

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACOLOGICHE, TOSSICOLOGICHE, DELLO SVILUPPO E
DEL MOVIMENTO UMANO
CICLO XXVII

Settore concorsuale di afferenza: 05/G1 - Farmacologia, Farmacologia Clinica e Farmacognosia

Settore scientifico disciplinare: BIO/14 - Farmacologia

*LA RICERCA TRASLAZIONALE NELLA FARMACOLOGIA
GASTROENTEROLOGICA*

Presentata da: Giovanni Dothel

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Patrizia Hrelia

Relatore

Prof. Fabrizio De Ponti

Esame finale anno 2015

INDICE

CAPITOLO I: LA FARMACOLOGIA NEL PANORAMA SCIENTIFICO ATTUALE	3
CAPITOLO II: IL MODELLO SPERIMENTALE DI MALATTIA, ASPETTI ETICI E LEGISLATIVI	5
CAPITOLO III: CARATTERISTICHE TRASLAZIONALI DEI MODELLI IN VITRO, IN VIVO, ED IN SILICO	13
<i>III.1 Aspetti epistemologici e traslazionali dei modelli sperimentali</i>	
a) <i>Obiettivo della sperimentazione</i>	16
b) <i>Malattia</i>	18
c) <i>Biomarcatori, end-point primari, end-point surrogati</i>	18
<i>III.2 Fisiopatologia della sindrome dell'intestino irritabile</i>	20
<i>III.3 Fisiopatologia delle malattie infiammatorie croniche intestinali</i>	22
<i>III.4 Il ruolo dei modelli in silico negli studi di farmacologia traslazionale</i>	25
<i>III.5 Modelli in vitro ed ex vivo di malattie intestinali organiche e funzionali</i>	29
<i>III.6 Modelli in vivo di malattie intestinali organiche e funzionali</i>	32
<i>III.7 Modelli in vivo di IBS</i>	34
<i>III.8 Modelli in vivo di IBD</i>	36
<i>III.9 Modelli di infiammazione intestinale: colite DSS- e TNBS- indotta</i>	37
CAPITOLO IV: IL SISTEMA OPIOIDE E CANNABINOIDE NELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI E NELLA SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE	41
<i>IV.1 Il ruolo del sistema oppioide nella nocicezione immuno-mediata periferica e intestinale</i>	41
<i>IV.2 Il sistema cannabinoide ed il suo ruolo nei meccanismi fisiopatologici di IBS e IBD</i>	43

<i>IV.3 Studio esplorativo tissutale: caratterizzazione del recettore cannabinoide CB2 del recettore oppioide μ e del suo ligando β-Endorfina nella Sindrome dell'Intestino Irritabile</i>	46
<i>IV.3.1 Materiali e Metodi</i>	46
<i>a) Pazienti</i>	46
<i>a.1) Criteri di inclusione</i>	47
<i>a.2) Criteri di esclusione</i>	47
<i>a.3) Criteri di inclusione per i soggetti di controllo</i>	48
<i>a.4) Criteri di esclusione per i soggetti di controllo</i>	48
<i>b) Colonscopia e biopsie</i>	48
<i>c) Immunofluorescenza e Imaging confocale</i>	48
<i>d) Isolamento del materiale d'indagine</i>	49
<i>e) Saggi biomolecolari - Western Blotting e Sybr green Real Time PCR</i>	50
<i>f) Analisi statistica</i>	53
<i>IV.3.2 Risultati</i>	53
<i>a) Imaging confocale</i>	53
<i>b) SYBR Green Real Time PCR</i>	56
<i>c) Western Blot</i>	58
<i>IV.3.3 Discussione</i>	60
CAPITOLO IV: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	62
BIBLIOGRAFIA	67

Capitolo I: LA FARMACOLOGIA NEL PANORAMA SCIENTIFICO ATTUALE

Un dato recente della *Food and Drug Administration* sul numero di farmaci messi in commercio nell'ultimo anno riflette una tendenza positiva degli ultimi anni legata, tra i vari fattori, alla spinta dell'industria farmaceutica verso lo sviluppo di farmaci orfani e di nuova generazione, come i farmaci biologici o biosimilari ¹. Tuttavia, questo dato corrisponde solo in parte al grado di avanzamento delle conoscenze in ambito biotecnologico e bioinformatico registrato negli ultimi dieci anni.

Ad oggi, il processo di elaborazione delle informazioni derivate dalla progressiva interpretazione delle varianti genetiche della popolazione, associate a predisposizioni a patologie o alla differente risposta a un farmaco, sta orientando la ricerca farmacologica verso lo sviluppo di una medicina personalizzata. Una tale prospettiva sta gradualmente rivoluzionando i processi produttivi e, più in generale, l'utilizzo dei farmaci in terapia sulla base del concetto "un paziente, un farmaco, una dose".

Tuttavia, fino ad oggi tale approccio sembra soddisfare a fatica i criteri necessari al trasferimento delle conoscenze alla realtà clinica, dalla ridefinizione di nuovi criteri di diagnosi, sia nei necessari la richiesta del mercato farmaceutico di nuove molecole: ai costi di sviluppo, brevetto e produzione, spesso non corrisponde un utile che giustifichi la spesa complessiva. È opportuno precisare che la ricerca in questo ambito da sempre si interroga sulle possibili strategie da adottare per migliorare il meccanismo "a collo di bottiglia" che contraddistingue il processo di produzione.

A fronte di questo trend negli ultimi anni è stato intrapreso un vero e proprio percorso di auto-analisi per individuare gli elementi più critici alla base della sproporzione tra *outcome* fallimentari e positivi. È opportuno citare inoltre, come questa analisi esuli da aspetti strettamente scientifici, quando si riconoscono nella produzione scientifica, non solo in campo biomedico, alcuni vizi strutturali tra i quali, la dipendenza economica degli enti di ricerca dalla produzione di dati pubblicabili, ben sintetizzato dal motto "*publish or perish*" ²; ed il processo di revisione tra pari non sempre imparziale e spesso soggetto a logiche di reciproca "solidarietà" ³.

Se da una parte tali meccanismi contribuiscono ad ampliare il numero di false evidenze all'origine del processo di sviluppo del farmaco, sono stati altresì individuati ulteriori elementi che possono alterare l'affidabilità del dato, relativi alla conduzione di uno studio sperimentale preclinico sia nei suoi aspetti teoretici e tecnico-scientifici. Tra questi, i fattori principali sono stati individuati, appunto, nella difficoltà di trasferimento di conoscenze dall'ambito preclinico a quello clinico secondo il concetto. In risposta a questa problematica, negli ultimi dieci anni in ambito nazionale ⁴, europeo ⁵ e internazionale ^{6,7} si è assistito ad un ingente investimento di risorse e alla fondazione di nuove realtà accademiche per la produzione di materiale scientifico e alla fondazione di un nuovo settore di ricerca biomedica.

La medicina traslazionale, il concetto "*from benchside to bedside*" (dal bancone del laboratorio al letto d'ospedale) definisce le condizioni e i prerequisiti per trasferire i risultati ottenuti dalla ricerca preclinica e biomedica ad applicazioni cliniche, portando ad un miglioramento della cura del paziente accelerando il progresso del grado di innovazione scientifica alla realtà clinica in maniera tempestiva ed efficace, fornendo risultati affidabili ^{8,9}.

Capitolo II:

IL MODELLO SPERIMENTALE DI MALATTIA, ASPETTI ETICI E LEGISLATIVI

L'applicazione di un modello sperimentale dipende da concetti epistemologici quali: fine dell'analisi, conoscenza pregressa e osservazione dell'evento. Solo in seguito all'analisi di questi aspetti è possibile scegliere il modello sperimentale più adeguato alla sperimentazione in oggetto o valutarne l'utilità in base a criteri sia etici che funzionali. L'evento può essere rappresentato dal comportamento di una molecola endogena, di un farmaco o dalla variazione di un parametro fisiologico; l'osservazione comprende la costruzione del modello, lo stato fisiologico o patologico in cui si osserva l'evento, il modello come sistema (es. grado di complessità) e il grado di perturbazione del sistema determinato dall'osservazione stessa o da altri fattori; la conoscenza pregressa è legata alla strategia adottata per ottenere le informazioni sull'analisi da condurre e lo stato delle conoscenze al momento dell'analisi.

Nei paragrafi successivi saranno trattati gli elementi rispetto ai quali può definirsi funzionale il modello sperimentale in base alla quantità e alla qualità di informazione trasferibile alla dimensione clinica dei fenomeni biologici. Gli aspetti etici della conduzione di uno studio preclinico riguardano soprattutto l'impiego di animali nelle procedure.

La questione etica sull'utilizzo degli animali per la sperimentazione scientifica implica diverse domande. La più immediata è strettamente connessa all'aspetto scientifico: la ricerca animale fornisce informazioni essenziali che non possono essere ottenute altrimenti? Anche una risposta affermativa a tale domanda non risolve la questione etica se sia accettabile o meno utilizzare animali in procedure che possano causare loro dolore, sofferenza e distress. Questo concetto, e tutte le sue possibili implicazioni etiche sono state trattate per esteso e sulla base di principi etico-epistemologici durante la seduta del Nuffield Council on Bioethics dell'Aprile 2005. In questa sede sono stati definiti i criteri da considerare nel processo di *decision making* in ambito etico valutabili secondo una visione consequenzialista o deontologica. In base alla prima di queste, il valore morale delle azioni umane ed il loro giudizio è determinato principalmente dal loro risultato. Questo tipo di approccio solitamente non enfatizza

aspetti relativi a diritti inviolabili di chi compie (agente morale) e chi subisce (soggetto morale) azioni eticamente valutabili; per la seconda visione ogni tipo di azione possiede un valore intrinseco giusto o sbagliato che dipende da un sistema formale basato su diritti inviolabili. All'interno della discussione vengono identificate le seguenti proprietà, non esclusive, che definiscono un soggetto morale:

- **Senienza** (*sentience*) come capacità di esperire piacere e dolore.
- **Capacità cognitive sviluppate** (*higher cognitive capacities*) che includono la consapevolezza del bene e del male, del sé, il possesso di libertà e di volontà razionale, quest'ultima intesa come capacità di agire secondo regole autodefinitive per perseguire determinati fini (es. l'utilizzo di strumenti, la comunicazione inter-individuale, la capacità di assegnare parole ad oggetti).
- **Capacità di prosperare** (*capacity to flourish*) , ovvero di perseguire i bisogni specie-specifici. Tale proprietà include una serie di ulteriori considerazioni legate all'arricchimento ambientale, alla procreazione selettiva e alle modificazioni genetiche.
- **Socialità** (*sociability*), la capacità di creare legami sociali o comunità intra-specie o con l'uomo.
- **Possesso di una vita**

Inoltre, viene rifiutato come criterio etico l'esistenza di una proprietà fondamentale e la necessità che per definirsi tale un soggetto morale esprima tutte le proprietà sopra citate; l'assegnazione di una determinata specie per una precisa applicazione; e qualsiasi sistema che individui un particolare ordine gerarchico di specie con l'essere umano all'apice.

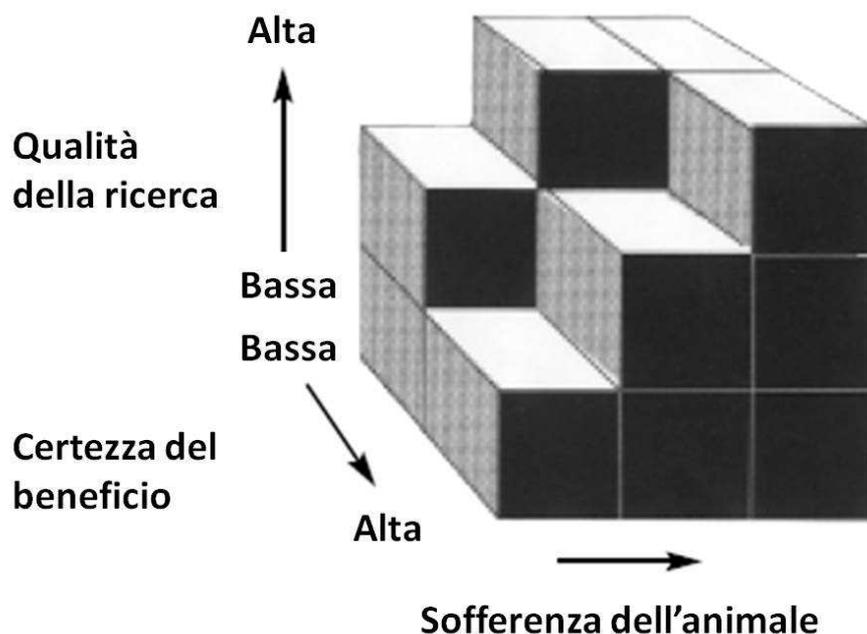
Sulla base di questi principi il dibattito tra i diversi *stakeholders* non è sfociato in una posizione comune in merito alla questione, quanto piuttosto alla definizione di cinque diverse posizioni:

1. **Tesi antropocentrica** (“*anything goes*”): se la sperimentazione animale mostra un valore per l'uomo, non è necessaria alcuna giustificazione etica;

2. **Tesi compromissoria** (“*on balance*”): si giustifica pienamente la sperimentazione, a condizione che ogni decisione sia presa con la certezza che il costo per l’animale sia di minore entità possibile;
3. **Il dilemma morale**: la scelta che sia eticamente accettabile o meno si rivela comunque problematica poiché in un caso nuoce al benessere animale, nell’altro altro alla salute umana;
4. **Tesi abolizionista**: che non riconosce alcun valore etico nella sperimentazione animale, se l’uomo usa l’animale per scopi scientifici lo fa solo in ragione della capacità di poterlo fare e non perché sia eticamente giusto ¹⁰.

A seguito di un complesso processo di revisione della Direttiva 86/609/EEC, l’Unione Europea ha abbracciato un quadro teorico ibrido: con posizioni sia consequenzialiste che deontologiche e nel complesso più aderenti alla tesi compromissoria, ammettendo la possibilità di svolgere un progetto di ricerca che implica l’uso di animali a condizione che questo incontri una serie di requisiti concernenti gli obiettivi della ricerca e le sue probabilità di successo, le specie animali utilizzate, l’effetto delle procedure sugli animali usati negli esperimenti e la accessibilità a metodi alternativi. Perciò esperimenti che provocano sofferenza in un ampio numero di animali, con obiettivi scarsamente significativi e bassa probabilità di successo e soprattutto in presenza di metodi alternativi, molto difficilmente possono essere considerati accettabili. Al contrario, un progetto di studio che mostri un’alta qualità del disegno sperimentale (basato su di una precedente revisione sistematica della letteratura) e della probabilità di successo data dal grado di predittività e di trasferibilità dei dati in clinica, può essere considerato eticamente accettabile, almeno finché non saranno disponibili metodi alternativi altrettanto affidabili rispetto al modello animale.

Figura 1: Criteri per valutare l'accettabilità di un progetto di ricerca



NB. Se le caratteristiche del progetto ricadono nel riquadro opaco del cubo, lo studio non dovrebbe essere condotto. Immagine tratta da Jennings M and Smith J - *Handbook for Lay Members of Local Ethical Review Processes* (Horsham: RSPCA). Immagine © Patrick Bateson 1986

A più riprese la comunità scientifica ha trasmesso la necessità di adottare un consenso generico sulle modalità per affrontare un protocollo di studio che coinvolga l'uso di animali, in seguito adottato e diffuso in diversi report e piani regolatori, compreso quello sovranazionale della UE.

L'approccio delle 3R segue i seguenti principi: ridurre il numero di animali utilizzati a partire dal disegno sperimentale (*Reduction*); ridurre procedure inumane e promuovere il benessere degli animali utilizzati (*Refinement*); sostituire, quando possibile organismi viventi con materiale biologico insenziente (*Replacement*)¹¹.

Nel 1986, la Comunità Europea (oggi Unione Europea) ha adottato la Direttiva 86/609/EEC sulla protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici. Ventiquattro anni dopo, a seguito di un dibattito pubblico che ha coinvolto diversi *stakeholders* inclusi membri della comunità scientifica, protezionisti e associazioni di pazienti, è stata

introdotta la Direttiva 2010/63/EU, che obbligava gli Stati Membri a trasporre la direttiva entro il 10 Novembre 2012 ed a darne applicazione a partire dall' 1 Gennaio 2013. Da parte propria l'Italia ha pubblicato il decreto legislativo di recepimento in data 4 marzo 2014 riproponendo in modo pressoché fedele l'impianto e gli obiettivi della normativa europea di riferimento, sebbene con poche ma significative eccezioni che rendono il presente decreto più restrittivo rispetto alla direttiva sovranazionale. In particolare, l'articolo 5.2 del D.lsg, concernente le finalità delle procedure, vieta l'uso di animali per la determinazione della LD₅₀ e della LC₅₀ , per la ricerca su sostanze d'abuso e per la produzione di anticorpi tramite induzione dell'ascite, salvo specifiche di altre normative nazionali e della Farmacopea; per gli studi mediante xenotrapianto (considerato come trapianto di organo intero); nella didattica, fatta eccezione per i corsi di formazione e di alta formazione veterinaria e per i corsi di alta formazione del personale medico.

Alcune delle disposizioni maggiormente di nota (Tabella 1) includono la definizione del personale necessario ed il suo coordinamento per lo svolgimento delle procedure, i requisiti per la cura e la stabulazione, i metodi per il sacrificio e la classificazione della gravità delle procedure atte ad ottenere un rigido apparato regolatorio di riferimento. Inoltre, in accordo con il principio delle 3R elenca tutte le misure da adottare in base alle conoscenze aggiornate sui fattori che influenzano il benessere animale e sulla proprietà delle diverse specie di provare dolore, sofferenza, distress e di subire danni permanenti. Il principio delle 3R è citato in diversi contesti: ad esempio se la sostituzione (i.e. *Replace*) con metodi alternativi non è possibile (Articolo 13 Comma 2 b), le procedure devono essere condotte limitando al minimo il numero degli animali utilizzato (i.e. *Reduce*). Assicurarsi il benessere dell'animale durante la stabulazione e la riproduzione e, coerentemente agli obiettivi del progetto di ricerca, limitare il dolore dell'animale mediante trattamento con analgesici (Articoli 1 Comma 5; 14 Comma 1. Vedi Tabella 1). Altre disposizioni, inoltre, regolano la formazione del personale e in diversi casi rendono obbligatoria la presenza di un veterinario (a differenza della direttiva UE) al fine di assicurare un corretto svolgimento delle procedure e di ottenere risultati affidabili. Attraverso l'adozione di queste misure è possibile provvedere ad un adeguato welfare dell'animale e a migliorare la qualità della ricerca¹². Tali disposizioni, derivanti dalla necessità di un approccio etico alla sperimentazione non devono essere considerate come una semplice restrizione dell'utilizzo degli animali, ma come una serie di linee guida utili a migliorare la qualità della ricerca in termini di accuratezza e nell'ottimizzazione del

modello. Il concetto che dolore e stress rappresentino un bias che influenza il risultato sperimentale aggiunge un nuovo stimolo ad ottimizzare le procedure e migliorare il benessere animale. Ulteriori misure per la riduzione del numero degli animali utilizzati consistono nell'impiego di strumenti statistici per determinare *a priori* la solidità del disegno sperimentale, definendo il numero necessario di replicati, riducendo i duplicati sperimentali e l'errore casuale¹³.

Per ciò che concerne la sostituzione del modello animale con metodi alternativi, negli ultimi anni si è assistito ad un notevole incremento in ricerca di base, applicata e sui test regolatori: metodiche *in vitro*, modelli e analisi *in silico* o studi, con le opportune considerazioni etiche, su volontari umani. I maggiori progressi sono stati ottenuti grazie agli studi di cristallografia a raggi X, che hanno permesso di trasferire le informazioni derivate dalla struttura molecolare tridimensionale a sistemi computazionali. La successiva nascita della chimica computazionale e lo sviluppo di sistemi di *High Throughput Screening* (HTS) per la valutazione precoce dei candidati farmaci hanno sostituito in parte test di farmacodinamica¹⁴ e test tossicologici^{15, 16}. Tuttavia, non esistono al momento metodi alternativi che possano fornire un modello completo e verosimile di malattia animale, soprattutto a causa del livello di complessità dei sistemi biologici e alla mancanza di conoscenza di diversi meccanismi fisiologici e fiopatologici. Se la completa sostituzione non è applicabile, può essere considerato l'utilizzo di specie con uno sviluppo neurologico limitato, eseguendo un'analisi sul grado di conservazione genetica o sull'osservazione di meccanismi fisiologici analoghi a quelli umani. Organismi più semplici possono essere perciò utili in determinati protocolli di studio: il nematode *C. Elegans*, ad esempio, rappresenta un modello animale invertebrato utile agli studi delle malattie neurodegenerative grazie alla sua facilità di mantenimento e dell'alto grado di conservazione dei meccanismi di trasduzione del segnale proteico¹⁵.

Varie critiche sull'effettivo contributo scientifico della sperimentazione animale si basano sull'evidente discrepanza con i criteri, molto più rigidi, utilizzati nei test clinici. In diversi casi infatti i protocolli di studio non vengono condotti adeguatamente e alla luce di revisioni sistematiche della letteratura¹⁶. A questo proposito sono state recentemente pubblicate alcune linee guida, che includono veri e propri diagrammi di flusso per il disegno sperimentale¹⁷ e su come condurre una ricerca sistematica della letteratura al fine di ridurre la duplicazione di studi condotti in precedenza che offrono già di per sé valide informazioni¹³. In questo modo è inoltre possibile diffondere la buona pratica

della valutazione dell'appropriatezza di diversi modelli animali e delle specie usate per soddisfare specifiche necessità sperimentali, offrendo inoltre più alti standard per la conduzione di nuovi studi¹⁸.

