



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di *Scienze del Farmaco*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE
INDIRIZZO FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
CICLO XXV

Neuropatia enterica in un modello murino di infezione del sistema nervoso enterico con *Herpes simplex virus* di tipo 1

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore: Ch.mo Prof. Maria Cecilia Giron

Dottorando: Marsela Qesari

INDICE

SUMMARY	<i>Pag. III</i>
RIASSUNTO	<i>Pag. V</i>
ABBREVIAZIONI	<i>Pag. VII</i>
1. INTRODUZIONE	<i>Pag. 1</i>
1.1 Fisiologia e patologia del sistema nervoso enterico.	<i>Pag. 2</i>
1.1.1 Il codice neurochimico dei neuroni del SNE.	<i>Pag. 4</i>
1.2 Ruolo delle infezioni virali nei DFGI.	<i>Pag. 7</i>
1.2.1 Herpes simplex virus di tipo 1.	<i>Pag. 8</i>
1.3 I recettori Toll-like ed il loro coinvolgimento nelle malattie del tratto GI.	<i>Pag.12</i>
2. SCOPO	<i>Pag.15</i>
3. MATERIALI E METODI	<i>Pag.17</i>
3.1 Allestimento di un modello animale di infezione enterica da HSV-1.	<i>Pag.17</i>
3.2 Immunoistochimica su preparati whole mount (IHC-WM).	<i>Pag.17</i>
3.3 Immunoistochimica a fluorescenza di criosezioni di ileo (IHC).	<i>Pag.18</i>
3.4 Microscopia confocale a fluorescenza e analisi quantitativa del SNE.	<i>Pag.18</i>
3.5 Colorazione istochimica della rete neuronale colinergica e analisi quantitativa delle fibre.	<i>Pag.19</i>
3.6 Western blot (WB).	<i>Pag.19</i>
3.7 Valutazione dell'attività contrattile di preparati di ileo.	<i>Pag.20</i>
3.8 Preparazione di colture tissutali derivate da LMMP.	<i>Pag.21</i>
3.8.1 Caratterizzazione delle cellule neuronali, muscolari lisce e gliali mediante immunocitochimica a fluorescenza (ICC).	<i>Pag.21</i>
3.8.2 Studio funzionale sul rilascio di acetilcolina triziata.	<i>Pag.21</i>
3.8.3 Valutazione dell'espressione di fattori neurotrofici in seguito all'infezione in vitro con HSV-1 mediante real-time PCR.	<i>Pag.22</i>
3.8.4 Citofluorimetria FACS (fluorescence-activated cell sorting).	<i>Pag.23</i>
3.9 Analisi statistica dei risultati.	<i>Pag.23</i>
4. RISULTATI	<i>Pag.27</i>
4.1 Analisi degli effetti dell'infezione con HSV-1 sul SNE.	<i>Pag.27</i>
4.1.1 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla morfologia dei gangli mienterici.	<i>Pag.27</i>

4.1.2	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sull'espressione di proteine neuronali e gliali del SNE.	Pag.28
4.1.3	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul sistema nitrgergico.	Pag.30
4.1.4	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul sistema colinergico.	Pag.33
4.1.5	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla trasmissione VIPergica e tachichinergica.	Pag.34
4.1.6	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla contrattilità intestinale.	Pag.35
4.2	Caratterizzazione delle colture tissutali derivate da LMMP.	Pag.36
4.2.1	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul rilascio in vitro di [³ H]-ACh in colture tissutali derivate da LMMP.	Pag.37
4.2.2	Effetto dell'infezione in vitro con HSV-1 sull'espressione di fattori neurotrofici in colture tissutali di LMMP.	Pag.38
4.3	Ruolo della replicazione virale nelle alterazioni del SNE.	Pag.42
4.3.1	Effetto dell'infezione in vivo con ICP27 KO sulla morfologia dei gangli mienterici del SNE.	Pag.42
4.3.2	Effetto dell'infezione in vivo con ICP27 KO sulle alterazioni del fenotipo neurochimico del SNE.	Pag.42
4.3.3	Ruolo della replicazione virale nelle alterazioni della contrattilità intestinale.	Pag.48
4.3.4	Ruolo della replicazione virale sull'espressione di fattori neurotrofici in colture tissutali di LMMP.	Pag.48
4.4	Caratterizzazione dell'espressione del recettore Toll-like 2 nell'ileo di topo.	Pag.51
4.5	Ruolo dei TLR2 nelle alterazioni del SNE in seguito all'infezione virale.	Pag.51
4.5.1	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla morfologia dei gangli mienterici di topi TLR2 KO.	Pag.51
4.5.2	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul fenotipo neurochimico del SNE.	Pag.53
4.5.3	Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 nelle alterazioni della contrattilità intestinale di topi TLR2 KO.	Pag.58
4.5.4	Effetto dell'infezione in vitro con HSV-1 o con ICP27 KO sull'espressione di fattori neurotrofici in colture tissutali di LMMP di topi TLR2 KO.	Pag.59
5.	DISCUSSIONE	Pag.61
	BIBLIOGRAFIA	Pag.71

I. SUMMARY

Herpes simplex virus type 1 infection of murine enteric nervous system leads to gut neuropathy.

The functional gastrointestinal disorders (FGIDs) are a heterogeneous group of chronic conditions characterized by disabling symptoms and decreased patients' quality of life (Corazziari et al., 2004; Talley et al., 2008). Among these diseases, the Irritable Bowel Syndrome (IBS) is the most relevant for the severe prognosis and the high social and economic burden (Drossman, 2006; Fichna and Storr, 2012; Quigley et al., 2012). In clinical practice, IBS is characterized by visceral hypersensitivity and altered bowel function (Larauche et al., 2012). Since the etiology is still poorly understood and no curative treatments are available, nowadays therapy for IBS is palliative and supportive but is notoriously unsatisfactory (Halland and Talley, 2012).

Although the underlying pathophysiology of FGIDs is still undefined, there are several evidences suggesting that functional or anatomical alterations of the enteric nervous system (ENS) disrupt gastrointestinal homeostasis determining FGIDs (De Giorgio and Camilleri, 2004; Furness, 2012). Infectious agents, such as neurotropic viruses, have been proposed to infect and disrupt ENS integrity either directly or indirectly eliciting harmful inflammatory responses by the innate and adaptive immune system (Chen et al., 2003; Facco et al., 2008; Selgrad et al., 2009). Among common pathogens the *Herpes simplex virus type 1* (HSV-1), shows several interesting features as candidate pathogen involved in FGIDs, being highly prevalent in human populations (Knipe and Cliffe, 2008) and able to infect ENS neurons (Gesser and Koo, 1996; Brun et al., 2010). Our research group has recently established a novel animal model in rodents where a persistent HSV-1 infection in ENS leads to intestinal motor abnormalities with no macroscopic histological damage or clinical signs of disease (Brun et al., 2010).

The aim of my Ph.D. research project was to study the mechanisms responsible of the altered intestinal function secondary to HSV-1 infection of mice ENS. At 1-10 weeks after viral administration the presence of HSV-1 infection in the ENS determined time-dependent alterations of enteric neural network architecture, shown by an altered distribution and/or expression of specific neural proteins, such as HuC/D, peripherin e β III-tubulin, and glial proteins, such as S100 β and glial fibrillary acidic protein (GFAP; Qesari et al., 2011). These structural modifications in myenteric plexus were linked to changes in the equilibrium between excitatory and inhibitory neurotransmission, revealed by an increased expression of both enzymes, nitric oxide synthase (nNOS), acetylcholinesterase (ChAT) and by a modified distribution of the vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P (SP) and acetylcholinesterase (AChE).

The presence of an unbalanced inhibitory/excitatory activity was further confirmed by experiments on tissue cultures from longitudinal muscle with myenteric plexus (LMMP) and on gut contractility of ileum segments, mounted vertically in organ baths. Depolarization-evoked release of [3 H]acetylcholine was significantly reduced for most of viral infection time course and in the same time neurally-mediated cholinergic

responses to electric field stimulation were significantly reduced in the early and late phases of infection. All these data suggest that HSV-1 infection induces structural alterations and changes in neural excitatory activity and/or neurotransmitters release, all signs of an underlying enteric neuropathy (Qesari et al., 2011).

To study the role of innate immunity and of viral replication in the onset of HSV-1 infection-induced gut neurodysfunction, mice deficient for Toll-like receptor 2 (TLR2 KO) and ICP27-null HSV-1 (ICP27 KO), a mutant virus unable to replicate (Uprichard and Knipe, 1996), have subsequently been used. ICP27 KO administration induced anomalies in the ENS only in the early phases of infection to indicate an involvement of viral replication in the onset of enteric neuropathy only in the latest times of infection (Qesari et al., 2012). Recent studies have shown that an interaction between TLR2 and HSV-1 can trigger excessive signaling TLR2-dependent, leading to an excessive inflammation and tissue damage (Soberman et al., 2012). HSV-1 infection in the ENS of TLR2 KO mice induced only a reduction in nNOS positive neurons with no effects on myenteric plexus anatomy and intestinal contractile function.

In conclusion, this study demonstrated that HSV-1 infection of mice ENS triggers TLR2-mediated immune responses which are consequently responsible of myenteric plexus structural abnormalities and changes in ileal contractile function. My results also highlight TLR2 as an attractive therapeutic target for an effective modulation of pathogenic immune responses and possibly for the treatment of viral-associated neuropathies.

II. RIASSUNTO

I disturbi funzionali gastrointestinali (DFGI) comprendono un gruppo eterogeneo di malattie croniche i cui sintomi possono essere invalidanti e compromettere la qualità della vita dei pazienti che ne sono affetti (Corazziari et al., 2004; Talley et al., 2008). Tra queste, la sindrome dell'intestino irritabile (Irritable Bowel Syndrome, IBS) è considerata la più rilevante per la gravità della prognosi ed il forte impatto economico-sociale nella popolazione mondiale (Drossman, 2006; Fichna and Storr, 2012; Quigley et al., 2012). Le manifestazioni cliniche dell'IBS includono aumento della sensibilità viscerale ed alterazioni della motilità intestinale (Larauche et al., 2012). Essendo l'eziologia ancora poco conosciuta, a tutt'oggi le terapie disponibili sono per lo più palliative e poco soddisfacenti (Halland and Talley, 2012).

Sebbene la patofisiologia dei DFGI non sia ancora stata definita, numerose evidenze scientifiche suggeriscono che alterazioni permanenti o transitorie a carico del sistema nervoso enterico (SNE) possono determinare anomalie funzionali con compromissione dell'omeostasi del tratto gastrointestinale (De Giorgio and Camilleri, 2004; Furness, 2012). Agenti infettivi, come virus neurotropi, sono stati a lungo sospettati di rappresentare uno dei fattori in grado di interferire con l'integrità del SNE determinando alterazioni della rete neuronale sia direttamente che mediante una risposta immunitaria di tipo innato e/o adattativo spesso dannosa per l'ospite (Chen et al., 2003; Facco et al., 2008; Selgrad et al., 2009). L'*Herpes simplex* virus di tipo I (HSV-1), un virus neurotrofo altamente diffuso nella popolazione (Knipe and Cliffe, 2008) e capace di infettare il SNE (Gesser and Koo, 1996; Brun et al., 2010), è stato proposto come un possibile agente eziopatologico coinvolto nell'insorgenza di DFGI. In questo contesto, il nostro gruppo di ricerca ha di recente descritto un nuovo modello sperimentale in roditori nel quale un'infezione persistente nel SNE ad opera dell'HSV-1 causa delle complesse anomalie funzionali in assenza di macroscopici danni istologici o segni di malattia (Brun et al., 2010).

Il mio progetto di dottorato ha avuto come obiettivo lo studio dei meccanismi responsabili dell'alterata funzione intestinale secondaria all'infezione del SNE murino da parte dell'HSV-1. L'infezione con HSV-1 ha determinato a 1-10 settimane dalla somministrazione del virus alterazioni tempo-dipendenti dell'architettura della rete nervosa enterica evidenziate da un'alterata distribuzione e/o espressione di specifiche proteine neuronali, quali HuC/D, periferina e β III-tubulina, e di specifiche proteine gliali, quali S100 β e proteina acida fibrillare gliale (GFAP; Zesari et al., 2011). Tali cambiamenti strutturali a livello del plesso mienterico sono stati accompagnati da variazioni nell'equilibrio tra la neurotrasmissione eccitatoria ed inibitoria, rilevate da un aumento dell'espressione degli enzimi ossido nitrico sintetasi (nNOS), acetilcolintrasferasi (ChAT) e da cambiamenti nella distribuzione del polipeptide intestinale vasoattivo (VIP), della sostanza P (SP) e dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE).

La presenza di uno sbilanciamento dell'attività eccitatoria/inibitoria è stata ulteriormente confermata da studi su culture tissutali di cellule derivate dalla muscolatura

longitudinale con annesso il plesso mienterico (LMMP) e di contrattilità su preparati di ileo, montati verticalmente in bagni per organo isolato. La liberazione di acetilcolina triziata in seguito a depolarizzazione è risultata ridotta in quasi tutti i tempi di infezione virale. In parallelo, la risposta colinergica neuronale evocata dalla stimolazione elettrica è risultata significativamente ridotta sia in una fase iniziale che tardiva dell'infezione. Tali risultati suggeriscono che il decorso dell'infezione virale ha indotto sia alterazioni strutturali che di eccitabilità neuronale e/o di rilascio di neurotrasmettitori, segni della presenza di una neuropatia a livello enterico (Qesari et al., 2011).

Allo scopo di studiare il ruolo dell'immunità innata e della replicazione virale nell'insorgenza della neurodisfunzione enterica indotta dall'infezione da HSV-1, si sono impiegati topi deficienti del gene che codifica per il recettore Toll-like 2 (TLR2 KO) ed un ceppo di HSV-1 deficiente del gene immediatamente precoce che codifica per la proteina ICP27 (ICP27 KO) essenziale per la replicazione virale (Uprichard and Knipe, 1996). L'infezione con ICP27 KO ha determinato alterazioni del SNE solamente nel primo periodo di infezione, a suggerire un coinvolgimento dei meccanismi di replicazione virale nell'insorgenza della neuropatia nelle fasi tardive dell'infezione (Qesari et al., 2012).

Studi recenti hanno evidenziato che l'interazione fra TLR2 e HSV-1 porta allo sviluppo di una risposta immunitaria innata con produzione eccessiva di citochine pro-infiammatorie e conseguente danno tissutale di natura neuroimmunitaria (Soberman et al., 2012). L'infezione del SNE con HSV-1 nei topi TLR2 KO ha prodotto solo una riduzione dei neuroni nitrgergici nNOS positivi senza determinare anomalie strutturali del plesso mienterico ed alterazioni della contrattilità intestinale.

In conclusione, questa ricerca ha dimostrato che l'infezione del SNE in topi ad opera di HSV-1 determina alterazioni strutturali nel plesso mienterico e funzionali dell'attività contrattile dell'ileo che insorgono in seguito all'attivazione della risposta immunitaria mediata dai TLR2. Alla luce di questi risultati il mio lavoro di ricerca evidenzia i TLR2 come un interessante bersaglio molecolare per modulare le risposte immunitarie innescate da patogeni e possibilmente per il trattamento di neuropatie di origine virale.

ABBREVIAZIONI

[³H]-ACh	acetilcolina triziata
5-HT	serotonina
5-HT3	recettore per la serotonina
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterasi
BCA	acido bicinconinico
BSA	albumina di siero bovino
CF	citofluorimetria
ChAT	acetilcolintrasferasi
CIIP	pseudo-ostruzione intestinale idiopatica
CNTF	fattore neurotrofico ciliare
Ctrl	controllo
DFGI	disordini funzionali gastrointestinali
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DPM	disintegrazioni per minuto
E	geni precoci dell'HSV-1
EBV	epstein-barr virus
ECL	enhanced chemiluminescence
EFS	stimolazione elettrica a campo
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	siero fetale bovino
Fw	primer forward
GAPDH	gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi
GFAP	proteina acidica gliale
HRP	horseradish peroxidase
HSV	<i>herpes simplex</i> virus
HSV-1	<i>herpes simplex</i> virus di tipo 1
HuC/D	proteine neuronali della famiglia ELAV
IBD	malattia infiammatoria intestinale
IBS	sindrome dell'intestino irritabile
ICC	immunocitochimica
ICP	infected cell protein
ICP27 KO	ceppo di HSV-1 deficiente del gene che codifica per ICP27
ICP27	proteina codificata da gene IE
IE	geni immediatamente precoci dell'HSV-1
IG	intra gastrico
IgG	immunoglobulina
IHC	immunoistochimica
IN	intranasale
KREBS	soluzione fisiologica
L	geni tardivi dell'HSV-1

LAT	trascritti associati alla latenza
LMMP	muscolatura longitudinale con annesso il plesso mienterico
MAPs	proteine associate ai microtubuli
MuLV	trascrittasi inversa della leucemia murina
NGF	fattore di crescita nervoso
NK	neurochinina
nNOS	ossido nitrico sintetasi
NO	ossido nitrico
NSE	specifica enolasi neuronale
NT	nucleotidi
NT-3	neurotrofina 3
NT-5	neurotrofina 5
OCT	optimal cutting temperature
PAMP	componenti molecolari proprie dei patogeni
PBS	phosphate buffer saline
PFA	paraformaldeide
pfu	unità formanti placche
PGP 9.5	protein gene product 9.5
PVDF	polivinildenfluoruro
RIPA	radio immuno precipitation assay
ROS	specie reattive dell'ossigeno
Rv	primer reverse
S100-β	proteina gliale che lega il calcio
SDS	sodio dodecil solfato
SDS-PAGE	elettroforesi su gel di poliaccrilammide in presenza di sodio dodecil solfato
SNC	sistema nervoso centrale
SNE	sistema nervoso enterico
SP	sostanza P
TA	temperatura ambiente
TLR2 KO	topi deficienti del gene codificante il recettore TLR2
TLR2	recettore toll-like 2
T_M	temperatura di melting
UPL	universal probe library assay design center
VIP	polipeptide intestinale vasoattivo
W	settimana
WB	western-blot
WM	whole-mount
WT	wild type
α-SMA	α-smooth muscle actin

1. INTRODUZIONE

I disordini funzionali gastrointestinali (DFGI) comprendono un gruppo eterogeneo di malattie croniche e ricorrenti a forte impatto sociale. L'acalasia, la pseudo-ostruzione intestinale cronica idiopatica e la sindrome dell'intestino irritabile (Irritable Bowel Syndrome, IBS) sono tra i più rilevanti DFGI, rispettivamente, per gravità della prognosi, forte impatto sulla qualità della vita o prevalenza (Corazziari, 2004; Drossman, 2006).

La sindrome dell'intestino irritabile, oltre a presentare un'alta prevalenza nella società, stimata essere tra il 10 e il 20% nella popolazione occidentale e tra il 7 e il 10% a livello mondiale (Jones et al., 2007; Clarke et al., 2009; Fichna and Storr, 2012), è caratterizzata da costi economico-sociali elevati. Infatti, tra cure mediche, ospedalizzazioni e assenteismo dal lavoro, la spesa totale sembra raggiungere circa 17 bilioni di dollari all'anno, anche se il reale costo sembrerebbe essere sottostimato data l'esistenza di un numero rilevante di persone che non si espone ad un parere medico (Talley, 2008; Quigley et al., 2012).

L'IBS si manifesta come un disturbo intestinale funzionale cronico ma di entità moderata associato ad alterazione della motilità (diarrea o costipazione) e aumento della sensibilità viscerale (dolore addominale e gonfiore) (Drossman, 2006; Larauche et al., 2012). Questa malattia viene considerata come una patologia bio-psicosociale che risulta insorgere dall'interazione tra fattori psicosociali (ansia e depressione), intolleranze alimentari e infezioni gastrointestinali (Hanevik et al., 2009; Ammoury et al., 2009). Nell'insorgenza di questo disturbo funzionale gastrointestinale sembra essere coinvolta una certa predisposizione genetica. In particolare, recenti studi hanno dimostrato che polimorfismi di geni che codificano per i trasportatori della serotonina (5HT), per i recettori α_2 -adrenergici e per le citochine (IL-6, TNF- α , IL-10) potrebbero influire sulla suscettibilità individuale alla sindrome dell'intestino irritabile, la più diffusa dei DFGI (Adam et al., 2007; Camilleri, 2009; Barkhordari et al., 2009).

