



# UNIVERSITÀ DI PISA

## CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

### TESI DI LAUREA

**MECCANISMI FISIOPATOLOGICI ALLA BASE  
DELL'ENTEROPATIA INDOTTA DA FARMACI ANTI-  
INFIAMMATORI NON STEROIDEI: STUDIO DI  
CONFRONTO TRA CELECOXIB ED ETORICOXIB**

**Relatore**

Chiar.mo Prof. Corrado Blandizzi

**Candidato**

Erika Tirotta

Anno Accademico 2013-2014

## **INDICE**

|                                                                 |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1. Introduzione</b>                                          | <b>-2-</b>  |
| 1.1 FANS e meccanismo d'azione                                  | -3-         |
| 1.2 Distribuzione tissutale di COX-1 e COX-2                    | -5-         |
| 1.2.1 Ciclo-ossigenasi-1                                        | -5-         |
| 1.2.2 Ciclo-ossigenasi-2                                        | -6-         |
| 1.3 Funzioni biologiche mediate dai prostanoidi                 | -11-        |
| 1.4 Farmaci inibitori delle ciclo-ossigenasi                    | -15-        |
| 1.5 Fisiopatologia del danno gastro-intestinale indotto da FANS | -20-        |
| 1.5.1 Tratto digestivo superiore                                | -20-        |
| 1.5.2 Tratto digestivo inferiore                                | -23-        |
| 1.5.3 Patogenesi del danno al piccolo intestino                 | -25-        |
| 1.6 Diagnosi di danno                                           | -29-        |
| 1.7 ns-FANS vs COXIB                                            | -31-        |
| <b>2. OBIETTIVO</b>                                             | <b>-35-</b> |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b>                                    | <b>-35-</b> |

|                                                                                |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| 3.1 Animali e disegno sperimentale                                             | -35- |
| 3.2 Trattamento farmacologico                                                  | -36- |
| 3.3 Dosaggio dell'emoglobina plasmatica                                        | -38- |
| 3.4 Valutazione microscopica del danno GI                                      | -38- |
| 3.5 Dosaggio dei livelli di PGE <sub>2</sub> nella mucosa intestinale          | -39- |
| 3.6 Analisi western blot dell'espressione di COX-1 e COX-2                     | -40- |
| 3.7 Valutazione della funzione mitocondriale                                   | -42- |
| 3.8 Valutazione del danno ossidativo tissutale e dell'infiltrato infiammatorio | -45- |
| 3.9 Analisi statistica                                                         | -46- |
| <b>4. RISULTATI</b>                                                            | -47- |
| 4.1 Aspetto macroscopico dell'intestino                                        | -47- |
| 4.2 Mortalità                                                                  | -48- |
| 4.3 Valutazione delle variazioni del peso corporeo                             | -48- |
| 4.4 Pressione arteriosa sistolica e frequenza cardiaca                         | -49- |
| 4.5 Analisi dell'emoglobina plasmatica                                         | -50- |
| 4.6 Valutazione microscopica del danno intestinale                             | -51- |

|                                                 |      |
|-------------------------------------------------|------|
| 4.7 Valutazione dei livelli di PGE <sub>2</sub> | -56- |
| 4.8 Analisi Western blot di COX-1 e COX-2       | -57- |
| 4.9 Valutazione della funzione mitocondriale    | -59- |
| 4.10 Valutazione dei livelli di malondialdeide  | -63- |
| 4.11 Dosaggio dei livelli di mieloperossidasi   | -65- |
| 4.12 Analisi di correlazione                    | -67- |
| <b>5. DISCUSSIONE</b>                           | -69- |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b>                          | -77- |

# PARTE GENERALE

## 1. INTRODUZIONE

I Farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), rappresentano la categoria di medicinali maggiormente prescritti per la loro efficacia nel trattamento del dolore, febbre, infiammazione e malattie reumatiche. L'effetto anti-infiammatorio, antipiretico e analgesico di questi composti li ha resi la classe più prescritta tra tutti i farmaci per il trattamento delle affezioni dell'apparato muscolo scheletrico, quali artropatie infiammatorie e cronico-degenerative. Inoltre, studi clinici hanno fornito evidenze a supporto dell'efficacia dei FANS anche in numerose altre condizioni dolorose, quali reumatismi extra-articolari, stati post-traumatici, dolore post-operatorio, dismenorrea primaria, dolore oncologico, odontoiatrico, emicrania e inoltre vengono spesso assunti senza prescrizione medica per dolori di lieve entità. Se da un lato i FANS rappresentano il gold standard nel trattamento delle affezioni a carattere flogistico, dall'altro sono ben noti gli effetti collaterali legati alla loro assunzione cronica. Gli effetti indesiderati più significativi comprendono reazioni avverse epatiche, renali, cardiocircolatorie, sebbene la caratteristica più nota dei FANS è la propensione a provocare eventi avversi a carico dell'apparato gastro-intestinale, che possono

includere dispepsia, lesioni gastriche più o meno gravi e, specialmente in gruppi di pazienti a rischio (precedenti ulcere, uso concomitante di anticoagulanti e corticosteroidi, helicobacter pylori, ecc.) e per trattamenti prolungati, complicanze gastro-intestinali gravi come erosioni, ulcere e sanguinamenti, con un'incidenza 4 o 5 volte superiore rispetto a quella osservata nei soggetti che non utilizzano farmaci di questa classe (Hernandez-Diaz e Garcia Rodriguez, 2001; Garcia Rodriguez e Hernandez-Diaz, 2001). In molti casi, le lesioni da FANS sono asintomatiche e se di lieve entità scompaiono dopo la sospensione del trattamento.

### **1.1 FANS e meccanismo d'azione**

I FANS, nonostante rappresentano un gruppo di farmaci chimicamente differenti tra di loro, sono caratterizzati da un meccanismo comune alla base dei loro effetti terapeutici. Esercitano la loro azione farmacologica attraverso l'inibizione della ciclo-ossigenasi (COX) che permette la trasformazione dell'acido arachidonico in prostaglandine (PG) e trombossani, dotate di numerose funzioni biologiche: citoprotezione del tratto gastrointestinale, funzionalità piastrinica, omeostasi renale, funzionalità uterina, regolazione del ciclo

sonno-veglia, della temperatura corporea, e altre. Tuttavia, la sintesi delle prostaglandine, è un fenomeno abbastanza complesso, che inizia con il rilascio di acido arachidonico a partire dai fosfolipidi contenuti nelle membrane cellulari, ad opera dell'enzima fosfolipasi. Dall'acido arachidonico, per mezzo di reazioni ossidative dirette o di trasformazioni enzimatiche, si possono formare vari prodotti biologicamente attivi distinguibili in prostanoidi, leucotrieni, acidi tetraenoici e isoprostani (Murakami e Kudo, 2003).

I prostanoidi, rappresentati da prostaglandine ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e trombossano ( $\text{TXA}_2$ ), si formano dall'acido arachidonico per opera dell'enzima ciclo-ossigenasi, denominata anche prostaglandina endoperossido  $\text{H}_2$  sintetasi o prostaglandina G/H sintetasi. Questa proteina è caratterizzata dalla capacità di svolgere due attività enzimatiche: una di tipo ciclo-ossigenasico, che promuove l'ossigenazione dell'acido arachidonico con formazione di  $\text{PGG}_2$ , e una di tipo perossidasi, che conduce alla formazione di  $\text{PGH}_2$ . Successivamente, si verifica la conversione della  $\text{PGH}_2$  nei principali prostanoidi per mezzo di specifiche reductasi e isomerasi tissutali (Smith e Song, 2002). Agli inizi degli anni '90 si scoprì che le COX esistono in due isoforme: ciclossigenasi-1 (COX-1) e ciclossigenasi-2 (COX-2). Le due



isoforme sono presenti in quantità variabili nei distretti dell'organismo, dove svolgono funzioni fisiologiche distinte.

## **1.2 Distribuzione tissutale di COX-1 e COX-2**

### **1.2.1 Ciclo-ossigenasi-1**

Nel sistema nervoso centrale la COX-1 è distribuita uniformemente in molte aree, con un'espressione particolarmente marcata a livello del proencefalo. Si ritiene quindi che le prostaglandine, prodotte in questo distretto cerebrale, siano coinvolte nella regolazione di alcune complesse funzioni integrative quali, per esempio, la modulazione del sistema nervoso autonomo e di alcuni processi sensoriali (Kaufmann et al., 1997). A livello del sistema cardiocircolatorio la COX-1 svolge un ruolo molto importante, soprattutto nelle piastrine dove promuove la sintesi di trombossano  $A_2$  ( $TXA_2$ ), un prostanoide coinvolto nella regolazione dei meccanismi di attivazione ed aggregazione piastrinica. COX-1 è costitutivamente espressa anche nell'endotelio e nella muscolatura liscia dei vasi dove, anche se con un ruolo minore rispetto a COX-2, contribuisce alla sintesi della prostaciclina e svolge un'attività antiaggregante piastrinica oltre a promuovere il rilassamento della muscolatura liscia (Catella-Lawson e Crofford, 2001; Morita, 2002).

Studi basati su tecniche di biologia molecolare ed immunoistochimica hanno dimostrato che COX-1 è espressa in maniera costitutiva in tutte le regioni del sistema gastrointestinale, anche se con un profilo di distribuzione disomogeneo. I prostanoidei prodotti da COX-1 sono coinvolti sia nei meccanismi di protezione della mucosa digestiva che nella regolazione delle funzioni secretive e motorie (Fornai et al., 2010). L'azione protettiva svolta da COX-1 è complessa e dipende da numerosi fattori. Ad esempio, attraverso la produzione di PGE<sub>2</sub> e prostaciclina, COX-1 inibisce la secrezione gastrica acida, stimola la secrezione di muco e potenzia il flusso ematico della mucosa. Il blocco tissutale di questa isoforma enzimatica delle ciclo-ossigenasi ad opera dei FANS sembra contribuire in maniera significativa all'insorgenza di lesioni ulcerative a carico della mucosa digestiva (Parente e Perretti, 2003).

Nel rene è stata dimostrata l'espressione costitutiva di COX-1 sia a livello della porzione midollare che di quella corticale, con una maggiore presenza in corrispondenza di quest'ultima regione. Nei vari distretti del tessuto renale COX-1 media la produzione di prostaglandine, soprattutto PGE<sub>2</sub>, le quali svolgono un ruolo importante nell'autoregolazione e nel mantenimento della funzione renale. Questi mediatori controllano

infatti l'emodinamica, l'attività glomerulare e quella tubulare. Le azioni regolatrici dei prostanoidei acquistano un significato particolarmente rilevante in presenza di eventi patologici associati a compromissione delle funzioni renali, com'è dimostrato dalle sindromi di insufficienza renale che possono insorgere in seguito all'uso di farmaci inibitori delle ciclo-ossigenasi in soggetti anziani o in pazienti con malattie renali o patologie sistemiche associate a riduzione della perfusione ematica renale (Morita, 2002).

### **1.2.2 Ciclo-ossigenasi-2**

Pur essendo a carattere prevalentemente inducibile, la COX-2 si trova espressa in maniera costitutiva a livello del sistema nervoso centrale, della trachea, del testicolo, dell'ovaio e dell'utero (Turini e Dubois, 2002). Nel sistema nervoso centrale COX-2 è distribuita soprattutto nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo e nel midollo spinale. In quest'ultimo distretto COX-2 svolge un ruolo importante in quanto la sua espressione non è stabile ma può essere regolata da variazioni fisiologiche o patologiche dell'attività dei neuroni (ad esempio crisi epilettiche). Queste osservazioni suggeriscono che le prostaglandine siano in grado di contribuire in maniera significativa ai

meccanismi di regolazione della trasmissione nervosa e che gli inibitori selettivi di COX-2 possano dunque svolgere effetti terapeutici utili bloccando l'attività enzimatica di questa isoforma a livello del sistema nervoso centrale. Diversi dati sperimentali dimostrano che COX-2, sia come isoforma costitutivamente espressa che come isoforma inducibile, regola le funzioni del centro termoregolatore ipotalamico e facilita la trasmissione del dolore a livello del midollo spinale (Samad et al., 2002). Inoltre, nei pazienti con malattia di Alzheimer l'espressione di COX-2 risulta aumentata nelle aree cerebrali deputate al controllo delle funzioni mnesiche e cognitive (corteccia, ippocampo) e numerose evidenze sperimentali suggeriscono che COX-2 sia significativamente coinvolta nella fisiopatologia di questa malattia neurodegenerativa (Pasinetti, 2001 ; Cakala e Strosznajder, 2010).

Alcuni autori hanno dimostrato che l'espressione di COX-2 nei diversi segmenti del tratto gastrointestinale è molto bassa o comunque trascurabile in condizioni basali, mentre viene rapidamente indotta in seguito all'insorgenza di processi flogistici o neoplastici a carico della mucosa. Per esempio, una marcata induzione di COX-2 si osserva in seguito ad infezione da *Helicobacter pylori*, un batterio patogeno responsabile di gastrite cronica e lesioni ulcerative. Numerosi studi

hanno evidenziato che *Helicobacter pylori* promuove la liberazione di PGE<sub>2</sub> da parte di cellule gastriche *in vitro* e causa un aumento dell'espressione di COX-2 e, conseguentemente, un incremento della produzione di PGE<sub>2</sub> nella mucosa gastrica dei pazienti con infezione. Secondo alcuni autori questo fenomeno potrebbe rappresentare un meccanismo difensivo della mucosa nei confronti del processo infettivo sostenuto dal batterio (Halter et al., 2001). Livelli elevati di COX-2 sono stati riscontrati, sia nell'uomo che in modelli animali, anche in vari tipi di neoplasie a carico dell'intestino. Ciò ha permesso di ipotizzare un ruolo di questo enzima nell'insorgenza e progressione del carcinoma intestinale. Numerose evidenze sperimentali hanno poi avvalorato quest'ipotesi, dimostrando che il trattamento con inibitori selettivi di COX-2 causa una riduzione significativa dell'attività proliferativa di linee cellulari derivate da carcinomi colon-rettali. Su tali basi è stato proposto l'uso dei bloccanti di COX-2 per la chemio-prevenzione ed il trattamento dei carcinomi del colon e di altre patologie tumorali digestive (Dubois, 2003; Wang e Dubois, 2010).

Studi sul sistema cardiocircolatorio hanno dimostrato che COX-2 risulta espressa in maniera costitutiva nelle cellule endoteliali e muscolari lisce dei vasi e tali osservazioni suggeriscono che COX-2 sia

coinvolta nei meccanismi di difesa della parete vascolare, contribuendo alla regolazione della produzione endoteliale di prostaciclina, dotata di attività vasodilatatrice ed antitrombotica. È stato inoltre evidenziato un incremento significativo dell'espressione di COX-2 nelle cellule della parete vascolare in seguito a stimolazione con citochine pro-infiammatorie, fattori di crescita e lipopolisaccaride batterico (LPS). È stato quindi ipotizzato che COX-2 possa essere indotta nei vasi per svolgere attività pro-infiammatoria ed anti-trombotica in presenza di processi degenerativi associati a rischio di aggregazione piastrinica e complicazioni di tipo ischemico, come nel caso della patologia aterosclerotica (Parente e Perretti, 2003).

Nel rene si osserva una marcata espressione di COX-2 soprattutto a livello della macula densa e delle cellule interstiziali della midollare. Com'è noto, la macula densa svolge un ruolo molto importante nella regolazione della funzione renale e nella regolazione della pressione arteriosa sistemica attraverso il controllo della liberazione di renina, della filtrazione glomerulare e del riassorbimento tubulare (Harris, 2002).

### 1.3 Funzioni biologiche mediate dai prostanoidi

Il ruolo delle prostaglandine (in particolare di  $PGE_2$ ) nella sintomatologia tipica dell'infiammazione è stato ampiamente documentato. Nei siti dove insorge uno stato infiammatorio, la ciclo-ossigenasi, da origine a prostaglandine responsabili dell'effetto flogogeno e quindi arrossamento, aumento del flusso ematico nelle aree di infiammazione acuta, potenziamento dell'effetto della bradichinina sensibilizzando le fibre C afferenti agli altri stimoli nocivi ed inoltre le prostaglandine della serie E sono anche coinvolte nel determinare l'aumento della temperatura corporea e quindi febbre (Dubois et al., 1998). Il blocco della sua biosintesi da parte dei FANS determina scomparsa o riduzione di tali eventi indesiderati.

