

**Dottorato di Ricerca in
“Fisiopatologia Medica e Farmacologia”**

**Divisione di Farmacologia e Chemioterapia
Dipartimento di Medicina Interna
Università di Pisa**



**Coordinatore
Chiar.mo Prof. Mario Del Tacca**

***Modulazione farmacologica del
sistema dell'adenosina nella
fisiopatologia dell'infiammazione
intestinale***

**Tutore:
Chiar.mo Prof.
Corrado Blandizzi**

**Dottorando:
Dr. Luca Antonioli**

INDICE

ABBREVIAZIONI	Pag. I
RIASSUNTO	Pag.IV
PARTE GENERALE	Pag. 1
ADENOSINA: SINTESI E METABOLISMO	Pag. 2
Trasporto dell'adenosina	Pag. 3
Metabolismo dell'adenosina	Pag. 7
I recettori dell'adenosina	Pag. 8
Funzioni biologiche dell'adenosina	Pag. 17
SISTEMA NERVOSO ENTERICO	Pag. 27
INTERAZIONE TRA SISTEMA NERVOSO ENTERICO E SISTEMA IMMUNITARIO	Pag. 30
Patologie infiammatorie dell'intestino	Pag. 35
Effetti dell'infiammazione intestinale sulle funzioni neuromotorie	Pag. 41
EFFETTI DELL'ADENOSINA SULLE FUNZIONI GASTROINTESTINALI	Pag. 46

PARTE SPERIMENTALE	Pag. 52
INTRODUZIONE	Pag. 53
MATERIALI E METODI	
- Animali e tessuti umani	Pag. 58
PROCEDURE SPERIMENTALI NEL RATTO	
<i>A.1) Studi funzionali</i>	Pag. 58
- Induzione di colite sperimentale	Pag. 58
- Valutazione dell'induzione di colite sperimentale	Pag. 59
- Misurazione dell'attività contrattile nei preparati di muscolatura liscia	Pag. 61
- Analisi RT-PCR dell'espressione dei recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B}	Pag. 64
<i>A.2) Studio sull'attività anti-infiammatoria di APP</i>	Pag. 66
- Caratteristiche strutturali di APP	Pag. 66
- Saggio enzimatico <i>in vitro</i>	Pag. 66
- Induzione e valutazione della colite sperimentale	Pag. 67
- Disegno sperimentale	Pag. 67
- Valutazione dei livelli tissutali di mieloperossidasi	Pag. 68
- Valutazione dei livelli tissutali di malondialdeide	Pag. 69
- Valutazione delle concentrazioni tissutali e plasmatiche di citochine	Pag. 70

- Analisi RT-PCR dell'espressione COX-1, COX-2 e iNOS	Pag. 70
PROCEDURE SPERIMENTALI SU TESSUTI UMANI	
- Prelievo e preparazione dei tessuti	Pag. 72
- Misurazione dell'attività contrattile dei preparati di muscolatura liscia	Pag. 72
FARMACI	Pag. 75
ANALISI STATISTICA	Pag. 75
RISULTATI	Pag. 77
STUDI <i>IN VITRO</i> SULLA MOTILITA' COLICA NEL RATTO	Pag. 77
- Valutazione macroscopica e microscopica della colite nel ratto	Pag. 77
- Analisi RT-PCR	Pag. 78
- Effetti degli antagonisti dei recettori A ₁ , A _{2A} e A _{2B} sull'attività contrattile	Pag. 78
- Effetti degli agonisti dei recettori A ₁ , A _{2A} e A _{2B} sull'attività contrattile	Pag. 81
STUDI <i>IN VITRO</i> SULLA MOTILITA' COLICA NELL'UOMO	Pag. 93
STUDI SULL'ATTIVITA' ANTI-INFIAMMATORIA DELL'INIBITORE ADENOSINA APP	Pag. 98
- Saggio in vitro di inibizione dell'adenosina deaminasi	Pag. 98
- Consumo di cibo, peso corporeo e peso della milza	Pag. 98

- Valutazione del danno macroscopico e microscopico	Pag. 99
- Valutazione dei livelli tissutali di MPO, MDA e TNF- α nel colon	Pag. 100
- Valutazione dei livelli plasmatici di TNF- α e IL-6	Pag. 101
- Espressione di iNOS, COX-1 e COX-2 nel colon	Pag. 101
DISCUSSIONE	Pag. 110
CONCLUSIONI	Pag. 126
BIBLIOGRAFIA	Pag. 128
RINGRAZIAMENTI	Pag. 151

Abbreviazioni

ADP= adenosina difosfato

AICAR= 5-aminoimidazolo-4-carbossiamide ribonucleotide

AMP= adenosina monofosfato

AMPc= adenosina monofosfato ciclico

APP= aminopirazolo pirimidina (nuovo inibitore dell'adenosina deaminasi)

ATP= adenosina trifosfato

BPCO= broncopneumopatia cronica ostruttiva

CCPA= 2-cloro-N⁶-ciclopentiladenosina (agonista del recettore A₁)

CGS 21680= 4-[2-[[6-amino-9-(N-etil-β-D-ribofuranuronamidossil)-9-H-purin-2-il]amino]etil] acido benzenepropanoico (agonista del recettore A_{2A})

CNT= trasportatori nucleosidici concentrativi

DAG= diacil glicerolo

DNBS= acido 2,4-dinitrobenzensolfonico

DPCPX= 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (antagonista del recettore A₁)

EHNA= eritro-9-(2-idrossi-3nonil) adenina (inibitore dell'adenosina deaminasi)

ENT= trasportatori nucleosidici equilibrativi

EPSP= potenziale eccitatorio rapido post-sinaptico

ERK 1/2= extracellular signal-regulated kinase 1/2

E.S.M.= errore standard della media

FAD= flavin adenin dinucleotide

GMPc= guanosin monofosfato ciclico

GTP= guanosin trifosfato

IBD= inflammatory bowel diseases

IFN-γ= interferone-γ

IL-1 β = interleuchina-1 β
IL-2= interleuchina-2
IL-4= interleuchina-4
IL-5= interleuchina-5
IL-6= interleuchina-6
IL-10= interleuchina-10
IL-12= interleuchina-12
IL-13= interleuchina-13
IP₃= inositolo trifosfato
L-NAME= N^o-nitro-L-arginina metilestere
MDA= malondialdeide
MIP-1 α = macrophage inflammatory protein-1 α
MPO= mieloperossidasi
MRS 1706= N-(4-acetilfenil)-2-[4-(2,3,6,7-tetraidro-2,6-diosso-1,3-dipropil-1H-purin-8-il)fenossi]-acetamide (antagonista del recettore A_{2B})
NAD= nicotinamide adenina dinucleotide
NBTI= nitrobenziltioinosina
NECA= 5'-N-etilcarbossamidoadenosina/1-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-deossi-N-etil- β -D-ribofuranuronamide (agonista purinergico)
NF-kB= fattore nucleare kB
nNOS= ossido nitrico sintetasi neuronale
NPA= N^o-propil-L-arginina
PAF= platelet activating factor
PKA= protein chinasi A
SAH= S-adenosilomocisteina
SET= stimolazione elettrica transmurale
SETr= stimolazione elettrica transmurale ripetuta

SETs= stimolazione elettrica transmurale singola

TNBS= acido trinitrobenzensolfonico

TNF- α = tumour necrosis factor- α

TNF- β = tumour necrosis factor- β

ZM 241385= 4-(2-[7-amino-2-(2-furil) [1, 2, 4]triazolo [2, 3-a][1, 3, 5]triazin-5-ilamino] etil) fenolo (antagonista del recettore A_{2A})

RIASSUNTO

Le normali funzioni gastrointestinali, quali l'attività contrattile e secretiva, risultano alterate in pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali. Diverse evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato che queste disfunzioni sono imputabili a complesse modificazioni morfo-funzionali del sistema nervoso enterico, le quali dipendono in larga misura dal sistema immunitario/infiammatorio e che possono contribuire alla comparsa di una sintomatologia caratterizzata soprattutto da dolore addominale e alterazioni dell'alvo. Tra i vari mediatori coinvolti in questa complessa interazione tra sistema immuno-infiammatorio enterico e sistema nervoso, l'adenosina sembra svolgere un ruolo significativo.

L'adenosina è fisiologicamente coinvolta nella regolazione di numerosi processi a livello del tratto digerente, ma diverse evidenze sperimentali ne hanno ipotizzato anche un coinvolgimento nella fisiopatologia delle malattie infiammatorie intestinali. Sulla base di queste evidenze, le nostre ricerche sono state indirizzate alla caratterizzazione dell'espressione e del ruolo funzionale dei recettori dell'adenosina nel comparto neuromuscolare del colon umano e del ratto, e alla valutazione degli effetti dell'infiammazione intestinale sull'espressione e sulla funzione di questi recettori in un modello di colite sperimentale. Gli esperimenti sono stati condotti su ratti Sprague-Dawley nei quali la colite è stata indotta attraverso la somministrazione intrarettale di acido 2,4 dinitrobenzensolfonico (DNBS), e su campioni di tessuto colico umano, ottenuti da pazienti sottoposti a resezione chirurgica. Sono stati saggiati gli effetti degli antagonisti e agonisti dei recettori purinergici sull'attività contrattile di questi preparati indotta attraverso stimolazione elettrica transmurale o mediante stimolazione colinergica con carbacolo in presenza di tetrodotossina. Una parte del programma di ricerca è stata inoltre dedicata alla caratterizzazione dei possibili effetti antinfiammatori derivanti dal blocco dell'attività dell'adenosina deaminasi per mezzo di APP, un nuovo inibitore di questo enzima, in un modello di colite nel ratto. In questo caso sono stati valutati gli effetti di APP in confronto con EHNA (inibitore standard di adenosina deaminasi) sia su parametri flogistici sistemici (consumo di cibo, variazione di peso, peso della milza, livelli plasmatici di TNF- α e IL-6) che su parametri tissutali

(valutazione del danno macro e microscopico, livelli tissutali di TNF- α , MPO, MDA, variazioni dell'espressione di iNOS, COX-1 e COX-2).

Ruolo di adenosina nella regolazione della motilità colica

Nel ratto l'analisi RT-PCR ha permesso di rilevare l'espressione di tutti e tre i sottotipi recettoriali dell'adenosina sia in tessuti prelevati da ratti normali che da animali con colite, ed ha evidenziato un incremento dell'espressione del recettore A_{2A} nei tessuti infiammati.

L'incubazione dei preparati di muscolatura longitudinale colica di ratto con DPCPX (antagonista del recettore A₁), ZM 241385 (antagonista del recettore A_{2A}) o MRS 1706 (antagonista del recettore A_{2B}) ha prodotto un incremento significativo delle risposte motorie alla stimolazione elettrica, mentre solo il trattamento con l'A_{2A} antagonista ha fatto apprezzare un incremento significativo della risposta contrattile in tessuti infiammati. Questo effetto potenziante non ha subito modificazioni in seguito all'ablazione farmacologica del sistema noradrenergico e tachinergico, per cui è possibile ipotizzare un coinvolgimento dei recettori A₁, A_{2A} e A_{2B} nella modulazione dell'attività contrattile colinergica. L'effetto potenziante osservato con A₁ e A_{2B} antagonisti è risultato maggiormente apprezzabile in seguito ad isolamento della componente motoria colinergica, in presenza di un blocco del sistema nitroergico inibitore. In presenza di queste condizioni, il trattamento con DPCPX o MRS 1706 ha causato un potenziamento significativo delle risposte motorie colinergiche sia in tessuti sani che in quelli infiammati, mentre il trattamento con ZM 241385 non ha permesso di evidenziare modificazioni significative della risposta motoria. Gli effetti degli antagonisti sono stati saggiati inoltre sulla stimolazione muscarinica diretta della muscolatura longitudinale, attraverso l'impiego di carbacolo in presenza di tetrodotossina. I risultati ottenuti hanno indicato che le contrazioni indotte da carbacolo subiscono un potenziamento in seguito a trattamento con l'antagonista per il recettore A_{2B}, ma non con DPCPX o ZM 241385. In seguito sono stati esaminati i possibili meccanismi responsabili delle variazioni di risposta agli antagonisti A₁, A_{2A} e A_{2B}, evidenziate in tessuti normali rispetto a quelli infiammati. A tale scopo è stata condotta una serie di esperimenti nei quali i tessuti in esame sono stati trattati con dipiridamolo e

adenosina deaminasi al fine di abbattere i livelli di adenosina endogena e in queste condizioni sono stati saggiati gli effetti degli agonisti per i recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} .

In presenza di queste condizioni sperimentali è stata evidenziata la capacità di CCPA (agonista del recettore A_1) e NECA (agonista purinergico) di indurre una riduzione concentrazione-dipendente della risposta contrattile colinergica evocata da stimolazione elettrica, con un profilo di risposta simile sia in tessuti di controllo che in tessuti infiammati. Per contro, il trattamento con dosi crescenti di CGS 21680 (agonista per il recettore A_{2A}) non ha fatto registrare modificazioni significative del profilo contrattile, escludendo un possibile coinvolgimento di questo recettore nella modulazione diretta della risposta colinergica. Successivamente sono stati condotti alcuni esperimenti mantenendo attivi i sistemi nitrgergico e colinergico. In questo caso il trattamento con l'agonista per i recettori A_{2A} ha indotto una riduzione della risposta contrattile nei preparati normali, e soprattutto nei tessuti infiammati. Queste osservazioni, insieme al fatto che la colite si associa ad un aumento dell'espressione dei recettori A_{2A} , suggeriscono che: a) in presenza di infiammazione intestinale il potenziamento del controllo inibitore esercitato dal recettore A_{2A} può essere attribuito a variazioni della sua espressione; b) il recettore A_1 e A_{2B} cooperano nella modulazione diretta del controllo colinergico dell'attività motoria del colon in condizioni normali; c) in presenza di infiammazione è soprattutto il recettore A_{2A} a partecipare al controllo inibitore dell'attività motoria colica attraverso la stimolazione della via nitrgergica.

I profili di risposta motoria osservati nei preparati colici umani risultano simili a quelli registrati nei tessuti di ratto. Infatti questi tessuti rispondono alla stimolazione elettrica con contrazioni fasiche atropino-sensibili, le quali vengono potenziate dal trattamento con ZM 241385, mentre risultano significativamente ridotte in preparati incubati con l'agonista del recettore A_{2A} .

L'incubazione dei preparati di colon umano con ZM 241385 o con CGS 21680 non ha prodotto modificazioni significative delle risposte motorie atropino-sensibili alla stimolazione indotta da carbacolo in presenza di tetrodotossina. Analogamente a quanto osservato nei tessuti di ratto, in preparati nei quali è stata isolata la componente colinergica, il trattamento con ZM 241385 non ha potenziato significativamente la risposta alla stimolazione elettrica. Successivamente è stata svolta una serie di esperimenti in preparati nei quali è stata isolata farmacologicamente la componente

nitrergica. In questi tessuti la stimolazione elettrica induceva una risposta rilassante, sensibile al trattamento con l'antagonista per il recettore A_{2A} .

I risultati ottenuti nell'uomo sostengono il concetto che: a) l'adenosina partecipa alla regolazione dei circuiti neuromuscolari enterici deputati alla regolazione inibitrice delle risposte contrattili attraverso l'attivazione dei recettori A_{2A} ; b) l'attività del recettore A_{2A} si esplica prevalentemente a livello neuronale attraverso la modulazione del sistema nitrergico.

Modulazione farmacologica di adenosina deaminasi e infiammazione intestinale

Recenti evidenze hanno ipotizzato una modulazione del sistema dell'adenosina tra i possibili obiettivi per lo sviluppo di farmaci innovativi ad attività anti-infiammatoria. Una parte del presente progetto di ricerca è stata dedicata quindi alla valutazione del possibile effetto anti-infiammatorio di APP, un nuovo inibitore dell'adenosina deaminasi, in un modello di colite sperimentale. I risultati ottenuti dimostrano, che il blocco farmacologico di questo enzima, coinvolto nel metabolismo dell'adenosina endogena, è in grado di migliorare significativamente la colite, e che il trattamento con APP risulta più efficace rispetto a EHNA (inibitore dell'adenosina deaminasi utilizzato come farmaco di riferimento) nel controllare diversi parametri flogistici sistemici e tissutali caratteristici della colite sperimentale.

Nel nostro studio, il trattamento con APP o EHNA ha indotto un incremento significativo del consumo di cibo, del peso corporeo e una riduzione del peso della milza, e dei livelli plasmatici di $TNF-\alpha$ e IL-6, utilizzati come parametri sistemici di infiammazione. Inoltre l'inibizione dell'adenosina deaminasi si associa ad un miglioramento significativo del punteggio di danno macroscopico e istologico, a conferma che il blocco della degradazione enzimatica dell'adenosina favorisce un miglioramento del decorso del processo flogistico.

Nei nostri esperimenti abbiamo osservato un incremento dei livelli tissutali di $TNF-\alpha$ e MPO in animali con colite ed una riduzione significativa di questi parametri in ratti trattati con APP o EHNA. E' stata osservata inoltre una riduzione delle citochine plasmatiche ($TNF-\alpha$, IL-6) in seguito al trattamento con entrambi gli inibitori dell'adenosina deaminasi. In tessuti prelevati da ratti con colite è stato evidenziato un aumento significativo della perossidazione lipidica, che si è ridotto in seguito a

somministrazione di APP o EHNA. Inoltre è stata valutata l'espressione di iNOS, COX-1 e COX-2. I risultati indicano un incremento dell'espressione di iNOS nel colon di ratti con colite. Questo incremento non ha subito modificazioni in seguito a trattamento con APP o EHNA, suggerendo che gli effetti antinfiammatori osservati con questi due farmaci non sono attribuibili ad una diretta modulazione dell'espressione di iNOS. Nelle presenti condizioni sperimentali, l'induzione della colite sperimentale non ha determinato a variazioni significative dell'espressione di COX-1 e COX-2 e questo profilo non ha subito modificazioni in seguito a trattamento con APP, EHNA o desametasone.

Nell'insieme questi risultati suggeriscono che l'APP è in grado di contrastare l'infiammazione intestinale con una potenza maggiore rispetto a EHNA, e che le differenze nell'attività anti-infiammatoria di questi farmaci riflettono le loro rispettive potenze nell'inibire *in vitro* l'attività dell'adenosina deaminasi. L'APP può quindi rappresentare un farmaco di riferimento per lo sviluppo di nuovi inibitori dell'adenosina deaminasi caratterizzati da buoni profili di potenza e selettività.

In conclusione, i risultati del presente studio indicano che i recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} sono espressi nel comparto neuromuscolare del colon di ratto in condizioni fisiologiche, e suggeriscono che questi recettori contribuiscono alla regolazione dell'attività eccitatrice colinergica nei circuiti neuromuscolari enterici agendo rispettivamente a livello pre- e post-giunzionale. Inoltre, in presenza di colite, il recettore A_{2A} sembra assumere un ruolo predominante nella regolazione dell'attività motoria colinergica del colon distale, attraverso la modulazione del sistema nitrgico.

Nell'insieme, queste osservazioni possono costituire una base per l'interpretazione dei meccanismi tramite i quali il sistema dell'adenosina controlla le funzioni neuromotorie enteriche, sia in condizioni fisiologiche che in presenza di patologie infiammatorie intestinali. In particolare, i risultati ottenuti nel modello di colite sperimentale forniscono evidenze originali a sostegno dell'importanza di questo autacoide nella fisiopatologia delle disfunzioni motorie associate ai processi infiammatori enterici, e inoltre evidenziano che la modulazione farmacologica dei livelli di adenosina endogena può rappresentare un possibile bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci ad attività anti-infiammatoria, utili per contrastare il processo

flogistico, e per correggere i disturbi della motilità intestinale caratteristici delle malattie infiammatorie intestinali.

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE

ADENOSINA: SINTESI E METABOLISMO

L'adenosina è un nucleoside purinico presente in vari tessuti e organi, coinvolto nella modulazione di diversi meccanismi omeostatici cellulari (sintesi degli acidi nucleici, metabolismo degli aminoacidi e regolazione del metabolismo cellulare) (Noji *et al.*, 2004). Essa rappresenta inoltre un costituente importante di diverse molecole biologicamente rilevanti, quali nicotinamide adenina dinucleotide (NAD), flavin adenin dinucleotide (FAD), coenzima A (Poulsen *et al.*, 1998). In condizioni patologiche (stress, dolore, ipossia, infiammazione) la produzione di questo autacoide subisce un incremento significativo a fronte di un' aumentata richiesta di energia a livello cellulare e quindi di una maggiore degradazione di adenosina trifosfato (ATP) (Cronstein, 1995; Latini Pedata, 2001).

Per quanto riguarda la localizzazione cellulare della biosintesi di adenosina, sono state descritte due vie principali: una, utilizzata principalmente in condizioni fisiologiche, si svolge a livello intracellulare attraverso S-adenosilomocisteina (SAH) (Figura. 1A); l'altra, utilizzata in condizioni patologiche, prevede la degradazione sequenziale a livello extracellulare di ATP ad ADP e successivamente ad AMP, per terminare con la produzione di adenosina ad opera dell'enzima ecto-5'-nucleotidasi

(Figura. 1B) (Latini e Pedata, 2001). Questa via sintetica viene utilizzata quando il fabbisogno energetico cellulare risulta aumentato ma non adeguatamente sostenuto da un incremento delle disponibilità di ossigeno. La maggior produzione di adenosina sembra favorire un riequilibrio del rapporto tra consumo e produzione di energia, attraverso una vasodilatazione, e quindi un maggior apporto di sangue ossigenato, e tramite effetti tissutali protettivi (Ralevic e Burnstock, 1998; Linden, 2001).

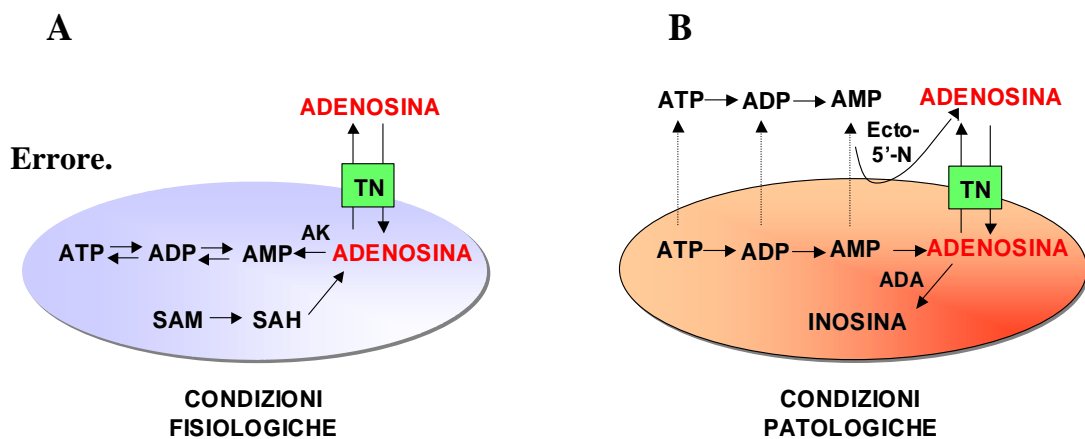


Figura 1. Sintesi e metabolismo di adenosina in condizioni fisiologiche (A) e patologiche (B). ADA: adenosina deaminasi; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; AK: adenosina chinasi; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilomocisteina; TN: trasportatore nucleosidico

Trasporto dell'adenosina

Il trasporto dell'adenosina attraverso le membrane cellulari avviene per mezzo di *carrier* nucleosidici, i quali svolgono un ruolo importante nella

regolazione dei livelli extracellulari di questo autacoide (Cass *et al.*, 1999; Cabrita *et al.*, 2002). I trasportatori nucleosidici sono classificati in base alle loro caratteristiche funzionali e alla loro struttura molecolare in due principali categorie: 1) trasportatori nucleosidici equilibrativi; 2) trasportatori nucleosidici concentrativi (Cass *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 2002).

I trasportatori nucleosidici equilibrativi (ENT) agiscono attraverso meccanismi di trasporto passivo e di diffusione facilitata. Essi facilitano il flusso di nucleosidi attraverso le membrane cellulari sfruttando il gradiente di concentrazione dell'adenosina nel compartimento intra ed extracellulare (Figura 2). I trasportatori equilibrativi sono presenti in vari tessuti (cervello, fegato, pancreas, intestino, cuore, timo, polmone, milza, rene, muscolo scheletrico) e partecipano alla regolazione di diverse funzioni fisiologiche.

Attualmente sono stati identificati 4 tipi di trasportatori equilibrativi (ENT1, ENT2, ENT3 e ENT4) (Podgorska *et al.*, 2005). I trasportatori nucleosidici equilibrativi vengono classificati sulla base della loro diversa sensibilità all'inibizione da parte dell'analogo nucleosidico nitrobenziltioinosina (NBTI) (Yao *et al.*, 1997; Hyde *et al.*, 2001). Si distinguono infatti: a) trasportatori equilibrativi-sensibili (*es*), potentemente inibiti a concentrazioni nanomolari di NBTI (ENT1 e

ENT3); b) trasportatori equilibrativi-insensibili (*ei*) bloccati solo in presenza di concentrazioni micromolari di NBTI (ENT2) (Buolamwini, 1997). Le caratteristiche del trasportatore ENT4, di recente identificazione, non sono state per il momento determinate (Podgorska *et al.*, 2005).

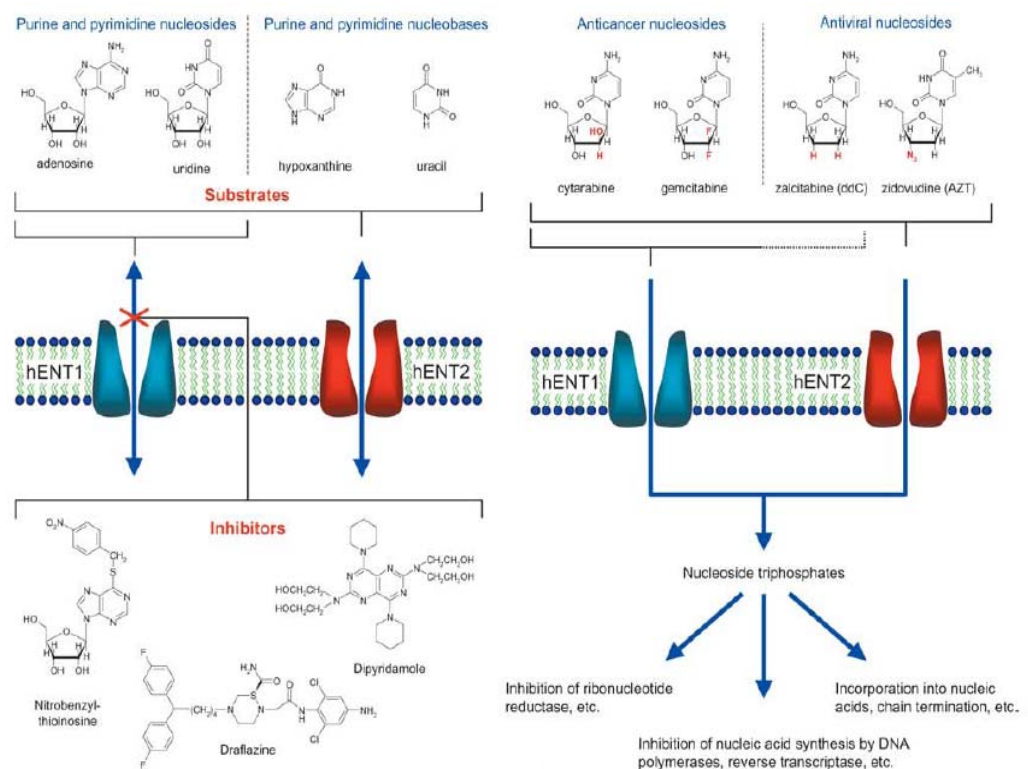


Figura 2. Schema rappresentativo dei trasportatori nucleosidici equilibrativi (Baldwin *et al.*, 2003).

I **trasportatori nucleosidici concentrativi (CNT)** promuovono il flusso di nucleosidi all'interno delle cellule contro gradiente di concentrazione attraverso meccanismi di trasporto attivo sodio-dipendenti (Figura 3).

I trasportatori nucleosidici concentrativi sono suddivisi in tre sottotipi (CNT1, CNT2, CNT3), in base alla loro selettività nei confronti di diversi substrati (Wang *et al.*, 1997; Ritzel *et al.*, 2001). I trasportatori CNT1 trasportano selettivamente le pirimidine, ma hanno la capacità di legare anche le purine. Questi trasportatori rappresentano un bersaglio per vari farmaci antivirali (zidovudina, lamivudina) e per alcuni farmaci ad attività antineoplastica (citarabina, gemcitabina).

I trasportatori CNT2 sono implicati nel trasporto di nucleosidi a struttura purinica. Farmaci antivirali quali didanosina e ribavirina sfruttano questo sistema di trasporto per penetrare all'interno della cellula e svolgere la propria attività farmacologica (Gray *et al.*, 2004).

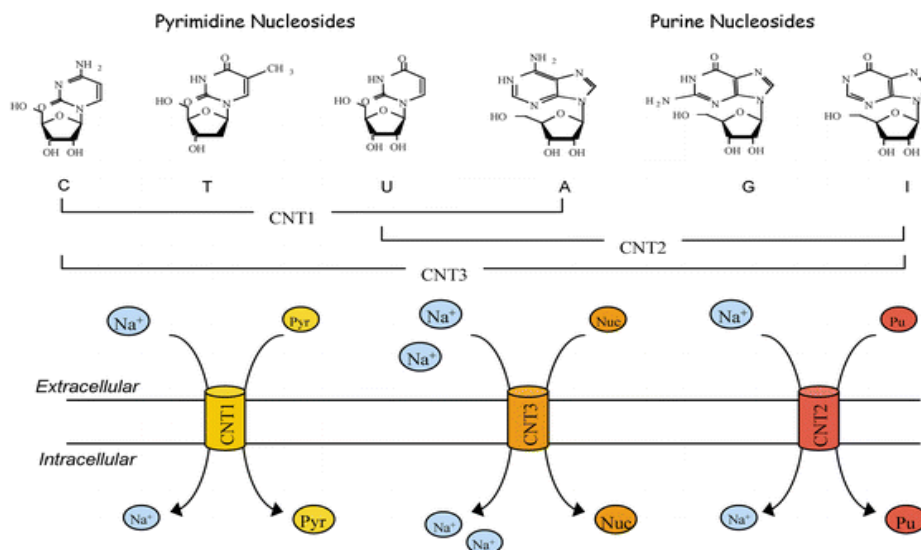


Figura 3. Schema rappresentativo dei trasportatori nucleosidici concentrativi (CNT1, CNT2, CNT3) (Gray *et al.*, 2004)

La maggior parte degli studi condotti sui trasportatori nucleosidici si è concentrata sul sottotipo *es* poiché questi sono ampiamente espressi in molti distretti dell'organismo, dove partecipano alla regolazione di numerose funzioni fisiologiche (Noji *et al.*, 2004).