I sintomi dell'IBS non sembrano correlati ad anomalie strutturali e biochimiche, anche se a volte si osserva la presenza di infiltrati infiammatori che possono progredire verso una condizione infiammatoria cronica, soprattutto nei casi di IBS post-infettiva (Barbara et al. 2002; Feng et al., 2012).

Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che i disordini funzionali gastrointestinali possono insorgere in seguito a disfunzioni della muscolatura liscia intestinale e della trasmissione del sistema nervoso enterico e/o centrale (Quigley, 1999; De Giorgio et al., 2004). È noto, infatti, che il sistema nervoso enterico è coinvolto nel controllo delle funzioni gastrointestinali, quali l'attività motoria, l'assorbimento, la secrezione, il flusso sanguigno e la risposta immunitaria locale. Ne consegue che alterazioni permanenti o transitorie a livello del sistema nervoso enterico possono determinare anomalie della funzione intestinale e di conseguenza compromettere la qualità della vita dei pazienti che ne sono affetti (De Giorgio, 2004).

Una serie di condizioni, compresi interventi chirurgici, sindromi paraneoplastiche, fattori ambientali, infezioni virali e/o batteriche e anomalie a carico del sistema

immunitario possono danneggiare il sistema nervoso enterico inducendo processi di tipo degenerativo sia immuno-mediati che non (Tornblom et. al., 2002, Tornblom et. al., 2007). Il ritrovamento di infiltrati linfocitari nel plesso mienterico di pazienti affetti da DFGI ha suggerito come possibile eziologia di queste malattie una reazione immuno-mediata dell'ospite ad agenti infettivi. In particolare, un'infezione da parte di virus neurotropi comunemente diffusi, come l'*Herpes Simplex* virus di tipo 1 (HSV-1) e il poliovirus JC a livello del sistema nervoso enterico, risulta coinvolta nel determinare anomalie motorie del tratto gastrointestinale e nell'insorgenza di neuropatia enterica (Facco et al., 2008; Selgrad et al., 2008).

Ad oggi, per il trattamento dei DFGI vengono utilizzati diverse classi di farmaci quali, antagonisti dei recettori 5-HT₃ della serotonina, antidepressivi triciclici, inibitori selettivi per la ricaptazione della serotonina (5-HT), gabapentanoidi, antagonisti dei recettori adrenergici β_3 , somatostatina, melatonina ed altri (Mayer et al., 2008; Fichna and Storr 2012). Tuttavia, queste terapie farmacologiche sono palliative, rivolte ad attenuare i sintomi più fastidiosi e debilitanti.

Allo scopo di identificare i meccanismi molecolari coinvolti nell'eziopatogenesi di questi disturbi e, di conseguenza, possibili bersagli farmacologici, negli ultimi decenni sono stati messi a punto diversi modelli animali sperimentali in grado di mimare le alterazioni che si verificano nei DFGI. I modelli animali attualmente utilizzati sono basati sull'induzione di stress acuto, cronico o post-traumatico, o su danno infiammatorio intestinale con l'impiego di agenti irritanti per la parete enterica (destrano sodio solfato, acido trinitrobenzensulfonico e acido 2,4-dinitrobenzensulfonico) o di agenti infettivi, quali *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Trichinella Spiralis* (Barbara et al., 1997; Mayer and Collins 2002; Antonioli et al., 2007; Larauche et al., 2012; Qin et al., 2012).

Data l'elevata diffusione di virus neurotropi nella popolazione e il ruolo cruciale che il sistema nervoso enterico svolge nella regolazione della funzione intestinale, nel 2010 è stato messo appunto un modello animale di infezione enterica da HSV-1 nel sistema nervoso enterico, caratterizzato da alterazioni della motilità intestinale in assenza di segni di malattia locale o sistemica (Brun et al., 2010).

1.1 Fisiologia e patologia del sistema nervoso enterico

Il tratto gastrointestinale si differenzia da tutti gli altri organi periferici dal momento che possiede un esteso sistema nervoso intrinseco, denominato sistema nervoso enterico (SNE), il quale è in grado di regolare la funzione intestinale indipendentemente dal sistema nervoso centrale (SNC; Furness, 2012). Il SNE è costituito, proprio come il SNC, da una rete neuronale che comprende classi di cellule nervose altamente specializzate dove il numero di neuroni enterici nell'uomo oscilla tra 400 e 600 milioni, quasi equivalente al numero di neuroni presenti nel midollo spinale (Furness, 2012). Nel SNE, i corpi cellulari neuronali (soma) sono raggruppati in tanti piccoli gangli connessi tra di loro mediante fasci di fibre nervose che formano i due maggiori plessi gangliari, il plesso mienterico (o il plesso di Auerbach) e il plesso sottomucoso (o il plesso di

Meissner). Il plesso mienterico, localizzato tra lo strato longitudinale e lo strato circolare della muscolatura liscia, si estende lungo tutto il tratto intestinale e provvede all'innervazione motoria e secreto-motoria rispettivamente della muscolatura liscia e della mucosa. Un numero sostanziale di proiezioni neuronali del plesso mienterico si estendono anche nel plesso sottomucoso localizzato tra lo strato muscolare circolare e la muscularis mucosae. Il plesso sottomucoso svolge un ruolo importante nel controllo della funzione secretoria, infatti le sue proiezioni neuronali innervano la muscularis mucosae, le cellule endocrine intestinali ed i vasi sanguigni della submucosa (Goyal Ray e Hirano, 1996; Figura 1).

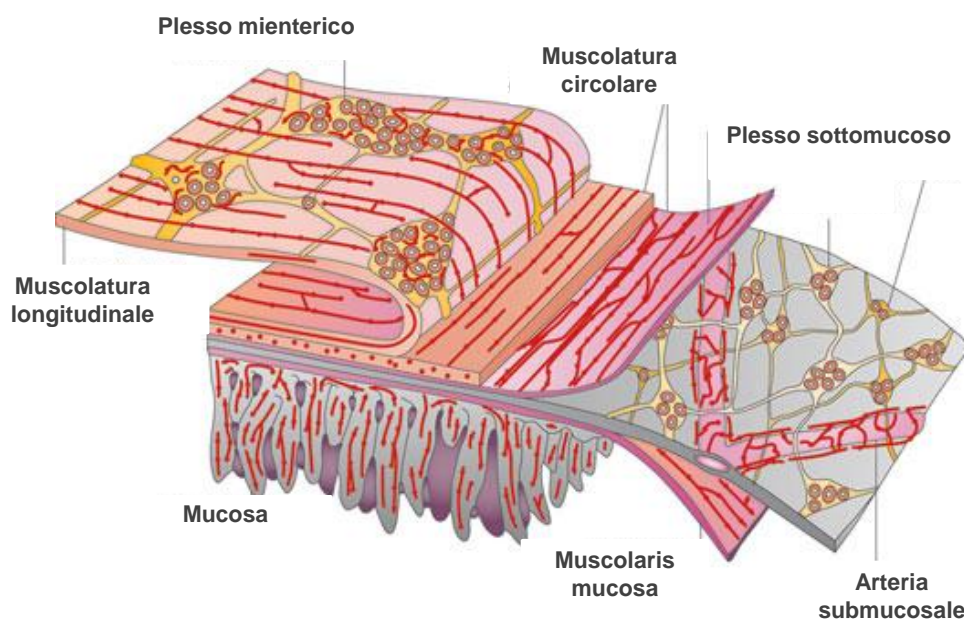


Figura 1. Rappresentazione grafica dell'anatomia dell'intestino tenue. Estratto e modificato da Furness, 2012.

I gangli sono avvolti da cellule gliali simili agli astrociti del SNC che, rivestendo con le loro estensioni la maggior parte dei soma dei neuroni, li separano dai tessuti adiacenti costituendo una vera e propria barriera che assomiglia a quella emato-encefalica. Nei mammiferi adulti, le cellule gliali prevalgono sui neuroni enterici con un rapporto di 4:1. Esse possiedono delle caratteristiche strutturali univoche, ossia dei lunghi prolungamenti laminari che rivestono gli assoni neuronali, e delle strette giunzioni cellulari che creano numerosi contatti sinaptici con vescicole localizzate nelle varicosità nervose (Ruhl et al., 2004).

In passato si pensava che le cellule gliali fossero cellule passive coinvolte unicamente nel sostentamento neuronale. Le somiglianze tra il SNE e il SNC sia in termini di indipendenza funzionale e di organizzazione strutturale che di rassomiglianza morfologica e fenotipica tra la glia enterica e gli astrociti del SNC, hanno portato ad ipotizzare che questi due tipi cellulari siano funzionalmente correlati. Infatti,

analogamente agli astrociti, le cellule gliali enteriche possiedono una densa matrice di filamenti intermedi ricca in proteina fibrillare acida gliale (GFAP), esprimono la proteina S-100 chelante il calcio e la glutammina sintetasi coinvolta nella detossificazione neuronale da glutammato e acido amminobutirrico (Ruhl et al., 2001). Nell'ultimo ventennio, numerosi studi hanno dimostrato il ruolo attivo delle cellule gliali nella fisiologia e nella patofisiologia del tratto gastrointestinale (Neunlist et al., 2007). Funzionalmente le cellule gliali svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità del SNE e nella neuroprotezione promuovendo la sopravvivenza neuronale attraverso l'apporto di nutrienti dai vasi sanguigni, la produzione di fattori neurotrofici, la formazione di mediatori del segnale intercellulare e la regolazione dell'omeostasi perineuronale (Cabarrocas et al., 2003; Bassotti et al., 2007). Il ruolo della glia enterica nel mantenimento dell'integrità intestinale è stato dimostrato anche in animali transgenici, dove l'ablazione delle cellule gliali determinava la degenerazione dei plessi mienterici e l'alterazione dell'integrità epiteliale con susseguente grave infiammazione intestinale ed infine morte dell'animale stesso (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001; Aube et al., 2006). È ormai dimostrato il coinvolgimento della glia nei processi immunitari all'interno del SNE. Infatti, le cellule gliali, come gli astrociti, svolgono un ruolo importante nei complessi meccanismi di modulazione della risposta infiammatoria intestinale, attraverso la produzione di interleuchine (come ad esempio IL-1 β , IL-6, IL-1 α , TNF- α) e l'espressione de novo di antigeni di istocompatibilità di classe II (MHC II) (Goyal Ray e Hirano, 1996; Cabarrocas et al., 2003; Von Boyen et al., 2004; Cirillo et al., 2011).

1.1.1 Il codice neurochimico dei neuroni del SNE

In base a proprietà istochimiche ed elettrofisiologiche, i neuroni vengono classificati in sottopopolazioni funzionalmente distinte, ossia neuroni effettori (eccitatori e inibitori), sensori intrinseci ed interneuroni, in grado di governare autonomamente, attraverso circuiti nervosi integrati, pressoché tutte le funzioni digestive, quali l'attività motoria del canale alimentare, le secrezioni gastrointestinali, l'assorbimento intestinale di nutrienti ed il circolo splancnico (Furness et al., 1998; Furness et al., 2004; De Giorgio et al., 2004).

La trasmissione chimica mediata dai neuroni enterici coinvolge all'incirca 30 neurotrasmettitori (Tabella 1), tra cui l'acetilcolina (ACh), la sostanza P (SP), il polipeptide intestinale vasoattivo (VIP) e l'ossido nitrico (NO) (Ruhl et al., 2004; Gross and Pothoulakis, 2007; Zhou and Zhu, 2009; Harrington et al., 2010). Il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNE e il primo ad essere stato individuato è stata l'ACh.

I neuroni colinergici sono stati tradizionalmente identificati mediante l'utilizzo di saggi in grado di rilevare l'attività enzimatica dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE), coinvolto nell'idrolisi dell'ACh in colina e acetato (Johnson et al., 1995). Un'altra proteina utilizzata per marcare i neuroni colinergici è stato l'enzima acetilcolintrasferasi (ChAT), sintetizzato nel soma neuronale ed in seguito trasportato nelle terminazioni

nervose dove è responsabile della sintesi dell'ACh. Recentemente anche i trasportatori vescicolari dell'ACh (VACHT) e i trasportatori della colina ad alta affinità (CHT) sono stati impiegati come proteine utili per caratterizzare il sistema colinergico.

All'interno del SNE ci sono due classi di recettori che mediano la neurotrasmissione colinergica, i recettori nicotinici e quelli muscarinici, i quali a loro volta mediano due tipi di risposte eccitatorie, rispettivamente, rapida e lenta. Entrambi queste classi di recettori sono espresse anche in molte cellule del sistema immunitario, come linfociti, macrofagi e cellule dendritiche, a suggerire un'azione neuro-immunomodulatrice dell'ACh (Saeed et al., 2005; Kawashima et al., 2007). Diversi studi, infatti, hanno dimostrato l'attività anti-infiammatoria dell'ACh mediata attraverso l'interazione con il recettore nicotinico $\alpha 7$ (Wang et al., 2003). Inoltre l'utilizzo di inibitori dell'AChE e quindi l'aumento dei livelli di ACh nello spazio extracellulare rende gli animali più resistenti all'infezione da salmonella enterica attraverso l'induzione di risposte anti-infiammatorie che attenuano l'infiammazione e promuovono la sopravvivenza (Fernandez-Cabezudo et al., 2010).

Le tachichinine insieme all'ACh sono i principali responsabili della neurotrasmissione eccitatoria del SNE (Harrington et al., 2010). Il neuropeptide SP, largamente distribuito nel SNE, risulta essere tra le tachichinine più importanti. Oltre ad essere abbondantemente espressa nei due plessi enterici, la SP viene prodotta anche dalle cellule del sistema immunitario, come i monociti, i macrofagi della lamina propria, gli eosinofili e i linfociti (Ho et al., 1997; Castagliuolo et al., 1997; Lai et al., 1998). Spesso gli stessi neuroni che rilasciano l'ACh rilasciano anche questo neuropeptide, il quale negli ultimi anni è stato utilizzato come marker dei neuroni tachichinergici. Gli effetti della SP sono mediati da tre recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine-G, le neurochinine (NK-1, NK-2 e NK-3) (Gross and Pothoulakis, 2007). Studi su modelli animali hanno evidenziato l'attività proinfiammatoria della SP e del suo recettore NK-1 nella patofisiologia dei disturbi infiammatori intestinali (Inflammatory Bowel Disease, IBD; Zhao et al., 2002).

Oltre alla SP, un'altro neuropeptide che assume un ampio significato nella fisiologia dell'intestino è il VIP. Esso è stato identificato originariamente nel tratto gastrointestinale ed è stato così nominato per la sua potente azione vasodilatatoria. Il VIP è altrettanto coinvolto nella regolazione della motilità, inibisce il riflesso peristaltico nello strato della muscolatura liscia circolare e modula il sistema immunitario (Delgado and Ganea, 2003; Abad et al., 2012). Esso viene rilasciato dalle stesse terminazioni nervose dei neuroni che contengono l'enzima ossido nitrico sintetasi (nNOS), enzima costitutivamente presente nei neuroni e principale fonte di NO. (Furness et al., 1995; Goyal and Hirano, 1996). Il VIP inoltre sembra essere un importante mediatore della plasticità neuronale; infatti ha dimostrato possedere un'attività neuroprotettiva per la sua capacità di inibire la produzione di citochine pro-infiammatorie, spesso causa di neurodegenerazione sia nel SNC che nel SNE (Sandgren et al., 2003). Questa sua attività immunomodulatoria ha reso il VIP un potenziale candidato per la cura dell'infiammazione intestinale.

PRINCIPALI NEUROTRASMETTITORI DEL SNE	
Amine:	Peptide rilasciante gastrina
Acetilcolina	Neuromedina U
Norepinefrina	Neuropeptide- Y
Serotonina	Neurotensina
Aminoacidi:	Opioidi:
γ-Acido aminobutirrico	Dinorfina
Purine:	Endorfine
ATP	Encefaline
Adenosina	
Gas:	Peptide YY
Ossido nitrico	Peptide pituitario attivante l'adenilciclasi
Monossido di carbonio	Somatostatina
Peptidi:	Sostanza P
Calcitonina	Ormone rilasciante tireotropina
Colecistochinina	Endotelina intestinale vasoattiva
Galanina	Poliptide intestinale vasoattivo

Tabella 1. Principali neurotrasmettitori individuati nel SNE.

L'NO è un altro messaggero biologico pluripotente coinvolto in numerosi eventi fisiologici e patologici del tratto gastrointestinale (Dijkstra et al., 2004). Esso esercita la sua funzione attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi con produzione del secondo messaggero guanosina 3', 5'-monofosfato ciclico dipendente che a sua volta attiva protein chinasi cGMP dipendenti, che fosforilando diversi substrati tissutali intervengono nella modulazione della motilità e peristalsi intestinale (Garthwaite, 2010). L'enzima nNOS, costitutivamente espresso nei neuroni, sintetizza l'NO catalizzando la reazione di ossidazione della L-arginina (Zhou and Zhu, 2009). Recenti studi hanno evidenziato il coinvolgimento dell'NO nell'IBS, suggerendo un ruolo diretto dell'nNOS sulle terminazioni nervose intestinali con conseguente aumentata sensibilità viscerale (Tjong et al., 2011). In diverse patologie intestinali, quali il megacolon (Hirschprung), l'acalasia o la gastroparesi, il fallimento della neurotrasmissione inibitoria contribuisce alla stasi gastrointestinale, tipica di questi disordini. L'acalasia, infatti, è associata a una perdita selettiva dei neuroni nitregici che innervano la muscolatura liscia della parete e dello sfintere esofageo determinando un mancato rilasciamento dello sfintere esofageo inferiore e una ridotta peristalsi (Shah et al., 2004; Rivera, 2011).

Alterazioni nell'espressione di questi neurotrasmettitori sono eventi molto comuni nella plasticità neuronale. Questi cambiamenti possono essere temporanei in risposta a stimoli acuti o divenire permanenti in seguito a gravi danni o a patologie infiammatorie dell'intestino, come quelle che si verificano nell'IBS post-infettiva o nelle IBD. Tali mediatori risultano essere un chiaro esempio di comunicazione bidirezionale tra il

sistema immunitario e il SNE, supportando la teoria dell'inflammatione come causa dei sintomi dell'IBS (Ekblad and Bauer, 2004; De Giorgio et al., 2004).

1.2 Ruolo delle infezioni virali nei DFGI

Agenti infettivi, come virus neurotropi comunemente diffusi, capaci di infettare il SNC, sono stati proposti come elemento scatenante in grado di alterare e compromettere l'integrità del SNE sia direttamente che attraverso risposte infiammatorie attivate dalle componenti del sistema immunitario innato e adattativo. Attualmente esistono evidenze poco chiare sul ruolo eziologico dei virus neurotropi nei DFGI e sono per lo più indirette, basate su pochi casi riferiti all'insorgenza di DFGI in seguito ad un'infezione virale, o alla presenza del genoma virale nel SNE di pazienti affetti da gravi alterazioni motorie gastrointestinali (Benini et al., 1996; Jungla et al., 1996). L'ipotesi che virus neurotropi potessero infettare il SNE risale all'inizio degli anni '50 quando le particelle virali di HSV-1 furono trovate sia nella saliva che nelle feci di bambini affetti da somatite erpetica primaria (Budding et al., 1953).