Tabella 1. Elementi rilevanti del dlgs. 26/2014 a confronto con la direttiva UE 63/2010

Art.	Par.	Comma	Testo	Cfr. Direttiva UE 96/2010
2	Definizioni	1	<p>f) utilizzatore, la persona fisica o giuridica autorizzata a <u>porre in esercizio uno stabilimento</u> in cui vengono eseguite le procedure, con o senza scopo di lucro;</p> <p>g) responsabile del progetto di ricerca, la persona fisica titolare dell'autorizzazione del progetto, che provvede all'elaborazione delle procedure e di progetti ed e' responsabile degli aspetti amministrativi e scientifici;</p> <p>h) responsabile del benessere animale, la persona responsabile del benessere e dell'assistenza degli animali e del funzionamento delle attrezzature di uno o più stabilimenti;</p> <p>i) membro scientifico, ricercatore o scienziato tecnico e teorico nei vari campi di indagine tecnico-scientifica che appartenendo alla comunità scientifica, comunica i risultati dei propri lavori attraverso pubblicazioni;</p> <p>q) xenotrapianto, trapianto di uno o più <u>organi</u> effettuato tra animali di specie diverse.</p>	<p><i>user means any natural or legal person <u>using animals in procedures, whether for profit or not. g); h); i); m); q): categorie relative agli aspetti scientifici delle procedure, non definite nel testo</u></i></p>
5	Finalità delle procedure	2	<p>Non possono essere autorizzate le procedure:</p> <p>a) per la produzione e il controllo di materiale bellico;</p> <p>b) <u>per i test tossicologici con i protocolli della Lethal Dose -LD₅₀ e della Lethal Concentration - LC₅₀</u>, tranne i casi in cui risulti obbligatorio da legislazioni o farmacopee nazionali o internazionali;</p> <p>c) <u>per la produzione di anticorpi monoclonali</u> tramite l'induzione dell'ascite, qualora esistano corrispondenti altri metodi di produzione e non risulti obbligatorio da legislazioni o farmacopee nazionali o internazionali;</p> <p>d) <u>per le ricerche sugli xenotrapianti di cui all'articolo 3, comma 1, lettera q);</u></p> <p>e) <u>per le ricerche sulle sostanze d'abuso;</u></p> <p>f) nel corso delle esercitazioni didattiche svolte nelle scuole primarie, secondarie e nei corsi universitari, ad eccezione della formazione universitaria in medicina veterinaria nonché dell'alta formazione universitaria dei medici e dei medici veterinari.</p>	<p>Non presente nel testo</p>
vari	Varie	vari	veterinario designato	<i>Veterinarian or another competent person</i>

Capitolo III:
CARATTERISTICHE TRASLAZIONALI DEI MODELLI
IN VITRO, IN VIVO, ED IN SILICO

III.1 Aspetti epistemologici e traslazionali dei modelli sperimentali

Un modello sperimentale o biomedico si definisce come un sostituto di un essere umano o di un sistema biologico umano che può essere usato per comprendere funzioni normali ed anormali, dal gene al fenotipo e che fornisce la base per un intervento di profilassi o terapeutico nelle malattie umane¹⁰. Tale definizione implica una serie di categorie che definiscono l'ambito di applicazione del modello ed il suo utilizzo, e nel contempo pone una serie di problematiche relative al suo grado di affidabilità. Considerando questi concetti di base è possibile sviluppare un sistema per distinguere i vari modelli e definirne l'adeguatezza di applicazione a seconda del grado di verosimiglianza con la patologia o il meccanismo patologico umano. Su queste basi è possibile distinguere gli elementi da definire per ottenere uno schema teorico che caratterizza il modello sperimentale ed il suo corretto impiego. Ad esempio, il sistema proposto da Sams-Dodds permette di assegnare un punteggio al modello utilizzato; questo viene calcolato sulla base della capacità di fornire una *proof of mechanism*, a seconda delle caratteristiche di verosimiglianza sia clinico-sintomatologica (*face validity*), che meccanicistica (*construct validity*), considerando come parametro principale il grado di complessità del sistema-modello¹⁹.

Un organismo vivente è un sistema complesso, costituito da sotto-sistemi a loro volta complessi ed interagenti. Partendo da questo presupposto la malattia può essere considerata come una perturbazione di tale sistema. La sua simulazione *in toto* e la possibilità di collezionare e interpretare tutti i dati pertinenti con gli strumenti oggi disponibili è impossibile senza l'utilizzo di un modello animale. D'altro canto, la ricerca *in vivo* ha mostrato come le differenze inter-specie spesso non permettano di ottenere gli *outcome* previsti nella fase clinica²⁰.

Il classico percorso teoretico di uno studio sperimentale procede per induzione, tramite l'utilizzo di sistemi basati su materiale biologico (*in vitro*), tramite un altro organismo vivente (*in vivo*) o di un modello matematico/computazionale (*in silico*); e per

deduzione, in base all'informazione che da essi deriva tramite l'analisi (ancora, *in silico*) dei dati ottenuti (Figura 2). Il processo induttivo si basa sull'osservazione sperimentale di un fenomeno in un sistema che permetta di osservare e misurare le variazioni degli elementi che compongono il sistema stesso. In questo caso, lo studio, attraverso l'analisi meccanicistica, procede per astrazioni successive, con una progressiva separazione dei sotto-insiemi biologici fino all'identificazione di un preciso meccanismo da analizzare. Uno studio che esamina i processi infiammatori, ad esempio, in un modello *in vitro* può focalizzarsi su di una componente precisa del sistema immunitario come, ad esempio, il processo di diapedesi linfocitario. Conoscendo la letteratura relativa ai *pathway* di espressione delle molecole coinvolte nel fenomeno, in un modello di co-coltura epiteliale e linfocitario può essere osservata un'alterazione dell'espressione delle molecole associate al fenomeno di diapedesi. Una domanda scientifica che può emergere è se, una patologia nella quale è coinvolto il sistema immune possa essere associata a queste variazioni, se un farmaco possa interagire in senso terapeutico con i meccanismi osservati o, se uno già esistente, possa avere una nuova applicazione in questo meccanismo fisiopatologico.

Un aspetto fondamentale della sperimentazione *in vitro* risiede nella natura stessa del sistema in osservazione, costituito necessariamente da componenti biologiche isolate. Perciò è di fondamentale importanza mantenere la condizione di tali componenti il più possibile rappresentativa e coerente all'obiettivo dello studio eliminando ogni possibile fattore che possa influire su questi due parametri. Ciò concerne, ad esempio, le procedure di raccolta ed isolamento del materiale che definisce il primo step di preparazione del campione. Uno studio tissutale, che può avere carattere descrittivo (es. analisi d'espressione, istologia) o funzionale (es. studi elettromiografici) a seconda che il campione in esame possa essere o meno mantenuto vitale durante l'analisi. Nel primo caso l'obiettivo è ottenere un'"istantanea" della condizione fisiologica del tessuto al momento del prelievo (i.e. congelamento, immersione in formaldeide), nel secondo è necessario adottare tutte le misure possibili per mantenere funzionale il tessuto (es. tramite l'immersione in tamponi salini ossigenati).

L'utilizzo di un modello *in vivo* permette di osservare il target in studio in un sistema dinamico. Perciò da un lato permette di aumentare il livello di complessità del sistema e di migliorare il grado di predittività rispetto all'organismo, dall'altro lo stesso grado di complessità, se il sistema viene perturbato come nel caso dell'induzione di uno stato patologico, può produrre dei fenomeni che possono sfuggire all'analisi. Tuttavia, come

verrà descritto più dettagliatamente nel corso della trattazione, anche i sistemi *in vitro* che utilizzano sistemi cellulari, anch'essi complessi, possono essere soggetti ad alterazioni indotte dagli stessi elementi costitutivi del modello, come i processi di immortalizzazione delle linee cellulari continue. Se i modelli *in silico* invece, non possono essere soggetti ad alcuna perturbazione data da un fenomeno emergente indefinibile, denotano altresì un limite ontologico dato dalla conoscenza umana, poiché realizzati immettendo nel sistema i dati a disposizione per rappresentare la realtà fisiopatologica, nel caso della simulazione di una malattia, o per decifrare l'informazione ottenuta da precedenti esperimenti, nel caso dell'analisi dati .

Figura 2: Modello classico induttivo-deduttivo di uno studio sperimentale

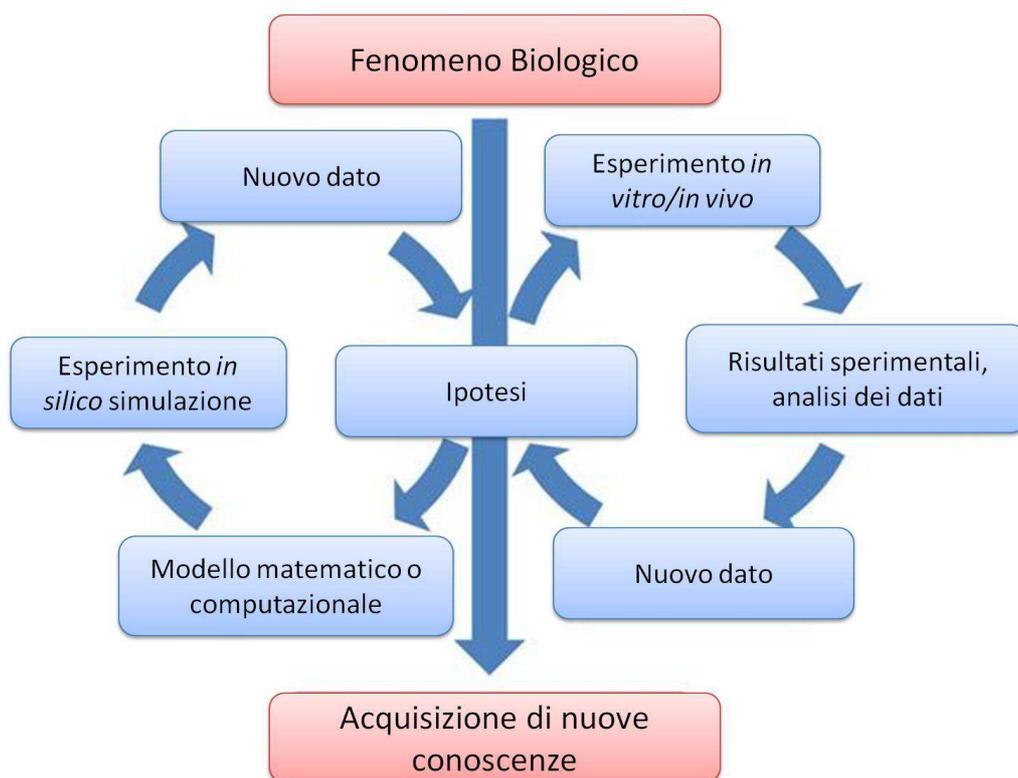


Figura 2. La progressiva creazione di conoscenza si basa sull'indagine per induzione attraverso l'utilizzo di modelli sperimentali e per deduzione attraverso l'analisi dei dati, si noti che il modelli *in silico* sono essere utilizzati in almeno uno dei due processi descritti (i.e. analisi del dato). Immagine tratta da Woelke AL, Murgueitio MS, Preissner R - Theoretical modeling techniques and their impact on tumor immunology. Clin Dev Immunol. 2010;2010:271794

a) Obiettivo della sperimentazione

Le fasi della sperimentazione in ambito farmacologico, pongono una prima distinzione che definisce i diversi modelli applicabili. Nella fase precoce di drug discovery è determinante l'applicazione di modelli in silico quali, ad esempio l'analisi QSAR che non necessitano della simulazione di una realtà patologica, si analizzano unicamente gli elementi fondamentali della possibile attività di una molecola, ovvero quelle caratteristiche chimiche che ne determinano l'interazione con un target biologico (es. docking molecolare). Tale processo si basa sulla rappresentazione virtuale dei due elementi e prevede l'utilizzo di banche dati contenenti tutte le varianti chimiche possibili del candidato farmaco e tutti i target biologici di cui è disponibile una struttura cristallografica. Tale sistema da un punto di vista teoretico, può non distinguere il target in base al suo ruolo biologico, si basa unicamente sui principi della chimica combinatoria; è completamente automatizzato e pressoché continuo. La capacità di analisi in questo caso definisce la categoria di tecnologie come high throughput screening, nella quale rientrano anche i più recenti studi del genoma intero (Genome Wide Association Studies - GWAS).

Altri approcci (i.e. in vitro) utilizzati nella fase precoce di sviluppo del farmaco prevedono l'utilizzo di materiale biologico che rappresenti una realtà fisiologica cellulare o fisiopatologica e vedono una più vasta applicazione per le malattie caratterizzate da un'eziopatogenesi multifattoriale o non del tutto chiara. In questo caso, può essere utilizzato materiale biologico derivato dal paziente (es. prelievo biotico, di sangue o plasma), protocollo comune, ad esempio, nella sperimentazione oncologica e possibile solo grazie al supporto di una realtà clinica coinvolta nel progetto di studio. Il tessuto tumorale, inoltre, permette il suo mantenimento in coltura, fattore da considerare comunque nel confronto con la reale dimensione fisiologica (i.e. verosimiglianza meccanicistica). Per questo motivo, l'importanza del modello di tumor engraftment nel modello animale, provvede a fornire una serie di elementi utili a provvedere un'adeguata verosimiglianza meccanicistica. Si noti, che questo modello è attualmente realizzabile sul territorio nazionale poiché esente da divieto solo grazie ad un'opportuna distinzione dal trapianto di organo intero (vedi Tabella 1 - xenotrapianti).

Nel caso non sia possibile il mantenimento in coltura del materiale biologico derivato dal paziente, si applicano delle metodiche che fissano le caratteristiche biologiche al

momento dell'espianto, elemento determinante per la verosimiglianza meccanicistica del materiale biologico. Tra le più comuni, il congelamento del tessuto in azoto liquido (snap freeze), o la fissazione chimica tramite formaldeide. In questo caso l'obiettivo dell'analisi (i.e. studio tissutale) deve limitarsi ad un carattere descrittivo, anche se altamente predittivo, che riguarda la quantificazione di un target biologico. Uno studio meccanicistico invece, comprende l'osservazione dinamica del comportamento di un target in determinate condizioni, quando il sistema biologico viene condizionato per simulare meccanismi fisiopatologici in presenza o meno di una condizione terapeutica o che ponga i presupposti per un intervento di questo genere. In questo senso, si definisce proof of mechanism l'evidenza che la variazione di un fattore biologico induce un particolare effetto. La forza di tale evidenza, si basa sul grado di comprensione di tutti gli elementi del sistema nel quale si è osservata tale variazione.

Per ciò che riguarda le fasi più avanzate del processo di sviluppo del farmaco, gli studi di farmaco-cinetica e farmaco-dinamica sottendono l'uso di modelli matematici/computazionali (tramite l'utilizzo di equazioni differenziali), che possono basarsi sui parametri conosciuti, e quindi simulabili, dei compartimenti biologici umani deputati ad assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione del farmaco (i.e. ADME). In particolare, recenti studi hanno proposto un sistema innovativo per considerare i parametri di biodisponibilità sistemica (F_{sys}) dopo somministrazione orale, che comprendessero le informazioni relative non solo al meccanismo di first-pass epatico, ma anche intestinale ²¹. Tra questi i modelli ACAT ²² e ADAM ²³ sono attualmente utilizzati in ambito accademico ed industriale e hanno permesso l'interpretazione dei dati in base ai parametri relativi ad età e profilo genetico del paziente, fisiopatologia della malattia e formulazione del farmaco. Da queste premesse emergono alcuni elementi intrinseci alla costruzione del modello che ne definiscono la loro funzione.

b) Malattia

A seconda del carattere eziologico della malattia in oggetto lo sviluppo o la scelta di un modello sperimentale cambia drasticamente: nel caso di una malattia con eziologia nota, come nel caso di una malattia infettiva, il modello sperimentale si ottiene inserendo il fattore eziopatogenico nel sistema biologico, inoculando ad esempio in vivo, o aggiungendo nel mezzo di coltura in vitro, l'agente infettivo o una sua componente. Più

comunemente la malattia in studio è caratterizzata da un'eziologia non del tutto chiara o completamente sconosciuta. In questo caso lo sviluppo (o la valutazione) del modello si deve basare su un grado di conoscenza parziale della patologia e sulla simulazione dei meccanismi che si considerano coinvolti nella sua fisiopatologia. In questo senso, in base al fine della sperimentazione, il modello può rappresentare un singolo meccanismo fisiopatologico o una serie di meccanismi atti ad una rappresentazione approssimata della realtà fisiopatologica umana. A tale scopo è imprescindibile un aggiornamento periodico delle conoscenze attraverso una revisione sistematica della letteratura scientifica per assicurarsi della coerenza del modello in utilizzo.

Come altri compartimenti biologici l'intestino è soggetto a malattie che possono essere definite in maniera univoca solo da una serie di parametri clinici e sintomatologici (i.e. malattia funzionale) piuttosto che da alterazioni biologiche chiare (i.e. malattia organica). Ciò rappresenta il limite maggiore allo sviluppo di un valido modello di malattia, insieme alla mancanza di una chiara eziologia del disturbo. Altra caratteristica che rende problematica per la costruzione di un modello è il carattere multifattoriale della patologia come accennato sopra. Nei paragrafi successivi, la trattazione prenderà in considerazione due patologie che denotano queste caratteristiche: la sindrome dell'intestino irritabile e le malattie infiammatorie croniche intestinali.

c) Biomarcatori, end-point primari, end-point surrogati

La necessità di stabilire il significato o meno delle variazioni osservate in un sistema biologico che sia una cellula, un modello sperimentale o l'intero organismo umano ha portato la ricerca biomedica e farmacologica alla definizione di tre parametri riferiti all'aspetto preclinico e clinico della sperimentazione. Un biomarcatore biologico è una caratteristica misurabile obiettivamente e valutabile come indicatore di processi biologici normali, processi fisiopatologici o risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico²⁴. Gli end-point primari si riferiscono agli outcome della sperimentazione clinica, ovvero rappresentano gli elementi che forniscono un'informazione sulla variazione di salute del paziente. Sono definiti come caratteristiche che riflettono come si sente il paziente, come espleta le sue funzioni biologiche o la sua sopravvivenza. Un end-point surrogato invece, viene inteso come parametro scientifico (es. epidemiologico, terapeutico o relativo alla

fisiopatologia) che possa sostituire un end-point clinico, ovvero un biomarker che si possa definire anche end-point.. A seconda dell'applicazione, possono essere distinte quattro categorie di biomarcatori:

- Biomarcatori diagnostici: se la caratteristica osservata riguarda la presenza o meno di una malattia o la sua progressione (biomarcatore prognostico). Può invece avere carattere predittivo nel caso indichi quale meccanismo di azione potrebbe essere di maggior beneficio per un paziente o se lo stesso possa incorrere ad eventi avversi ad una particolare terapia.
- Biomarcatori dell'attività patologica: misurano la gravità della patologia e di conseguenza la risposta ad un trattamento terapeutico, alcuni di questi possono essere usati per valutare le reazioni avverse al farmaco.
- Biomarcatori d'efficacia del farmaco: misurano il livello di interazione della molecola in esame con il target biologico, consente di ottenere informazioni preliminari sulla dose.
- Biomarcatori della cinetica del farmaco: relativi alle informazioni sui polimorfismi e varianti genetiche associate ad enzimi e trasportatori.

Lo sforzo della comunità scientifica nello studio di nuovi biomarcatori, ma soprattutto il tentativo di armonizzare, classificare e in generale trovare un consenso comune sui criteri di validazione dei diversi biomarcatori si è concretizzato nella fondazione di numerosi consorzi tra i quali il 'Predictive Safety Testing Consortiu'²⁵ ed il Biomarkers Consortium²⁶.

III.2 Fisiopatologia della sindrome dell'intestino irritabile

La sindrome dell'intestino irritabile (irritable bowel syndrome - IBS) è un disturbo funzionale cronico caratterizzato da dolore viscerale associato ad alterazioni dell'alvo che possono manifestarsi come stipsi (IBS-D), diarrea (IBS-D), o con l'alternanza di entrambi i sintomi (*mixed*, IBS-M). Questa patologia coinvolge circa l' 11% della popolazione mondiale con una prevalenza legata al genere femminile (67% maggiore rispetto a quello

maschile) ed una variabilità geografica compresa tra il 7% del Sud dell'Asia e il 21% del Sud America.

L'incidenza in un così ampio spettro della popolazione genera sia costi diretti per il SSN, relativi all'accesso alle strutture mediche, sia indiretti, legati ad un generale peggioramento della qualità della vita incluso il disturbo dell'attività lavorativa. Ad oggi rimane sconosciuta l'eziologia né sono stati individuati biomarker univoci per IBS nonostante sia stato dimostrato come diversi fattori biologici siano coinvolti nel quadro fisiopatologico di gruppi eterogenei di pazienti.