A livello del sistema cardiovascolare la  $PGE_2$  è un potente vasodilatatore ed agisce sia nei distretti arteriolarari che pre- e post-capillari. La  $PGD_2$  svolge invece sia effetti vasodilatatori che vasocostrittori. Tuttavia in alcuni settori vascolari, compresi quelli mesenterico, renale e coronarico, la vasodilatazione si manifesta a concentrazioni più basse rispetto a quelle necessarie per ottenere vasocostrizione. Nel distretto polmonare la  $PGD_2$  causa vasocostrizione. La  $PGI_2$  possiede proprietà vasodilatatrici ed è in grado di svolgere

un'attività ipotensiva che è circa cinque volte più elevata rispetto a quella della  $PGE_2$ . Il  $TXA_2$  è un potente vasocostrittore in grado di contrarre la muscolatura liscia dell'albero bronchiale e dei vasi *in vitro*, e di esercitare effetti vasocostrittori in modelli animali *in vivo*.

A livello ematico le prostaglandine ed i loro analoghi modulano la funzione piastrinica. La  $PGI_2$  inibisce l'aggregazione piastrinica nel sangue umano *in vitro* a concentrazioni molto basse (1-10 nM). Questo effetto, insieme all'osservazione che questo mediatore è attivamente prodotto dall'endotelio, ha permesso di stabilire che la  $PGI_2$  modula l'aggregazione piastrinica *in vivo* e contribuisce alle proprietà antitrombotiche della parete vascolare integra. Al contrario, il  $TXA_2$  rappresenta il principale metabolita dell'acido arachidonico a livello piastrinico e possiede potenti proprietà pro-aggreganti. Le vie che portano all'aggregazione per opera di questo prostanoide sono sensibili all'azione inibitrice dell'aspirina.

Le prostaglandine sono capaci di influenzare l'escrezione renale di acqua e di sali, non solo modificando il flusso ematico, ma anche attraverso un'azione diretta sui tubuli renali.  $PGE_2$  e  $PGI_2$ , infuse direttamente nelle arterie renali, potenziano il flusso sanguigno e provocano diuresi, natriuresi e kaliuresi, mantenendo inalterata la



velocità di filtrazione glomerulare.  $\text{TXA}_2$ , al contrario, riduce il flusso ematico e la filtrazione glomerulare.  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGD}_2$  sono inoltre in grado di indurre la secrezione di renina, apparentemente attraverso un effetto diretto sulle cellule iuxtaglomerulari (Harris, 2002). Nel sistema respiratorio le PGF e la  $\text{PGD}_2$  svolgono attività contratturante, mentre  $\text{PGE}_2$  rilassa la muscolatura liscia bronchiale e tracheale.  $\text{TXA}_2$  ha la capacità di stimolare la contrazione della muscolatura bronchiale umana, mentre  $\text{PGE}_2$  causa broncodilatazione in molte specie. Il tessuto bronchiale umano è particolarmente sensibile a questa azione e, a tale livello, la prostaciclina è in grado di antagonizzare efficacemente la broncocostrizione indotta da altri agenti.

Nell'utero di donne non gravide PGF e  $\text{TXA}_2$  inducono effetti contratturanti, mentre  $\text{PGE}_2$  svolge azioni opposte. Durante la gravidanza l'effetto della  $\text{PGE}_2$  diviene contratturante a basse dosi e la responsività uterina a tale mediatore aumenta con il progredire della gestazione. La produzione di  $\text{PGF}_{2\alpha}$  subisce un incremento durante questo periodo e specialmente durante il termine della gravidanza, contribuendo così ad avviare e sostenere il travaglio (Challis et al., 2002).

Molte delle azioni biologiche dei prostanoidi si osservano a livello del sistema digerente, sia per quanto riguarda l'attività della muscolatura liscia che della mucosa. La muscolatura longitudinale, dallo stomaco al colon, è stimolata sia dalle PGE che dalle PGF, mentre quella circolare generalmente si rilassa in risposta alle PGE e si contrae in risposta alle PGF.  $\text{TXA}_2$  e  $\text{PGI}_2$  inducono effetti contrattili, ma presentano un'attività minore rispetto a quella delle PGE e delle PGF. *In vivo* le prostaglandine causano un aumento del transito intestinale sia nel tenue che nel colon. Diarrea, crampi e reflusso biliare sono stati osservati dopo somministrazione orale di PGE nell'uomo. Le PGE e la prostaciclina inibiscono la secrezione gastrica acida stimolata dal cibo, dall'istamina o dalla gastrina. Il volume delle secrezioni, l'acidità ed il contenuto di pepsina sono ridotte probabilmente a causa dell'effetto diretto sulle cellule secretive. Inoltre, la prostaciclina svolge effetti vasodilatatori a livello della mucosa gastrica e sembra essere coinvolta nella regolazione del flusso ematico in tale distretto. La secrezione di muco nello stomaco e nel tenue viene inoltre potenziata dalla  $\text{PGE}_2$  contribuendo a sostenere l'integrità della barriera mucosa. E' noto infatti che le prostaglandine svolgono un ruolo protettivo a livello della mucosa gastrica non solo mantenendo la secrezione di muco e

bicarbonato, ma anche sostenendo il microcircolo e contribuendo alla riparazione di processi ulcerativi (Eberhart e Dubois, 1995; Wallace, 2001). Le principali funzioni svolte dai prostanoidi sono schematizzate nella tabella 1.

**Tabella 1** principali funzioni svolte dai prostanoidi

| <b>Attività biologica</b>                       | <b>Prostanoide</b>                   |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Rilassamento della muscolatura liscia vascolare | PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>  |
| Contrazione della muscolatura liscia vascolare  | TXA <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> |
| Induzione dell'aggregazione piastrinica         | TXA <sub>2</sub>                     |
| Inibizione dell'aggregazione piastrinica        | PGI <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub>  |
| Contrazione della muscolatura liscia bronchiale | PGF <sub>2α</sub> , PGD <sub>2</sub> |
| Aumento del flusso sanguigno renale             | PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>  |
| Protezione della mucosa gastrica                | PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>  |
| Contrazione della muscolatura liscia uterina    | PGF <sub>2α</sub> , PGE <sub>2</sub> |

#### **1.4 Farmaci inibitori delle ciclo-ossigenasi**

Secondo i dati riportati, è stato possibile prefigurare che:

- il ruolo della COX-1 è fondamentalmente finalizzato alla regolazione di funzioni omeostatiche dell'organismo, quali il mantenimento dell'integrità della mucosa gastrica, della funzionalità piastrinica e del flusso del sangue nel rene;

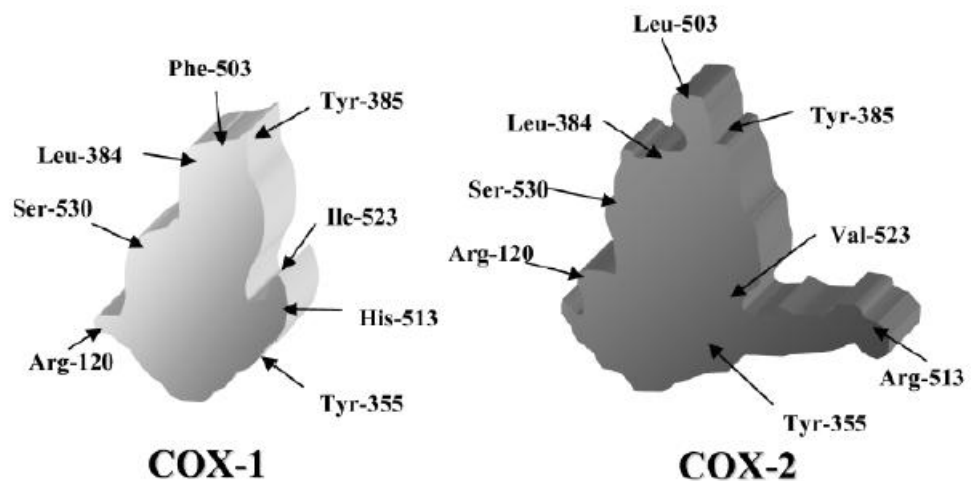
- il ruolo della COX-2, rapidamente indotta e strettamente regolata, è quello di intervenire nei processi infiammatori o in altri tipi di danno tissutale.

I livelli di COX-1 possono essere aumentate di 2-4 volte in seguito a stimoli infiammatori (citochine, endotossine, fattori di crescita, ecc.) mentre i livelli di COX-2 possono aumentare di 10-20 volte, particolarmente in macrofagi, monociti, sinoviociti, condrociti, fibroblasti, osteoblasti e cellule endoteliali, permettendo di stabilire che la COX-2 è responsabile della biosintesi di prostaglandine flogogene.

La tappa successiva alla scoperta dell'esistenza di due isoforme di COX è stata quella di ipotizzare che all'inibizione della COX-2 siano da attribuire gli effetti analgesici, antipiretici ed anti-infiammatori dei FANS, mentre l'inibizione della COX-1 sia legata alla loro tossicità organo specifica (gastrica, renale ecc). Secondo questa teoria la tossicità dei FANS è da correlare alla mancanza di selettività nell'inibizione di COX-1 e COX-2. In altri termini, a dosi che riducono o bloccano la produzione di prostaglandine flogogene, i FANS sopprimono anche la sintesi di prostaglandine derivate dalla COX-1, ad azione protettiva. A partire da ciò, lo sforzo della ricerca è stato finalizzato alla sintesi di farmaci in grado di inibire selettivamente la COX-2 senza quindi esercitare alcuna

influenza sulla COX-1. A 100 anni dalla nascita dell'acido acetilsalicilico (1899), primo prodotto di sintesi usato nel trattamento delle malattie reumatiche, si sono resi disponibili i primi due inibitori selettivi della COX-2, celecoxib e rofecoxib. Questo è stato possibile poiché, pur mostrando un'elevata analogia molecolare, COX-1 e COX-2, presentano importanti differenze funzionali derivanti da variazioni strutturali minime a livello degli aminoacidi che partecipano alla formazione del sito catalitico (Figura 1).

In particolare, è stato stabilito che l'aspirina, un FANS non selettivo (ns-FANS) causa un'inibizione irreversibile sia di COX-1 che di COX-2 attraverso l'acetilazione del residuo di serina in posizione 530 (Ser-530) (Marnett, 2002).

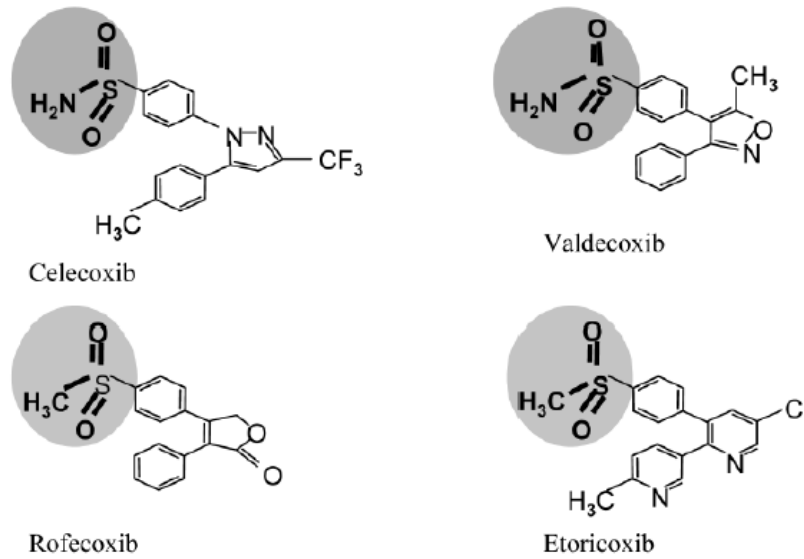


**Figura 1** Rappresentazione dei siti aminoacidici di COX-1 e COX-2 coinvolti nell'interazione con i FANS tradizionali e con gli inibitori selettivi di COX-2.

Studi cristallografici condotti su COX-1 e COX-2 hanno permesso di evidenziare regioni molecolari enzimatiche adiacenti a Ser-530 dotate di elevata affinità per il gruppo salicilato. Uno di questi siti è rappresentato dall'arginina in posizione 120 (Arg-120) che svolge un ruolo importante nel legame del residuo carbossilico dell'acido arachidonico, substrato naturale delle ciclo-ossigenasi. Arg-120 è localizzata a distanza di 9,7 Å dal gruppo idrossilico di Ser-530 nella COX-1 e di 10,3 Å nella COX-2 ed è ciò che consente all'aspirina di legarsi in stretta prossimità del sito catalitico (Figura 2).

L'importanza del ruolo di Arg-120 è stata dimostrata da uno studio di cristallografia svolto su COX-1 dopo incubazione con acido bromo-acetilsalicilico. I risultati ottenuti suggeriscono un'interazione tra il gruppo bromo-acetilico e Ser-530 ed un legame tra Arg-120 alla base del sito catalitico e l'acido salicilico, avvalorando l'ipotesi di un modello molecolare secondo cui il gruppo salicilico, interagendo con Arg-120, permette l'attacco della frazione acetilica al residuo Ser-530. L'aspirina presenta una cinetica di inibizione delle ciclo-ossigenasi peculiare in quanto il blocco enzimatico è dovuto ad una modificazione covalente della struttura proteica e quindi ad un'inibizione di tipo irreversibile (Loll et al., 1996).

Gli inibitori selettivi di COX-2 che sono stati finora messi a punto comprendono celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib e parecoxib (pro-farmaco di valdecoxib). Questi farmaci sono tutti caratterizzati da una struttura diarileterociclica. Studi svolti sul rapporto struttura-attività hanno dimostrato l'importanza del gruppo solfonamidico (celecoxib, valdecoxib, parecoxib) e del gruppo metilsolfonico (rofecoxib, etoricoxib), entrambi in grado di inserirsi in una nicchia presente all'interno del canale idrofobico dell'enzima (tasca laterale). Questa tasca risulta più facilmente accessibile in COX-2 rispetto a COX-1 a causa della sostituzione di un residuo di isoleucina con uno di valina in posizione 523. Altre differenze strutturali tra le due isoforme enzimatiche sono alla base della capacità di COX-2 di formare legami a idrogeno preferenziali con farmaci contenenti gruppi solfonamidici o metilsolfonici (Figura 5). Attualmente, gli unici due inibitori selettivi di COX-2 rimasti in commercio comprendono celecoxib ed etoricoxib, in quanto gli altri farmaci sono stati ritirati dal commercio in seguito ad una elevata incidenza di eventi avversi cardiocircolatori (Baron et al., 2008; Nussmeier et al., 2005).



**Figura 2** Gli inibitori selettivi di COX-2 sono dotati di gruppi solfonamidici o metilsolfonici capaci di penetrare all'interno della tasca laterale di COX-2 e di instaurare legami a idrogeno.

## 1.5 Fisiopatologia del danno gastro-intestinale indotto da FANS

### 1.5.1 Tratto digestivo superiore

La fisiopatologia del danno della mucosa gastrica indotto da FANS dipende in parte dall'inibizione delle COX ed in parte da meccanismi COX-indipendenti (Laine et al., 2008). L'inibizione delle COX può aumentare la suscettibilità della mucosa gastrica all'azione dei FANS attraverso la soppressione di diverse funzioni protettive svolte dalle prostaglandine. Per esempio, le prostaglandine inibiscono l'attivazione dei neutrofili ed il rilascio locale di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Di



conseguenza, attraverso il blocco della sintesi delle prostaglandine, i FANS favoriscono il reclutamento e l'adesione endoteliale dei neutrofili circolanti (Whittle, 2002). Una volta aderiti, i neutrofili ostruiscono il microcircolo causando una diminuzione del flusso sanguigno locale a livello della mucosa e favoriscono il rilascio di fattori tissutali dannosi, come enzimi proteolitici e leucotrieni, che innalzano il tono vascolare esacerbando l'ischemia a livello tissutale. Questi processi stimolano la produzione di ROS e promuovono la distruzione della matrice causando così necrosi tissutale, soprattutto in presenza di valori di pH bassi che si riscontrano a livello del lume gastrico (Jiménez et al., 2004).

I FANS, inoltre, sempre con meccanismi COX-dipendenti, vanno ad inibire la secrezione di ioni bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) contribuendo ulteriormente a favorire la formazione di lesioni tissutali. Infatti, la produzione di tali ioni genera un gradiente di pH a livello della superficie mucosa del tratto gastroduodenale e questo costituisce una prima linea difensiva nei confronti dell'acidità del lume (Allen e Flemström, 2005).