Nel 1984, Rand e collaboratori, associarono l'infezione erpetica all'ulcera peptica. Evidenziarono, infatti, la presenza dell'HSV-1 nel ganglio celiaco suggerendo la diffusione del virus attraverso un movimento anterogrado dalla mucosa dello stomaco e/o dell'intestino. Più recentemente, nel 1990, Lhor dimostrò la presenza dell'HSV-1 in cellule attigue alle lesioni ulcerose peptiche, ipotizzando che il virus si trovi allo stato di latenza nel ganglio vagale ed in seguito a riattivazione sia in grado di viaggiare lungo il nervo vago fino a raggiungere il possibile sito di lesione. Una volta raggiunte le terminazioni nervose, il virus rilasciato dal nervo o da cellule neuroendocrine, si replica nelle cellule epiteliali della mucosa causando così ulcera peptica (Lhor et al., 1990). Nel 1997, Debinski e collaboratori suggerirono il ruolo eziologico degli *herpes* virus nella pseudo-ostruzione intestinale idiopatica (CIIP). L'indagine eseguita su 13 pazienti con CIIP rivelò la presenza del virus Epstein-Barr (EBV) e del citomegalovirus nei neuroni mienterici del piccolo intestino. In seguito, altri studi hanno ipotizzato il coinvolgimento dell'HSV-1 o del polioma virus JC nelle anomalie della contrattilità muscolare e della peristalsi gastrointestinale, suggerendo come possibile eziologia di queste malattie una reazione immuno-mediata dell'ospite ad agenti infettivi (Castagliuolo et al., 2004; Facco et al., 2008; Selgrad et al., 2009).

Tra possibili candidati patogeni, l'HSV-1 presenta delle caratteristiche molto interessanti per quanto riguarda i DFGI. Nell'uomo, in seguito all'infezione primaria attraverso l'epitelio mucosale cutaneo, l'HSV-1 è in grado di stabilirsi allo stato di latenza nei neuroni che innervano il sito di infezione primaria e di persistere nell'organismo dell'ospite per tutta la durata della vita nonostante vi sia una potente risposta immunitaria cellulo-mediata (Efsthathiou et al., 2005). La riattivazione del virus nell'ospite determina la formazione di particelle virali che attraverso la diffusione nella mucosa orofaringea potrebbero raggiungere il tratto gastrointestinale (Gesser and Koo, 1996). Nel 1996, Gesser e Koo dimostrarono che, dopo somministrazione di HSV-1 per via orale nel lume esofageo di topi, il virus era in grado di raggiungere le terminazioni

nervose della parete intestinale e attraverso il SNE di diffondere nel plesso sottomucoso, nel plesso perigliandolare, fino ad arrivare nella mucosa interagendo direttamente con le cellule epiteliali. Queste evidenze portarono così a supporre che l'HSV-1, una volta giunto nel lume intestinale, acceda al SNE attraverso le fibre nervose intramucosali. In seguito ad infezione orale, è stato suggerito anche per l'uomo un profilo di diffusione di HSV-1 a livello enterico simile a quello messo in evidenza nel topo, dal momento che i disturbi gastrointestinali compaiono contemporaneamente alle riacutizzazioni (Gesser and Koo, 1997).

Considerata l'elevata diffusione del virus nella popolazione e la sua capacità di infettare il SNE (Gesser and Koo, 1996, Gesser and Koo, 1997) è possibile presupporre che l'infezione intestinale con HSV-1 possa rappresentare un innovativo modello animale per lo studio delle alterazioni contrattili a livello intestinale. Alcuni modelli animali di infezione da HSV-1 si sono basati sul diretto inoculo del virus per via intragastrica. Gli animali infetti presentavano però un'elevata percentuale di mortalità in pochi giorni dall'infezione, dovuta all'impiego di un'elevata dose di particelle virali (10^7 pfu) che causavano il decesso per encefalite acuta (Gesser et al., 1994; Gesser et al., 1995).

Allo scopo di ridurre l'elevata mortalità degli animali da esperimento, nel 2010, è stato sviluppato dal laboratorio del Prof. Castagliuolo (Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova) in collaborazione col nostro gruppo, un protocollo di infezione basato su due tempi di somministrazione di HSV-1 (Brun et al., 2010). Il protocollo di trattamento applicato prevede un primo inoculo di HSV-1 per via intranasale e, dopo quattro settimane, una seconda somministrazione per via intragastrica. Il primo trattamento a bassa dose permette così al virus di penetrare nell'organismo e raggiungere il SNC, dove si stabilizza in uno stato di latenza, riducendo significativamente il rischio di insorgenza di encefalite. La somministrazione per via intragastrica di un'alta dose di HSV-1 permette il contatto del virus con l'epitelio intestinale e la sua penetrazione nelle terminazioni nervose dove si stabilizza in uno stato di latenza nei plessi enterici. Tale protocollo ha il pregio di mimare il processo di infezione che potrebbe avvenire nell'uomo in seguito a deglutizione di particelle virali provenienti dalle lesioni erpetiche. Questo modello animale di infezione virale del SNE presenta alterazioni della contrattilità e del transito intestinale senza segni di malattia, caratteristiche molto simili a quelle evidenziate nei DFGI (Brun et al., 2010).

1.2.1 *Herpes simplex virus di tipo 1*

Una caratteristica chiave di tutti gli *Herpes simplex virus* (HSV) è la loro abilità di permanere allo stato di latenza per tutta la durata della vita dell'organismo che li ospita. Durante l'infezione latente, essi non sono facilmente rilevabili attraverso metodi standard di riconoscimento virale. Riattivazioni periodiche determinano invece infezioni ricorrenti, esacerbazione della malattia e trasmissione delle particelle virali ad un nuovo organismo ospite. Gli HSV causano stati patologici che in alcuni casi, come in pazienti immunodepressi o in neonati, possono risultare fatali. Persone immunocompetenti possono altrettanto soffrire di malattie erpetiche piuttosto serie, quali ricorrenti cheratiti

che possono portare a cicatrici corneali e a cecità e, in casi più gravi, encefaliti erpetiche che spesso si concludono con il decesso, nonostante la disponibilità di farmaci antivirali. Le attuali terapie farmacologiche antivirali utilizzate nei confronti degli HSV colpiscono solamente l'infezione nella sua fase litica senza interferire in questo caso con il virus latente. Per questo motivo, il monitoraggio dei serbatoi di HSV durante l'infezione latente risulta essere oggi una nuova ed indispensabile strategia terapeutica (Knipe and Cliffe, 2008).

L'*Herpes simplex* virus di tipo 1 (HSV-1) è un virus neurotrofo che si replica a livello nucleare e presenta un peso molecolare di 96×10^6 kDa (Efstathiou and Preston, 2005). Esso comprende tre maggiori elementi strutturali: (i) il nucleocapside che racchiude il genoma virale; (ii) l'involucro o l'envelope costituito da un doppio strato lipidico con incorporate le glicoproteine e (iii) una regione proteica, localizzata tra il capsido e l'envelope, chiamata tegumento. Il capsido è una struttura icosaedrica con un diametro di circa 125 nm e uno spessore di 15 nm composto da 4 proteine; VP5 (proteina capsidica maggiore), pre-VP22a (proteina che costituisce l'impalcatura), VP19C e VP23. L'envelope ospita approssimativamente 11 glicoproteine virali, quattro delle quali (gD, gH, gL e gB) sono essenziali per la penetrazione del virus nella cellula ospite. Il tegumento, che contiene circa 20 proteine, funge da serbatoio di alcune proteine richieste nella fase iniziale dell'infezione. Il genoma virale è una molecola di DNA a doppio filamento lineare di circa 152 000 pb. La sua struttura consiste in due segmenti uniti covalentemente, L (long, lungo) ed S (short, corto), fiancheggiati da ripetizioni invertite. In entrambi i filamenti di DNA sono distribuiti più di 80 geni differenti, mentre i geni localizzati nelle regioni ripetute ed invertite sono presenti in doppia copia (Arduino and Porter, 2008).

L'infezione primaria da HSV-1 avviene attraverso un contatto diretto con una lesione o fluidi infetti (saliva ed essudati di lesioni attive). Spesso l'infezione primaria risulta essere asintomatica. Infatti, il 60% dei pazienti risulta non sviluppare vescicole dopo l'infezione facilitando in questo modo la diffusione orizzontale del virus nella popolazione.

L'HSV-1 infetta le cellule epiteliali delle mucose attraverso il legame a specifici recettori cellulari. Al legame iniziale delle glicoproteine virali, gC e/o gB, ai proteoglicani eparan solfato della superficie cellulare, segue il legame della glicoproteina gD a diversi recettori cellulari di membrana; HVEM (herpes virus entry mediator, un membro della superfamiglia dei recettori TNF), PVRL1/2 (nectine, molecole di adesione cellulare che appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline) e catene di eparan solfato modificate dall'enzima 3-O-solfotrasferasi. La gB sembrerebbe legare in modo indipendente dal legame con i proteoglicani eparan solfato anche i recettori PIL α (Paired Immunoglobulin-Like type 2 receptor α) attraverso i quali avverrebbe la penetrazione del virus in seguito alla fusione dell'envelope virale con la membrana plasmatica della cellula ospite. Ad oggi, risulta ancora poco chiaro il modo in cui queste glicoproteine mediano la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare. Il legame della gD ad uno dei recettori cellulari sembrerebbe innescare una alterazione della loro conformazione che gli permetterebbe

in seguito di interagire con le glicoproteine gH-gL o gB attivando la loro capacità di fusione (Reske et al., 2007). Una volta nel citoplasma cellulare, il capsido privo dell'envelope viene trasportato nel nucleo dove rilascia il genoma virale che in seguito si replicherà determinando la formazione di una progenie virale che diffonderà nelle cellule epiteliali adiacenti. Successivamente all'infezione litica sulle superfici mucosali, l'HSV-1 entra nelle terminazioni nervose dei nervi sensoriali dove viene trasportato attraverso un trasporto assonale retrogrado nei corpi cellulari neuronali stabilendo uno stato di latenza (Arduino and Porter, 2008).

Il ciclo vitale dell'HSV-1 coinvolge sia la fase litica (produttiva) che la fase latente di infezione (non produttiva; Figura 2). Nonostante una vigorosa risposta immunitaria durante l'infezione acuta, l'HSV-1 stabilisce uno stato di latenza che gli permette di mantenere il genoma virale in una forma non patogena e non replicativa. Il sito primario di latenza è il ganglio trigemino, dove il virus rimane presente per tutta la durata della vita. Dati scientifici riportati in letteratura indicano anche altri siti di latenza del virus, come il ganglio nodoso del nervo vago e il ganglio della radice dorsale in modelli animali, mentre nell'uomo, il ganglio superiore cervicale e vagale, il ganglio ciliare e l'encefalo. Durante questa fase, gli unici trascritti virali espressi risultano essere i trascritti virali associati alla latenza (latency-associated transcripts, LATs). Numerose funzioni presenti durante lo stato di latenza sono riconducibili alla regione del genoma dell'HSV-1 che codifica per i LATs. E' noto, infatti, che questi trascritti interferiscono con i processi apoptotici andando ad inibire l'attivazione delle caspasi 8 e 9 favorendo così la sopravvivenza delle cellule infette. LAT è inoltre un precursore di quattro diversi miRNA che inibiscono l'espressione di due proteine fondamentali nella replicazione virale stabilizzando così lo stato di latenza (Perng et al., 2000; Knipe and Cliffe, 2008).

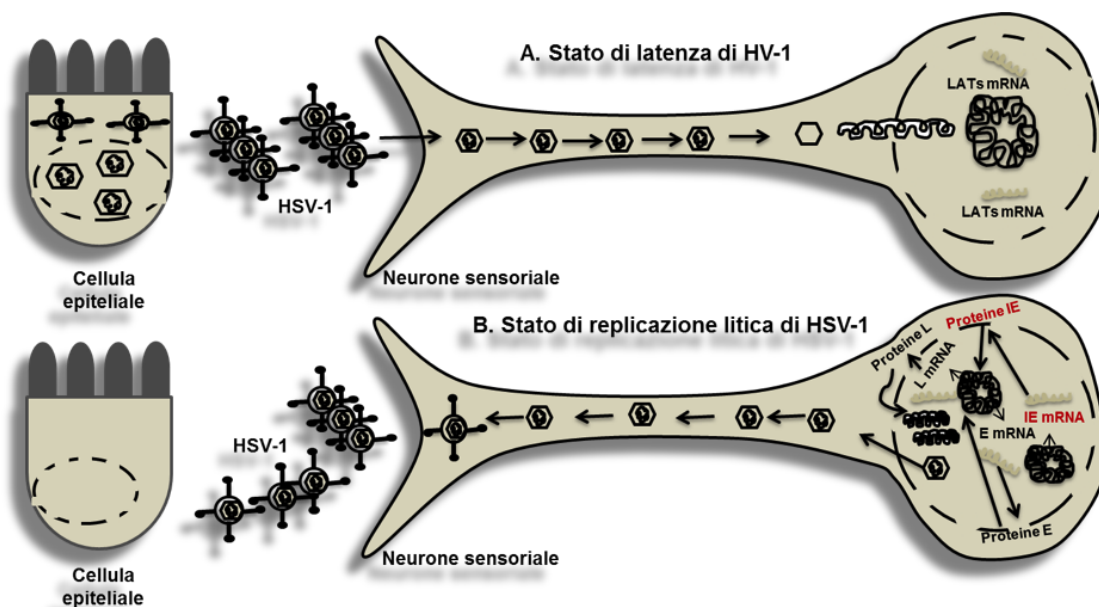


Figura 2. Rappresentazione schematica del ciclo vitale dell'HSV-1. **A.** L'infezione virale delle cellule epiteliali permette la replicazione produttiva del virus e la formazione della progenie virale. Le particelle virali entrano nei neuroni sensoriali che innervano il sito di infezione primaria e attraverso un movimento

retrogrado rilasciano il DNA nel nucleo neuronale dove verrà integrato con il DNA cellulare. Durante questa fase gli unici trascritti virali sono i LATs. **B.** In seguito a riattivazione, l'espressione a cascata dei geni IE, E e L permette la sintesi di nuove copie di DNA virale e di proteine strutturali coinvolte nell'assemblaggio delle nuove particelle virali. Attraverso un movimento anterogrado, gli HSV-1 vengono trasportati lungo l'assone, dove verranno poi rilasciati verso il sito di infezione primaria infettando nuove cellule epiteliali. Estratto e modificato da Knipe and Cliffe, 2008.

La risposta del SNC e/o SNP (Sistema Nervoso Periferico) ad eventi di stress, a traumi o ad immunosoppressione svolge un ruolo importante nella riattivazione del virus dallo stato di latenza. Durante la riattivazione, l'espressione dei geni virali viene regolata in tre fasi distinte e sequenziali: l'espressione di geni immediatamente precoci (IE, immediate early), l'espressione di geni precoci (E, early) e l'espressione di geni tardivi (L, late).

Sono stati identificati 5 geni IE originariamente definiti come geni la cui espressione avviene in assenza di una sintesi proteica de novo; geni codificanti ICP4 (Infected Cell Protein), ICP0, ICP27, ICP22 e ICP47. L'attivazione di questi geni avviene attraverso la formazione di un complesso multiproteico costituito dalla proteina transattivatrice del virione, VP16 e, dalle proteine della cellula ospite Oct-1 e HCF (Host Cell Factor) (Weir, 2001).

La proteina ICP4, ad oggi la più studiata, risulta essere indispensabile per l'attivazione dell'espressione dei geni precoci e tardivi, mentre funziona da repressore dell'espressione di alcuni geni virali e del suo stesso gene. L'esatto meccanismo attraverso il quale l'ICP4 attiva l'espressione genica rimane ancora poco conosciuto.

La proteina ICP0 attiva l'espressione di tutte le classi di geni virali incrementando i livelli stazionari di mRNA. Essa presenta negli aminoacidi terminali un dominio anulare simile ad un dominio "zing-finger DNA binding domain", il quale sembrerebbe svolgere un ruolo critico nella mediazione del trasferimento della ubiquitina nei substrati bersaglio per la conseguente degradazione da parte dei proteosomi. L'interazione tra la proteina ICP0 e gli enzimi che rimodellano la cromatina sembrerebbe attivare la trascrizione virale (Perng and Jones, 2010). L'ICP0 induce inoltre la degradazione di specifici bersagli cellulari attraverso lo stesso meccanismo con cui attiva l'espressione dei geni virali. La sua ridotta espressione in colture primarie di neuroni e in linee cellulari neuronali ha indotto ad ipotizzare che la mancanza di espressione della proteina ICP0 potrebbe favorire lo stabilirsi dello stato di latenza precludendo l'espressione della normale cascata dei geni virali nei neuroni.

Il ruolo funzionale dell'ICP22 risulta essere meno chiaro delle altre proteine. Questo è parzialmente dovuto al fatto che tale proteina probabilmente non è indispensabile per la replicazione virale.

L'ICP27 influisce sulle attività trascrizionali e post-trascrizionali che regolano l'espressione dei geni virali. Essa svolge inoltre un ruolo importante nel silenziamento dell'espressione di alcune proteine dell'ospite attraverso l'inibizione dello splicing (Hardwicke and Sandri-Goldin, 1994; Samaniego et al., 1995). Quest'ultima funzione sembrerebbe conferire al virus un enorme vantaggio dato che la maggioranza dei trascritti virali non contiene introni, mentre i trascritti delle cellule ospiti necessitano

tutti dello splicing alternativo. La proteina ICP27 è una proteina indispensabile per replicazione del DNA (Sandri-Goldin, 2008). E' stato dimostrato che virus deficienti del gene che codifica per ICP27 (ICP27 KO) presentano una riduzione dell'attività replicativa del 90% assieme ad una ridotta espressione dei geni tardivi (Uprichard and Knipe, 1996). L'ICP27 risulta dunque indispensabile per la replicazione litica dell'HSV-1 (McCarthy et al., 1989).

1.3 I recettori Toll-like ed il loro coinvolgimento nelle malattie del tratto GI

La risposta immunitaria dei vertebrati si divide in immunità innata ed acquisita, dove l'immunità innata risulta essere la prima barriera di difesa nei confronti di organismi patogeni. Al contrario, le risposte immunitarie acquisite sono processi lenti, mediati dai linfociti B e T che esprimono un'ampia diversità di recettori per l'antigene.

L'immunità innata è stata considerata a lungo aspecifica, dal momento che è caratterizzata dall'inglobamento dei microorganismi da parte dei macrofagi. Studi recenti hanno dimostrato che il sistema immunitario innato possiede un elevato grado di specificità e la raffinata abilità di discriminare tra microorganismi endogeni e patogeni estranei all'organismo. Questa discriminazione si affida ad un'estesa famiglia di recettori solubili e di membrana altamente conservati, noti come recettori Toll-like (TLR). Il ruolo chiave dei TLR è quello di riconoscere in maniera altamente specifica componenti molecolari proprie dei patogeni (pathogen-associated molecular pattern; PAMP), quali peptidoglicani, lipopolisaccaridi, acidi nucleici di batteri e virus e, di attivare una veloce risposta immunitaria innata e in seguito adattativa (Akira and Takeda, 2004). Tuttavia, il ritrovamento dei TLR in tessuti normalmente non esposti a microbi (come il sistema nervoso) e la loro abilità di riconoscere segnali endogeni di danno tissutale (danger-associated molecular pattern; DAMP), come fibrinogeno, DNA endogeno, acido urico o eparan solfato, ha suggerito un ruolo dei TLR che va ben oltre la difesa dai microrganismi (Kawai and Akira, 2010; Sloane et al., 2010).

Ad oggi, sono stati identificati 11 tipi di TLR (TLR-1/11) nell'uomo e 13 nel topo. La famiglia dei TLR comprende recettori localizzati sia sulla superficie cellulare (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) che a livello intracellulare (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) (Figura 3). Essi sono caratterizzati da un dominio costituito da regioni ricche di leucina, responsabile del riconoscimento dei PAMP, ed un dominio definito TIR (Toll/IL-1 receptor), poichè omologo dei recettori per l'IL-1 (Takeda and Akira, 2005). Il contatto con il ligando attiva due possibili vie di trasmissione del segnale, finalizzate all'induzione dei geni che codificano per citochine infiammatorie quali TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12. La prima via è attivata dall'interazione della proteina MyD88 con i recettori di tipo 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 9, mentre il TLR3 attiva una via MyD88 indipendente. Il TLR4 è il solo recettore conosciuto che attivi entrambe le vie (Takeda and Akira, 2004; Cario, 2010).