Secondo le teorie correnti si ritiene che alla fisiopatologia dell'IBS contribuiscano vari fattori, tra i quali, le alterazioni dell'attività motoria intestinale, un aumento della sensibilità viscerale e fattori psicologici ²⁷. Recentemente sono stati identificati precisi elementi biologico-molecolari che si ritengono essere implicati nella fisiopatologia di un ampio sottogruppo di pazienti. Tra questi, polimorfismi genetici per citochine pro-infiammatorie (es. del gene *TNFSF15* per il sottogruppo IBS-C ²⁸), il ruolo di episodi di gastroenterite infettiva (*post infectious*, PI-IBS), modificazioni dell'assetto endocrino intestinale (quali le alterazioni del metabolismo della serotonina) ed un'attivazione immunitaria a livello della mucosa intestinale ²⁹ (Figura 2). Un ruolo principale risulta essere svolto dall'asse cervello-intestino che comprende tutte le interazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene con il sistema immune, la barriera epiteliale ed il microbiota luminale. In particolare, evidenze sperimentali confermano la presenza di un'alterazione dell'omeostasi immunitaria a livello mucosale in un ampio sottogruppo di pazienti con IBS ³⁰

Figura 3. Rappresentazione schematica degli elementi che contribuiscono alla fisiopatologia di IBS

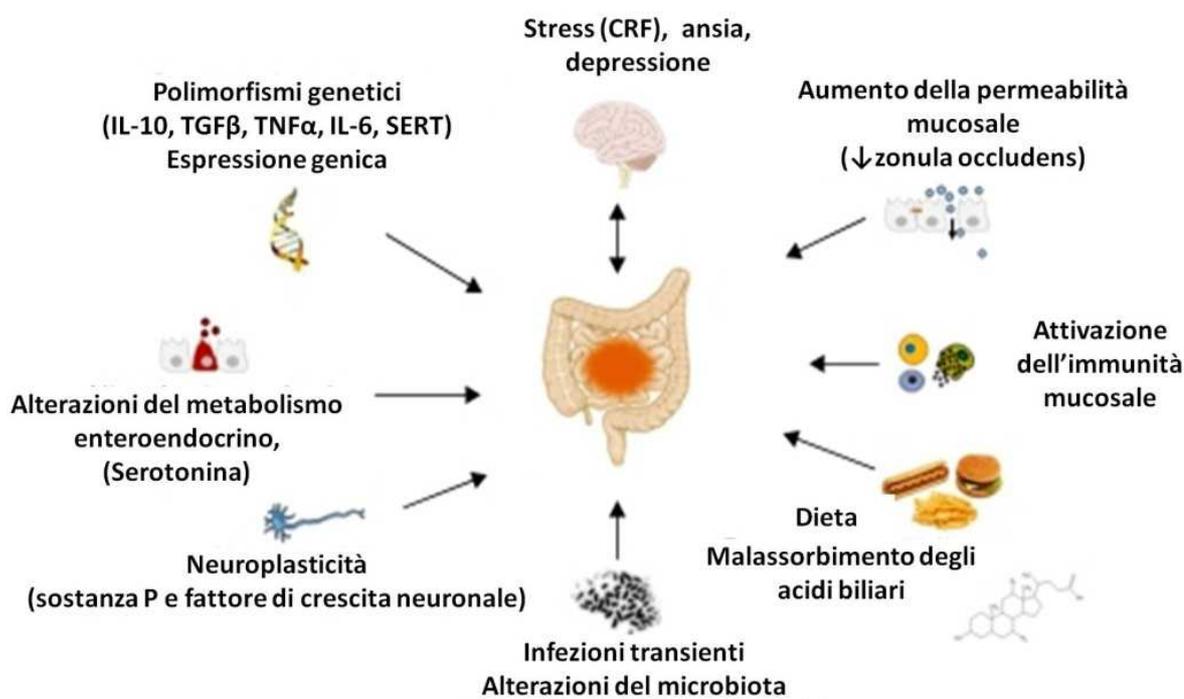


Figura 3. Immagine tratta da Barbara G et al - The Immune System in Irritable Bowel Syndrome - Neurogastroenterol Motil. Oct 2011; 17(4): 349–359.

L'attivazione immunitaria è prevalentemente di tipo mastocitario, sebbene siano implicati anche i linfociti T CD4+ e CD8+³⁰. I mastociti di mucosa si trovano in stretto rapporto anatomico con le fibre nervose della mucosa in pazienti con IBS rispetto ai controlli sani, suggerendo una maggiore attività del cross-talk neuro-immune³¹. A conferma delle implicazioni cliniche di questo cross-talk vi è dimostrazione che la presenza di mastociti attivati in prossimità delle fibre nervose correla in maniera significativa con la frequenza e la severità del dolore addominale. Inoltre, mediatori ottenuti da biopsie di mucosa colica di pazienti con IBS, infusi in colon di topo, inducono ipersensibilità viscerale³² e attivano i neuroni sensoriali mesenterici in preparazioni di ileo isolato di ratto³³. Analogamente, l'applicazione di mediatori ottenuti dalla mucosa di pazienti con IBS a neuroni del plesso mienterico e sottomucoso umano evoca una risposta eccitatoria³⁴. L'alterazione delle funzioni sensoriali e motorie indotta dai mediatori IBS può essere, almeno in parte, antagonizzata dal blocco recettoriale di alcune molecole

implicate nei processi infiammatori (es. istamina o proteasi), suggerendo che un'attivazione del sistema immunitario contribuisca in maniera significativa alla fisiopatologia di IBS.

Ad oggi, la diagnosi di IBS dipende da diversi parametri che vengono definiti a scadenza decennale (i.e. criteri di Roma) per definire un consenso sulla validità di nuovi biomarcatori diagnostici e biologici della malattia. Tuttavia, il preciso meccanismo eziopatogenico e diversi aspetti fisiopatologici comuni a tutti i pazienti sono tutt'ora da definire. Infatti, non è da escludere che sintomi complessi quali dolore viscerale e alterazioni della motilità, possano anche riflettere un gruppo eterogeneo di disturbi con diverse eziologie (es. predisposizione genetica; eziologie esclusive del sistema nervoso centrale [SNC] piuttosto che intestinali), fisiopatologie (motoria, sensoriale, alterazioni dell'attività secretoria) e presentazioni cliniche (diarrea o stipsi). Una delle ragioni dell'espressione di sintomi simili a livello gastrointestinale può essere dovuta al limitato numero di risposte percettive (dolore/fastidio) e comportamentali (motilità) a stimoli di diversa natura e a prescindere che lo stimolo sia localizzato a livello del SNC o intralume. Un'ulteriore causa dell'eterogeneità clinica di IBS potrebbe dipendere dalla coesistenza di vari disturbi, come disturbi della sfera affettiva ³¹, fibromialgia, ³² o cistiti interstiziali ³³; il fatto che queste manifestazioni extraintestinali non siano un denominatore comune di tutti i pazienti non li rende necessariamente elementi della fisiopatologia, oppure, potrebbe esistere un fattore non specifico di predisposizione, in assenza del quale né meccanismi centrali né periferici sarebbero in grado di generare i sintomi di IBS.

III.3 Fisiopatologia delle malattie infiammatorie croniche intestinali

Il Morbo di Crohn (*Crohn Disease* - CD) e la colite ulcerosa (*Ulcerative Colitis* - UC) sono malattie infiammatorie croniche intestinali (*inflammatory bowel disease* - IBD) ad eziologia sconosciuta ³⁵. Le IBD definiscono un gruppo di patologie infiammatorie croniche che interessa 2.2 milioni di persone in Europa e 1.4 negli Stati Uniti con incidenza in aumento in Asia Meridionale ³⁶. Le IBD sono caratterizzate da una perturbazione multifattoriale dell'omeostasi immunitaria che coinvolge un aumento della permeabilità intestinale ed una conseguente risposta aberrante al microbiota intestinale ³⁴

³⁵. CD e UC rappresentano le due maggiori forme di IBD caratterizzate da infiammazione cronica ad episodi ricorrenti e da parametri genetici ed istologici ³⁶. Caratteristiche comuni della fisiopatologia comprendono alterazioni della risposta innata e difetti delle funzioni della barriera mucosale. Diversamente, una chiara distinzione su base immunologica delle due patologie è tutt'ora poco chiara e si basa soprattutto sull'analisi di pattern citochinici e su profili genetici ³⁷ 41 42. Entrambe le forme mostrano un aumento dei livelli di TNF α e altre citochine pro-infiammatorie della risposta innata e cellulo-mediata (es. IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and IL-18). Nel CD, l'infiammazione cronica interessa diverse porzioni dell'intero tratto intestinale, più comunemente il tratto dell'ileo distale e del colon, e può condurre alla formazione di granulomi, fistole e stenosi intestinale e manifestazioni extraintestinali ³⁸. L'infiammazione è orientata ad una risposta di tipo Th1/Th17 con espressione di IL-12/IL-23 and IFN γ /IL-17 44.

La UC mostra un'infiammazione continua limitata alla sola area del colon, associata ad una risposta di tipo Th2 atipica, per l'assenza di IL-4 45. Quest'ultima evidenza è in linea con le recenti osservazioni riguardanti le linee linfocitarie che indicano una modulazione dinamica dell'espressione di diverse citochine da parte dei CD4 maturi dipendente dal *milieu* infiammatorio ³⁹. Diversi fattori genetici contribuiscono al grado di suscettibilità alle IBD: recentemente 70 diversi polimorfismi sono stati associati a CD e UC. In particolare, la correlazione della frequenza di espressione di polimorfismi associati alla proteina 2 contenente il dominio di legame nucleotidico per l'oligomerizzazione (NOD2) e ai recettori NOD2 simili (NLRPs), hanno confermato un ruolo determinante dell'immunità innata ⁴⁰. Inoltre, lo stesso tipo di associazione con il gene associato ad autofagia *ATG16L* ha dato spazio a nuovi spunti per l'interpretazione della patogenesi 48. Alcune differenze tra UC e Cd sono state infine individuate a livello delle regioni cromosomiche associate ai meccanismi di migrazione e *recruitment* leucocitari 49 50.

Figura 4: Caratteristiche comuni e distinte della fisiopatologia di UC e CD

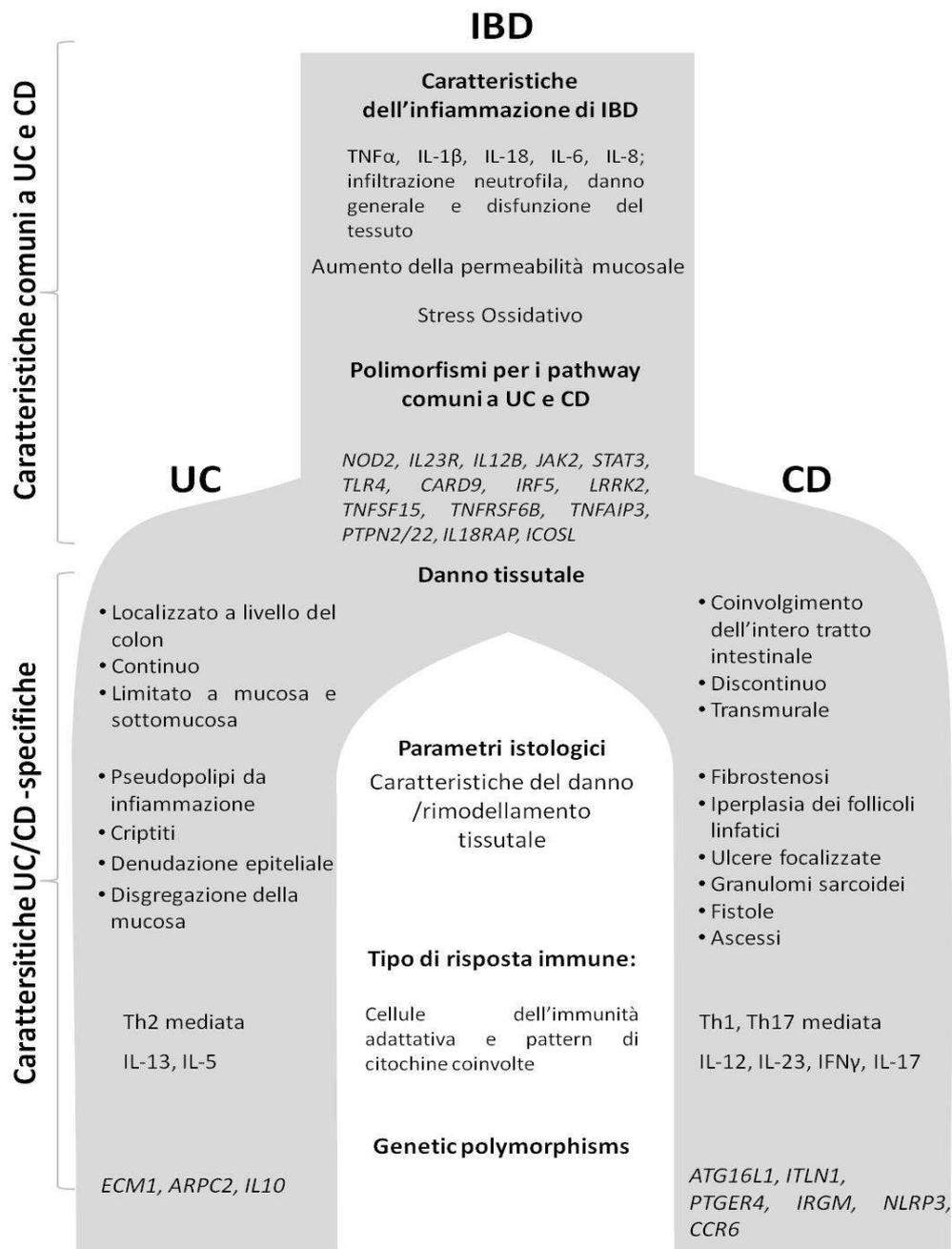


Figura 4. Caratteristiche fisiopatologiche e potenziali biomarcatori di IBD. Nella parte superiore, sono presentate le caratteristiche generali di IBD; la parte inferiore elenca le caratteristiche specifiche di UC e CD. Immagine tratta da Dothel G et al - Animal Models of Chemically Induced Intestinal Inflammation: Predictivity and Ethical Issues - Pharmacol Ther. 2013 Jul;139(1):71-86.

Come già riportato, le patologie considerate in questa trattazione sono caratterizzate dall'alterazione dell'attività di numerosi compartimenti biologici (i.e. CNS, ENS, immunità innata e adattativa, sistema endocrino, microbiota intestinale) e da interazioni del segnale proteico pleiotropiche e ridondanti. Inoltre, si devono tenere in considerazione i fattori esterni quali dieta, agenti infettivi ed altri fattori ambientali (es. fumo di sigaretta). Ne consegue che tutti i modelli sperimentali, compresi quelli animali riproducono solo parzialmente i meccanismi biologici d'interesse, andando a comporre un puzzle utile a determinare progressivamente la reale interazione di tutti fattori coinvolti.

Il grado di complessità delle malattie intestinali, organiche o funzionali che siano, è legato alla natura intrinseca dell'organo: vari sistemi sistemi complessi interagenti, (es. ENS, sistema immunitario) ed esposte come nessun altro compartimento dell'organismo ad agenti esterni, nella fattispecie, la componente antigenica derivata da cibo e microbiota intestinale. Per questo motivo, nello studio delle patologie intestinali risulta particolarmente difficile rispetto ad altri organi (es. sistema vascolare) la sostituzione del modello *in vivo* con metodi alternativi. D'altra parte, a causa delle differenze inter-specie, il disegno dello studio e l'interpretazione del dato deve considerare l'interazione di fattori endogeni (es. pattern d'espressione citochinico) ed esogeni (es. alterazione del microbiota) sia nella patologia umana che in quella animale basandosi sugli sviluppi recenti della ricerca di base e della biologia di sistema (es. epigenetica) ⁴¹.

III.4 Il ruolo dei modelli in silico negli studi di farmacologia traslazionale

Il contributo più tangibile della ricerca *in silico* nella recente storia del sviluppo del farmaco in fase precoce può essere individuato nei primi anni 2000 in seguito allo sviluppo degli studi di cristallografia a raggi X e alla conseguente creazione di database contenenti le caratteristiche funzionali e strutturali sia di recettori endogeni che di possibili molecole bio-attive. Attraverso l'applicazione di sistemi combinatoriali a matrice è stato possibile automatizzare il processo di *docking* molecolare, ovvero la rappresentazione virtuale del legame ligando-recettore fornendo diversi dati sulle caratteristiche farmacodinamiche (i.e. *3D Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis* - 3D QSAR). I composti valutati positivamente nel processo di *matching* con il target biologico vengono sottoposti ad una successiva fase di ottimizzazione del

composto (parte del processo *Hit to Lead*). Inoltre, l'analisi 3D QSAR è stata recentemente applicata all'analisi delle varianti genotipiche del trasportatore ABC ed il successivo test dell'attività di diversi composti ⁴².

È noto come le applicazioni dei modelli computazionali non siano esclusive della fase di validazione del *target*, ma che costituiscano uno strumento pressoché imprescindibile durante l'intero processo di sviluppo del farmaco. In questa categoria rientrano modelli di statistica inferenziale generalmente applicati agli studi *wet* durante la fase preclinica e ai successivi trial clinici; di statistica descrittiva in fase IV e negli studi farmacoepidemiologici.

I modelli *in silico* permettono di fornire una rappresentazione predittiva dei fenomeni biologici e delle loro interazioni significative (i.e. simulatore), attraverso l'applicazione di vari strumenti matematici, tra i maggiormente diffusi, il calcolo differenziale. L'obiettivo principale alla base della costruzione del modello è stabilire le variabili dipendenti e le variabili indipendenti in base ad un'analisi a monte dei dati sperimentali. Successivamente si definiscono le proprietà, ovvero l'insieme di funzioni, in grado di predire lo stato del sistema nell'istante successivo (i.e. generatore di evoluzione). Il modello matematico ottenuto viene quindi sottoposto a validazione sia attraverso analisi qualitative che simulazione di casi noti per poi procedere alla validazione sperimentale e alla simulazione di casi non noti (Figura 3).

Figura 5: Diagramma di flusso, deduzione e validazione di un modello matematico per la ricerca sperimentale biomedica.

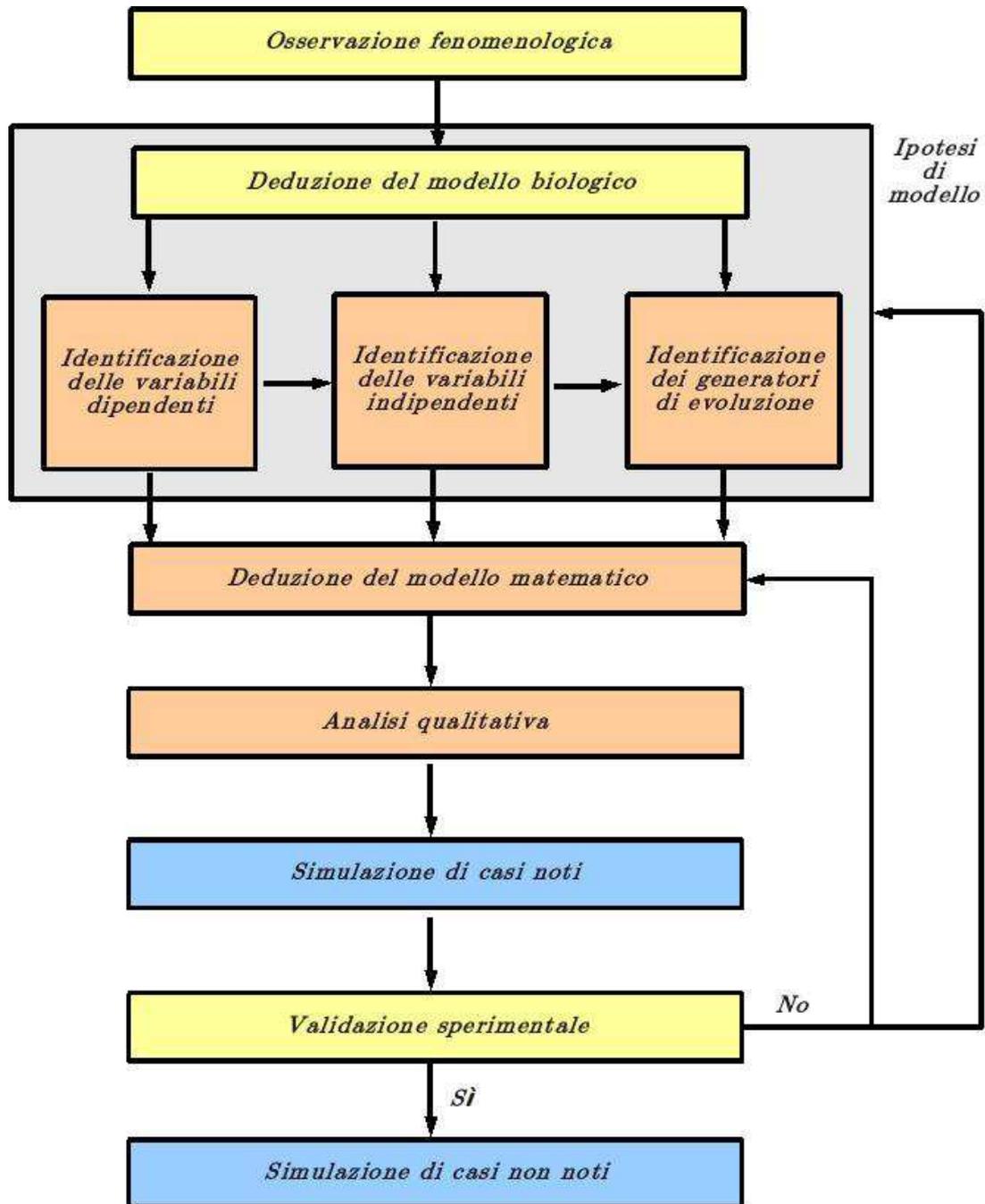


Figura 5. Le diverse fasi di sviluppo del modello comprendono procedure sperimentali *wet* (giallo), progettuali (arancione) e di calcolo (azzurro). Immagine tratta da L. Preziosi. Modelli differenziali nelle scienze biomediche, in C. Bartocci, P. Odifreddi, Eds., *La Matematica IV. Pensare il Mondo*, Einaudi, 2010.