Metabolismo dell'adenosina

L'inattivazione dell'adenosina liberata nell'ambiente extracellulare è dovuta principalmente al recupero del nucleoside ad opera di trasportatori nucleosidici che la veicolano all'interno delle cellule e la rendono disponibile per la fosforilazione ad AMP, attraverso l'attività dell'adenosina chinasi, o la deaminazione ad inosina ad opera dell'adenosina deaminasi (Latini e Pedata, 2001)

I recettori per l'adenosina

L'80% di tutti gli ormoni, neurotrasmettitori e neuromodulatori, che regolano le interazioni tra le cellule, esercitano i loro effetti interagendo con specifici recettori accoppiati a proteine G. Questo tipo di recettori, a cui appartengono anche i recettori per l'adenosina, sono monomeri dotati di una struttura molto simile. Ogni proteina recettoriale è costituita da una singola catena polipeptidica, che attraversa la membrana sette volte con l'estremità amminoterminale extracellulare e quella carbossiterminale intracellulare (Figura 4A e B) (Ralevich e Burnstock, 1998).

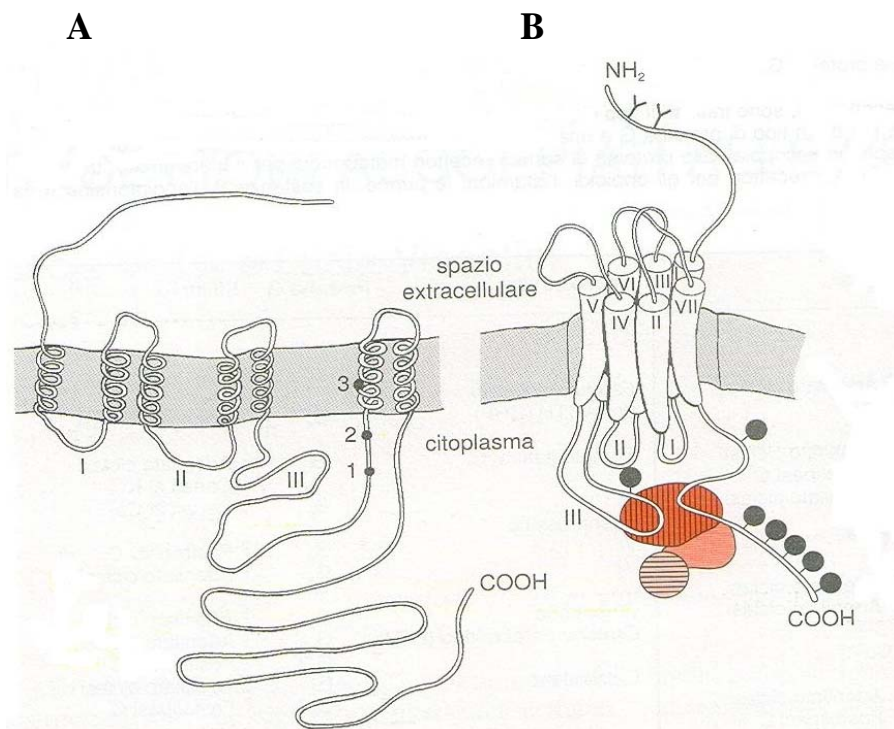


Figura 4. I recettori accoppiati a proteine G sono formati da un unico filamento proteico che attraversa sette volte la membrana plasmatica (A). In (B) è riportato un modello tridimensionale di recettore accoppiato a proteina G. Le Y presenti al terminale $-NH_2$ indicano i siti di glicosilazione, mentre i cerchi presenti a livello intracellulare indicano i siti di fosforilazione (Clementi e Fumagalli, 1999)

Le caratteristiche strutturali che variano in modo apprezzabile tra i diversi recettori accoppiati a proteine G, risiedono nella composizione e nella lunghezza del terzo *loop* citoplasmatico e dell'estremità carbossiterminale.

L'interazione tra agonista e sito di legame sul recettore induce un cambiamento conformazionale del recettore, soprattutto nelle regioni del terzo *loop* citoplasmatico e dell'estremità carbossiterminale, che si trasmette alla proteina G. Questa si lega con diversi punti di contatto proprio in corrispondenza di queste due regioni molecolari del recettore (Figura 4B). Le diversità strutturali del terzo territorio citoplasmatico e dell'estremità carbossiterminale conferiscono la specificità di legame dei diversi recettori con le diverse proteine G. Nella parte citoplasmatica della struttura recettoriale, e soprattutto nella coda carbossiterminale, sono presenti numerosi siti di fosforilazione (Figura 4B). Questi siti sono molto importanti da un punto di vista funzionale poiché coinvolti nel disaccoppiamento del recettore dalla proteina G, responsabile del fenomeno della desensibilizzazione (Luttrell, 2006).

La formazione del complesso recettore attivato-proteina G costituisce un passaggio cruciale per l'ulteriore trasmissione del segnale. Le proteine G sono eterotrimeri costituiti da tre subunità denominate α , β , e γ , in ordine di peso molecolare decrescente. Nel corso degli ultimi anni, grazie a studi di biochimica e biologia molecolare, il numero di componenti di

questa famiglia di proteine è andato continuamente aumentando e attualmente sono state classificate circa una ventina di proteine G, distinte tra loro sulla base di specifiche caratteristiche strutturali e funzionali delle subunità α . Ad oggi sono state infatti identificate 20 subunità α , ma solo cinque unità β e dieci subunità γ . Probabilmente una catena β o γ può formare un eterotrimerico con subunità α diverse. Le subunità α delle proteine G possiedono la capacità di legare i nucleotidi guanilici, in particolare GTP, e successivamente di idrolizzarlo grazie ad un'attività GTPasica intrinseca.

Tali attività biochimiche sono cruciali per la trasduzione del segnale da parte delle proteine G, che trasferiscono informazioni dai recettori alle molecole effettrici attraverso un ciclo di attivazione-inattivazione regolato dal legame e dall'idrolisi del GTP (Figura 5) (Clementi e Fumagalli, 1999).

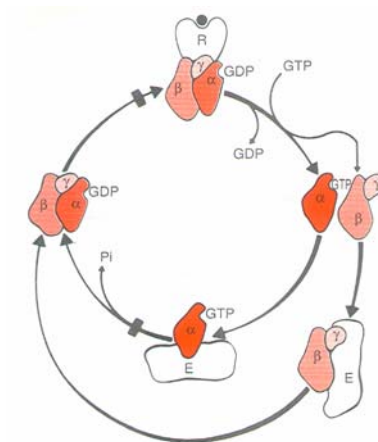


Figura 5. Schema rappresentativo del ciclo di attivazione-inattivazione delle proteine G (Clementi e Fumagalli, 1999)

Tutti i recettori per l'adenosina finora identificati sono accoppiati a proteine G. Nel 1978 Burnstock propose l'esistenza di almeno due tipi di recettori per le purine, denominati P1 e P2. Questa distinzione era basata sull'ordine di potenza di vari nucleotidi e nucleosidi: P1 identifica la famiglia di recettori maggiormente sensibili ad adenosina, mentre i recettori P2 sono preferenzialmente attivati da ATP e ADP (Burnstock, 1978).

L'antagonismo funzionale tra ATP e adenosina è molto interessante, in quanto l'ATP, presente nelle terminazioni sinaptiche e parasinaptiche, genera adenosina. L'ATP induce attività rapide e transitorie di tipo eccitatorio, mentre l'adenosina evoca effetti lenti e inibitori. L'adenosina regola quindi con un meccanismo di *feed-back* inibitore sia le attività eccitatrici dell'ATP, che quelle di neurotrasmettitori coliberati con ATP dai terminali nervosi. Questa complessa regolazione suggerisce che più elevato è il grado di attivazione iniziale, e quindi maggiore è la liberazione di ATP, maggiore sarà il controllo inibitore esercitato dall'adenosina, in quanto maggiore sarà la quantità di nucleoside che si forma a partire dall'ATP (Sawynok, 2007).

Un'ulteriore criterio di differenziazione tra recettori P1 e P2 è basato sulla diversa sensibilità agli antagonisti di tipo xantinico: infatti i recettori P1 sono inibiti competitivamente da farmaci xantinici quali caffeina,

teofillina e teobromina, che sono inattivi sui recettori P2. Questa suddivisione generale in recettori P1 e P2 ha rappresentato la base per l'attuale classificazione e nomenclatura di questi recettori. Ciascuna delle due famiglie comprende diversi sottotipi recettoriali identificabili in base al profilo farmacologico, al meccanismo di traduzione del segnale e alla struttura molecolare (Fredholm *et al.*, 2001).

L'adenosina può interagire con 4 sottotipi recettoriali localizzati a livello della membrana citoplasmatica (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) e che hanno una distribuzione variabile in diversi sistemi (sistema nervoso centrale, cardiovascolare, renale, respiratorio, immunitario e gastrointestinale) dove partecipano alla modulazione delle normali funzioni biologiche (Ralevic and Burnstock, 1998).

In precedenza, i recettori dell'adenosina sono stati classificati in base alla loro struttura molecolare, al loro profilo farmacologico e al loro meccanismo di trasduzione del segnale (Fredholm *et al.*, 2001). Ciascun sottotipo è accoppiato ad un determinato tipo di proteina G, che può essere stimolatrice (Gs) o inibitrice (Gi) (Figura 6). La stimolazione di questi recettori può determinare l'attivazione o l'inibizione dell'adenilato ciclasi. Inoltre, in alcuni tessuti, i recettori A_1 e A_3 sono capaci di modulare l'attività della fosfolipasi C e, nel caso del recettore A_1 , di canali ionici per il Ca^{2+} o K^+ (Clementi e Fumagalli, 1999).

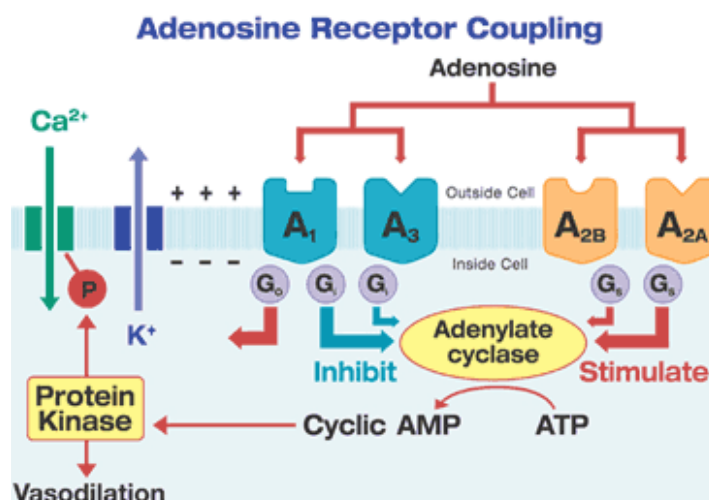


Figura 6. Rappresentazione schematica dei sottotipi recettoriali dell'adenosina e secondi messaggeri: adenosina monofosfato ciclica (AMPc), adenosina trifosfato (ATP)

La classificazione dei sottotipi recettoriali dipende anche dai profili di affinità per agonisti ed antagonisti. In base alla diversa affinità per il nucleoside purinico, è stato possibile definire i recettori A_1 , e A_{2A} come recettori ad alta affinità, mentre A_{2B} e A_3 sono recettori caratterizzati da una bassa affinità per l'adenosina (Poulsen *et al.*, 1998).

Recettori A_1 . Questo sottotipo recettoriale fu identificato per la prima volta a livello del sistema nervoso centrale, dove evidenze sperimentali hanno dimostrato la sua localizzazione su fibre dopaminergiche (Murayama *et al.*, 1990). Attraverso tecniche di biologia molecolare, è stato dimostrato che i recettori A_1 sono accoppiati a proteine G di tipo G_i o di tipo G_o . L'effetto intracellulare derivante dal legame dell'adenosina con

il recettore A_1 consiste quindi nell'attivazione della proteina G_i che inibisce l'attività dell'adenilato ciclasi, riducendo i livelli di AMPc. È stato dimostrato che la stimolazione del recettore A_1 è associata anche all'attivazione dei canali al potassio e, conseguentemente, ad iperpolarizzazione della membrana e un'inattivazione dei canali N-P e Q del calcio. A livello delle terminazioni nervose presinaptiche questo fenomeno induce un'inibizione della liberazione di neurotrasmettitore (Klinger *et al.*, 2002). Il legame dell'adenosina con il recettore A_1 determina inoltre l'attivazione della famiglia di proteinchinasi, *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2) (Fredholm *et al.*, 2001).

Recettori A_{2A} . Questo sottotipo recettoriale è stato identificato insieme al sottotipo A_{2B} nei mastociti presenti nel fluido broncoalveolare umano, e per questo è stato ipotizzato un suo ruolo importante nella patogenesi dell'asma e della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (Polosa *et al.*, 2002). La trasduzione del segnale avviene attraverso una proteina G_s (Klinger *et al.*, 2002). L'effettore coinvolto è l'adenilato ciclasi (Fredholm *et al.*, 2001). L'identificazione e la caratterizzazione di ligandi potenti e selettivi per il recettore A_{2A} ha permesso un'analisi delle diverse risposte funzionali indotte dall'attivazione o dall'inibizione del recettore e, di

conseguenza, è stata compresa la sua importanza biologica in condizioni sia fisiologiche che patologiche, quali ischemia/ipossia (Pedata *et al.*, 2005).

Recettore A_{2B}. I recettori A_{2B} sono stati clonati dall'ipotalamo di ratto (Rivkees e Reppert, 1992), dall'ippocampo umano (Pierce *et al.*, 1992) e dai mastociti di topo (Marquardt *et al.*, 1994), utilizzando la tecnica di *polymerase chain reaction* (PCR). Questo recettore presenta molte analogie a livello della regione carbossiterminale con i sottotipi A₁ e A₃, inoltre tutti e tre hanno un peso molecolare simile. La trasduzione del segnale avviene attraverso una proteina G_s che induce un aumento dei livelli di AMPc e successiva attivazione di proteinchinasi (Polosa, 2002). Il recettore A_{2B} possiede inoltre la capacità di aumentare i livelli di IP₃, suggerendo un'accoppiamento anche con una proteina di tipo G_q, e determinando quindi la liberazione degli ioni calcio dai depositi cellulari (Klinger *et al.*, 2002).

Recettori A₃. I recettori A₃ sono stati identificati nel ratto a livello di reni, tessuto cardiaco, cervello, polmone e testicoli. Nell'uomo i recettori A₃ sono presenti a livello di fegato, placenta, reni, cervello, aorta, cuore, polmoni, testicoli e tratto gastrointestinale (Fredholm *et al.*, 2001). Questo sottotipo recettoriale presenta un meccanismo di trasduzione analogo a

quello dei recettori A_1 , dove la proteina G è di tipo inibitore, ed ha quindi la capacità di bloccare l'attività dell'adenilato ciclasi riducendo i livelli di AMPc. Tuttavia, questa non sembra essere l'unica via di trasduzione, poichè è stato dimostrato anche un incremento dei livelli di IP_3 , con conseguente attivazione dei canali al calcio (Poulsen *et al.*, 1998).

FUNZIONI BIOLOGICHE DELL'ADENOSINA

All'inizio degli anni '70, Burnstock propose l'adenosina quale ipotetico neurotrasmettitore a livello delle sinapsi "non-adrenergiche non-colinergiche" (NANC) presenti in diverse regioni del sistema nervoso autonomo. Inizialmente questa teoria trovò scarso riscontro nella comunità scientifica, poiché risultava difficile ipotizzare la partecipazione di molecole ubiquitarie, quali le purine, in eventi altamente specifici come quelli coinvolti nella neurotrasmissione. Successivamente, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato una significativa partecipazione delle purine nei processi di neuromodulazione e neurotrasmissione, a livello del sistema nervoso e periferico (Sawynok *et al.*, 2003).

Nel sistema nervoso centrale, l'adenosina presente a basse concentrazioni nei fluidi extracellulari svolge un'azione un effetto deprimente su diverse popolazioni neuronali per mezzo dei recettori A₁ (Ribeiro, 2005), riducendo la liberazione di neurotrasmettitori dai terminali nervosi presinaptici (Abbraccio e Cattabeni, 1999; Stone, 2002) e potenziando la conduttanza al potassio a livello post-sinaptico (Stone 2002). Evidenze sperimentali hanno dimostrato la capacità del recettore A₁ di inibire la liberazione di vari neurotrasmettitori, quali dopamina (Cauli e Morelli, 2005), serotonina, noradrenalina, acetilcolina (Sawynok e Liu,

2003), e glutammato (Ribeiro, 2005). La stimolazione dei recettori A_{2A} è collegata ad una facilitazione della trasmissione dopaminergica e colinergica (Rosin et al., 1998) e ad una inibizione delle terminazioni GABA-ergiche (Moreau e Huber, 1999).

Alcuni autori hanno ipotizzato un possibile ruolo neuroprotettivo dell'adenosina a livello del sistema nervoso centrale evidenziandone la capacità di prevenire i danni conseguenti a fenomeni ischemici o ad attacchi epilettici, condizioni in cui la produzione di adenosina subisce un notevole incremento, attraverso la modulazione della liberazione di aminoacidi eccitatori ed inibitori (Pagonopoulou *et al.*, 2006; Yildirim *et al.*, 2007). Tuttavia, altri autori hanno messo in dubbio tale effetto neuroprotettivo, proponendo un possibile contributo dell'adenosina al danno e alla morte delle cellule neuronali (Ribeiro *et al.*, 2005). Questa duplice attività sembra imputabile al tipo di recettore attivato, alle possibili interazioni tra i recettori e all'effetto svolto dall'autacoide sulle cellule neuronali e gliali (de Mendonca, 2000).

Le conoscenze acquisite negli ultimi anni circa le funzioni svolte dall'adenosina e dai suoi analoghi a livello del sistema nervoso centrale hanno portato ad ipotizzare un possibile impiego clinico di antagonisti purinergici nel trattamento di malattie neurodegenerative (malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, corea di Huntington) (Klinger *et al.*, 2002;

Schwarzschild *et al.*, 2006). Alcune autori hanno infatti proposto l'uso di antagonisti del recettore A_1 , capaci di facilitare la liberazione di acetilcolina, nel trattamento della malattia di Alzheimer (Sebastiao e Ribeiro, 1996). Inoltre, in modelli murini di malattia di Parkinson, il trattamento con antagonisti selettivi del recettore A_{2A} in associazione con basse dosi di L-DOPA ha permesso di ottenere risultati incoraggianti, riducendo significativamente il tremore tipico dell'animale parkinsoniano (Bara-Jimenez, 2003).

A livello cardiaco l'adenosina è coinvolta nella regolazione dell'attività delle cellule pacemaker e dei miociti (Mubagwa *et al.*, 2001). Questo autacoide svolge infatti un'attività inotropica e cronotropica negativa, ascrivibile all'attivazione del recettore A_1 , che agisce attraverso un antagonismo funzionale degli effetti inotropi e cronotropi positivi delle catecolamine. Più precisamente, a livello atriale, l'adenosina induce attivazione della conduttanza del K^+ , mentre a livello ventricolare gli effetti sono attribuibili alla riduzione dell'ingresso di Ca^{2+} . Attualmente l'attività delle purine a livello cardiaco sono sfruttate terapeutamente per il controllo delle aritmie sopraventricolari.

Diverse osservazioni sperimentali hanno evidenziato la capacità dell'adenosina di attivare un meccanismo cellulare finalizzato alla protezione delle cellule cardiache nei confronti di un eventuale danno

ischemico (Ely et al., 1992). In particolare, l'adenosina riduce il carico di lavoro del cuore e la richiesta di ossigeno durante l'ischemia attraverso una diminuzione del ritmo cardiaco, inibendo l'attività del nodo seno-atriale e attenuando la conduzione del nodo atrio-ventricolare attraverso recettori A_1 , con successiva attivazione dei canali al potassio ATP-dipendenti.

L'adenosina è coinvolta nel controllo del flusso coronarico (Hein *et al.*, 1999). Essa causa infatti coronaro-dilatazione, incrementando l'apporto di ossigeno al miocardio attraverso l'attivazione dei recettori A_{2A} e A_{2B} localizzati sulla muscolatura liscia dei vasi e sull'endotelio vascolare (Poulsen *et al.*, 1998). L'attivazione del recettore A_{2A} induce la sintesi di ossido di azoto (NO), stimolando la produzione di GMPc e favorendo quindi la disconnessione tra i filamenti di actina e miosina, responsabili della risposta contrattile (Mubagwa *et al.*, 2001).

Vari autori hanno descritto un'azione anti-ischemica dell' adenosina, mediata dal recettore A_{2A} (Forman *et al.*, 2006). Questo effetto sembra essere legato a due meccanismi: il primo prevede che l'attivazione del recettore e il conseguente innalzamento di AMPc inneschi la cascata fosforilativa delle proteine ERK e la successiva attivazione della proteina Rap1, capace di favorire un prolungamento della sopravvivenza cellulare durante situazioni di ipossia (Forman *et al.*, 2006), il secondo ipotizza la

riattivazione delle correnti al K^+ e delle correnti al Ca^{2+} in ingresso, con conseguente attivazione delle PKA (cascata fosforilativa), consentendo un'azione protettiva nei confronti di fenomeni ischemici (Klinger *et al.*, 2002);

L'adenosina, attraverso recettori A_{2A} e A_{2B} , svolge un potente effetto inibitore sull'aggregazione piastrinica (Horiuchi, 2006). Questo autacoide è quindi in grado di ridurre il danno miocardico, di attenuare la disfunzione ventricolare post-ischemica reversibile e di ridurre l'entità dell'infarto del miocardio (Liang e Jacobson, 1998; Baxter, 2002).

A livello del sistema respiratorio, l'adenosina svolge un ruolo chiave nei processi infiammatori e nella broncocostrizione associata ad asma e BPCO. L'inalazione di questa purina, generalmente sotto forma di AMP, causa un'evidente broncocostrizione in pazienti asmatici e in soggetti allergici non-asmatici (Minge *et al.*, 2002). Il ruolo svolto dall'adenosina nell'insorgenza della patologia asmatica e nella BPCO non sembra attribuibile ad un'azione diretta del nucleoside sulla muscolatura liscia, quanto piuttosto ad un meccanismo indiretto che prevede l'interazione del mediatore con i recettori purinergici espressi su terminazioni nervose o su cellule infiammatorie come i mastociti. Una volta ricevuto lo stimolo, queste cellule sono in grado di liberare mediatori dell'infiammazione quali leucotrieni, prostaglandine, interleuchine, *tumour necrosis factor- α* (TNF-

α) e istamina, che interagiscono con la muscolatura liscia inducendo broncocostrizione (Polosa *et al.*, 2002). Evidenze sperimentali hanno infatti dimostrato che l'adenosina agisce attraverso due vie nell'induzione della costrizione bronco-alveolare: la via neuronale e l'interazione con recettori purinergici presenti sulla membrana dei mastociti (Spicuzza *et al.*, 2003).

Per mezzo di studi *in vitro* è stato possibile osservare che l'adenosina è in grado di promuovere la liberazione di istamina, prostaglandina D_2 e triptasi da popolazioni di cellule mastocitarie (Spicuzza *et al.*, 2003). I recettori per l'adenosina presenti sui mastociti appartengono ai sottotipi A_{2A} e A_{2B} . In condizioni fisiologiche, la concentrazione di adenosina è tale da consentire il legame preferenziale con i recettori A_{2A} , a più alta affinità (Spicuzza *et al.*, 2003). In presenza di stati patologici, come asma e BPCO, la concentrazione di adenosina è tale da reclutare anche recettori A_{2B} , caratterizzati da una bassa affinità, con conseguente degranolazione dei mastociti mediata da IP_3 e DAG, e aumento della liberazione di istamina (Spicuzza *et al.*, 2003).

A livello renale l'adenosina esplica le sue funzioni attraverso l'interazione con i sottotipi recettoriali A_1 e A_2 . Al contrario di quanto accade nel cuore e nei vasi extra-renali, dove l'adenosina svolge un effetto vasodilatatore, nel rene essa promuove soprattutto un'azione

vasocostrittrice poiché sia l'adenosina che gli agonisti purinergici sono in grado di indurre una riduzione del flusso sanguigno renale con concomitante riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR). Questi effetti sono mediati dal recettore A_1 , localizzato su arteriole afferenti, a livello del glomerulo, nel tubulo prossimale e dotti collettori (Welch, 2002). Recettori A_{2A} risultano espressi a livello delle arteriole efferenti (Modlinger e Welch, 2003).

L'adenosina è significativamente coinvolta nella modulazione delle risposte infiammatorie attraverso la regolazione dell'attività di diverse cellule immunitarie. Questo autacoide, infatti, interagendo con specifici recettori svolge una marcata attività immunosoppressiva capace di contrastare processi associati a risposte immunitarie abnormi (Haskò e Cronstein, 2004). Attraverso l'interazione con i recettori A_{2A} , l'adenosina è in grado di inibire, l'attività dei neutrofili, cellule rapidamente reclutate a livello di siti infiammatori. Nei primi anni '80, Cronstein e collaboratori dimostrarono la capacità di questo autacoide di ridurre la produzione di anioni superossido inibendo l'attività di neutrofili umani (Cronstein *et al.*, 1983). Studi successivi evidenziarono la capacità dell'adenosina di ridurre l'espressione di molecole di adesione e di limitare la secrezione di citochine proinfiammatorie e di fattori di crescita (Cronstein, 1994; Haskò e Cronstein, 2004). Recentemente, diverse evidenze hanno dimostrato

l'espressione di recettori A_1 a livello dei neutrofilii. Questi recettori mediano un incremento della chemiotassi e della fagocitosi. Tuttavia, l'effetto A_{2A} -mediato (immunosoppressivo) sembra predominare su quello A_1 -mediato (immunostimolatorio) (Haskò e Cronstein, 2004).

Recettori A_{2A} , A_{2B} e A_3 sono espressi anche su macrofagi e cellule dendritiche (Figura 7). Khoa *et al.* (2006) hanno dimostrato che la stimolazione di questi recettori è associata ad una riduzione della liberazione di interleuchina (IL-12), TNF- α , *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) e ossido nitrico (NO), e ad un aumento della produzione di interleuchina-10 (IL-10), citochina ad attività anti-infiammatoria. In linea con queste evidenze, Panther *et al.* (2003) hanno osservato che cellule dendritiche incubate con adenosina e successivamente stimulate con lipopolisaccaride (LPS) presentano una ridotta capacità di attivare l'espansione clonale di linfociti T-helper (T_{H1}). Questa inibizione della differenziazione di cellule T_{H1} rappresenta un ulteriore meccanismo di contenimento del processo infiammatorio, in quanto tali cellule stimolano la risposta flogistica mediata dai macrofagi (Panther *et al.*, 2003).

In letteratura sono disponibili evidenze a sostegno della capacità dell'adenosina di indurre liberazione di istamina in seguito a interazione con recettori A_{2B} e A_3 espressi sui mastociti (Feoktistov *et al.*, 2003).

Alcuni autori hanno dimostrato che la liberazione di istamina è in grado di ridurre la produzione di TNF- α e quindi di contenere il fenomeno infiammatorio, attraverso l'attivazione di recettori H₂ presenti su macrofagi (Smith *et al.*, 2002). Studi recenti hanno dimostrato che in topi *knockout* per l'enzima adenosina deaminasi, caratterizzati da elevati livelli endogeni di adenosina, sviluppano un'inflammatione mastocito-mediata molto simile a quella che si riscontra nella patologia asmatica (Chunn *et al.*, 2001). Questa evidenza, sostenuta dall'osservazione che pazienti con asma presentano livelli elevati di adenosina nel liquido broncoalveolare (BAL) e un incremento dell'espressione di recettori purinergici nelle cellule infiammatorie, suggerisce che il sistema dell'adenosina sia attivamente coinvolto nella fisiopatologia dell'asma e delle BPCO (Mohsenin e Blackburn, 2003).

Alcuni autori hanno dimostrato che il trattamento con un inibitore dell'adenosina chinasi, in grado di provocare un aumento dei livelli di adenosina endogena, favorisce un miglioramento significativo della colite indotta da trattamento con sodio destransolfato nel topo (Siegmond *et al.*, 2000). Inoltre l'adenosina sembra essere implicata negli effetti anti-infiammatori di metotressato e sulfasalazina, farmaci utilizzati in clinica nel trattamento di patologie infiammatorie intestinali (Gadangi *et al.*, 1996). Altri autori ritengono tuttavia che l'adenosina svolga anche effetti

pro-infiammatori attraverso l'interazione con recettori A_1 . Infatti questi recettori sembrano in grado di promuovere la formazione di ioni superossido, degranulazione, fagocitosi e liberazione di citochine (Cronstein et al., 1994).

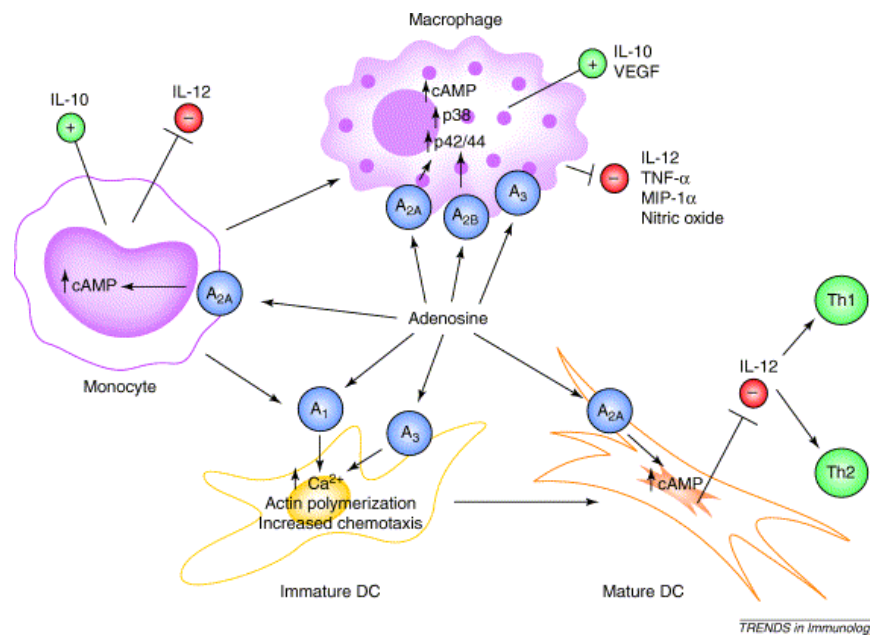


Figura 7 Schema rappresentativo dell'azione modulatoria dell'adenosina su diverse popolazioni cellulari immunitarie. DC: cellule dendritiche; IL-10: interleuchina-10; IL-12: interleuchina-12; VEGF: vascular endothelial growth factor; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1 α (tratto da Haskò e Cronstein, 2004).

SISTEMA NERVOSO ENTERICO

Il sistema nervoso enterico è costituito dall'insieme dei neuroni del tratto gastrointestinale, che possono svolgere la loro attività indipendentemente dal sistema nervoso centrale. Questo sistema controlla la motilità, la secrezione esocrina ed endocrina, la microcircolazione e la regolazione dei processi immunitari e infiammatori. Esso deriva da cellule del segmento vagale della cresta neurale, che migrano dalla porzione craniale dell'intestino e successivamente vanno a popolare l'intero tratto digerente (Le Douarin *et al.*, 1994).