Molti FANS possiedono caratteristiche di acidi deboli e si ritiene che questa loro proprietà possa contribuire allo sviluppo del danno a livello della mucosa gastrica in maniera COX-indipendente. Quando questi composti con caratteristiche strutturali di tipo acido si trovano

esposti ad un ambiente fortemente acido, la loro forma indissociata ed idrofobica è in grado di attraversare le membrane cellulari ed accumularsi nelle cellule epiteliali, all'interno delle quali il pH assume valori di circa 7,4. A tali valori di pH questi composti passano in forma ionica, rimanendo così intrappolati all'interno delle cellule. Questo accumulo intracellulare sembra responsabile dell'attivazione di alcuni meccanismi che possono contribuire allo sviluppo del danno tissutale, come per esempio il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale. La conseguenza di questa disfunzione mitocondriale è una riduzione della produzione di ATP ed un incremento dei livelli di ATP e AMP, i quali, a loro volta, causano un incremento dei livelli intracellulari di calcio. Tutti questi cambiamenti sono seguiti da danni a livello degli stessi mitocondri, dall'aumento della produzione di ROS e dall'alterazione del bilancio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  che porta ad un indebolimento della barriera della mucosa ed a necrosi cellulare (Wallace e Ma, 2001; Bjarnason et al., 2007). Più basso è il pKa maggiore è la suscettibilità al danno mitocondriale (ASA, indometacina, naprossene). Viceversa, farmaci con alto pKa si accumulano poco nelle cellule e quindi nei mitocondri.

Nonostante sia ampiamente riconosciuto che l'uso dei FANS si associ all'insorgenza di eventi avversi nel tratto gastrointestinale superiore (GI), alcune evidenze sperimentali hanno suggerito che questi farmaci possano anche esercitare effetti negativi sul tratto gastrointestinale inferiore, con esiti potenzialmente gravi (perforazione, sanguinamento evidente e stenosi) (Scarpignato e Hunt, 2010; Zeino et al., 2010).

### **1.5.2 Tratto digestivo inferiore**

Recentemente, l'avvento dell'enterocapsula (CE) e i risultati dello studio CONDOR (Chan et al., 2010), hanno confermato la capacità dei FANS di indurre lo sviluppo di danno intestinale. La patogenesi sarebbe multi-fattoriale ma rimane ancora poco conosciuta. Sebbene la tossicità sul tratto gastrointestinale inferiore dei ns-FANS è spesso sottovalutata, ci sono studi che dimostrano come la sua prevalenza può addirittura superare quella registrata per il tratto gastrointestinale superiore, con una frequenza di complicanze che rappresentano circa un terzo di tutti i danni del tratto GI (Scarpignato, 2008; Zeino et al., 2010). Negli ultimi 10 anni, si è infatti verificata una riduzione delle ospedalizzazioni a causa di complicanze del tratto digerente superiore, sebbene si sia registrato un aumento del danno a livello del piccolo intestino, con una gravità

superiore a quelle manifestatesi a livello gastro-duodenale (Lanas, et al., 2009). In letteratura sono presenti diversi studi che dimostrano come l'uso cronico di FANS può indurre lesioni a livello del piccolo intestino nell'uomo.

Goldstein et al. (2005) ha dimostrato come lesioni della mucosa dell'intestino tenue si sono verificate nel 55% dei volontari sani che avevano assunto naprossene per 2 settimane. Inoltre, Graham et al. (2005), dopo aver eseguito analisi con CE in pazienti artritici che avevano assunto FANS per almeno 3 mesi, ha evidenziato la presenza di lesioni intestinali nel 71% dei pazienti esaminati. Attraverso studi condotti mediante l'uso della CE, è stata inoltre dimostrata la presenza di edema intestinale, petecchie, erosioni e ulcerazione del piccolo intestino nel 40% dei pazienti reumatici trattati con FANS (Graham et al., 2005; Costamagna et al., 2002), confermando precedenti dati autoptici (Allison et al., 1992).

L'assunzione di FANS può essere associata ad eventi acuti e cronici. In acuto si può avere la comparsa di diarrea, che può rappresentare una delle maggiori cause di tutti gli eventi registrati nella pratica clinica (Etienney et al., 2003) mentre l'assunzione cronica può causare enteropatia da FANS, associata a sanguinamento lieve e continuo che, a

lungo termine, porta ad anemia (Moore et al., 2008) e nel 40-70% da malassorbimento intestinale e perdita di proteine (Bjarnason et al., Lancet 1987; Bjarnason et al., Scand J Rheumatol Suppl 1987), mentre nei casi più gravi si può avere emorragie digestive e perforazione.

### **1.5.3 Patogenesi del danno al piccolo intestino**

I fattori di rischio associati all' enteropatia indotta da FANS non sono stati ancora completamente identificati. In letteratura sono presenti tuttavia alcuni studi che includono tra i fattori di rischio, l'invecchiamento, storia di precedente danno GI da FANS e la malattia diverticolare del colon (Ballinger, 2008; Bardou e Barkun, 2010; Lanas et al, 2012). Per quanto riguarda i meccanismi di danno sul tratto digestivo inferiore sembrerebbe che l'inibizione degli isoenzimi della ciclo-ossigenasi (COX-1, COX-2), e la conseguente riduzione dei prostanoidei endogeni, non siano sufficienti a spiegare completamente le alterazioni dell'integrità della mucosa intestinale e l'aumento della sua permeabilità osservata durante trattamenti con ns-FANS (Bjarnason e Takeuchi, 2009). E' noto che il contatto diretto e prolungato di questi farmaci con la mucosa intestinale svolge un ruolo importante nella patogenesi di enteropatia indotta da FANS, e che la tossicità è

strettamente legata alla loro struttura chimica acida/lipofila (Bjarnason, 2013). Infatti, le proprietà chimiche peculiari della maggior parte dei FANS non selettivi permettono loro di penetrare nelle cellule epiteliali intestinali dando luogo a un massiccio accumulo intracellulare. Questo aumento di concentrazione del farmaco intracellulare porta alla inibizione della fosforilazione ossidativa mitocondriale, con conseguente carenza di ATP, seguita da grave danno ossidativo, marcata disfunzione delle giunzioni intercellulari strette e la morte cellulare per apoptosi (Scarpignato, 2008; Thiéfin e Beaugerie, 2005). Queste alterazioni determinano un incremento della permeabilità della mucosa intestinale, e di conseguenza una maggiore esposizione agli aggressori luminali (batteri e loro prodotti di degradazione, acidi biliari, secrezione pancreatica, ecc.) e insorgenza di gravi reazioni infiammatorie (Bjarnsson e Takeuchi, 2009) fino alla produzione di ulcere ed erosioni. In particolare, il rilascio di endotossine batteriche nella parete intestinale, promuove la produzione di citochine pro-infiammatorie (ad esempio, interleuchina-1 e fattore di necrosi tumorale TNF), chemiotassi e attivazione dei neutrofili, con successivo incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (Zeino et al., 2010).

In uno studio è stato dimostrato come la somministrazione di FANS nel ratto, possa determinare un profondo cambiamento sia nel numero che nel tipo di batteri enterici, con un sostanziale aumento di batteri gram-negativi. Questo sembra contribuire in modo significativo allo sviluppo di piccole ulcere intestinali (Reuter et al., 1997; Hagiwara et al., 2004; Wallace et al., 2011).

È importante sottolineare che il cambiamento dei batteri intestinali si verifica solo con i FANS che subiscono il circolo enteroepatico (Reuter et al., 1997). Ciò può spiegare la presenza delle lesioni dell'epitelio indotte dal contatto ripetuto col farmaco, il quale subisce ricircolo attraverso l'intestino (Reuter et al., 1997). Inoltre, alcuni batteri hanno la capacità di deconiugare gli acidi biliari (Shindo et al., 1998), e anche questo potrebbe avere un ruolo fondamentale nel promuovere il danno intestinale.

In seguito all'alterazione della mucosa intestinale, i batteri gram-negativi presenti nel lume intestinale, possono attraversare le cellule della parete intestinale e incontrare il recettore Toll-Like TLR4, espresso sulla membrana cellulare dei macrofagi e capace di riconoscere la componente LPS del batterio. Il loro incontro si traduce, mediante la proteina MyD88-dipendente del TLR4, nell'attivazione della cascata

infiammatoria con la produzione di citochine, reclutamento dei neutrofili e successivo rilascio di specie reattive dell'ossigeno portando ad un'ulteriore lesione della mucosa intestinale.

Alla luce di questo, uno studio (Watanabe et al., 2008) ha dimostrato come la cascata infiammatoria indotta dai batteri potrebbe essere ridotta attraverso la rimozione dei batteri commensali/saprofiti mediante la somministrazione di antibiotici quali ampicillina e aztreonam, o attraverso il blocco del TLR4 mediante la somministrazione di un antagonista (Scarpignato, 2007).

Non vi sono dati rilevanti che dimostrino un ruolo determinante degli acidi gastrici nel danno indotto da FANS sulla mucosa intestinale (Hunt et al., 2009), sebbene un'inibizione cronica della secrezione acida gastrica possa causare un'eccessiva crescita di batteri nell'intestino tenue, che potrebbe contribuire all'aumento della gravità dell'enteropatia da FANS (Wallace et al., 2011). Questo fenomeno potrebbe spiegare come l'uso di farmaci inibitori di pompa protonica (IPP) dimostrino una grande efficacia nella prevenzione del danno sulla parete gastro-duodenale indotto da FANS, ma non hanno dimostrato alcuna efficacia sul tratto gastrointestinale inferiore, e in alcuni casi sembrano addirittura potenziarne gli effetti dannosi (Lanas et al., 2009).



## 1.6 Diagnosi di danno

La maggior parte dei pazienti con enteropatia da FANS sono asintomatici. Sono stati sviluppati test più o meno invasivi per valutare il danno della mucosa. Un metodo di diagnosi si basa sull'uso della CE che ha permesso la valutazione della morfologia macroscopica del piccolo intestino (Graham et al., 2005; Goldstein et al., 2005; Goldstein et al., 2007; Hawkey et al., 2008; Maiden et al., 2007), mettendo in evidenza lesioni della mucosa, arrossamento petecchie e sangue nel lume intestinale. Tuttavia, tali manifestazioni non sono un elemento patognomonico per le lesioni da FANS, ma possono manifestarsi in diverse malattie intestinali, in particolare, è talvolta impossibile distinguere l'enteropatia da FANS dalla malattia di Crohn. Rimane comunque una tecnica invasiva, non completamente priva di complicazioni, e inoltre risulta inadatta come test di screening di routine poiché è una metodologia lunga e costosa.

Sono stati compiuti notevoli sforzi per sviluppare metodi non invasivi per poter rilevare anomalie del GI, tra cui le prove di permeabilità (Bjarnason et al., 2009) che risultano essere tra le più utilizzate (Davies, 1998). La permeabilità sia gastrica che del piccolo intestino nell'uomo può essere valutata sfruttando le caratteristiche di

particolari molecole come ad esempio la molecola di saccarosio, la quale rappresenta una sonda ideale per rilevare un aumento della permeabilità gastroduodenale. La sua attività è sito-specifica, poiché questo disaccaride viene rapidamente degradato nel piccolo intestino, rendendolo quindi specifico per il tratto gastrointestinale superiore (Meddings et al., 1993). Il metodo migliore per valutare la permeabilità intestinale è usare come sonda l'acido Cr-etilendiamminotetraacetico (Cr-EDTA) (Hunt et al., 2000), in cui la valutazione viene fatta nella fase successiva, mediante la raccolta e analisi delle urine.

Sfruttando queste tecniche è stato dimostrato che tutti i FANS non selettivi portano ad un aumento della permeabilità intestinale entro le 24 ore dalla ingestione (Bjarnason et al., 2009), con l'eccezione del sulindac e delle molecole prive di struttura acida quali gli inibitori selettivi di COX-2 (Bjarnason I, et al., 2009).

L'enteropatia da FANS può essere valutata inoltre mediante la misurazione di calprotectina fecale (Tibble et al., 1999). Nei pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali come morbo di Chron, è stata dimostrata una perdita maggiore di leucociti nelle feci, correlata quindi ad un aumento della concentrazione di calprotectina nei campioni fecali (Tibble e Bjarnason, 2001). Takanori et al. (2013) hanno

usato la calprotectina fecale come indice per valutare il danno del piccolo intestino, nei pazienti sottoposti a trattamento cronico con FANS. Un'altra caratteristica dei pazienti che assumono FANS è quella di sviluppare anemia. In genere, i pazienti presentano eritrociti di piccole dimensioni, un ematocrito ridotto e quindi carenza di ferro. Tuttavia, la perdita di sangue raramente è tale da causare sanguinamento rettale e melena, e inoltre il test per rilevare il sangue occulto nelle feci è inaffidabile per determinare il sanguinamento intestinale al di sopra della valvola ileocecale (Hunt et al., 2000).

### **1.7 ns-FANS vs COXIB**

È interessante notare che il tipo e la prevalenza di lesioni gastrointestinali nei pazienti trattati con FANS sembrano dipendere dal tipo di farmaco che essi assumono. A tale riguardo, l'introduzione di inibitori selettivi di COX-2 (attualmente celecoxib e etoricoxib) nell'uso clinico come antinfiammatori/analgesici dotati di un maggior grado di selettività per COX-2 rispetto COX-1, è associata con una riduzione significativa (circa 50%) di rischio delle lesioni del tratto gastrointestinale superiore (Moore et al., 2006). Recenti studi, condotti con CE, hanno inoltre dimostrato che i ns-FANS, somministrati in volontari sani, hanno sviluppato un'incidenza di danno intestinale che va dal 55% al 75%,

mentre sembrerebbe che l'uso dei coxib sia associato ad un'incidenza minore, sia per il tratto superiore che inferiore (Maiden et al., 2007; Maiden, 2009; Graham et al., 2005; Maiden et al., 2005; Goldstein et al., 2005; Fujimori et al., 2010). Smecuol et al. (2001), hanno dimostrato che la permeabilità intestinale aumenta notevolmente con l'uso di naprossene, indometacina e meloxicam ma non con il celecoxib e che la permeabilità del colon non è significativamente aumentata con nessuno dei 4 farmaci. Sono stati ottenuti risultati simili con etoricoxib in uno studio in cui è stato valutato il sangue occulto nelle feci (Hunt et al., 2003). Mediante l'uso della CE è stata osservata un'incidenza minore di danno intestinale in pazienti che assumevano celecoxib rispetto ai pazienti che assumevano in associazione FANS-IPP (Goldstein et al., 2005; Goldstein et al., 2007; Hawkey et al., 2008). Lo studio VIGOR ha messo in evidenza come gli eventi avversi del tratto GI inferiore, si manifestavano con la stessa frequenza di quelli che si manifestavano nel tratto GI superiore e come l'uso di rofecoxib (50mg/die) rispetto al naprossene (500 mg bid) dava un'incidenza minore del 50-60% di danno GI (Laine et al., 2003). Contrariamente, altri studi clinici, condotti nel quadro del programma MEDAL, in cui sono stati confrontati etoricoxib, un inibitore COX-2 dotato di un valore basso pKa (Okumu et al., 2009), e

ns-FANS come diclofenac, hanno mostrato eventi avversi GI simili (Laine et al., 2007). Lo studio CONDOR (Chan et al., 2010) dimostra invece come un trattamento di 6 mesi con celecoxib, inibitore COX-2 con pKa elevato (Bjarnason et al., 2007) è associato con una minore incidenza di eventi gastrointestinali clinicamente significativi rispetto a quella registrata nei pazienti trattati con un'associazione di diclofenac e omeprazolo. Sulla base dei dati clinici attuali, è possibile ipotizzare che il profilo di sicurezza favorevole di celecoxib, sia a livello del tratto gastrointestinale superiore che inferiore, potrebbe non dipendere interamente dalla selettività per COX-2 ma dalle sue peculiari proprietà chimiche (mancanza di struttura acida).

# **PARTE SPERIMENTALE**

## **2. OBIETTIVO**

La presente tesi è stata condotta allo scopo di valutare gli effetti di celecoxib, in confronto con etoricoxib ed due ns-FANS, indometacina e diclofenac, sull'integrità intestinale in ratti anziani, allo scopo di identificare i meccanismi primari coinvolti nella fisiopatologia del danno intestinale.

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Animali e disegno sperimentale**

Gli esperimenti sono stati eseguiti su ratti Wistar maschi (500-600 g) di 40 settimane. Gli animali sono stati alloggiati, 3 unità per gabbia, in ambiente a temperatura di 22-24°C, umidità controllata del 50-60%, alimentati con mangime standard del commercio ed acqua di rubinetto *ad libitum* e sottoposti ad esposizione alla luce per 12 ore al giorno.

Lo studio è stato preceduto da una fase preliminare, allo scopo di identificare la minima dose di farmaco e il minor tempo, necessari a provocare alterazioni sul tratto GI. A tal fine, sono state somministrate dosi crescenti di farmaco per via intra-gastrica, 2 volte al giorno e gli effetti sono stati valutati a 7 e 14 giorni dall'inizio del trattamento con: indometacina 2, 3 e 4 mg/Kg/die; diclofenac 4, 8 e 12 mg/Kg/die; etoricoxib 2.5, 5 e 10 mg/Kg/die; celecoxib 2, 4 e 8 mg/Kg/die.