Tale processo, risulta particolarmente complesso nei sistemi biologici e necessita di un preciso grado di approssimazione ottenibile con l'aiuto di strumenti statistici atti a ridurre il numero delle variabili significative (es. analisi delle componenti principali - PCA). Un approccio proposto da Kepler e Cilburn per la simulazione del processo di reclutamento ed extravasazione dei macrofagi segue quello della programmazione digitale, procedendo con lo sviluppo di modelli (i.e. programmi) più semplici e con la progressiva integrazione in un programma più ampio⁴³. Il sistema di micro-simulazione proposto comprende la rappresentazione di più sistemi accoppiati: un modello di reazione/diffusione delle citochine e altri recettori solubili, un modello per il reclutamento e la diapedesi dei leucociti e un modello per alcuni meccanismi biomolecolari interni alla singola cellula.

L'applicazione di modelli statistici risulta particolarmente efficace nella validazione dei modelli sperimentali di malattia. In particolare, studi recenti hanno determinato il grado di verosimiglianza meccanicistica di due modelli largamente utilizzati di infiammazione intestinale eseguendo un'analisi multidimensionale basata sui livelli di espressione di diverse citochine pro-infiammatorie inserite come variabili in matrici di correlazione o nell'analisi delle componenti principali (PCA)⁴⁴.

Un esempio ulteriore di applicazione dei modelli *in silico* costituisce l'area di studi di proteomica inclusa nella biologia di sistema e relativa alla creazione di *network* proteici. Generalmente, il dato relativo all'interazione tra proteine deriva dall'applicazione di tecniche *high throughput* alle metodiche di spettrofotometria di massa e cromatografia per affinità su campioni di lievito. I grafici di interazione proteina-proteina sono generati da un'elaborazione statistica che permette di correlare i dati in tempo reale provenienti dall'analisi definendo i nodi, ossia le proteine che interagiscono con più target proteici. Successivamente si effettua un'analisi guidata tramite il raffronto con database on-line⁴⁵. La rappresentazione grafica automatizzata si limita a definire le proteine che interagiscono senza definire la natura dell'interazione. L'implementazione data da successive analisi contribuisce a determinare se tale interazione costituisca il blocco o l'attivazione della molecola, e può essere ulteriormente implementata con le caratteristiche riguardanti la natura biochimica del fenomeno di interazione (es. fosforilazione, ubiquitinizzazione). La rappresentazione dei network proteici permette una valutazione schematica della natura delle interazioni e del ruolo di attori specifici nella trasduzione del segnale proteico. Di recente sviluppo sono alcune piattaforme on-

line, quali Ingenuity® (Qiagen), che permettono il raffronto e l'analisi di differenti *network* utilizzando la visualizzazione a network come *output* del confronto tra differenti profili genetici ⁴⁶. Tale sistema rappresenta un utile strumento per eseguire studi comparativi delle alterazioni fisiopatologiche nelle malattie in esame attraverso studi di *gene profiling*.

Tale approccio olistico nell'analisi dei parametri fisiopatologici dei modelli di malattia (sia immunologici che genetici) rappresenta un passo importante per lo sviluppo strategie terapeutiche multi-target, soprattutto nelle malattie dove il sistema immune gioca un ruolo determinante, come in IBD ⁴⁷ e in IBS ⁴⁸. Data l'eterogeneità del campione, composto da individui che presentano una condizione fisiopatologica multifattoriale, risulta impossibile condurre un'analisi su di un campione reale che rappresenti tutte le possibili combinazioni dei diversi fattori. I modelli *in silico* rappresentano l'unico approccio per la creazione di questo pool "inesistente" di individui, resi all'interno di un sistema computazionale e combinatoriale come un insieme di variabili dinamiche associate ai diversi parametri (i.e. fattori: epigenetici, genetici, metabolici, immunitari) che contribuiscono alla malattia. Se in questo sistema ideale può essere simulata la realtà endogena del campione, deve altresì essere calcolata una realtà esogena (i.e. ambientale) i cui parametri, altrettanto o forse maggiormente numerosi, devono essere definiti. Questi ultimi, nel caso ad esempio di patologie intestinali, comprendono sia la componente microbica e di conseguenza tutti i meccanismi di tolleranza immunitaria, che quella relativa alla dieta e ai tossici ambientali. Una simile complessità, derivata comunque da una conoscenza incompleta della malattia, deve necessariamente procedere tramite l'analisi dei singoli meccanismi.

III.5 Modelli in vitro ed ex vivo di malattie intestinali organiche e funzionali

Le piattaforme *in vitro* convenzionali rappresentano un irrinunciabile strumento per l'identificazione di meccanismi di trasduzione del segnale e target proteici coinvolti in una moltitudine di processi fisiologici e patologici. Tuttavia, poiché basati su isolamento, mantenimento e analisi di uno o due tipi cellulari non permettono la loro osservazione nelle condizioni risultanti dalle complesse interazioni che si verificano nell'organo intero. Le colture cellulari, ad esempio, non sono in grado di simulare la dinamica di

distribuzione dei nutrienti a livello della matrice cellulare. I metodi di coltura cellulare classici, infatti, sono caratterizzati dalla presenza di alte concentrazioni di nutrienti che non permette di generare stimoli chimici o meccanici tempo-dipendenti, ovvero le molecole segnale, necessarie alle normali funzioni cellulari ⁴⁹. Generalmente tali sistemi utilizzano colture primarie, linee cellulari continue e cellule immortalizzate tramite traslocazione indotta da virus SV40.

Tra le linee più utilizzate le Caco2, le T-84, e le H-26 permettono di ottenere uno strato di cellule senza soluzione di continuità (i.e. *monolayer*) che, raggiunta la fase di confluenza denota alcune caratteristiche fenotipiche che ben rappresentano la membrana epiteliale intestinale. Questo tipo di colture inoltre, è applicabile a sistemi *trans-well* costituiti da due ambienti separati che possono condividere o meno lo stesso mezzo di coltura tramite l'utilizzo di membrane specifiche per il passaggio o meno di soluti tra i due ambienti. In questo caso la valutazione della permeabilità trans-epiteliale si basa sulla simulazione dello spazio intraluminale dell'intestino all'interfaccia apicale delle cellule e di quella intraepiteliale all'altra.

La valutazione delle proprietà di questo modello di epitelio intestinale può essere eseguita attraverso la misura di parametri fisici e funzionali della membrana attraverso due tipi di analisi. In una procedura viene misurata la conduttanza, un valore fisico intrinseco legato alla resistenza della membrana (ne è il suo inverso matematico: $G = \frac{1}{R}$ dove G: conduttanza ed R: resistenza). Il sistema si realizza grazie all'applicazione di due coppie di elettrodi applicate ai due compartimenti separati da una membrana, sulla quale è stato sviluppato il *monolayer* cellulare. La misura dei parametri funzionali, ovvero quanto il *monolayer* sia in grado di schermare il passaggio di soluti da un ambiente all'altro, avviene tramite il saggio spettrofotometrico della concentrazione di un cromogeno o di un composto fluorescente (es. fluoresceina) presente dopo un tempo *T* nello spazio adiacente alla parte basale del *monolayer*. Questa metodica, applicata anche nel sistema delle *Ussing chambers*, ha permesso di stabilire alcuni dei meccanismi alla base della variazione della permeabilità trans-epiteliale in condizioni patologiche, nonché il suo aumento sia in IBS ^{29,50} che in IBD ⁵¹⁻⁵⁴. La stessa modalità viene utilizzata per la co-coltura delle cellule epiteliali con cellule neuronali (immortalizzate o *ex vivo*) seminate nell'ambiente inferiore all'interno del quale viene applicato uno stimolo elettrico nell'ordine dei μV , con la conseguente eccitazione della componente neuronale.

Gli studi di elettrofisiologia da metà degli anni settanta ad oggi hanno fornito il maggior contributo per la comprensione delle funzioni del sistema nervoso enterico (ENS) e si basano sulla misurazione elettromiografica della contrazione muscolare in espianti di muscolatura longitudinale e plesso mienterico (da uomo o animale), mantenuti vitali attraverso l'utilizzo di opportuni tamponi salini. Questa metodica rappresenta un felice esempio di come un sistema isolato *in vitro* possa mantenere un carattere altamente informativo: in questo caso il processo *bottom-up* si basa sulla caratterizzazione di una componente, quella neuromuscolare, di per sé molto eterogenea ed in grado di mantenere le sue caratteristiche morfo-funzionali. Infatti, le caratteristiche intrinseche del sistema nervoso enterico, hanno permesso di renderlo un ottimo target di studio per l'analisi fattori di vario genere, incluse quelle che mimano una condizione patologica (es. infiammazione) nonché le normali condizioni fisiologiche.

Questo, come gli altri modelli citati in questa sessione infatti, possono beneficiare in termini di predittività di fattori estrinseci derivati dal paziente, ossia, nel caso degli studi su IBS dei mediatori derivati da biopsie di colon. In questo caso, il tessuto biotico viene mantenuto in terreno ossigenato per 20 minuti e successivamente congelato fino al trattamento del tessuto/coltura del sistema *in vitro* ⁵⁵. In questo caso, la coerenza dei risultati tra i diversi studi che utilizzano questa metodica è legata, come precedentemente accennato, alla fase di mantenimento del tessuto in insufflazione, che può essere eseguita con diverse tempistiche. Questo aspetto è di importanza fondamentale per lo studio di biomarker e altri parametri biologici che permettano la distinzione dei diversi sottogruppi di IBS ⁵⁵.

Lo sviluppo delle tecniche di coltura *in vitro* ed *ex vivo* classiche ha recentemente adottato diverse tecniche di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa utilizzando nuovi supporti per la crescita cellulare basati sulla funzionalizzazione strutturale di materiali inorganici e sull'utilizzo di biomateriali. Il principio alla base di queste nuove applicazioni riflette la necessità di simulare un sistema di coltura tridimensionale che meglio simuli le caratteristiche strutturali e funzionali di un tessuto. Collagene e acido ialuronico sono le componenti più comuni di strutture reticolari tridimensionali (i.e. *scaffolds*) in grado di fornire un elemento di supporto per la crescita di vari tipi cellulari non necessariamente immortalizzati, come neuroni e microglia ⁵⁶, condrociti e cellule mesenchimali ⁵⁷. Questi sistemi hanno permesso di comprendere l'importanza della crescita in 3D nella determinazione del grado di tumorigenicità di alcune specie cellulari

di carcinoma e tumore, dimostrando così la dipendenza del fenotipo cellulare dalle caratteristiche strutturali della coltura ⁵⁸. Inoltre, grazie all'applicazione di tecniche di micrografia laser e microfluidodinamica, oggi è possibile creare supporti che permettono lo sviluppo di colture cellulari che ricreano alcune caratteristiche morfo-funzionali dei tessuti, associabili alle funzioni dell'organo intero su piattaforme di pochi centimetri, nonché di acquisire dati sulla vitalità e differenziamento in tempo reale. Tali piattaforme biomimetiche (i.e. *organ-on-a-chip*) sono attualmente in uso per la simulazione del comportamento di fegato, reni, tessuto vascolare, polmone e tessuto tumorale negli studi di *drug delivery* ⁵⁸. Di recente sviluppo presso l'istituto Wyss di Harvard è il *gut-on-a-chip*, in grado di riprodurre una varietà di funzioni dell'intestino, inclusi i meccanismi di assorbimento, la peristalsi, nonché di includere all'interno della piattaforma una componente microbica intestinale presso il compartimento intraluminale ⁵⁹.

III.6 Modelli in vivo di malattie intestinali organiche e funzionali

Nonostante le innegabili differenze genomiche, fenotipiche e fisiopatologiche tra specie diverse, il modello animale rappresenta ancora la maggiore fonte di informazione sui sistemi biologici. Un vasto studio condotto da Pfizer nel 2000 evidenziò il livello di corrispondenza tra la tossicità dei farmaci rilevata nei modelli animali e nell'uomo, individuando l'area applicazione delle patologie gastro-intestinali come quella con una maggiore percentuale di *outcome* positivi ²⁰. L'organismo vivente, soprattutto negli studi di tossicità in gastroenterologia fornisce un modello complesso non ottenibile artificialmente che permette lo studio di interazioni fisiologiche e biochimiche non simulabili in maniera integrata nei modelli *in vitro* ed *in silico*.

Nel disegno di uno studio traslazionale è necessario considerare le caratteristiche comportamentali, anatomiche, fisiologiche, fenotipiche e genetiche della specie in uso nel modello di malattia. La predittività stessa del modello dipenderà fortemente dai tentativi di ottimizzare e validare il modello scientifico sia in termini di verosimiglianza che di trasferibilità delle informazioni ottenute al realtà clinica. Recentemente, molti autori hanno sottolineato l'importanza di identificare i biomarkers nel processo di sviluppo del farmaco proponendo le caratteristiche ideali di un modello di malattia ⁶⁰. Sams-Dodds sottolinea l'importanza di valutare la validità del modello in funzione della situazione clinica. Queste

informazioni infatti possono essere integrate nello sviluppo e ottimizzazione del modello attraverso la scelta dei biomarkers e i test per misurare i parametri patologici più rilevanti al fine di paragonare la validità dei diversi modelli ¹⁹. Inoltre, esiste una relazione sinergica tra i modelli di malattia e le corrispettive malattie nell'uomo: ad esempio, la modulazione del sistema immunitario nei modelli animali ha permesso la comprensione della patogenesi di alcune patologie immuni contribuendo allo sviluppo di farmaci biologici e biosimilari nell'uomo. L'uso di questi ultimi nelle malattie auto-immuni a sua volta ha permesso di individuare ulteriori meccanismi fisiopatologici, biomarker diagnostici e di riconsiderare la patogenesi della malattia ⁶¹. Per i suddetti meccanismi un aspetto innovativo degli studi clinici si rivela proprio nell'ottimizzazione del modello animale attraverso il miglioramento del grado di predittività che corrisponde necessariamente alla produzione di dati più affidabili. In altre parole, la ricerca traslazionale può essere interpretata come una disciplina bidirezionale, ovvero non semplicemente dal “banco al letto” (“*from bench to bedside*”), ma anche dal letto al banco (“*from bedside to bench*”).

La maggioranza dei modelli animali utilizzati negli studi preclinici, fatte alcune eccezioni (es. malattie infettive), vengono ottenuti tramite l'induzione di una serie di segni e sintomi di malattia che rappresentino per quanto possibile la condizione umana. Tuttavia, la relazione tra sintomi e meccanismi fisiopatologici non è univoca: questo è particolarmente vero sia per malattie multifattoriali come le malattie intestinali funzionali (es. IBS) e le malattie organiche (es. IBD). Di conseguenza, per valutare pienamente l'attività di un candidato farmaco devono essere considerati i diversi livelli e diversi meccanismi di interazione con gli elementi sopra elencati.

A questo si deve aggiungere la variazione inter-specie dei meccanismi fisiologici gastrointestinali ⁶², in particolare le diverse caratteristiche immunologiche tra il topo e l'uomo ⁶³. A questo proposito, un primo step da intraprendere nel disegno sperimentale è la valutazione del target molecolare inter-specie, affinché l'intervento terapeutico possa essere efficace in fase clinica.

III.7 Modelli in vivo di IBS

Lo sviluppo dei modelli *in vivo* di IBS riflette l'eterogeneità di questo disturbo, ovvero modelli diversi tendono a fornire un grado di verosimiglianza clinico-sintomatologica con i diversi aspetti della malattia. La caratteristica funzionale di IBS è un parametro che limita la valutazione del raggiungimento della condizione patologica nel modello all'analisi del grado di sensibilità viscerale, motilità intestinale e *output* fecale. Manifestazioni organiche, quali valutazioni istologiche del danno micro- e macroscopico devono perciò dare necessariamente esito negativo. Le metodologie d'elezione per la misurazione del dolore viscerale nei roditori consistono nel monitoraggio della contrazione della muscolatura addominale (risposta visceromotoria, VMR) in seguito a distensione meccanica della parete del colon-retto (CRD). La VMR può essere valutata attraverso elettrodi applicati tramite procedura chirurgica al muscolo addominale interno o esterno attraverso il tracciato degli impulsi elettromiografici (EMG). Nonostante questo sistema fornisca un dato di innegabile importanza per lo studio del dolore viscerale, devono essere considerati alcuni significativi deficit procedurali per ciò che riguarda la valutazione cronica, come la perdita di segnale causata dal danneggiamento degli elettrodi o le interferenze del segnale elettrico. Inoltre, la procedura d'impianto particolarmente invasiva può indurre una risposta immunitaria a livello dell'insulto tissutale indotto chirurgicamente. Un recente studio indica che il pre-condizionamento dell'animale tramite chirurgia EMG, la somministrazione post-chirurgica di antibiotici e la stabulazione individuale ha un impatto considerevole sulla risposta del dolore viscerale⁶⁴. Tuttavia, la somministrazione di antibiotici deve essere considerata come possibile fattore confondente per gli studi immunologici.

Altri approcci consistono nella registrazione dei cambiamenti manometrici della pressione di una sonda inserita a livello del colon distale o la differenza di pressione all'interno del lume. Tali metodiche risultano meno invasive e non necessitano dell'applicazione di trattamenti post-chirurgici come l'utilizzo di antibiotici o di analgesici che possono influire sulla percezione del dolore. Le stesse tuttavia, richiedono la stabulazione in un ambiente vincolante (gabbie di Bollman) e perciò necessitano un periodo di acclimatamento e che potrebbe rappresentare esso stesso un fattore di distress⁶⁴.

L'induzione dei sintomi di IBS può avvenire sia in età precoce che in età adulta tramite l'utilizzo di fattori stressanti (separazione della madre, CRD) o composti chimici.

Ad esempio, nel modello di deprivazione materna nel ratto, la separazione del neonato dalla madre per periodi di 3 ore durante il periodo post-natale causa una riduzione della soglia del dolore viscerale ⁶⁵ e alterazioni dell'espressione di neurotrasmettitori quali GABA, norepinefrina e fattore rilasciante corticotropina (CRF) a livello del SNC. Nello stesso modello è stato evidenziato un aumento della traslocazione batterica dal lume allo spazio sub-mucosale associato ad un aumento della permeabilità trans-epiteliale e un conseguente attivazione immunitaria ⁶⁶. Tuttavia, la presenza anche se minima, di un danno macroscopico (1,3 vs 0,1 del controllo) e l'aumento consistenza dell'attivazione immunitaria in fase acuta (mieloperossidasi endogena) rappresentano alterazioni di tipo organico che potrebbero inficiare la verosimiglianza del modello con la condizione umana. Inoltre, se è comprovata la tendenza alla manifestazione di malattie croniche inclusa IBS nei soggetti che hanno vissuto eventi avversi nelle fase precoci della vita, tale modello potrebbe avere un'applicazione valida, in linea teorica, solo per i pazienti con IBS che includono questo tipo di caratteristiche cliniche.

Il modello chimicamente indotto viene realizzato attraverso la perfusione per via rettale di basse dosi di acido trinitrobenzene solfonico (TNBS) o olio di senape in età precoce. La manifestazione dei sintomi simili ad IBS in questo caso segue una fase acuta fino a ridursi completamente con la remissione completa dell'infiammazione e non raggiunge la caratteristica cronicità che definisce il disturbo. L'induzione dei sintomi raggiunge una cronicizzazione se associata a CRD (due distensioni di 60 secondi con 30 minuti di recupero). La valutazione della sensibilità tramite CRD dalla 5^a settimana alla 12^{ma} risulta significativamente superiore rispetto al controllo senza però alcuna differenza rispetto del dato istologico. Inoltre, questo modello è l'unico che mostra un'alterazione della motilità intestinale sia in forma diarroica che di stipsi.