Nel tratto gastrointestinale, i TLR sono inducibili o costitutivamente espressi in diversi tipi di cellule, quali cellule epiteliali, miofibroblasti, cellule enteroendocrine e cellule immunitarie della lamina propria, come cellule T e cellule dendritiche (Abreu, 2010;

Cario, 2010). L'attività poliedrica dei TLR è ben riconosciuta nella mucosa intestinale, dove questi recettori sono coinvolti nella mediazione della risposta infiammatoria nei confronti dei patogeni e nell'attivazione di segnali utili per il mantenimento dell'integrità tissutale in condizioni fisiologiche (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Rakoff-Nahoum et al., 2006; Turer et al., 2008).

Negli anni il sistema immunitario gastrointestinale si è evoluto in modo da poter bilanciare la necessità di rispondere all'invasione da agenti patogeni e di coesistere con commensali saprofiti e antigeni di origine alimentare.

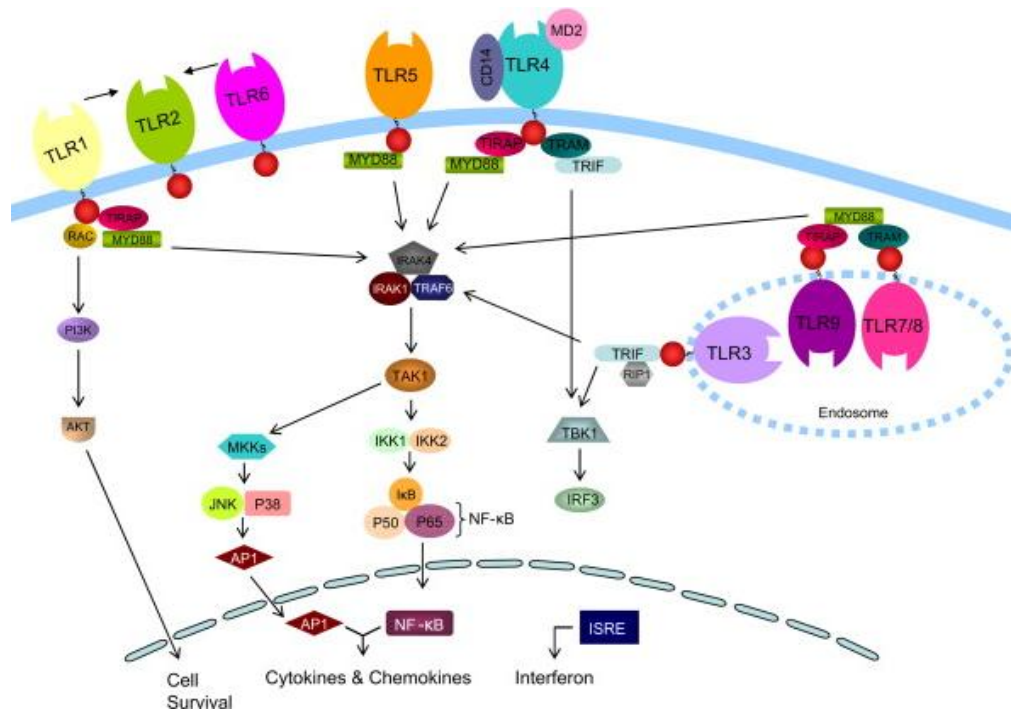


Figura 3. Via del segnale della famiglia dei recettori Toll-like (Terhorst et al., 2007).

Una disfunzione dell'interazione tra la flora batterica e la mucosa intestinale che conduce all'attivazione del sistema immunitario innato risulta essere una delle possibili cause della sindrome dell'intestino irritabile (IBS). Mentre, la patogenesi del disturbo infiammatorio intestinale (IBD) risulta essere conseguenza di un'adeguata risposta immunitaria contro i batteri saprofiti associata ad una suscettibilità genetica dell'individuo stesso. Infatti, polimorfismi individuati nei TLR2 e nei suoi co-recettori 1 e 6, in individui con IBD, suggeriscono il coinvolgimento di una scorretta risposta immunitaria nei confronti della flora batterica come causa scatenante l'infiammazione (Kranefeld et al., 2008).

Tra gli 11 membri della famiglia dei TLR, i TLR2 agiscono come eterodimeri in associazione con i TLR1 e i TLR6 e sono in grado di identificare una vasta gamma di PAMP derivati da differenti patogeni (batteri Gram+ e/o Gram-, micobatteri, funghi, virus e parassiti; Texereau et al., 2005). I TLR2 risultano essere tra i recettori più importanti anche per quanto riguarda il mantenimento dell'omeostasi mucosale. Nelle

cellule intestinali epiteliali, l'attivazione dei TLR2 induce effetti citoprotettivi favorendo la formazione di tight-junctions, prevenendo l'apoptosi cellulare e stimolando la proliferazione di cellule staminali (Cario et al., 2007).

L'espressione dei recettori TLR nel sistema nervoso (neuroni e glia) risulta essere estremamente interessante in quanto l'esposizione a microbi potrebbe determinare una condizione di infiammazione caratterizzata da una sovraespressione di citochine pro-infiammatorie in grado di delimitare l'infezione, senza però escludere il ruolo dannoso di un'eccessiva risposta immunitaria (Lima et al., 2010). Solo recentemente, i TLR2 sono stati identificati nei neuroni e nelle cellule progenitrici neuronali e gliali (Rolls et al., 2007). Nel 2009, Barajon e collaboratori hanno dimostrato per la prima volta l'espressione dei TLR3, TLR4 e TLR7 nelle cellule neuronali e gliali del plesso mienterico e sottomucoso, mentre recentemente è stato dimostrato per la prima volta il ruolo dei TLR4 nella modulazione della motilità gastrointestinale e nella promozione della sopravvivenza neuronale (Anitha et al., 2012).

L'espressione dei recettori TLR nella rete neuronale enterica sottolinea la presenza di un sistema di sorveglianza neuronale e suggerisce che antigeni di origine virale o batterica possono attivare direttamente risposte di origine neuronale senza l'interposizione di cellule intestinali epiteliali e/o immunitarie della lamina propria (Barajon et al., 2009). I TLR appaiono così un valido bersaglio per lo sviluppo di terapie innovative in grado di modulare la patogenesi dell'infiammazione intestinale.

2. SCOPO

Virus neurotropi sono stati a lungo proposti come fattori in grado di interferire con l'integrità del sistema nervoso ed essere causa dell'insorgenza di neuropatie.

Il nostro gruppo di ricerca ha di recente messo a punto un innovativo modello sperimentale in roditori nel quale la presenza di una persistente infezione di HSV-1 nel SNE determina l'insorgenza di complesse anomalie neuromuscolari caratterizzate da alterata contrattilità e transito intestinale in assenza di evidente danno istologico o sintomi di malattia (Brun et al., 2010).

Scopo della presente tesi di dottorato, pertanto, è stato quello di caratterizzare il decorso dell'infezione enterica da HSV-1 nel SNE di topi sottoposti all'infezione a 1, 2, 4, 6, 8 e 10 settimane dalla somministrazione intragastrica del virus, nonché di individuare i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo delle anomalie motorie gastrointestinali. In particolare l'attenzione si è focalizzata nel:

- I.)** studiare gli effetti dell'infezione in vivo con HSV-1 su morfologia, fenotipo neurochimico e funzionalità del SNE;
- II.)** indagare l'influenza della replicazione virale sulla comparsa delle alterazioni del SNE mediante l'infezione in vivo degli animali con un ceppo di HSV-1 deficiente per il gene IE che codifica per la proteina ICP27, essenziale per l'attivazione del processo di replicazione;
- III.)** caratterizzare l'influenza della risposta immunitaria innata nel decorso dell'infezione virale nel SNE utilizzando topi deficienti per il TLR2.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento di un modello animale di infezione enterica da HSV-1

Il modello animale di infezione da HSV-1 è stato allestito in topi maschi wild type (WT, C57Bl/6, Charles River Laboratories, Italia) o deficienti del gene codificante per il recettore toll-like 2 (TLR2 KO, B6.129-Tlr2^{tm1kir}/J, Charles River Laboratories, Italia), di peso corporeo pari a 20±2 g. Gli animali sono stati inoculati per via intranasale (IN) con 10³ pfu di HSV-1 o di un ceppo di HSV-1 delecto del gene che codifica per la proteina ICP27 (ICP27 KO). La soluzione virale (volume totale pari a 20 µl) è stata instillata, mediante la punta di una pipetta, direttamente nella narice dell'animale ed assorbita interamente per inspirazione. Dopo un periodo di quattro settimane dalla somministrazione IN, i topi sono stati sottoposti ad una seconda somministrazione di 10⁸ pfu di HSV-1 o ICP27 KO per via intragastrica (IG) con l'impiego di un ago bottonuto. Gli animali sono stati sacrificati a 1, 2, 4, 6, 8 e 10 settimane (W) dal secondo trattamento. Contemporaneamente, sono stati sacrificati anche topi controllo, inoculati secondo il medesimo protocollo con lo stesso volume di lisato di cellule Vero (mock infection, Ctrl).

Gli animali sono stati mantenuti in condizioni standard (ciclo di 12 ore di luce/buio alla temperatura di 21°C) con libero accesso ad acqua e cibo presso gli stabulari del Dipartimento di Scienze del Farmaco e del Dipartimento di Scienze Biomediche. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le regolamentazioni europee ed internazionali per il benessere animale ed approvati dal Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (C.E.A.S.A.).

3.2 Immunoistochimica su preparati whole mount (IHC-WM)

Dopo l'apertura della cavità addominale è stato prelevato il tratto distale dell'ileo (~5-6 cm di lunghezza) ad una distanza di almeno 5 cm dalla valvola ileo-cecale. Una volta eseguito il delicato lavaggio del lume intestinale in tampone fosfato salino (phosphate buffer saline, PBS 1X, pH 7,4), i tessuti sono stati fissati in una soluzione di paraformaldeide (PFA) al 4% e acido picrico al 0,2% per 1 ora a temperatura ambiente (TA). Al termine dell'incubazione, l'intestino è stato lavato tre volte per 10 minuti in PBS 1X, suddiviso in segmenti di circa 1 cm che sono stati introdotti in eppendorf contenenti PBS 1X-0,1% NaN₃ e conservati a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

I preparati di ileo sono stati in seguito tagliati longitudinalmente, lungo il tratto mesenterico e distesi su supporti di silicone di spessore di 2 mm con la superficie mucosale rivolta verso il basso. La muscolatura longitudinale con annesso il plesso mienterico (LMMP, longitudinal muscle-myenteric plexus) è stata isolata con l'ausilio di un stereomicroscopio (Optech, Optical Technology) e fissata ai quattro angoli con spilli su supporti di silicone nero, in modo da distendere quanto più possibile il tessuto.

I preparati di LMMP sono stati sottoposti a lavaggi 3 volte per 15 minuti ciascuno sotto continua agitazione in una soluzione composta da PBS 1X e Triton X-100 allo 0,2% (Applichem). Il Triton X-100 è un tensioattivo non ionico impiegato per permeabilizzare le membrane cellulari al fine di facilitare l'accesso degli anticorpi e permettere la rivelazione di antigeni presenti in sede intracellulare.

I tessuti sono stati poi incubati in una soluzione di albumina di siero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, Italia) al 1%, PBS 1X e Triton X-100 allo 0,2% per 45 minuti a TA in modo da ridurre il legame degli anticorpi secondari a siti non specifici.

I preparati whole mount sono stati successivamente incubati per tutta la notte con l'anticorpo primario (Tabella 2) precedentemente diluito in BSA 1%, PBS 1X e Triton X-100 0,2%. Il giorno successivo, dopo tre lavaggi da 15 minuti con PBS 1X e Triton X-100 0,2% per rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato, i tessuti sono stati incubati per 2 ore a TA al buio con l'anticorpo secondario fluorescente. I controlli negativi, che permettono di determinare il segnale di fluorescenza di fondo, sono stati ottenuti incubando il tessuto in assenza di anticorpo primario. Dopo ulteriori lavaggi i tessuti sono stati montati in vetrini porta oggetto di tipo SuperFrost (Vetrotecnica), immersi in mounting medium (Sigma-Aldrich), rivestiti con vetrini copri oggetto (Vetrotecnica) e conservati al buio a 4°C fino all'analisi al microscopio confocale. Gli anticorpi primari e secondari utilizzati negli studi di immunofluorescenza e le relative caratteristiche sono elencati nella Tabella 3 e Tabella 4.

3.3 Immunoistochimica a fluorescenza di criosezioni di ileo (IHC)

Al criostato sono stati ottenuti sezioni trasversali da segmenti di ileo di animali precedentemente congelati in OCT (Optimal Cutting Temperature). Una volta tagliate, le sezioni di spessore 5 µm sono state fissate su vetrini porta oggetto (Superfrost Plus, Vetrotecnica) ricoperti di gelatina e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Le fettine congelate di tessuto sono state portate a TA e lasciate scongelare per 10 minuti. Allo scopo di mantenere stabili le strutture cellulari, comprese quelle della membrana plasmatica, le sezioni sono state sottoposte a fissazione per 10 minuti utilizzando una soluzione di PFA al 4%. Per eliminare eventuale presenza di autofluorescenza, i tessuti sono stati incubati in NH₄Cl 50 mM per 10 minuti. Una volta fissato, il tessuto è stato successivamente bloccato con BSA, per ridurre i siti aspecifici e permeabilizzato con una soluzione di Triton X-100 (BSA 2%, Triton X-100 0,3% e PBS). I preparati sono stati poi incubati per 1 ora a TA con l'anticorpo primario (Tabella 2). Dopo opportuni lavaggi i vetrini sono stati sottoposti ad incubazione con l'anticorpo secondario funzionalizzato con il fluoroforo ed in seguito con il colorante nucleare TOTO[®]-3 (Tabella 3). Una volta montati, i vetrini sono stati conservati al buio a 4°C fino al momento dell'analisi.

3.4 Microscopia confocale a fluorescenza e analisi quantitativa del SNE

Le immagini in fluorescenza dei gangli mienterici sono state analizzate usando il microscopio confocale Leica TCSNT/SP2 (Leica Microsystems). Per aumentare il rapporto segnale/rumore del campo di interesse, il piano focale è stato acquisito 15 volte, in modo da ottenere un'immagine finale sottoposta a processo di filtrazione selettiva dei pixel mediamente più luminosi. Per ogni regione analizzata dei diversi gruppi sperimentali sono stati utilizzati sempre gli stessi parametri di acquisizione (intensità del laser, offset, gain, numero di scansioni) in modo da poter confrontare l'intensità del segnale tra gli stessi gruppi. Ciascun fluoroforo è stato acquisito su un canale separato, rosso, verde e blu, avendo cura di mantenere inalterato il piano focale di acquisizione nel passaggio da un canale all'altro.

Le immagini sono state acquisite con una risoluzione pari a 1024x1024 pixel e un ingrandimento 40X e/o 60X, memorizzate in formato single-TIFF, che ha il vantaggio di mantenere separati i canali del colore (verde, rosso e blu) e successivamente elaborate usando il software NIH ImageJ (versione 1.36s), che ha permesso la sovrapposizione di immagini relative allo stesso campo ottenute sui due o tre diversi canali.

Le immagini dei gangli mienterici sono state analizzate per misurare il numero di cellule positive per le proteine marker in studio (Tabella 2). Il numero di cellule è stato contato in almeno 5 campi selezionati casualmente da almeno tre preparati di LMMP per topo, per un totale di almeno 3 animali per gruppo. Le immagini sono state acquisite ad un ingrandimento 40X corrispondente ad una superficie di 0,141 mm².

3.5 Colorazione istochimica della rete neuronale colinergica e analisi quantitativa delle fibre

Per valutare gli effetti dell'infezione virale su cellule e fibre colinergiche è stato applicato il protocollo di Hedreen che permette una localizzazione selettiva dell'enzima acetilcolinesterasi nei neuroni e nei processi colinergici permettendone la visualizzazione microscopica (Hedreen et al., 1985).

I tessuti whole mount, preparati come descritto nel paragrafo 3.2, sono stati lavati in PBS 1X sotto costante agitazione e incubati per 2 ore a 37°C in una soluzione di rame (7,2 mg di etopropazina, 115,6 mg di acetiltiocolina ioduro, 75 mg di glicina, 50 mg di solfato di rame pentaidrato e 885 mg di acetato di sodio triidrato, in 100 ml di acqua bidistillata; Sigma Aldrich) preparata al momento dell'utilizzo e portata a pH 5,6 con acido acetico glaciale. L'etopropazina è stata aggiunta per inibire l'attività enzimatica di altre esterasi tissutali. Terminata l'incubazione, i preparati sono stati lavati in acqua bidistillata ed in seguito sottoposti ad una seconda incubazione della durata di 1 minuto in una soluzione di solfuro di sodio 1,25%.

La colorazione avviene grazie alla degradazione dell'acetiltiocolina ioduro ad opera dell'enzima AChE che porta alla formazione di tiocolina la quale, in seguito ad una reazione di complessazione con il rame, forma un composto che precipita in grossi cristalli. Questi ultimi vengono convertiti in depositi scuri ed amorfi di solfuro di rame per azione del solfuro di sodio.

Dopo la colorazione, le sezioni sono state montate su vetrini porta oggetto e analizzate mediante microscopio ottico, Leica DMI 4000B, implementato con una videocamera digitale. La densità delle fibre colinergiche è stata determinata contando il numero di fibre all'interno di ogni immagine (ingrandimento 10X) precedentemente suddivisa in 10 quadretti della superficie di 0,1 mm² ciascuno. Per ogni gruppo sperimentale sono stati analizzati tre preparati di LMMP di almeno tre animali diversi.

3.6 Western blot (WB)

I tessuti di LMMP, una volta isolati dall'ileo, sono stati prelevati, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. In seguito per l'analisi proteica i tessuti sono stati scongelati e omogenati direttamente in soluzione RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) non denaturante (NaCl 150 mM, IGEPAL® CA-630 1,0%, sodio desossicolato 0,5%, SDS 0,1%, Tris 50 mM, cocktail di inibitori delle proteasi 1X e sodioortovanadato 1 mM, pH 8,0; Sigma Aldrich). Dopo 45 minuti di incubazione a 4°C i lisati sono stati centrifugati (13000 g per 15 minuti a 4°C) per rimuovere il materiale particolato ed è stato raccolto il surnatante contenente la frazione proteica. La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il saggio con acido bicinconinico (BCA, Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma Aldrich). Volumi di lisato contenenti 60 µg di proteine sono stati sospesi nel tampone di caricamento Ripa e Laemly 2X (SDS 4%, glicerolo 20%, 2-mercaptoetanololo 10%, blu di bromofenolo 0,004% e Tris HCl 0,125 M, pH 6,8; Sigma Aldrich) e riscaldati a 100°C per 5 minuti al

fine di permettere la reazione di denaturazione. Le proteine sono state separate su gel SDS-PAGE al 8, 10 o 15% di acrilammide (Bio-Rad, Italia) e trasferite su membrana di polivinildenfluoruro (PVDF, GE Healthcare, Italia) precedentemente attivata in metanolo. In seguito al trasferimento la membrana è stata incubata per 1 ora in una soluzione contenente latte scremato al 5% in PBS 1X-0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich) a TA sotto agitazione, al fine di bloccare tutti i siti di legame che possono interferire col successivo legame con l'anticorpo specifico. Dopo tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS 1X-0,05% Tween 20, la membrana è stata incubata per 12 ore a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale (Tabella 2) in una soluzione contenente latte scremato al 5% in PBS 1X-0,05% Tween 20. A questo trattamento sono seguiti nuovamente tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS 1X-0,05% Tween 20, dopodiché la membrana è stata sottoposta ad incubazione per 2 ore a temperatura ambiente con l'opportuno anticorpo secondario coniugato a perossidasi di rafano (HRP) (Tabella 3) in soluzione contenente 5% latte scremato in PBS 1X-0,05% Tween 20. Infine, dopo tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS 1X-0,05% Tween 20, gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante reazione chemiluminescente esponendo la membrana a Luminata™ Classico Western HRP Substrate (Millipore). Le bande delle rispettive proteine sono state visualizzate attraverso l'utilizzo dello strumento VersaDoc 4000MP Imaging System (Bio-Rad) e l'analisi densitometrica delle singole bande è stata eseguita mediante il programma ImageJ 1.44 Analysis System dove l'espressione delle proteine di interesse è stata normalizzata per l'espressione della β -actina, proteina stabilmente espressa ad elevate quantità in tutti i tessuti.

