellule positive a GFAP (Fig.14A) ed S100 (Fig.14D), marker specifici per la glia; da notare l'espressione filamentosa citoplasmatica di GFAP e quella più diffusa, sia citoplasmatica che nucleare di S100. Accanto a questi markers si osserva la presenza di cellule contaminanti, positive all'alfa-actina di tipo muscolare, probabilmente muscolo liscio oppure miofibroblasti. La proporzione di queste cellule è sensibilmente variabile da una preparazione all'altra. Comunque, col progredire della coltivazione, il numero di contaminanti diminuisce fino ad avere una popolazione gliale (positiva ad S100 oppure GFAP) al 90% pura (Fig.14C,F). Nel caso sia necessaria una coltura con maggiore purezza, oppure il numero di cellule contaminanti sia molto alto, si possono adottare procedure per rimuovere i fibroblasti (vedi materiale e metodi)

E' interessante osservare che le cellule gliali esibiscono una naturale eterogeneità, sia morfologica, sia in relazione all'espressione dei marker GFAP e S100, visualizzabile in esperimenti di doppia immunofluorescenza (Fig.14G).



**Figura 14** Sviluppo delle colture gliali enteriche. **A-C**, doppia immunofluorescenza con GFAP (verde), alfa-actina SMA (rosso) e dapi (blu). **D-F**, doppia immunofluorescenza con S100 al posto di GFAP. Le colture sono state seguite al primo passaggio (**A,D**), al terzo (**B,E**) e al quinto (**C,F**).

In **G**, doppia immunofluorescenza con entrambi i marker gliali, GFAP (in rosso) e S100 (in verde). Si può osservare la presenza di cellule con prevalente espressione di GFAP (punta di freccia) e cellule con prevalente espressione di S100 (freccia). Non sono note una differenze funzionali o classificative per queste sottopopolazioni. Barra = 50µm in A,B,D,E e 100µm in C,F,G

## **4.4 TOSSICITÀ DA GLUTAMMATO**

L'esposizione ad alte concentrazioni di glutammato causa tossicità neuronale determinando morte cellulare per apoptosi o necrosi. Mentre nel sistema nervoso centrale questo fenomeno è stato ampiamente studiato, soltanto un lavoro descrive l'eccitotossicità da glutammato nei neuroni enterici.

### **4.4.1 Tossicità da glutammato in colture organotipiche**

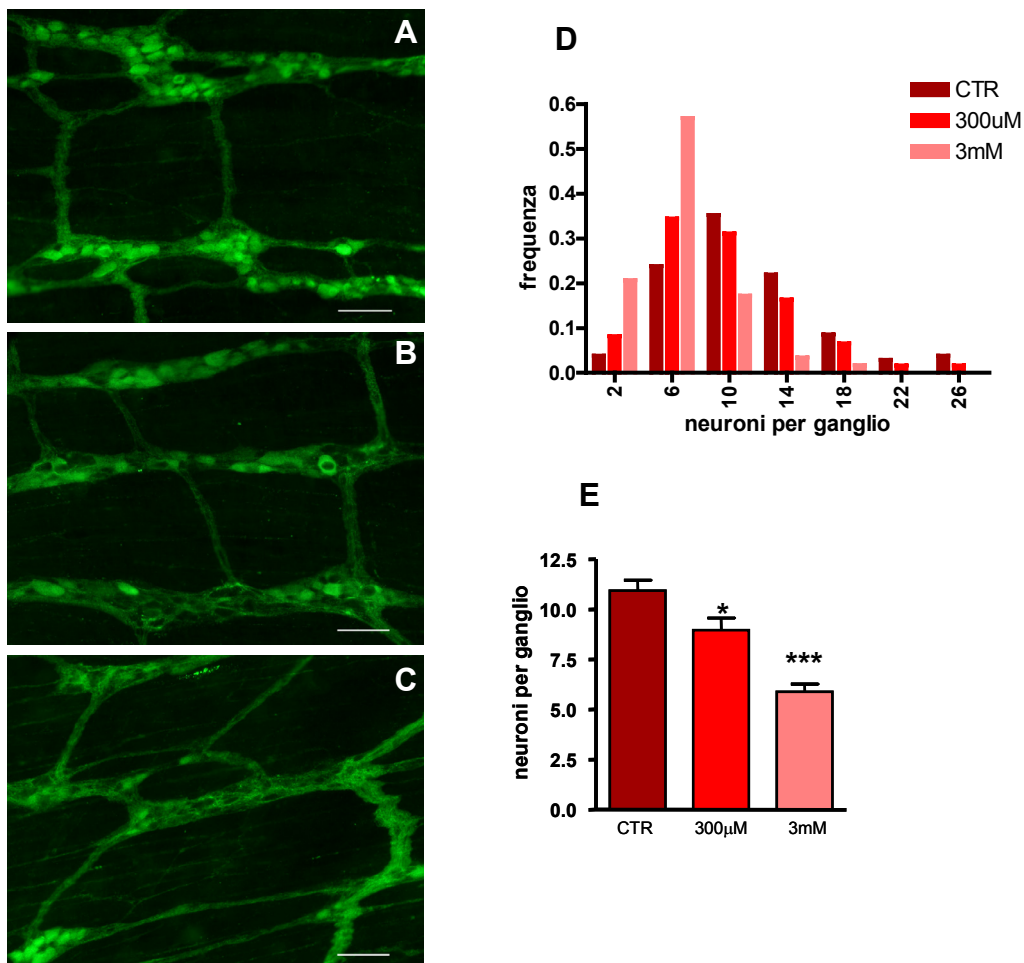
Per valutare la tossicità da glutammato in tessuto, strati di muscolo longitudinale recanti il plesso mienterico sono stati isolati dall'ileo di ratto e coltivati come descritto in materiale e metodi. Dopo aver esposto i tessuti per 1 ora a diverse concentrazioni di glutammato disciolto nel mezzo di coltura (300 $\mu$ M e 3mM) oppure al solo terreno (CTR), si sono attese 24 ore di recupero prima di valutare il numero di neuroni presenti. I tessuti sono stati opportunamente fissati e colorati per immunofluorescenza contro PGP9.5 (Fig.15). Nel controllo non trattato si può osservare una forma iniziale di degenerazione dei gangli dovuta al passaggio in coltura: alcuni dei neuroni contenuti hanno ridotto le proprie dimensioni e probabilmente andranno incontro a morte programmata. I tessuti trattati esibiscono invece estesi danni gangliari di natura diversa rispetto al controllo; si osserva un progressivo svuotamento del contenuto neuronale dei gangli, visualizzabile con la comparsa di cavità. Per ottenere una valutazione numerica del danno citotossico si è contato il numero di neuroni per ganglio. Mentre nel tessuto di controllo si ottiene una distribuzione centrata intorno agli 11 neuroni per ganglio, i trattamenti con glutammato determinano un progressivo slittamento a sinistra della curva, portando il numero medio di neuroni per ganglio a 9 (300 $\mu$ M) e 5,8 (3mM). Lo spostamento della distribuzione è simmetrico e sembra coinvolgere gangli di tutte le dimensioni.