Diversi recettori dotati di attività tirosin-chinasica sono importanti per la migrazione e lo sviluppo di neuroblasti nell'intestino. Uno di questi recettori, denominato RET, è coinvolto nello sviluppo dei gangli enterici derivanti da cellule della cresta neuro-vagale. Il recettore Kit, dotato anch'esso di attività tirosin-chinasica, regola lo sviluppo delle cellule di Cajal, considerate cellule pace-maker intestinali (Huizinga *et al.*, 1995).

Il plesso nervoso intestinale (Figura 8) costituisce una rete, denominata sistema nervoso enterico, connessa al sistema nervoso centrale attraverso terminazioni simpatiche e parasimpatiche. Esso è costituito da neuroni raggruppati in piccoli gangli, che danno luogo alla formazione di due plessi:

- a) **plesso mienterico (o plesso di Auerbach)**, situato tra gli strati di muscolatura longitudinale e circolare, coinvolto soprattutto nella regolazione della motilità;
- b) **plesso sottomucoso (o plesso di Meissner)**, localizzato nella sottomucosa, tra lo strato di muscolatura circolare e la muscolaris mucosae. Questo plesso regola funzioni di secrezione, di assorbimento e vascolari, ed è particolarmente sviluppato a livello dell'intestino tenue (Gershon *et al.*, 1994).

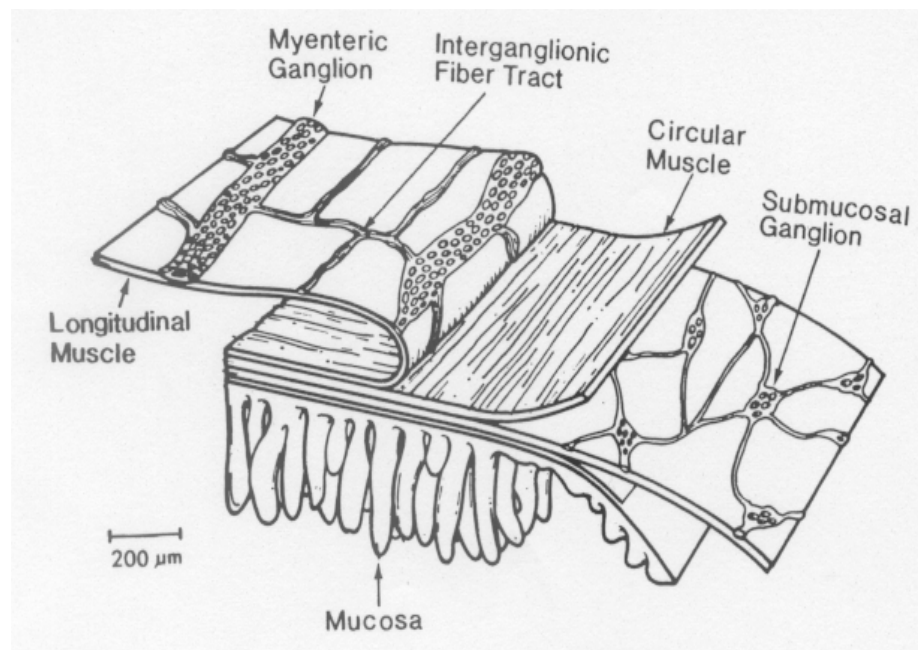


Figura 8. Struttura e localizzazione del sistema nervoso enterico (Johnson e Alpers, 1994)

Il sistema nervoso enterico è innervato da fibre estrinseche appartenenti a entrambe le sezioni (simpatica e parasimpatica) del sistema nervoso

autonomo, che hanno soprattutto il compito di modulare l'attività dei circuiti neuronali a livello dei plessi enterici intramurali (Wood, 1994). La maggior parte delle fibre nervose estrinseche che si distribuiscono all'intestino appartiene a neuroni afferenti primari (Figura 9) (Janing, 1996).

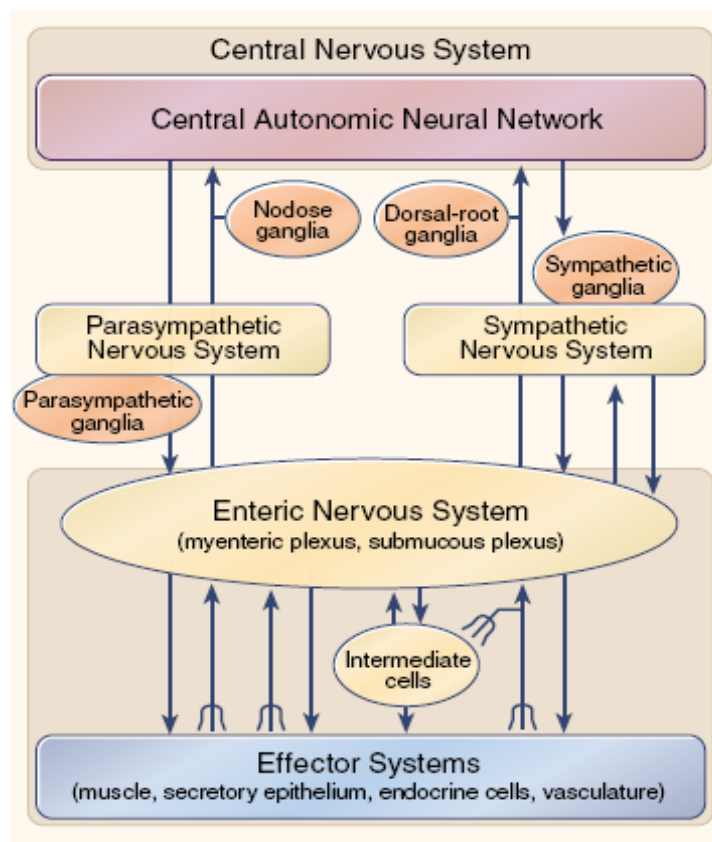


Figura 9. Innervazione del tratto gastrointestinale (Goyal e Hirano, 1996).

INTERAZIONE TRA SISTEMA NERVOSO ENTERICO E SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema nervoso enterico rappresenta un complesso sistema integrato di neuroni situato nella parete del tratto digerente. I sistemi nervosi integrati possiedono la capacità di mantenere memorizzati programmi funzionali in grado di generare specifici profili di risposte motorie stereotipate. La rete neurale del sistema nervoso enterico è in grado quindi di generare varie risposte motorie della muscolatura del tratto gastrointestinale, le quali caratterizzano specifiche fasi delle funzioni digestive o stati patologici (Wood, 2004). All'interno dei circuiti nervosi di questo sistema è memorizzato un programma neurale per ogni profilo motorio. Tali programmi sono identificabili attraverso l'osservazione delle risposte motorie. Tra questi possiamo distinguere:

- 1) movimenti di segmentazione e mescolamento durante la fase digestiva nell'intestino tenue;
- 2) il cosiddetto complesso motorio migrante, che caratterizza la fase interdigestiva;
- 3) movimenti di propulsione anterograda, che compaiono in particolari stati patologici e si propagano per lunghi tratti del tubo digerente;
- 4) propulsione retrograda nell'intestino tenue durante il vomito;
- 5) formazione delle austre nel colon;

6) assenza di contrazioni muscolari;

Ciascuno di questi profili comprende una componente secretiva e circolatoria che integra quella motoria.

I movimenti di propulsione fanno anche parte di un programma difensivo e, in tal caso, si manifestano come conseguenza di interazioni tra sistema immunitario e sistema nervoso enterico. I movimenti propulsivi a carattere difensivo vengono in genere evocati dalla presenza nel lume intestinale di un antigene che determina una sensibilizzazione alla quale fa seguito una risposta caratterizzata da potenziamento dell'attività motoria propulsiva e della secrezione di muco e acqua, allo scopo di allontanare l'antigene in maniera rapida (Castro, 1989; Wang *et al.*, 1991; Cowles e Sarna, 1990; Cowles e Sarna, 1991; Hansen, 2003; Schemann e Neunlist, 2004).

Oltre a contenere un “secondo cervello”, il tratto digerente è riconosciuto come il maggiore organo linfoide dell'organismo. Diverse popolazioni cellulari immunitarie (polimorfonucleati, linfociti, macrofagi, dendrociti e mastociti) sono fisiologicamente presenti a livello della mucosa intestinale, della lamina propria e della muscolatura liscia enterica. Situato in una delle aree di interfaccia tra organismo e ambiente esterno più contaminate, il sistema immunitario enterico viene continuamente in contatto con antigeni presenti nel cibo, agenti infettivi, tossine e agenti

chimici nocivi. La barriera chimica e fisica dell'epitelio intestinale è insufficiente a contrastare il notevole carico di antigeni, consentendo così una continua stimolazione del sistema immunitario. Inoltre, lo stress ambientale o la manipolazione chirurgica possono causare una interruzione di tale barriera promuovendo ulteriori attivazioni del sistema immunitario (Sauders *et al.*, 2002; Soderholm *et al.*, 2002; Turler *et al.*, 2002).

Il sistema immunitario enterico è strettamente connesso da un punto di vista sia morfologico che funzionale, ai neuroni del plesso sottomucoso e mienterico. In presenza di infiammazione è stata osservata una massiccia presenza di linfociti e leucociti a livello di terminazioni nervose, suggerendo una possibile influenza da parte di queste cellule nella regolazione delle funzioni neuronali (Sharkey e Mawe, 2002). Evidenze a sostegno della comunicazione tra sistema immunitario e sistema nervoso enterico derivano da studi di elettrofisiologia condotti su neuroni enterici di preparati intestinali ottenuti da animali sensibilizzati da antigeni. Le evidenze sperimentali suggeriscono che l'integrazione neuro-immunitaria induce l'attuazione di un programma motorio difensivo in risposta a condizioni dell'ambiente intestinale che potrebbero risultare dannose per l'integrità dell'organismo stesso. L'integrazione neuro-immunitaria procede in maniera sequenziale, partendo dal riconoscimento immunitario seguito dal trasferimento del segnale al sistema nervoso enterico, a cui fa

seguito l'interpretazione neurale e quindi la selezione di uno specifico programma secretivo-motorio che, in maniera efficace, determina l'espulsione dell'antigene dal lume intestinale (Figura 10) (Wood, 2004).

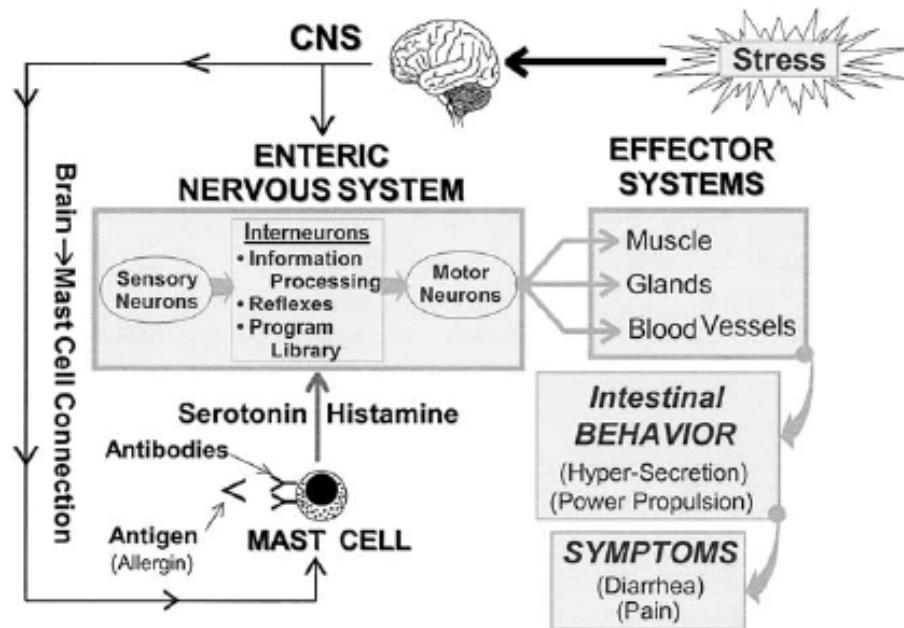


Figura 10. Rappresentazione schematica delle connessioni tra sistema nervoso e sistema immunitario enterico. Neuroni sensori, interneuroni e motoneuroni sono interconnessi per formare microcircuiti. I mastociti si comportano come neuroni sensori che allertano il sistema nervoso enterico sulla comparsa di agenti nocivi all'interno dell'intestino. Segnali provenienti dal sistema nervoso centrale possono, attraverso l'intervento dei mastociti, causare sintomi evocati dallo stress, quali diarrea e dolore addominale. (Tratto da Wood, 2004).

Il sistema nervoso enterico è quindi responsabile di un controllo continuo dell'attività motoria intestinale in condizioni fisiologiche e in presenza di stati patologici quali il vomito, la contaminazione con

enterotossine, l'infiammazione e la stimolazione da parte di allergeni alimentari. Senza questo sistema l'intestino non potrebbe funzionare. L'avanzamento delle conoscenze durante gli ultimi 30 anni fanno del sistema nervoso enterico un fertile terreno di ricerca per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche mirate al trattamento dei disturbi gastrointestinali. A differenza del sistema nervoso centrale, quello enterico è costretto ad operare in un ambiente avverso, circondato da continui cambiamenti dell'attività di cellule immunitarie e infiammatorie, le quali liberano mediatori che a loro volta sono in grado di influenzare specifiche attività neuronali. Tutto questo determina modificazioni a livello dei circuiti nervosi intestinali e variazioni comportamentali a livello dell'intero organismo (Sharkey e Mawe, 2002).

Attualmente, le conoscenze relative alla comunicazione tra sistema nervoso enterico e sistema immunitario suggeriscono nuove opportunità per la scoperta di strategie terapeutiche utilizzabili nel trattamento di sintomi derivanti da disordini a livello della comunicazione neuro-immunitaria (Wood, 2004).

Patologie infiammatorie dell'intestino

Circa dieci anni fa le patologie infiammatorie intestinali, quali il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, sono state definite come malattie importanti e invalidanti, meritevoli di ricerche approfondite (Ferguson, 1994). Da allora, mentre non si conosce ancora l'eziologia di queste patologie, le conoscenze relative ai mediatori molecolari e ai meccanismi implicati nello sviluppo delle lesioni tissutali hanno subito un notevole avanzamento. In particolare, lo studio delle caratteristiche di queste patologie ha evidenziato alcuni fattori predisponenti significativi, tra i quali i fattori genetici, infettivi, immunologici e infiammatori (Ardizzone e Bianchi Porro, 2005).

Esistono numerose evidenze a sostegno del fatto che la colite ulcerosa e il morbo di Crohn siano, almeno in parte, il risultato di una predisposizione genetica che può coinvolgere diversi geni suscettibili, alcuni dei quali comuni alle due malattie, mentre altri sono peculiari dell'una o dell'altra patologia. In particolare, la predisposizione genetica sembra incidere maggiormente nella patogenesi del morbo di Crohn rispetto alla colite ulcerosa. I geni responsabili della suscettibilità e del tipo di patologia infiammatoria sembrano differire da quelli relativi al fenotipo clinico, come ad esempio l'estensione e la gravità del disturbo e la sensibilità al trattamento farmacologico (Shanahan, 2001).

Nel 1996, un gene in grado di conferire suscettibilità al morbo di Crohn fu individuato in seguito a studi condotti su famiglie che presentavano un'elevata incidenza di questa patologia (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Tale gene è localizzato sul cromosoma 16 ed è denominato NOD2. Si ritiene che le proteine NOD siano recettori citosolici per segnali patogeni di origine batterica. NOD2 è espresso nei monociti ed è in grado di attivare il fattore nucleare kB (NF-kB), un fattore di regolazione della trascrizione genica considerato di cruciale importanza per l'attivazione di risposte immuno-infiammatorie (van Heel *et al.*, 2001; Mahida e Johal, 2001). Mutazioni del gene NOD2 sono state individuate nell'8% dei pazienti con morbo di Crohn, rispetto al 4% dei controlli. Tuttavia, solo i pazienti affetti da morbo di Crohn risultano omozigoti per queste mutazioni e questa condizione si associa a un aumento del rischio di sviluppare la malattia di 20-40 volte. Per quanto riguarda la colite ulcerosa, le mutazioni osservate nel gene NOD2 non risultano significativamente più frequenti rispetto ai controlli, sostenendo che le due patologie sono comunque distinte (Ardizzone e Bianchi Porro, 2005).

Tra i vari fattori che possono essere coinvolti nell'insorgenza e nella progressione delle patologie infiammatorie enteriche, quelli di origine ambientale sono poco chiari. L'importanza di questi fattori è tuttavia sostenuta dal fatto che negli ultimi 50 anni si è verificato un notevole

incremento di incidenza del morbo di Crohn nel mondo industrializzato, e attualmente si sta osservando un incremento nella diffusione di questa patologia anche nei paesi in fase di sviluppo.

Cambiamenti ambientali che possono influenzare la reattività del sistema immunitario della mucosa digestiva, lo sviluppo della microflora enterica o di entrambi comprendono: miglioramento delle condizioni igieniche; consumo di cibi sterili o non fermentati; vaccinazioni; età a cui avviene la prima esposizione dell'intestino ad agenti patogeni (Shanahan, 2002). Ad esempio, il miglioramento degli standard igienici nel mondo industrializzato, associato alla riduzione del numero di infezioni da elminti, può rappresentare una spiegazione meccanicistica della maggiore suscettibilità all'insorgenza di morbo di Crohn. Infatti, l'infezione da elminti è associata a una risposta immunitaria di tipo 2 che coinvolge i linfociti T-helper (T_{h2}), la quale potrebbe controbilanciare la risposta di tipo 1 (T_{h1}) associata al morbo di Crohn (Elliott *et al.*, 2000).

Gli effetti opposti che il fumo di sigaretta può svolgere su ciascuna forma di infiammazione enterica accresce l'incertezza sulla natura delle interazioni tra fattori ambientali e malattie infiammatorie intestinali. Numerosi studi hanno evidenziato che l'assenza di dipendenza dal fumo è una caratteristica dei pazienti affetti da colite ulcerosa, mentre il consumo di sigarette è peculiare dei pazienti affetti da morbo di Crohn (Franceschi

et al., 1987; Lindberg *et al.*, 1988). La nicotina è probabilmente il fattore principale chiamato in causa per questa associazione, ma il meccanismo rimane sconosciuto. È stato riportato che il fumo di sigaretta può influenzare l'immunità umorale e cellulo-mediata (Miller *et al.*, 1982; Srivastava *et al.*, 1991) e può stimolare la secrezione di muco a livello del colon (Cope *et al.*, 1986). Inoltre, è stato osservato che sia il fumo che la nicotina sembrano in grado di ridurre la motilità colica (Coulie *et al.*, 2001). Infine, studi *in vivo* hanno evidenziato che la nicotina possiede anche un effetto inibitore sulla funzione T_{h2} , la quale è predominante nei pazienti con colite ulcerosa, mentre non possiede effetti sulla funzione T_{h1} , predominante nel morbo di Crohn (Madretsma *et al.*, 1996).

Lo stress psicologico, presente in circa il 40% dei pazienti affetti da colite ulcerosa, sembra essere un potente fattore scatenante (Theis e Boyco, 1994). Evidenze significative collegano lo stress psicologico con una maggiore probabilità di contrarre malattie e, verosimilmente, con un'augmentata suscettibilità alle infezioni dovuta alla riduzione della funzionalità del sistema immunitario (Herbert e Cohen, 1993). Lo stress a lungo termine sembra tuttavia essere maggiormente coinvolto nell'esacerbazione della colite ulcerosa, analogamente a quanto osservato in alcuni primati che sviluppano colite dopo lunghi periodi di cattività (Madara *et al.*, 1985).

Sebbene i dati in letteratura non siano convincenti circa la possibilità che alcuni tipi di infezione siano collegati allo sviluppo della malattia infiammatoria intestinale, esistono evidenze a favore del fatto che la microflora intestinale possa svolgere un ruolo importante in queste patologie. I batteri presenti nel lume intestinale vivono in un complesso ecosistema comunicante con l'esterno, e il numero di microrganismi presenti nell'intestino di un individuo sano è 10 volte superiore a quello di tutte le cellule che compongono il corpo umano. Differenze tra pazienti sani e individui affetti da colite ulcerosa o morbo di Crohn nell'ecologia della flora intestinale non sono tuttavia sostenute da forti evidenze sperimentali. Una significativa riduzione del numero di batteri anaerobi e di *Lactobacillus* è stata evidenziata in pazienti affetti da malattia infiammatoria intestinale in fase attiva (ma non durante la fase di remissione) (Fabia *et al.*, 1993). Inoltre, evidenze a sostegno di una correlazione tra microflora intestinale e colite ulcerosa derivano da studi condotti su animali transgenici, i quali sviluppano colite quando sono esposti a batteri non patogeni appartenenti alla normale flora batterica in ambienti privi di agenti patogeni specifici, ma non quando si trovano in ambienti sterili (Sartor, 2000).

In condizioni fisiologiche, la mucosa intestinale si trova in una situazione di "infiammazione controllata", regolata da un delicato

equilibrio tra la produzione di citochine con attività pro- e antinfiammatoria. In presenza di un antigene si osserva l'attivazione di linfociti enterici seguita dalla liberazione di interferone (IFN)- γ e interleuchina (IL)-2. IL-2 induce l'espansione clonale dei linfociti T e B. I linfociti T vengono classificati in T_h1 e T_h2 in base al tipo di citochine prodotte e al tipo di risposta immunitaria da loro controllata.

I linfociti T_h1 sono implicati nella modulazione delle risposte cellulo-mediate attraverso la liberazione di IL-2, IFN- γ e TNF- β . Attraverso IFN- γ vengono attivate altre popolazioni cellulari (cellule presentanti antigene e macrofagi) con conseguente produzione e liberazione di interleuchina (IL)-12. I linfociti T_h2 intervengono nel controllo delle risposte umorali attraverso la liberazione di IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13.

Il morbo di Crohn è caratterizzato dall'espansione clonale di linfociti T_h1 , mentre in presenza di colite ulcerosa è stato osservato un incremento della produzione di citochine proinfiammatorie tipiche di una risposta T_h2 (Fiocchi, 1998). Questa complessa interazione tra fattori genetici, microbici e ambientali induce un'attivazione delle diverse popolazioni cellulari immunitarie a livello della mucosa intestinale, facilitata probabilmente da alterazioni a carico della barriera epiteliale enterica, con conseguente insorgenza del processo infiammatorio e successiva distruzione del tessuto (Ardizzone Bianchi Porro, 2005).

Effetti dell'inflammation intestinale sulle funzioni neuromotorie

I neuroni intestinali sono influenzati dalle infezioni e da infiammazioni enteriche associate ad attivazione del sistema immunitario. In particolare, i neuroni AH, che svolgono funzioni afferenti primarie ed interneuronali, vanno incontro a cambiamenti nella loro attività elettrica in presenza di infiammazione. Questo tipo di neuroni appare particolarmente suscettibile ai cambiamenti associati all'inflammation, verosimilmente per il fatto che essi proiettano verso gli strati mucosi, dove la risposta infiammatoria è tipicamente più intensa (Mawe *et al.*, 2004). In presenza di enteriti indotte da *Trichinella spiralis* e nella sensibilizzazione indotta da proteine del latte, i neuroni AH tendono a depolarizzarsi e a divenire ipereccitabili (Palmer *et al.*, 1998; Frieling *et al.*, 1994; Frieling *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003). In modelli di colite indotta da acido trinitrobenzensolfonico (TNBS), dove la risposta infiammatoria è generata dall'attivazione delle cellule T, i neuroni AH sono ipereccitabili, ma mantengono un normale potenziale a riposo (Linden, 2003). Tali differenze di sensibilità dei neuroni AH, nei confronti delle risposte infiammatorie immuno-mediate rispetto a quelle di origine infettiva o allergica, indicano che i meccanismi alla base delle disfunzioni neuronali sono diversi. Nel caso di enteriti infettive e di alterazioni di origine allergica, le risposte infiammatorie sono relativamente acute e sembra che

i mastociti ricoprono un ruolo predominante (Frieling *et al.*, 1994; Frieling *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2003). I mediatori liberati dai mastociti e che probabilmente contribuiscono alla depolarizzazione e all'ipereccitabilità dei neuroni, comprendono soprattutto l'istamina, ma anche prostaglandine, triptasi mastocitaria e leucotrieni (Frieling *et al.*, 1994; Frieling *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2003; Linden *et al.*, 2001).

In aggiunta all'eccitabilità neuronale, anche l'attività sinaptica risulta potenziata in presenza di infiammazione di origine batterica e immuno-mediata (Figura 11). Mentre l'input sinaptico eccitatorio rapido verso i neuroni AH è relativamente raro, il potenziale eccitatorio rapido post-sinaptico (EPSP) risulta più frequente ed ampio nei neuroni AH di animali con colite da TNBS e con enterite da *T. spiralis* (Linden *et al.*, 2003). Inoltre, nei neuroni S, i quali svolgono la funzione di interneuroni e di motoneuroni, sia i potenziali eccitatori rapidi che quelli lenti, risultano aumentati (Linden *et al.*, 2003). Queste evidenze suggeriscono che l'infiammazione determina una facilitazione della trasmissione sinaptica nei gangli enterici, probabilmente attraverso un meccanismo pre-sinaptico.

L'omeostasi intestinale è coordinata dalle risposte di differenti tipi di cellule, comprendenti cellule immunitarie e non immunitarie. L'interazione tra questi tipi di cellule risulta amplificata durante

l'inflammation o l'infezione da nematodi, favorendo l'esposizione delle cellule non immuni all'azione di mediatori, quali le citochine liberate dalle cellule immunitarie. Le citochine svolgono un ruolo importante nelle alterazioni delle cellule muscolari lisce e delle cellule epiteliali che si riscontrano in presenza di infiammazione e/o infezione (Mawe *et al.*, 2004).

Le citochine pro-infiammatorie, interleuchina-1 β (IL-1 β) e il TNF- α , risultano elevate già nelle fasi precoci dell'inflammation enterica e determinano un incremento della liberazione di prostaglandine e di leucotrieni, i quali contribuiscono all'amplificazione del danno tissutale e dell'inflammation, determinando anche modificazioni dell'attività della muscolatura liscia (Shea-Donohue *et al.*, 1997). Si verifica quindi una progressiva alterazione della contrattilità delle cellule muscolari, la quale provoca una riduzione delle risposte motorie a stimoli eccitatori e un incremento dell'incidenza di fenomeni diarroici (Hosseini *et al.*, 1999). Il contributo di mediatori pro-infiammatori, quali il *platelet activating factor* (PAF) e l'interleuchina-1 (IL-1), nella riduzione della motilità, è stato evidenziato da diversi anni (Morteau *et al.*, 1993), e studi condotti su cellule muscolari intestinali, prelevate da pazienti affetti da malattia infiammatoria intestinale, hanno indicato alterazioni della funzione muscolare e/o neuronale enterica (Vermillion *et al.*, 1993).

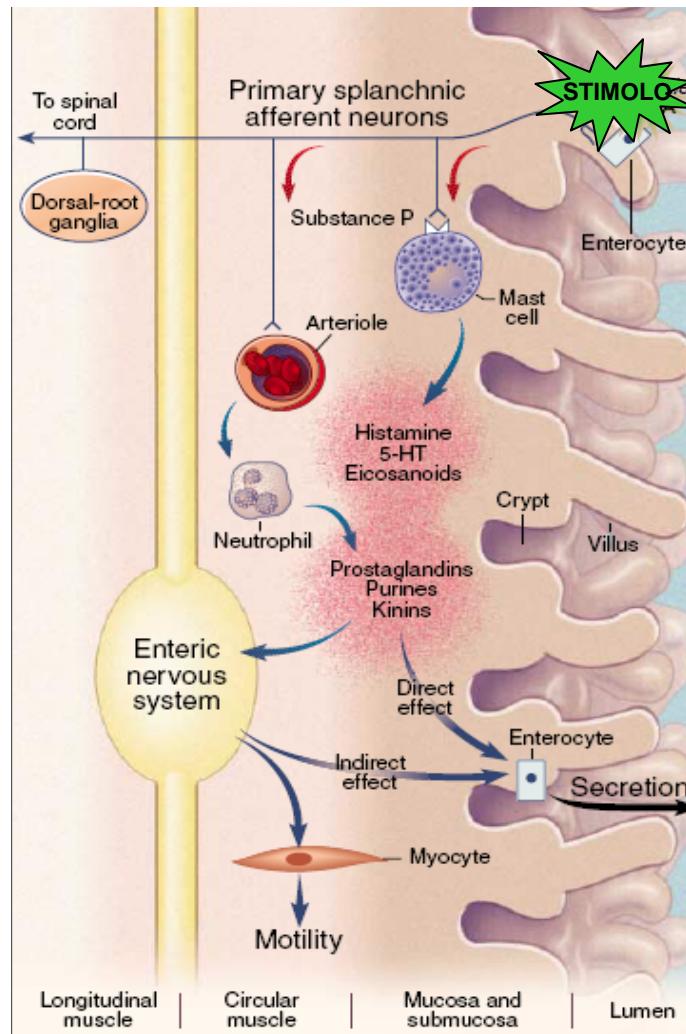


Figura 11 Schema delle alterazioni secretive e motorie in presenza di infiammazione intestinale (Tratto da Goyal e Hirano, 1996)

Con l'ampliamento delle conoscenze delle basi immunologiche delle risposte infiammatorie in diversi modelli animali, aumentano le opportunità di determinare i meccanismi che stanno alla base della regolazione immunitaria delle funzioni neuromuscolari enteriche. L'integrità del sistema nervoso enterico è un fattore molto importante nei meccanismi difensivi dell'ospite. Ad esempio, l'ablazione delle fibre

nervose sensorie e simpatiche favorisce un aumento delle risposte agli stimoli infiammatori (McCafferty *et al.*, 1997). Le interconnessioni tra sistema nervoso e citochine è bidirezionale ed il ruolo immunomodulatorio dei neuroni durante i processi infiammatori rappresenta un'area che offre potenziali strategie terapeutiche ed ulteriori studi di approfondimento.

EFFETTI DELL'ADENOSINA SULLE FUNZIONI GASTROINTESTINALI

Alcune evidenze presenti in letteratura suggeriscono il ruolo dell'adenosina nella regolazione delle funzioni fisiologiche del tratto gastrointestinale (Yip e Kwok, 2004).

A livello gastrico è stata dimostrata una partecipazione dell'adenosina nella modulazione dell'attività secretiva acida (Kwok et al., 1990). In particolare, è stata dimostrata l'espressione di recettori A_1 e A_{2A} a livello della mucosa nell'antro e nel corpo dello stomaco (Yip et al., 2004). Successivamente, esperimenti *in vivo* condotti su ratti hanno evidenziato la capacità dell'adenosina di inibire la liberazione di gastrina attraverso un'azione sui recettori A_1 , e di indurre la liberazione di somatostatina attraverso la stimolazione del sottotipo recettoriale A_{2A} (Yip e Kwok, 2004).

Vari studi hanno evidenziato la partecipazione di questo autacoide alla regolazione della motilità intestinale, attraverso interazioni con specifici recettori localizzati su neuroni enterici a livello pre- e post-sinaptico (Christofi e Wood 1994; Kadowaki *et al.*, 2000).