3.7 Valutazione dell'attività contrattile di preparati di ileo

Gli esperimenti di organo isolato sono stati condotti su segmenti di ileo di topo inseriti in appositi bagni per organo isolato di volume pari a 10 ml e contenenti soluzione fisiologica Krebs preparata al momento (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂·2H₂O 2,5 mM, MgSO₄·7H₂O 1,19 mM, K₂HPO₄ 1,197 mM, NaHCO₃ 24,99 mM e C₆H₁₂O₆ 11,1 mM). Durante l'esperimento, la soluzione è stata mantenuta alla temperatura costante di 37°C ed ossigenata con una miscela di O₂ al 95% e CO₂ al 5% al fine di riprodurre le condizioni fisiologiche ottimali per la sopravvivenza del tessuto intestinale.

La tensione sviluppata dai preparati di ileo, è stata misurata con l'ausilio di trasduttori isometrici (WPI, USA) che trasmettono il segnale al sistema di acquisizione dati PowerLab (ADInstruments) che lo converte da analogico a digitale. Il segnale è stato successivamente visualizzato ed elaborato grazie al programma LabChart 6.0 (ADInstruments). Prima di ogni esperimento i trasduttori sono stati tarati con un peso campione di 1 grammo. L'ileo distale è stato tagliato in segmenti della lunghezza di circa 1 cm; ad entrambe le estremità di ciascun segmento è stato cucito un filo di cotone così da agganciare verticalmente il preparato: la parte inferiore è stata ancorata alla porzione interna del bagno mentre la parte superiore è stata agganciata al trasduttore isometrico, precedentemente tarato. Successivamente, l'organo è stato lasciato stabilizzare in soluzione Krebs ossigenata, sostituita ad intervalli di dieci minuti, per un tempo totale di 40 minuti. Prima dell'inizio di ogni esperimento i segmenti sono stati esposti per tre volte a carbacolo 1 μ M, al fine di valutarne la vitalità. Gli esperimenti di stimolazione elettrica a campo (Electric Field Stimulation, EFS) sono stati condotti con l'ausilio di elettrodi bipolari di platino collegati ad uno stimolatore Grass-S88 e posti parallelamente ai preparati di ileo all'interno dei bagni per organo isolato. Lo stimolo applicato a 40 V è costituito da un treno di 10 secondi di impulsi rettangolari della

durata di 1 millisecondo. L'effetto contratturante è stato indotto da frequenze di stimolazione in un intervallo crescente da 1 a 40 Hz. La risposta contrattile è stata calcolata come differenza tra la linea di base (registrata prima dello stimolo) e la risposta allo stimolo indotto ed espressa come grammo tensione/ peso secco di tessuto.

3.8 Preparazione di colture tissutali derivate da LMMP

Le colture tissutali di neuroni mienterici, cellule muscolari lisce e cellule gliali sono state generate dalla dissociazione della LMMP di animali controllo e infetti con HSV-1. Una volta espantato l'ileo in condizioni da minimizzare il rischio di contaminazione, la LMMP è stata isolata in sterilità sotto cappa a flusso laminare. Il materiale così ottenuto è stato sottoposto a digestione enzimatica con proteasi tipo I (1 mg/ml, Sigma Aldrich) e collagenasi tipo II (1,466 mg/ml, Gibco, Invitrogen) a 37°C sotto continua agitazione. Al termine della digestione, gli enzimi sono stati inattivati e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1600 giri per 8 minuti. Le cellule così ottenute sono state risospese in terreno DMEM (dulbecco's modified eagle medium, Euroclone) con 10% di FBS (siero fetale bovino, Euroclone) e NGF (fattore di crescita nervoso, Sigma Aldrich) alla concentrazione di 100 ng/ml e quindi seminate in piastre da 6 o 24 pozzetti precedentemente ricoperti con una soluzione di collagene tipo I di coda di ratto alla concentrazione di 50 µg/ml (Sigma Aldrich). Il mezzo di coltura è stato sostituito per la prima volta con terreno completo fresco contenente 5% di FBS 19 ore dopo la semina.

3.8.1 Caratterizzazione delle cellule neuronali, muscolari lisce e gliali mediante immunocitochimica a fluorescenza (ICC)

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti su vetrini copri oggetto alla densità di $4,5 \times 10^5$ cellule ml^{-1} . Dopo tre giorni dell'isolamento, le co-colture sono state caratterizzate in immunofluorescenza mediante l'utilizzo di specifici marcatori per cellule neuronali (anti-HuD e anti-periferina), gliali (anti-S100-β e anti-GFAP) e muscolari (anti-α-SMA). Una volta fissate in 4% di PFA per 15 minuti le cellule sono state incubate in soluzione permeabilizzante (PBS 1X e 0,1% Triton-X 100) contenente 7% di BSA per bloccare i siti di legame aspecifici. Dopo 30 minuti di incubazione le cellule sono state lavate e poi incubate per 1 ora con la soluzione di anticorpo primario (Tabella 2) diluito in PBS 1X, 0,5% di BSA e 0,1% di Triton-X 100. Dopo diversi lavaggi per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso, i vetrini sono stati incubati con i rispettivi anticorpi secondari (Tabella 3) per 45 minuti al buio. In alcuni casi, per evidenziare i nuclei, le cellule sono state incubate con il colorante nucleare TOTO[®]-3. Infine, dopo una serie di lavaggi, le cellule presenti sulla superficie dei vetrini copri oggetto sono state capovolte e montate su vetrini porta oggetto mediante l'impiego di mounting medium. Al termine, i vetrini sono stati opportunamente sigillati e conservati a 4°C al buio fino al momento dell'analisi al microscopio confocale.

3.8.2 Studio funzionale sul rilascio di acetilcolina triziata

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di $2,5 \times 10^5$ cellule ml^{-1} . Il rilascio in vitro di acetilcolina (ACh) è stato studiato applicando il protocollo di Rodrigues e collaboratori (Rodrigues et al., 2011). Dopo tre giorni dalla semina il terreno è stato allontanato e le cellule sono state incubate con [metil-³H]-colina (attività specifica = 82 Ci/mmol, Amersham) in soluzione Krebs alla concentrazione di 2 µCi

ml⁻¹ per 1 ora, in incubatore a 37°C. Al termine dell'incubazione il surnatante è stato sostituito con soluzione Krebs contenente KCl 30 mM per 5 minuti; stimolo depolarizzante utile ad indurre il rilascio di ACh endogena. Le colture sono state poi re-incubate con la soluzione Krebs contenente [metil-³H]-colina per 1 ora allo scopo di permettere la risintesi di ACh dal precursore triziato. Dopo la seconda incubazione, per rimuovere la [metil-³H]-colina non incorporata, sono stati eseguiti 3 lavaggi da 5 minuti con soluzione Krebs. Infine, è stato stimolato il rilascio di ACh intracellulare attraverso incubazione con soluzione depolarizzante Krebs contenente KCl 60 mM. La radioattività ottenuta nel surnatante della coltura stimolata con K⁺ è stata comparata a quella ottenuta dalle colture di controllo non sottoposte a stimolo depolarizzante, ma incubate per uno stesso intervallo di tempo con solo soluzione Krebs. Per ogni condizione sperimentale sono stati impiegati 8 pozzetti di colture, di cui 4 sono stati incubati in 300 µl di Krebs con K⁺ 60 mM, mentre gli altri rispettivi 4 pozzetti hanno ricevuto 300 µl di solo soluzione Krebs. Dopo 15 minuti di incubazione, i surnatanti di ogni pozzetto (300 µl) sono stati raccolti e diluiti in 4 ml di liquido scintillante (Ultima Gold, Packard). Il contenuto di trizio rilasciato è stato misurato con uno spettrometro a scintillazione liquida (Packard Tricarb 2100) e la radioattività è stata espressa in disintegrazioni per minuto (DPM). Con l'obiettivo di misurare il contenuto residuo di trizio intracellulare, le cellule sono state in seguito lisate con 300 µl di SDS al 10% in H₂O ed è stata quindi misurata la radioattività. Il rilascio di [³H] è stato considerato proporzionale al rilascio di [³H]-ACh ed è stato determinato considerando i valori medi di radioattività per ciascun gruppo (surnatante dopo lo stimolo depolarizzante, surnatante senza stimolo depolarizzante e lisato cellulare):

$$\frac{\text{surnatante (stimolato) [metil-}^3\text{H]-colina}}{\text{lisato (stimolato) [metil-}^3\text{H]-colina} + \text{surnatante (stimolato) [metil-}^3\text{H]-colina}} - \text{il rilascio di [metil-}^3\text{H]-colina (non stimolato)} * 100\%$$

3.8.3 Valutazione dell'espressione di fattori neurotrofici in seguito all'infezione in vitro con HSV-1 mediante real-time PCR

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 4,5 x 10⁵ cellule ml⁻¹. Alla distanza di tre giorni dalla semina le co-colture sono state infettate con HSV-1 e ICP27 KO (carica virale: 1 x 10⁷ pfu). Dopo 24 ore di incubazione con il virus, le cellule sono state raccolte e l'RNA totale è stato estratto mediante l'utilizzo di un kit commerciale (SV Total RNA Isolation System, Promega). In seguito all'eliminazione del DNA contaminante attraverso il trattamento con DNasi I (Promega), 1 µg di RNA estratto da ciascuna condizione sperimentale è stato in seguito retrotrascritto in cDNA impiegando la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina (MuLV) e utilizzando dei primers universali (random). Per la retrotrascrizione (RT) è stata preparata una miscela di reazione costituita da Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 5,5 mM, dNTPs 2 mM, oligonucleotidi d'innescio universale (random hexamers) 2,5 µM, 60 U inibitore dell'RNasi, 125 U di trascrittasi inversa MuLV, 2 µg di RNA estratto ed acqua MilliQ fino ad un volume finale di 50 µl. La miscela è stata quindi posta in termociclatore (Mastercycler[®] Personal, Eppendorf[®]) per 10 minuti a 25°C seguiti da 60 minuti a 48°C ed infine 5 minuti a 95°C.

Allo scopo di indagare il rilascio di fattori neurotrofici dalle co-culture non trattate (Ctrl) ed infette con HSV-1 o ICP27 KO, il cDNA ottenuto da ciascuna condizione sperimentale è stato in seguito impiegato per quantificare l'espressione dei geni che codificano per il fattore di crescita nervoso (NGF), fattore neurotrofico ciliare (CNTF), neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina 5 (NT-5) mediante amplificazione in real-time PCR utilizzando il sistema ABI PRISM 7700 (PerkinElmer) e, come sistema di rilevazione, il sistema in sonda TaqMan (Applied Biosystems) e UPL (Universal Probe Library Assay Design Center, Roche Applied Science). Per ogni campione è stata allestita una miscela di amplificazione del volume finale di 20 μ l, costituita da 10 μ l di 2x Universal PCR TaqMan™ Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 μ l di ciascun primer (10 μ M, Invitrogen), 0,25 μ l di sonda (10 μ M, Roche), 2 μ l di cDNA, ed acqua MilliQ. In base alla sequenza da amplificare è stata utilizzata la sonda 77 per il gene housekeeping che codifica per GADPH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi), la sonda 94 per il gene che codifica per NT-5 e CNTF e la sonda 42 per il gene che codifica per NGF (www.roche-applied-science.com). Le sequenze delle coppie di primers utilizzati per l'amplificazione di ciascun gene e le rispettive temperature di appaiamento sono riportate in Tabella 4. L'espressione di ogni trascritto di interesse è stato normalizzato per i livelli di mRNA del gene housekeeping, GADPH.

3.8.4 Citofluorimetria FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Attraverso il processo di co-marcatura è stato possibile caratterizzare quali cellule esprimevano TLR2 in preparati di LMMP.

Una volta tripsinizzate, le cellule sono state contate ed in seguito trattate con la soluzione di permeabilizzazione (PBS 1X contenente 5% di FBS, 0,2% di Triton X-100 e 0,5% di glicina, Sigma Aldrich) per 15 minuti a 4°C. I campioni sono stati poi incubati con gli anticorpi primari (Tabella 2), diluiti in soluzione di permeabilizzazione, tutta la notte a 4°C. Dopo tre lavaggi in PBS 1X, è stata effettuata l'incubazione con gli anticorpi secondari (Tabella 3) per 45 minuti a TA. Infine, in seguito ad una serie di lavaggi, le cellule sono state risospese in 100 μ l di PBS 1X con 2% di BSA e sono state caricate in citofluorimetro BD-FACS Calibur (Becton Dickinson) e quindi analizzate mediante il software CellQuest (Becton Dickinson).

3.9 Analisi statistica dei risultati

Tutti i risultati sono stati espressi come la media \pm SEM dei dati ottenuti dal numero di esperimenti indicati. Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati il test t di Student per dati non accoppiati o l'analisi della varianza ANOVA ad un solo criterio di valutazione (one-way), seguita dal test di Newman-Keuls o di Bonferroni per confronti multipli, utilizzando il software Graph Pad Prism 3.03. Come limite di significatività statistica è stato assunto il valore di $P < 0,05$.

Tabella 2. Anticorpi primari utilizzati in diverse tecniche sperimentali

ANTICORPI PRIMARI				
ANTIGENE	DILUIZIONE	OSPITE	DITTA	APPLICAZIONE
α -SMA, coniugato con1A4 Cy3	1:200	topo	Sigma Aldrich	IHC, ICC, CF
β -actina	1:4000	topo	Sigma Aldrich	WB
β III-tubulina	1:1000	coniglio	Couvance	IHC, WB
Caspasi-3	1:500	coniglio	R&D Systems	WB
ChAT	1:1000	capra	Millipore	WB
GFAP	1:500	coniglio	Millipore	CF, ICC
GFAP	1:1000	topo	Millipore	WB, CF
HuD	1:500	coniglio	Millipore	CF
HuC/D, coniugato con 16A11 biotina	1:40	topo	MolecularProbes	ICC, IHC
nNOS	1:40; 1:500	coniglio	Invitrogen	IHC, WB
Periferina	1:200; 1:1000	coniglio	Millipore	IHC, WB
S100- β	1:100; 1:1000	coniglio	Millipore	IHC, ICC, WB
Sostanza P	1:2000	coniglio	ImmunoStar	IHC
TLR2	1:500	topo	eBioscience	IHC
TOTO [®] -3	1:500		Invitrogen	IHC, ICC
VIP	1:10	coniglio	GenWay Biotech	IHC

Tabella 3. Anticorpi secondari

ANTICORPI SECONDARI				
ANTIGENE	DILUIZIONI	OSPITE	DITTA	APPLICAZIONE
IgG anti-capra, coniugato con HRP	1:8000	bovino	Santa Cruz Biotechnology	WB
IgG anti-coniglio, coniugato con HRP	1:5000	capra	Sigma Aldrich	WB
IgG anti-topo, coniugato con HRP	1:2000	capra	Sigma Aldrich	WB
IgG anti-topo, coniugato con Alexa Fluor 555	1:1000	capra	Invitrogen	IHC, ICC, CF
IgG anti-topo, coniugato con Alexa Fluor 488	1:1000	capra	Invitrogen	IHC, ICC, CF
IgG anti-coniglio, coniugato con Alexa Fluor 555	1:1000	capra	Invitrogen	IHC, ICC, CF
IgG anti-coniglio, coniugato con Alexa Fluor 488	1:1000	capra	Invitrogen	IHC, ICC, CF
Streptavidina, coniugata con Alexa Fluor 488	1:200		Invitrogen	ICC

Tabella 4. Oligonucleotidi utilizzati negli esperimenti di real-time PCR

OLIGONUCLEOTIDI	AMPLICONI (NT)	SEQUENZA	T _M (°C)
GAPDH	110	Fw 5'-gaggatccttctgggagttttt-3' Rv 5'-tagcgaatgggtggattttc-3'	59
NGF	142	Fw 5'-agtttggcctgtggcgt-3' Rv 5'-ggacattacgctatgcacctc-3'	59
NT-3	77	Fw 5'-cgacgtccctggaaatagtc-3' Rv 5'-tggacatcaccttgttcacc-3'	59
NT-5	84	Fw 5'-cccatccaacatgacccta-3' Rv 5'-caatgagctgcatgaggaga-3'	59
CNTF	79	Fw 5'-ggccaagcaaatgtagctctt-3' Rv 5'-gcccctggggaactactg-3'	60

4. RISULTATI

4.1 Analisi degli effetti dell'infezione con HSV-1 sul SNE

4.1.1 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla morfologia dei gangli mienterici

Al fine di valutare eventuali effetti del trattamento in vivo con HSV-1 sul fenotipo del SNE, preparazioni WM di LMMP, provenienti da topi Ctrl e infettati a 1, 2, 4, 6, 8 e 10 W, sono state sottoposte a doppia marcatura impiegando uno specifico marcatore neuronale, l'anti-HuC/D e, uno specifico marcatore per le cellule gliali, l'anti-S100 β .

Come si può notare in Figura 4, il fenotipo gangliare dei topi a 1 W dall'infezione con doppio inoculo di HSV-1 è apparso alterato rispetto ai topi Ctrl; infatti, il ganglio ha assunto un aspetto disorganizzato dove le cellule neuronali (HuC/D-positive) e le fibre gliali (S100 β -positive) sono risultate essere meno definite. In una fase tardiva, a 8 e 10 W dall'infezione con HSV-1, l'immunoreattività dei neuroni mienterici si è ridotta ulteriormente, a suggerire che nel corso dell'infezione viene alterata l'espressione della proteina HuC/D a livello della rete neuronale mienterica.

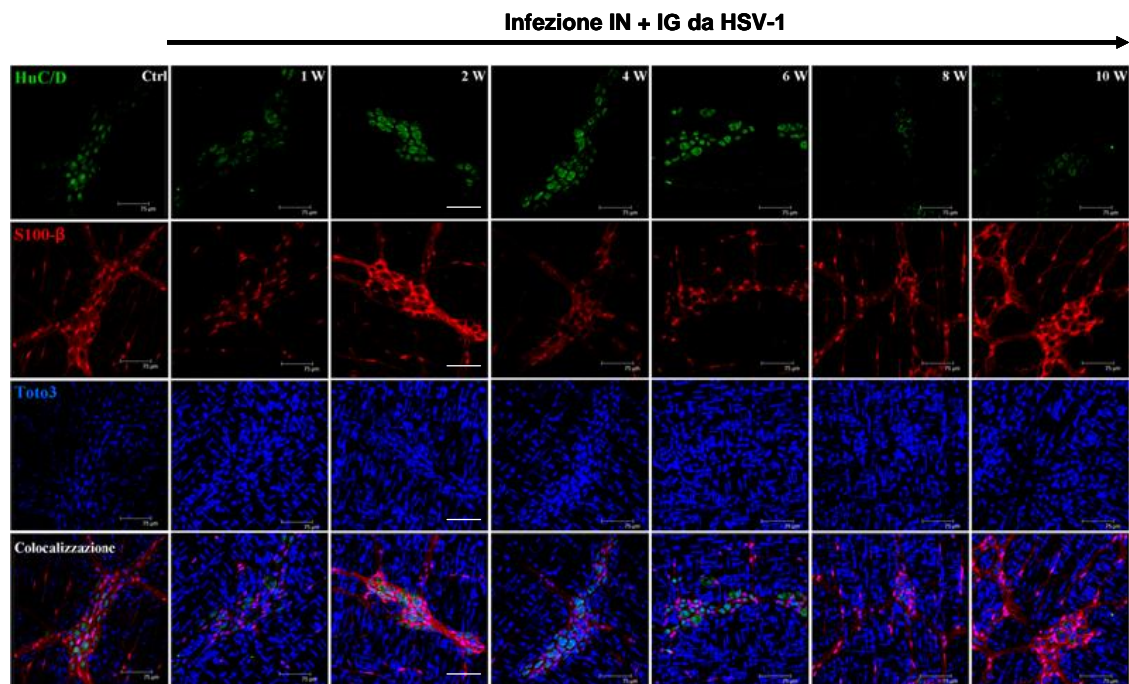


Figura 4. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni whole mount (WM) di muscolatura longitudinale con annesso il plesso mienterico (LMMP) di ileo di topi ($n \geq 3$) inoculati con cellule Vero (Ctrl) e trattati con il doppio inoculo di HSV-1 ad 1, 2, 4, 6, 8 e 10 settimane (W). I gangli mienterici sono stati marcati con anti-HuC/D (marcatore neuronale in verde), anti-S100 β (marcatore gliale in rosso) e Toto[®]-3 (marcatore nucleare in blu). Barra=75 μ m.