### **4.4.2 Tossicità da glutammato in colture di gangli**

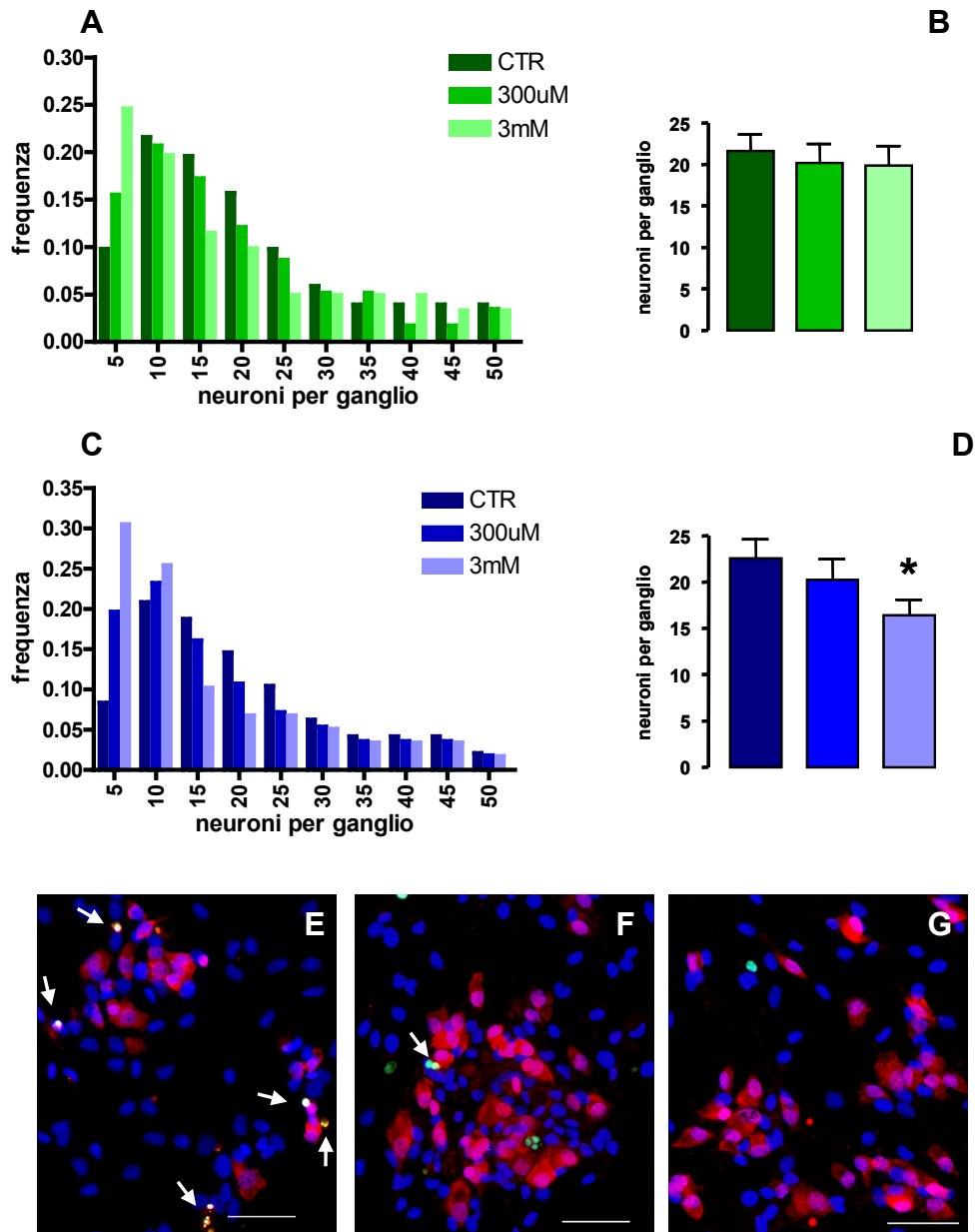
Si è deciso di provare gli effetti del glutammato in colture di gangli mienterici di cavia: tra i modelli messi a punto, infatti, è quello che permette di disporre del numero più ampio di neuroni. Si è scelto come inizio del trattamento il giorno 4 di coltura perché consente di lavorare con gangli poco compatti e tra loro distinguibili, con una crescita gliale ancora contenuta.