E' stata dimostrata la capacità dell'adenosina di inibire la liberazione di acetilcolina, sostanza P e neurochinina A da parte di neuroni enterici attraverso l'interazione con recettori A_1 pre-sinaptici in diversi modelli

animali (Nicholls e Hourani, 1997; Kadowaki *et al.*, 2003). In particolare, il trattamento con agonisti selettivi del recettore A_1 determina una riduzione significativa della motilità del colon nel ratto, mentre il trattamento con antagonisti potenzia l'attività propulsiva (Kadowaki *et al.*, 2000).

Duarte-Araújo *et al.* (2004) hanno inoltre evidenziato un possibile ruolo dei recettori A_{2A} nella facilitazione della liberazione di acetilcolina a livello del digiuno di ratto. Per contro, studi recenti hanno dimostrato la capacità del recettore A_{2A} di inibire l'attività contrattile del colon di ratto attraverso la stimolazione del sistema nitrgergico (Antonioli *et al.*, 2006). I recettori A_{2B} sono localizzati a livello della muscolatura liscia e la loro attivazione provoca un rilasciamento della muscolatura longitudinale sia nel colon distale (Bailey e Hourani, 1992, Fozard *et al.*, 2003) che nel duodeno di ratto (Nicholls *et al.*, 1996).

A livello intestinale l'adenosina sembra essere coinvolta anche nella regolazione dei processi secretivi e di riassorbimento attraverso recettori A_{2B} espressi su popolazioni cellulari della mucosa intestinale (Nicholls *et al.*, 1996). I recettori A_{2A} sembrano essere implicati nell'insorgenza dei processi diarroici. L'adenosina infatti sembra agire come mediatore paracrino della secrezione di ioni cloro. (Madara *et al.*, 1993).

Per mezzo di tecniche di immunistochemica, è stata osservata la presenza di una distribuzione eterogenea dei recettori A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 a livello delle varie regioni dell'intestino umano, ma sono necessari ulteriori studi allo scopo di definire e approfondire il ruolo di questi recettori nella regolazione della secrezione intestinale e dell'attività motoria enterica (Christofi et al., 2001).

I fenomeni infiammatori intestinali sono caratterizzati da alterazioni delle funzioni motorie, le quali possono contribuire alla comparsa di una sintomatologia caratterizzata da dolore addominale e gravi alterazioni dell'alvo (Linden et al., 2003). Alcune osservazioni sperimentali suggeriscono che l'adenosina possa partecipare alla modulazione delle funzioni motorie intestinali in queste condizioni, contribuendo alle reciproche interazioni che si verificano tra sistema neuronale e sistema immunitario enterico in presenza di infiammazione enterica. L'adenosina possiede infatti la capacità di modulare la risposta infiammatoria con diverse modalità e molti tipi cellulari coinvolti nei processi flogistici esprimono recettori per questo autacoide. In queste cellule l'adenosina sembra in grado di bloccare sia la liberazione di citochine che la produzione di anioni superossido (Thiel et al., 2003), e studi condotti su modelli sperimentali di infiammazione e shock settico hanno evidenziato

un coinvolgimento dei recettori purinergici nella modulazione del processo flogistico (Hasko e Cronstein, 2004).

Siegmud et al. (2000) hanno dimostrato la capacità dell'adenosina di indurre un significativo miglioramento della colite sperimentale in ratti trattati con un inibitore dell'adenosina chinasi, a sostegno dell'ipotesi di un possibile ruolo anti-infiammatorio per questo autacoide. Recentemente, Odashima *et al.* (2005) hanno dimostrato l'efficacia di ATL-146e, un agonista selettivo del recettore A_{2A} , nel ridurre i parametri di attività infiammatoria in un modello di ileite acuta indotta nel coniglio.

Nell'uomo è stato osservato che gli effetti di alcuni farmaci utilizzati nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (sulfasalazina, metotrexato), possono dipendere, almeno in parte, da un incremento della produzione di adenosina e dello stato di attivazione dei suoi recettori (Cronstein et al., 1999). In particolare, il metotrexato sembra essere in grado di promuovere il rilascio di adenosina a livello dei siti di infiammazione attraverso un aumento dei livelli intracellulari di 5-aminoimidazolo-4-carbossiamide ribonucleotide (AICAR) (Cronstein et al., 1993).

Diverse evidenze sostengono il possibile ruolo antinfiammatorio dell'adenosina in modelli sperimentali di shock settico. Tuttavia poco è noto sul ruolo che questo autacoide potrebbero svolgere nella regolazione

del processo flogistico intestinale e nella modulazione dell'attività motoria intestinale in presenza di processi infiammatori enterici.

PARTE SPERIMENTALE

INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie intestinali (*inflammatory bowel diseases*, IBD) sono il risultato di una complessa interazione tra sistema immunitario e fattori ambientali, che in soggetti geneticamente predisposti induce l'insorgenza di una grave reazione infiammatoria a livello dell'intestino (Fiocchi, 1998). Le normali funzioni gastrointestinali, come l'attività contrattile e secretiva, risultano alterate in pazienti affetti da IBD, e diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che tali disfunzioni sono imputabili a complesse modificazioni morfo-funzionali del sistema nervoso enterico (Lomax *et al.*, 2005). A differenza del sistema nervoso centrale, quello enterico è costretto ad operare in un ambiente avverso, esposto a continue sollecitazioni dovute all'attività di cellule immunitarie e infiammatorie, le quali liberano mediatori che a loro volta sono in grado di influenzare specifiche attività neuronali (Wood, 2004). Tra i vari mediatori coinvolti in questa complessa interazione tra sistema immuno-infiammatorio e sistema nervoso enterico, l'adenosina sembra svolgere un'intensa attività di modulazione finalizzata all'attivazione di meccanismi protettivi nei confronti del compartimento neuromuscolare (Christofi, 2001; Linden, 2001).

Le conoscenze relative al ruolo dell'adenosina nel controllo della motilità digestiva, sia in condizioni fisiologiche che in presenza di

infiammazione, sono attualmente limitate e spesso le evidenze presenti in letteratura risultano in contrasto tra loro. Alcuni studi hanno evidenziato la partecipazione di questo autacoide alla regolazione di diverse funzioni digestive in condizioni fisiologiche, attraverso un'interazione con specifici recettori localizzati su neuroni enterici a livello pre- e post-sinaptico (Christofi e Wood, 1994; Kadowaki *et al.*, 2000). Alcuni autori hanno inoltre esplorato il possibile coinvolgimento dell'adenosina nella fisiopatologia delle alterazioni motorie intestinali provocate da processi di ischemia-riperfusion (ileo post-operatorio) nel ratto, condizione associata a vari gradi di infiammazione locale del tessuto digestivo (Kadowaki *et al.*, 2001). In particolare è stato dimostrato che tale procedura induce una riduzione della motilità dell'intestino tenue *in vitro* e del transito gastrointestinale *in vivo* attraverso una modulazione del sistema colinergico da parte dell'adenosina. Infatti, il successivo trattamento del tessuto o dell'animale in esame, con un antagonista selettivo per il recettore A₁ ha permesso di osservare un incremento significativo della motilità enterica e un miglioramento del transito intestinale (Kadowaki *et al.* 2001). Per contro, diversi autori hanno osservato che l'induzione di colite sperimentale si associa a una perdita della funzionalità del recettore A₁ e di conseguenza ad una ridotta modulazione dell'adenosina sull'attività motoria colinergica. Questa alterazione funzionale è stata

attribuita ad una possibile desensibilizzazione del recettore causata dall'esposizione cronica all'autacoide durante il processo infiammatorio (Deportere *et al.*, 2002; De Man *et al.*, 2003).

Recenti evidenze hanno dimostrato una partecipazione del sottotipo recettoriale A_{2A} alla regolazione dell'attività contrattile enterica in condizioni fisiologiche, mentre poco chiara rimane l'azione modulatrice di questo recettore in presenza di processi flogistici (Duarte-Araujo *et al.*, 2004).

Per mezzo di esperimenti di biologia molecolare e di studi funzionali, è stato possibile identificare l'espressione del recettore A_{2B} a livello del tratto gastrointestinale del ratto ed è stato possibile caratterizzarne il ruolo nella regolazione della motilità enterica (Bailey e Hourani, 1992; Dixon *et al.* 1996). In particolare, è stata dimostrata la capacità di questo recettore di modulare l'attività contrattile enterica, attraverso una diretta modulazione della muscolatura liscia (Fozard *et al.* 2003).

Oltre ad un coinvolgimento nella regolazione dell'attività motoria enterica, l'adenosina è in grado di svolgere un'importante attività modulatrice su cellule immunitarie a livello del compartimento neuromuscolare enterico (Linden, 2001; Sitkovsky *et al.*, 2004). Le popolazioni cellulari coinvolte nei processi infiammatori (mastociti, polimorfonucleati, neutrofili, linfociti, macrofagi ed eosinofili) esprimono

infatti recettori per questo autacoide, e vari autori hanno osservato una significativa attività anti-infiammatoria svolta dall'adenosina in seguito all'inibizione dell'attività linfocitaria e dei polimorfonucleati, con conseguente blocco della liberazione di citochine e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (Cronstein *et al.*, 1983; Cronstein, 1994; Thiel *et al.*, 2000; Haskò e Cronstein, 2004). A tal proposito, Siegmund *et al.* (2000) hanno dimostrato una stretta correlazione tra l'aumento dei livelli endogeni di adenosina, ottenuti attraverso l'inibizione dell'enzima adenosina chinasi, e il miglioramento della colite indotta nel topo.

Attraverso studi condotti su modelli sperimentali di infiammazione e shock settico è stata dimostrata l'esistenza di un meccanismo in grado di contrastare la risposta flogistica attraverso l'attivazione del recettore A_{2A} (Sitkovsky *et al.*, 2004). L'attivazione di questo sottotipo recettoriale è infatti collegata all'inibizione dell'attività di neutrofili e macrofagi (Linden, 2006), e ad una riduzione della produzione di radicali citotossici da parte di popolazioni cellulari immunitarie (Swain *et al.*, 2003). Recentemente, Odashima *et al.* (2005) hanno dimostrato l'efficacia del trattamento con ATL-146e, un agonista selettivo per il recettore A_{2A} , nel ridurre i principali indici di attività infiammatoria in un modello di ileite acuta indotta nel coniglio.

L'esistenza di interazioni tra infiammazione neurogena e infiammazione immunogena nella fisiopatologia delle malattie infiammatorie intestinali è ampiamente dimostrata. Il sistema dell'adenosina a livello enterico rappresenta un interessante oggetto di studio, poiché questo sistema risulta fortemente coinvolto nella modulazione dell'attività del sistema immunitario e alcune evidenze suggeriscono un ruolo importante dell'adenosina endogena nella regolazione dell'attività contrattile intestinale in condizioni fisiologiche.

Obiettivi del progetto di ricerca

Sulla base di queste premesse, il presente progetto di ricerca è stato intrapreso allo scopo di:

1) esaminare l'espressione e la funzione di recettori per l'adenosina nel compartimento neuromuscolare del colon, utilizzando in modo comparativo tessuti umani e murini;

2) valutare il possibile coinvolgimento dei sottotipi recettoriali A_1 , A_{2A} e A_{2B} nelle alterazioni delle funzioni motorie intestinali in un modello di colite sperimentale nel ratto.

3) valutare il possibile effetto anti-infiammatorio di un nuovo derivato aminopirazolo pirimidinico (APP), attivo come inibitore dell'adenosina deaminasi, in un modello di colite sperimentale.

MATERIALI E METODI

Animali e tessuti umani

Gli esperimenti sono stati condotti su: A) ratti adulti Sprague-Dawley di sesso maschile, del peso di circa 240 grammi (Harlan Italia, UD), B) campioni di tessuto colico umano, ottenuti da pazienti sottoposti a resezione chirurgica.

Gli animali sono stati alimentati con mangime standard del commercio ed acqua *ad libitum*, e non sono stati sottoposti a procedure sperimentali per almeno una settimana dal loro arrivo al laboratorio. Durante la permanenza nello stabulario, gli animali sono stati alloggiati in gruppi di 5 unità per gabbia, in ambiente a temperatura e umidità controllate (22-24°C; umidità del 50-60%), ed esposizione alla luce per 12 ore al giorno. La stabulazione degli animali è stata eseguita in ottemperanza alle norme contenute nella Direttiva n° 86-60 della Comunità Economica Europea, riconosciuta ed adottata in Italia.

A) PROCEDURE SPERIMENTALI NEL RATTO

A.1) Studi funzionali

Induzione della colite

Gli animali sono stati sottoposti ad induzione di colite mediante somministrazione di acido 2,4-dinitrobenzensolfonico (DNBS, 30 mg/ratto

disciolto in etanolo al 50% v/v) secondo il protocollo descritto da Barbara et al. (2000). In presenza di anestesia con etere dietilico, un catetere di gomma è stato inserito nel retto per via aborale e sospinto nel colon fino a una distanza di 8 cm dall'orifizio anale (approssimativamente all'altezza della flessura splenica). Attraverso il catetere sono stati instillati nel lume del colon 0,25 ml della soluzione di DNBS. Ratti trattati con soluzione fisiologica o etanolo al 50% sono stati utilizzati come controlli. In tutti i casi, gli animali sono stati sottoposti alle successive procedure sperimentali a distanza di sei giorni dai trattamenti suddetti. La presenza di colite è stata verificata sia tramite ispezione diretta del cavo peritoneale e del tessuto intestinale, che tramite esame istologico eseguito su segmenti di colon prelevati dall'area esposta al DNBS. Segmenti di colon distale sono stati privati della mucosa e sottomucosa, attraverso un'accurata dissezione, e tagliati in strisce della lunghezza di circa 20 mm e larghezza di 3 mm.

Valutazione della colite

Trascorsi sei giorni dal trattamento con DNBS o con il suo veicolo, gli animali sono stati sacrificati e l'entità dell'infiammazione intestinale è stata valutata sia macroscopicamente che microscopicamente, in accordo

con i criteri precedentemente suggeriti da Wallace e Keenan (1990), e successivamente modificati da Barbara *et al.* (2000). I criteri di analisi macroscopica sono descritti in tabella 1. La valutazione microscopica dell'inflammazione è stata eseguita per mezzo di un microscopio ottico, su sezioni istologiche di colon distale sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina. I criteri istologici comprendono la valutazione dei seguenti parametri: entità delle modificazioni strutturali della mucosa; infiltrato cellulare; spessore della muscolatura liscia; presenza di microascessi nelle cripte e deplezione di cellule mucipare. Tutti i parametri relativi al danno macroscopico e microscopico sono stati determinati per ciascun animale da due osservatori ai quali non era noto il trattamento eseguito.

Tabella 1. Criteri di valutazione del livello di infiammazione e ulcerazione dei tessuti colici

Score	Aspetto
	Macroscopico
0	Normale
1	Iperemia circoscritta, nessuna lesione ulcerativa
2	Lesioni ulcerative con assenza di iperemia o ispessimento della parete
3	Lesioni ulcerative con infiammazione localizzata
4	2 o più siti ulcerati e infiammati
5	Lesioni ulcerative con estensione >1 cm
6	Lesioni ulcerative con estensione >2 cm. Score viene incrementato di 1 per ogni millimetro di ispessimento della parete colica

Misurazione dell'attività contrattile dei preparati di muscolatura liscia

L'attività motoria dei preparati di colon è stata misurata come precedentemente descritto (Blandizzi et al., 2001). I preparati sono stati posti in bagni per organi isolati contenenti soluzione di Krebs a 37°C nella quale era fatta gorgogliare una miscela di O₂ 95% + CO₂ 5%. I preparati sono stati collegati a trasduttori isotonici (Basile, Comerio, VA), con una tensione costante di 1 g. I preparati sono stati lasciati a riposo per 30 minuti. L'attività della muscolatura longitudinale è stata registrata per mezzo di poligrafi (Basile, Comerio, VA).

La stimolazione elettrica transmurale (SET) è stata eseguita per mezzo di uno stimolatore BM-ST6 (Biomedica Mangoni, Pisa). Gli stimoli elettrici sono stati applicati come segue: a) stimolazione elettrica singola (SETs) della durata di 10 secondi (0,5 ms, 30 mA) alla frequenza di 10 Hz; b) treni di stimolazione transmurale elettrica ripetuta (SETr) della durata di 5 secondi (0,5 ms, 30 mA) alla frequenza di 5 Hz; c) stimolazione colinergica ottenuta attraverso applicazione di carbacolo a concentrazione submassimale (1 µM) e sovramassimale (100 µM) in presenza di tetrodotossina (1 µM), per meglio apprezzare l'eventuale effetto potenziante o rilasciante indotto dal trattamento con antagonisti e agonisti purinergici. Ciascun preparato è stato ripetutamente stimolato per mezzo di

SET e gli esperimenti sono iniziati solo dopo aver ottenuto risposte motorie riproducibili (di solito dopo 2 o 3 stimolazioni).

In una prima serie di esperimenti, i preparati di muscolatura longitudinale di ratto sono stati pre-incubati con DPCPX (antagonista per il recettore A_1 , 0,01 μM), ZM 241385 (antagonista per il recettore A_{2A} , 0,01 μM) o MRS 1706 (antagonista per il recettore A_{2B} , 0,02 μM) al fine di valutare gli effetti di questi farmaci sulle risposte contrattili indotte da SETs. Gli antagonisti sono stati aggiunti alla soluzione 20 minuti prima della stimolazione elettrica.

La seconda serie di esperimenti è stata condotta in preparati di colon mantenuti in una soluzione di Krebs contenente guanetidina (10 μM), L-732,138 (antagonista del recettore NK_1 per le tachichinine, 10 μM), GR-159897 (antagonista del recettore NK_2 per le tachichinine, 1 μM) e SB-218795 (antagonista del recettore NK_3 per le tachichinine, 1 μM). In presenza di queste condizioni sono stati esaminati gli effetti degli antagonisti purinergici sulle risposte motorie colinergiche e nitrergiche evocate da SETs. L'incubazione dei preparati con DPCPX, ZM 241385 e MRS 1706 prima della stimolazione elettrica è stata condotta con le modalità sopra descritte.

Nella terza serie di esperimenti, sono stati saggiati gli effetti degli antagonisti purinergici in studio sulle risposte motorie colinergiche. A tal

fine, preparati colici, mantenuti in soluzione di Krebs addizionata con guanetidina e antagonisti per i recettori delle tachichinine, sono stati pre-incubati con N^ω-propil-L-arginina (NPA, 0,01 μM) inibitore selettivo dell'ossido nitrico sintetasi neuronale (nNOS), allo scopo di inibire risposte atropino-insensibili. I preparati in esame, incubati contestualmente con NPA e antagonisti purinergici, sono stati sottoposti a stimolazione elettrica di tipo SETs.

In una quarta serie di esperimenti, gli effetti di DPCPX, ZM 241385 e MRS 1706 sono stati saggiati su risposte contrattili indotte da stimolazione colinergica estrinseca dei recettori muscarinici presenti sulla muscolatura liscia. In questo caso i preparati sono stati mantenuti in una soluzione di Krebs contenente tetrodotossina (1 μM) e sono stati stimolati due volte con carbacolo (agonista muscarinico, 1 μM). La prima stimolazione è stata eseguita in assenza di altri farmaci, mentre la seconda è stata condotta dopo pre-incubazione per 20 minuti con i farmaci in studio, come precedentemente descritto.

Un'ulteriore serie di esperimenti è stata condotta su preparati colici mantenuti in soluzione di Krebs contenente dipiridamolo (inibitore dei trasportatori dell'adenosina, 0.5 μM) e adenosina deaminasi (0.5 U/ml) al fine di abbattere i livelli di adenosina endogena. In queste condizioni, sono stati saggiati gli effetti di CCPA (agonista del recettore A₁; 0.001-100

μM), CGS 21680 (agonista del recettore A_{2A} ; 0.001-100 μM), NECA (agonista purinergico; 0.001-100 μM) su contrazioni indotte da SETr (in presenza di antagonisti per i recettori delle tachichinine, NPA e guanetidina) o evocate da stimolazione con carbacolo in presenza di tetrodotossina. Gli effetti degli agonisti purinergici sono stati successivamente valutati in presenza dei rispettivi antagonisti recettoriali.

La potenza degli agonisti purinergici è espressa come EC_{50} (concentrazione dell'agonista che provoca il 50% della risposta massimale). È stato valutato inoltre l'effetto massimale degli agonisti (E_{max}). La potenza degli antagonisti è espressa come valori di K_d , ottenuti dalla seguente equazione:

$$K_d = [B]/(DR-1)$$

dove B rappresenta la concentrazione molare dell'antagonista e DR è il rapporto tra EC_{50} dell'agonista in presenza ed in assenza dell'antagonista (Blandizzi et al., 2003).

Analisi RT-PCR dell'espressione dei recettori A_1 , A_{2A} , e A_{2B}

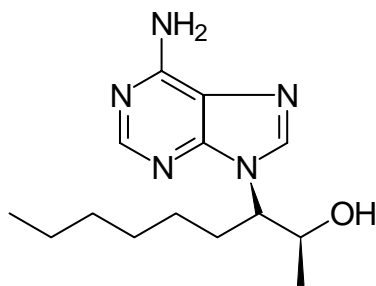
L'RNA totale è stato isolato mediante Trizol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) e cloroformio da tessuti colici sottoposti a rimozione della mucosa e sottomucosa. L'RNA totale (5 μg) è stato utilizzato per la sintesi del cDNA in una reazione di trascrizione inversa

(RT) condotta utilizzando 2 μ l di oligonucleotidi esamerici randomizzati (0.5 μ g/ μ l) con 200 U di *Moloney murine leukaemia virus* (MMLV)-trascrittasi inversa in tampone contenente 500 μ M di desossinucleotidi trifosfati (dNTP) e 10 mM di ditiotreitolo. La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando *primer* specifici per i geni che codificano per i recettori A₁, A_{2A} e A_{2B} nel ratto, secondo le condizioni descritte da Kadowaki et al. (2000), Jackson et al. (2002) e Ralevic e Burnstock (1998), rispettivamente. La PCR, costituita da 2 μ l dei prodotti di RT, 2,5 U di Taq polimerasi, 100 μ M di dNTP e 0,5 μ M di ciascun primer, è stata condotta per mezzo di un *thermocycler* PCR-Express (Hybaid, Ashford, U.K). RNA non trascritto è stato incluso nella reazione per verificare l'assenza di DNA genomico. L'efficienza della reazione di RT-PCR è stata controllata attraverso l'impiego di primer specifici per la β -actina di ratto. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% e marcati con bromuro di etidio. Le bande di cDNA sono state visualizzate con luce UV, quantificate attraverso analisi densitometrica (programma Kodak Image Station program; Eastman Kodak, Rochester, NY, U.S.A.), e normalizzate rispetto a quelle di β -actina.

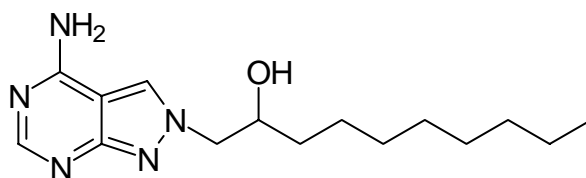
A.2) Studi sull'attività anti-infiammatoria di APP

Caratteristiche strutturali di APP

Il nuovo inibitore dell'adenosina deaminasi APP, sintetizzato presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche della Facoltà di Farmacia, Università di Pisa (Prof. Federico Da Settimo), presenta una struttura simile a EHNA, in cui l'anello purinico è stato sostituito da un nucleo pirimidinico.



EHNA



APP

Saggio enzimatico in vitro

L'attività dell'adenosina deaminasi è stata determinata attraverso un'analisi spettrofotometrica, valutando ad intervalli regolari (2 min) le variazioni dell'assorbanza a 262 nm, di una soluzione contenente adenosina 50 μM , tampone fosfato 50 mM (pH=7,2) e 500 μl di adenosina deaminasi. L'attività inibitrice di EHNA e APP è stata saggiata aggiungendo 100 μl dei due inibitori, disciolti in acqua, alla soluzione descritta precedentemente. Come bianco è utilizzata la soluzione descritta

precedentemente senza l'aggiunta di adenosina. La concentrazione dell'inibitore è stata valutata in triplicato e il calcolo dell'IC₅₀ è stato effettuato attraverso l'analisi di regressione lineare delle curva dose-risposta ottenute per i due inibitori dell'adenosina deaminasi. I valori di K_i sono stati calcolati attraverso i valori di IC₅₀ utilizzando l'equazione di Cheng e Prusoff.

Induzione e valutazione della colite sperimentale

Gli animali sono stati sottoposti ad induzione di colite sperimentale mediante somministrazione di DNBS, 15 mg/ratto disciolto in etanolo al 50% v/v secondo il protocollo descritto da Barbara *et al.* (2000), con alcune modifiche. Le procedure sperimentali per l'induzione di colite e la successiva valutazione macroscopica e microscopica sono state eseguite secondo i criteri sopra descritti.

Disegno sperimentale

Gli animali sono stati trattati per via intraperitoneale a partire dal giorno precedente l'induzione della colite, con i seguenti farmaci: EHNA (90 µmoli/kg), APP (15 µmoli/kg), o desametasone (0,25 µmoli/kg). I farmaci in esame sono stati disciolti in DMSO sterile e le successive diluizioni sono state effettuate in soluzione salina sterile. Gli animali

trattati con DNBS (gruppo DNBS) o con il suo veicolo (gruppo di controllo) sono stati trattati con soluzione salina sterile.

Le dosi di APP ed EHNA sono state scelte sulla base di esperimenti preliminari, effettuati con lo scopo di verificare gli effetti di dosi crescenti di questi farmaci (APP, 5-45 $\mu\text{mol/kg}$; EHNA, 10-90 $\mu\text{mol/kg}$) su indici macroscopici di infiammazione (consumo di cibo, variazioni ponderali, peso della milza, danno tissutale macroscopico), al fine di scegliere dosi equiattive del farmaco di riferimento (EHNA) e del nuovo inibitore di adenosina deaminasi (APP). Il consumo di cibo e le variazioni di peso corporeo sono stati monitorati giornalmente a partire dal primo giorno di trattamento con i diversi farmaci. La dose di desametasone, farmaco antiinfiammatorio di riferimento, è stata scelta sulla base di precedenti studi (Nakase et al., 2001).

Valutazione dei livelli tissutali di mieloperossidasi

I livelli tissutali di mieloperossidasi (MPO), indice del grado di infiltrazione da polimorfonucleati, sono stati valutati secondo la metodica descritta da Pacheco et al. (2000). Campioni di tessuto colico (300 mg) sono stati omogenati ad una temperatura costante di 4°C per mezzo di un omogenizzatore polytron (Cole Parmer Homogenizer, Vernon Hills, IL,

USA), previa aggiunta di 1 ml di tampone fosfato (50 mMol/L, pH 6.0), contenente 0.5% di esadecil trimetilammonio bromuro con lo scopo di bloccare l'attività pseudoperossidasi dell'emoglobina. Il campione omogenato è stato sottoposto a sonicazione per 10 secondi, e successivamente a tre cicli di congelamento e scongelamento, prima della centrifugazione a 18,000 g per 20 minuti. Il sovrantante ottenuto è stato poi utilizzato per la valutazione dei livelli di MPO per mezzo di un kit per dosaggio immunoenzimatico (Bioxytech, Oxis International Inc., Portland, OR, USA). I risultati sono stati espressi come ng di MPO per 100 mg di tessuto.

Valutazione dei livelli tissutali di malondialdeide

La concentrazione tissutale di malondialdeide (MDA), indice di perossidazione lipidica delle membrane cellulari, è stata valutata secondo la metodica sperimentale descritta da Fornai et al. (2005). Campioni di tessuto colico sono stati pesati ed omogenizzati in presenza di tampone (Tris-HCl 20 mMol/L, pH 7.4; 1 ml/100 mg di tessuto), per mezzo di un omogenizzatore polytron. I campioni ottenuti sono stati centrifugati per a 1500 g per 10 minuti a 4°C. I livelli tissutali di MDA sono stati valutati nel sovrantante per mezzo di un kit per dosaggio colorimetrico (Calbiochem-

Novabiochem Corporativo, San Diego, CA, USA). I risultati sono stati espressi come μmoli di MDA per mg di tessuto colico.

Valutazione delle concentrazioni tissutali e plasmatiche di citochine

Al momento del sacrificio, il plasma è stato prelevato e utilizzato per la determinazione dei livelli di TNF- α e IL-6 per mezzo di kit per dosaggi immunoenzimatici (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). I risultati ottenuti sono stati espressi in pg/ml. Parallelamente sono stati valutati i livelli tissutali di TNF- α utilizzando una metodica immunoenzimatica (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Per questo scopo, come descritto precedentemente da Marquez et al. (2006), campioni di tessuto, pesati e omogenizzati in presenza di tampone fosfato (PBS, pH 7.2) 300 μl /100 mg di tessuto, sono stati centrifugati a 13400 g per 20 minuti. Aliquote di 100 μl del sovrantante sono state utilizzate per il dosaggio. I livelli tissutali di TNF- α sono stati espressi in pg per mg di tessuto.

Analisi RT-PCR dell'espressione di cicloossigenasi-1 (COX-1), cicloossigenasi-2 (COX-2) e ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS)

L'RNA totale è stato isolato tramite Trizol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) e cloroformio. Quattro μg di RNA sono stati

utilizzati per la sintesi del cDNA in una reazione condotta utilizzando 2 μ l di oligonucleotidi esamerici randomizzati (0.5 μ g/ μ l) con 200 U di MMLV-trascrittasi inversa in tampone contenente 500 μ M di dNTP e 10 mM di ditiotreitolo. La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando primer specifici, basati sulla sequenza nucleotidica dei geni che codificano per iNOS, COX-1 e COX-2 nel ratto (Viridis et al., 2005; Fornai et al., 2006). La PCR, costituita da 5 μ l dei prodotti di RT, 2,5 U di Taq polimerasi, 100 μ M di dNTP e 0,5 μ M di ciascun primer, è stata condotta per mezzo di un *thermocycler* PCR-Express (Hybaid, Ashford, U.K). Per quanto riguarda iNOS, le condizioni di amplificazione sono state: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C per 30 cicli, seguiti da 7 min a 72°C. Per entrambe le isoforme COX, le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 1 min a 94°C, 2 min a 60°C e 1 min a 72°C per 35 cicli seguiti da 7 min a 72°C. Aliquote di RNA non trascritto sono state incluse nella reazione per verificare l'assenza di DNA genomico. L'efficienza della reazione di RT-PCR è stata controllata attraverso l'impiego di primer specifici per la β -actina di ratto. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,8% e marcati con bromuro di etidio. Le bande di cDNA sono state visualizzate con luce UV, quantificate

attraverso analisi densitometrica e normalizzate rispetto a quelle di β -actina.