Dal momento che le neuropatie gastrointestinali inducono modifiche nel numero delle cellule gangliari (Benardini et al., 2012), le immagini dei preparati WM di LMMP ottenute dai topi Ctrl e infettati da 1 a 10 W con HSV-1 (Figura 4) sono state sottoposte ad analisi quantitativa al fine di valutare eventuali variazioni del numero di cellule neuronali HuC/D positive (Figura 5) e del numero di cellule gliali S100 β positive (Figura 6).

Come si può osservare dal grafico in Figura 5, la densità delle cellule neuronali HuC/D positive è risultata significativamente ridotta a 1 e a 8 W dall'infezione con doppio inoculo di HSV-1, rispettivamente del 33% e del 36% rispetto a quella riscontrata nei plessi mienterici degli animali Ctrl.

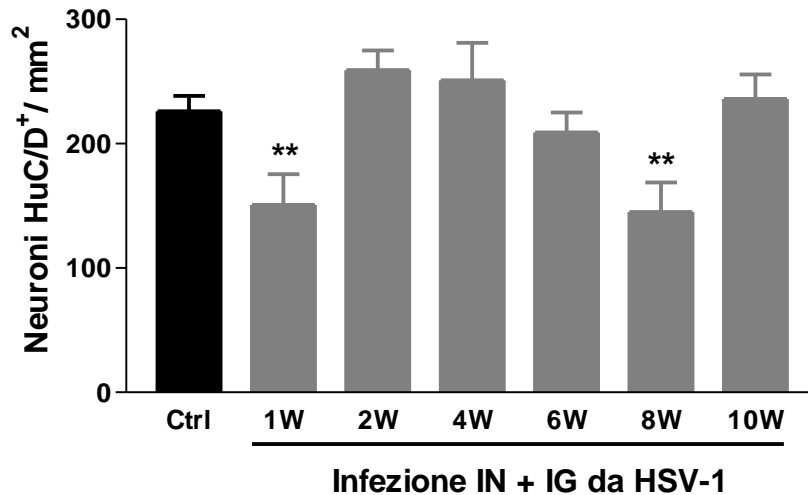


Figura 5. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla densità delle cellule neuronali HuC/D positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5). ** $P < 0,01$ vs Ctrl.

La densità delle cellule gliali S100 β positive è risultata significativamente aumentata nella fase tardiva dell'infezione, cioè a 8 e 10 W, rispettivamente del 35% e del 72% se confrontata alla densità delle cellule gliali ottenuta indagando nel plesso mienterico degli animali Ctrl (Figura 6).

Allo scopo di approfondire gli effetti dell'infezione in vivo con HSV-1 sull'integrità del SNE, nei successivi esperimenti è stata studiata la distribuzione di proteine neuronali strutturali: periferina (Figura 7), proteina presente nel soma e nei prolungamenti assodendritici e, β III-tubulina (Figura 8), proteina del citoscheletro. Come si può notare in Figura 7, è stata rilevata un'iniziale riduzione dell'immunoreattività della periferina a 2 W ed un'alterata distribuzione a 6 e 8 W dalla somministrazione del virus. A questi tempi, in particolare, la marcatura di questa proteina appare granulosa a suggerire la formazione di aggregati intracellulari con interruzione dei neurofilamenti. Per quanto riguarda la β III-tubulina si è evidenziata un'alterazione del fenotipo a 4 W dalla somministrazione IG del virus (Figura 8).

4.1.2 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sull'espressione di proteine neuronali e gliali del SNE

In questa serie di esperimenti è stata dunque saggiata l'espressione delle proteine neuronali periferina e β III-tubulina e di quelle gliali S100 β e GFAP (Figura 9).

L'analisi condotta su proteine estratte da LMMP di topi Ctrl e infettati da 1 a 10 W con HSV-1 ha rilevato che l'infezione modifica i livelli di queste proteine. Come si può notare in Figura 10A, l'infezione da HSV-1 ha determinato variazioni significative dell'espressione della periferina del -13% a 1 W, del -66% a 4 W, del -48% a 6 W, del +60% a 8 W e del +70% a 10 W.

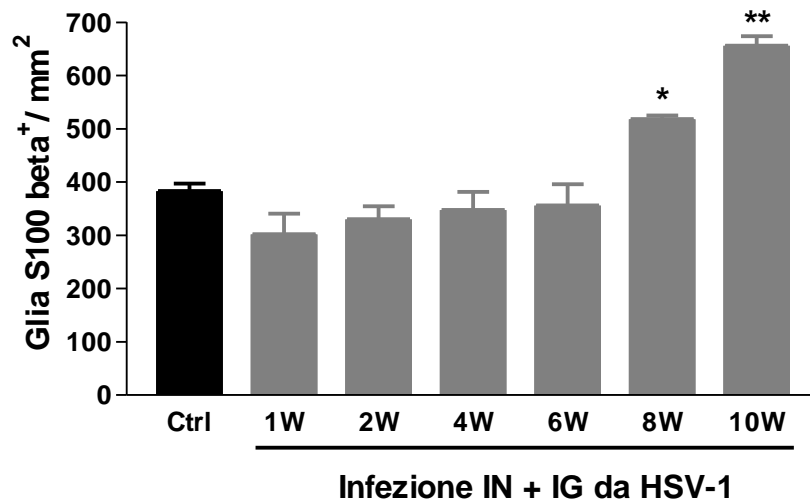


Figura 6. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla densità delle cellule gliali S100 β positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs Ctrl.

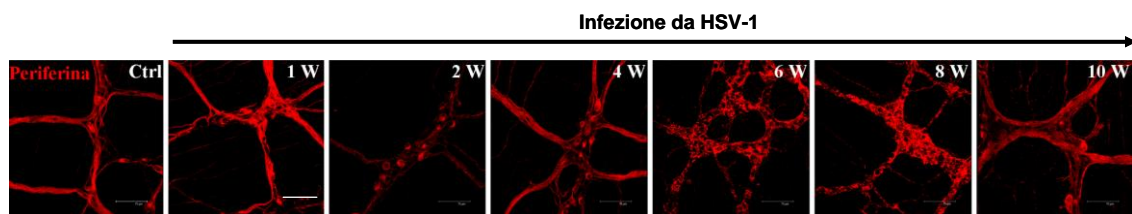


Figura 7. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali periferina positivi. Barra=75 μ m.

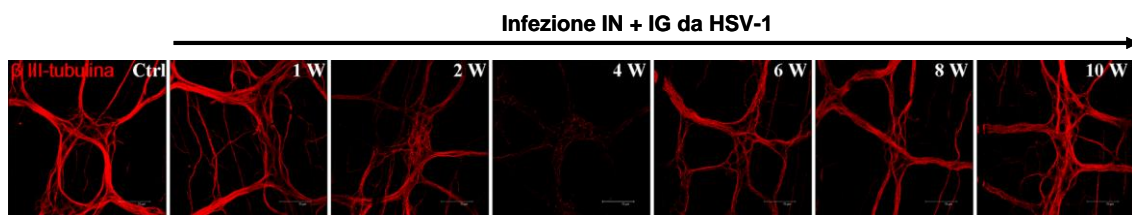


Figura 8. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La fluorescenza in rosso rappresenta le fibre neuronali β III-tubulina positive. Barra=75 μ m.

L'espressione della β III-tubulina si è dimostrata alterata in quasi tutti i tempi dell'infezione. Infatti, come emerge dalla Figura 10B, i livelli della proteina sono risultati modificati del -25% a 1 W, del -76% a 4 W, del -71% a 6 W, del -27% a 8 W e del +25% a 10 W rispetto ai livelli nei topi Ctrl.

La proteina gliale S100 β è risultata significativamente alterata in tutti i tempi di infezione con HSV-1, rispettivamente del -33% a 1 W, del +11% a 2 W, del -20% a 4 W, del -51% a 6 W, del -75% a 8 W e del +33% a 10 W (Figura 10C). Infine, l'indagine eseguita sull'espressione della proteina GFAP ha dimostrato una significativa sovraespressione durante quasi tutto il decorso dell'infezione. Infatti, l'espressione è

aumentata del +60% a 1 W, del +103% a 2 W, del +63% a 6 W, del +148% a 8 W e del +187% a 10 W (Figura 10D). Alla luce di questi risultati, la presenza del virus nel SNE determina alterazioni nell'espressione di proteine strutturali neuronali e gliali (periferina, β III-tubulina e GFAP), nonché di proteine gliali coinvolte nell'omeostasi cellulare (S100 β).

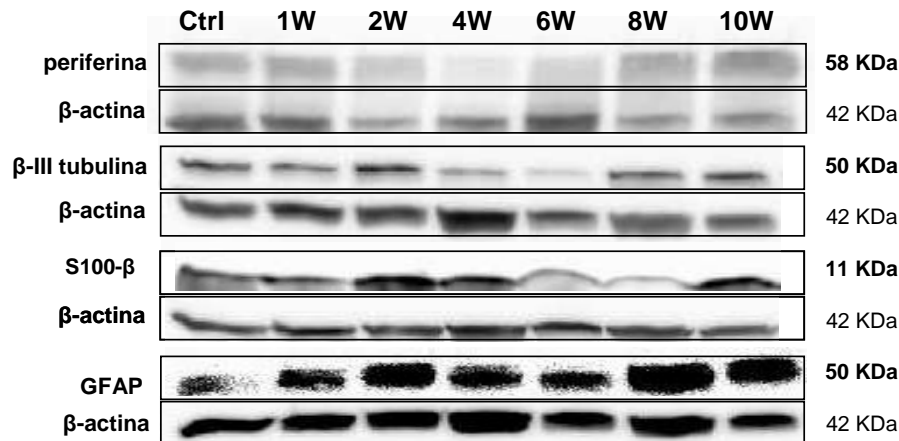
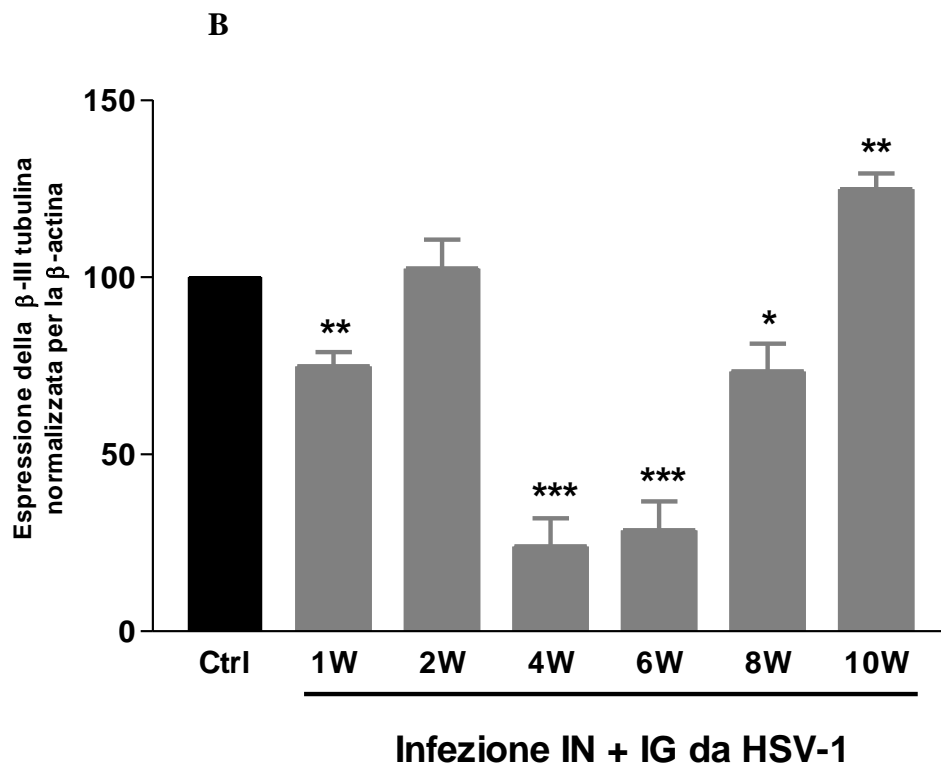
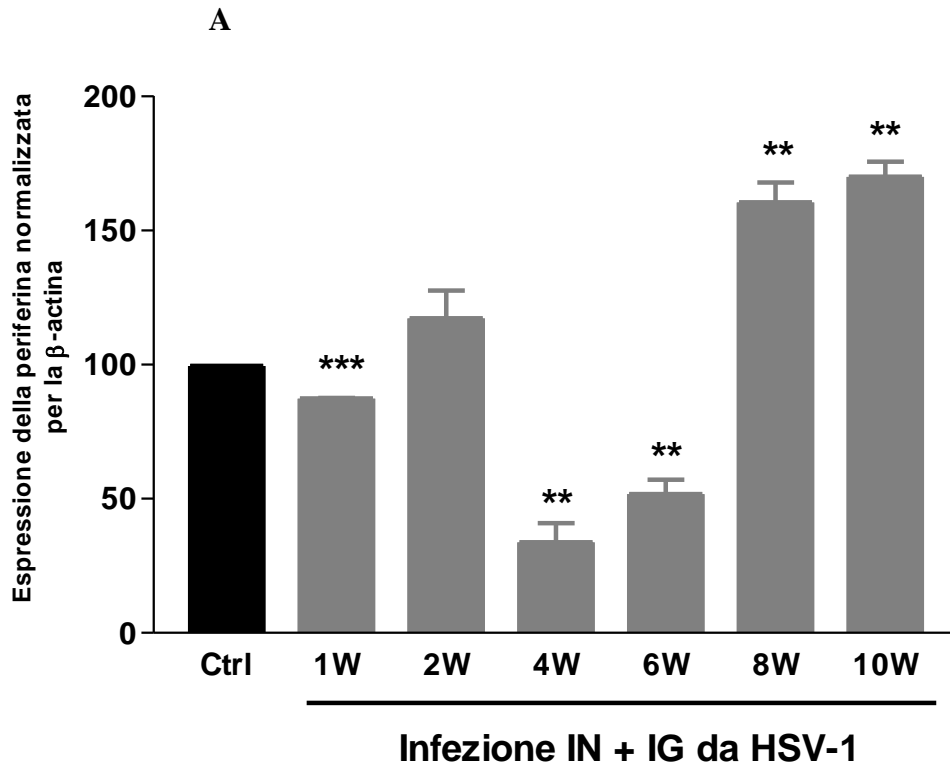


Figura 9. Analisi in WB delle specifiche proteine neuronali periferina e β III-tubulina e di quelle gliali S100 β e GFAP. Le proteine sono state estratte da LMMP di topi (n=4) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La β -actina è stata utilizzata come proteina di riferimento.

4.1.3 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul sistema nitrgico

Ad oggi, è ormai noto che in seguito ad un determinato danno e/o ad alterazioni funzionali del tratto gastrointestinale la plasticità dei neuroni enterici risulta essere un meccanismo di risposta adattativa (Lomax et al., 2005). Questo processo così complesso, oltre a coinvolgere riarrangiamenti strutturali determina anche alterazioni dell'eccitabilità neuronale e dell'espressione di neurotrasmettitori (Ekblad and Bauer, 2004). Per questo motivo, in questa serie di esperimenti, si è andati a valutare gli effetti dell'infezione sul sistema nitrgico mettendo in evidenza i neuroni immunoreattivi per l'enzima nNOS in preparazioni WM di LMMP di topi Ctrl e di topi infettati con doppio inoculo di HSV-1 da 1 a 10 W (Figura 11). Al fine di determinare nel decorso dell'infezione eventuali alterazioni della densità di cellule neuronali immunopositive per l'nNOS, le immagini dei gangli mienterici sono state in seguito sottoposte ad analisi quantitativa (Figura 12). Dall'indagine, come si può osservare in Figura 11, è emerso che l'immunopositività all'enzima nNOS è aumentata in quasi tutti i tempi di infezione con HSV-1 ad eccezione della quarta settimana, mentre l'indagine quantitativa ha rilevato un incremento significativo del numero di neuroni nNOS-positivi a 1 W (+58%), a 6 W (+41%) e a 8 W (+100%) (Figura 12).

Per approfondire ulteriormente questa indagine, è stato deciso di valutare dal punto di vista quantitativo l'espressione dell'enzima nNOS in estratti proteici derivati da LMMP di animali Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W (Figura 13A). L'espressione dell'enzima è risultata ridotta in maniera significativa a 1 W (-24%), a 4 W (-27%) e a 6 W (-33%), mentre è aumentata significativamente a 8 W (+24%) e a 10 W (+19%) (Figura 13B).