Indometacina e diclofenac sono stati testati sia in assenza che in presenza di omeprazolo 0.7 mg/Kg/die somministrato al mattino una volta al giorno (Berenguer et al., 2002). Allo stesso tempo, si è cercato di mantenere per ciascun farmaco, la dose capace di esercitare i propri effetti inibitori su COX-1 e/o COX-2.

### **3.2 Trattamento farmacologico**

Gli esperimenti sono stati condotti con il seguente schema di trattamento:

Gruppo 1: veicolo (Methocel 1 %)

Gruppo 2: indometacina 3 mg/Kg/die

Gruppo 3: indometacina 3 mg/Kg/die + omeprazolo 0,7 mg/Kg/die

Gruppo 4: diclofenac 8 mg/Kg/die

Gruppo 5: diclofenac 8 mg/Kg/die + omeprazolo 0,7 mg/Kg/die

Gruppo 6: etoricoxib 5 mg/Kg/die

Gruppo 7: celecoxib 4 mg/Kg/die

Gli animali sono stati sottoposti a trattamento con i farmaci in studio per 14 giorni, due volte al giorno (ore 9:00 e 19:00), per via intragastrica, sospesi in 300 ml di veicolo, con eccezione di omeprazolo,



somministrato soltanto al mattino, 1 ora prima dalla somministrazione del FANS. Il peso corporeo di ogni animale è stato valutato due volte a settimana, in modo da aggiustare il dosaggio del farmaco in base al peso. Inoltre, la pressione sistolica e la frequenza cardiaca sono state misurate prima di iniziare il trattamento e al momento del sacrificio. Ventiquattro ore dopo la fine del trattamento, i ratti sono stati anestetizzati con cloralio idrato e sottoposti al prelievo di sangue attraverso l'aorta addominale. Ogni campione è stato poi impiegato nell'analisi quantitativa dell'emoglobina. Successivamente, l'intero tratto GI è stato asportato e campioni di tessuto intestinale prelevati dall'ileo, dal digiuno prossimale e distale, sono stati isolati e conservati a -80 °C, allo scopo di valutare i seguenti parametri:

1. Concentrazione di PGE<sub>2</sub> nell'ileo
2. Dosaggio della malondialdeide (MDA) e della mieloperossidasi (MPO) nel digiuno e nell'ileo
3. Analisi western blot dell'espressione di COX-1 e COX-2 nell'ileo

Altre porzioni di tessuto, prelevate dal digiuno e dall'ileo, sono state sottoposte ad analisi microscopica del danno intestinale, come riportato di seguito.

### **3.3 Dosaggio dell'emoglobina plasmatica**

La valutazione dei livelli di emoglobina è stata eseguita sui campioni di sangue raccolti come descritto in precedenza, mediante l'impiego di un kit colorimetrico (Quantichrom, Bioassay Systems, Hayward, CA, USA) ed espressa in g/dL.

### **3.4 Valutazione microscopica del danno GI**

La quantificazione del danno intestinale è stata effettuata come descritto da Fornai et al. (2014). Porzioni di digiuno prossimale, distale e ileo sono state immerse in una soluzione di formalina al 10%. Dopo 30 minuti, il tessuto è stato aperto lungo la linea anti-mesenterica, privato del contenuto fecale e fissato in formalina al 10% per 24 h. Dopo la fissazione, i tessuti sono stati incorporati in blocchi di paraffina, tagliati in sezioni seriali e consecutive di 3  $\mu$ m e sottoposte a colorazione con ematossilina ed eosina. Il danno istologico è stato classificato secondo i criteri riportati nella Tabella 2.

**Tabella 2.** Criteri per la valutazione microscopica delle lesioni indotte dai farmaci

|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Lesioni di tipo 1</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Il danno rimane confinato alla tonaca mucosa</li><li>• Disepitelizzazione</li><li>• Alterazioni morfologiche significative dei villi intestinali</li></ul>                                                                                            |
| <b>Lesioni di tipo 2</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Infiltrazione infiammatoria nella sottomucosa, con ispessimento della tonaca muscolare e sierosa</li><li>• La morfologia della mucosa si conserva</li></ul>                                                                                           |
| <b>Lesioni di tipo 3</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Il danno interessa l'intero spessore della parete</li><li>• Perdita della struttura morfologica della tonaca</li><li>• La reazione infiammatoria si estende ampiamente nella tonaca sierosa, con un aumento significativo dell'ispessimento</li></ul> |

### 3.5 Dosaggio dei livelli di PGE<sub>2</sub> nella mucosa intestinale

L'analisi della PGE<sub>2</sub> nella mucosa intestinale è stata effettuata attraverso un kit commerciale ELISA, come descritto da Fornai et al., (2014). I campioni di tessuto prelevato dalla mucosa intestinale sono stati pesati e omogeneizzati in 1 ml di tampone fosfato (PBS 0,1 M, pH 7,4 contenente EDTA 1 mM e indometacina 10 mM) per grammo di tessuto, utilizzando un omogeneizzatore Polytron (QIAGEN, Milano, Italia). L'omogenato ottenuto è stato aggiunto ad uguale volume di

etanolo assoluto, e mescolato con Vortex. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la miscela è stata centrifugata a 1.500 rpm per 10 minuti a 4°C. Il sovrinatante è stato aggiunto di HCl 1 M fino a pH 4. Prima dell'analisi, i campioni sono stati sottoposti a purificazione con colonne Superclean LC-18 SPE (Sigma Co., St. Louis, MO, USA). A tale scopo, 0,5 ml di campione sono stati addizionati a 2 ml di etanolo. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. Il sovrinatante è stato quindi eluito nelle colonne precedentemente attivate con 5 ml di metanolo seguiti da 5 ml di acqua. Dopo l'eluizioni le colonne sono state lavate in sequenza con 5 ml di acqua e 5 ml di esano. La PGE<sub>2</sub> è stata quindi eluita con 5 ml di etile acetato contenente l'1% di metanolo. La frazione eluita è stata sottoposta a completa evaporazione. Le aliquote sono state quindi utilizzate per l'analisi immunoenzimatica e la concentrazione di PGE<sub>2</sub> espressa come pg/mg di tessuto.

### **3.6 Analisi western blot dell'espressione di COX-1 e COX-2**

I campioni di ileo sono stati pesati e omogeneizzati in tampone di lisi contenente 10 mM acido 2-[4-(2-idrossietil)piperazin-1-il]etansolfonico (HEPES), 30 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 2 mM

fenilmetilsulfonil fluoruro, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml aprotinina, 1 mM fluoruro di sodio, 1 mM ortovanadato di sodio, 2% glicerina, 0,3 mM MgCl<sub>2</sub> e 1% Triton X-100. Gli omogenati sono stati centrifugati a 15.000 g per 15 min a 4°C e i sovrinatanti sono stati conservati a -80°C. Il sovrinatante è stato quindi utilizzato per misurare la concentrazione proteica totale tramite il metodo di Bradford (Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Trenta mg di lisato totale sono stati sottoposti a denaturazione tramite bollitura, separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide all'8% contenente sodio dodecilsolfato e trasferiti su membrana Immobilon-P. Le proteine sono state quindi bloccate e marcate con anticorpi primari diretti contro COX-1, COX-2 e β-actina. Le bande sono state sottoposte a rivelazione con anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano. Le bande immunoreattive sono state visualizzate tramite incubazione con reagenti chemiluminescenti ed esposte a scansione con Codak Image Station 440 (Carestream Health, Rochester, NY) per l'acquisizione e l'analisi densitometrica delle immagini.

### 3.7 Valutazione della funzione mitocondriale

La frazione mitocondriale è stata ottenuta dal tessuto epatico (Calderone et al., 2010). La scelta di utilizzare mitocondri epatici, è stata dettata dall'impossibilità di estrarre mitocondri sani dai tessuti intestinali, in quantità tali da ottenere risultati sufficienti. Tuttavia, evidenze sperimentali dimostrano l'assenza di differenze significative, tra i mitocondri isolati dai diversi organi in risposta ad agenti disaccoppianti o inibitori della catena respiratoria (Tyler, 1991; Diao et al., 2012). La sospensione mitocondriale ottenuta è stata suddivisa in due aliquote di cui una (2 mg proteine mitocondriali/ml) è stata utilizzata per valutare il potenziale di membrana mitocondriale, mentre l'altra (0,8 mg proteine mitocondriali/ml) è stata utilizzata per valutare la respirazione mitocondriale mediante il consumo di ossigeno. Il potenziale basale della membrana mitocondriale (preso come indice di riserva energetica) e le sue variazioni, indotte da noti agenti disaccoppianti come il 2,4-dinitrofenolo (DNP) e il cianuro di carbonile m-clorofenil idrazina (CCCP), sono stati registrati potenziometricamente con l'utilizzo di un mini-elettrodo sensibile al tetrafenilfosfonio ( $\text{TPP}^+$ ), ione liposolubile che si distribuisce fra interno ed esterno del mitocondrio in relazione al potenziale di membrana, ed accoppiato con

un elettrodo di riferimento (WPI, FL, USA). Le variazioni di potenziale sono state registrate tramite un sistema di acquisizione dati (Biopac Inc, CA, USA). Prima di ogni esperimento, gli elettrodi sono stati calibrati utilizzando concentrazioni note di TPP<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>. I mitocondri (2 mg di proteina/ml) sono stati sospesi sotto agitazione nel mezzo di incubazione (composizione: KCl 120 mM, K<sub>2</sub>HPO 45 mM, HEPES 10 mM, acido succinico 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 1 mM, TPP<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> 10 mM, pH 7,4). Il valore del potenziale di membrana è stato calcolato secondo l'equazione di Nernst:

$$\Delta\psi = 60 \times \text{Log} \frac{V_0 \cdot \frac{[TPP^+]_0}{[TPP^+]_t} - V_t - K_o P}{V_m P + K_i P}$$

dove  $\Delta\psi$  è il potenziale di membrana mitocondriale (mV),  $V_0$  è il volume del mezzo di incubazione prima dell'aggiunta dei mitocondri,  $V_t$  è il volume del mezzo di incubazione dopo l'aggiunta dei mitocondri,  $V_m$  è il volume della matrice mitocondriale ( $\mu\text{l}/\text{mg}$  di proteina),  $[TPP^+]_0$  e  $[TPP^+]_t$  sono le concentrazioni di TPP<sup>+</sup> registrate prima dell'aggiunta dei mitocondri e al tempo t, rispettivamente, P è la concentrazione delle proteine (mg/ml),  $K_o$  e  $K_i$  sono coefficienti apparenti esterni ed interni

della partizione  $TPP^+$ , e sono stimati in 14,3 ml/mg e 7,9 ml/mg, rispettivamente. Il volume dei mitocondri è stato preso come 1 ml/mg di proteina (Calderone et al., 2010; Testai et al, 2013). Il consumo di ossigeno è stato misurato nei mitocondri con l'elettrodo di Clark (WPI, FL, USA), che consente di misurare cambiamenti rapidi che si riscontrano, nel consumo di ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari, e acquisiti tramite il sistema di analisi APOLLO 4000 (WPI, FL, USA). Le misure sono state effettuate in camere termostate utilizzando un mezzo di incubazione contenente KCl 120 mM, HEPES 10 mM,  $K_2HPO_4$  45 mM, acido succinico 10 mM,  $MgCl_2$  2 mM, rotenone 2 mM, pH 7,4. In particolare, è stato valutato il rapporto di controllo respiratorio (RCR, un indice di integrità della membrana interna), il numero di moli di ATP sintetizzato per mole di ossigeno consumato (ATP/O, un indice dell'efficacia della fosforilazione ossidativa), e il rapporto tra "stato III/UC" (inteso come rapporto tra stato respiratorio e stato disaccoppiato, un ulteriore indice che riflette il grado di funzionalità e l'integrità fisica della membrana interna). L'acido succinico è stato usato come substrato per la respirazione, e le misurazioni sono state fatte sia in assenza di ADP (stato IV, tasso di consumo di ossigeno quando ADP è esaurito) che in presenza (stato III,



tasso di consumo di ossigeno quando ADP è disponibile). Questo ha permesso di calcolare RCR, ossia il rapporto stato III e stato IV, ATP/O cioè il rapporto tra le moli di ATP prodotto e le moli di ossigeno consumato. Infine, per poter valutare il consumo di ossigeno in condizioni di disaccoppiamento è stato aggiunto DNP, permettendo di calcolare il rapporto "Stato III/UC" (Li e Graham , 2012).

### **3.8 Valutazione del danno ossidativo tissutale e dell'infiltrato infiammatorio**

La concentrazione di MDA nei tessuti intestinali è stata determinata per ottenere una stima quantitativa della perossidazione lipidica della membrana (Fornai et al., 2014). A tal fine, i campioni di tessuto intestinale sono stati pesati e omogenati in 2 ml di tampone (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) usando un omogeneizzatore Polytron (QIAGEN, Milano, Italia), e centrifugati a 1.500 g per 10 min a 4°C. Le aliquote dei sovrantanti sono state poi utilizzate per il dosaggio della MDA, usando un kit colorimetrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, U.S.A.). I risultati sono stati espressi in nanomoli di MDA per milligrammo di tessuto intestinale.

La concentrazione tissutale di MPO è stata assunta come indice quantitativo di infiltrazione di cellule polimorfonucleate nella parete

intestinale. I campioni di tessuti intestinali (30 mg) sono stati omogenati con omogeneizzatore Polytron (QIAGEN, Milano, Italia) in 0,6 ml di tampone di lisi (NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, Tris 10 mM, 10 % glicerina, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoruro, 1 mg/ml leupeptina e 28 µg/ml di aprotinina, pH 7.4). L'omogenato è stato centrifugato 2 volte a 4°C per 15 min a 1.500 g. Il sovrantante, diluito in rapporto 1:5, è stato utilizzato per la determinazione della concentrazione di MPO mediante analisi immunoenzimatica (ELISA) (Hycult Biotech, Uden, NL). I risultati sono stati espressi come nanogrammi di MPO per milligrammo di tessuto intestinale.

### **3.9 Analisi statistica**

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media (S.E.M.). Le differenze statistiche sono state valutate tramite analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dall'analisi *post hoc* mediante test di Student-Newman-Keuls, e i valori inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi. L'elaborazione informatica dei risultati è stata eseguita tramite software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). L'analisi della regressione lineare, eseguita con software commerciale (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA), è stata

impiegata per analizzare la correlazione tra l'espressione di COX-2 (espressa come % di variazione vs controllo) con i livelli tissutali di MPO e MDA (espressi come log % di variazione vs controllo) negli animali trattati con indometacina, diclofenac, etoricoxib e celecoxib. L'analisi semi-log, è stata scelta al fine di stabilizzare la varianza (Howell, 2007).

## **4. RISULTATI**

### **4.1 Aspetto macroscopico dell'intestino**

Data la grande estensione superficiale del piccolo intestino, è stato difficile effettuare una stima quantitativa attendibile del danno macroscopico causata dai farmaci. Tuttavia, la verifica qualitativa ha permesso di documentare la presenza di alterazioni macroscopiche, incluse stenosi e lesioni ulcerative multiple, negli animali trattati con indometacina o diclofenac, sia in assenza che in presenza di omeprazolo. Al contrario, nessuna alterazione macroscopica apprezzabile è stata rilevata nei tessuti intestinali ottenuti da ratti trattati con etoricoxib e celecoxib.

## **4.2 Mortalità**

La mortalità osservata nel gruppo di animali trattati con indometacina è stata pari a circa il 40%, mentre in combinazione con omeprazolo è risultata intorno al 20%. Nel gruppo di animali trattati con diclofenac la mortalità è stata all'incirca del 28%, mentre negli altri gruppi di trattamento, non è stato rilevato alcun decesso (Tabella 3).

## **4.3 Valutazione delle variazioni di peso corporeo**

Gli animali trattati con il veicolo, hanno mostrato un aumento del peso corporeo di  $10 \pm 2,4$  e  $22,5 \pm 3,4$  g, rispettivamente a 7 e 14 giorni (Tabella 3). La somministrazione di indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac e diclofenac più omeprazolo per 7 o 14 giorni è risultata associata ad una riduzione significativa del peso corporeo. Gli animali trattati con etoricoxib hanno mostrato una riduzione significativa del peso corporeo dopo 14 giorni di trattamento, mentre la somministrazione di celecoxib è risultata associata ad una riduzione del peso corporeo sia a 7 e 14 giorni, senza tuttavia raggiungere la significatività statistica rispetto al controllo (Tabella 3).