B) PROCEDURE SPERIMENTALI SU TESSUTI UMANI

Prelievo e preparazione dei tessuti

Campioni di tessuto colico sono stati prelevati da pazienti sottoposti a resezione chirurgica per patologie neoplastiche. I campioni erano costituiti da porzioni a tutto spessore della parete del colon distale macroscopicamente normale, prelevate a una distanza di almeno 10 cm da lesioni visibili. Particolare attenzione è stata posta all'esame microscopico dei tessuti, allo scopo di verificare l'assenza di processi infiammatori e/o degenerativi. Solo i campioni prelevati entro un'ora dalla laparotomia sono stati utilizzati. La parte rimanente del tessuto è stata posta in soluzione di Krebs ossigenata a 4°C e trasportata in laboratorio. Strisce di muscolatura liscia circolare della lunghezza di circa 20 mm e dello spessore di 3 mm sono state preparate dopo aver rimosso con accuratezza mucosa e sottomucosa.

Misurazione dell'attività contrattile dei preparati di muscolatura liscia

L'attività motoria dei preparati di colon è stata misurata come precedentemente descritto per il ratto.

L'attività contrattile dei preparati colici è stata indotta tramite SETs, o stimolazione muscarinica con carbacolo (1 μM) in presenza di tetrodotossina. Ciascun preparato è stato ripetutamente stimolato per mezzo di SETs e gli esperimenti sono iniziati solo dopo aver ottenuto risposte motorie riproducibili (di solito dopo 2 o 3 stimolazioni).

In una prima serie di esperimenti, i preparati di muscolatura circolare stati pre-incubati con ZM 241385 (0,01 μM) 20 minuti prima della SETs o CGS 21680 (0,1 μM) 12 minuti prima della SETs in presenza di dipiridamolo e adenosina deaminasi.

La seconda serie di esperimenti è stata condotta, allo scopo di valutare gli effetti di ZM 241385 sulle risposte motorie alla stimolazione elettrica, diretta in modo selettivo sull'innervazione colinergica e nitrergica. A tale scopo, i preparati sono stati mantenuti, come già descritto per i tessuti di ratto, in una soluzione di Krebs contenente guanetidina, L-732,138, GR-159897 e SB-218795 in modo da inibire le risposte motorie ai mediatori adrenergici e tachichininergici. L'incubazione dei preparati con l'antagonista A_{2A} prima della stimolazione elettrica è avvenuta con le modalità precedentemente descritte.

Nella terza serie di esperimenti, sono stati saggiati gli effetti di ZM 241385 sulle risposte motorie colinergiche. A tal fine, preparati colici, mantenuti in soluzione di Krebs addizionata con guanetidina e antagonisti

per i recettori delle tachichinine, sono stati pre-incubati con N^o-nitro-L-arginina metilestere (L-NAME, inibitore di NO sintetasi, 100 µM), ottenendo risposte contrattili completamente sensibili all'atropina. I preparati in esame incubati contemporaneamente con L-NAME e ZM 241385 sono stati sottoposti a stimolazione elettrica tramite SETs.

In una quarta serie di esperimenti sono stati saggiati gli effetti di ZM 241385 sull'attività motoria indotta da SETs in preparati colici mantenuti in soluzione di Krebs addizionata con guanetidina e antagonisti per i recettori delle tachichinine, e preincubati con atropina. In queste condizioni sperimentali la stimolazione elettrica induce un risposta rilasciante sensibile al trattamento con L-NAME.

Nell'ultima serie di esperimenti, sono stati saggiati gli effetti di ZM 241385 e CGS 21680 sulle risposte motorie indotte da stimolazione colinergica diretta della muscolatura liscia. In questo caso i preparati sono stati mantenuti in una soluzione di Krebs contenente tetrodotossina e stimolati due volte con carbacolo. La prima stimolazione è stata effettuata in assenza di altri farmaci, mentre la seconda è stata condotta dopo pre-incubazione per 20 minuti con i farmaci in studio, come precedentemente descritto.

FARMACI

Sono stati utilizzati i seguenti farmaci: atropina solfato, N^onitro-L-arginina metilestere (L-NAME), L-arginina, esametonio, guanetidina monosolfato, carbacolo cloruro, dipiridamolo, acido 2,4-dinitrobenzensolfonico, desametasone, esadeciltrimetilammonio bromuro e adenosina deaminasi (Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, USA); tetrodotossina, DPCPX, ZM 241385, MRS 1706, CCPA, CGS 21680, NECA, L-732,138, GR-159897, SB-218795, EHNA e N-propil L-arginina (NPA) (Tocris, Balwin, MO, USA).

La sintesi di APP è stata eseguita come riportato da Da Settimo et al. (2005).

ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati espressi come valore percentuale rispetto ai valori di controllo \pm errore standard della media (E.S.M.). La significatività tra le differenze è stata valutata attraverso l'analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test di Student-Newman-Keuls, e valori di $P < 0.05$ sono stati considerati significativi. I preparati di colon inclusi in ciascun gruppo sperimentale sono stati ottenuti da pazienti o animali distinti e quindi il numero di esperimenti si riferisce anche al numero di pazienti o di animali assegnati a ciascun gruppo sperimentale. L'elaborazione

informatica dei risultati è stata eseguita tramite software commerciale (GraphPad Prism™, versione 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, U.S.A.).

RISULTATI

STUDI *IN VITRO* SULLA MOTILITA' COLICA NEL RATTO

Valutazione macroscopica e microscopica della colite

Al sesto giorno dal trattamento con DNBS, la parete del colon distale risultava ispessita ed ulcerata, con aree evidenti di infiammazione transmurale. Le aderenze erano presenti in molti casi e il colon appariva occasionalmente dilatato all'esame istologico. La colite era caratterizzata da un'intensa infiltrazione di granulociti che si estendeva attraverso la mucosa e la sottomucosa, interessando spesso lo strato muscolare che appariva ispessito. Negli animali trattati con DNBS si osservava un incremento superiore a 5 volte del punteggio macroscopico e microscopico, rispetto a quanto osservato negli animali di controllo. I valori medi del punteggio macroscopico e microscopico sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Valori di punteggio macroscopico e microscopico ottenuti dopo 6 giorni dall'induzione di colite con DNBS. Ciascun valore rappresenta la media di 6 esperimenti \pm E.S.M. Significatività della differenza verso i rispettivi valori ottenuti negli animali di controllo: * $p < 0,05$.

	Controlli	DNBS
Danno macroscopico	1,43\pm0,41	12,7\pm1,8*
Danno microscopico	1,67\pm0,35	9,1\pm1,1*

Analisi RT-PCR

L'analisi RT-PCR ha messo in evidenza l'espressione dei recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} nel comparto neuromuscolare colico (figura 1A, B e C). L'analisi densitometrica delle bande di cDNA non ha evidenziato cambiamenti apprezzabili nell'espressione dei recettori A_1 e A_{2B} nei tessuti esaminati (Figura 1D e F). Per contro, è stato osservato un incremento significativo dell'espressione dei recettori A_{2A} nei tessuti prelevati da animali con colite (Figura 1E).

Effetti degli antagonisti dei recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} sull'attività contrattile

Durante la fase di stabilizzazione, i preparati di colon, ottenuti da animali di controllo o sottoposti a induzione di colite sperimentale, hanno sviluppato un'attività motoria spontanea di modesta entità, caratterizzata da un andamento stabile nel corso dell'esperimento. Le risposte motorie indotte da SETs erano caratterizzate da contrazioni fasiche, seguite da post-contrazioni di ampiezza variabile. Il trattamento con atropina (1 μ M) ha determinato la comparsa di rilassamenti, seguiti da post-contrazioni, mentre la pre-incubazione con tetrodotossina (1 μ M) ha causato la quasi completa abolizione delle risposte motorie alla stimolazione elettrica (non mostrato). Le contrazioni evocate dal trattamento con carbacolo (1 μ M) in presenza di tetrodotossina sono state abolite dall'atropina, confermando

che tali risposte motorie sono dovute all'attivazione di recettori muscarinici muscolari.

In preparati di controllo, il trattamento con DPCPX (0,01 μ M), ZM 241385 (0,01 μ M) e MRS 1706 (0,01 μ M) ha indotto un significativo incremento significativo della risposta contrattile evocata da SETs (+32,6 \pm 4,7%, +20,1 \pm 3,9% e +31,3 \pm 5,2%, rispettivamente) (Figura 2A e 3A). In tessuti colici prelevati da ratti con colite, solo il trattamento con ZM 241385 ha indotto un incremento significativo della risposta contrattile (+47,6 \pm 5,6%), mentre DPCPX o MRS 1706 non hanno causato effetti significativi (+10,7 \pm 4,8% e +18,1 \pm 4,5%) (Figura 2B e 3B).

Esperimenti successivi sono stati condotti su preparati di colon mantenuti in soluzione di Krebs contenente guanetidina e antagonisti dei recettori per le tachichinine. Il trattamento con atropina (1 μ M) ha determinato la comparsa di risposte rilassanti, sensibili all'incubazione con NPA (0,1 μ M). In presenza di queste condizioni sperimentali, gli effetti potenzianti degli antagonisti dei recettori dell'adenosina sulle risposte contrattili indotte da SETs precedentemente osservati, non hanno subito modificazioni apprezzabili sia nei tessuti normali che nei tessuti infiammati (non mostrato).

La successiva incubazione con NPA ha indotto un incremento significativo della risposta alla SETs sia nei preparati normali ($+25,5\pm 5,2\%$) che nei tessuti prelevati da animali con colite ($+34,6\pm 4,8\%$) (Figura 4A e B). Queste risposte sono state abolite o notevolmente ridotte dal pre-trattamento con atropina ($1\ \mu\text{M}$) e sono risultate sensibili alla tetrodotossina ($1\ \mu\text{M}$). In presenza di NPA, il trattamento dei preparati di controllo o infiammati con DPCPX ($0,01\ \mu\text{M}$) o MRS 1706 ($0,01\ \mu\text{M}$) ha potenziato significativamente le risposte contrattili colinergiche alla SETs, mentre il trattamento con ZM 241385 non ha determinato alcuna modificazione dell'attività contrattile colica in entrambi i tipi di tessuti esaminati (Figura 4A e B).

Il trattamento con carbacolo ($1\ \mu\text{M}$) dei preparati di colon ottenuti da animali di controllo o infiammati, ha evocato risposte contrattili atropino-sensibili. In questo caso, il pre-trattamento con DPCPX ($0,01\ \mu\text{M}$) o con ZM 241385 ($0,01\ \mu\text{M}$) non ha prodotto alcuna variazione delle risposte contrattili indotte da carbacolo, mentre MRS 1706 ha indotto un potenziamento significativo di tali risposte in entrambi i tipi di tessuti esaminati (Figura 5).

Effetti degli agonisti dei recettori A₁, A_{2A} e A_{2B} sull'attività contrattile

Una serie di esperimenti è stata condotta su preparati di colon mantenuti in soluzione di Krebs contenente dipiridamolo (0.5 μ M) e adenosina deaminasi (0.5 U/ml) al fine di abbassare i livelli extracellulari di adenosina endogena, e addizionata con antagonisti per i recettori delle tachichinine, NPA e guanetidina. In presenza di queste condizioni, il trattamento con CCPA (0.001-100 μ M) ha causato una riduzione concentrazione-dipendente dell'attività contrattile evocata da SETr in entrambi i tipi di tessuto esaminati, con un profilo di potenza ed efficacia paragonabile (preparati di controllo: EC₅₀=124 nM, E_{max}=-74,3%; preparati di colon infiammato: EC₅₀=131 nM, E_{max}=-67,7%). In entrambi i tipi di preparati l'effetto rilassante indotto da CCPA è stato antagonizzato dal pre-trattamento con DPCPX (K_d=3,8 nM nei preparati di controllo e K_d=3,6 nM nei preparati ottenuti da ratti con colite) (Figura 6A e B), ma non dalla pre-incubazione con ZM 241385 o MRS 1706 (non mostrato).

Nelle condizioni sopra descritte sono stati saggiati inoltre gli effetti di CGS 21680 (0,001-100 μ M). Il trattamento con concentrazioni crescenti di questo agonista del recettore A_{2A} non ha determinato modificazioni significative delle risposte evocate da SETr in entrambi i tipi di preparati esaminati (non mostrato).

Successivamente sono stati saggiati gli effetti di CGS 21680 (0,001-100 μ M) in tessuti mantenuti nelle condizioni sopra descritte, ma in assenza di NPA, al fine di preservare il funzionamento del sistema nitrergico. In presenza di queste condizioni l'agonista del recettore A_{2A} ha causato una riduzione concentrazione-dipendente dell'attività contrattile indotta da SETr in preparati normali di colon ($EC_{50}= 20$ nM, $E_{max}= -27\%$), ma soprattutto in tessuti infiammati ($EC_{50}= 16$ nM, $E_{max}= -58\%$) (Figura 7A e B). Questi effetti sono stati antagonizzati da ZM 241385 (Figura 7A e B).

Sono stati valutati anche gli effetti di NECA (0,001-100 μ M) su preparati di colon mantenuti in soluzione di Krebs contenente dipiridamolo e adenosina deaminasi. In queste condizioni, il trattamento con NECA ha prodotto una riduzione della risposta contrattile evocata da carbacolo (100 μ M) in presenza di tetrodotossina, con un profilo di potenza ed efficacia paragonabile nei tessuti esaminati (preparati di controllo: $EC_{50}=17$ μ M, $E_{max}=-77,2\%$; preparati di colon infiammato: $EC_{50}=16$ μ M, $E_{max}=-74,3\%$) (Figura 8A e B). In entrambi i tipi di preparati l'effetto rilassante indotto da NECA è stato antagonizzato da MRS 1706 0,01 μ M (Figura 8A e B), ma non da DPCPX o ZM 241385 (non mostrato).

Il trattamento con NECA 0,5 μ M ha ridotto significativamente le risposte contrattili evocate da carbacolo (1 μ M) in presenza di tetrodotossina in tessuti normali e infiammati ($-30\pm 4,5\%$ e $-34,2\pm 5,2\%$, rispettivamente). Per contro l'incubazione sia con CCPA che con CGS 21680 non ha causato modificazioni significative dell'attività contrattile (Figura 9).

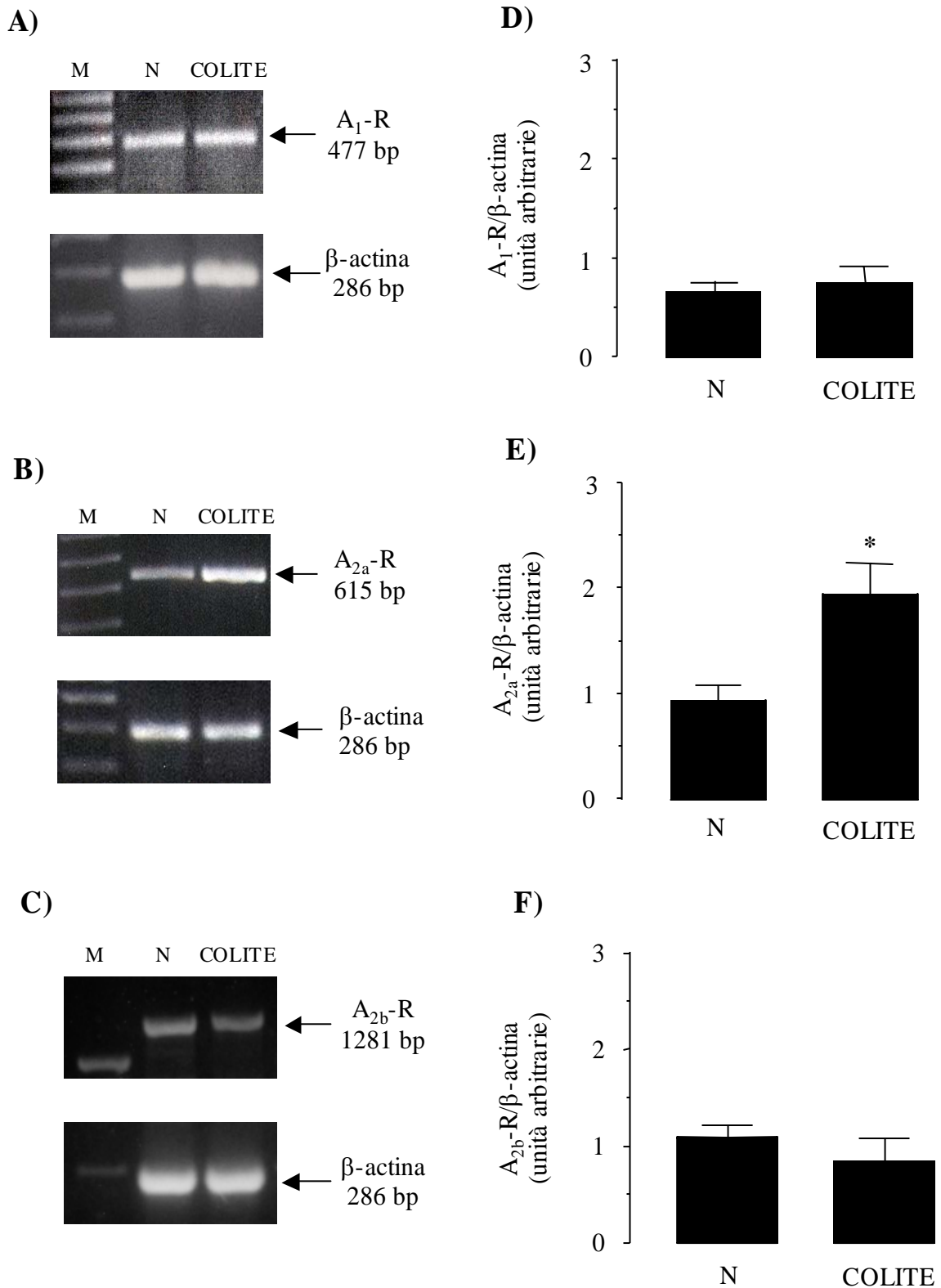
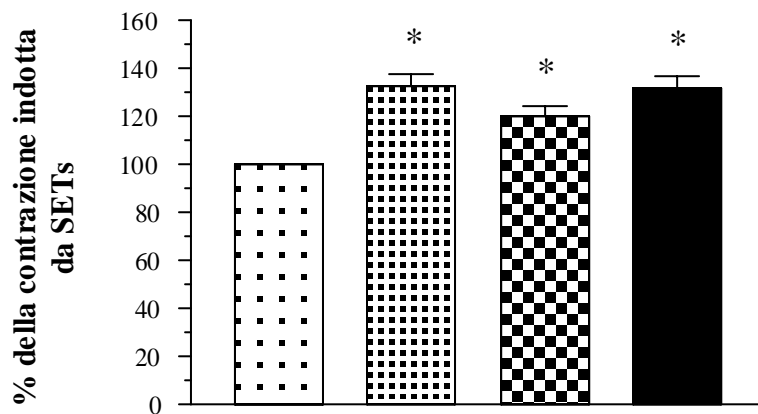


Figura 1. Analisi RT-PCR dell'espressione dei recettori A₁, A_{2A}, A_{2B} e β-actina nello strato muscolare longitudinale di colon isolato da ratti di controllo o da animali con colite indotta da DNBS. I pannelli A, B, e C mostrano tre gel di agarosio relativi all'amplificazione del cDNA dei recettori A₁, A_{2A}, A_{2B} e β-actina. I pannelli D, E e F mostrano istogrammi relativi all'analisi densitometrica dell'espressione dei recettori, normalizzata rispetto all'espressione di β-actina. Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 5 esperimenti ± E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: *p < 0,05.

Controllo
 ZM 241385 0.01 μ M
 DPCPX 0.01 μ M
 MRS 1706 0.01 μ M

A) NORMALE



B) COLITE

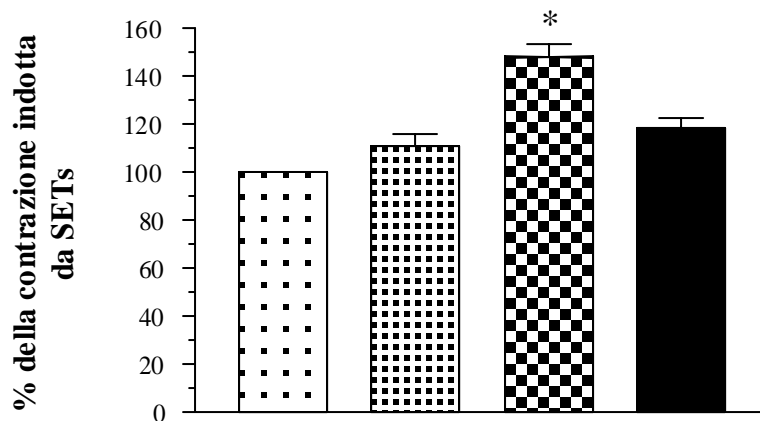


Figura 2. Colon distale isolato da ratti normali (A) o con colite indotta da DNBS (B). Effetti di DPCPX 0,01 μ M, ZM 241385 0,01 μ M e MRS 1706 0,01 μ M sulle risposte contrattili indotte da SETs, in preparati incubati in soluzione di Krebs standard. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio di 7-8 esperimenti \pm E.S.M. * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo

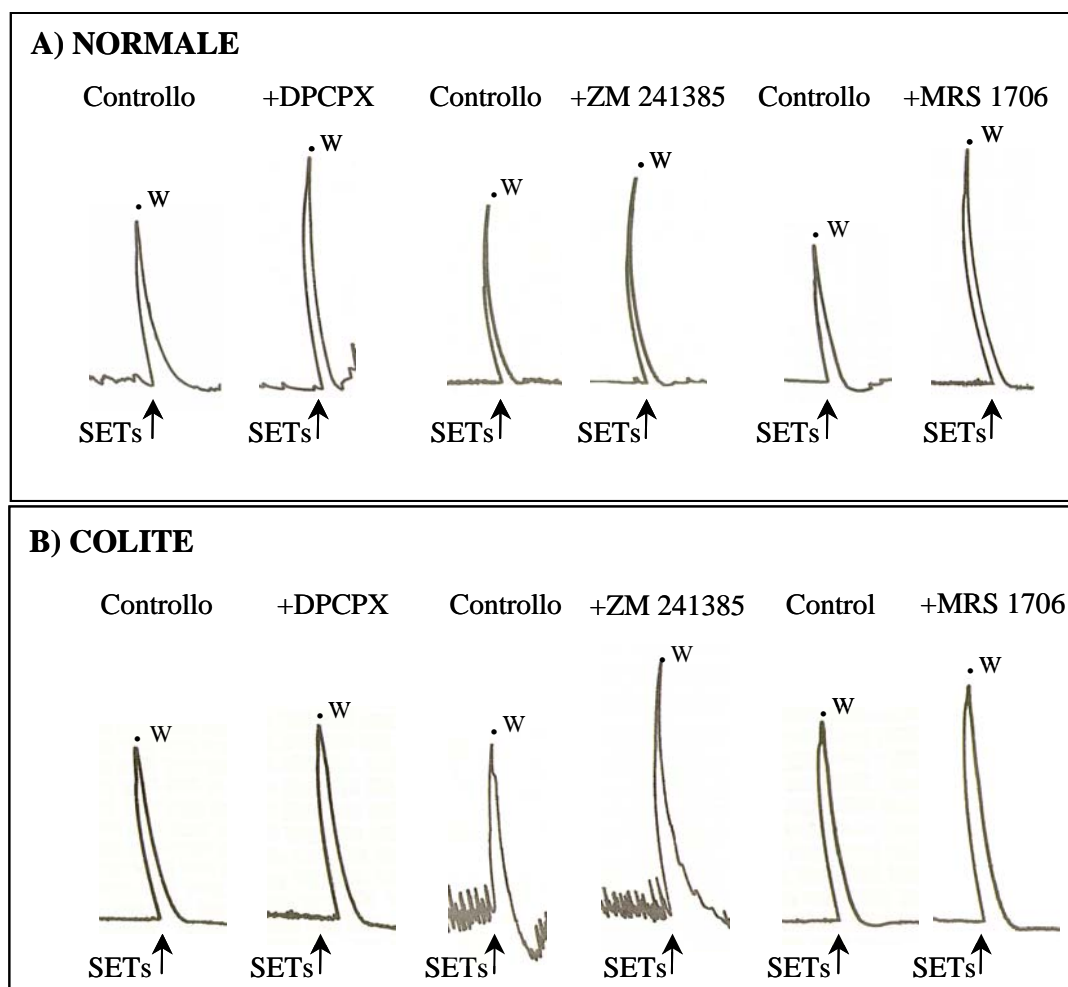
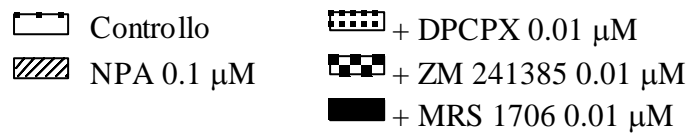
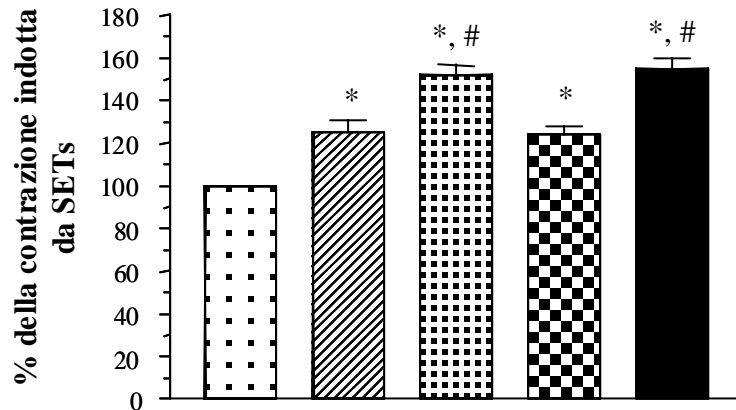


Figura 3. Colon distale di ratto. Tracciati rappresentativi delle risposte motorie indotte da SETs in preparati di muscolatura longitudinale ottenuti da ratti normali (pannello A) o colite indotta da DNBS (pannello B), in assenza di farmaci (controllo) o in presenza di DPCPX 0,01 μ M, ZM 241385 0,01 μ M e MRS 1706 0,01 μ M. W=lavaggio



A) NORMALE



B) COLITE

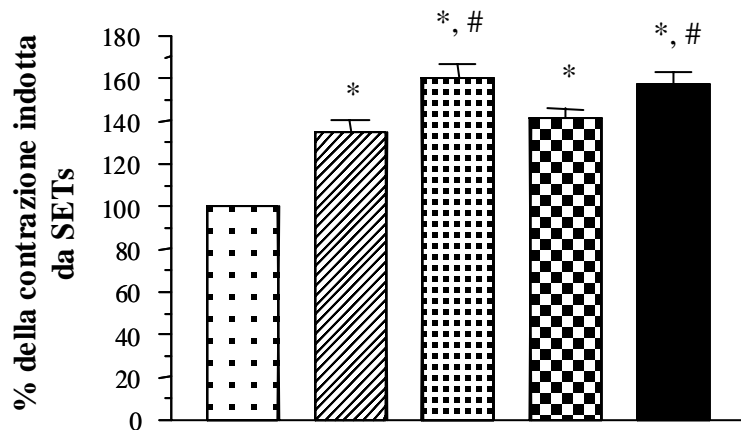


Figura 4. Colon distale isolato da ratti normali (A) o con colite indotta da DNBS (B). Effetti di NPA 0,1 μM sulle risposte contrattili indotte da SETs in assenza o in presenza di DPCPX 0,01 μM, ZM 241385 0,01 μM e MRS 1706 0,01 μM, in preparati incubati in soluzione di Krebs addizionata con guanetidina, L-732,138, GR-159897 e SB-218795. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio di 7-8 esperimenti±E.S.M. *p<0,05: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo. #p<0,05: significatività delle differenze rispetto al trattamento con NPA.

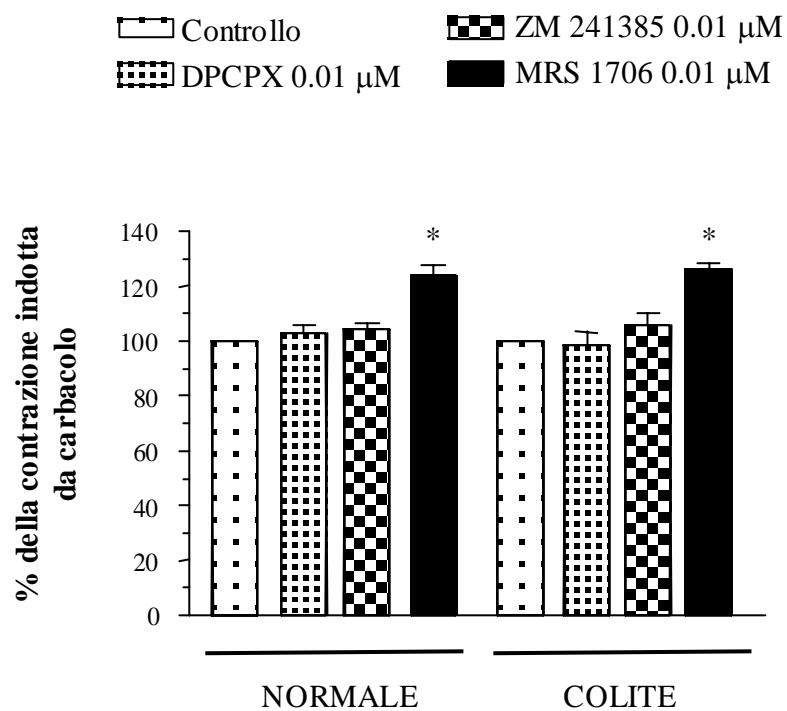
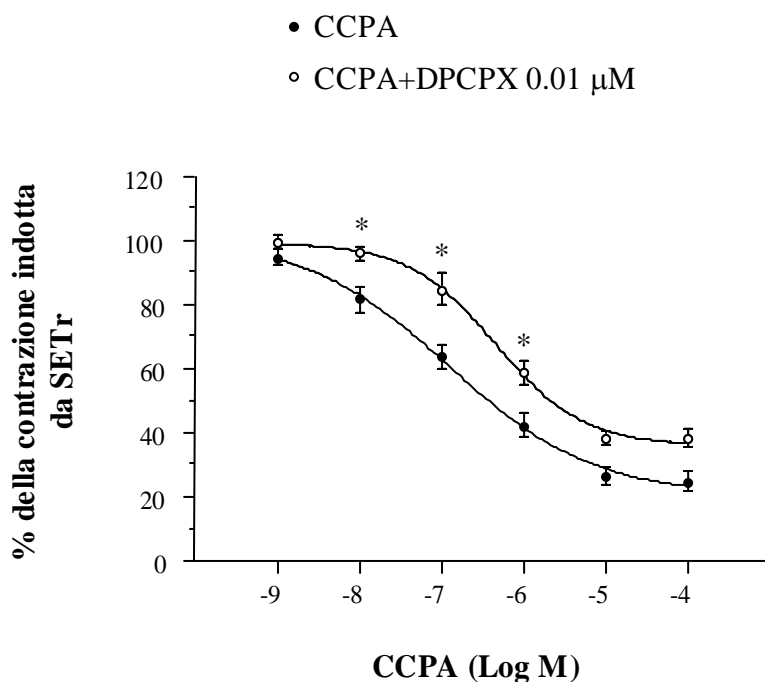


Figura 5. Colon distale isolato da ratti normali o con colite indotta da DNBS. Effetti di DPCPX 0,01 μ M, ZM 241385 0,01 μ M e MRS 1706 0,01 μ M sulle risposte contrattili indotte da carbacolo (1 μ M) in presenza di tetrodotossina (1 μ M). Ciascun istogramma rappresenta il valore medio di 6-8 esperimenti \pm E.S.M. * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo

A) NORMALE



B) COLITE

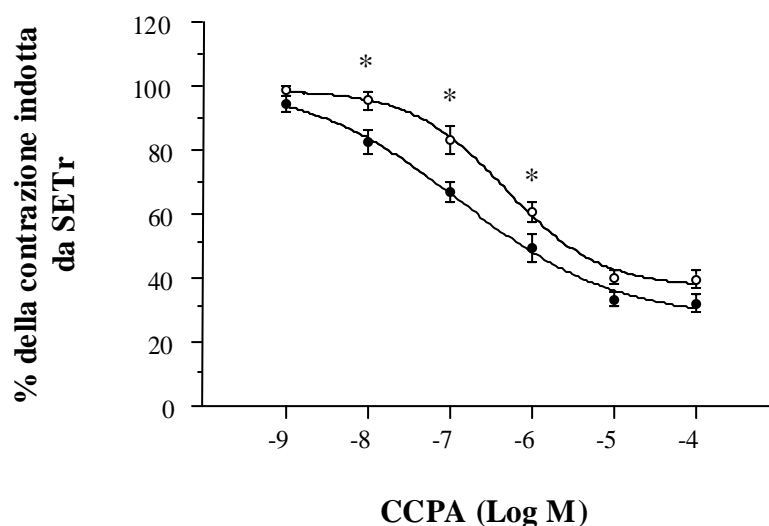
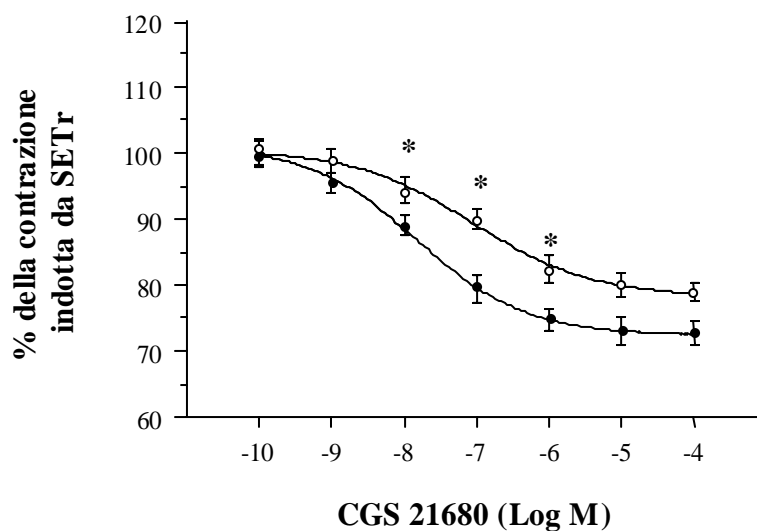


Figura 6. Colon distale isolato da ratti normali (A) o con colite indotta da DNBS (B). Effetti di CCPA (0.001-100 μ M), in assenza e in presenza di DPCPX 0,01 μ M, sulle risposte contrattili indotte da SETr, in preparati incubati in soluzione di Krebs addizionata con dipiridamolo, adenosina deaminasi, guanetidina, NPA, L-732,138, GR-159897 e SB-218795. Ciascun punto rappresenta il valore medio di 7-8 esperimenti \pm E.S.M. * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al trattamento con CCPA da solo.