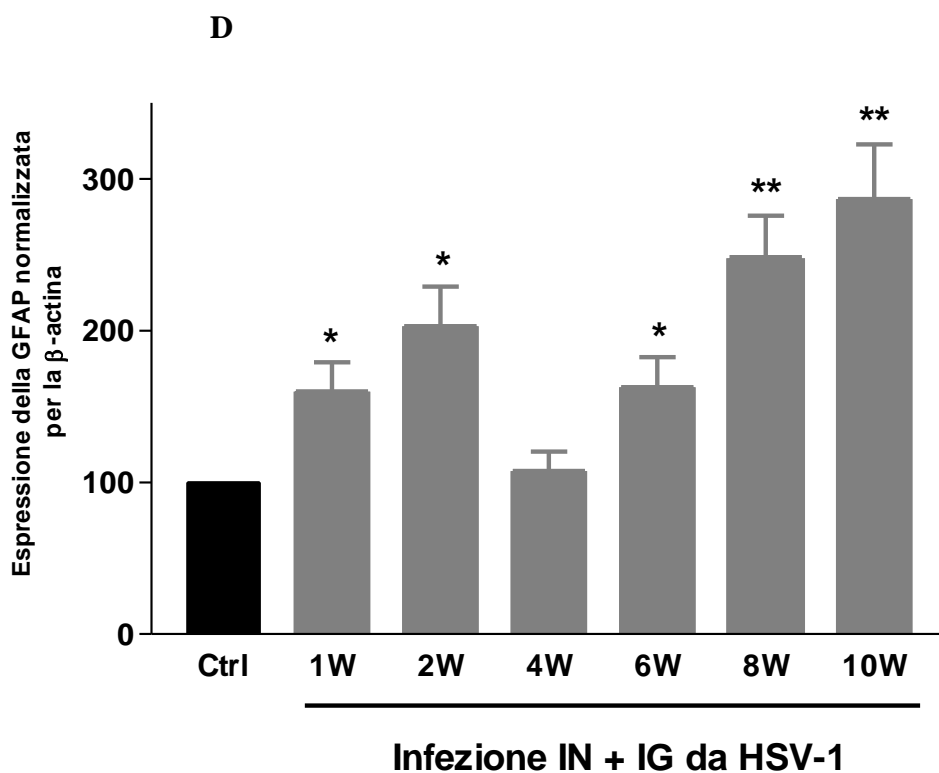
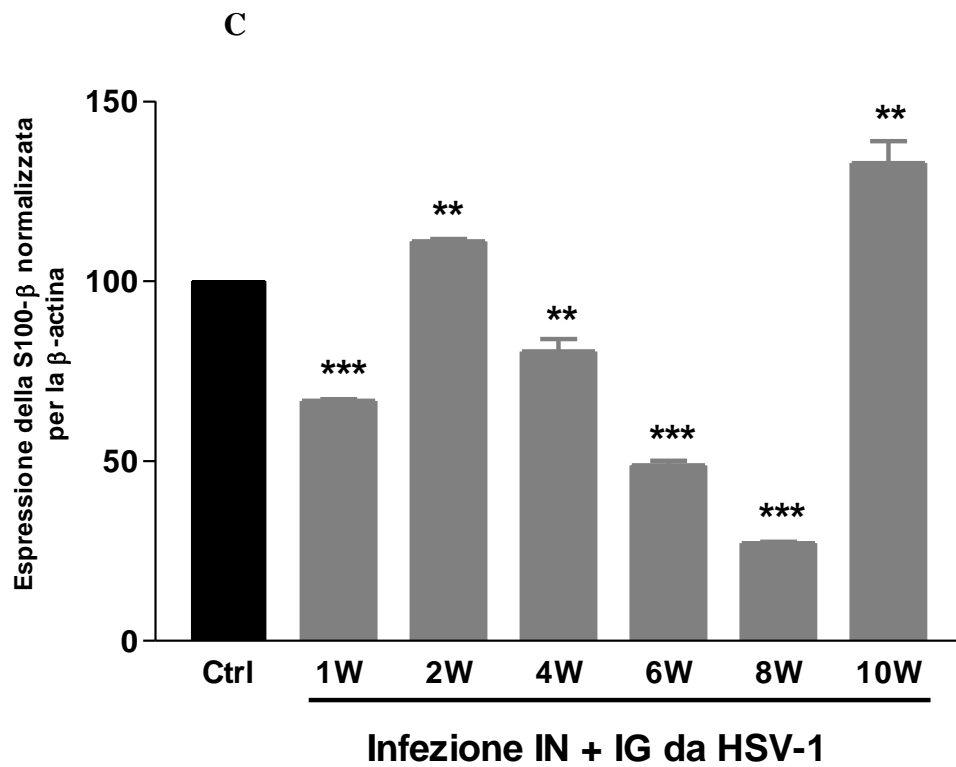


Figura 10. Espressione in percentuale di periferina (A), β III-tubulina (B), S100 β (C) e GFAP (D) durante l'infezione con HSV-1 da 1 a 10 W. I dati sono stati espressi come rapporto densitometrico della proteina indicata rispetto alla relativa β -actina in unità arbitrarie. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs Ctrl.

4.1.4 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul sistema colinergico

La neurotrasmissione colinergica rappresenta una delle principali vie di neurotrasmissione eccitatoria nell'intestino (Harrington et al., 2010). Al fine di valutare se l'infezione in vivo con HSV-1 sia in grado di alterare anche questa via di segnale, è stata studiata la distribuzione di AChE e ChAT, due principali enzimi coinvolti nel metabolismo dell'acetilcolina in preparati WM di LMMP di topi Ctrl e infettati da 1 a 10 W con doppio inoculo di HSV-1.

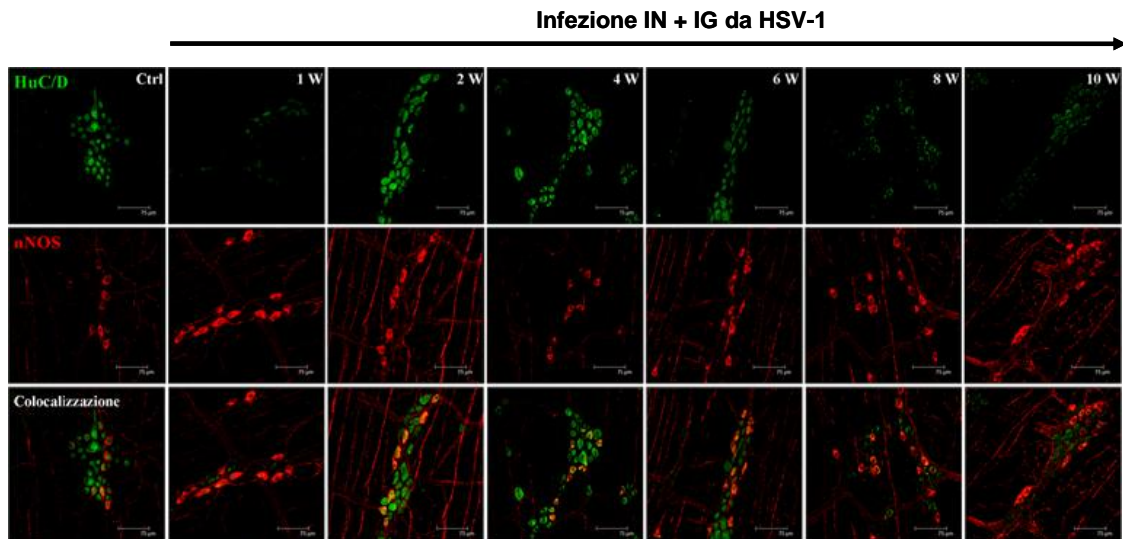


Figura 11. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi, mentre la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali nNOS positivi. Barra=75 μm .

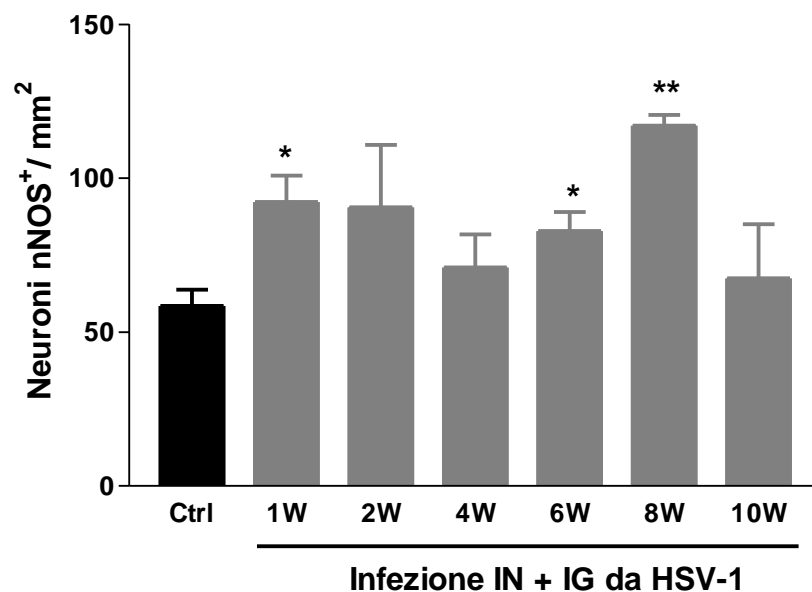


Figura 12. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla densità dei neuroni nNOS positivi in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs Ctrl.

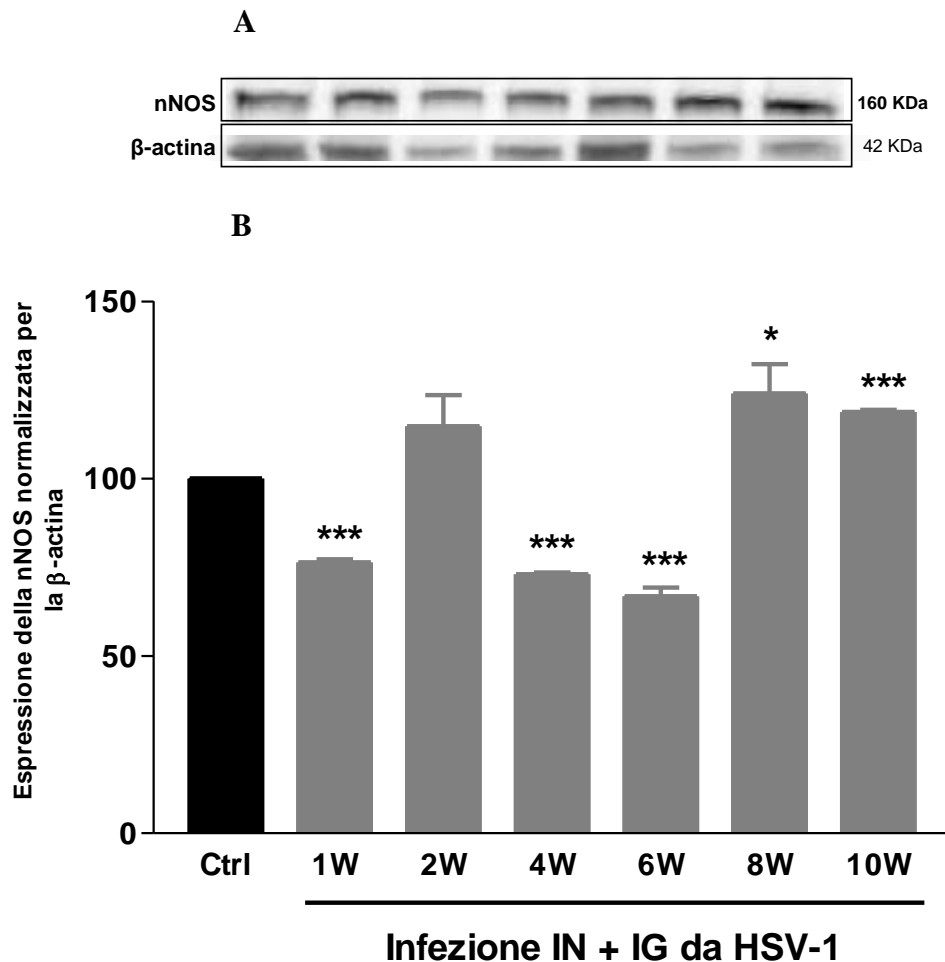


Figura 13. A. Analisi di western blot per l'enzima nNOS costitutivamente espresso dai neuroni nitroergici. La proteina è stata estratta da LMMP di topi (n=3) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La β-actina è stata utilizzata come proteina di riferimento. **B.** Espressione in percentuale di nNOS durante l'infezione con HSV-1 da 1 a 10W. I dati sono stati espressi come rapporto densitometrico di nNOS rispetto alla relativa β-actina in unità arbitrarie. *P<0,05, ***P<0,001 vs Ctrl.

Come si può vedere in Figura 14 ed in Figura 15, la densità delle fibre colinergiche AChE-positive è risultata significativamente ridotta a 1, 8 e 10 W, rispettivamente del 58%, 30% e 35% rispetto al Ctrl.

L'espressione di ChAT (Figura 16A), enzima coinvolto nella sintesi intracellulare di ACh, è risultata aumentare in maniera significativa durante tutto il decorso dell'infezione (72% a 1 W, 84% a 2 W, 215% a 4 W, 208% a 6 W, 473% a 8 W e 306% a 10 W; Figura 16B), a suggerire un meccanismo compensatorio utile probabilmente a bilanciare il deficit di AChE.

4.1.5 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla trasmissione VIPergica e tachichinergica

I neuropeptidi intestinali come SP e VIP sono stati descritti in letteratura come delle molecole importanti coinvolte nell'ipersensibilità viscerale (Gross and Pothoulakis, 2007).

Al fine di evidenziare ulteriormente il ruolo dell'infezione da HSV-1 nella neurotrasmissione enterica, in preparati WM di LMMP di topi Ctrl e infettati con doppio inoculo di HSV-1 si è andati a valutare il fenotipo VIPergico e tachichinergico. L'indagine qualitativa condotta sui gangli mienterici ha rilevato un'aumentata immunoreattività al VIP (Figura 17) durante il decorso dell'infezione, mentre l'immunopositività della SP (Figura 18) è incrementata a partire dalla seconda settimana di infezione IG con HSV-1.



Figura 14. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio ottico della distribuzione dell'enzima AChE in preparazioni whole-mount di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. Barra=100 μ m.

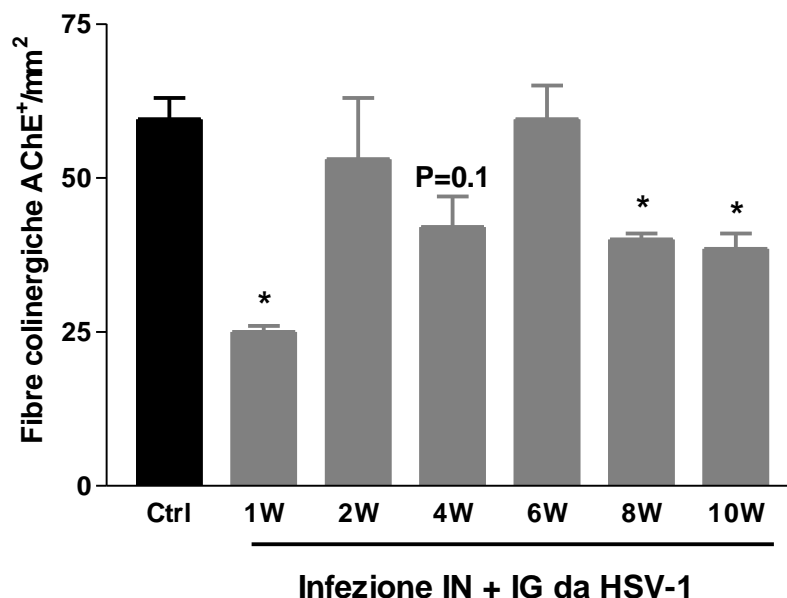


Figura 15. Analisi densitometrica delle fibre colinergiche AChE-positivo. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla distribuzione dell'enzima AChE nelle preparazioni WM di LMMP di animali ($n \geq 3$) Ctrl e infettati da 1 a 10 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 3). * $P < 0,05$ vs Ctrl.

4.1.6 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla contrattilità intestinale

La risposta dei preparati di ileo a EFS è stata studiata per chiarire eventuali alterazioni funzionali del SNE. Precedenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le contrazioni evocate nell'intervallo di frequenze da 1 a 40 Hz risultano essere primariamente di origine neuronale essendo abolite dal pretrattamento con tetrodotossina 1 μ M. Inoltre, fino alla frequenza di 20 Hz, tali contrazioni risultano essere prevalentemente di origine colinergica, essendo completamente abolite da pretrattamento con atropina 1 μ M, antagonista muscarinico non selettivo (Zoppellaro, 2010).

L'EFS alla frequenza di 20 Hz ha indotto nei preparati di ileo una significativa riduzione della contrattilità a 1, 4, 8 e 10 W dall'infezione con HSV-1 rispetto a quella sviluppata dai segmenti di ileo prelevati da topi Ctrl (Figura 19), a suggerire che le alterazioni morfologiche e molecolari finora evidenziate sono accompagnate da un'anomala neurotrasmissione colinergica.

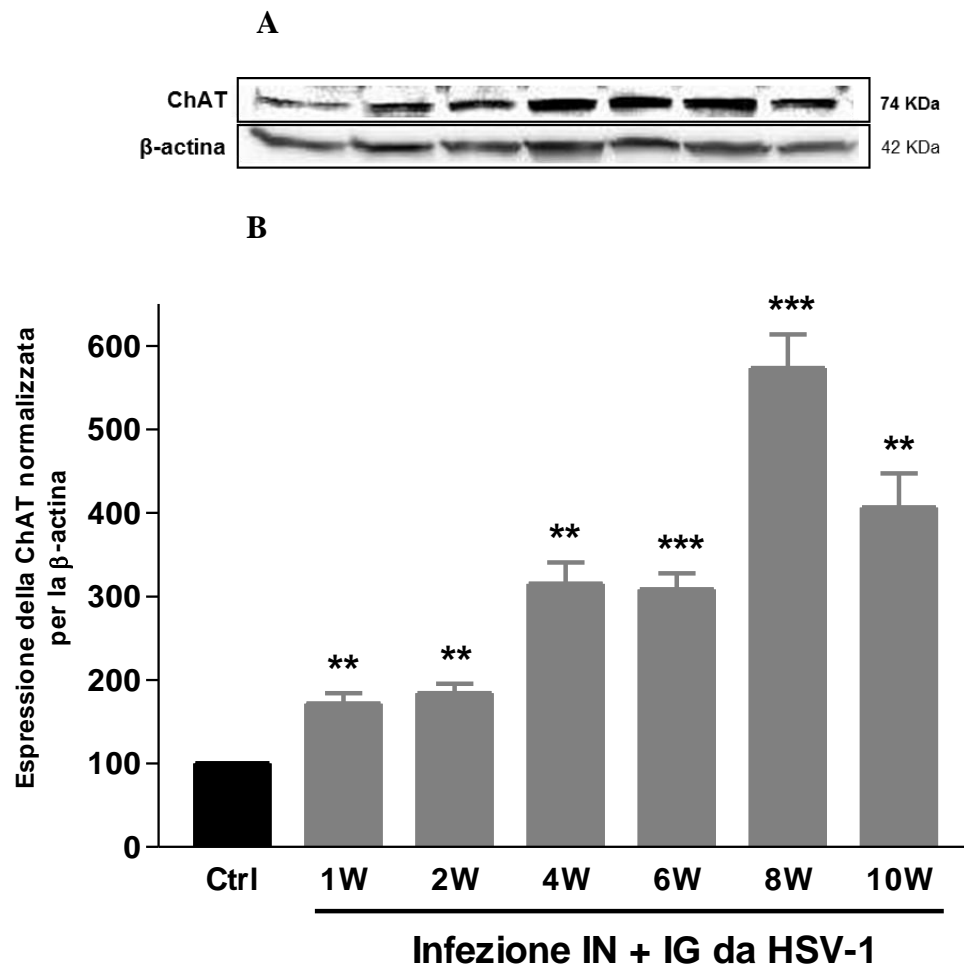


Figura 16. A. Analisi di western blot per l'enzima ChAT. La proteina è stata estratta da LMMP di topi (n=3) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La β -actina è stata utilizzata come proteina di riferimento. **B.** Espressione in percentuale di ChAT durante l'infezione con HSV-1 da 1 a 10 W. I dati sono stati espressi come rapporto densitometrico di ChAT rispetto alla relativa β -actina in unità arbitrarie. **P<0,01, ***P<0,001 vs Ctrl.

4.2 Caratterizzazione delle colture tissutali derivate da LMMP

Le colture tissutali derivate da LMMP sono state caratterizzate tramite microscopia ottica e confocale. Come si può osservare in Figura 20A, queste sono costituite dalla presenza di agglomerati simili ai gangli mienterici, rappresentati da cellule neuronali e gliali, che formano una rete circondata da cellule muscolari lisce.

Dopo 3 giorni dalla messa in coltura, le cellule sono state caratterizzate con analisi ICC a fluorescenza utilizzando dei specifici marcatori cellulari. Le cellule neuronali sono state identificate con anticorpi anti-HuC/D (Figura 20C) e anti-periferina (Figura 20E-F), mentre le cellule gliali, con anti-GFAP (Figura 20B-F) e anti-S100 β (Figura 20C-G).

Accanto a queste cellule si osserva la presenza di un'altra popolazione cellulare, positiva all' α -SMA, che corrisponde alle cellule muscolari lisce (Figura 20D).