III.8 Modelli in vivo di IBD

Nel corso degli ultimi cinquant'anni sono stati sviluppati sessantasei diversi modelli animali di IBD, cinquantacinque dei quali sono attualmente in uso nei protocolli di ricerca 61, 62. Nel corso degli anni sono state proposte varie classificazioni 63-66 nel tentativo di mantenere aggiornato il numero, in costante aumento, di modelli *knock-out* e

transgenici sviluppati ⁶⁷. Ad oggi è possibile individuare quattro classi di modelli: i chimicamente indotti, i transgenici (*knock-out* e *knock-in*), i modelli spontanei, e quelli immuno-mediati (attraverso il trasferimento di linfociti attivati in animali con grave immunodeficienza combinata - SCID). Numerosi studi valutato la validità dei due modelli più comuni di di IBD, i modelli di infiammazione intestinale indotta da destrano-sodio solfato (DSS) ⁶⁷ ⁶⁸, e da TNBS ⁶⁹⁻⁷¹. Negli ultimi anni numerosi studi sui pattern di espressione citochinici hanno portato a modificare la distinzione classica delle due maggiori forme di IBD ^{38, 44, 72}. La validazione dei modelli animali che simulano le caratteristiche distinte di queste due forme patologiche devono considerare le ultime evidenze sperimentali che indicano numerose differenze inter-specie nei pathway di differenziamento dei linfociti. In particolare, è possibile individuare una chiara distinzione funzionale tra i sierotipi Th1 e Th2 nel topo: la produzione di IL-10 è Th-2 specifica, a differenza dell'uomo ⁶³.

Recenti studi che hanno analizzato le caratteristiche dell'immunità adattativa del modello di topo DSS hanno indicato un diverso pattern di espressione delle citochine a seconda del ceppo e delle procedure di trattamento ^{73 53} ⁶⁹. Queste evidenze rendono complessa l'interpretazione del potenziale diagnostico di profili di espressione così diversi. Un approccio basato sulla statistica multivariata (ancora un esempio di elegante applicazione del modello *in silico*) ha analizzato i pattern citochinici dei linfociti Th1, Th2 e Th17 nel modello DSS e nel modello TNBS entrambi in topo ⁵³. La valutazione simultanea di variabili multiple (i.e. citochine e chemochine) permette di individuare dei profili citochinici specifici che possono sufficientemente distinguere controlli non affetti dal trattamento ed una patologia da un'altra.

Nei test di dose e via di somministrazione, gli studi di farmacodinamica e farmacocinetica dovrebbero riprodurre il più fedelmente possibile quelli pianificati per i futuri utilizzi clinici. Ad esempio, data la natura cronica delle IBD, la somministrazione del farmaco *per os* dovrebbe essere preferita, nonostante non sia sempre eseguibile per le proprietà intrinseche della molecola. Un importante aspetto da prendere in considerazione è l'eventuale capacità di indurre modificazioni del consumo di fluidi o delle proprietà dipsogeniche del farmaco test: l'induzione di infiammazione nel modello DSS, essendo indotta oralmente potrebbe essere influenzata da tali fattori e causare degli errori di valutazione sull'effetto terapeutico ⁶⁹. Un altro fattore confondente deriva dal considerare l'efficacia potenziale del farmaco senza una chiara distinzione tra attività terapeutica e

attività preventiva. Nonostante gli studi *in vivo* possano prevedere la somministrazione dell'agente terapeutico prima dell'induzione dell'infiammazione, la migliore *proof of concept* deriva dalla dimostrazione dell'efficacia del farmaco nell'indurre un recupero da una condizione patologica, come nel caso di studi clinici su pazienti con IBD. In uno studio di Koboziev e colleghi è stato indicato il mancato raggiungimento di un *outcome* positivo nel trial clinico della terapia basata su IL-10 (somministrazione terapeutica), nonostante l'efficacia mostrata nel prevenire/attenuare l'infiammazione intestinale nei precedenti studi preclinici (somministrazione preventiva) ⁶⁸. Questo esempio rafforza il concetto della necessità di adottare approcci farmacologici simili in studi prelini e clinici.

Infine, un ulteriore aspetto da tenere in considerazione della conduzione degli studi *in vivo* è l'adeguata valutazione statistica in fase di progettazione. Il calcolo della potenza e del numero del campione condotto su studi preliminari può permettere di limitare lo studio ai soli casi necessari (coerentemente col principio di Riduzione delle 3R). Inoltre, è consigliabile l'uso di altri parametri utilizzati comunemente nei trial clinici, quando possibile, come la conduzione dello studio in cieco, la randomizzazione e l'allocazione casuale del campione.

III.9 Modelli di infiammazione intestinale: colite DSS- e TNBS- indotta

La colite indotta da DSS rappresenta uno dei modelli di infiammazione intestinale più studiati. Numerosi studi sono stati condotti per determinarne le caratteristiche genetiche, immunologiche e microbiologiche ⁶⁹⁻⁷². In particolare, diversi studi hanno correlato specifiche caratteristiche dell'infiammazione (i.e. score del danno macroscopico e microscopico, attività della MPO endogena e pattern di espressione citochinici) con il dosaggio e le tempistiche del trattamento con DSS, differenti pesi molecolari del DSS, ceppo e sesso degli animali ⁷²⁻⁷⁵.

La somministrazione *per os* di una soluzione contenente DSS (2-5%) in acqua in diverse specie di roditori (i.e. topi, ratti conigli e cavie) per 5 fino a 7 giorni provoca una forma acuta di colite caratterizzata da presenza di diarrea ematica, perdita di peso, ulcere e infiltrazione di granulociti. Una condizione associabile all'infiammazione cronica può

essere indotta attraverso cicli di trattamento ripetuti (4-7). Nel topo, l'entità dell'infiammazione dipende dal ceppo utilizzato, che determina anche un diverso coinvolgimento della parete intestinale⁶⁹. L'ingresso del DSS nelle cellule epiteliali è mediato da un sistema di trasporto vescicolare dipendente dal peso molecolare del polimero di DSS⁷². Si noti che ad oggi non è del tutto chiaro come il DSS promuova il danno della mucosa; tuttavia è stato recentemente indicata come responsabile del fenomeno la capacità del DSS di competere per i siti dell'RNA ribosomiale responsabili del processo di traduzione proteica⁷². La ricostituzione del tessuto viene osservata dopo 14 giorni dalla cessazione del trattamento. Il danno mucosale è responsabile della risposta immune, con conseguente aumento dell'ingresso di agenti microbici nell'ambiente intestinale. Nel topo, il picco dell'infiammazione si manifesta al giorno 5 quando viene osservata una differente espressione del pattern citochinico⁷⁵. La fase acuta mostra una risposta mediata da linfociti Th1 e l'aumento di espressione di IFN γ , IL-12, TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-17 (quest'ultima attualmente in discussione)^{68,76,77}. Tale risposta precoce evolve in una risposta Th2 mediata nel modello cronico con elevati livelli di IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 and IL-10 in modo analogo alle caratteristiche della infiammazione caratteristica della UC umana^{78,79}. In particolare, l'espressione di IL-6 risulta essere gene-dipendente⁷⁰. Nonostante evidenze sperimentali mostrino un aumento delle citochine specifiche della risposta immune adattativa, il fatto che topi con Immuno-Deficienza Sistemica Combinata (SCID) manifestino comunque infiammazione a seguito del trattamento indica che questo tipo di infiammazione sia indipendente dalla risposta immunitaria specifica.

Il TNBS, o in alternativa il DNBS⁸⁰, è un aptene somministrato tramite clisma nei ratti o nei topi in combinazione con etanolo (40-50%) al fine di rompere la barriera mucosale e permettere l'ingresso del TNBS/DNBS nella parete intestinale. Quest'ultimo, reagisce con alcune proteine autologhe stimolando un'ipersensibilità ritardata responsabile dell'attivazione di cellule T antigene- specifiche. La risposta immune aptene-indotta provoca ulcerazioni profonde della mucosa e della barriera epiteliale caratterizzate da infiltrazione transmurale di cellule mononucleate. In alcuni ceppi di ratto, un singolo clisma provoca un'infiammazione cronica che può durare oltre il mese. Più cicli di trattamento sono spesso richiesti nel topo per ottenere la cronicizzazione, a causa della ridotta tempistica dell'insulto intestinale⁸¹. La reazione di ipersensibilità ritardata può essere facilitata attraverso una fase di pre-sensitizzazione con TNBS/DNBS

applicato alla pelle, per intravena o per via subcutanea prima del trattamento del colon. In ogni caso, l'applicazione di una seconda dose di TNBS/DNBS risulta necessaria per assicurare una risposta autoimmune Th1-dipendente ⁸².

La fase acuta di infiammazione è caratterizzata da livelli aumentati di TNF α , IL-17, IL-12, IL-6 e IL-18; nell'infiammazione cronica, la risposta sembra essere mediata da Th1/Th17 con un aumento dell'espressione di IL-17, IL-12, IL-10 e MIP-2 ^{70, 83, 84}.

Il modello TNBS/DNBS è utilizzato al pari del modello DSS-indotto sebbene i protocolli utilizzati per l'induzione della colite siano meno standardizzati ⁸⁵.

Si noti che sia il dosaggio di TNBS/DNBS che quello di etanolo varia in diversi studi e necessita di essere ottimizzato dal singolo ricercatore, tenendo in considerazione fattori ambientali. Ad esempio, in un modello ideale per uno screening farmaceutico, il danno del tessuto intestinale non dovrebbe andare oltre ad un livello che risulterebbe irrealistico aspettarsi da un recupero raggiungibile attraverso ad un trattamento farmaceutico. Perciò, il dosaggio di TNBS/DNBS dovrebbe essere scelto accuratamente in ogni laboratorio (che potrebbe avere alcune caratteristiche particolari relative al ceppo dell'animale o a fattori ambientali) in modo da ottenere un danno coerente e calcolato, mantenendo il minor grado di mortalità possibile. In studi precedentemente svolti presso il laboratorio dell'Unità di Farmacologia - DIMEC, Università di Bologna sono state testate diverse concentrazioni di DNBS al fine di sviluppare un modello di IBD affidabile caratterizzato da un basso livello di mortalità {Dothel, 2013 411 /id}.

Fatta eccezione per gli aspetti concernenti il benessere animale, la selezione di dosi appropriate di agenti inducenti colite permette di ottenere condizioni standard, che dovrebbero essere prese da riferimento per saggiare le proprietà di qualsiasi nuovo farmaco da testare.

Durante l'infiammazione acuta, il danno iniziale indotto da una singola dose di DNBS tende alla guarigione e senza che solitamente si osservi alcuna recidiva⁸¹; in studi recenti effettuati presso i nostri laboratori, tutti i parametri biologici relativi all'infiammazione diminuivano dopo 10 giorni dal clisma con DNBS. Perciò, al fine di simulare l'infiammazione cronica osservata nel CD sono stati realizzati modelli attraverso somministrazioni multiple di TNBS/DNBS ^{84, 86, 87}.

Un infiammazione di tipo acuto e di tipo cronico è quindi ottenibile attraverso il modello TNBS/DNBS a seconda del protocollo utilizzato e della domanda scientifica da porsi. Originariamente sviluppato in ratto, questo modello è stato realizzato e validato anche in topo. Il primo di questi mostra vantaggi sia a causa di analogie morfologiche con l'uomo sia che per la facilità di manipolazione, mentre il modello in topo meglio si presta alle modifiche genetiche. Sebbene questi due tipi di roditori condividano fenotipi simili per le caratteristiche relative ai processi infiammatori, è necessaria un'analisi delle corrispondenze filogenetiche prima di intraprendere uno studio su qualsiasi target biologico. Inoltre, come per il modello DSS, variazioni genetiche tra ceppi diversi possono determinare una diversa suscettibilità al trattamento con TNBS/DNBS. Infatti, sono state individuate differenze tra i ceppi di topo BALB/c e SJL/J (più suscettibili) e il topo C57BL/6 meno suscettibile^{82, 88}.

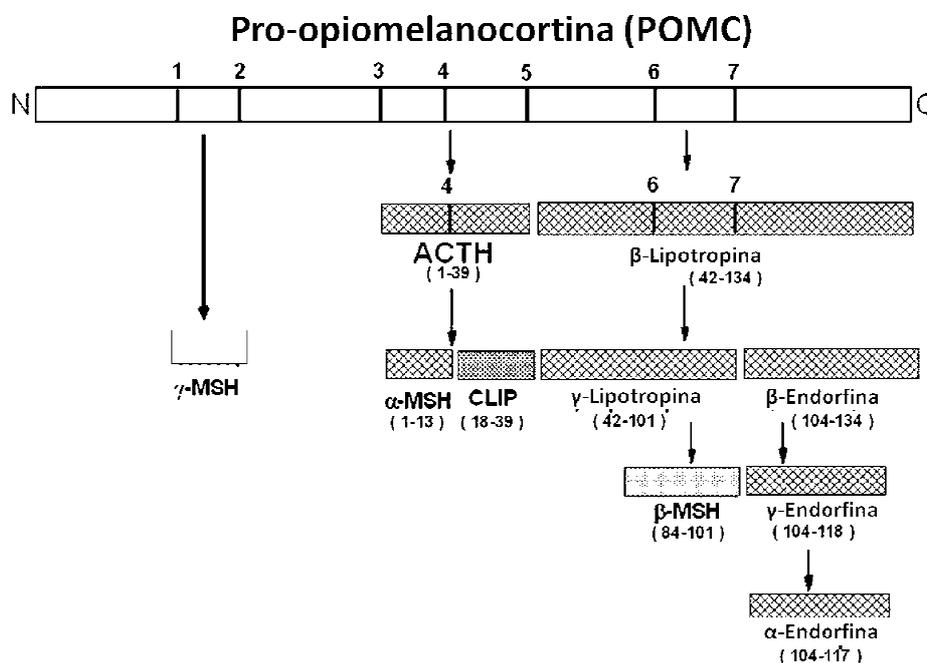
A fronte di questi dati è possibile elaborare diversi spunti per la realizzazione di un modello che simuli un infiammazione di basso grado, acuta, e cronica e la fase di remissione. Tuttavia manca ancora una chiara standardizzazione del modello ed esistono alcune discrepanze che riguardano in particolare la scelta del ceppo da utilizzare⁷⁴. Esistono inoltre variabili difficilmente gestibili, quali le differenze microbiologiche dovute alle diverse procedure di manipolazione e stabulazione.

Capitolo IV
IL SISTEMA OPIOIDE E CANNABINOIDE NELLE PATOLOGIE
INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI E NELLA SINDROME
DELL'INTESTINO IRRITABILE

IV.1 Il ruolo del sistema oppioide nella nocicezione immuno-mediata periferica e intestinale

È noto come gli oppioidi endogeni ed i loro recettori sono implicati nel controllo del dolore sia a livello viscerale che somatico ⁸⁹⁻⁹¹. Le cellule immunitarie, in particolare i linfociti T, contengono ed esprimono peptidi oppioidi, di cui sono noti gli effetti inibitori sul ENS e sulle vie nervose sensoriali ⁹². Ad oggi, sono state caratterizzate tre famiglie di peptidi oppioidi, ognuna derivante da un gene e da un precursore differente: pro-opiomelanocortina (POMC), proencefalina e prodinorfina, da questi derivano rispettivamente β -endorfina, encefalina e dinorfina. Ognuno di questi peptidi mostra diversa affinità per i tre recettori oppioidi μ , δ , κ (μ OR, κ OR, δ OR), recettori a 7 domini transmembrana associati a proteina G ⁹³. Al fine specifico della presente trattazione è opportuno citare la natura zwitterionica del precursore POMC responsabile della produzione tramite taglio proteolitico di numerosi peptidi con importanti funzioni biologiche, alcuni dei quali a loro volta precursori, come il peptide N-terminale di POMC (NPP, o pro- γ -MSH) ed il peptide intermedio corticotropino-simile (CLIP). Altri prodotti della proteolisi di POMC: γ -melanotropina (γ -MSH), corticotropina (ACTH), α -Melanotropina (α -MSH), β -Lipotropina (β -LPH), γ Lipotropina (γ -LPH), β Melanotropina (β MSH) e Metencefalina (Figura 6).

Figura 6 - Processo proteolitico e formazione dei derivati del precursore pro-opiomelanocortina



La β -endorfina (β -END) è il peptide oppioide più potente ed esercita la sua azione analgesica legando preferenzialmente i recettori μ . Questi sono sintetizzati a livello dei neuroni della radice del ganglio dorsale e, tramite trasporto vescicolare, vengono trasportati lungo l'assone per localizzarsi in membrana sui neuroni sensoriali del sito di infiammazione⁹⁴. In questa sede, il recettore risulta maggiormente espresso, suggerendo una sua funzione compensatoria inducibile (up-regulation) nei meccanismi di nocicezione⁹⁵.

Durante l'evento infiammatorio l'effetto proalgescico di alcune molecole dell'infiammazione (istamina, proteasi, citochine) è bilanciato dall'effetto antinocicettivo di oppioidi endogeni prodotti dalle cellule immunitarie 81-83. Studi in modelli animali di immunodeficienza combinata B e T linfocitaria (SCID-mice) mostrano che i linfociti T CD4+ determinano un effetto analgesico viscerale attraverso il rilascio dell'oppioide endogeno β -endorfina (β -END)^{96,97}.

Modelli animali immunosoppressi con ciclosporina A, con steroidi o con radiazione corporea integrale mostrano l'eliminazione dell'effetto analgesico stress-indotto⁹². Il blocco delle molecole di adesione endoteliali (L-,P- selettine) tramite anticorpi specifici, responsabili della diapedesi dei leucociti, riduce significativamente i fenomeni di

nocicezione endogena in sede periferica ^{98,99}. Inoltre, linfociti esprimenti L-selettina e β -END sono stati localizzati sia a livello dei linfonodi e che nella sede di infiammazione in modelli di infiammazione acuta somatica nel ratto ⁹⁹.

Durante l'evento infiammatorio l'espressione e il trasporto in membrana di μ OR risultano aumentate come anche la superficie accessibile delle terminazioni nervose a causa dell'aumento dell'innervazione ¹⁰⁰. Il tessuto infiammato è caratterizzato da un ambiente ad alta concentrazione di peptidasi e da un'elevata acidità e temperatura. Gli oppioidi endogeni sono suscettibili all'azione proteolitica, è perciò ipotizzabile che la vicinanza dei linfociti alle terminazioni nervose riduca il grado di degradazione degli oppioidi endogeni responsabile dell'effetto analgesico ¹⁰¹.

IV.2 Il sistema cannabinoide ed il suo ruolo nei meccanismi fisiopatologici di IBS e IBD

La composizione attualmente conosciuta del sistema cannabinoide comprende due recettori accoppiati a proteine G (CB1 e CB2), vari composti endogeni cannabinoide-simili ed un sistema per la loro sintesi e degradazione. Gli endocannabinoidi sono ammidi ed esteri di acidi grassi polinsaturi a lunga catena, di questi l'anandamide (AEA) mostra maggiore affinità per CB1 mentre il 2-arachidonoilglicerolo (2AG) come altri composti endocannabinoido-simili quali N-palitoilietanolamina (PEA) e oleoetanolammide mostrano affinità per entrambi i recettori ¹⁰²⁻¹⁰⁴. La degradazione degli endocannabinoidi avviene per idrolisi mediata da enzimi specifici, nella fattispecie tramite idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH) per AEA; monoacil glicerolo lipasi per 2AG; e ammidasi per l'idrolisi dell'acido N-acetiletanolamminico per PEA ^{103, 105}. Per ciò che riguarda il processo di sintesi, AEA risulta essere prodotta da diverse vie metaboliche, in particolare, attraverso la fosfolipasi D N-acil-fosfatidiletanolammino specifica (NAPE-PLD) ¹⁰⁶, mentre la sintesi di 2AG risulta maggiormente mediata dalla diacilglicerolo lipasi ¹⁰³.

Numerosi studi hanno confermato la presenza di AEA e 2 AG nel sistema gastrointestinale ed il loro coinvolgimento in vari processi fisiologici, tra i quali il rilassamento dello sfintere esofageo inferiore e l'inibizione della funzione secreto-

motoria intestinale ¹⁰⁷. CB1 e CB2, differiscono ampiamente sia a livello strutturale, con un'identità di sequenza attorno al 40%, che per la loro distribuzione all'interno dell'organismo ¹⁰⁸. CB1 è stato localizzato soprattutto nel CNS, nell'area post-sinaptica dei neuroni, dove modula il flusso di ioni K^+ e Ca^{2+} ¹⁰⁹; è inoltre marcatamente espresso a livello periferico sui neuroni sensoriali della radice del ganglio dorsale, nel trigemino e sulle cellule deputate alla funzione di difesa dell'ospite presenti in prossimità dei neuroni CB1 positivi, ossia cellule dell'immunità innata (es. macrofagi, mastociti) e cheratinociti ¹¹⁰.

A livello del ENS CB1 contribuisce alla regolazione dei neuroni secretomotori colinergici, inoltre, è espresso sui neuroni vagali, spinali e sui neuroni primari afferenti intrinseci (IPANs) di cavia e ratto ¹¹¹⁻¹¹³. Studi recenti suggeriscono una possibile applicazione di agonisti di CB1 nel trattamento di disturbi diarroici, incluso IBS-D, e di antagonisti per lo stesso recettore come terapeutico per la stipsi ed in particolare per i pazienti con IBS-C ¹¹⁴.

La localizzazione di CB2 in distretti diversi dal CNS ha storicamente definito una dicotomia delle due forme recettoriali stabilendo CB2 come recettore "periferico" piuttosto che CB1 come "centrale", tale assunto è tuttavia messo in discussione da diversi studi che mostrano CB2 espresso nella microglia e che la sua induzione dipenda da eventi infiammatori ¹¹⁵. Questa discrepanza tra risultati sperimentali ha peraltro destato una certa perplessità sull'effettiva specificità degli anticorpi utilizzati ¹¹⁵. CB2, generalmente si localizza sulle cellule ematopoietiche ed immunitarie, in particolare a livello di linfociti B, linfociti T CD4 e CD8, macrofagi e cellule NK. Si veda Cabral e colleghi per una descrizione dettagliata della distribuzione dei recettori nel sistema immunitario, dallo stesso studio è tratta la tabella seguente ¹¹⁵.