A) NORMALE

• CGS 21680

◦ CGS 21680+ZM 241385 0.01 μ M



B) COLITE

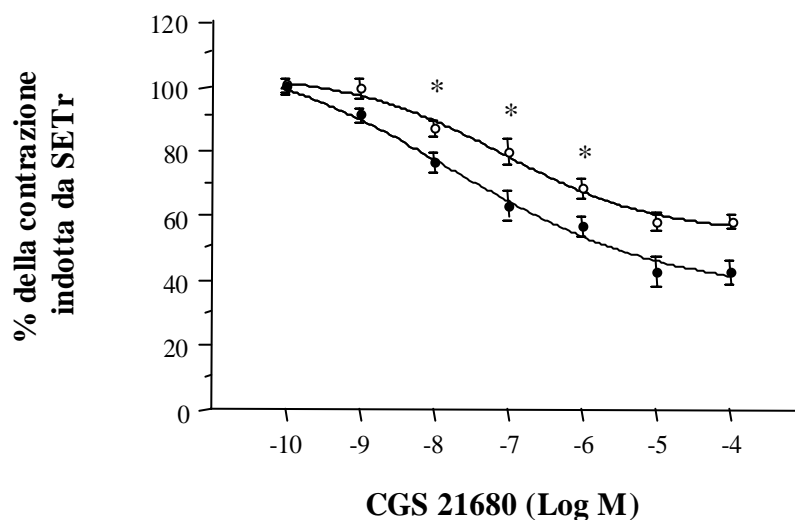
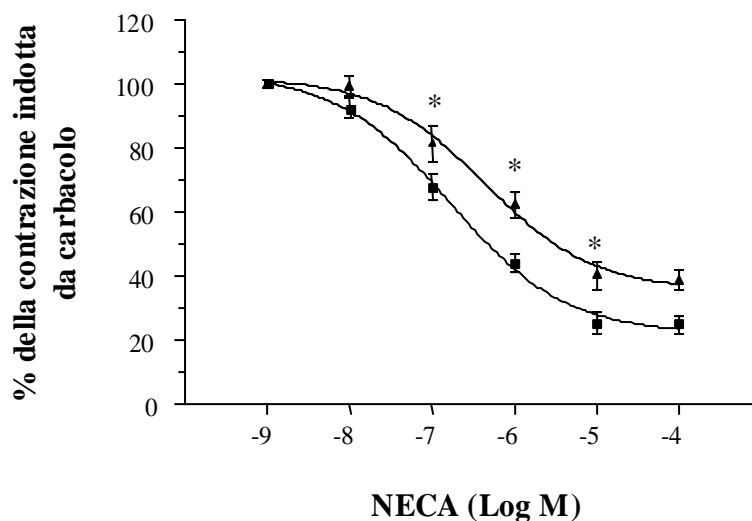


Figura 7. Colon distale isolato da ratti normali (A) o con colite da DNBS (B). Effetti di CGS 21680 (0.001-100 μ M), in assenza e in presenza di ZM 241385 0,01 μ M, sulle risposte contrattili indotte da SETr in preparati incubati in soluzione di Krebs addizionata con dipiridamolo, adenosina deaminasi, guanetidina, L-732,138, GR-159897 e SB-218795. Ciascun punto rappresenta il valore medio di 6-8 esperimenti \pm E.S.M. * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al trattamento con CGS 21680 da solo.

A) NORMALE

- NECA
- ▲ NECA+MRS 1706 0.01 μ M



B) COLITE

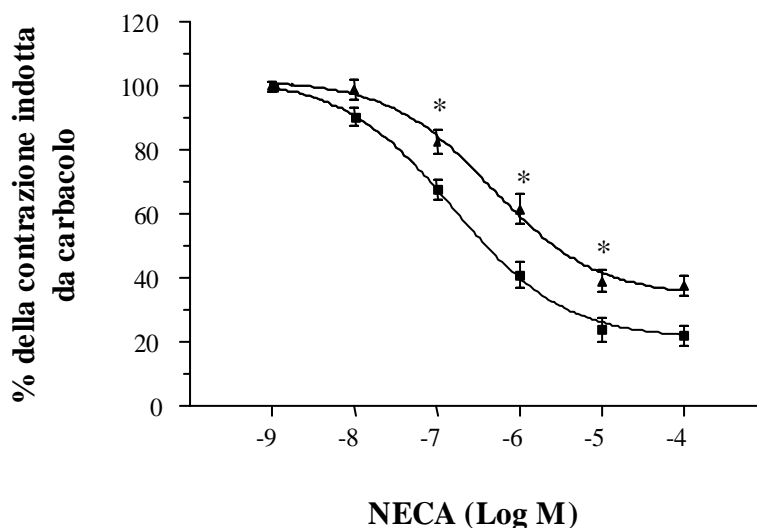


Figura 8. Colon distale isolato da ratti normali (A) o con colite indotta da DNBS (B). Effetti di NECA (0.001-100 μ M), in assenza e in presenza di MRS 1706 0,01 μ M, sulle risposte contrattili indotte da carbacholo (100 μ M) in presenza di tetrodotossina, in preparati incubati in soluzione di Krebs addizionata con dipiridamolo e adenosina deaminasi. Ciascun punto rappresenta il valore medio di 6 esperimenti \pm E.S.M. * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al trattamento con NECA da solo.

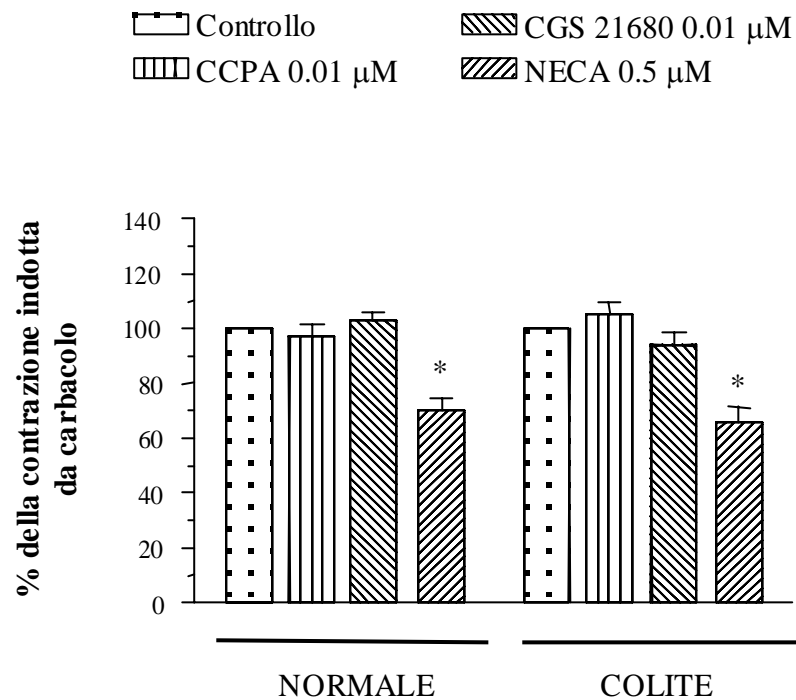


Figura 9. Colon distale isolato da ratti normali o con colite indotta da DNBS. Effetti di CCPA, CGS 21680 e NECA sulle risposte contrattili indotte da carbacolo ($1 \mu\text{M}$) in presenza di tetrodotossina, in preparati incubati in soluzione di Krebs addizionata con dipiridamolo e adenosina deaminasi. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio di 6-8 esperimenti \pm E.S.M. * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo

STUDI *IN VITRO* SULLA MOTILITA' COLICA NELL'UOMO

Durante il periodo di riposo, la maggior parte dei preparati di colon ha sviluppato un'attività contrattile spontanea, caratterizzata da ampiezza modesta e generalmente stabile nel corso dell'esperimento. Le risposte motorie evocate da SETs erano costituite da contrazioni fasiche seguite, in molti casi, da contrazioni di ampiezza variabile che si manifestavano alla fine del periodo di stimolazione (post-contrazione). Il trattamento con atropina (1 μ M) ha determinato l'abolizione delle contrazioni fasiche o ha provocato la comparsa di rilassamenti, e ha favorito la comparsa di post-contrazioni. La pre-incubazione dei preparati con tetrodotossina (1 μ M) ha causato l'inibizione, quasi completa, delle risposte motorie evocate dalla stimolazione elettrica.

Il trattamento con ZM 241385 (0,01 μ M) ha determinato un potenziamento significativo della risposta contrattile indotta da SETs (+56,2 \pm 9,4%), mentre l'incubazione con CGS 21680 (0,1 μ M) ha provocato una riduzione significativa della contrazione evocata da SETs (-46,2 \pm 8,2%) (Figura 17).

In presenza di guanetidina e antagonisti dei recettori per le tachichinine, la SETs ha evocato contrazioni fasiche dei preparati colici. Il trattamento con atropina 1 μ M ha notevolmente ridotto le risposte contrattili,

provocando un rilassamento nei preparati in esame. Queste contrazioni sono state soppresse dall'incubazione con tetrodotossina (1 μM ; -97%), mentre esametonio (10 μM) non ha prodotto effetti significativi (-6%). In presenza di queste condizioni, ZM 241385 (0,01 μM) ha provocato un potenziamento significativo delle risposte contrattili alla stimolazione elettrica (+51,6 \pm 9,9%).

In esperimenti nei quali i tessuti in esame sono stati mantenuti nelle condizioni sopra descritte, la pre-incubazione con L-NAME 100 μM ha causato un aumento significativo della risposta contrattile (+57,8 \pm 8,7%) (Figura 18). In presenza di L-NAME, il trattamento con ZM 241385 non ha potenziato ulteriormente la risposta evocata da SETs (+16,1 \pm 5,2%) (Figura 18).

In un'altra serie di esperimenti sono stati saggiati gli effetti di ZM 241385 su preparati di colon mantenuti in soluzione di Krebs addizionata con guanetidina, antagonisti per i recettori delle tachichinine e atropina. In presenza di queste condizioni, SETs ha evocato risposte rilassanti, che sono risultate sensibili al trattamento ZM 241385 (-45,8 \pm 4,8%) o L-NAME (-91,1 \pm 4,8%) (Figura 19).

L'esposizione dei preparati di colon a carbacolo (1 μM) ha dato luogo alla comparsa di contrazioni fasiche atropino-sensibili. Queste risposte

motorie non hanno subito modificazioni significative in seguito al trattamento con ZM 241385 (0,01 μ M) o con CGS 21680 (0,1 μ M) in presenza di dipiridamolo e adenosina deaminasi (+9,3 \pm 2,6% e -2,8 \pm 1,1%, rispettivamente).

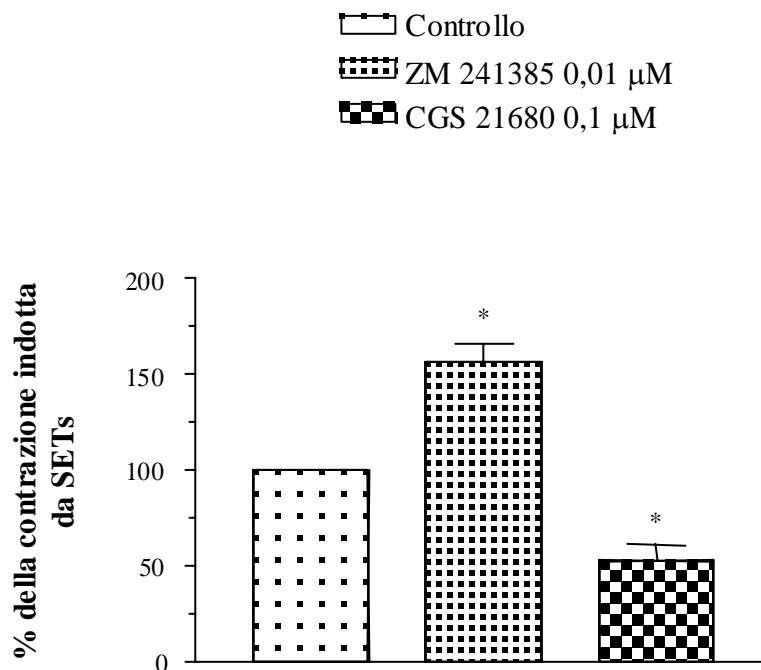


Figura 17. Preparati di muscolatura circolare di colon umano. Effetti di ZM 241385 (0,01 μM) o CGS 21680 (0,1 μM) sulle risposte contrattili indotte da SETs su preparati mantenuti in soluzione di Krebs standard. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio ottenuto da 6-8 esperimenti±E.S.M. *p<0,05: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo.

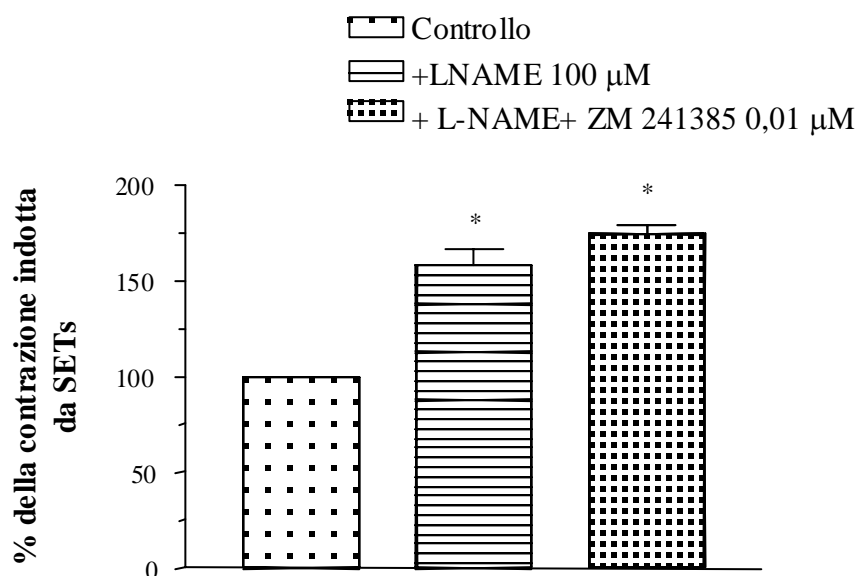


Figura 18. Preparati di muscolatura circolare di colon umano. Effetti di L-NAME (100 μM) e ZM 241385 (0,01 μM) sulle risposte contrattili indotte da SETs su preparati incubati in soluzione di Krebs contenente guanetidina, L-732,138, GR-159897 e SB-218795. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio ottenuto da 6 esperimenti±E.S.M. *p<0,05: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo.

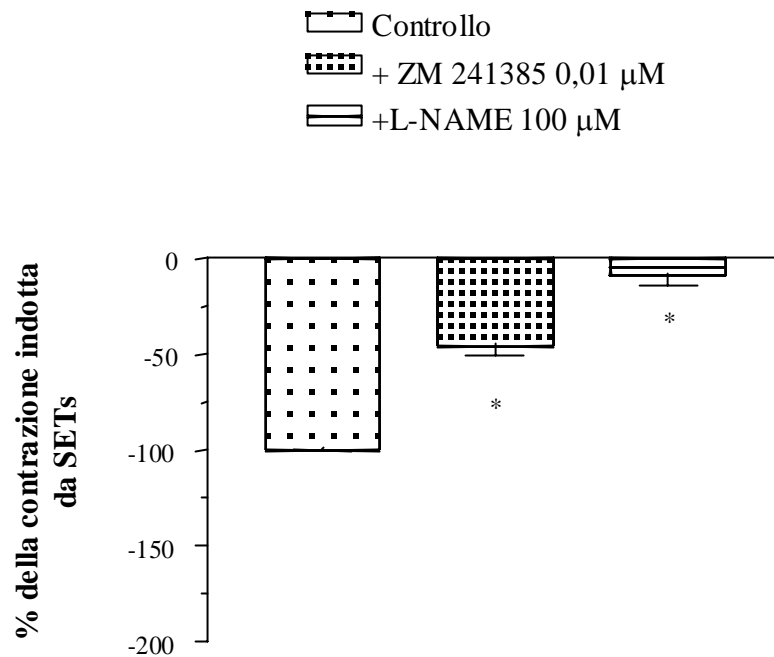
A**B**

Figura 19. Preparati di muscolatura circolare di colon umano. (A) Effetti di ZM 241385 (0,01 μ M) e L-NAME (100 μ M) sulle risposte motorie indotte da SETs su preparati incubati in soluzione di Krebs contenente guanetidina, L-732,138, GR-159897 e SB-218795 e atropina. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio ottenuto da 4-6 esperimenti \pm E.S.M. (linee verticali). * $p < 0,05$: significatività delle differenze rispetto al valore di controllo. (B) Tracciati rappresentativi delle risposte contrattili dei preparati di muscolatura circolare indotte da SETs in presenza di guanetidina, L-732,138, GR-159897, SB-218795 e atropina e incubati con ZM 241385 o L-NAME.

STUDI SULL'ATTIVITÀ ANTI-INFIAMMATORIA DELL'INIBITORE DI ADENOSINA DEAMINASI APP

Saggio in vitro di inibizione dell'adenosina deaminasi

Il saggio di inibizione enzimatica ha dimostrato la capacità di APP di bloccare l'attività dell'adenosina deaminasi con una K_i di $0,28 \pm 0,02$ nM, mentre EHNA è risultato meno potente (K_i $1,14 \pm 0,02$ nM) di APP.

Consumo di cibo, peso corporeo e peso della milza

Al sesto giorno dall'induzione della colite con DNBS è stata osservata una riduzione significativa del consumo di cibo (Figura 10A). Il trattamento con APP o con EHNA, a dosi crescenti, ha fatto registrare un incremento di questo parametro, con un effetto massimale osservato nei ratti trattati rispettivamente con APP a $15 \mu\text{moli/kg}$ e con EHNA a $90 \mu\text{moli/kg}$. In questi animali, la quantità di cibo consumata è risultata paragonabile a quella osservata negli animali di controllo, mentre non è stata osservata alcuna variazione significativa di questo parametro nei ratti trattati con desametasone ($0,25 \mu\text{moli/kg}$) (Figura 10A).

Negli animali infiammati è stata osservata anche una significativa riduzione del peso corporeo (-15 ± 5 g) rispetto ai ratti di controllo, nei quali è stato registrato un fisiologico incremento ponderale ($+37,5 \pm 8,7$ g)

(Figura 10B). Il trattamento con APP (15 e 45 $\mu\text{moli/kg}$) o con EHNA (30 e 90 $\mu\text{moli/kg}$) ha determinato un incremento significativo del peso corporeo nei ratti con colite, mentre non è stato osservato incremento ponderale negli animali trattati con desametasone (Figura 10B).

E' stato valutato il peso della milza come indice di infiammazione sistemica. Questo parametro è aumentato significativamente nei ratti con colite ($+30.1\pm 6.2\%$) (Figura 11), ma non negli animali sottoposti al trattamento con i farmaci in studio, nei quali il peso dell'organo non ha subito variazioni significative rispetto ai controlli (Figura 11).

Valutazione del danno macroscopico e microscopico

Al sesto giorno dall'induzione della colite, la parete del colon distale dei ratti trattati con DNBS risultava ispessita e ulcerata con aree evidenti di infiammazione transmurale. In molti casi erano presenti aderenze con organi limitrofi e il colon appariva talvolta dilatato, con un punteggio relativo al danno macroscopico pari a $7,8\pm 1,4$. Il trattamento con APP, EHNA o desametasone ha causato una riduzione significativa del punteggio relativo al danno macroscopico (Figura 12A).

L'analisi istologica dei tessuti colici prelevati da animali trattati con DNBS ha evidenziato la presenza di aree estese di necrosi a livello della mucosa, caratterizzate da una distruzione completa dell'architettura

ghiandolare. La porzione sottomucosa appariva ispessita per la presenza di edema e di un'intensa infiltrazione di granulociti che spesso arrivava ad interessare lo strato muscolare (Figura 13B). Nelle sezioni di tessuti colici prelevati da ratti con colite è stato osservato un incremento significativo del punteggio di danno microscopico rispetto a quanto osservato negli animali di controllo (Figura 12B). Il trattamento con APP 15 $\mu\text{mol/kg}$, EHNA 90 $\mu\text{mol/kg}$ o desametasone 0,25 $\mu\text{mol/kg}$ ha indotto una riduzione significativa del danno microscopico (Figura 12B e Figure 13C, D, e E).

Valutazione dei livelli di MPO, MDA e TNF- α nel colon

Nei ratti trattati con DNBS è stato osservato un incremento significativo dei livelli tissutali di MPO e di MDA ($17,1 \pm 4,5$ ng/100 mg e $548 \pm 23,4$ $\mu\text{mol/mg}$, rispettivamente) rispetto agli animali di controllo ($3,2 \pm 1,8$ ng/100 mg e $148 \pm 23,8$ $\mu\text{mol/mg}$, rispettivamente). Il trattamento con APP 15 $\mu\text{mol/kg}$, EHNA 90 $\mu\text{mol/kg}$ o desametasone 0,25 $\mu\text{mol/kg}$ ha contrastato l'incremento delle concentrazioni di MPO e MDA associati all'induzione di colite (Figura 14A e B).

La colite sperimentale è risultata associata ad un incremento dei livelli di TNF- α (da $3,8 \pm 1,1$ a $8,6 \pm 1,5$ pg/mg) nei tessuti colici. Il trattamento con

tutti i farmaci in studio ha promosso una riduzione significativa dei livelli tissutali di questa citochina proinfiammatoria (Figura 14C).

Valutazione dei livelli plasmatici di TNF- α e IL-6

Il trattamento con DNBS è stato caratterizzato da un aumento dei livelli plasmatici di TNF- α e IL-6 (da $5\pm 1,3$ a $41\pm 9,4$ pg/ml e da $122,7\pm 2,5$ a $206,5\pm 18$ pg/ml, rispettivamente). Le concentrazioni plasmatiche di queste citochine sono state significativamente ridotte dal trattamento con APP, EHNA o desametasone (Figura 15A e B).

Espressione di iNOS, COX-1 e COX-2 nel colon

L'analisi RT-PCR ha evidenziato un aumento significativo dell'espressione di iNOS in tessuti prelevati da ratti con colite. Il trattamento con APP 15 μ moli/kg, EHNA 90 μ moli/kg non ha modificato l'espressione di questo enzima, mentre una riduzione significativa è stata osservata con desametasone 0,25 μ moli/kg (Figura 16A). L'analisi molecolare ha inoltre evidenziato la presenza di COX-1 e COX-2 nei tessuti colici esaminati (Figura 16B e C). La successiva analisi densitometrica delle bande di cDNA non ha dimostrato cambiamenti apprezzabili nell'espressione delle due isoforme di COX in seguito al trattamento con APP, EHNA e desametasone (Figura 16B e C).

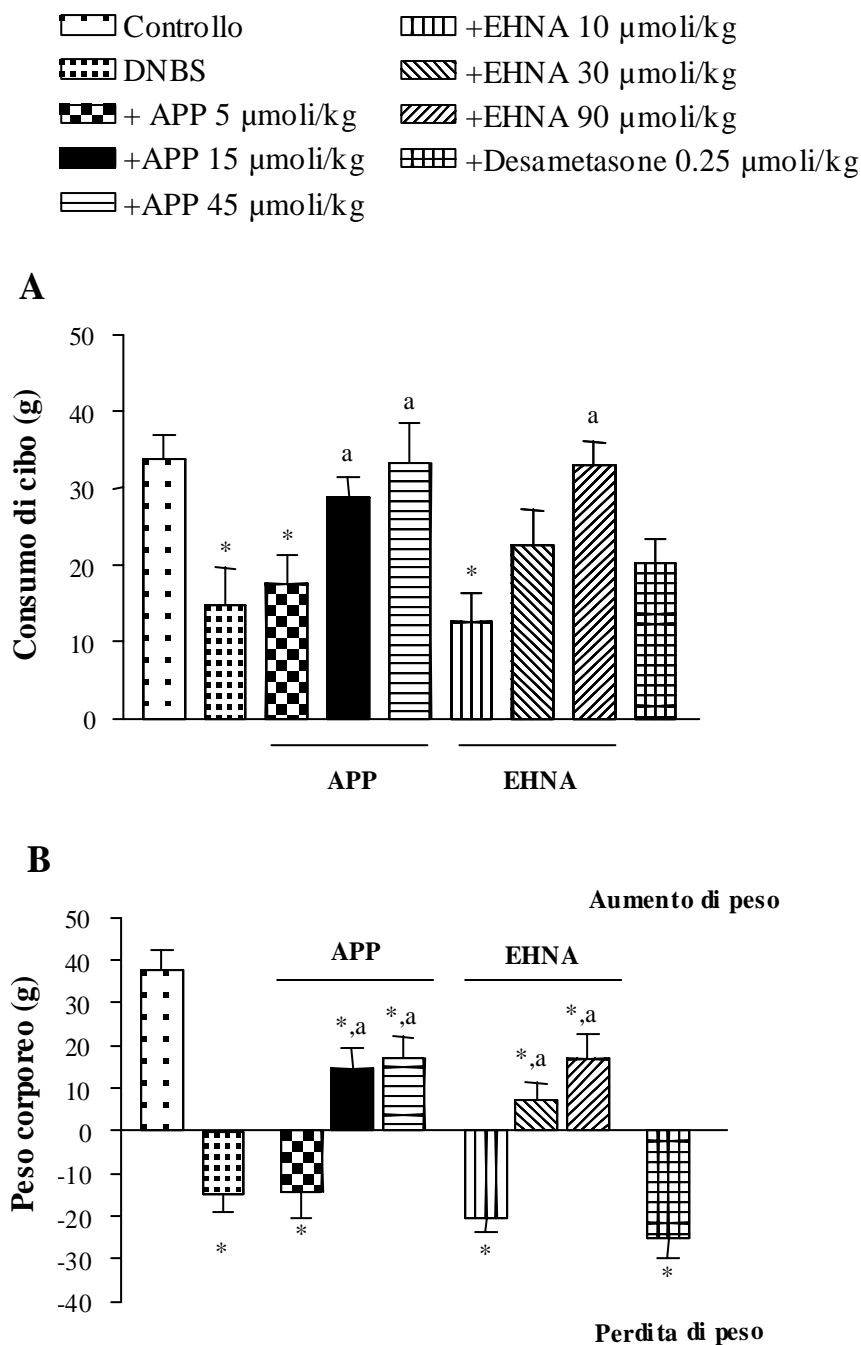


Figura 10. Effetti del trattamento con APP (5-45 $\mu\text{mol/kg}$), EHNA (10-90 $\mu\text{mol/kg}$) o desametasone (0,25 $\mu\text{mol/kg}$) sul consumo di cibo (A) e peso corporeo (B) al sesto giorno dall'induzione di colite con DNBS. Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 8 esperimenti \pm E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: * $p < 0,05$. Significatività delle differenze rispetto al gruppo trattato con DNBS: ^a $p < 0,05$.