**Tabella 3.** Variazioni del peso corporeo e mortalità nei gruppi di trattamento

| GRUPPI DI TRATTAMENTO     | VARIAZIONI PESO (g) |              | Numero di animali | Decessi |
|---------------------------|---------------------|--------------|-------------------|---------|
|                           | GIORNO 7            | GIORNO 14    |                   |         |
| CONTROLLO                 | +10.0 ± 2.4         | +22.5 ± 3.4  | 10                | 0       |
| INDOMETACINA              | -10.6 ± 2.0*        | -26.2 ± 3.1* | 18                | 7       |
| INDOMETACINA + OMEPRAZOLO | -17.5 ± 5.9*        | -28.0 ± 6.4* | 14                | 3       |
| DICLOFENAC                | -10 ± 4.6*          | -39 ± 8.3*   | 14                | 4       |
| DICLOFENAC + OMEPRAZOLO   | -17.5 ± 4.2*        | -30.0 ± 8.0* | 10                | 0       |
| ETORICOXIB                | +8.3 ± 1.7          | -5.0 ± 2.9*  | 10                | 0       |
| CELECOXIB                 | -2.5 ± 2.5          | -2.3 ± 2.1   | 10                | 0       |

\*P<0.05, differenza significativa vs controllo

#### 4.4 Pressione arteriosa sistolica e frequenza cardiaca

La pressione arteriosa sistolica media, registrata nei ratti di controllo, è risultata di 120 ± 3.5 mmHg, mentre la frequenza cardiaca 350 ± 15 bpm (Tabella 4). Negli animali trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib o celecoxib per 14 giorni, non sono state registrate variazioni significative di entrambi i parametri (Tabella 4).

#### **4.5 Analisi dell'emoglobina plasmatica**

La valutazione dei livelli di emoglobina nel sangue è stata assunta come indice indiretto di sanguinamento indotto dai farmaci nel tratto gastrointestinale (Sanchez et al., 2002). Nei ratti trattati con il veicolo per 14 giorni, la concentrazione di emoglobina era pari a  $14 \pm 0,3$  g/dl (Tabella 4). La somministrazione di indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac o diclofenac più omeprazolo per 14 giorni hanno determinato una riduzione dei livelli di emoglobina nel sangue. Nessun cambiamento significativo è stato rilevato negli animali trattati con celecoxib, mentre negli animali trattati con etoricoxib si è registrata una tendenza alla riduzione dei livelli di emoglobina nel sangue, anche se i valori ottenuti non hanno raggiunto la significatività statistica (Tabella 4).

**Tabella 4.** Pressione sistolica, frequenza cardiaca e livelli di emoglobina nei ratti a 14 giorni di trattamento

|                                  | Dosaggio     | Pressione sistolica (mmHg) | Frequenza cardiaca (bpm) | Emoglobina (g/dL) |
|----------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|-------------------|
| <b>CONTROLLO</b>                 |              | 120±3.5                    | 350±15                   | 14±0.3            |
| <b>INDOMETACINA</b>              | 3 mg/Kg/die  | 115±3                      | 371±17                   | 11.6±0.1*         |
| <b>INDOMETACINA + OMEPRAZOLO</b> | 3 mg/Kg/die  | 114±5                      | 372±15                   | 11.8±1.2*         |
| <b>DICLOFENAC</b>                | 8 mg/Kg/die  | 118±3.8                    | 352±8.9                  | 12.1±0.6*         |
| <b>DICLOFENAC + OMEPRAZOLO</b>   | 8 mg/Kg /die | 116±3                      | 355±11                   | 11.9±0.8*         |
| <b>ETORICOXIB</b>                | 5 mg/Kg /die | 125±4.2                    | 345±11                   | 12.6±0.4          |
| <b>CELECOXIB</b>                 | 4 mg/Kg /die | 121±2.15                   | 350±12                   | 13.8±0.5          |

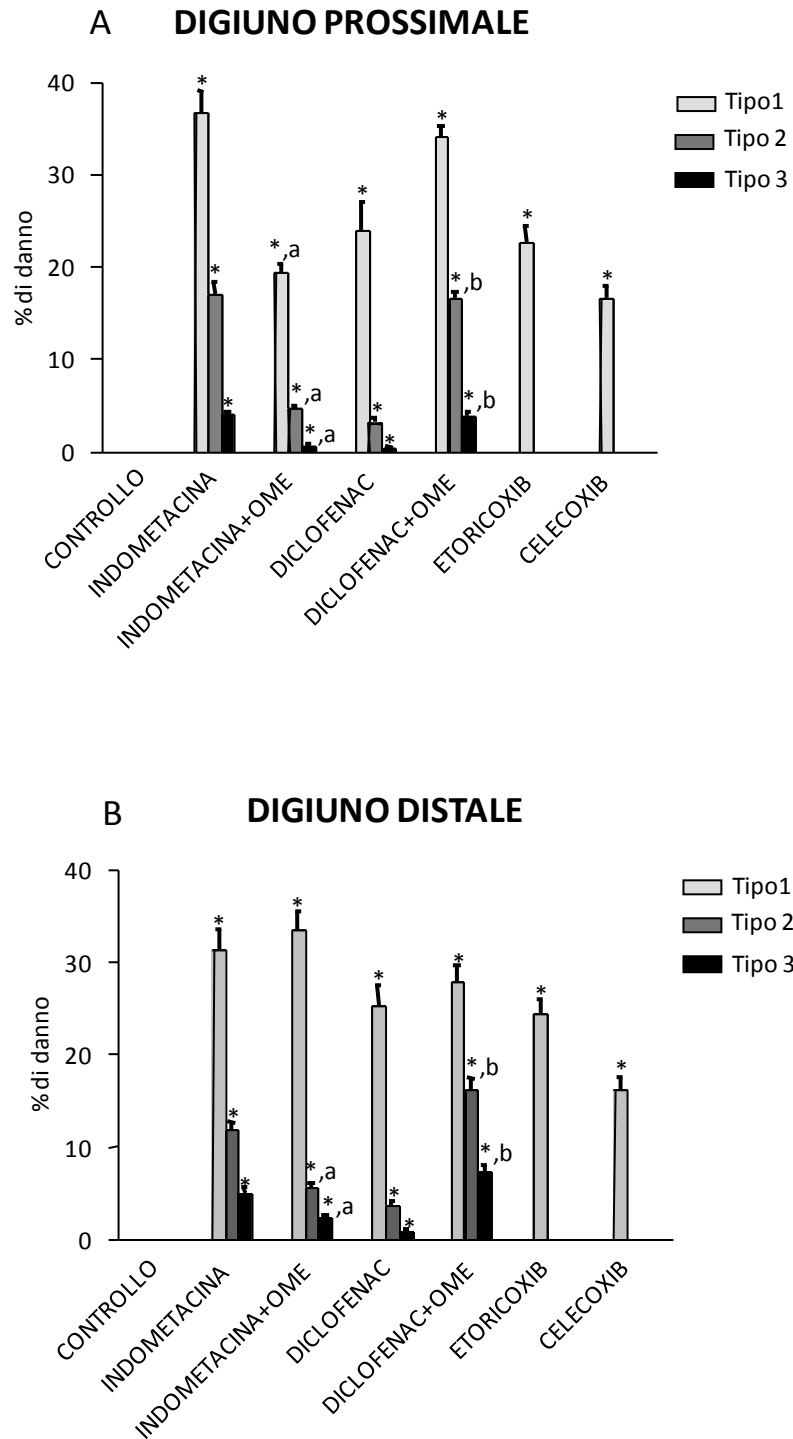
\*P<0.05, differenza significativa vs controllo

#### 4.6 Valutazione microscopica del danno intestinale

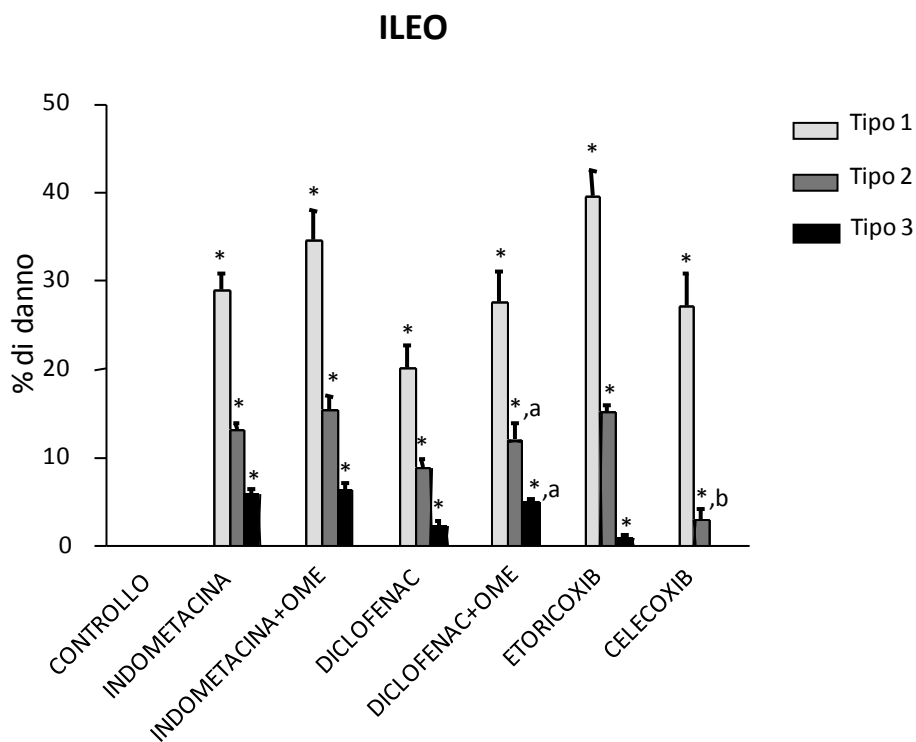
L'analisi istologica ha evidenziato che i ratti trattati con indometacina, diclofenac, etoricoxib e celecoxib hanno sviluppato lesioni di tipo I sia nel digiuno che nell'ileo (Figura 3 e 4). Nel digiuno, indometacina e diclofenac hanno causato lesioni di tipo II e III, mentre etoricoxib e celecoxib non hanno portato ad alcuna lesione significativa. Nel gruppo di animali trattati con indometacina più omeprazolo, si è osservata una riduzione delle lesioni di tipo II e III, rispetto al

trattamento con sola indometacina, mentre i ratti trattati con omeprazolo più diclofenac hanno riportato lesioni di tipo II e III con un'incidenza di danno significativamente maggiore rispetto ai ratti trattati con solo diclofenac (Figura 3). Nell'ileo, tutti i farmaci hanno causato lesioni di tipo I. I trattamenti con indometacina, diclofenac, etoricoxib e, in misura significativamente minore, celecoxib, hanno determinato l'insorgenza di lesioni di tipo II. Omeprazolo non ha avuto alcuna influenza sull'entità delle lesioni di tipo II indotte dall'indometacina nell'ileo, mentre ha causato un aumento significativo degli effetti dannosi evocati da diclofenac. Lesioni di tipo III sono state osservate nell'ileo dei ratti trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo e, in misura minore con etoricoxib, mentre celecoxib non ha causato alcuna lesione di questo tipo (Figura 4).

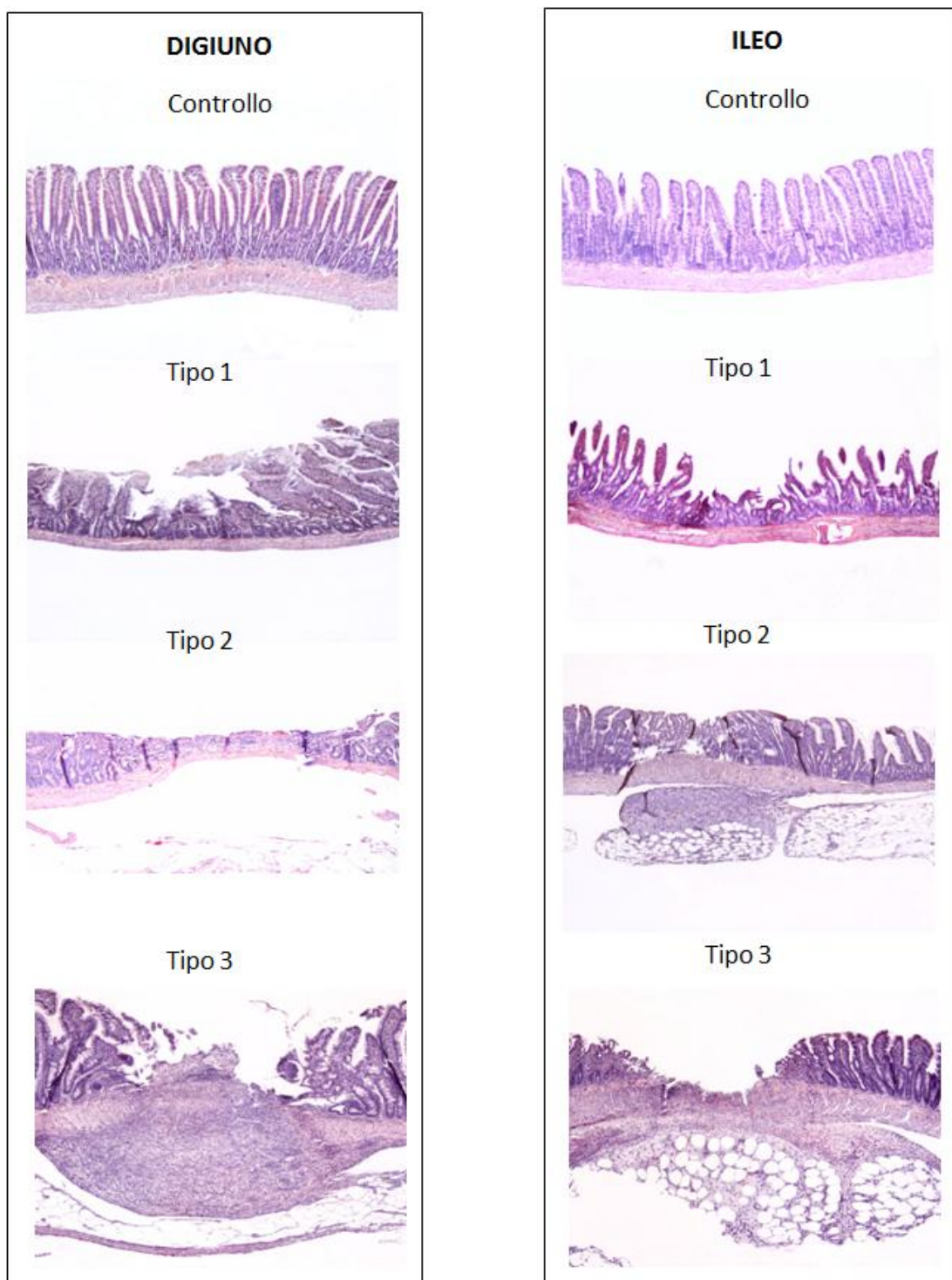




**Figura 3.** Effetti di indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib sul danno microscopico nel digiuno prossimale e distale. Ogni colonna rappresenta la media $\pm$ S.E.M. ottenuta da 10-11 animali. \* $P < 0,05$ , differenza significativa vs controllo; <sup>a</sup> $P < 0,05$ , differenza significativa vs indometacina; <sup>b</sup> $P < 0,05$ , differenza significativa vs diclofenac.



**Figura 4.** Effetti di indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib sul danno microscopico nell'ileo. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  S.E.M. ottenuta da 10-11 animali. \* $P < 0,05$ , differenza significativa vs controllo; <sup>a</sup> $P < 0,05$ , differenza significativa vs diclofenac; <sup>b</sup> $P < 0,05$ , differenza significativa vs etoricoxib.



**Figura 5.** Aspetto istologico delle lesioni di tipo 1, 2 e 3 indotte da indometacina nel digiuno (sinistra) e ileo (destra).

#### 4.7 Valutazione dei livelli di PGE<sub>2</sub>

I livelli di PGE<sub>2</sub> nella mucosa del digiuno e dell'ileo dei ratti trattati per 14 giorni con veicolo sono risultati pari a 148±12 e 129±10 ng/g di tessuto, rispettivamente. Negli animali trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac o diclofenac più omeprazolo per 14 giorni è stata riscontrata una riduzione significativa di PGE<sub>2</sub> nella mucosa di entrambe le regioni dell'intestino tenue, mentre etoricoxib o celecoxib non hanno determinato variazioni significative (Tabella 5).