Si sono trattate le cellule 1h con due concentrazioni diverse di glutammato (300 $\mu$ M e 3mM) sciolto nel terreno di coltura; parallelamente una terza aliquota di cellule di controllo è stata

sottoposta a procedure analoghe, senza venire a contatto con il glutammato (CTR). Successivamente si è atteso un tempo di recupero di 12 o 24 ore prima di fissare le cellule e sottoporle a immunofluorescenza e/o TUNEL (Fig.16).



**Figura 15.** Tossicità da glutammato in colture organotipiche di plesso mienterico. Il trattamento con glutammato è durato 1h, seguito da 24h di recupero. (A-C) Figure esemplificative della progressiva diminuzione del contenuto neuronale dei gangli, visualizzato tramite immunoreattività a PGP9.5. A, controllo; B, trattamento con glutammato 300μM; C, trattamento con glutammato 3mM. La barra corrisponde a 100 μm. (D, E) Quantificazione della tossicità mediante conta del contenuto neuronale dei gangli. In D, spostamento simmetrico verso sinistra della distribuzione dei neuroni nei gangli; E, la media di neuroni per ganglio diminuisce significativamente dopo trattamento con glutammato 300 μM (\* p<0.05, Dunn's Test dopo ANOVA) ed quasi la metà rispetto al controllo dopo trattamento con glutammato 3 mM (\*\*\*) p<0.001, Dunn's Test dopo ANOVA).



**Figura 16** Tossicità da glutammato in colture di gangli mienterici. Il trattamento con glutammato a diverse concentrazioni è durato 1h, seguito da un recupero di 12 (A.,B) o 24 ore (C, D). A, Dopo 12h di recupero il conteggio dei neuroni per ganglio mostra uno spostamento della distribuzione verso sinistra, evidente soprattutto per la concentrazione 3mM; tuttavia il numero medio di neuroni per ganglio non varia significativamente (B). Dopo 24 ore di recupero (C) la distribuzione dei neuroni nei gangli mostra caratteristiche analoghe ma più accentuate; da notare che la diminuzione dei neuroni nei gangli interessa solo i gangli di piccole dimensioni (<25-30 neuroni), mentre i gangli ricchi di neuroni non sembrano affetti. (D) La media dei neuroni per ganglio diminuisce significativamente solo alla concentrazione di 3mM (\*  $p < 0.05$ , Dunn's Test dopo ANOVA). Positività alla TUNEL delle colture di gangli dopo trattamento con glutammato 3mM (1h) e recupero di 24 ore (E-F); colture di controllo non trattate (G). In rosso, immunoreattività per HuC/D, in verde TUNEL, in blu dapi; la barra corrisponde a 50 $\mu$ m. Da notare che la maggior parte dei neuroni sopravvive al trattamento: in particolare, i neuroni positivi alla TUNEL si concentrano in gangli di piccole dimensioni (E), mentre gangli più ricchi di neuroni appaiono meno sensibili alla tossicità (F).

Dopo 12 ore dal trattamento con glutammato non sono visibili alterazioni morfologiche della coltura; la conta dei neuroni in ogni ganglio coltivato mostra uno spostamento della distribuzione verso sinistra, visualizzabile con l'aumento dei gangli di piccole dimensioni (Fig.16 A). Questo spostamento è evidente soprattutto per la concentrazione più alta di glutammato, ma non causa una variazione significativa del numero medio di neuroni per ganglio (Fig.16 B).

Dopo 24 ore, lo spostamento della distribuzione verso sinistra diventa più marcato per la concentrazione 3mM di glutammato e produce un significativo abbassamento del numero medio di neuroni per ganglio (Fig.16 C,D) Il campione trattato con la concentrazione più bassa di glutammato non differisce significativamente dal controllo. Da notare che lo slittamento della distribuzione non è simmetrico, bensì relativo ai soli gangli di piccole dimensioni con meno di 25-30 neuroni; gangli con più ricco contenuto neuronale sembrano non risentire dei trattamenti citotossici. Questo fatto differenzia la perdita di neuroni spontanea della coltura con quella indotta da glutammato.