Tabella 2 - Distribuzione dei recettori CB1 e CB2 nel sistema immunitario

Cellule/tessuto	Specie	Recettore
Linfociti B	Uomo	CB ₂
Linfociti T CD4+	Uomo	CB ₂
Linfociti T CD8+	Uomo	CB ₂
Leucociti	Uomo	CB ₂
Macrofagi	Uomo, topo	CB ₂
Microglia	Ratto	CB ₁ , CB ₂
Monociti	Uomo, ratto	CB ₂
Mastociti	Uomo, Ratto	CB ₂
Cellule NK	Uomo	CB ^a
Placche di Peyer	Ratto	CB ₁ , CB ₂
Fegato	Uomo, topo, ratto	CB ₂
Timo	Uomo	CB ₂
Tonsille	Uomo	CB ₂
Linfonodi	Ratto	CB ^a

Studi in vitro su cellule di origine murina hanno dimostrato diversi gradi di attivazione di macrofagi e cellule della microglia in risposta allo stimolo infiammatorio indotto da LPS, il trattamento inoltre, provocava l'inibizione dell'espressione di CB2¹¹⁶. In questo contesto è opportuno sottolineare l'importanza di studi che utilizzino la forma umana di CB2 piuttosto che di roditore dato il grado di omologia di sequenza rispetto all'uomo (93%), la sequenza di CB1 diversamente, risulta essere più conservata¹¹⁵.

Uno studio di Sabatino e colleghi indica che l'espressione di CB1 e non CB2 risulta aumentata nei tratti di colon infiammato sia in pazienti con CD che UC. Inoltre, la concentrazione dell'agonista endogeno AEA risulta inferiore negli stessi campioni rispetto ai controlli e altrettanto risulta per il suo precursore NAPE-PLD al contrario di FAAH, marcatamente più espresso nei campioni con infiammazione¹¹⁷. Tuttavia, diversi altri studi mostrano un aumento della concentrazione di AEA associato ad infiammazione intestinale¹¹⁷.

Tuttavia, numerosi studi condividono la tesi secondo cui l'alterazione dell'espressione dei recettori cannabinoidi sia legata ai meccanismi infiammatori intestinali, suggerendo una possibile applicazione terapeutica di agonisti non selettivi per favorire i processi di omeostasi immunitaria^{118, 119} e per contrastare i processi fibrotici coinvolti nella formazione di stenosi associate a CD¹¹⁷. Studi su modelli di ratto inoltre, suggeriscono CB1 e CB2 come target terapeutici per il trattamento dell'iperalgia viscerale¹²⁰. Queste ed altre evidenze inclusa l'inibizione della degranulazione

mastocitaria cannabinoide-dipendente ¹²¹ includono IBS tra le possibili patologie nelle quali l'intervento nei meccanismi d'azione cannabinoidi potrebbe svolgere un ruolo terapeutico ^{115, 119, 122, 123}.

Ad oggi risultano ancora poco chiari i meccanismi attraverso i quali il sistema oppioide e cannabinoide partecipino alla genesi dei sintomi viscerali (incluso il dolore addominale) nell'IBS e nelle IBD. In particolare, ipotizziamo che in queste patologie vi sia un'alterazione del fenotipo neuronale di mucosa (i.e. aumento dell'innervazione mucosale) e del sistema oppioide (modificazioni del rilascio di β -END e dell'espressione del recettore μ) e che questi siano coinvolti nella patofisiologia e nei meccanismi di percezione sensoriale.

IV.3 Studio esplorativo tissutale: caratterizzazione del recettore cannabinoide CB2 del recettore oppioide μ e del suo ligando β -Endorfina nella Sindrome dell'Intestino Irritabile

Sulla base delle evidenze precedentemente enunciate è stato condotto uno studio esplorativo multicentrico al fine di valutare l'espressione del recettore oppioide μ , del suo ligando β endorfina e del recettore cannabinoide 2 e la loro localizzazione su alcuni tipi cellulari dell'immunità innata e specifica.

IV.3.1 Materiali e Metodi

a) Pazienti

Il progetto di studio ha coinvolto 23 pazienti con IBS-C (11 maschi e 12 femmine; età media $34,4 \pm 1,5$, range 18-55), 32 pazienti con IBS-D (16 maschi e 16 femmine; età media $37 \pm 1,9$, range 21-53) e 31 HC (12 maschi e 19 femmine; età media $36,3 \pm 2,3$, range 20-55). I soggetti coinvolti nello studio sono stati arruolati fra coloro che afferiscono all'Unità Operativa di Medicina Interna (Prof. Corinaldesi) Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna, con protocollo sperimentale n° 23/2012/U/Tess. e al Gail and Gerald Oppenheimer Family

Center for the Neurobiology of Stress, (Lin Chang, MD) David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA, USA .

a.1) Criteri di inclusione

- Pazienti affetti da IBS (sia maschi che femmine) con diagnosi positiva basata sui criteri di Roma III ¹²⁴. Età ≥ 18 anni e ≤ 65 anni.
- Pazienti che avranno fornito un consenso informato scritto.

a.2) Criteri di esclusione

- Pazienti in gravidanza o presunta gravidanza o in corso di allattamento o che non usa un metodo contraccettivo valido.
- Pazienti con anamnesi positiva per importanti patologie organiche, metaboliche, sistemiche e psichiatriche.
- Interventi chirurgici importanti a carico dell'addome.
- Malattia celiaca.
- Morbo di Crohn
- Colite Ulcerosa.
- Colite microscopica.
- Allergie alimentari accertate.
- Pazienti con una patologia concomitante che possa interferire con il completamento dello studio: patologia tumorale, scompenso cardiaco congestizio, angina instabile.
- Insufficienza renale significativa (creatinina ≥ 2.0 mg/dL).
- Insufficienza epatica (transaminasi superiori 2 volte il valore massimo).
- Contemporanea partecipazione ad altro studio.

a.3) Criteri di inclusione per i soggetti di controllo

- Soggetti di età e sesso comparabile al gruppo dei pazienti con IBS.
- Soggetti per i quali è indicata l'esecuzione di colono scopia nell'ambito del normale percorso assistenziale.
- Ottenimento del consenso informato.

a.4) Criteri di esclusione per i soggetti di controllo

- Soggetti affetti da malattie organiche o disturbi funzionali gastrointestinali.
- Condizioni che controindicano l'esecuzione di un'indagine colonscopica: ossia pazienti affetti da concomitanti patologie caratterizzate da grave insufficienza renale, epatica, respiratoria e cardiaca.

b) Colonscopia e biopsie

La pulizia dell'intestino è stata eseguita dal personale medico la sera precedente ed il mattino del giorno dell'esame mediante clisma con 1/2 litro di fisiologica. I pazienti dovranno essere a digiuno dalla mezzanotte del giorno precedente. Dopo la valutazione dei sintomi mediante questionario, i pazienti sono stati sottoposti ad una rettosigmoidoscopia nel corso della quale sono state ottenute 4 biopsie di mucosa colica nel tratto del sigma/colon discendente.

c) Immunofluorescenza e Imaging confocale

I campioni sono stati processati secondo metodiche standard di fissazione ed inclusione in paraffina presso il Laboratorio di Patologia Traslazionale (TPCL) - UCLA. Dal blocchetto paraffinato sono state ottenute dalle 2 alle 4 fette bianche per vetrino. Le sezioni istologiche (spessore di 3 µm) montate su vetri xilanati, dopo sparaffinatura e lavaggio con buffer salino fosfato contenente triton 0,1% (T-PBS), le sezioni sono state incubate per 1 ora con soluzione di T-PBS e serio di asino allo 0,5% a temperatura ambiente per il blocco dei siti aspecifici. Successivamente le sezioni sono state incubate

con anticorpo primario specifico (Tabella 2) per una notte a 4 °C. Il giorno seguente le stesse sono state incubate con anticorpo secondario specifico (Tabella 2). In esperimenti preliminari sono state definite le concentrazioni ottimali degli anticorpi primari e secondari, tramite diluizione seriale. In questa fase sono state eseguite le analisi includendo per ogni sessione sperimentale un controllo (incubazione preliminare con peptide specifico - immunoblocco). In tutta la fase sperimentale è stato compreso un controllo negativo incubato con il solo anticorpo secondario. L'analisi di immunofluorescenza e colocalizzazione è stata eseguita con un microscopio confocale (LSM Zeiss 710; (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) e software ZEN 2011 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) in dotazione presso il CURE center of Digestive Diseases, David Geffen School of Medicine - UCLA. Le immagini sono state acquisite ad un ingrandimento di 20X e 40X previa analisi dell'intensità del background e del controllo negativo per la normalizzazione del segnale del target.

d) Isolamento del materiale d'indagine

L'espressione dei geni corrispondenti a β -END e μ OR comprendono diverse modificazioni post-trascrizionali e post-traduzionali.

Il peptide oppioide β -END deriva dal taglio proteolitico del precursore pro-opiomelanocortina (POMC), che genera attraverso 4 distinti siti di taglio diversi peptidi biologicamente attivi⁹⁹. Ne consegue che l'analisi di espressione del trascritto attraverso RT-PCR corrisponde necessariamente ad un dato quantitativo assoluto e non corrispondente all'espressione del solo peptide β -END che sarà determinato attraverso le analisi immunoenzimatiche (i.e. Western Blot).

Al fine di ottimizzare la resa dei campioni bioptici in termini di numero e ripetibilità, è stata adottata una metodica che permette la separazione di RNA e proteine totali dallo stesso campione. Pur essendo possibile lo stesso tipo di separazione tramite il classico metodo di Chomczynski¹²⁵) è stato preferito l'utilizzo di un kit a colonnine (Illustra TriplePrep, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) al fine di ottenere una resa superiore in termini di purezza. Tale sistema inoltre, offre la possibilità di ottenere l'isolamento in step successivi delle porzioni relative a DNA, RNA e proteine dallo stesso campione, ciò ha permesso di utilizzare lo stesso campione di tessuto bioptico sia per i saggi

d'espressione del trascritto tramite Real-Time PCR, che del contenuto proteico tramite Western Blot . Il DNA genomico ottenuto è stato archiviato per studi futuri. La concentrazione di RNA per campione è stata quantificata mediante spettrofotometro (Nanodrop 1000, Fisher - Waltham, MA USA).

e) Saggi biomolecolari - Western Blotting e Sybr green Real Time PCR

Le biopsie (n°2) sono state congelate in azoto liquido subito dopo il prelievo (snap freeze) siglate e conservate a -80° C. La frazione proteica è stata determinata tramite saggio colorimetrico basato sulla reazione dell'acido bicinconico (BCA, Pierce), e lettura allo spettrofotometro. Il contenuto proteico dei campioni è stato separato per elettroforesi su gel di poliacrilamide al 10% e trasferito su membrane di polivinidenefluoruro (PVDF). Successivamente è stato eseguito il blocco dei siti aspecifici tramite incubazione per 1 ora con buffer di bloccaggio LI-COR (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Le membrane sono state incubate overnight con l'anticorpo primario specifico per la proteina in esame e per la proteina di controllo (GAPDH - Tabella 2). Il giorno seguente, le membrane sono state lavate in T-PBS ed incubate con anticorpo secondario fluorescente specifico (Tabella 2) per 1 ora, l'intensità delle bande è stata acquisita e quantificata grazie attraverso scanner Odyssey SA e software Odyssey (LICOR Biosciences, Lincoln, NE).

Tabella 3 - Elenco degli anticorpi utilizzati nelle procedure, caratteristiche e concentrazioni d'uso

	Descrizione	Target cellulare/molecolare	Specie	Laboratorio/Azienda produttrice	Concentrazione di utilizzo per IF	Concentrazione di utilizzo per WB
Ab primari	anti- hu MOR	MOR	Rb	Immunostar	1:200	1:2000
	anti-hu β -END	β -END	Rb	Lab. di Psichiatria e Scienze Comportamentali – UCLA	1:100	1:1500
	anti-hu EMR-1	Macrofagi	Mo	Santa Cruz	1:100	
	anti-hu CD4	Linfociti T CD4+	Mo	Millipore	1:50	
	anti-hu Triptasi	Mastociti	Mo	Millipore	1:1000	
	anti-hu GAPDH	Gliceraldeide -3-fosfato-deidrogenasi	Mo	Cell Signaling		1:2000
	Anti-hu CB2	CB2	Gt	Santa Cruz	1:50	1:200
Ab secondari	Alexa fluo 555 anti Rb		Dk	Life Technologies	1:1000	
	Alexa fluo 488 anti Mo		Dk	Life Technologies	1:1000	
	IR-Dye 680 anti Mo		Gt	LI-COR		1:10000
	IR-Dye 800 Anti Rb		Gt	LI-COR		1:10000
	IR-Dye 800 Anti Gt		Dk	LI-COR		1:10000

Per il saggio di Real T-PCR, per ogni campione 1 µg di RNA è stato utilizzato per la reazione enzimatica di retrotrascrizione eseguita tramite kit contenente trascrittasi inversa SuperScript III (Superscript III® Life Technologies, CA); il cDNA ottenuto è stato caricato in triplicato su piastre da 384 e aggiunto a 49µl di LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix e termociclatore LightCycler® 480 (Roche, Applied Biosystem,) secondo indicazioni del fornitore. Di seguito sono riportate le sequenze dei primer per l'ampificazione dei target d'indagine e della sequenza relativa al gene housekeeping β-actina per la normalizzazione del grado di espressione.

µOR	F: 5' - ATGCCAGTGCTCATCATTAC - 3' R: 5' - GATCCTTCGAAGATTCCTGTCCT- 3'
POMC	F: 5' - TGGAGTTCAAGAGGGAGCTG - 3' R: 5' - TTCTCGGAGGTCATGAAACC
CB2	F: 5' - CGCCGGAAGCCCTCATAACC - 3' R: 5' - CCTCATTCGGGCCATTCCTG - 3'
β-actina	F: 5' - CCATCATGAAGTGTGACGTGG - 3' R: 5' - GTCCGCCTAGAAGCATTTGCG - 3'

Tutte le sequenze sono state valutate tramite software on-line (Primer 3).

f) Analisi Statistica

I dati sono riportati come medie ± ES e intervalli. L'analisi di varianza (ANOVA) sarà usata per il confronto tra i tre gruppi compresi nello studio (HC, IBS-D, IBS-D). La potenza dello studio è stata calcolata ad uno 0.80 per il grado di significatività basato su un modello di effetto fisso.

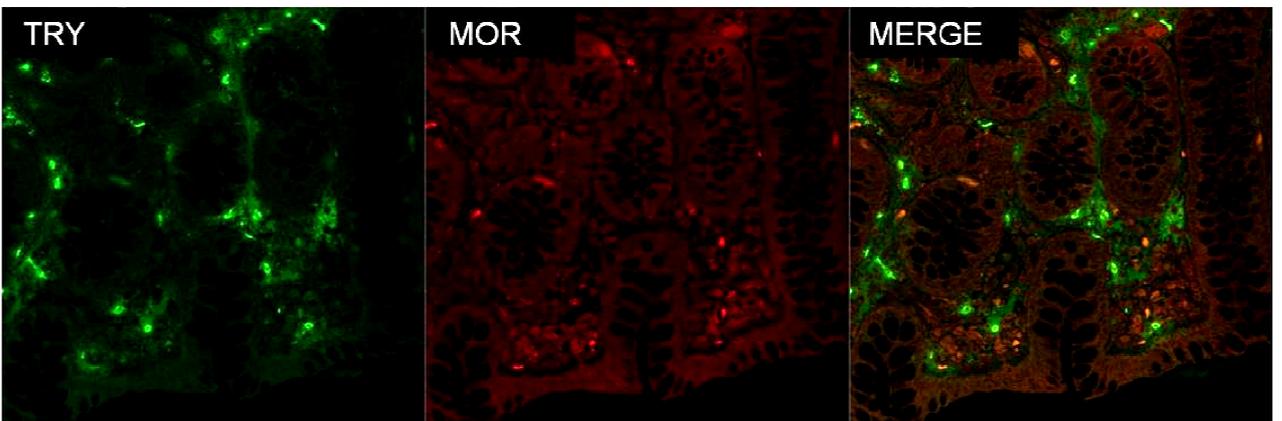
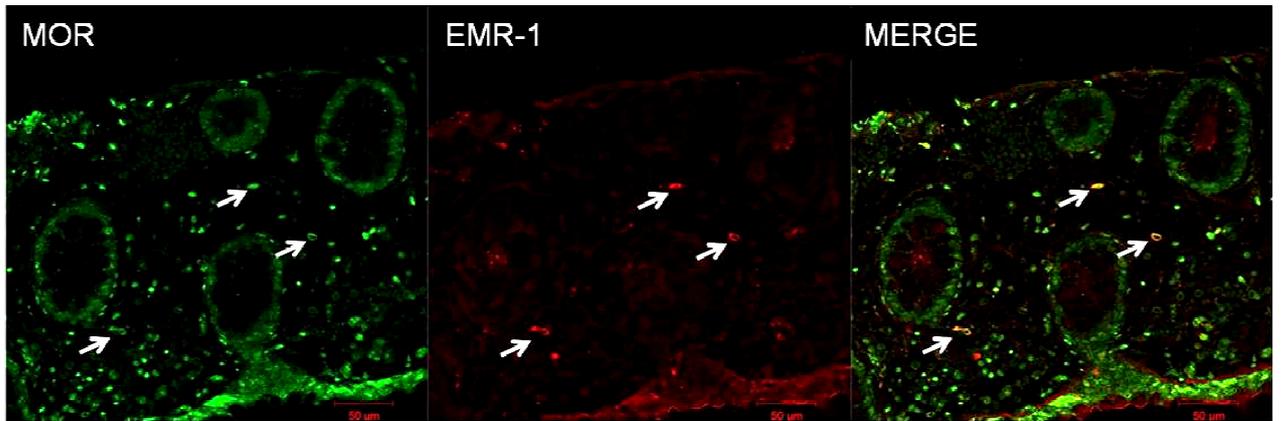
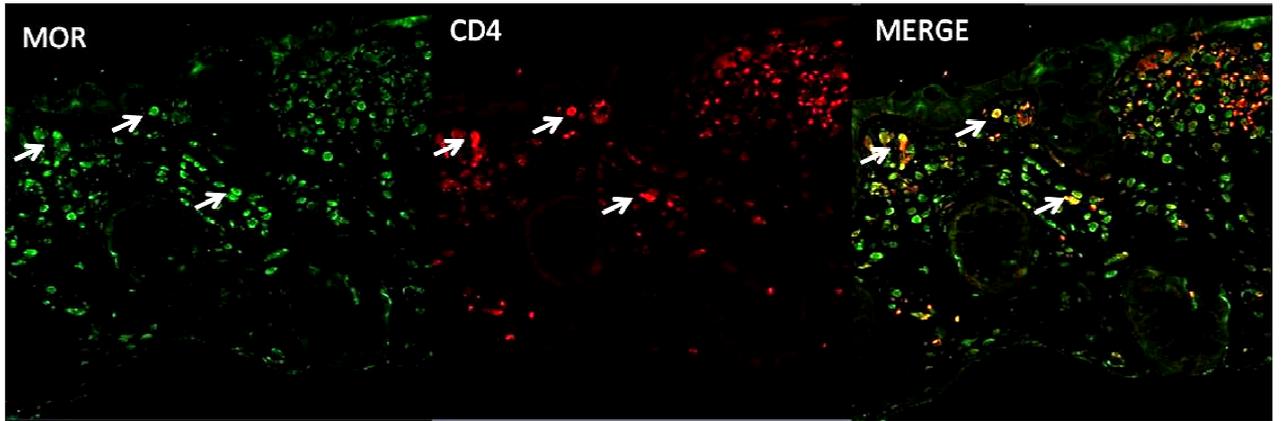
Il test di Spearman per ranghi sarà utilizzato per valutare la correlazione tra i valori relativi ai punteggi dei sintomi gastrointestinali e il grado di espressione di β -END e μ OR.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software Graphpad Prism (Graphpad Inc. La Jolla, CA), saranno considerati statisticamente significativi i valori P minori di 0.05.

IV.3.2 Risultati

a) Imaging confocale

La valutazione tramite imaging confocale ha mostrato la presenza dei target di indagine su alcuni tipi cellulari. In particolare, linfociti T CD4+ e macrofagi EMR-1 sono risultati immunoreattivi agli anticorpi per μ OR e β -END, come anche diverse cellule epiteliali, disposte sul perimetro delle cripte intestinali (Figura 7). Non è stata evidenziata alcuna immunoreattività per μ OR e β -END sui mastociti. CB2 inoltre è risultato espresso dalle stesse cellule epiteliali immunoreattive a μ OR (Figura 8).