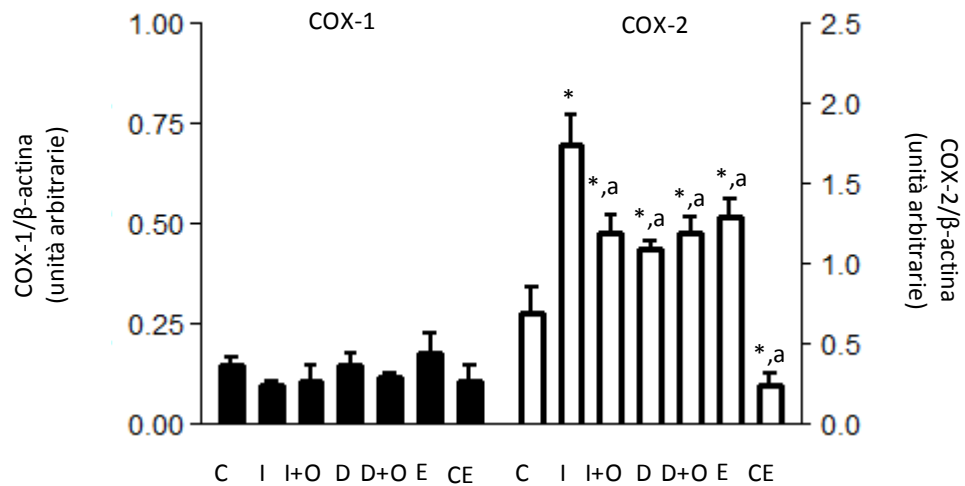
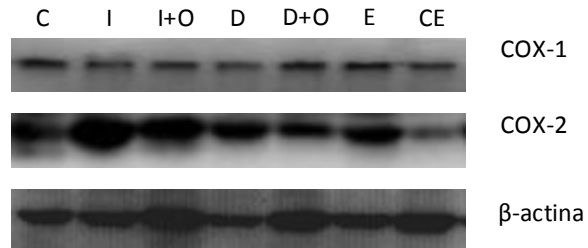
**Tabella 5.** Livelli di prostaglandina E<sub>2</sub> nella mucosa dell'intestino tenue

|                                      | Trattamento per 14 giorni | Prostaglandina E <sub>2</sub><br>(ng/g tessuto) |        |
|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|--------|
|                                      |                           | Digiuno                                         | Ileo   |
| <b>CONTROLLO</b>                     |                           | 148±12                                          | 129±10 |
| <b>INDOMETACINA</b>                  | 3 mg/Kg/die               | 96±11*                                          | 77±9*  |
| <b>INDOMETACINA +<br/>OMEPRAZOLO</b> | 3 mg/Kg/die               | 93±3*                                           | 79±6*  |
| <b>DICLOFENAC</b>                    | 8 mg/Kg/die               | 101±6*                                          | 68±7*  |
| <b>DICLOFENAC +<br/>OMEPRAZOLO</b>   | 8 mg/Kg /die              | 94±4*                                           | 74±5*  |
| <b>ETORICOXIB</b>                    | 5 mg/Kg /die              | 134±7                                           | 130±5  |
| <b>CELECOXIB</b>                     | 4 mg/Kg /die              | 139±8                                           | 131±6  |

\*P<0.05, differenza significativa vs controllo

#### **4.8 Analisi Western blot di COX-1 e COX-2**

L'analisi Western blot, effettuata sui campioni di ileo ottenuti dai ratti di controllo, ha evidenziato l'espressione di entrambe le isoforme di COX (Figura 6). La somministrazione dei farmaci in studio per 14 giorni, non ha causato alcun cambiamento significativo dell'espressione di COX-1, mentre indometacina, e in misura minore, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo ed etoricoxib, hanno determinato un aumento significativo dell'espressione di COX-2. Infine, il trattamento con celecoxib è risultato associato ad una riduzione dell'espressione di COX-2 (Figura 6).

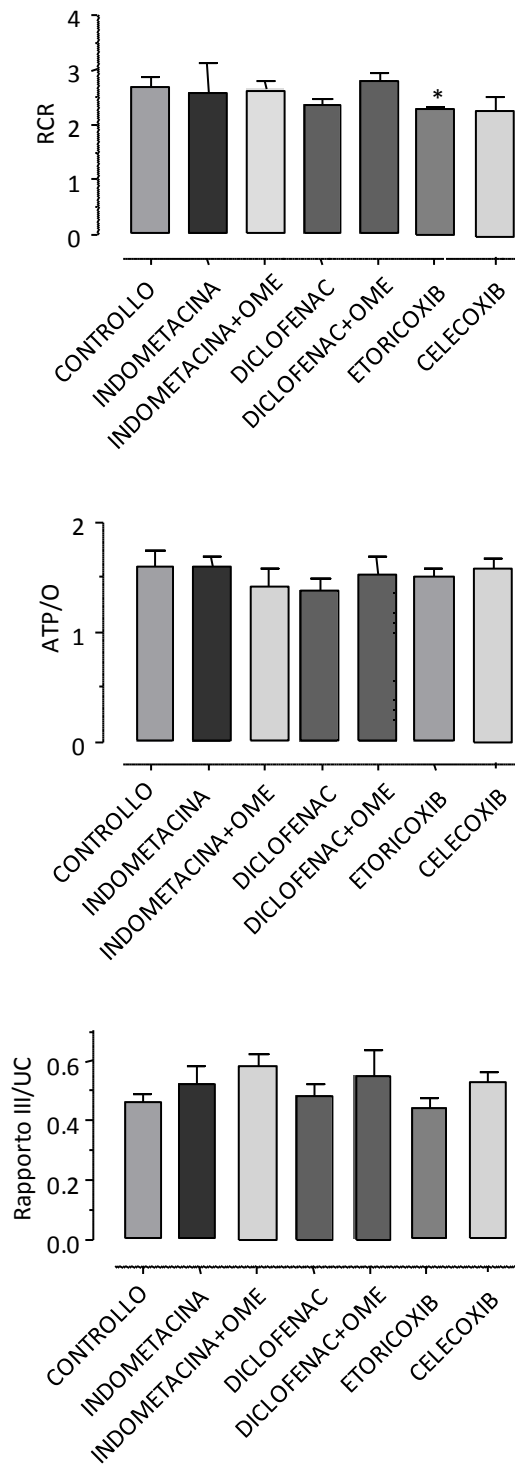


**Figura 6.** Analisi Western blot dell'espressione COX-1 e COX-2 nell'ileo di ratti trattati con veicolo (C), indometacina, (I), indometacina più omeprazolo (I+O), diclofenac (D), diclofenac più omeprazolo (D+O), etoricoxib (E) o celecoxib (CE). Ogni colonna rappresenta la media±S.E.M. ottenuta da 6 animali. \*P<0,05, differenza significativa vs controllo; <sup>a</sup>P<0.05, differenza significativa vs indometacina.

#### **4.9 Valutazione della funzione mitocondriale**

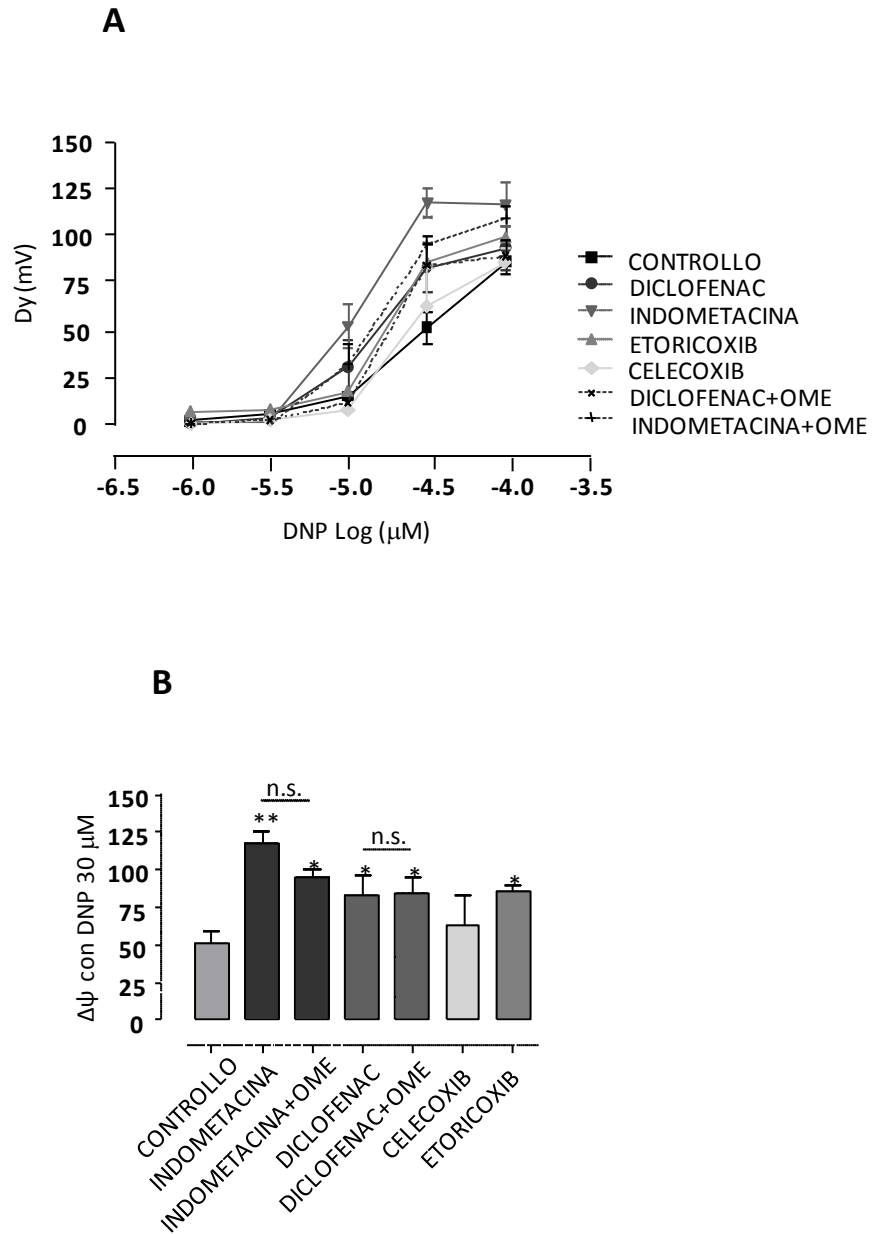
Nei mitocondri epatici ottenuti dagli animali trattati con i farmaci in studio, non è stata osservata alcuna variazione significativa del potenziale basale di membrana, rispetto al controllo. Inoltre, i trattamenti farmacologici non hanno prodotto nessuna alterazione dei valori di RCR, ATP/O e del rapporto stato III/UC, ad eccezione di etoricoxib, il quale ha causato una riduzione significativa dell'indice RCR, suggerendo una possibile perdita dell'integrità di entrambi i complessi respiratori e della membrana mitocondriale interna (Figura 7).

Negli esperimenti di valutazione della reattività mitocondriale agli agenti disaccoppianti DNP e CCCP, indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo ed etoricoxib hanno causato un incremento significativo della sensibilità dei mitocondri a tali agenti, mentre celecoxib non ha esercitato alcuna effetto significativo (Figura 8A e B; 9A e B).

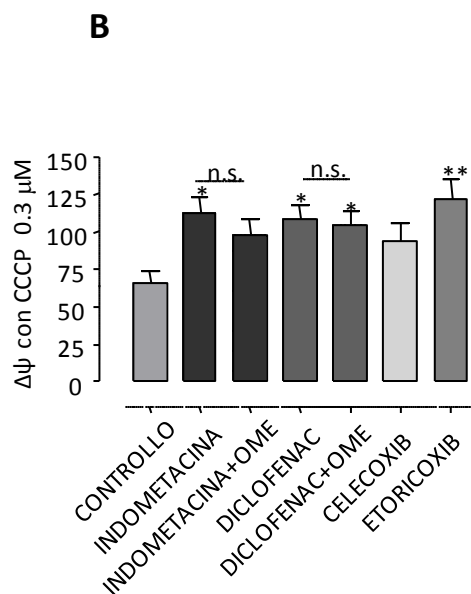
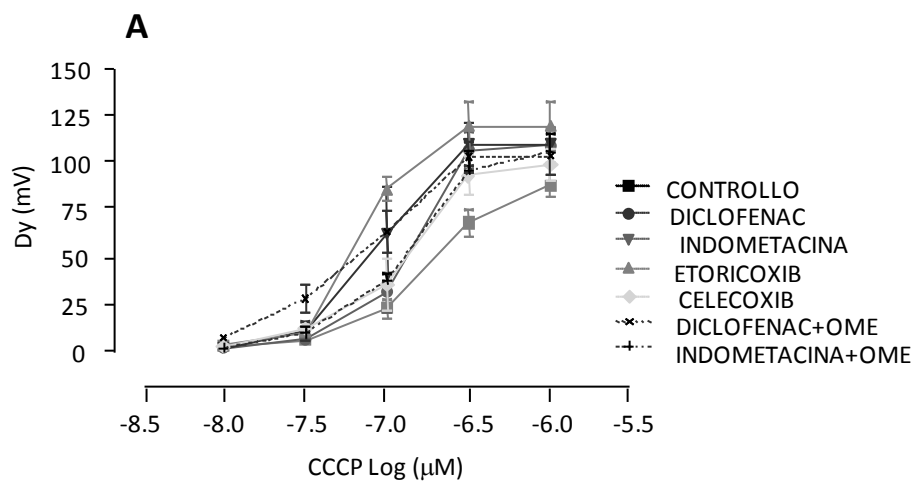


**Figura 7.** Valori di RCR (A), ATP/O (B) e del rapporto stato III/UC (C) registrati mediante elettrodo di Clark nei mitocondri epatici di ratti trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib. Ciascuna colonna rappresenta la media±S.E.M. ottenuta da 10-11 animali. \*P <0.05, differenza significativa vs controllo.





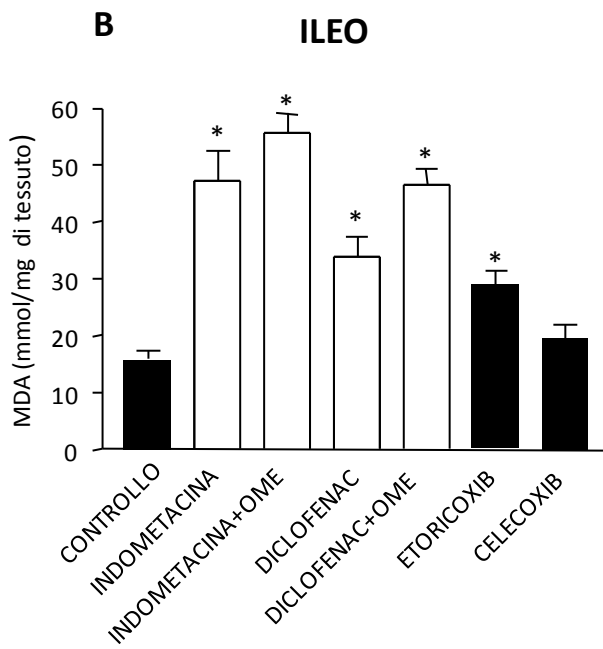
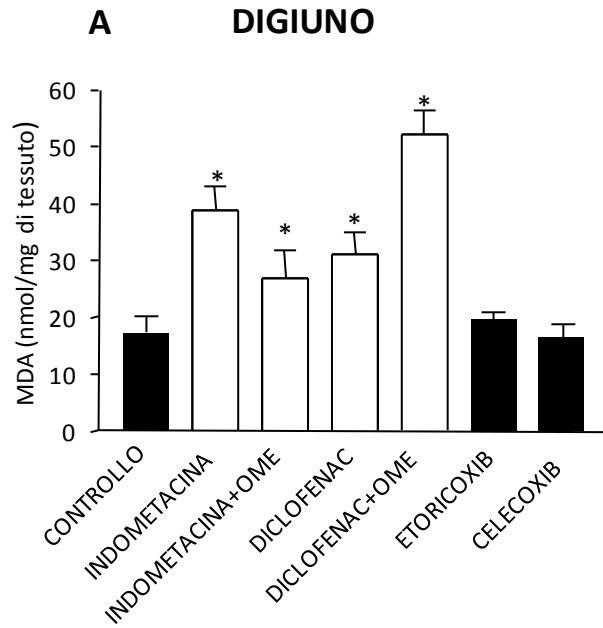
**Figura 8.** Variazione del potenziale di membrana in presenza di dinitrofenolo (DNP) registrato nei mitocondri epatici di ratti trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib. Il grafico B mostra le variazioni di potenziale di membrana mitocondriale indotte da DNP 30  $\mu\text{M}$ . Ciascuna colonna rappresenta la media  $\pm$  S.E.M. ottenuta da 10-11 animali. \* $P < 0.05$ , differenza significativa vs controllo. n.s.: non significativo.



**Figura 9.** Variazione del potenziale di membrana in presenza di cianuro di carbonile m-chlorofenilidrazone (CCCP), registrato nei mitocondri epatici di ratti trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib. Il grafico B mostra le variazioni del potenziale di membrana mitocondriale indotte da CCCP 0,3  $\mu\text{M}$ . Ciascuna colonna rappresenta la media $\pm$ S.E.M. ottenuta da 10-11 animali. \*P<0.05, differenza significativa vs controllo. n.s.: non significativo.