E' noto dalla letteratura che la citotossicità da glutammato si manifesta, almeno in parte, seguendo un percorso apoptotico. Immunofluorescenza diretta contro la caspasi 3 attivata (dopo 6,12 e 24 ore dal trattamento) non ha consentito di rilevare variazioni di marcatura rispetto al controllo (dato non mostrato), suggerendo un debole coinvolgimento di questa cascata proteolitica nella mortalità neuronale. Tuttavia, utilizzando un saggio di TUNEL fluorescente, che utilizza una deossinucleotide-transferasi terminale (TdT) incorporando dUTP-fluoresceinato nei siti di rottura del DNA, accoppiata ad una immunofluorescenza per HuC/D è stato possibile evidenziare un aumento di neuroni con nucleo frammentato (Fig.16 E,F,G). La visualizzazione dei neuroni degradati è più marcata nei piccoli cluster gangliari piuttosto che nei raggruppamenti più estesi (confronta Fig.16 E e F).



## 5. DISCUSSIONE

Un numero sempre crescente di ricerche sul SNE impiega colture cellulari. La mancanza di colture neuronali pure spinge alcuni sperimentatori all'utilizzo di linee cellulari, come ad es. le SHSy5y, mentre altri scelgono come modello le colture neuronali enteriche miste, da diverse regioni dell'intestino. Tuttavia, l'impiego di molteplici modelli animali (topo, ratto, cavia, coniglio, maiale, uomo) in diverse fasi di sviluppo (embrionale, neonato, adulto) ha causato una frammentazione dei modelli sperimentali e una scarsa caratterizzazione.

In questo studio si opera una descrizione delle caratteristiche di crescita di alcuni modelli di colture sviluppate a partire dall'ileo di cavia o ratto. Si tratta di colture miste in cui si ritrova una componente proliferante gliale e ridotte contaminazioni di cellule muscolari o miofibroblasti; i neuroni, identificati come cellule HuC/D immunoreattive, esibiscono anche gli altri markers pan-neuronali NSE e PGP9.5 dopo qualche giorno di coltura (Fig.8 e 9). Le colture possono essere utilizzate nel breve termine, quando il rapporto neuroni/glia è paragonabile alla situazione in vivo (Fig.5 e 12), oppure possono essere mantenute per tempi più lunghi in presenza di inibitori mitotici quali ARA C, che mostrano però qualche manifestazione morfologica di tossicità come svantaggio (Fig.10).

A nostra conoscenza, dopo i tentativi iniziali di valutazione della sopravvivenza utilizzando [<sup>3</sup>H]GABA<sup>62</sup>, solo pochi lavori del gruppo di Ekblad<sup>58,67,68</sup> hanno posto l'accento sulla sopravvivenza delle colture e dei sottotipi neuronali presenti. Utilizzando colture mienteriche dissociate di ratto adulto, ad esempio, è stata riportata una marcata riduzione neuronale (del 40% dopo 4 giorni di coltivazione e del 70% dopo 8), associata ad un cambiamento di composizione dei sottotipi presenti in coltura<sup>67</sup>; in colture mienteriche da maiale neonato, invece, la popolazione neuronale sembra dimezzarsi dopo 6 giorni di coltura<sup>58</sup>.

Anche i risultati prodotti in questa ricerca mostrano che durante la coltivazione intervengono fenomeni rilevanti di mortalità neuronale. Due modelli diversi di colture da animali adulti sono stati studiati: colture di neuroni mienterici di ratto dissociati e colture di gangli mienterici di cavia.

Per quello che riguarda le colture di neuroni dissociati si è evidenziata una perdita di neuronale del 19% dopo 5 giorni di coltivazione (Fig.13), associata a cambiamenti nei raggruppamenti neuronali iniziali: per effetto di migrazione o di morte cellulare, con l'avanzata del tempo di coltivazione incrementano i neuroni isolati o raggruppati in piccoli cluster (gruppi di 3,4 neuroni il primo giorno diventano di 2,0 il giorno 5), dispersi in uno strato crescente di glia (Fig 12 e 13A,B). Sebbene la mortalità neuronale sembri inferiore a quella decritta in modelli analoghi, il basso numero di neuroni effettivamente presenti in coltura costituisce un limite per l'utilizzo di questa metodica. Non è noto il rapporto

neuroni/glia in colture simili, quindi non è possibile il confronto diretto in questo senso; tuttavia, sembra difficile poter utilizzare questa tipologia di coltura in assenza di inibitori mitotici o in tempi lunghi di coltivazione.

Le colture di gangli mienterici da cavia sono state seguite con un approccio statistico basato sulla frequenza di distribuzione dei neuroni nei gangli: infatti, non è stato possibile standardizzare né il numero di gangli piastrati, né il contenuto neuronale di tali gangli. Un approccio basato sul conteggio dei neuroni per unità di superficie non renderebbe conto dell'effettivo sviluppo della coltura (Fig.5), che risulta procedere in modi diversi per i raggruppamenti estesi e per quelli ridotti. Mentre nel primo caso i cluster (definiti 'gangli' nella sezione Risultati, in realtà non corrispondono a effettivi gangli integri, ma presumibilmente a parte di essi) mantengono una struttura compatta e si espandono in modo limitato nei primi giorni di coltivazione, nel secondo caso si assiste ad un rapido adattamento alle condizioni colturali con formazione di un monostrato di crescita e aumento delle distanze cellulari.(Fig.5,7) Tuttavia, l'espansione del ganglio non è dipendente dal numero di neuroni al suo interno, poiché nessuna correlazione è stata dimostrata (Fig.7C). La perdita di compattezza strutturale dei cluster potrebbe essere guidata da un basso numero di cellule gliali, anche se non sono state eseguite quantificazioni al merito: l'osservazione nasce dal fatto che nei clusters estesi un elevato numero di cellule gliali tiene saldati assieme i neuroni, mentre un'altra popolazione gliale si espanda nel territorio circostante.