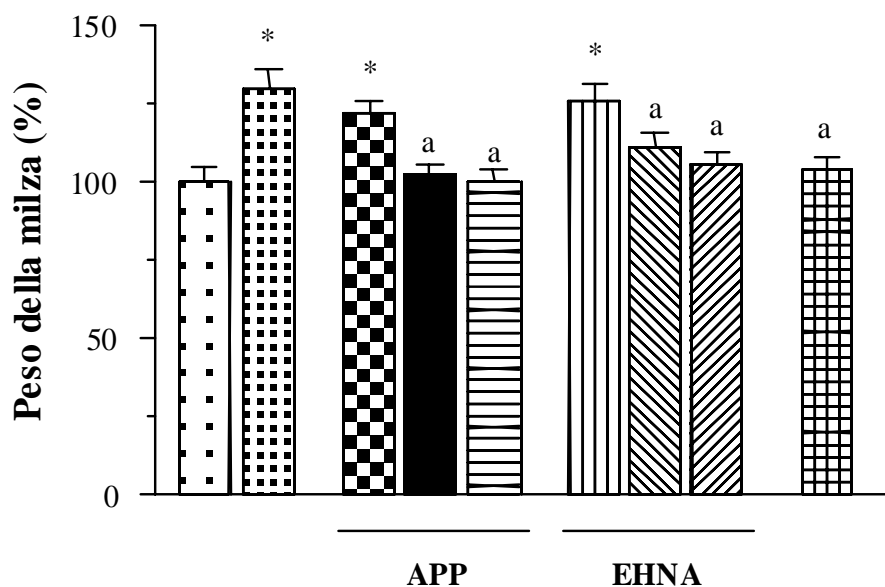
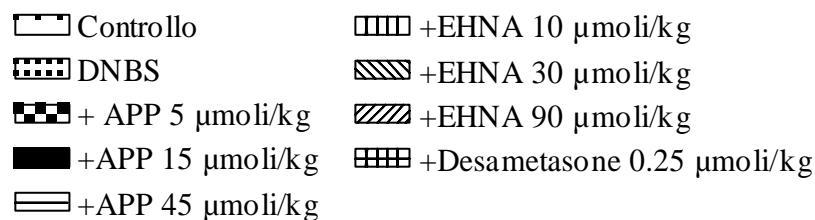


Figura 11. Effetti del trattamento con APP (5-45 μmoli/kg), EHNA (10-90 μmoli/kg) o desametasone (0,25 μmoli/kg) sul peso della milza al sesto giorno dall'induzione di colite con DNBS. Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 8 esperimenti±E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: *p<0,05. Significatività delle differenze rispetto al gruppo trattato con DNBS: ^ap<0,05.

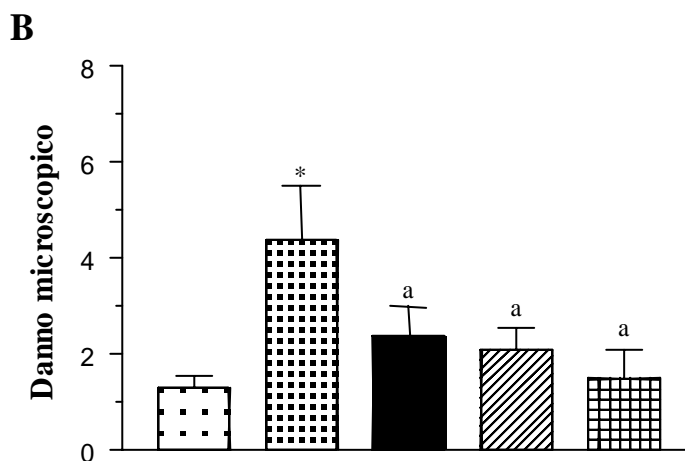
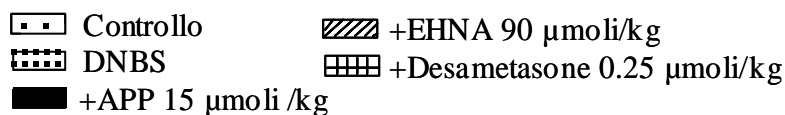
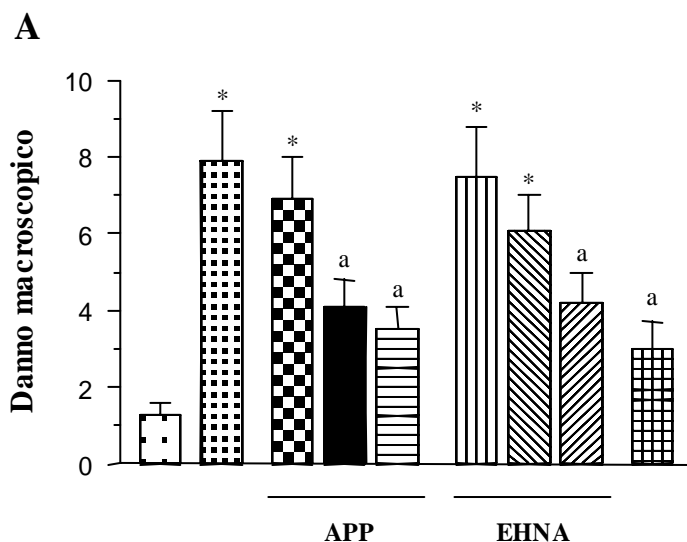
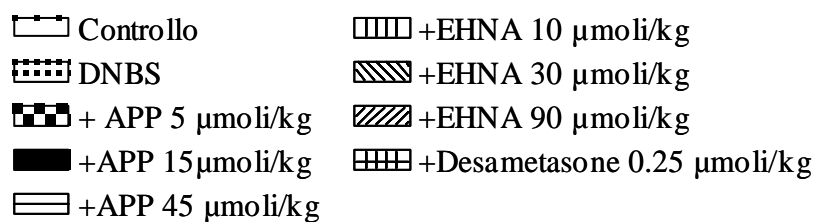


Figura 12. Valutazione del danno macroscopico (A) e microscopico (B) in tessuti colici prelevati da ratti normali e da animali con colite trattati con APP, EHNA o desametasone. Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 8 esperimenti±E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: * $p<0,05$. Significatività delle differenze rispetto al gruppo trattato con DNBS: ^a $p<0,05$.

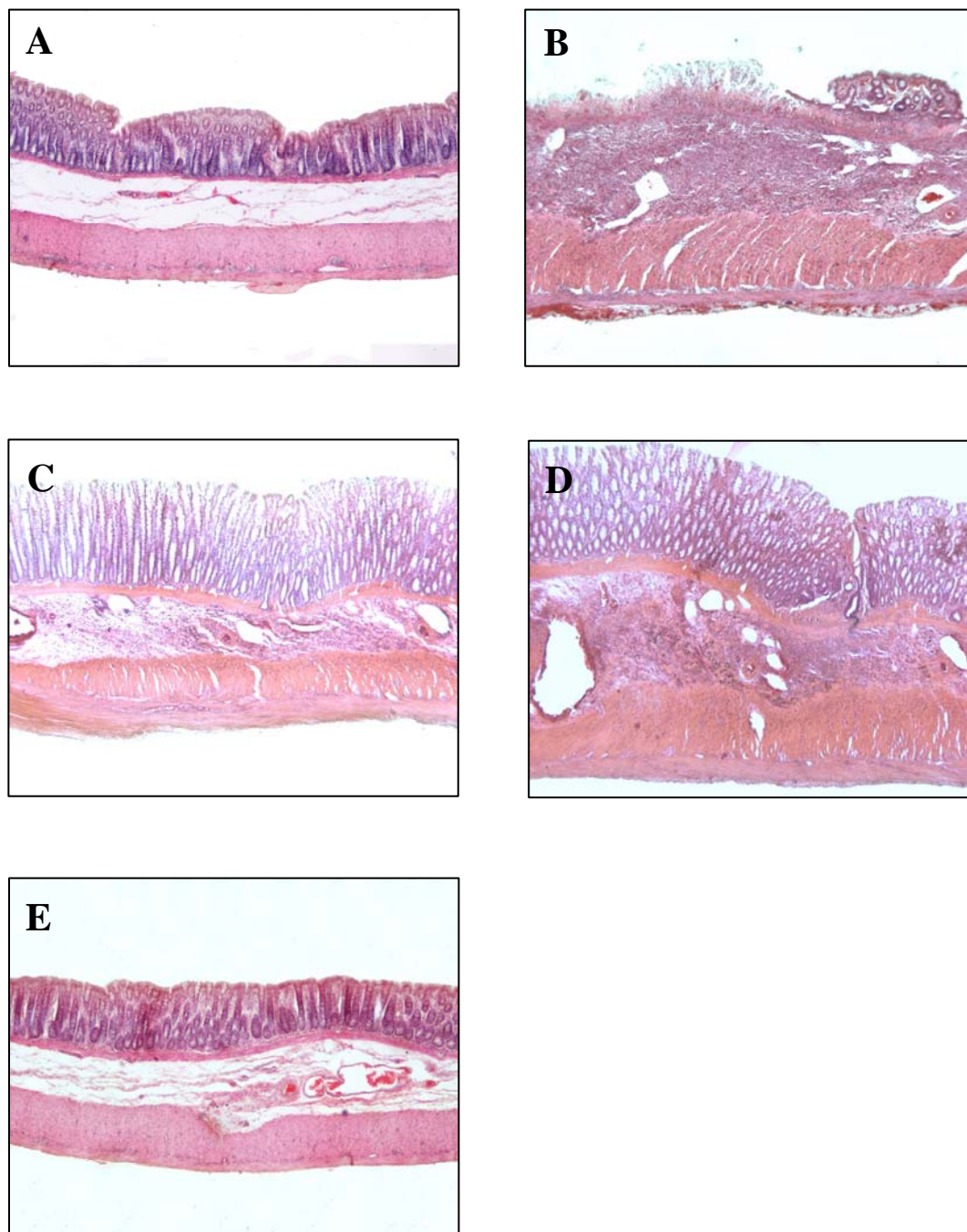


Figura 13. Sezioni istologiche di colon distale di ratto. Le immagini si riferiscono a tessuti prelevati da ratti normali (A), trattati con DNBS (B), e da ratti con colite trattati con APP (C), EHNA (D) o desametasone (E). La colorazione dei preparati è stata effettuata con ematossilina/eosina.

Controllo
 +EHNA 90 $\mu\text{mol/kg}$
 DNBS
 +Desametasone 0.25 $\mu\text{mol/kg}$
 +APP 15 $\mu\text{mol/kg}$

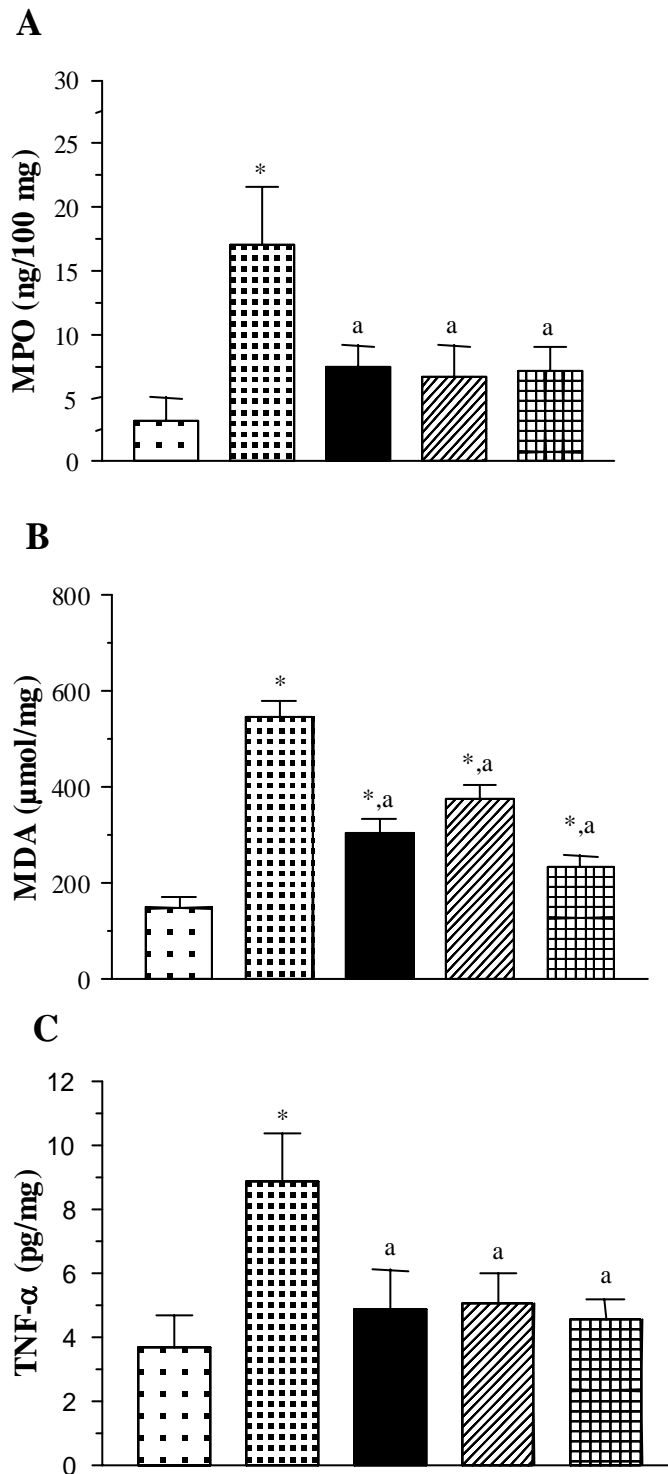


Figura 14. Valutazione dei livelli di MPO (A), MDA (B) e TNF- α (C) in tessuti colici prelevati da ratti normali, da ratti trattati con DNBS, e da animali con colite trattati con APP (15 $\mu\text{mol/kg}$), EHNA (90 $\mu\text{mol/kg}$) o desametasone (0,25 $\mu\text{mol/kg}$). Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 8 esperimenti \pm E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: * $p<0,05$. Significatività delle differenze rispetto al gruppo trattato con DNBS: ^a $p<0,05$

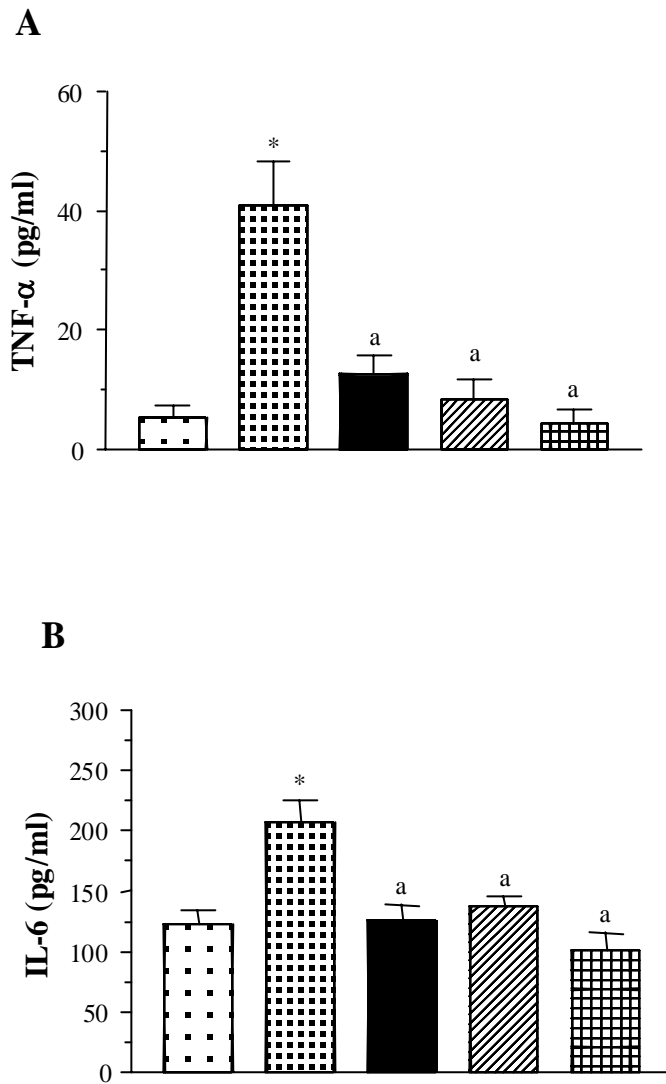
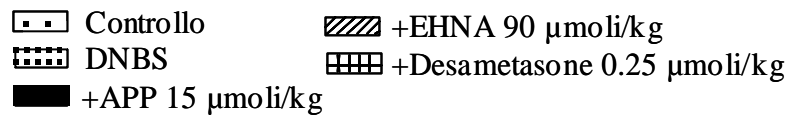


Figura 15. Valutazione dei livelli di TNF- α (A) e IL-6 (B) nel plasma prelevato da ratti normali, ratti trattati con DNBS, e da animali con colite trattati con APP (15 μ moli/kg), EHNA (90 μ moli/kg) o desametasone (0,25 μ moli/kg). Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 8 esperimenti \pm E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: * $p < 0,05$. Significatività delle differenze rispetto al gruppo trattato con DNBS: ^a $p < 0,05$

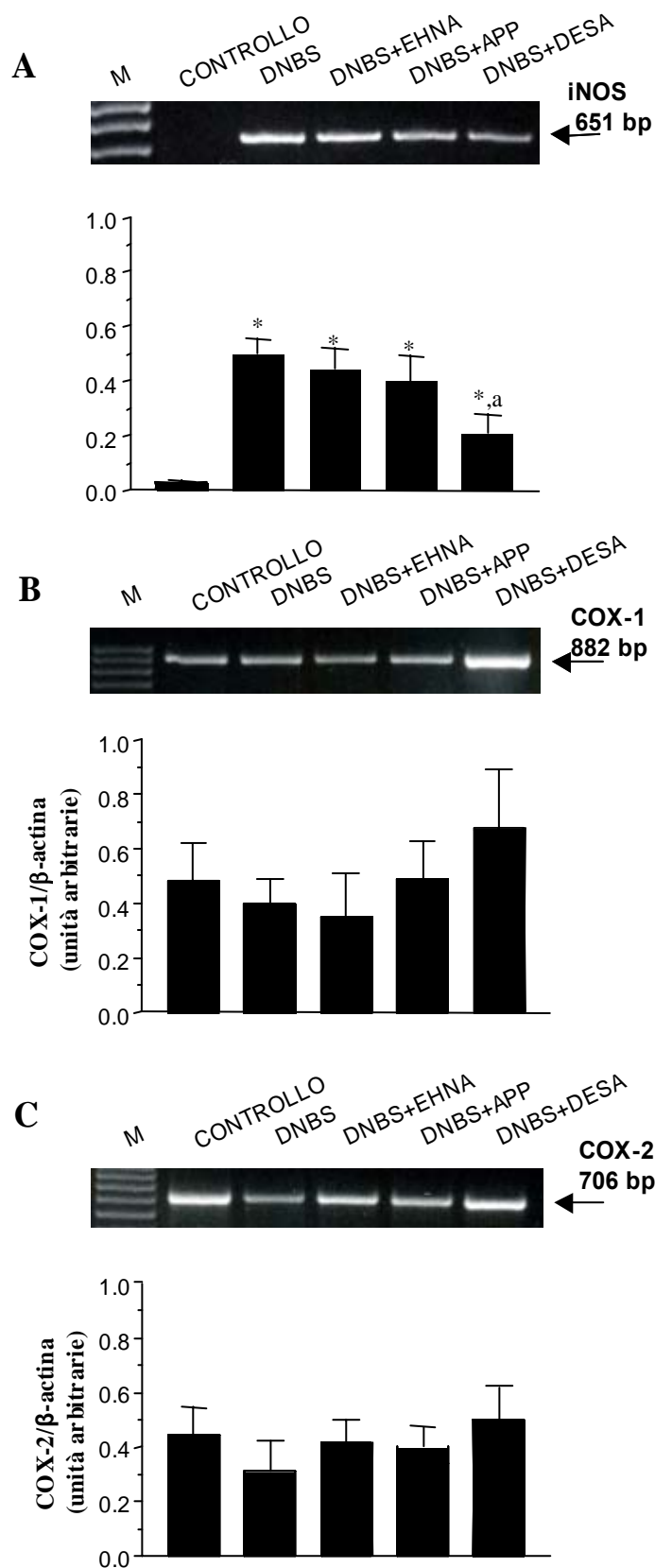


Figura 16. Analisi RT-PCR dell'espressione di iNOS (A), COX-1 (B), COX-2 (C) in tessuti prelevati da animali di controllo o da ratti con colite sottoposti o meno al trattamento con APP, EHNA o desametasone. Ogni colonna rappresenta il valore medio ottenuto da 4-5 esperimenti \pm E.S.M. Significatività delle differenze rispetto al gruppo di controllo: * $p < 0,05$. Significatività delle differenze rispetto al gruppo DNBS: ^a $p < 0,05$.

DISCUSSIONE

Le normali funzioni gastrointestinali, quali l'attività contrattile e secretiva, possono essere gravemente alterate in pazienti affetti da IBD. Diverse evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato che tali disfunzioni sono imputabili a modificazioni morfo-funzionali del sistema nervoso enterico che dipendono in larga misura dal sistema immunitario/infiammatorio e che possono contribuire alla comparsa di una sintomatologia caratterizzata soprattutto da dolore addominale e alterazioni dell'alvo (Lomax *et al.*, 2005). Tra i vari mediatori coinvolti in questa complessa interazione tra sistema immuno-infiammatorio e sistema nervoso enterico, l'adenosina sembra svolgere un ruolo importante (Christofi *et al.*, 2001).

L'adenosina è fisiologicamente coinvolta nella regolazione di numerosi processi a livello del tratto digerente, comprese le funzioni secretive della mucosa gastrointestinale e quelle motorie (Christofi e Wood, 1994). Inoltre diverse evidenze sperimentali hanno ipotizzato un coinvolgimento di questo mediatore anche nella fisiopatologia delle malattie infiammatorie intestinali (Sebastiao e Ribeiro, 2000; Duarte-Araujo *et al.*, 2004). In particolare è stata dimostrata la capacità dell'adenosina di influire sulle risposte infiammatorie con diverse modalità, e molti tipi cellulari coinvolti nei processi flogistici (mastociti, polimorfonucleati neutrofili, linfociti, macrofagi ed eosinofili) esprimono

recettori per questo autacoide. In queste cellule l'adenosina sembra in grado di modulare sia la liberazione di citochine che la produzione di anioni superossido (Thiel et al., 2003). Poco è invece noto sulla possibile partecipazione dell'adenosina ai fenomeni di disfunzione della motilità digestiva caratteristici dei soggetti affetti da IBD. Sulla base di queste evidenze, le nostre ricerche sono state indirizzate alla caratterizzazione dell'espressione e del ruolo funzionale dei recettori dell'adenosina nel comparto neuromuscolare del colon di ratto e umano, e alla valutazione degli effetti dell'infiammazione intestinale sull'espressione e sulla funzione di questi recettori in un modello di colite sperimentale nel ratto. Nello stesso modello sono stati inoltre saggiati i possibili effetti antinfiammatori derivanti dal blocco farmacologico dell'attività dell'adenosina deaminasi.

Ruolo di adenosina nella regolazione della motilità colica

Le evidenze sperimentali ottenute nel presente studio hanno mostrato che, in condizioni fisiologiche, i recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} dell'adenosina sono espressi in maniera costitutiva nel compartimento neuromuscolare del colon distale di ratto e che essi contribuiscono direttamente o indirettamente alla modulazione dell'attività motoria colinergica a livello neuronale o muscolare. Inoltre, è stato evidenziato che l'induzione di colite

sperimentale si associa ad un marcato incremento nell'espressione del recettore A_{2A} nel comparto neuromuscolare e che, in presenza di infiammazione, questo recettore sembra svolgere un ruolo predominante nel controllo delle funzioni motorie colinergiche.

Prima di esaminare gli effetti degli antagonisti e agonisti dei recettori purinergici sull'attività motoria del colon di ratto, abbiamo ritenuto opportuno esaminare la loro espressione nei tessuti neuromuscolari. L'analisi RT-PCR ha permesso di rilevare l'espressione dei tre sottotipi recettoriali esaminati sia in tessuti colici prelevati da ratti normali che da animali con colite. In linea con queste osservazioni, studi precedenti hanno dimostrato la presenza dei recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} nel tratto gastrointestinale di ratto in condizioni fisiologiche (Bailey e Hourani, 1992; Kadowaki et al., 2001).

L'incubazione dei preparati normali di colon di ratto con DPCPX (antagonista del recettore A_1), ZM 241385 (antagonista del recettore A_{2A}) e MRS 1706 (antagonista del recettore A_{2B}) ha prodotto incrementi significativi delle risposte motorie alla stimolazione elettrica, mentre solo il trattamento con l'antagonista A_{2A} ha permesso di apprezzare un incremento significativo della risposta contrattile nei tessuti infiammati. Questi effetti potenzianti non hanno subito modificazioni in seguito all'ablazione farmacologica del sistema noradrenergico e tachinergico,

per cui è possibile ipotizzare un coinvolgimento dei recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} nella modulazione dell'attività contrattile colinergica. In accordo con questa ipotesi, studi precedenti hanno evidenziato che il trattamento con DPCPX è in grado di potenziare l'attività contrattile intestinale *in vitro*, attraverso la facilitazione della trasmissione colinergica (Kadowaki et al. 2001). Altri autori hanno inoltre descritto una correlazione tra induzione di colite sperimentale nel topo e alterazioni a carico del sistema purinergico. In particolare è stata osservata una ridotta capacità modulatrice del recettore A_1 sulla motilità intestinale, suggerendo che, anche in questo modello, le disfunzioni motorie associate all'infiammazione potrebbero dipendere, almeno in parte, da modificazioni del sistema dell'adenosina (De Man et al., 2003).

Gli effetti potenzianti osservati con gli antagonisti A_1 e A_{2B} sono risultati maggiormente apprezzabili in seguito ad isolamento della componente motoria colinergica, attraverso il blocco del sistema nitrgico inibitore. In queste condizioni, il trattamento con DPCPX o MRS 1706 ha causato un potenziamento significativo delle risposte motorie colinergiche sia nei tessuti sani che in quelli infiammati mentre il trattamento con ZM 241385 non ha permesso di apprezzare modificazioni significative della risposta motoria. Questa evidenza delinea un possibile coinvolgimento dei recettori A_1 e A_{2B} nella modulazione dell'attività contrattile colinergica,

mentre il recettore A_{2A} sembra modulare principalmente l'attività delle terminazioni nervose nitrergiche.

Poiché non era chiaro se gli antagonisti dei recettori dell'adenosina potessero svolgere la loro azione sull'attività motoria colinergica a livello neuronale e/o muscolare, gli effetti di questi farmaci sono stati saggiati sulla stimolazione muscarinica diretta della muscolatura longitudinale, ottenuta attraverso l'impiego di carbacolo in presenza di tetrodotossina. I risultati ottenuti hanno chiaramente indicato che le contrazioni indotte da carbacolo subiscono un potenziamento in seguito a trattamento con l'antagonista del recettore A_{2B} , ma non con DPCPX o ZM 241385. Questa evidenza è in accordo con quanto descritto da Fozard et al. (2003), i quali avevano dimostrato la presenza di recettori A_{2B} sulla muscolatura liscia del colon distale di ratto, ipotizzando un possibile ruolo di questo sistema recettoriale nel controllo dell'attività motoria colica in condizioni fisiologiche.

Successivamente sono stati esaminati i possibili meccanismi responsabili delle variazioni di risposta agli antagonisti A_1 , A_{2A} e A_{2B} , evidenziate nei tessuti normali rispetto a quelli infiammati. A tale scopo è stata condotta una serie di esperimenti nei quali i tessuti in esame sono stati trattati con dipiridamolo e adenosina deaminasi al fine di abbattere i livelli extracellulari di adenosina endogena e, in presenza di un blocco

farmacologico dei sistemi adrenergico, tachichininergico e nitrergico. Questa serie di esperimenti ha evidenziato la capacità di CCPA e NECA di causare una riduzione concentrazione-dipendente della risposta contrattile colinergica evocata da sequenze ripetute di stimolazione elettrica, con un profilo di risposta simile sia in tessuti di controllo che infiammati. Per contro, il trattamento con dosi crescenti di CGS 21680 (agonista del recettore A_{2A}) non ha fatto registrare modificazioni significative del profilo contrattile, escludendo un possibile coinvolgimento di questo recettore nella modulazione diretta della risposta motoria colinergica. Successivamente sono stati condotti alcuni esperimenti mantenendo attivi i sistemi nitrergico e colinergico. In presenza di queste condizioni il trattamento con l'agonista dei recettori A_{2A} ha determinato una riduzione della risposta contrattile nei preparati normali di colon, ma soprattutto nei tessuti infiammati. Queste osservazioni suggeriscono che, in assenza del mediatore endogeno, non risultano evidenti differenze apprezzabili nella capacità del recettore A_1 e A_{2B} di modulare l'attività contrattile colinergica nei tessuti in esame, mentre il recettore A_{2A} sembra modulare indirettamente la risposta colinergica attraverso la stimolazione del sistema nitrergico nei tessuti normali e, più marcatamente, nei preparati ottenuti da animali con colite. Questi risultati, considerati insieme al fatto che la colite si associa ad un aumento dell'espressione dei recettori A_{2A} , suggeriscono

plesso mienterico e/o l'attività dei recettori muscarinici nella muscolatura liscia. Per esempio, in uno studio pubblicato da Duarte-Araujo et al. (2004) è stato osservato un potenziamento della liberazione di acetilcolina in esperimenti condotti su preparati di ileo di ratto, in seguito a trattamento con un agonista del recettore A_1 , mentre, contrariamente alle nostre evidenze, il trattamento con l'agonista del recettore A_{2A} era in grado di potenziare la risposta contrattile. Tale discrepanza è da imputarsi probabilmente alle diverse regioni intestinali prese in esame nel nostro studio (colon distale) e in quello di Duarte-Araujo (2004).

Christofi et al. (2001) hanno dimostrato la presenza dei recettori dell'adenosina nel comparto neuromuscolare del colon umano attraverso la tecnica RT-PCR, definendone inoltre la localizzazione cellulare per mezzo di una successiva analisi immunostochimica. Sulla base di queste evidenze abbiamo avviato un programma di esperimenti su tessuti umani (tuttora in corso) al fine di valutare il possibile ruolo dell'adenosina nella modulazione dell'attività contrattile della muscolatura liscia colica, concentrando la nostra attenzione soprattutto sul recettore A_{2A} . I profili di risposta motoria osservati nei preparati colici umani risultano simili a quelli registrati nei tessuti di ratto. Infatti questi tessuti rispondono alla stimolazione elettrica con contrazioni fasiche atropino-sensibili, le quali vengono potenziate dal trattamento con ZM 241385, mentre risultano

significativamente ridotte in preparati incubati con l'agonista del recettore A_{2A} .

L'incubazione dei preparati di colon umano con ZM 241385 o con CGS 21680 non ha prodotto modificazioni significative delle risposte motorie atropino-sensibili alla stimolazione indotta da carbacolo in presenza di tetrodotossina. Sulla base di queste prime evidenze sperimentali è quindi ipotizzabile un coinvolgimento del recettore A_{2A} nella regolazione dell'attività contrattile colica a livello neuronale, escludendo una diretta modulazione dell'attività miogena. Questa ipotesi trova peraltro riscontro con quanto osservato da Christofi et al. (2001), i quali hanno evidenziato l'espressione del recettore A_{2A} a livello di delle terminazioni neuronali enteriche. Analogamente a quanto osservato nei tessuti di ratto, in preparati nei quali è stata isolata la componente motoria colinergica, il trattamento con ZM 241385 non ha potenziato significativamente la risposta alla stimolazione elettrica. Successivamente è stata svolta una serie di esperimenti in preparati nei quali è stata isolata farmacologicamente la componente nitrergica. In questi tessuti la stimolazione elettrica ha indotto una risposta rilassante, sensibile al trattamento con l'antagonista del recettore A_{2A} .