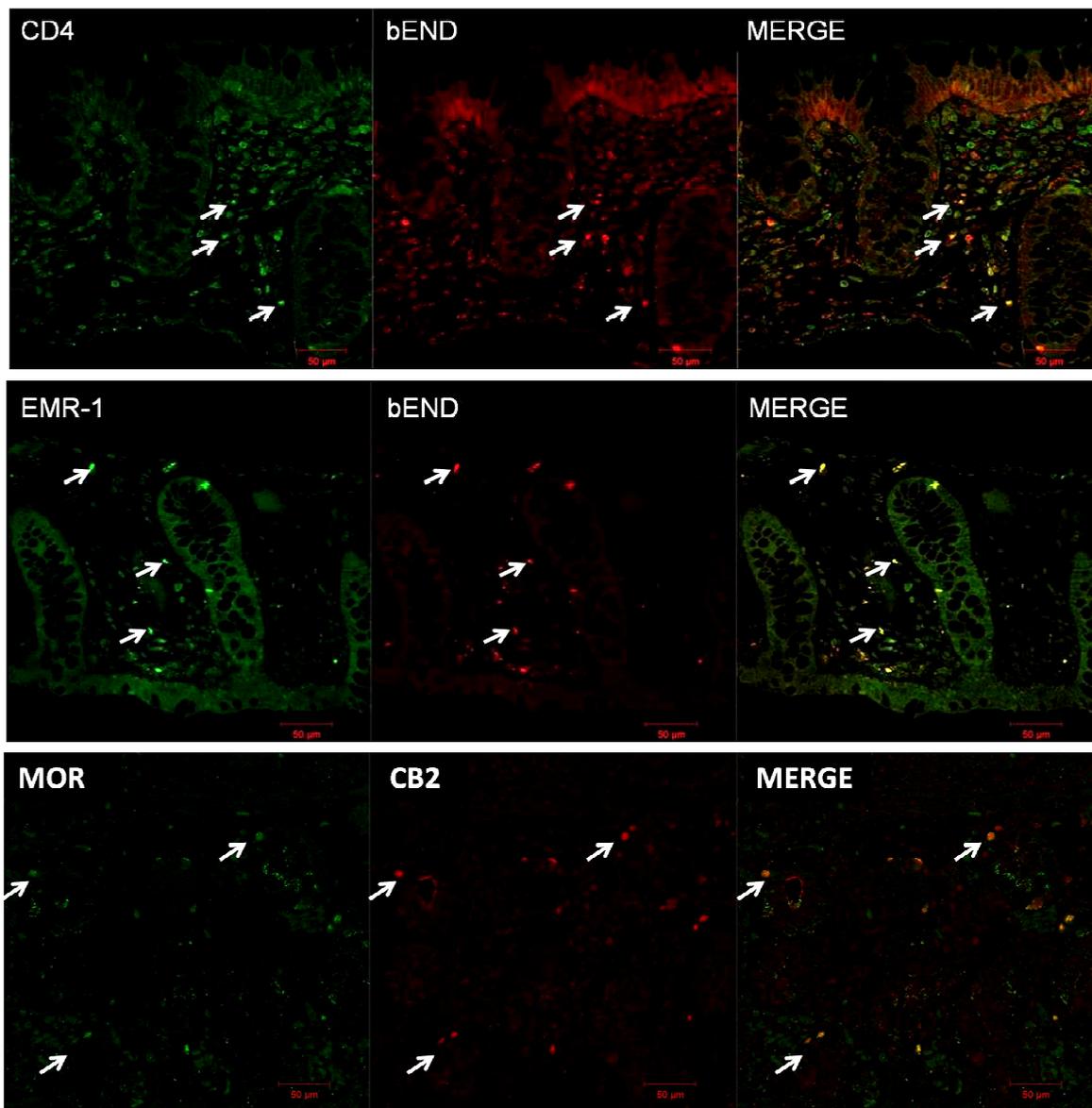


Figura 7. Immagini rappresentative dell'indagine di immunofluorescenza su campioni biotici di mucosa colica di pazienti con IBS - immunoreattività dei target d'indagine μ OR e β -END ed i marker immunitari d'indagine CD4, relativo ai linfociti T CD4+; EMR-1, ai macrofagi e triptasi (TRY) ai mastociti. CB2 è risultato espresso sulle stesse cellule epiteliali positive alla marcatura di μ OR

b) SYBR Green Real Time PCR

Le analisi d'espressione del messaggero per μ OR non hanno raggiunto un risultato statisticamente significativo ($p=0.0675$) nonostante ciò è stata rilevata una tendenziale aumento rispetto ai campioni HC soprattutto nel sottogruppo IBS-C ($+1,098\pm 0,53$ - Figura 8, A). Non è stata rilevata alcuna differenza di genere statisticamente significativa nell'espressione del target. ($p=0,12$ - Figura 8, B) come in quella di tutti le altre molecole analizzate durante lo studio.

Figura 8 - quantificazione del trascritto relativo a μ OR

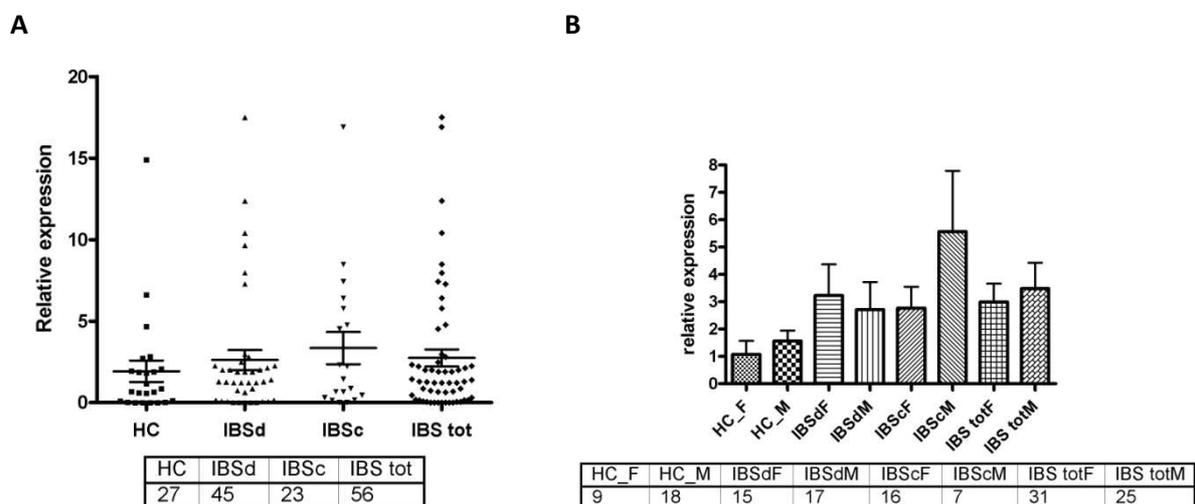


Figura 8 - Real Time per μ OR - **A**. Il grafico mostra una tendenza all'aumento dell'espressione del recettore nei campioni di pazienti con IBS (N=56), in particolare nel sottogruppo IBS-C (N=23; $+1,098\pm 0,53$; $p=0,0675$ vs HC: N=27; IBS-D: N=32). **B**. Non è stato rilevato alcun aumento statisticamente significativo nell'espressione del recettore tra soggetti maschi e femmine. Nella parte inferiore del grafico è indicata la numerosità di ciascun gruppo sperimentale.

Il trascritto per POMC nei pazienti con IBS è risultato aumentato rispetto ai HC, in particolare nel sottogruppo IBS-C ($+1,82\pm 0,48$; $p<0,05$ - Figura 9).

Figura 8 - quantificazione del trascritto relativo a μ OR

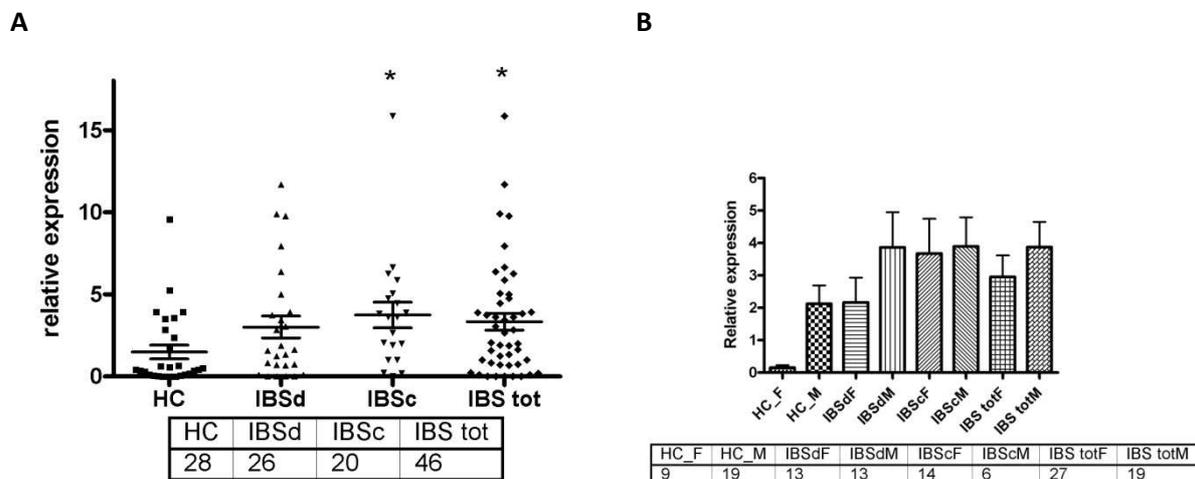


Figura 9 - Real Time per POMC- **A**. Il grafico mostra un aumento dell'espressione del recettore nei campioni di pazienti con IBS rispetto ai HC ($+1,84 \pm 0,5$; $p < 0,05$; IBS: $N=46$; HC: $N=28$), in particolare nel sottogruppo IBS-C ($+2,25 \pm 0,7$; $p < 0,05$; IBS-C: $N=20$). **B**. la differenza di espressione tra pazienti maschi e femmine non risulta statisticamente significativa (HC_F HC_M $p=0,081$). Nella parte inferiore del grafico è indicata la numerosità di ciascun gruppo sperimentale.

Il recettore CB2 è risultato più espresso rispetto a μ OR e β -END in tutti i gruppi, sebbene con un'ampia variabilità. L'espressione è risultata circa 7 volte maggiore nel sottogruppo di pazienti con IBS-C rispetto ai HC ($+630,8 \pm 280,91$, $p < 0,05$ - Figura 10). Anche in questo caso non sono state rilevate differenze di genere tra i gruppi.

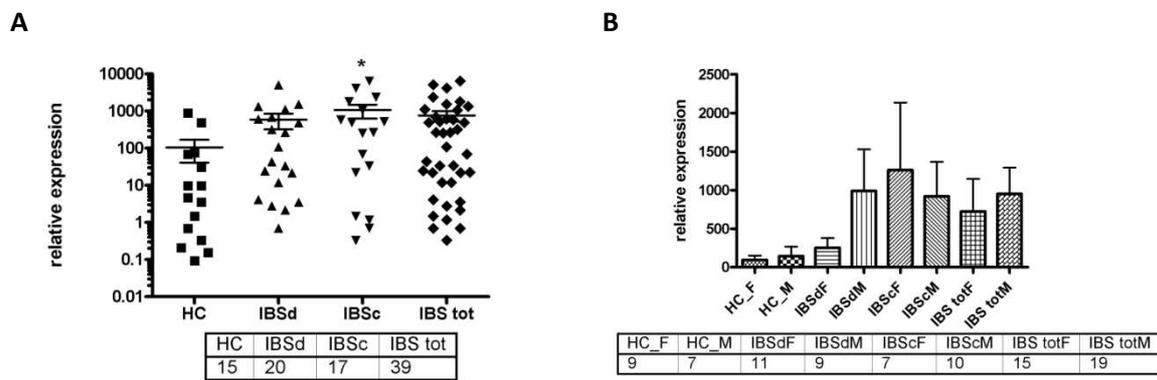


Figura 9 - Real Time per CB2- **A**. Il grafico mostra un marcato aumento dell'espressione del recettore nei campioni di pazienti con IBS rispetto ai HC ($+460,2 \pm 145,8$; $p < 0,05$; IBS: $N=39$; HC: $N=15$) IBS-C ($+630,8 \pm 280,9$ vs HC, $p < 0,05$; IBS-C $N=17$ IBS-D: $N=20$). Si noti l'ampia variabilità del campione (asse y log10) **B**. La differenza di espressione tra soggetti maschi e soggetti femmine non risulta statisticamente significativa. Nella parte inferiore del grafico sono riportate le numerosità dei gruppi sperimentali.

c) Western Blot

I risultati dell'analisi d'espressione proteica indicano un analogo aumento dell'espressione dei target di analisi paragonabile alla quantificazione del trascritto precedentemente riportate nei campioni IBS rispetto ai HC, ma con alcune differenze rispetto ai sottogruppi. In particolare, è stato rilevato un significativo aumento d'espressione nei sottogruppi IBS-D e nel totale dei campioni IBS nell'analisi di μ OR (IBS-D: $+0,042 \pm 0,015$; IBS: $+0,042 \pm 0,015$ - $p < 0,05$) e CB2 (IBS-D: $+0,046 \pm 0,01$; IBS+ $0,043 \pm 0,001$ - $p < 0,05$), mentre come nel saggio di Real Time PCR anche nel Western Blot, β -END risulta maggiormente espressa nel sottogruppo IBS-C (IBS-C: $+0,095 \pm 0,02$; IBS $+0,07 \pm 0,01$ $p < 0,05$) (Figura5).

Figura 10 - Quantificazione dell'espressione proteica di μ OR, β END e CB2

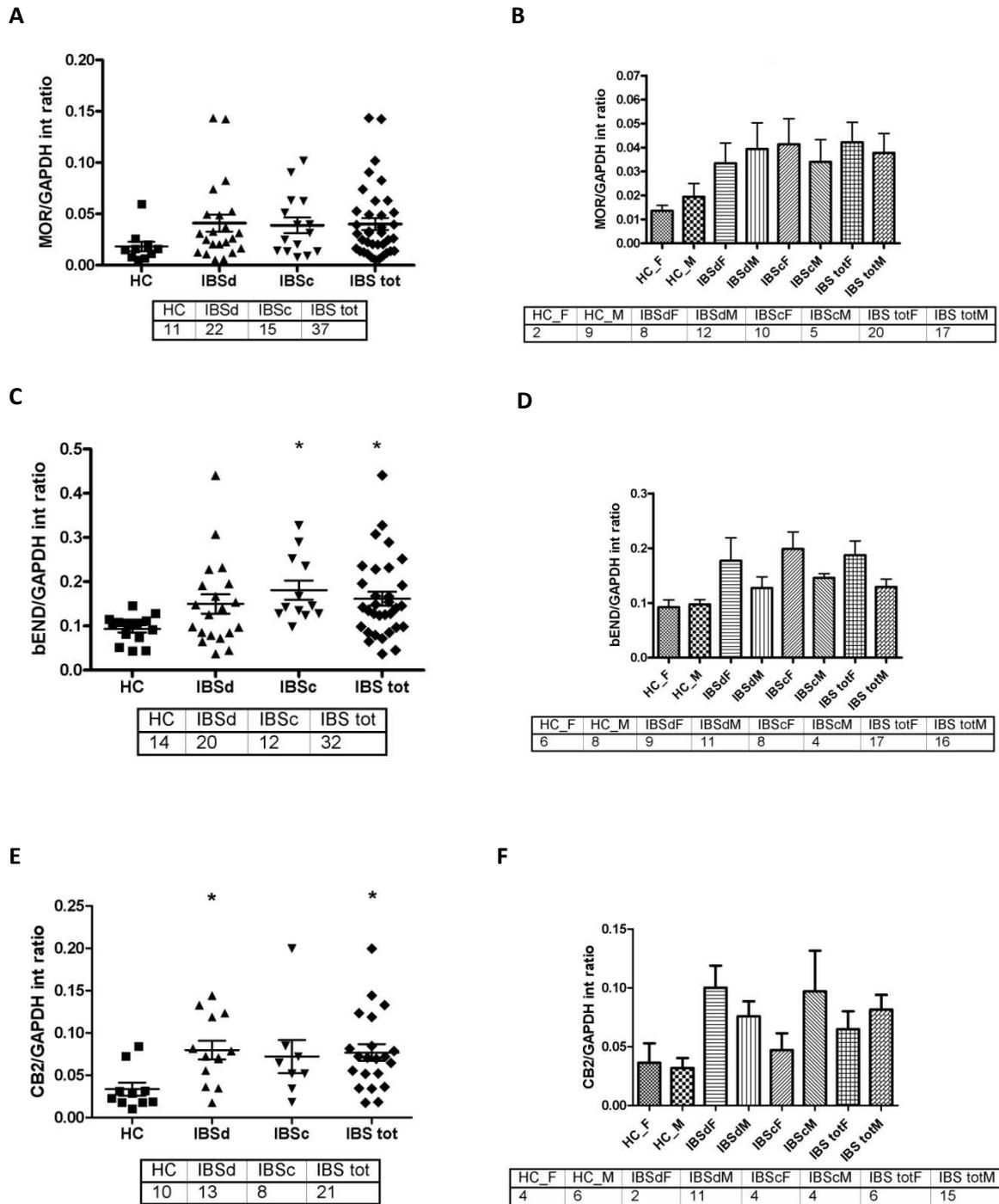


Figura 10. Western Blot per i target di studio. μ OR, β -END, e CB2 (A,C,E) risultano aumentati nei pazienti con IBS. **A.** μ OR: l'aumento tra IBS e HC non risulta statisticamente significativo (IBS vs HC $+0,022\pm 0,005$; $p=0,12$; IBS:N=35; HC: N=11; IBS-C: N=14; IBS-D: N=22). **B.** **C.** β -END: la sovraespressione è risultata maggiore nel sottogruppo IBS-C (IBS vs HC $+0,07\pm 0,001$; $p<0,05$; IBS-C vs HC $+0,09\pm 0,001$; $p<0,01$; IBS:N=35; HC: N=11; IBS-C: N=14; IBS-D: N=22). **E.** CB2 risulta aumentato

nei pazienti con IBS, a differenza delle precedenti analisi non è risultata una sensibile differenza di espressione tra sottogruppi (IBS vs HC $+0,04\pm 0,001$; $p<0,05$; IBS-D vs HC $+0,04\pm 0,001$; $p<0,05$ IBS:N=21; HC: N=10; IBS-C: N=8; IBS-D: N=13). La differenza di espressione tra pazienti maschi e femmine non risulta statisticamente significativa (**B,D,F**). Nella parte inferiore di ciascun grafico è annotata la numerosità di ogni gruppo sperimentale.

IV.3.3 Discussione

I dati presentati mostrano un tendenziale aumento dell'espressione di μ OR in un sottogruppo di pazienti con IBS ed una sovraespressione più pronunciata di β -END e del trascritto relativo al suo precursore POMC, soprattutto nei pazienti con IBS-C. Queste alterazioni sono state osservate attraverso un'analisi d'espressione che ha confermato una corrispondenza tra i dati relativi al trascritto e quelli relativi alla proteina. Nel corso dell'analisi è stata riscontrata un'ampia variabilità tra i campioni IBS, in linea con precedenti studi ^{126, 127}. Il dato relativo al precursore per β -END, POMC come precedentemente accennato è da considerarsi non direttamente proporzionale a quello del suo prodotto. Rimane tuttavia un indice utile al fine di saggiare in future analisi le concentrazioni di altri target POMC-derivati che potrebbero essere coinvolti nella patologia. Sia il μ OR che il ligando β -END sono stati localizzati su macrofagi EMR-1 positivi, sui linfociti T CD4 e in corrispondenza di alcune cellule epiteliali delle cripte intestinali. Il recettore CB2 è risultato marcatamente più espresso nei pazienti con IBS, sebbene le analisi del trascritto e della proteina mostrino una maggiore espressione in sottogruppi diversi: nell'analisi del trascritto CB2 risulta maggiormente espresso nei pazienti con IBS-D, mentre nell'analisi d'espressione proteica risulta una maggiore espressione nel sottogruppo IBS-C. Inoltre è stata evidenziata un'altissima variabilità tra i campioni, in particolare di 2 o 3 ordini di grandezza nell'espressione del trascritto. Il recettore CB2 è risultato espresso, analogamente a quanto rilevato per μ OR sulle cellule epiteliali presenti sul perimetro delle cripte. È nota l'interazione dei recettori cannabinoidi e μ OR sulle cellule immunitarie, in particolare di CB1 e μ OR nell'inibizione di produzione di IL-2 da parte dei linfociti T ¹²². Tuttavia il preciso ruolo di CB2 in sinergia con il recettore μ OR non è ancora chiaro e necessita di ulteriori studi funzionali. Diversamente da quanto prospettato dall'evidenza clinica che indica un abbassamento della soglia del dolore nei pazienti con IBS, ¹²⁸, il presente studio rileva un aumento delle componenti biologiche responsabili dei meccanismi endogeni analgesici.

Questa discrepanza in realtà può riferirsi ad un sensibile aumento della popolazione immunitaria innata (i.e. macrofagi) e specifica (linfociti T CD4+) mostrata in diversi studi precedenti ¹²⁹ e ad un possibile stato di attivazione dei suddetti tipi cellulari. Nello studio di Di Sabatino e colleghi sull'espressione di CB1 e CB2 in IBD è stato evidenziato un marcato aumento di CB1 nei tessuti di colon infiammato di pazienti con UC e CD ed un decremento anche se non sostanziale paragonato al controllo del ligando AEA ¹¹⁷. Diversamente Marquez e colleghi hanno mostrato come AEA risulti aumentato nei durante i fenomeni di infiammazione intestinale ¹³⁰. Un'analisi preliminare dell'espressione di CB1 ha evidenziato un aumento di questo recettore nei campioni di IBS, tale dato non è stato incluso nel presente studio poiché deve essere ancora validato con ulteriori analisi. Il dato relativo a CB2 potrebbe perciò essere legato a meccanismi compensatori endogeni di natura pro-algesica. Ulteriori analisi risultano quindi necessarie al fine di definire i valori degli agonisti endogeni di CB1 e CB2.