La sopravvivenza di queste colture è stata valutata dimostrando uno spostamento verso sinistra della distribuzione dei neuroni nei clusters, con riduzione della media geometrica del 22%. Tale spostamento riguarda tutti i clusters, ma è meno evidente per quelli di grandi dimensioni (>55 neuroni), che rappresentano 'la coda' della distribuzione, anche per la minore rappresentanza (Fig.6). Tuttavia, fenomeni di frammentazione nucleare sono risultati evidenti anche in questi gangli estesi.

La dimostrazione dei cambiamenti morfologici e degenerativi che avvengono in coltura dovrebbe essere tenuta in considerazione negli studi successivi condotti su questi modelli. Alcuni ricercatori hanno fornito prova di morte neuronale in coltura indotta da anticorpi anti-HuD<sup>70</sup>, da iperglicemia<sup>34</sup>, da glutammato<sup>82</sup> e da LPS<sup>58</sup>, ma solo in quest'ultimo caso è stato valutato il tasso di mortalità spontanea della coltura. Data la bassa sopravvivenza di queste colture, la possibilità di lavorare su sistemi ben caratterizzati permette stime più attendibili del significato e della rilevanza biologica della risposta a stimoli citotossici.

Le colture di gangli mienterici accoppiate all'analisi della frequenza di distribuzione neuronale sono state utilizzate per studiare la tossicità da glutammato, che riveste un ruolo primario nel SNC ma è poco studiata nel SNE.

L'incubazione delle colture di gangli con glutammato 300 $\mu$ M per 12 o 24 ore non ha prodotto spostamenti rilevanti della distribuzione, né alterazioni significative del numero medio di neuroni per ganglio (Fig.16). Utilizzando concentrazioni più elevate (3mM) si osserva invece uno spostamento verso sinistra della distribuzione che risulta statisticamente significativo (Fig.16C,D) e comporta una riduzione del 34% del numero di neuroni nei cluster (media geometrica). E' importante notare che lo spostamento non è simmetrico: mentre i cluster con meno di 10 neuroni incrementano di numero e quelli compresi tra 15 e 30 neuroni diminuiscono, un'altra popolazione con più di 30 neuroni sembra poco affetta dal fenomeno. Almeno in parte, la morte neuronale comporta frammentazione del nucleo simil-apoptotica; ciononostante marker precoci di apoptosi (caspasi 3) non hanno mostrato positività (Fig.16E,F,G).

Ciò che avviene in coltura non rispecchia esattamente quello che avviene nelle coltivazioni di tessuto: whole mount di muscolo longitudinale e plesso mienterico di ratto, isolati e coltivati, mostrano una maggiore sensibilità ai trattamenti con glutammato. Infatti, già concentrazioni pari a 300 $\mu$ M per 24 ore causano una diminuzione significativa del numero medio di neuroni per ganglio, che raggiungono circa il 50% del valore iniziale in seguito a trattamenti con glutammato 3mM (Fig.15).

L'unico studio di eccitotossicità nel SNE indotta da glutammato (Kirchgessner AL, 1997, Ref.82) identifica sia morte precoce per necrosi che morte tardiva per apoptosi in whole mount coltivate e in colture di gangli mienterici. Sebbene le concentrazioni di glutammato in grado di evocare sostenuta morte cellulare siano le stesse (3mM), non è stata descritta mortalità in concentrazioni inferiori; inoltre, le colture di gangli sono risultate più sensibili all'agente tossico: dopo 20 minuti è stata descritta necrosi del 40% del campione e dopo 24 ore apoptosi nella metà delle cellule. Una delle ragioni delle differenze riportate sono forse dovute ai metodi di rilevazione.

E' interessante soffermarsi sui risultati delle colture cellulari: mentre in questa ricerca le colture neuronali risultano meno sensibili al glutammato nei confronti del tessuto, nello studio di Kirchgessner avviene il fenomeno inverso: oltre all'influenza di una specie-specificità, è probabile che parte della differenza sia dovuta alla coltivazione dei gangli in presenza di ARA C, un inibitore della mitosi, che riduce drasticamente il numero delle cellule proliferanti. E' noto che la glia enterica esprime il trasportatore del glutammato EAAC1 e quindi rivesta un ruolo protettivo per i neuroni; se si riduce la percentuale di cellule gliali mediante ARA C<sup>82</sup> si ottengono colture di gangli più sensibili al glutammato di quanto non lo sia il tessuto isolato<sup>82</sup>; se invece si coltivano i gangli in assenza di ARA C, l'abbondante crescita gliale rende i neuroni coltivati più protetti che nel tessuto originario.