In definitiva, i risultati ottenuti nell'uomo sostengono il concetto che: a) l'adenosina partecipa alla regolazione dei circuiti neuromuscolari enterici

deputati alla regolazione inibitrice delle risposte contrattili attraverso l'attivazione dei recettori A_{2A} ; b) l'attività del recettore A_{2A} si esplica prevalentemente a livello neuronale attraverso la modulazione del sistema nitrenergico.

Modulazione farmacologica di adenosina deaminasi e infiammazione intestinale

Recenti evidenze sperimentali hanno ipotizzato una modulazione del sistema dell'adenosina tra i possibili obiettivi per lo sviluppo di farmaci innovativi ad attività anti-infiammatoria (Siegmond et al., 2000). Una parte del presente progetto di ricerca è stata dedicata quindi alla valutazione del possibile effetto anti-infiammatorio di APP, un nuovo inibitore dell'adenosina deaminasi, in un modello di colite sperimentale. I risultati ottenuti dimostrano che il blocco farmacologico di questo enzima, coinvolto nel metabolismo dell'adenosina endogena, è in grado di migliorare significativamente la colite, e che il trattamento con APP risulta più efficace rispetto all'EHNA (un inibitore dell'adenosina deaminasi utilizzato come farmaco di riferimento) nel controllare diversi parametri flogistici sistemici e tissutali caratteristici della colite sperimentale.

La colite indotta da DNBS è un modello di infiammazione intestinale caratterizzata da perdita di peso, diarrea, ulcerazione della mucosa

intestinale con sanguinamento, perdita dell'architettura ghiandolare e formazione di granulomi nella parete intestinale (Jurjus et al., 2004). In questo modello, lo stress ossidativo è descritto come uno dei processi critici per lo sviluppo del danno tissutale e della necrosi che insorgono alcuni giorni dopo la somministrazione di DNBS (Elson et al., 1995). Questo modello sperimentale è ampiamente utilizzato per la valutazione dell'effetto anti-infiammatorio di nuovi farmaci potenzialmente utilizzabili nella pratica clinica (Elson et al., 1995; Wirtz e Neurath, 2000). Nei nostri esperimenti, la validità di questo modello è stata dimostrata dalla capacità del desametasone, farmaco glucocorticoide con riconosciuta attività anti-infiammatoria, di ridurre significativamente i parametri flogistici sia sistemici che tissutali, in accordo con quanto descritto in letteratura (Nakase et al., 2001).

Nel presente studio, il trattamento con APP o EHNA ha indotto un incremento significativo del consumo di cibo, del peso corporeo e una riduzione del peso della milza, e dei livelli plasmatici di TNF- α e IL-6, indicatori utilizzati come parametri sistemici di infiammazione. Inoltre l'inibizione dell'adenosina deaminasi si è associata ad un miglioramento significativo del punteggio del danno macroscopico e istologico, a conferma che il blocco della degradazione dell'adenosina promuove un miglioramento del decorso del processo flogistico (Siegmond et al., 2000;

Adanin et al., 2002; Kuno et al., 2006). Queste evidenze sono in accordo con quanto osservato da alcuni autori, i quali hanno dimostrato che il trattamento con un agonista del recettore A_{2a} o con farmaci in grado di bloccare l'attività di adenosina chinasi e di aumentare quindi i livelli di adenosina endogena, erano in grado di contrastare efficacemente l'infiammazione intestinale indotta in modelli sperimentali (Siegmund et al., 2000; Odashima et al., 2005).

Diverse popolazioni cellulari immunitarie e citochine contribuiscono alla patogenesi delle malattie infiammatorie intestinali (Ardizzone e Bianchi Porro, 2005). In particolare, $TNF-\alpha$ svolge un ruolo importante nella fisiopatologia delle IBD, stimolando la produzione di chemochine in grado di promuovere il richiamo e l'attivazione dei neutrofili (Martin et al., 2006). Una volta attivati, i neutrofili fuoriescono dal letto circolatorio, e infiltrano la mucosa e la sottomucosa contribuendo al danno tissutale attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Kruidenier and Verspaget, 2002). In accordo con quanto descritto in letteratura, abbiamo osservato un incremento dei livelli tissutali di $TNF-\alpha$ e MPO in animali con colite ed una riduzione significativa di questi parametri in ratti trattati con APP o EHNA. La capacità di questi farmaci di ridurre i livelli di $TNF-\alpha$ e l'infiltrazione leucocitaria attraverso il blocco della degradazione dell'adenosina è in linea con quanto riportato da diversi autori, i quali

hanno dimostrato che un aumento dei livelli tissutali di adenosina si accompagnava ad una riduzione della sintesi di citochine pro-infiammatorie e ad una ridotta attivazione dei neutrofili (Tofovic et al., 2001; Adanin et al., 2002; Haskò and Cronstein, 2004; Kuno et al., 2006).

Come già accennato precedentemente, diverse evidenze indicano lo stress ossidativo quale una delle possibili cause del danno tissutale conseguente all'infiammazione intestinale (Martin et al., 2004; Oz et al., 2005). In tessuti prelevati da ratti con colite abbiamo osservato un aumento significativo della perossidazione lipidica, che è stato ridotto in seguito dalla somministrazione di APP o EHNA. Questa evidenza è in accordo con Bor et al. (1999), i quali hanno dimostrato che il trattamento con pentostatina, inibitore dell'adenosina deaminasi, induce una riduzione della produzione di MDA in tessuti renali sottoposti al danno ischemico, ad ulteriore dimostrazione che l'accumulo di adenosina endogena è in grado di proteggere dal danno ossidativo.

Diversi studi, condotti su modelli animali o su tessuti umani, hanno evidenziato che l'enzima iNOS è coinvolto nell'infiammazione intestinale promuovendo il processo flogistico attraverso la produzione di NO, che può essere convertito in specie reattive in seguito all'interazione con radicali dell'ossigeno (Kolios et al., 2004). In accordo con questa evidenza, i nostri risultati indicano un incremento dell'espressione di iNOS

nel colon di ratti con colite. Tuttavia questa induzione dell'espressione di iNOS non ha subito modificazioni in seguito al trattamento con APP o EHNA, suggerendo che gli effetti antinfiammatori osservati con questi due farmaci non sono attribuibili ad una diretta modulazione dell'espressione di iNOS. Attualmente il ruolo delle cicloossigenasi nel mantenimento dell'omeostasi e nell'insorgenza di reazioni infiammatorie a livello del tratto digestivo è ampiamente dibattuto (Lesch et al., 1999; Martin et al., 2003). Nelle nostre condizioni sperimentali, l'induzione della colite sperimentale non ha portato a variazioni significative dell'espressione della COX-2 e questo profilo non ha subito modificazioni in seguito al trattamento con APP, EHNA o desametasone. Le nostre evidenze sperimentali sono apparentemente in disaccordo con quanto osservato da altri autori, i quali osservano un incremento dell'espressione di COX-2 in tessuti colici infiammati (Talero et al., 2006). Tuttavia, questa discrepanza può essere spiegata considerando che l'induzione della COX-2 è un processo tempo-dipendente durante il processo flogistico. A tal proposito Kankuri et al. (2001) hanno dimostrato che l'espressione di COX-2 nel colon di ratti con colite raggiunge il livello massimo dopo 12-24 ore dall'induzione della colite per poi tornare a valori normali dopo 72 ore. Inoltre i nostri risultati sono in accordo con quelli di Kankuri et al. (2001) anche per il fatto che il trattamento con desametasone non ha modificato

significativamente l'espressione di COX-2. E' quindi ipotizzabile che il miglioramento della colite in seguito al trattamento con inibitori dell'adenosina deaminasi non sia dovuto ad una modulazione dell'espressione di COX-2.

Un altro obiettivo importante di questo studio era rappresentato dalla valutazione delle proprietà farmacodinamiche dell'APP. Per questo motivo abbiamo condotto inizialmente esperimenti *in vitro* al fine di stimare la potenza del nuovo farmaco nell'inibire l'adenosina deaminasi, e successivamente abbiamo proceduto con un test *in vivo* per saggiare gli effetti su alcuni parametri infiammatori nel modello di colite da DNBS. I nostri risultati hanno dimostrato che l'APP è in grado di contrastare l'infiammazione intestinale con una potenza maggiore rispetto all'EHNA, e che le differenze nell'effetto anti-infiammatorio di questi farmaci riflette le loro rispettive potenze nell'inibire *in vitro* l'attività dell'adenosina deaminasi. L'APP può quindi rappresentare un farmaco di riferimento per la messa a punto di nuovi inibitori dell'adenosina deaminasi caratterizzati da buoni profili di potenza e selettività.

La scarsa efficacia e sicurezza dei farmaci attualmente disponibili per il trattamento delle infiammazioni intestinali continuano a stimolare la ricerca di nuove molecole terapeuticamente attive. Le recenti acquisizioni sulla immunopatogenesi delle IBD hanno aperto nuove possibilità per lo

sviluppo di farmaci innovativi (Lim e Hanauer, 2004). Mentre le terapie tradizionali sono caratterizzate da effetti marcati e poco specifici nei confronti dei diversi parametri infiammatori, l'aumento delle conoscenze sulla fisiopatologia delle malattie infiammatorie intestinali rappresenta un punto di partenza per lo sviluppo di terapie mirate al blocco selettivo della cascata infiammatoria attraverso il blocco di specifiche citochine. In questo contesto il sistema dell'adenosina, e in particolare la modulazione dell'attività dell'adenosina deaminasi, sembra rappresentare un bersaglio promettente per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche per le IBD.

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio indicano che i recettori A_1 , A_{2A} e A_{2B} sono espressi nel comparto neuromuscolare del colon di ratto in condizioni fisiologiche, e suggeriscono che questi recettori contribuiscono alla regolazione dell'attività eccitatrice colinergica nei circuiti neuromuscolari enterici agendo rispettivamente a livello pre- e post-giunzionale. Inoltre, in presenza di colite, il recettore A_{2A} sembra assumere un ruolo predominante nella regolazione dell'attività motoria colinergica del colon distale, attraverso la modulazione del sistema nitrgico.

Nell'insieme, queste osservazioni possono costituire una base per l'interpretazione dei meccanismi tramite i quali il sistema dell'adenosina

controlla le funzioni neuromotorie enteriche, sia in condizioni fisiologiche che in presenza di patologie infiammatorie intestinali.

I risultati ottenuti nel modello di colite sperimentale forniscono evidenze originali a sostegno dell'importanza di questo autacoide nella fisiopatologia delle disfunzioni motorie associate ai processi infiammatori enterici, e suggeriscono che la modulazione farmacologica dei livelli di adenosina endogena può rappresentare un bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci ad attività anti-infiammatoria, utili per contrastare il processo flogistico, e anche per correggere i disturbi della motilità intestinale caratteristici delle IBD.

BIBLIOGRAFIA

- Abbracchio MP, Cattabeni F. Brain adenosine receptors as target for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 890: 79-92.
- Adanin S, Yalovetskiy IV, Nardulli BA, *et al.* Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *Am J Physiol* 2002, 282: R1324-R1332.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, *et al.* A_{2A} receptors mediate inhibitory effects of adenosine on colonic motility in the presence of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 117-122.
- Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002, 252: 475-496.
- Bailey SJ, Hourani SMO. Effects of purines on the longitudinal muscle of the rat colon *Br J Pharmacol* 1992, 105: 885-892.
- Bara-Jimenez W, Sherzai A, Dimitrova T, *et al.* Adenosine A_{2A} receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 2003, 12: 286-293.
- Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM *et al.* Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000, 46: 344-349.
- Baxter GF. Role of adenosine in delayed preconditioning of myocardium. *Cardiovasc Res* 2002, 55: 483-494.

- Blandizzi C, De Paolis B, Colucci R *et al.* Characterization of a novel mechanism accounting for the adverse cholinergic effects of the anticancer drug irinotecan. *Br J Pharmacol* 2001, 132: 73-84.
- Blandizzi C, Fornai M, Colucci R, *et al.* Altered prejunctional modulation of intestinal cholinergic and noradrenergic pathways by α_2 -adrenoceptors in the presence of experimental colitis. *Br J Pharmacol* 2003, 139, 309-320.
- Bor MV, Durmus O, Bilgihan A, *et al.* The beneficial effect of 2'-deoxycoformycin in renal ischemia-reperfusion is mediated both by preservation of tissue ATP and inhibition of lipid peroxidation. *Int J Clin Lab Res* 1999, 29: 75-79.
- Buolamwini JK. Nucleoside transport inhibitors: structure-activity relationship and potential therapeutic applications *Curr Med Chem* 1997, 4: 35-66.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors *In Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, ed. by R. W. Straub and L. Bolis 1978, 107-118, Raven Press, New York.
- Cabrita MA, Baldwin SA, Youn JD. Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol* 2002, 80: 623-638.

- Casado FJ, Lostao MP, Aymerich I, *et al.* Nucleoside transporters in absorptive epithelia *J Physiol Biochem* 2002, 58: 207-216.
- Cass CE, Young JD, Baldwin SA, *et al.* Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm Biotechnol* 1999, 12: 313-352.
- Cass CE, Young JD, Baldwin SA. Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 1998, 76: 761-770.
- Castro GA. Gut immunophysiology: regulatory pathways within a common mucosal immune system. *News Physiol Sci* 1989, 4: 59-64.
- Cauli O, Morelli M. Caffeine and the dopaminergic system. *Behav Pharmacol* 2005, 16: 63-77.
- Christofi FL e Wood JD. Electrophysiological subtypes of inhibitory P1 purinoceptors on myenteric neurons of guinea-pig small bowel. *Br J Pharmacol* 1994, 113: 703-710.
- Christofi FL, Zhang H, Yu JG, *et al.* Differential gene expression of adenosine A1, A2a, A2b, and A3 receptors in the human enteric nervous system. *J Comp Neurol* 2001, 439: 46-64.
- Chunn JL, Young HW, Banerjee SK, *et al.* Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 2001, 167: 4676-4685.

- Clementi F, Fumagalli G. Farmacologia generale e molecolare *UTET* 1999, 62-63.
- Cope GF, Heatley RV, Kelleher JK. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *Br Med J* 1986, 293: 481.
- Coulie B, Camilleri M, Bharucha AE *et al.* Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and the effects of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001, 15: 653-663.
- Cowles VE, Sarna SK. Effect of *T. spiralis* infection on intestinal motor activity in the fasted state. *Am J Physiol* 1990, 259: G693-G701.
- Cowles VE, Sarna SK. *Trichinella spiralis* infection alters small bowel motor activity in the fed state. *Gastroenterology* 1991, 101: 664-669.
- Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, *et al.* Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med*, 1983, 158: 1160-1177.
- Cronstein BN. A novel approach to the development of anti-inflammatory agents: adenosine release at inflamed sites. *J Investig Med*, 1995, 43: 50-57.
- Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994, 76: 5-13.

- De Man SJ, Seerden TC, Dewinter BY, *et al.* Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 2003, 139: 172-184.
- De Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 33: 258-274.
- Deportere I, Thijs T, Peeters TL. Generalized loss of inhibitory innervation reverses serotonergic inhibition into excitation in a rabbit model of TNBS-colitis. *Br J Pharmacol* 2002, 135: 2011-2019.
- Dixon AK, Gubiz AK; Sirinathsingji DJ, *et al.* Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in rat *Br J Pharmacol* 1996, 118: 1461-1468.
- Duarte-Araújo M, Nascimento C, Timóteo MA, *et al.* Dual effect of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A_{2A} and extrajunctional inhibitory A₁ receptors. *Br J Pharmacol* 2004, 141: 925-934.
- Elliott DE, Urban JR, Argo CK, *et al.* Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *FASEB J* 2000, 4: 430-435.
- Ellis KM, Mazzoni L, Fozard JR. Role of endogenous adenosine in the acute and late response to allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats. *Br J Pharmacol* 2003, 139: 1212-1218.
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, *et al.* Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995, 109: 1344-1367.

- Ely S, Berne R. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992, 85: 893-904.
- Fabia R, Arrajab A, Andersson ML, *et al.* Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993, 54: 248-255.
- Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, *et al.* Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A_{2B} and A₃ adenosine receptors. *Circ Res* 2003, 92: 485-492.
- Ferguson A. Ulcerative colitis and Crohn's disease: important and disabling diseases, still under-researched. *Br Med J* 1994, 309: 355-356.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998, 115: 182-205.
- Forman MB, Stone GW, Jackson EK. Role of adenosine as adjunctive therapy in acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drug Rev* 2006, 24: 116-147.
- Fornai M, Blandizzi C, Antonioli L, *et al.* Differential role of cyclooxygenase 1 and 2 isoforms in the modulation of colonic neuromuscular function in experimental inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006, 317, 938-945.
- Fornai M, Natale G, Colucci R, *et al.* Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005, 372: 79-87.

- Fozard JR, Baur F, Wolber C. Antagonist pharmacology of adenosine A_{2B} receptors from rat, guinea-pig and dog. *Eur J Pharmacol* 2003, 475: 79-84.
- Franceschi S, Panza E, La Vecchia C *et al.* Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *Am J Epidemiol* 1987, 125: 445-452.
- Fredholm BB, Ljzerman AP, Jacobson KA, *et al.* International union of pharmacology: XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001, 53: 527-552.
- Frieling T, Cooke HJ, Wood JD. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitisation to milk antigen. *Am J Physiol* 1994, 267, G1087-G1093.
- Frieling T, Palmer JM, Cooke HJ *et al.* Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *J Auton Nerv Syst* 1997, 66: 131-137.
- Gadangi P, Longaker M, Naime D, *et al.* The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J Immunol* 1996, 156: 1937-1941.
- Gershon MD, Kirchgessner AL, Wode PR. Functional anatomy of the enteric nervous system. *In: Physiology of the Gastrointestinal tract, 3rd ed, Johnson L R, Alpers D H, Jacobson E D, Walsh J H (editors); Raven press, New York; 381-422,1994.*

- Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *New Engl J Med* 1996, 334: 1106-1115.
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 2004, 447: 728-734.
- Hansen MB. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 2003; 92: 249-257.
- Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004, 25: 33-39.
- Hein TW, Kuo L. cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine: role of nitric oxide, G proteins, and K (ATP) channels. *Circ Res* 1999, 85: 634-642.
- Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med* 1993, 55: 364-379.
- Horiuchi H. Recent advance in antiplatelet therapy: the mechanisms, evidence and approach to the problems. *Ann Med* 2005, 38: 162-172.
- Hosseini JM, Goldhill JM, Bossone C *et al.* Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 1999, 11: 347-356.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411: 599-603.

- Huizinga J D, Thuneberg L, Kluppel M, *et al.* W/kit gene required for intestinal cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995, 373: 347-349.
- Hyde RJ, Cass CE, Young JD, *et al.* The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoform. *Mol Membr Biol* 2001, 18: 53-63.
- Jackson EK, Zhu C, Tofovic SP. Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002, 283: F41-F51.
- Janing W. Neurobiology of visceral afferent neurons: neuroanatomy, functions, organ regulations and sensation. *Biol Psychol* 1996, 42: 29-51.
- Jurjus AR, Khoury NH, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004, 50: 81-92.
- Kadowaki M, Nagakura Y, Tokita K, *et al.* Adenosine A₁ receptor blockade reverses experimental postoperative ileus in rat colon. *Eur J Pharmacol* 2003, 458: 197-200.
- Kadowaki M, Tokita K, Nagakura Y, *et al.* Adenosine A₁ receptor blockade reverses dysmotility induced by ischemia-reperfusion in rat colon. *Eur J Pharmacol* 2000, 409: 319-323.

- Kankuri E, Vaali K, Korpela R, *et al.* Effects of COX-2 preferential agent nimesulide on TNBS-induced acute inflammation in the gut. *Inflammation* 2001, 25: 301-310.
- Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, *et al.* Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A_{2A} receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* 2001, 167: 4026-4032.
- Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002, 14: 99-108.
- Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *J Immunol* 2004, 113: 427-437.
- Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002, 16: 1997-2015.
- Kuno M, Seki N, Tsujimoto S, *et al.* Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938. *Eur J Pharmacol* 2006, 534: 241-249.
- Kwok YN, McIntosh C, Brown N. Augmentation of release of gastric somatostatin-like immunoreactivity by adenosine, adenosine triphosphate and their analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 255: 781-788.

- Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 2001, 939: 74-84.
- Le Douarin NM, Dupin E, Ziller C. Genetic and epigenetic control in neural crest development *Curr Opin Genet Dev* 1994, 4: 685-695.
- Lesch CA, Kraus ER, Sanchez B, *et al.* Lack of beneficial effect of COX-2 inhibitors in an experimental model of colitis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999, 21: 99-104.
- Liang BT, Jacobson KA. A physiological role of adenosine A₃ receptor: sustained cardioprotection. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 6995-6996.
- Lim WC, Hanauer SB. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2004, 4: 66-85.
- Lindberg E, Tysk C, Anderson K, *et al.* Smoking and inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 1988, 29: 352-357.
- Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2003, 547: 589-601.
- Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001, 41: 775-787.
- Linden J. Purinergic chemotaxis. *Science* 2006, 314, 1689-1690.

- Liu S, Hu HZ, Gao N, *et al.* Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *Am J Physiol* 2003, 284: G154-G164.
- Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2005, 17: 4-15.
- Luttrell LM. Transmembrane signalling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 2006, 332: 3-49.
- Madara JL, Patapoff TW, Gillele-Castro B, *et al.* 5'-adenosine monophosphate in the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest* 1993, 91: 2320-2325.
- Madara JL, Podolsky DK, King NW *et al.* Characterization of spontaneous colitis in cotton-top tamarins (*Sanguinus oedipus*) and its response to sulfasalazine. *Gastroenterology* 1985, 88: 13-19.
- Madretsma S, Wolters LM, van Dijk JP. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996, 8: 1017-1020
- Mahida YR, Johal S. NF-kB may determine whether epithelial cell-microbial interactions in the intestine are hostile or friendly. *Clin Exp Immunol* 2001, 123: 347-349.

- Marquardt DL, Walker LL, Heinemann S. Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 1994, 152: 4508-4515.
- Marquez E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, *et al.* Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. *J Pineal Res* 2006, 40: 48-55.
- Martin GR, Wallace JL. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med* 2006, 231: 130-137.
- Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil* 2004, 16: 133-136.
- McCafferty DM, Wallace JL, Sharkey KA. Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat. *Am J Physiol* 1997, 272: G272-G280.
- Miller LG, Goldstein G, Murphy M *et al.* Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking: analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest* 1982, 82: 526-529.
- Ming FS, Mustafa J. Adenosine-mediated bronchoconstriction and lung inflammation in an allergic mouse model. *Pul Pharmacol Ther* 2002, 15: 147-155.

- Modlinger PS, Welch WJ. Adenosine A₁ receptor antagonists and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003, 12: 497-502.
- Mohsenin A, Blackburn MR. Adenosine signalling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2006, 12: 54-59.
- Moreau JL, Huber G. Central adenosine A_{2A} receptor: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* 1999, 31: 65-82.
- Morteau O, More J, Pons L *et al.* Platelet-activating factor and interleukin 1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1993, 104: 47-56.
- Mubagwa K, Flameng W. Adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001, 52: 25-39.
- Murayama T, Itahashi Y, Nomura Y. Possible involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins and D2 dopamine receptors in the A₁ adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 1990, 55: 1631-1638.
- Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, *et al.* An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 297: 1122-1128.
- Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, *et al.* An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene

- sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 297 :1122-1128.
- Nicholls J, Hourani SMO. Characterization of adenosine receptors on rat ileum, ileal longitudinal muscle and muscolaris mucosae. *Eur J Pharmacol* 1997, 338: 143-150.
- Noji T, Karasawa A, Kusaka H. Adenosine uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2004, 8: 1-16.
- Odashima M, Bamias G, Rivera-Nieves J, *et al.* Activation of A_{2A} adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005, 129: 26-33.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411: 603-606.
- Olah ME, Roudabush FL. Down-regulation of vascular endothelial growth factor expression after A_{2A} adenosine receptor activation in PC12 pheochromocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 293: 779-787.
- Oz HS, Chen TS, McClain CJ, *et al.* Antioxidants as a novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005, 16: 297-304.
- Pacheco I, Michiro O, Jin M, *et al.* Corticosteroid pre-treatment prevents small intestinal lesions induced by acetic acid-perfusion model in rats. *Dig Dis Sci* 2000, 45: 2337-2346.

- Pagonopoulou O, Efthimiadou A, Asimakoupolos B, *et al.* Modulatory role of adenosine and its receptors in epilepsy : possible therapeutic approaches. *Neurosci Res* 2006, 56: 14-20.
- Palmer JM, Wong-Riley M, Sharkey KA. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. *Am J Physiol* 1998, 275: G922-G935.
- Panther E, Corinti S, Idzko M, *et al.* Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 2003, 101: 3985-3990.
- Pedata F, Gianfriddo M, Turchi D, *et al.* The protective effect of adenosina A_{2A} receptor antagonism in cerebral ischemia. *Neurol Res* 2005, 27: 169-174.
- Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA, *et al.* Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2B} receptors from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 187: 86-93.
- Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. Recent advances on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 2005, 52: 749-758.

- Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediate responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002, 20: 488-496.
- Poulsen SA, Quinn RJ. Adenosine receptor: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem* 1998, 6: 619-641.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998, 50: 413-492.
- Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, *et al.* Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 2003, 547: 531-542.
- Ribeiro JA. What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005, 4: 325-329.
- Ritzel MW, Nog AM, Yao SY, *et al.* Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺ dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib.). *Mol Membr Biol* 2001, 18: 65-72.
- Rivkees SA, Reppert SM. RFL9 encodes an A_{2B}-adenosine receptor *Mol Endocrinol* 1992, 6: 1598-1604.
- Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, eds.

- Inflammatory Bowel Disease*, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000: 153-178.
- Sauders PR, Santos J, Hanssen NP, *et al.* Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci* 2002, 47: 208-215.
- Sawynok J, Liu JX. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Progress in Neurobiology* 2003, 69: 313-340.
- Sawynok J. Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2007, 177: 309-328.
- Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol motil* 2004, 16: 55-59.
- Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2006, 29: 647-654.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine A₂ receptor mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996, 48: 167-189.
- Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002, 359: 62-69.
- Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001, 120: 622-635.

- Sharkey KA, Mawe GM. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2002, 2: 669-677.
- Shea-Donohue T, Goldhill JM, Montcalm-Mazzilli E, *et al.* Role of sensory afferents in the myoelectric response to acute enteric inflammation in the rabbit. *Am J Physiol* 1997, 273: G447-G455.
- Siegmund B, Rieder F, Albrich S, *et al.* Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 2001, 296: 99-105.
- Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, *et al.* Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A_{2A}. *Annu Rev Immunol* 2004, 22: 657-682.
- Smith SR, Denhardt G, Terminelli C. A role for histamine in cytokine modulation by the adenosine A₃ receptor agonist, 2-Cl-IB-MECA. *Eur J Pharmacol* 2002, 457: 57-69.
- Soderholm JD, Yates DA, Gareau MG, *et al.* Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol* 2002, 283: G1257-G1263.
- Spicuzza L, Bonfiglio C, Polosa R. Reserch applications and implications of adenosine in diseased airways. *Trend Pharmacol Sci* 2003, 24: 409-413.
- Srivastava ED, Barton JR, O'Mahony S. Smoking, humoral immunity, and ulcerative colitis. *Gut* 1991, 32: 1016-1019.

- Stone TW, Bartrup JT. Electropharmacology of adenosine. *Adenosine in the Nervous System* (Stone T, ed);. 197-216 2002. Academic Press, London.
- Swain SD, Siemsen DW, Nelson LK, *et al.* Inhibition of the neutrophil NADPH oxidase by adenosine is associated with increased movement of flavocytochrome B between subcellular fractions. *Inflammation*; 2003, 27: 45-58.
- Talero E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, *et al.* Galanin in the trinitrobenzene sulfonic acid rat model of experimental colitis. *Int Immunopharmacol* 2006, 6: 1404-1412.
- Theis MK, Boyko EJ. Patients perception of causes of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1994, 89: 397-404.
- Thiel M, Caldwell CC, Sitkovsky MV. The critical role of adenosine A_{2A} receptor in down regulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infections disease. *Microbes and Infection* 2003, 5: 515-526.
- Tofovic SP, Zacharia L, Carcillo JA, *et al.* Inhibition of adenosine deaminase attenuates endotoxin-induced release of cytokines in vivo in rats. *Shock* 2001, 16: 196-202.
- Turler A, Moore BA, Pezzone MA, *et al.* Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann Surg* 2002, 236: 56-66.

- van Heel DA, McGovern DPB, Jewell DP. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. *Lancet* 2001, 357, 1902-1904.
- Vermillion DL, Huizinga JD, Riddell RH, *et al.* Altered small intestinal smooth muscle function in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993, 104: 1692-1699.
- Virdis A, Colucci R, Fornai M, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxin shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 312: 945-953.
- Wallace JL, Keenan CM. Leukotriene B4 potentiates colonic ulceration in the rat. *Dig Dis Sci* 1990, 35: 622-629.
- Wang J, Schaner ME, Thomassen S, *et al.* Functional and molecular characteristics of Na⁺-dependent nucleoside transporters. *Pharm Res* 1997, 14: 1524-1532.
- Wang YZ, Palmer JM, Cooke HJ. Neuroimmune regulation of colonic secretion in guinea pigs. *Am J Physiol* 1991, 260: G307-G314.
- Welch WJ. Adenosine type 1 receptor antagonists in fluid retaining disorders. *Expert Opin Investig Drugs*; 2002, 11: 1553-1562.

- Wirtz S, and Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2000, 15: 144-160.
- Wood J D, -“Physiology of the enteric nervous system”- *In: Physiology of the Gastrointestinal tract Johnson L R,(editors),New York: Raven; pp. 432-482, 1994.*
- Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 2004, 127: 635-657.
- Yao SY, Ng AM, Myzyka WR, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzyl thiosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transport proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissue. *J Biol Chem* 1997, 272: 28423-28430.
- Yildirim M, Marangoz C. Anticonvulsivant effects of focal and intracerebroventricular adenosine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Res* 2007, 1127: 193-200.
- Yip L e Kwok YN. Role of adenosine A_{2A} receptor in the regulation of gastric somatostatin release. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 309: 804-815.
- Yip L, Leung HC, Kwok YN. Effect of omeprazole on gastric adenosine A₁ and A_{2A} receptor gene expression and function. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 311: 180-189.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare sentitamente per avermi dato la possibilità di intraprendere questo importante percorso formativo e per l'aiuto e il sostegno ricevuti durante gli anni di frequenza del Corso di Dottorato il Prof. Mario Del Tacca, Prof. Corrado Blandizzi, Prof.ssa Maria Cristina Breschi, Dr. Matteo Fornai, Dr.ssa Rocchina Colucci, Dr.ssa Narcisa Ghisu, Dr. Marco Tuccori.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Federico Da Settimo, alle Dr.sse Concettina La Motta e Laura Mugnaini del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Pisa, per avermi concesso di utilizzare il nuovo inibitore di adenosina deaminasi APP.

Ringrazio infine il Prof. Massimo Chiarugi, Dr. Piero Bucciatti e Colleghi della Clinica Chirurgica Universitaria, Ospedale S. Chiara di Pisa, per avermi dato la possibilità di utilizzare i campioni umani.