In conclusione i dati presentati supportano la tesi secondo cui il sistema oppioide e cannabinoide possono contribuire alla risposta immune alterata riscontrata nei pazienti con IBS, ed in particolare nel sottogruppo IBS-C.

Capitolo V:

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

La presente trattazione ha descritto un modello concettuale in grado di collocare le diverse tipologie di studio in ambito farmacologico secondo una prospettiva traslazionale, inserendo il progetto di ricerca tissutale esposto precedentemente in una cornice che ne evidenziasse proprietà, vantaggi e limiti.

Il contesto attuale della legislazione nazionale pur limitando sotto alcuni significativi aspetti la sperimentazione animale ha altresì fornito diversi spunti per l'ottimizzazione delle procedure al fine di ottenere un disegno sperimentale volto a migliorare non solo le procedure sulla base di criteri etici, ma anche il carattere predittivo del modello animale. In tal senso, è necessario eseguire una valutazione della verosimiglianza dei modelli in base al preciso meccanismo in studio. In particolare, la predittività nei modelli di infiammazione intestinale chimicamente indotta mostrano una generale validità in base al grado di verosimiglianza clinico-sintomatologica. Tuttavia il modello DSS indotto non rispecchia le caratteristiche fisiopatologiche relative all'immunità cellulo-mediata presente nelle IBD umane e perciò non risulta un modello utile per questo tipo di studi. Inoltre, è da chiedersi se l'infiammazione a lungo termine mostrata in diversi modelli di infiammazione rispecchi la reale condizione cronica delle IBD. La caratteristica multifattoriale, l'eziopatogenesi ancora sconosciuta e l'eterogeneità dei pazienti con IBS rappresentano i limiti principali per lo sviluppo di un modello animale affidabile e predittivo. Un generale consenso sul ruolo dell'alterazione delle funzioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nella manifestazione dei sintomi in un sottoinsieme di pazienti con IBS valida l'utilizzo di modelli animali stress indotti. Si noti che lo sviluppo in questo senso di terapie farmacologiche dovrebbe essere volto al trattamento di pazienti con una storia clinica che comprenda eventi avversi in età precoce. Il modello ibrido stress/chimicamente indotto rappresenta l'unico modello di roditore che manifesti una

verosimiglianza con la cronicità clinica del disturbo e con le alterazioni della motilità. L'area di studio delle malattie funzionali gastrointestinali e nella fattispecie IBS mostra quindi una particolare necessità di utilizzare modelli alternativi rispetto a quello animale.

I modelli *in vitro* classici permettono una simulazione parziale dei diversi tipi cellulari che contribuiscono alla fisiopatologia della malattia, gli studi sulla permeabilità trans-epiteliale si basano su una metodica affidabile e standardizzata che comprende gli attori cellulari fondamentali nello studio di questo meccanismo. Gli studi di elettrofisiologia rappresentano un'altra procedura altamente standardizzata che da più di cinquant'anni ha contribuito in modo straordinario alla comprensione dei meccanismi sensoriali e motori intestinali. Entrambi i modelli (*in vivo* ed *in vitro*) possono essere fortemente ottimizzati in termini di verosimiglianza del costrutto attraverso l'integrazione con fattori esogeni derivabili dal paziente. L'utilizzo di terreni contenenti i mediatori derivati dal tessuto bioptico di pazienti con IBS rappresenta una felice integrazione del sistema cellulare/tessuto volta al miglioramento dell'aspetto traslazionale degli studi cellulari ed elettrofisiologici.

I modelli *in vitro* di nuova generazione, (i.e. *lab-on-a-chip*), basati su sistemi di microfluidodinamica potranno permettere di inserire alcuni parametri fondamentali nello studio dei meccanismi immunitari e di motilità poiché in grado di riprodurre diverse caratteristiche anatomiche e funzionali, come lo scorrimento di fluidi intraluminali e l'assorbimento di nutrienti. Tuttavia, il loro sviluppo recente necessita ancora di una validazione preliminare basata su meccanismi biologici noti nei modelli animali e nell'uomo e solo successivamente potranno essere utilizzati per analisi sull'attività (nota e successivamente sperimentale) di un farmaco.

Questo tipo di validazione qualitativa fa parte del normale processo di sviluppo di modelli induttivi, quali modelli concettuali³³, matematici e computazionali. Sulla base di questo approccio lo sviluppo dei modelli *in silico* è ontologicamente dipendente dalla conoscenza prodotta sperimentalmente e di conseguenza in continua evoluzione. Un possibile approccio per la rappresentazione dei fenomeni biologici procede attraverso la rappresentazione di sub-sistemi biologici e successiva integrazione degli stessi, mimando la realtà della programmazione digitale. Il percorso per la simulazione del livello di

complessità dell'organismo vivente è ad oggi impossibile, nonostante questo, è evidente come l'avanzamento delle tecniche sperimentali proceda di pari passo con la capacità di integrare i modelli computazionali (statistici o simulatori) con altri sistemi-modello (i.e. *in vitro* ed *in vivo*).

Questo tipo di approcci è alla base degli studi di biologia di sistema, che analizzano i dati derivanti dagli studi di profili genetici dei pazienti attraverso piattaforme in grado di determinare nuovi target biomolecolari e il network di interazioni proteiche associato. Gli stessi sistemi possono essere utilizzati per la validazione dei modelli animali di malattia intestinale come precedentemente eseguito in alcuni studi che hanno determinato i profili di espressione citochinici più simili alla realtà clinica di malattie infiammatorie croniche intestinali. Analogamente, è auspicabile l'utilizzo degli stessi strumenti per affinare i criteri diagnostici sulla base di una definizione dei parametri organici del paziente volti a creare un profilo rappresentativo specifico. Ad esempio, la variabilità riscontrata nel presente studio come in diverse indagini di target biologici e possibili biomarker per IBS potrebbe essere associata a dei precisi profili fisiopatologici specifici per classi di pazienti che non necessariamente corrispondono agli attuali criteri diagnostici di distinzione della patologia.

La creazione di nuovi sistemi di indagine sempre più validi da un punto di vista traslazionale, sembra quindi dipendere almeno in parte dalla capacità di integrare realtà disciplinari, tecnologie ed esperienze metodologiche diverse nel contesto della ricerca in campo biomedico e farmacologico.

BIBLIOGRAFIA

1. Food and Drug Administration - Novel New Drugs Summary, 2015.
2. Saver RS. Is it really all about the money? Reconsidering non-financial interests in medical research. *J.Law Med.Ethics*. 2012;40:467-481.
3. Juyal D, Thawani V, Thaledi S, et al. The fruits of authorship. *Educ.Health* 2014;27:217-220.
4. Casciello M. Workshop del 14 febbraio 2012: "Promuovere la medicina Traslazionale attraverso le Infrastrutture dedicate alla Salute e alla Ricerca". http://www.iss.it/binary/iatr/cont/Casciello_ISS.pdf, 2015.
5. Calzolari A, Valerio A, Capone F, et al. The European Research Infrastructures of the ESFRI Roadmap in Biological and Medical Sciences: status and perspectives. *Ann.Ist.S* 2014;50:178-185.
6. AA.VV. Pillars of reform. *Nature*. 2014;514:535.
7. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA*. 2008;299:211-213.
8. Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Curr.Opin.Pharmacol*. 2010;10:601-606.
9. Keramaris NC, Kanakaris NK, Tzioupis C, et al. Translational research: from benchside to bedside. *Injury* 2008;39:643-650.
10. Bioethics NCo. The ethics of research involving animals. In: Bioethics NCo, ed. London, 2005.

11. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Ltd., 1959.
12. M H. Training and competency of laboratory animal science staff in keeping with the 2010/63/EU Directive. *Lab Animal Europe* 2012;12.
13. Leenaars M, Hooijmans CR, van VN, et al. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies. *Lab Anim* 2012;46:24-31.
14. Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V. Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert.Opin.Drug Discov.* 2010;5:633-654.
15. Dimitriadi M, Hart AC. Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol.Dis.* 2010;40:4-11.
16. Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, et al. Where is the evidence that animal research benefits humans? *BMJ* 2004;328:514-517.
17. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother.* 2010;1:94-9.
18. NC3Rs Committee. *Systematic reviews of animal research*. NC3Rs, 2012.
19. Sams-Dodd F. Strategies to optimize the validity of disease models in the drug discovery process. *Drug Discov.Today* 2006;11:355-363.
20. Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 2000;32:56-67.

21. Fan J, Chen S, Chow EC, et al. PBPK modeling of intestinal and liver enzymes and transporters in drug absorption and sequential metabolism. *Curr. Drug Metab.* 2010;11:743-761.
22. Gertz M, Houston JB, Galetin A. Physiologically based pharmacokinetic modeling of intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates with high intestinal extraction. *Drug Metab Dispos.* 2011;39:1633-1642.
23. Darwich AS, Neuhoff S, Jamei M, et al. Interplay of metabolism and transport in determining oral drug absorption and gut wall metabolism: a simulation assessment using the "Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism (ADAM)" model. *Curr. Drug Metab.* 2010;11:716-729.
24. Salter H, Holland R. Biomarkers: refining diagnosis and expediting drug development - reality, aspiration and the role of open innovation. *J. Intern. Med.* 2014;276:215-228.
25. Goodsaid FM, Frueh FW, Mattes W. The Predictive Safety Testing Consortium: A synthesis of the goals, challenges and accomplishments of the Critical Path. *Drug Discov. Today Technol.* 2007;4:47-50.
26. Zerhouni EA, Sanders CA, von Eschenbach AC. The Biomarkers Consortium: public and private sectors working in partnership to improve the public health. *Oncologist.* 2007;12:250-252.
27. Longstreth GF. Definition and classification of irritable bowel syndrome: current consensus and controversies. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2005;34:173-187.
28. Cheung CK, Wu JC. Genetic polymorphism in pathogenesis of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:17693-17698.

29. Barbara G, Cremon C, de GR, et al. Mechanisms underlying visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Curr.Gastroenterol.Rep.* 2011;13:308-315.
30. Ohman L, Simren M. New insights into the pathogenesis and pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Dig.Liver Dis.* 2007;39:201-215.
31. Mayer EA, Craske M, Naliboff BD. Depression, anxiety, and the gastrointestinal system. *J.Clin.Psychiatry* 2001;62 Suppl 8:28-36.
32. Triadafilopoulos G, Simms RW, Goldenberg DL. Bowel dysfunction in fibromyalgia syndrome. *Dig.Dis.Sci.* 1991;36:59-64.
33. Mayer EA, Collins SM. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology.* 2002;122:2032-2048.
34. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med.* 2002;347:417-429.
35. Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J.Dig.Dis.* 2010;11:266-276.
36. Ming SC, Goldman H. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. In: Ming SC, Goldman H, eds. *Pathology of the gastrointestinal tract.* second ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1998:1020.
37. Ishihara S, Aziz MM, Yuki T, et al. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. *J.Gastroenterol.* 2009;44:1097-1108.
38. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-434.
39. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098-1102.

40. Nunes T, Fiorino G, Danese S, et al. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: is it genes or environment? *World J.Gastroenterol.* 2011;17:2715-2722.
41. Cooke J, Zhang H, Greger L, et al. Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2012.
42. Ishikawa T, Sakurai A, Hirano H, et al. Emerging new technologies in Pharmacogenomics: rapid SNP detection, molecular dynamic simulation, and QSAR analysis methods to validate clinically important genetic variants of human ABC Transporter ABCB1 (P-gp/MDR1). *Pharmacol.Ther.* 2010;126:69-81.
43. Kepler TB, Chan C. Spatiotemporal programming of a simple inflammatory process. *Immunol.Rev.* 2007;216:153-163.
44. Gottfries J, Melgar S, Michaelsson E. Modelling of mouse experimental colitis by global property screens: a holistic approach to assess drug effects in inflammatory bowel disease. *PLoS.One.* 2012;7:e30005.
45. Pastrello C, Pasini E, Kotlyar M, et al. Integration, visualization and analysis of human interactome. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2014;445:757-773.
46. Thomas S, Bonchev D. A survey of current software for network analysis in molecular biology. *Hum.Genomics* 2010;4:353-360.
47. Mi Q, Li NY, Ziraldo C, et al. Translational systems biology of inflammation: potential applications to personalized medicine. *Per.Med.* 2010;7:549-559.
48. Camilleri M. Genetics and irritable bowel syndrome: from genomics to intermediate phenotype and pharmacogenetics. *Dig.Dis.Sci.* 2009;54:2318-2324.
49. Polini A, Prodanov L, Bhise NS, et al. Organs-on-a-chip: a new tool for drug discovery. *Expert.Opin.Drug Discov.* 2014;9:335-352.

50. Piche T. Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol.Motil.* 2014;26:296-302.
51. Buning C, Geissler N, Prager M, et al. Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: Rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease? *Inflamm.Bowel.Dis.* 2012.
52. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann.Intern.Med.* 1986;105:883-885.
53. Johansson ME, Gustafsson JK, Sjoberg KE, et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *Plos One* 2010;5:e12238.
54. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 2002;50:307-313.
55. Nasser Y, Boeckxstaens GE, Wouters MM, et al. Using human intestinal biopsies to study the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol.Motil.* 2014;26:455-469.
56. Hopkins AM, DeSimone E, Chwalek K, et al. 3D in vitro modeling of the central nervous system. *Prog.Neurobiol.* 2015;125C:1-25.
57. Calloni R, Viegas GS, Turck P, et al. Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. *Cytotherapy.* 2014;16:3-16.
58. Bhise NS, Ribas J, Manoharan V, et al. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *J.Control Release* 2014;190:82-93.

59. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, et al. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip*. 2012;12:2165-2174.
60. Fitzgerald GA. Opinion: anticipating change in drug development: the emerging era of translational medicine and therapeutics. *Nat.Rev.Drug Discov*. 2005;4:815-818.
61. Ehrenstein MR, Mauri C. If the treatment works, do we need to know why?: the promise of immunotherapy for experimental medicine. *J.Exp.Med*. 2007;204:2249-2252.
62. Sanger GJ, Holbrook JD, Andrews PL. The translational value of rodent gastrointestinal functions: a cautionary tale. *Trends Pharmacol.Sci*. 2011;32:402-409.
63. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J.Immunol*. 2004;172:2731-2738.
64. Larauche M, Mulak A, Tache Y. Stress-related alterations of visceral sensation: animal models for irritable bowel syndrome study. *J.Neurogastroenterol.Motil*. 2011;17:213-234.
65. Bulmer DC, Grundy D. Achieving translation in models of visceral pain. *Curr.Opin.Pharmacol*. 2011;11:575-581.
66. Bulmer DC, Grundy D. Achieving translation in models of visceral pain. *Curr.Opin.Pharmacol*. 2011;11:575-581.
67. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci*. 2012;105:263-320.

68. Kobozev I, Karlsson F, Zhang S, et al. Pharmacological intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases: translating preclinical data into new drug therapies. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2011;17:1229-1245.
69. Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J.Biomed.Biotechnol.* 2012;2012:718617.
70. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2009;15:341-352.
71. Bauer C, Duewell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2010;59:1192-1199.
72. Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, et al. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. *Plos One* 2012;7:e32084.
73. Elson CO, Cong Y, Brandwein S, et al. Experimental models to study molecular mechanisms underlying intestinal inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998;859:85-95.
74. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2005;288:G1328-G1338.
75. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS.One.* 2009;4:e6073.
76. Kim YS, Lee MH, Ju AS, et al. Th17 responses are not induced in dextran sodium sulfate model of acute colitis. *Immune.Netw.* 2011;11:416-419.

77. Hall LJ, Faivre E, Quinlan A, et al. Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Dig.Dis.Sci.* 2011;56:79-89.
78. Mahler M, Bristol IJ, Leiter EH, et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am.J.Physiol* 1998;274:G544-G551.
79. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat.Protoc.* 2007;2:541-546.
80. Wallace JL, Le T, Carter L, et al. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 1995;33:237-239.
81. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-1367.
82. te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2006;12:995-999.
83. Shi XZ, Winston JH, Sarna SK. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2011;300:G41-G51.
84. Zhu MY, Lu YM, Ou YX, et al. Dynamic progress of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induced chronic colitis and fibrosis in rat model. *J.Dig.Dis.* 2012;13:421-429.
85. te Velde AA, de KF, Sterrenburg E, et al. Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2007;13:325-330.

86. Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, et al. IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 2008;135:2003-13, 2013.
87. Fitzpatrick LR, Meirelles K, Small JS, et al. A new model of chronic hapten-induced colitis in young rats. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2010;50:240-250.
88. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr.Protoc.Immunol.* 2002;Chapter 15:Unit.
89. Hogaboam CM, Snider DP, Collins SM. Cytokine modulation of T-lymphocyte activation by intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology.* 1997;112:1986-1995.
90. Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin.Invest.* 1997;100:142-148.
91. Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N.Engl.J Med.* 1995;332:1685-1690.
92. Machelska H, Stein C. Immune mechanisms in pain control. *Anesth.Analg.*2002. 2002;95:1002-8, table.
93. Chaturvedi K, Christoffers KH, Singh K, et al. Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* 2000;55:334-346.
94. Sternini C, Patierno S, Selmer IS, et al. The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol.Motil.* 2004;16 Suppl 2:3-16.
95. Yates DA, Santos J, Soderholm JD, et al. Adaptation of stress-induced mucosal pathophysiology in rat colon involves opioid pathways. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 2001;281:G124-G128.

96. Hua S, Cabot PJ. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31:427-433.
97. Verma-Gandhu M, Bercik P, Motomura Y, et al. CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology.* 2006;130:1721-1728.
98. Hua S, Hermanussen S, Tang L, et al. The neural cell adhesion molecule antibody blocks cold water swim stress-induced analgesia and cell adhesion between lymphocytes and cultured dorsal root ganglion neurons. *Anesth. Analg.* 2006;103:1558-1564.
99. Mousa SA, Machelska H, Schafer M, et al. Co-expression of beta-endorphin with adhesion molecules in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol.* 2000;108:160-170.
100. Chakrabarty A, McCarson KE, Smith PG. Hypersensitivity and hyperinnervation of the rat hind paw following carrageenan-induced inflammation. *Neurosci.Lett.* 2011;495:67-71.
101. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2009;9:3-8.
102. Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov.Today* 2010;15:474-483.
103. Petrosino S, Ligresti A, Di M, V. Endocannabinoid chemical biology: a tool for the development of novel therapies. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 2009;13:309-320.
104. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol.Rev.* 2010;62:588-631.

105. Solorzano C, Zhu C, Battista N, et al. Selective N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition reveals a key role for endogenous palmitoylethanolamide in inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009;106:20966-20971.
106. Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. Enzymological studies on the biosynthesis of N-acylethanolamines. *Biochim.Biophys.Acta* 2010;1801:1274-1285.
107. Izzo AA, Coutts AA. Cannabinoids and the digestive tract. *Handb.Exp.Pharmacol.* 2005;573-598.
108. Yao B, Mackie K. Endocannabinoid receptor pharmacology. *Curr.Top.Behav.Neurosci.* 2009;1:37-63.
109. Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, et al. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 2012;76:70-81.
110. Hohmann AG, Herkenham M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 1999;90:923-931.
111. MacNaughton WK, Van S, M.D., Keenan CM, et al. Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2004;286:G863-G871.
112. Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, et al. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J.Comp Neurol.* 2002;448:410-422.
113. (AIFA) AIdF. Guida all'uso dei farmaci 5. In: srl EM, ed. Lavis (TN), Italy, 2008.
114. Di M, V, Bifulco M, De PL. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2004;3:771-784.

115. Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert.Rev.Mol.Med.* 2009;11:e3.
116. Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, et al. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int.Immunopharmacol.* 2002;2:69-82.
117. Di SA, Battista N, Biancheri P, et al. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal.Immunol.* 2011;4:574-583.
118. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat.Rev.Immunol.* 2005;5:400-411.
119. Rieder SA, Chauhan A, Singh U, et al. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 2010;215:598-605.
120. Sanson M, Bueno L, Fioramonti J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol.Motil.* 2006;18:949-956.
121. De FD, D'Amico A, Iuvone T. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: new perspective in chronic inflammation. *J.Neuroendocrinol.* 2008;20 Suppl 1:20-25.
122. Borner C, Hollt V, Kraus J. Activation of human T cells induces upregulation of cannabinoid receptor type 1 transcription. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14:281-286.
123. Lunn CA, Reich EP, Bober L. Targeting the CB2 receptor for immune modulation. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 2006;10:653-663.

124. AAVV. Guidelines--Rome III Diagnostic Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders. *J Gastrointestin.Liver Dis.* 2006;15:307-312.
125. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 1987;162:156-159.
126. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132:26-37.
127. Cremon C, Carini G, Wang B, et al. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am.J.Gastroenterol.* 2011;106:1290-1298.
128. Chang L, Munakata J, Mayer EA, et al. Perceptual responses in patients with inflammatory and functional bowel disease. *Gut* 2000;47:497-505.
129. Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, et al. Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am.J.Gastroenterol.* 2009;104:392-400.
130. Marquez L, Suarez J, Iglesias M, et al. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS.One.* 2009;4:e6893.