Questo ruolo della glia aiuta a comprendere anche gli scarsi effetti tossici osservati nei cluster gangliari di grandi dimensioni (>30 neuroni), dove una massiccia presenza gliale strettamente vicina ai neuroni li rende meno esposti all'insulto da glutammato (Fig. 16C,E,F)

La glia potrebbe esercitare un ruolo protettivo anche nei confronti di altri agenti neurotossici, nonché influenzare la sopravvivenza/mortalità dei neuroni durante il processo di coltivazione. Un ruolo simile è noto anche nel SNC, ma potrebbe risultare più incisivo per i neuroni enterici che, al presente, non possono essere coltivati in assenza di glia. In vista di futuri studi finalizzati alla comprensione delle interazioni neurone-glia, sono state messe a punto colture di glia pure al 90% (Fig14).

Dagli studi di sopravvivenza a quelli di tossicità è emersa una popolazione di gangli non omogenea in quanto a sviluppo in vitro e risposte a neurotossici. Gli approcci metodologici impiegati hanno permesso di evidenziare questa eterogeneità tra gangli di ampie dimensioni e gangli più piccoli, dimostrando quanto queste differenze possano incidere nell'osservazione e nella quantificazione dei fenomeni sperimentali. Le future ricerche dovrebbero essere dirette a migliorare l'uniformità e la riproducibilità delle colture di gangli, anche selezionando cluster cellulari di dimensioni simili, per rendere il trattamento statistico dei risultati più incisivo.

## 6. CONCLUSIONI

Le ricerche sperimentali condotte hanno portato allo sviluppo e alla messa a punto di tre tipologie di coltivazioni in vitro di cellule del sistema nervoso enterico:

- Un modello di coltura di **gangli mienterici da ileo di cavia**, *sviluppato nei laboratori del Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna*
  - Un modello di coltura mista di **neuroni dissociati da plesso mienterico di ratto** *sviluppato nei laboratori del Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna*
  - Un modello di coltura di **glia enterica** ad elevata purezza, *appreso nei laboratori del Prof. Schemann, presso la Technischen Universität München.*
- 
- I modelli sono stati caratterizzati in quanto a composizione cellulare e sviluppo in vitro: una rilevante proliferazione gliale rende le colture di gangli o neuroni più adatte negli studi a breve termine; tuttavia è possibile utilizzarle in tempi più lunghi limitando la crescita della componente proliferante con inibitori della mitosi.
  - Lo studio della sopravvivenza neuronale in coltura condotto con diversi approcci analitici, ha evidenziato una mortalità neuronale che si attesta intorno al 20%, e che incide sull'intera popolazione, determinando una riduzione del contenuto neuronale dei gangli coltivati.
  - Stimoli neurotossici come il glutammato dimostrano di diminuire la sopravvivenza neuronale in modo concentrazione dipendente, sia nel tessuto integro sia in coltura. Le differenze rilevate tra queste due condizioni potrebbero dipendere dall'effetto protettivo della glia.
  - La coltivazione di gangli mienterici dimostra di essere eterogenea nella risposta al glutammato, esibendo differenze tra gangli di piccole e grandi dimensioni, in modo probabilmente dipendente dalla glia.
  - I risultati dimostrano che questi modelli di colture, associati ad un opportuno metodo di analisi, possono essere impiegati per studi di tossicità. Le osservazioni sperimentali condotte suggeriscono di apportare miglioramenti relativi all'omogeneità delle dimensioni gangliari per ottenere analisi più significative.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Furness J.B. *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing, 2006
- [2] Brookes S. and Costa M. Functional neuroanatomy. Chapter 1. In: *Pathophysiology of the Enteric Nervous System: a basis for understanding functional diseases*. Blackwell, Oxford, 2004
- [3] Hansen MB *The Enteric Nervous System I: Organization and classification*. Pharmacology and Toxicology 2003, 92:105-113
- [4] Costa M, Brookes SJ, Henning GW. *Anatomy and physiology of the enteric nervous system*. Gut 2000;47, S4:15-19
- [5] Genton L, Kudsk KA. *Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition*. Am J Surg. 2003 Sep;186(3):253-8.
- [6] Ruhl A. *Glial cell in the gut*. Neurogastroenterol. Motil. 2005; 17:777-790
- [7] Young HM, Bergner AJ, Müller T. *Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine*. J Comp Neurol. 2003; 456(1):1-11.
- [8] von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. *Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia*. Gut. 2004;53(2):222-8.
- [9] Hinkle DA, Harney JP, Cai A, Hilt DC, Yarowsky PJ, Wise PM. *Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 beta regulate S100 beta expression in cultured astrocytes*. Neuroscience. 1998;82(1):33-41.
- [10] Walz W. *Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter*. Glia. 2000;31(2):95-103
- [11] Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC. *S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage*. Glia. 2007;55(2):165-77.
- [12] Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice*. Cell. 1998;93(2):189-201.
- [13] Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. *Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease?* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(23):13306-11.
- [14] Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M. *Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption*. Gut. 2006;55(5):630-7.
- [15] Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. *Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione*. Gastroenterology. 2007;132(4):1344-58.
- [16] Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M. *Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain*. Lab Invest. 2007;87(8):731-6.