#### **4.10 Valutazione dei livelli di malondialdeide**

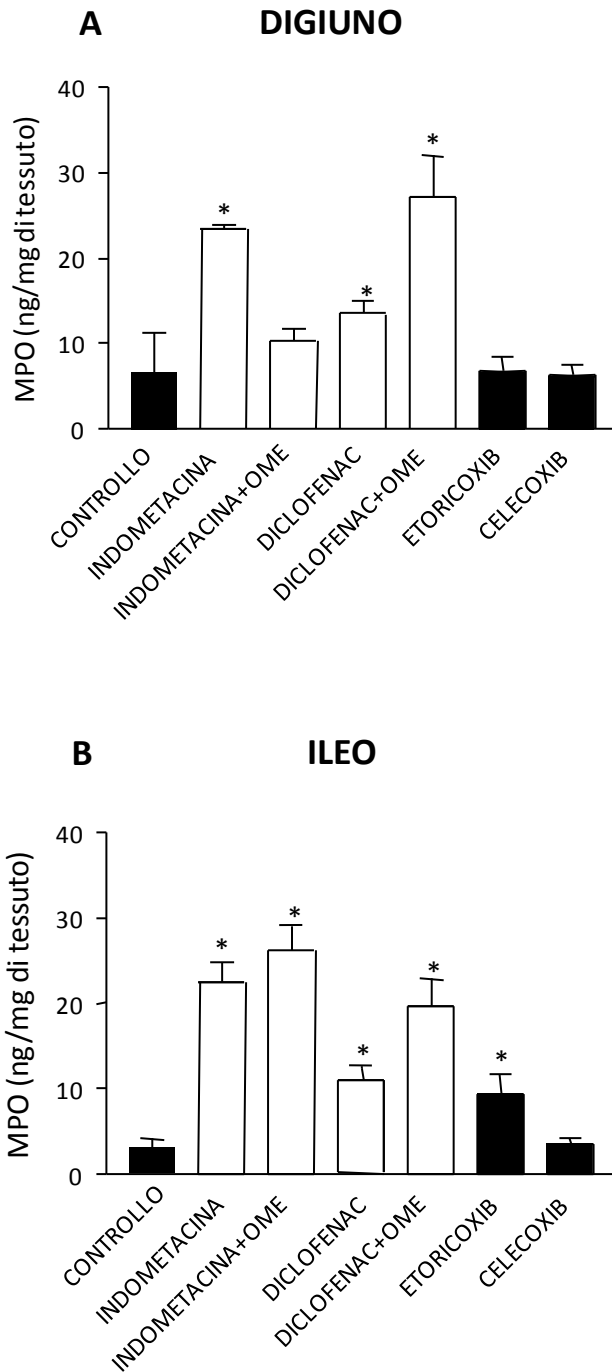
Nei campioni di digiuno e ileo prelevati dagli animali di controllo, i livelli di MDA sono risultati pari a  $17,3 \pm 2,8$  e  $15,9 \pm 1,5$  nmol/mg di tessuto, rispettivamente (Figura 10A e B). Nei ratti sottoposti al trattamento con indometacina o diclofenac, da soli o in combinazione con omeprazolo, i livelli di MDA sono risultati significativamente aumentati, sia nel digiuno che nell' ileo (Figura 10A e B). La somministrazione di etoricoxib o celecoxib non ha portato ad alcun cambiamento significativo dei livelli di MDA nel digiuno (Figura 10A), mentre nel ileo etoricoxib, ma non celecoxib, ha determinato un significativo aumento dello stress ossidativo tissutale (Figura 10B).



**Figura 10.** Livelli di malondialdeide (MDA) nel digiuno (A) e nell'ileo (B) di ratti trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib. Ogni colonna rappresenta la media±S.E.M. ottenuta da 6 animali. \*P<0.05, differenza significativa vs controllo.

#### **4.11 Dosaggio dei livelli di mieloperossidasi**

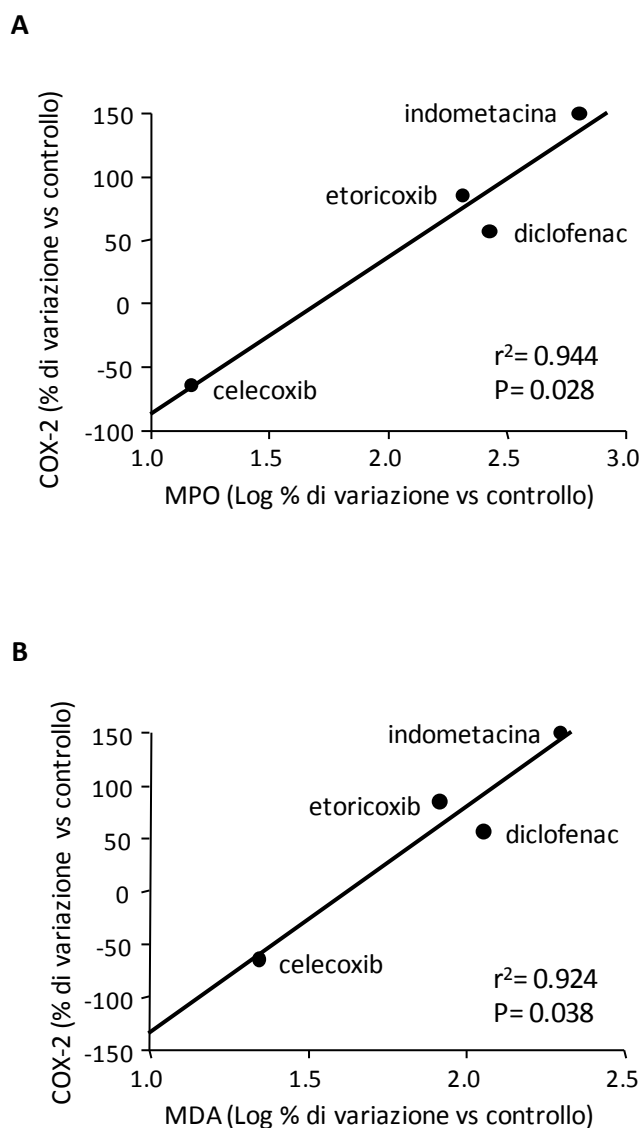
Negli animali di controllo, i livelli di MPO riscontrati nel digiuno e nell'ileo sono risultati rispettivamente pari a 6,7 e 3,0 ng/mg, (Figura 11A e B). Nel digiuno, il trattamento con indometacina, diclofenac o diclofenac più omeprazolo ha causato un aumento significativo del contenuto di MPO, mentre indometacina più omeprazolo, etoricoxib o celecoxib non hanno modificato in maniera significativa i livelli di MPO (Figura 11A). Al contrario, nell'ileo degli animali trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo o etoricoxib è stato osservato un aumento significativo dei livelli di MPO, mentre celecoxib non ha prodotto variazioni significative (Figura 11B).



**Figura 11.** Espressione dei livelli di mieloperossidasi (MPO) nel digiuno (A) e nell'ileo (B) nei ratti trattati con indometacina, indometacina più omeprazolo, diclofenac, diclofenac più omeprazolo, etoricoxib e celecoxib. Ogni colonna rappresenta la media±S.E.M. ottenuta da 6 animali. \*P<0.05, differenza significativa vs controllo.

#### 4.12 Analisi di correlazione

I dati ottenuti dall'espressione di COX-2 e dalla valutazione dei livelli di MPO ed MDA nell'ileo, sono stati analizzati mediante regressione lineare semi-log. Sull'asse delle y, sono stati riportati i valori dell'espressione di COX-2, intesa come variazione percentuale rispetto al valore di controllo, mentre sull'asse delle x, sono stati riportati i valori di MPO e MDA espressi come log delle variazioni percentuali verso i rispettivi valori di controllo. Correlazioni significative tra l'espressione di COX-2 con MPO ( $r^2 = 0,944$ ,  $p = 0,028$ ) e MDA ( $r^2 = 0,924$ ,  $p = 0.038$ ) sono state osservate negli animali trattati con indometacina, diclofenac, etoricoxib e celecoxib (Figura 12).



**Figura 12.** Analisi della regressione lineare tra l'espressione di COX-2 e i livelli tissutali di MPO (A) e MDA (B) negli animali trattati con indometacina, diclofenac, etoricoxib e celecoxib. Sull'asse y, sono stati riportati i valori dell'espressione di COX-2, intesa come variazione percentuale rispetto al valore di controllo, sull'asse x, sono stati riportati i valori di MPO e MDA espressi come log delle variazioni percentuali verso i rispettivi valori di controllo.



## 5. DISCUSSIONE

Nonostante sia ampiamente riconosciuto che l'uso dei FANS si associ all'insorgenza di eventi avversi nel tratto gastrointestinale superiore, alcune evidenze sperimentali hanno suggerito che questi farmaci possano anche esercitare effetti negativi sul tratto gastrointestinale inferiore, con esiti potenzialmente gravi (perforazione, sanguinamento evidente e stenosi) (Scarpignato e Hunt, 2010; Zeino et al., 2010). L'uso cronico dei FANS è destinato principalmente ai pazienti anziani, per i quali l'età avanzata rappresenta uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'enteropatia indotta da questi farmaci (Lanas et al., 2012). Alla luce di ciò, abbiamo scelto di condurre lo studio su un modello di animali anziani che rispecchiasse la pratica clinica. Infatti, è stato possibile osservare che il trattamento cronico con indometacina ha causato alterazioni a livello dell'intestino tenue come stenosi, lesioni erosive multiple, e una diminuzione dei livelli di emoglobina nel sangue, in maniera analoga a quanto osservato in pazienti sottoposti a trattamento con FANS (Nygård et al., 1995; Maiden et al., 2005).

Inoltre, la somministrazione di FANS è risultata in grado di influenzare la funzione mitocondriale, in accordo con quanto osservato da Somasundaram et al. (2000), dove indometacina ha dimostrato di

contrastare il trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria nei mitocondri epatici di ratto in vitro. Nei nostri esperimenti, lo stesso farmaco, non ha avuto alcuna influenza sugli indici della funzionalità mitocondriale, ma ha aumentato la sensibilità dei mitocondri agli agenti disaccoppianti, probabilmente come conseguenza del trattamento cronico.

Come previsto, il trattamento con diclofenac ha causato alterazioni macroscopiche del piccolo intestino e una diminuzione dei livelli di emoglobina nel sangue. L'analisi istologica ha evidenziato che indometacina e diclofenac hanno causato lo sviluppo sia di lesioni intestinali più superficiali che più profonde. Inoltre, indometacina e diclofenac hanno provocato un aumento dello stress ossidativo, dell'infiltrato infiammatorio e alterazioni mitocondriali, suggerendo che lo sviluppo di enteropatia sia dovuto ad un effetto diretto sulla parete intestinale. Tuttavia, nei ratti trattati con ns-FANS è stata osservata una diminuzione dei livelli di PGE<sub>2</sub> intestinale, un effetto non condiviso da celecoxib e etoricoxib. Pertanto, il blocco della COX-1 causato da indometacina e diclofenac, e la conseguente riduzione della produzione di prostaglandine, potrebbe contribuire all'evolversi dell'enteropatia.

Nei nostri esperimenti, celecoxib si è dimostrato molto meno lesivo rispetto ai ns-FANS. Infatti, gli animali trattati con celecoxib non hanno riportato evidenti alterazioni macroscopiche intestinali e/o riduzione dei livelli di emoglobina nel sangue. Inoltre, celecoxib non ha provocato lesioni profonde di tipo 3, mentre ha causato un basso grado di sviluppo di lesioni di tipo 2, ed alcune erosioni di tipo 1. Inoltre, celecoxib non ha modificato in maniera significativa i livelli di ossidazione dei tessuti intestinali, dell'infiltrato infiammatorio e della funzione mitocondriale, e non ha influenzato la produzione di PGE<sub>2</sub>. Le nostre osservazioni sono in accordo con quanto osservato nell'uomo, in cui il trattamento cronico con celecoxib ha dimostrato una buona tollerabilità intestinale (Goldstein et al., 2005; Goldstein et al., 2007; Chan et al., 2010). Inoltre, questi dati sono in linea con il profilo farmacodinamico e le caratteristiche chimico-fisiche di celecoxib, il quale è caratterizzato da un elevato valore di pKa e quindi sprovvisto di proprietà acide (Gierse et al., 2005). Studi pre-clinici (Tibble et al., 2000; Menozzi et al., 2006) e uno studio clinico (Smecuol et al., 2001), hanno dimostrato l'incapacità di celecoxib ad influenzare la permeabilità intestinale, il cui incremento rappresenta la chiave fisiopatologica per la formazione delle lesioni (Bjarnason e Takeuchi, 2009). Inoltre, è stata dimostrata l'incapacità di

celecoxib di alterare la fosforilazione ossidativa mitocondriale (Tibbles et al., 2000), considerata come un fattore che contribuisce all'alterazione dell'integrità della barriera intestinale, e quindi allo sviluppo di enteropatia.

Etoricoxib ha dimostrato un profilo di tollerabilità migliore rispetto a indometacina e diclofenac, ma meno favorevole rispetto al celecoxib. Nel gruppo di animali trattati con etoricoxib, alcuni ratti hanno sviluppato ulcerazioni macroscopiche. Inoltre, etoricoxib ha indotto lo sviluppo di lesioni di tipo 2 e 3, soprattutto nell'ileo. Tuttavia, queste lesioni non sono risultate associate ad una riduzione significativa di emoglobina nel sangue, che sembra coerente con la mancanza di perdita di sangue nelle feci in pazienti trattati con etoricoxib (Hunt et al., 2003). Per quanto riguarda i meccanismi alla base dell'enteropatia causata da etoricoxib, i nostri dati suggeriscono un'azione topica diretta. Infatti, negli animali trattati con etoricoxib è stato osservato un incremento dello stress ossidativo, dell'infiltrazione infiammatoria intestinale e alterazioni mitocondriali epatiche, ma nessuna variazione della produzione di PGE<sub>2</sub> intestinale. Etoricoxib, oltre ad aumentare la sensibilità mitocondriale agli agenti disaccoppianti, è stato l'unico farmaco in grado di influenzare i complessi respiratori mitocondriali e

l'integrità della membrana interna, come indicato dai valori RCR. Tale effetto, non sembra probabilmente correlato con il suo profilo di selettività, in quanto, nonostante etoricoxib sia più selettivo per COX-2 rispetto celecoxib (Riendeau et al., 2001), nei nostri esperimenti quest'ultimo si è dimostrato privo di qualsiasi effetto sulla attività mitocondriale e non ha aumentato gli indici del danno ossidativo e delle lesioni infiammatorie nei tessuti intestinali. Pertanto, le differenze osservate tra i profili di tollerabilità intestinale di etoricoxib e celecoxib possono essere spiegate considerando che, a differenza di celecoxib, etoricoxib è caratterizzato da una basso pKa, come la maggior parte dei ns-FANS (Paulson et al, 2001;. Michaux e Charlier, 2004). I nostri dati pre-clinici, sono in accordo con i risultati di un programma di studi clinici (MEDAL), in cui i pazienti hanno sviluppato un grado di tossicità intestinale simile in seguito al trattamento con etoricoxib o diclofenac (Laine et al., 2007).

L'analisi Western blot, effettuata sui campioni di ileo ottenuti dai ratti di controllo, ha evidenziato l'espressione di entrambe le isoforme di COX. L'espressione di COX-1 non è stata influenzata da nessuno dei farmaci in studio, mentre quella di COX-2 è risultata aumentata nel gruppo di animali trattati con indometacina, diclofenac ed etoricoxib,

mentre è risultata diminuita nel gruppo di animali trattati con celecoxib. L'andamento dell'espressione di COX-2 è parzialmente coerente con l'entità del danno enterico causato dai farmaci, in quanto è stata osservata una buona correlazione tra gli effetti lesivi infiammatori indotti dai farmaci in studio (come risultato dell'andamento dei valori di MPO e MDA nei tessuti) e le rispettive variazioni di espressione di COX-2. Nel complesso, le variazioni dell'espressione di COX-2 a livello dell'ileo, riflettono la capacità di questi farmaci di indurre effetti lesivi topici sulla parete. Infatti, mentre indometacina, diclofenac ed etoricoxib, responsabili di notevoli lesioni intestinali, hanno anche determinato un'induzione significativa di COX-2, celecoxib, risultato privo di effetti lesivi significativi, non ha portato ad un aumento dell'espressione di COX-2. Sebbene sia stato osservato che l'inibizione concomitante di COX-1 e COX-2 sia necessaria per indurre lo sviluppo di lesioni intestinali (Takeuchi et al., 2010), i risultati del nostro studio hanno prodotto evidenze discordanti, in quanto etoricoxib è risultato in grado di provocare effetti lesivi intestinali nonostante il suo profilo di selettività verso COX-2.