- [17] Tjwa ET, Bradley JM, Keenan CM, Kroese AB, Sharkey KA. *Interleukin-1beta activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003;285(6):G1268-76
- [18] von Boyen GB, Steinkamp M, Adler G, Kirsch J. Glutamate receptor subunit expression in primary enteric glia cultures. J Recept Signal Transduct Res. 2006;26(4):329-36.
- [19] Nasser Y, Ho W, Sharkey KA. *Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat.* J Comp Neurol. 2006;495(5):529-53.
- [20] Phillips RJ, Powley TL. *Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging.* Auton Neurosci. 2007;136(1-2):1-19
- [21] Wade PR, Hornby PJ., *Age-related neurodegenerative changes and how they affect the gut.* Sci Aging Knowledge Environ. 2005(12):pe8 (2005)
- [22] Gomes OA, de Souza RR, Liberti EA. *A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon.* Gerontology. 1997;43(4):210-7.
- [23] de Souza RR, Moratelli HB, Borges N, Liberti EA. *Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man.* Gerontology. 1993;39(4):183-8.
- [24] Hanani M, Fellig Y, Udassin R, Freund HR. *Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon.* Auton Neurosci. 2004;113(1-2):71-8.
- [25] Cowen T, Johnson RJ, Soubeyre V, Santer RM. *Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death.* Gut. 2000;47(5):653-60.
- [26] Rees DA, Alcolado JC. *Animal models of diabetes mellitus.* Diabet Med. 2005;22(4):359-70.
- [27] He CL, Soffer EE, Ferris CD, Walsh RM, Szurszewski JH, Farrugia G. *Loss of interstitial cells of Cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes.* Gastroenterology. 2001;121(2):427-34
- [28] Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, Kanaoka S, Furuta T, Ikuma M, Hishida A. *A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus.* J Gastroenterol. 2006;41(11):1076-87.
- [29] Chandrasekharan B, Srinivasan S. *Diabetes and the enteric nervous system.* Neurogastroenterol Motil. 2007; 19(12):951-60
- [30] Watkins CC, Sawa A, Jaffrey S, Blackshaw S, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. *Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy.* J Clin Invest 2000; 106: 373-84
- [31] 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
- [32] Celtek S, Foxwell NA, Moncada S. *Two phases of nitroergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats.* Diabetes 2003;52(9):2353-62
- [33] Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. *Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction.* Diabetes. 2000;49(11):1932-8.

- [34] Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadian A, Mwangi S, Sitaraman SV, Srinivasan S. *GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway*. J Clin Invest. 2006;116(2):344-56.
- [35] Towns R, Kabeya Y, Yoshimori T, Guo C, Shangguan Y, Hong S, Kaplan M, Klionsky DJ, Wiley JW. *Sera from patients with type 2 diabetes and neuropathy induce autophagy and colocalization with mitochondria in SY5Y cells*. Autophagy. 2005;1(3):163-70.
- [36] Korenaga K, Micci MA, Tagliabue G, Pasricha PJ. *Suppression of nNOS expression in rat enteric neurones by the receptor for advanced glycation end-products*. Neurogastroenterol Motil. 2006;18(5):392-400.
- [37] Geboes K, Collins S. *Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Neurogastroenterol Motil. 1998;10(3):189-202.
- [38] De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA, Mawe GM. *Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system*. Gastroenterology. 2004 Jun;126(7):1872-83
- [39] Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS, Monahan-Earley RA, Cullen J, et al. *Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches. Possible implications for pathogenesis of Crohn's disease*. Ann Surg. 1993;217(3):260-71.
- [40] Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. *Animal models of inflammatory bowel disease*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2004;50(2):81-92
- [41] Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. *Damage to the enteric nervous system in experimental colitis*. Am J Pathol. 1999;155(4):1051-7
- [42] Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson K. *Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis*. Auton. Neurosci. 2005 Jan 15;117(1):41-53.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] Lomax AE, Fernández E, Sharkey KA. *Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation*. Neurogastroenterol Motil. 2005;17(1):4-15
- [46] Palmer JM, Wong-Riley M, Sharkey KA. *Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs*. Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 1):G922-35.
- [47] 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.
- [48] Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA. *Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig*. J Physiol. 2005 May 1;564(Pt 3):863-75



- [49] Reichardt LF. *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006;361(1473):1545-64
- [50] Blennerhassett MG, Seaton B, Hsueh B, Lamb DP. *Neurotrophin production in inflamed rat intestine*. Gastroenterology. 1996; 110: A1060
- [51] von Boyen GB, Reinshagen M, Steinkamp M, Adler G, Kirsch J. *Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors*. Scand J Gastroenterol. 2002;37(6):621-5.
- [52] Johansson M, Norrgård O, Forsgren S. *Study of expression patterns and levels of neurotrophins and neurotrophin receptors in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 2007;13(4):398-409.
- [53] Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, Lieb K, Geerling I, Von Herbay A, Flämig G, Eysselein VE, Adler G. *Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut*. Gastroenterology. 2000;119(2):368-76.
- [54] Xia Y, Hu HZ, Liu S, Ren J, Zafirov DH, Wood JD. *IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system*. J Clin Invest. 1999;103(9):1309-16.
- [55] Kelles A, Janssens J, Tack J. *Electrical behaviour of interleukin-1 beta (IL-1 beta) and prostaglandin-E2 (PGE2) on colonic myenteric neurones*. Neurogastroenterol Motil. 2002;14(4):321-30.
- [56] von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. *Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis. 2006;12(5):346-54
- [57] von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. *Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines*. J Neuroendocrinol. 2006;18(11):820-5.
- [58] Arciszewski M, Pierzynowski S, Ekblad E. *Lipopolysaccharide induces cell death in cultured porcine myenteric neurons*. Dig Dis Sci. 2005;50(9):1661-8.
- [59] Giaroni C, De Ponti F, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. *Plasticity in the enteric nervous system*. Gastroenterology. 1999 Dec;117(6):1438-58.
- [60] Jessen KR, Saffrey MJ, Burnstock G. *The enteric nervous system in tissue culture. I. Cell types and their interactions in explants of the myenteric and submucous plexuses from guinea pig, rabbit and rat*. Brain Res. 1983;262(1):17-35.
- [61] Bałuk P, Jessen KR, Saffrey MJ, Burnstock G. *The enteric nervous system in tissue culture. II. Ultrastructural studies of cell types and their relationships*. Brain Res. 1983 Feb 28;262(1):37-47.
- [62] Jessen KR, Saffrey MJ, Bałuk P, Hanani M, Burnstock G. *The enteric nervous system in tissue culture. III. Studies on neuronal survival and the retention of biochemical and morphological differentiation*. Brain Res. 1983;262(1):49-62.
- [63] Nishi R, Willard AL. *Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. I. Morphological properties and immunocytochemical localization of transmitter candidates*. Neuroscience. 1985;16(1):187-99.

- [64] Willard AL, Nishi R. *Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. II. Electrophysiological properties and responses to neurotransmitter candidates.* Neuroscience. 1985;16(1):201-11.
- [65] Willard AL, Nishi R. *Neurons dissociated from rat myenteric plexus retain differentiated properties when grown in cell culture. III. Synaptic interactions and modulatory effects of neurotransmitter candidates.* Neuroscience. 1985;16(1):213-21.
- [66] Hanani M, Xia Y, Wood JD. *Myenteric ganglia from the adult guinea-pig small intestine in tissue culture.* Neurogastroenterol. Motil. 1994;6:103-118.
- [67] Sandgren K, Lin Z, Svenningsen AF, Ekblad E. *Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture.* J Neurosci Res. 2003;72(5):595-602.
- [68] Lin Z, Sandgren K, Ekblad E. *Increased expression of vasoactive intestinal polypeptide in cultured myenteric neurons from adult rat small intestine.* Auton Neurosci. 2003;107(1):9-19.
- [69] Kristensson E, Themner-Persson A, Ekblad E. *Survival and neurotransmitter plasticity in cultured rat colonic myenteric neurons.* Regul Pept. 2007;140(3):109-16
- [70] De Giorgio R, Bovara M, Barbara G, Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Cappello S, Pagnotta E, Nobile-Orazio E, Corinaldesi R. *Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility.* Gastroenterology. 2003 Jul;125(1):70-9.
- [71] Vanden Berghe P, Tack J, Coulie B, Andrioli A, Bellon E, Janssens J. *Synaptic transmission induces transient Ca<sup>2+</sup> concentration changes in cultured myenteric neurones.* Neurogastroenterol Motil. 2000;12(2):117-24.
- [72] Kimball BC, Mulholland MW. *Neuroligands evoke calcium signaling in cultured myenteric neurons.* Surgery. 1995;118(2):162-9; discussion 170.
- [73] Sarnelli G, Vanden Berghe P, Raeymaekers P, Janssens J, Tack J. *Inhibitory effects of galanin on evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses in cultured myenteric neurons.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;286(6):G1009-14.
- [74] Boesmans W, Gomes P, Janssens J, Tack J, Vanden Berghe P. *Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system.* Gut. 2008;57(3):314-22
- [75] Smith TK, Kang SH, Vanden Berghe P. *Calcium channels in enteric neurons.* Curr Opin Pharmacol. 2003;3(6):588-93.
- [76] Vanden Berghe P, Tack J, Andrioli A, Missiaen L, Janssens J. *Receptor-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in cultured myenteric neurons.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;278(6):G905-14.
- [77] Kurjak M, Sennefelder A, Aigner M, Schusdziarra V, Allescher HD. *Characterizing voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels coupled to VIP release and NO synthesis in enteric synaptosomes.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;283(5):G1027-34.
- [78] Mattson MP. *Calcium and neurodegeneration.* Aging Cell. 2007;6(3):337-50.
- [79] Hall KE, Wiley JW. *Neural injury, repair and adaptation in the GI tract. I. New insights into neuronal injury: a cautionary tale.* Am J Physiol. 1998;274(6 Pt 1):G978-83.

- [80] Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. *Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function.* Neuron. 1995;15(4):961-73.
- [81] Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, Kirchgessner AL. *Glutamatergic enteric neurons.* J Neurosci. 1997;17(12):4764-84.
- [82] Kirchgessner AL, Liu MT, Alcantara F. *Excitotoxicity in the enteric nervous system.* J Neurosci. 1997;17(22):8804-16.
- [83] Arundine M, Tymianski M. *Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity.* Cell Calcium. 2003;34(4-5):325-37