Nel presente studio, alcuni gruppi di animali sono stati trattati con indometacina o diclofenac in associazione ad omeprazolo, in modo da

riflettere la situazione clinica, dove gli effetti degli inibitori selettivi di COX-2 sono stati confrontati con quelli dei ns-FANS più IPP (Chan et al., 2010; Combe et al., 2009). I risultati ottenuti si sono rivelati particolarmente interessanti. Infatti, l'IPP si è dimostrato apparentemente protettivo nei confronti dell'azione lesiva di indometacina nel digiuno ma non nell'ileo (in particolare nel caso di lesioni di tipo 2 e 3). Al contrario, omeprazolo associato a diclofenac ha esacerbato l'azione del FANS sia nel digiuno che nell'ileo, in particolare aumentando l'entità delle lesioni di tipo 2 e 3. Entrambe le nostre osservazioni, se pur in conflitto tra loro, risultano corroborate dai dati riportati in letteratura. Infatti, in uno studio condotto su un modello murino, Kuroda et al. (2006) hanno osservato che lansoprazolo ha contrastato il danno intestinale indotto da indometacina, mentre Wallace et al. (2011) e Satoh et al. (2012) hanno osservato che alcuni IPP esacerbano gli effetti lesivi di naprossene e indometacina sull'intestino tenue del ratto. In ambito clinico, Goldstein et al. (2005) e Hawkey et al. (2008) hanno osservato un aumento dell'incidenza di lesioni intestinali in volontari sani che assumevano naprossene in combinazione con omeprazolo. Inoltre, Watanabe et al. (2013) hanno recentemente dimostrato che gli IPP risultano in grado di aggravare le

lesioni nell'intestino tenue di pazienti affetti da artrite reumatoide e sottoposti a trattamento cronico con FANS. In generale, sembra quindi che la gravità del danno sulla parete intestinale dipenda dal tipo di FANS, dal tipo di IPP considerati, dal modello sperimentale scelto e dal regime di trattamento con IPP adottato. Tuttavia, non è possibile trarre conclusioni certe sull'influenza che gli IPP esercitano sull'enteropatia indotta da FANS, e sono necessarie ulteriori studi per chiarire questo aspetto.

In conclusione, i dati ottenuti dal presente studio mostrano che la somministrazione cronica di ns-FANS così come di etoricoxib, caratterizzati da un basso valore di pKa, possono indurre lo sviluppo di enteropatia, attraverso effetti topici diretti sulla mucosa. Al contrario celecoxib, sprovvisto di caratteristiche acide, risulta privo di azioni lesive significative sul piccolo intestino. Pertanto, la sola inibizione di COX-1 e/o COX-2, non sembra essere sufficiente a provocare un danno intestinale in assenza di effetti lesivi topici, come documentato anche dal diverso impatto che celecoxib ed etoricoxib possiedono sugli indici di ossidazione, infiammazione e funzione mitocondriale.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Allen A and Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **288**: C1-C19.
- Allison MC, Howatson AG, Torrance CJ, *et al.* Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *N Engl J Med* 1992; **327**: 749-754.
- Ballinger A. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the colon. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; **10**: 485-495.
- Bardou M and Barkun AN. Preventing the gastrointestinal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: from risk factor identification to risk factor intervention. *Joint Bone Spine* 2010; **77**: 6-12.
- Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS, *et al.* Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *Lancet*. 2008; **372**: 1756-64.
- Berenguer B, Alarcón de la Lastra C, *et al.* Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2002; **442**: 125-135.
- Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, *et al.* Blood and protein loss via small intestinal inflammation induced by nonsteroidal anti-inflammatory

drugs. *Lancet* 1987; **2**: 711-714.

Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, *et al.* The pathogenesis and consequence of non steroidal anti-inflammatory drug induced small intestinal inflammation in man. *Scand J Rheumatol Suppl* 1987; **64**: 55-62.

Bjarnason I, Scarpignato C, Takeuchi K, *et al.* Determinants of the short-term gastric damage caused by NSAIDs in man. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**: 95-106.

Bjarnason I and Takeuchi K. Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID induced enteropathy. *J Gastroenterol* 2009; **44**: 23-29.

Bjarnason I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int J Clin Pract Suppl* 2013; **178**: 37-42.

Calderone V, Testai L, Martelli A, *et al.* Anti-ischemic properties of a new spiro-cyclic benzopyran activator of the cardiac mito-KATP channel. *Biochem Pharmacol* 2010; **79**: 39-47.

Challis JR, Sloboda D M, Alfaidy N, *et al.* Prostaglandins and mechanism of preterm birth. *Reproduction* 2002; **124**: 1-17.

Chan FK, Lanas A, Scheiman J, *et al.* Celecoxib versus omeprazole and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis (CONDOR): a randomized trial. *Lancet* 2010; **376**: 173-179.

Cakala M and Strosznajder JB. The role of cyclooxygenases in neurotoxicity

- of amyloid beta peptides in Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol* 2010; **44**: 65-79.
- Catella-Lawson F and Crofford LJ. Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. *Am J Med* 2001; **110**: 28S-32S.
- Combe B, Swergold G, McLay J, *et al.* Cardiovascular safety and gastrointestinal tolerability of etoricoxib vs diclofenac in a randomized controlled clinical trial (The MEDAL study). *Rheumatology (Oxford)* 2009; **48**: 425-432.
- Costamagna G, Shah SK, Riccioni ME, *et al.* A prospective trial comparing small bowel radiographs and video capsule endoscopy for suspected small bowel disease. *Gastroenterology* 2002; **123**: 999-1005.
- Davies NM. Review article: non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal permeability. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; **12**: 303–20.
- Diao L, Mei Q, Xu JM, *et al.* Rebamipide suppresses diclofenac-induced intestinal permeability via mitochondrial protection in mice. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 1059-1066.
- Dubois RN, Abramson SB, *et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; **12**: 1063-1073.
- Dubois RN. Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer. *Prog Exp Tumor Res* 2003; **37**: 124-137.

Eberhart CE and Dubois RN. Eicosanoids and gastrointestinal tract.

*Gastroenterology* 1995; **109**: 285-301.

Etienney I, Beaugerie L, Viboud C, *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a risk factor for acute diarrhoea: a case cross-over study. *Gut* 2003; **52**: 260-263.

Fornai M, Antonioli L, Colucci R, *et al.* Emerging role of cyclooxygenase isoforms in the control of gastrointestinal neuromuscular functions. *Pharmacol Ther* 2010; **125**: 62-78.

Fornai M, Antonioli L, Colucci R, *et al.* NSAID-induced enteropathy: are the currently available selective COX-2 inhibitors all the same? *J Pharmacol Exp Ther* 2014; **348**: 86-95.

Fujimori S, Gudis K, Takahashi Y, *et al.* Distribution of small intestinal mucosal injuries as a result of NSAID administration. *Eur J Clin Invest* 2010; **40**: 504-510.

Garcia Rodriguez LA and Hernandez-Diaz S. The risk of upper gastrointestinal complications associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids, acetaminophen and combinations of these agents. *Arthritis Res* 2001; **3**: 98-101.

- Gierse JK, Zhang Y, Hood WF, *et al.* Valdecoxib: assessment of cyclooxygenase-2 potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **312**: 1206-1212.
- Goldstein JL, Eisen GM, Lewis B, *et al.* Video capsule endoscopy to prospectively assess small bowel injury with celecoxib, naproxen plus omeprazole, and placebo. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; **3**: 133-141.
- Goldstein JL, Eisen GM, Lewis B, *et al.* Small bowel mucosal injury is reduced in healthy subjects treated with celecoxib compared with ibuprofen plus omeprazole, as assessed by video capsule endoscopy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **25**: 1211-1222.
- Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, *et al.* Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; **3**: 55-59.
- Hagiwara M, Kataoka K, Arimochi H, *et al.* Role of unbalanced growth of Gram-negative bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *J Med Invest* 2004; **51**: 43-51.
- Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, *et al.* Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut* 2001; **49**: 443-453.
- Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol*

2002; **89**: 10D-17D.

Hawkey CJ, Ell C, Simon B, *et al.* Less small-bowel injury with lumiracoxib compared with naproxen plus omeprazole. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2008; **6**: 536-544.

Hernandez-Diaz S and Garcia Rodriguez LA. Epidemiologic assessment of the safety of conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 2001; **110**: 20S-27S.

Howell DC (2007) *Statistical methods for psychology*, 6th ed. Thomson Wadsworth, Belmont, CA.

Hunt RH, Bowen B, Mortensen ER, *et al.* A randomized trial measuring fecal blood loss after treatment with rofecoxib, ibuprofen, or placebo in healthy subjects. *Am J Med* 2000; **109**: 201–206.

Hunt RH, Harper S, Callegari P, *et al.* Complementary studies of the gastrointestinal safety of the cyclo-oxygenase-2-selective inhibitor etoricoxib. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; **17**: 201-210.

Hunt RH, Lanas A, Stichtenoth DO, *et al.* Myths and facts in the use of anti-inflammatory drugs. *Ann Med* 2009; **8**: 1–16.

Jiménez MD, Martín MJ, Alarcon De La Lastra C, *et al.* Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa. *Free Radic Res* 2004; **38**: 903-911.

- Kaufmann WE, Andreasson KI, Isakson PC, *et al.* Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 1997; **54**: 601-24.
- Kuramoto T, Umegaki E, Nouda S, *et al.* Preventive effect of irsogladine or omeprazole on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced esophagitis, peptic ulcers, and small intestinal lesions in humans, a prospective randomized controlled study. *BMC Gastroenterol* 2013; **13**: 85.
- Kuroda M, Yoshida N, Ichikawa H, Takagi T, *et al.* Lansoprazole, a proton pump inhibitor, reduces the severity of indomethacin induced rat enteritis. *Int J Mol Med* 2006; **17**: 89-93.
- Laine L, Connors LG, Reicin A, *et al.* Serious lower gastrointestinal clinical events with nonselective NSAID or coxib use. *Gastroenterology* 2003; **124**: 288-292.
- Laine L, Curtis SP, Cryer B, *et al.* MEDAL Steering Committee Assessment of upper gastrointestinal safety of etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomized comparison. *Lancet* 2007; **369**: 465-473.
- Lanas A, Garcia-Rodriguez LA, Polo-Tomas M, *et al.* Time trends and impact of upper and lower gastrointestinal bleeding and perforation in

clinical practice. *Am J Gastroenterol* 2009; **104**: 1633–41.

Lanas A and Sopeña F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications. *Gastroenterol Clin North Am* 2009; **38**: 333-352.

Lanas A, Goldstein JL, Chan FK, *et al.* Risk factors associated with a decrease  $\geq 2$  g/dL in haemoglobin and/or  $\geq 10\%$  haematocrit in osteoarthritis patients taking celecoxib or a nonselective NSAID plus a PPI in a large randomised controlled trial (CONDOR). *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **36**: 485-492.

Li Z and Graham BH. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode; from Mitochondrial Disorders: Biomedical and Molecular Analysis. *Methods in Molecular Biology* 2012; **837**: 63-72.

Loll PJ, Picot D, Garavito RM. Synthesis and use of iodinated nonsteroidal anti-inflammatory drug analogues as crystallographic probes of the prostaglandin H<sub>2</sub> synthase cyclooxygenase active site. *Biochemistry* 1996; **11**: 7330-7340.

Maiden L, Thjodleifsson B, Theodors A, *et al.* A quantitative analysis of NSAID-induced small bowel pathology by capsule enteroscopy. *Gastroenterology* 2005; **128**: 1172-1178.



- Maiden L, Thjodleifsson B, Seigal A, *et al.* Long-term effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective agents on the small bowel: a cross-sectional capsule enteroscopy study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; **5**: 1040-1045.
- Maiden L. Capsule endoscopic diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *J Gastroenterol* 2009; **44**: 64-71.
- Marnett LJ. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins other Lipid Mediat* 2002; **68-69**: 153-164.
- Meddings JB, Sutherland LR, Byles NI, *et al.* Sucrose: a novel permeability marker for gastroduodenal disease. *Gastroenterology* 1993; **104**: 1619-26.
- Menozi A, Pozzoli C, Giovannini E, *et al.* Intestinal effects of nonselective and selective cyclooxygenase inhibitors in the rat. *Eur J Pharmacol* 2006; **552**: 143-150.
- Michaux C and Charlier C. Structural approach for COX-2 inhibition. *Mini Rev Med Chem* 2004; **4**: 603-615.
- Moore RA, Derry S, Phillips CJ, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice. *BMC Musculoskelet Disord* 2006; **7**: 79.

- Moore RA, Derry S, McQuay HJ. Faecal blood loss with aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors: systematic review of randomized trials using autologous chromium-labelled erythrocytes. *Arthritis Research & Therapy* 2008; **10**: R7.
- Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins other Lipid Mediat* 2002; **68-69**: 165-175.
- Murakami M and Kudo I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A2s. *Adv Exp Med Biol* 2003; **525**: 87-92.
- Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, *et al.* Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1081-91.
- Nygård G, Anthony A, Khan K, *et al.* Intestinal site-dependent susceptibility to chronic indomethacin in the rat: a morphological and biochemical study. *Aliment Pharmacol Ther* (1995); **9**: 403-410.
- Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Computer simulations using GastroPlus to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; **72**: 91-98.
- Parente L and Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem*

*Pharmacol* 2003; **65**: 153-159.

Pasinetti GM. Cyclooxygenase and Alzheimer's disease: implications for preventive initiatives to slow the progression of clinical dementia. *Arch Gerontol Geriatr* 2001; **33**:13-28.

Paulson SK, Vaughn MB, Jessen SM, *et al.* Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **297**: 638-645.

Reuter BK, Davies NM, Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 1997; **112**: 109-117.

Riendeau D, Percival MD, Brideau C, *et al.* Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **296**: 558-566.

Samad TA, Sapirstein A, Woolf CJ. Prostanoids and pain: unravelling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol Med* 2002; **8**:390-396.

Sánchez S, Alarcón de la Lastra C, Ortiz P, *et al.* Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. *Dig Dis Sci* 2002; **47**: 2791-2798.

- Satoh H, Amagase K, Takeuchi K. Exacerbation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal lesions by antisecretory drugs in rats: the role of intestinal motility. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; **343**: 270-277.
- Scarpignato C, Bjarnason I, Bretagne J-F, *et al.* Working team report: towards a GI safer anti-inflammatory therapy. *Gastroenterology Int* 1999; **12**: 186-215.
- Scarpignato C. NSAID-induced intestinal damage: are luminal bacteria the therapeutic target? *Gut* 2008; **57**: 145-158.
- Shindo K, Machida M, Fukumura M, *et al.* Omeprazole induces altered bile acid metabolism. *Gut* 1998; **42**: 266–271.
- Smecuol E, Bai JC, Sugai E, *et al.* Acute gastrointestinal permeability responses to different non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 2001; **49**: 650-655.
- Smith WL and Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins other Lipid Mediat* 2002; **68-69**: 115-128.
- Somasundaram S, Sigthorsson G, Simpson RJ, *et al.* Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of

cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; **14**: 639-650.

Takeuchi K, Tanaka A, Kato S, *et al.* Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *Clin Chim Acta* 2010; **411**: 459-466.

Testai L, Martelli A, Marino A, *et al.* The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**: 1634-1643.

Thiéfin G and Beaugerie L. Toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Joint Bone Spine* 2005; **72**: 286-294.

Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, *et al.* High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut* 1999; 45: 362–6.

Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, *et al.* Comparison of the intestinal toxicity of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, and indomethacin in the experimental rat. *Scand J Gastroenterol* 2000; **35**: 802-807.

Tibble JA and Bjarnason I. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2001; **7**: 460–5.

Turini ME and Dubois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu*

*Rev Med* 2002; **53**: 35-57.

Tyler DD (1991) Respiratory enzyme systems of mitochondria, in *The mitochondria health and disease* pp 269-352, VCH Publishers, New York.

Verburg KM. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1081-91.

Wallace JL and Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defence and injury. *Exp Biol Med* 2001; **226**: 1003-1115.

Wallace JL, Denou E, Vong L, *et al.* Proton pump inhibitors and low-dose aspirin markedly exacerbate NSAID-induced small intestinal injury: link to dysbiosis? *Gastroenterology* 2011; **140**: S-87.

Wallace JL, Syer S, Denou E, *et al.* Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology* 2011; **141**: 1314-1322.

Wang D and Dubois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010; **29**: 781-788.

Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is toll-like receptor 4 dependent. *Gut* 2008; **57**: 181-7.

Watanabe T, Tanigawa T, Nadatani Y, *et al.* Risk factors for severe nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage.

*Dig Liver Dis* 2013; **45**: 390-395.

Whittle BJ. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 2002; **17**: 301-313.

Zeino Z, Sisson G, Bjarnason I. Adverse effects of drugs on small intestine and colon. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; **24**: 133-141.