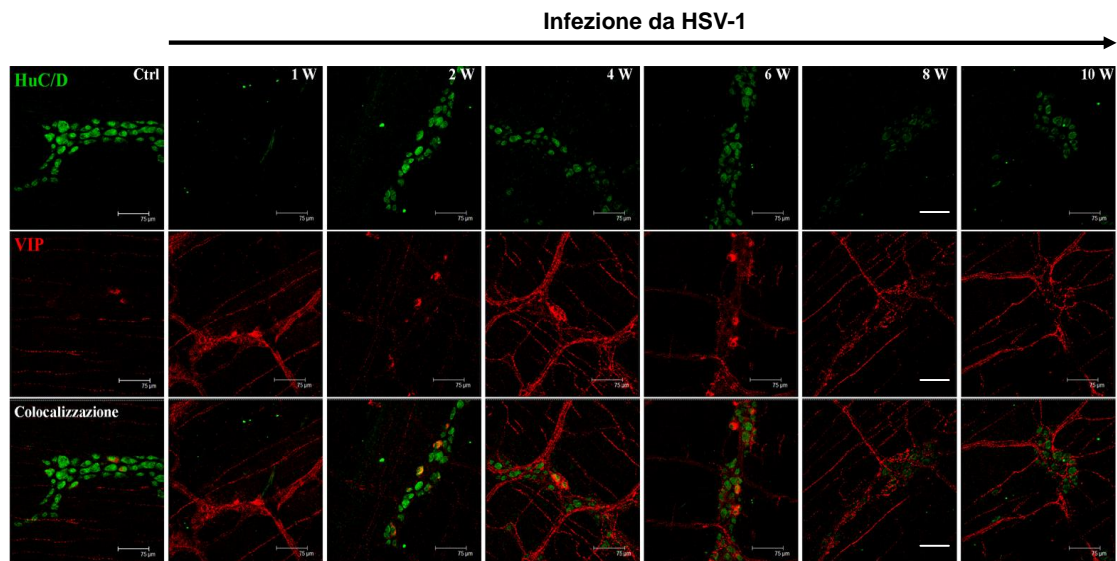


Figura 17. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi, mentre quella in rosso è relativa ai corpi cellulari e alle fibre neuronali VIP positivi anti-VIP. Barra=75 μ m.

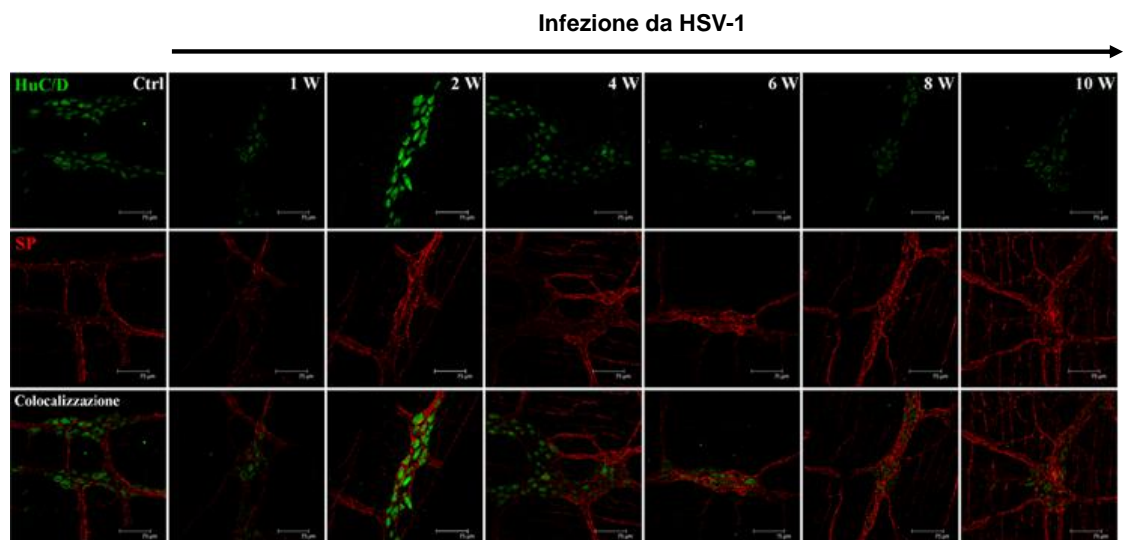


Figura 18. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 da 1 a 10 W. La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi, mentre quella in rosso è relativa ai corpi cellulari e alle fibre neuronali SP positivi. Barra=75 μ m.

4.2.1 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul rilascio in vitro di [3 H]-ACh in colture tissutali derivate da LMMP

Per approfondire ulteriormente l'effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul sistema colinergico, si sono utilizzate le colture tissutali derivate da LMMP di topi Ctrl ed

esposti all'infezione virale da 1 a 10 W con l'obiettivo di determinare se le anomalie funzionali potessero dipendere da un alterato rilascio di acetilcolina.

Si è scelto quindi di utilizzare le colture al terzo giorno dalla semina perché a questo tempo si ottengono cellule neuronali completamente vitali con una crescita di cellule gliali e muscolari lisce ancora contenuta. Il pretrattamento con il precursore [metil-³H]-colina e il successivo stimolo di depolarizzazione con KCl 60 mM ha così permesso di valutare il rilascio di ACh in vitro (Figura 21).

Il rilascio di [³H]-ACh nelle colture derivate da topi infettati con HSV-1 a 2 W (-74%), a 4 W (-82%) e a 8 W (-58%) è risultato significativamente ridotto rispetto alle colture derivate da animali Ctrl.

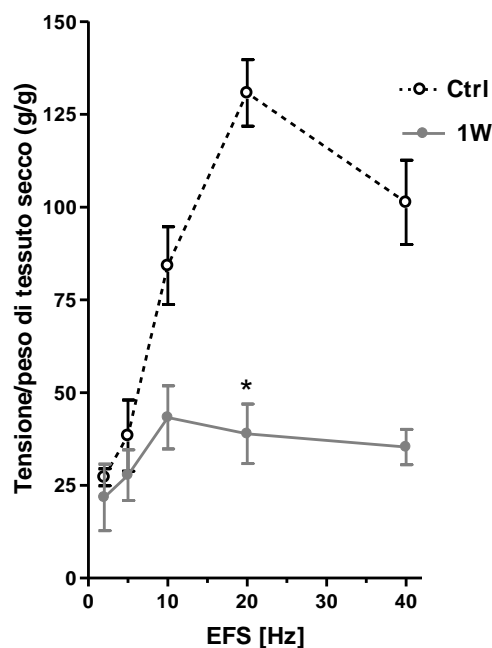
4.2.2 Effetto dell'infezione in vitro con HSV-1 sull'espressione di fattori neurotrofici in colture tissutali di LMMP

Dopo aver stabilito la presenza di evidenti alterazioni morfologiche, neurochimiche e funzionali causate dal HSV-1, l'attenzione si è focalizzata nello studio in vitro dell'espressione di fattori neurotrofici di cui è noto il coinvolgimento nella sopravvivenza neuronale.

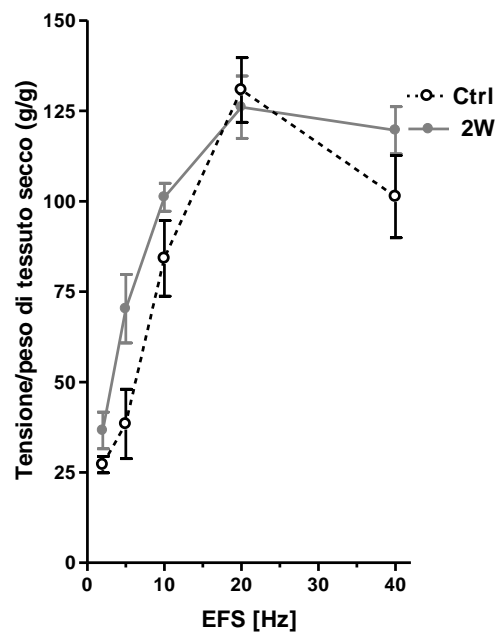
Si è deciso di indagare l'espressione dei fattori neurotrofici NGF, NT-3, NT-5 e CNTF, in colture tissutali derivate da LMMP dopo 24 ore di infezione in vitro con HSV-1 (Figura 22).

L'infezione in vitro con HSV-1 ha determinato un incremento di NT-5 di circa 10² volte superiore rispetto alle co-culture non sottoposte all'infezione virale (Figura 22C), mentre l'espressione del CNTF è aumentata di circa 5 volte (Figura 22D). Non è stata osservata invece alcuna variazione nell'espressione del NGF e NT-3 in seguito alle 24 ore di infezione in vitro con HSV-1 (Figura 22A/B).

A



B



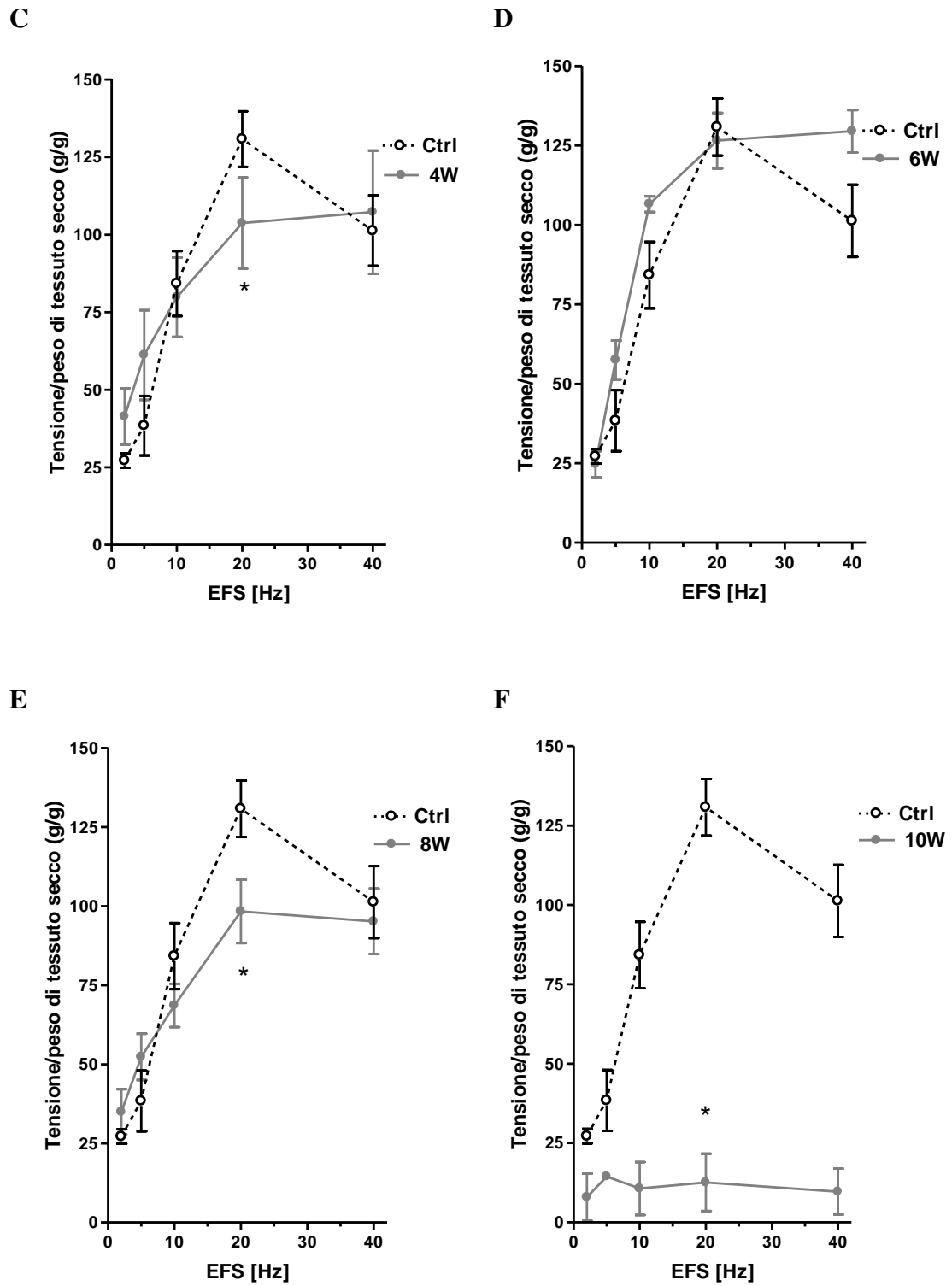


Figura 19. Effetto della stimolazione elettrica a frequenze crescenti (da 1 a 40 Hz; 40V) in preparati di ileo prelevati da topi ($n \geq 4$) Ctrl ed infettati con HSV-1 a 1 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D), 8 (E) e 10 W (F). * $P < 0,05$ vs Ctrl.

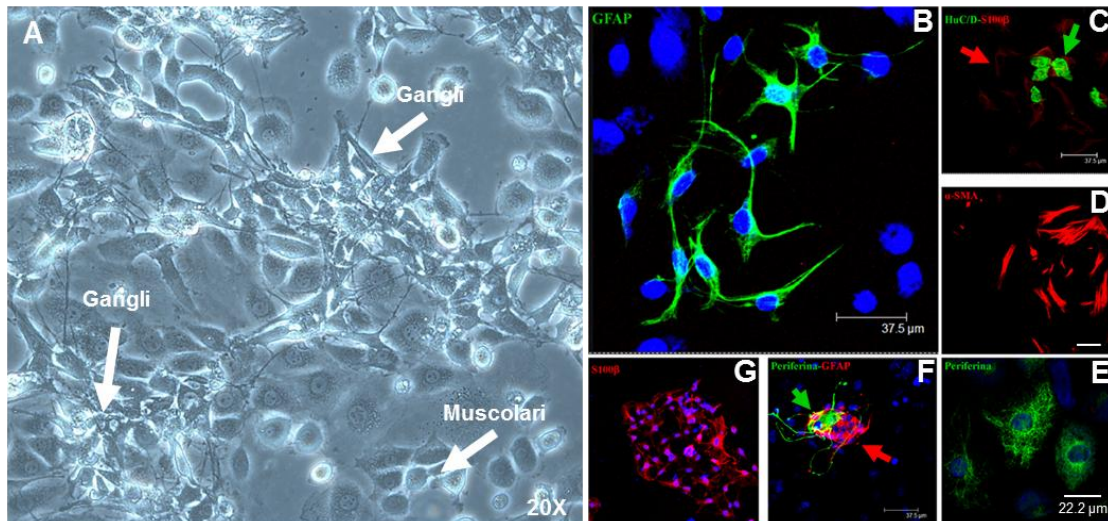


Figura 20. Modello di coltura tissutale derivata da LMMP. **A.** Immagine di coltura cellulare mista (gangli: neuroni e glia; cellule muscolari lisce) ottenuta mediante microscopio ottico (ingrandimento 20X). **B.** Cellule gliali GFAP positive. Barra=37,5 μ m. **C.** Cellule neuronali HuD positive (in verde) e cellule gliali S100 β positive (in rosso). Barra=37,5 μ m. **D.** Cellule muscolari lisce α -SMA positive. Barra=37,5 μ m. **E.** Cellule neuronali periferina positive. Barra=22,2 μ m. **F.** Gangli mienterici contenenti cellule neuronali periferina positive (in verde) e cellule gliale GFAP positive (in rosso). Barra=37,5 μ m. **G.** Cellule gliali S100 β positive. Nei pannelli B, E, F, G la fluorescenza in blu rappresenta i nuclei marcati con il colorante nucleare Toto[®]-3. Le immagini B, C, D, E, F, G sono state ottenute mediante l'utilizzo del microscopio confocale.

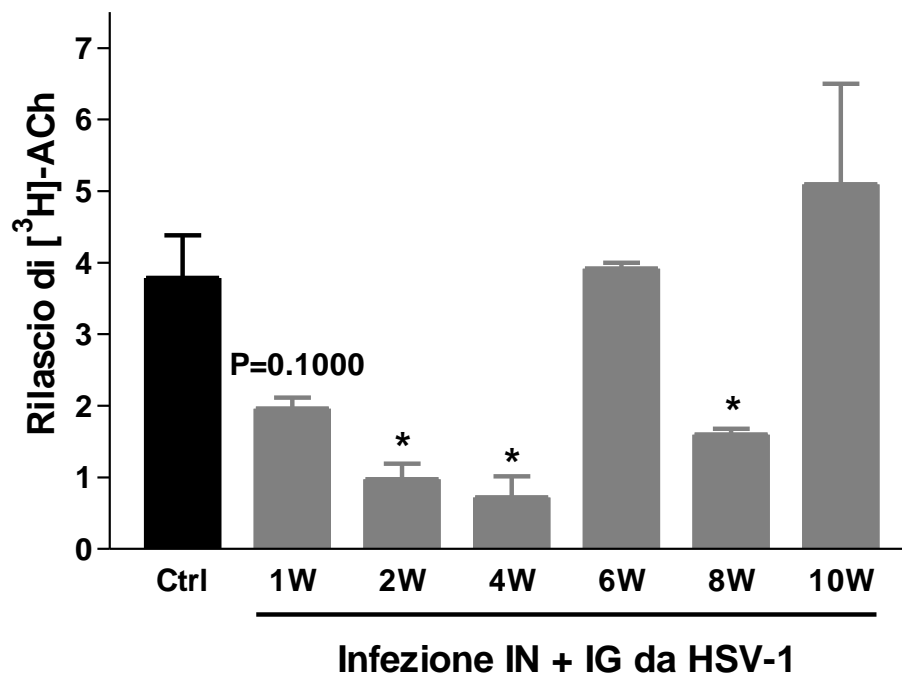


Figura 21. Rilascio di ACh triziata in colture tissutali di LMMP di ileo di topi ($n \geq 4$) Ctrl e infettati in vivo con HSV-1 da 1 a 10W. * $P < 0,05$ vs Ctrl.

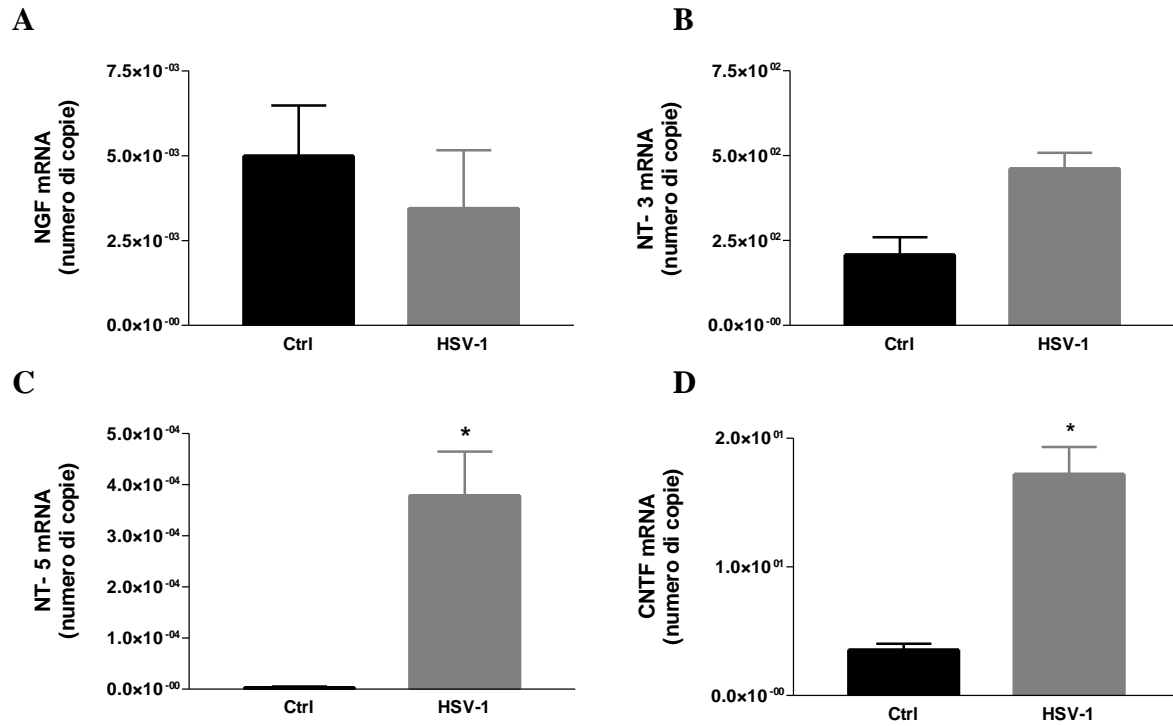


Figura 22. Analisi quantitativa in RT-PCR dell'mRNA dei fattori neurotrofici NGF (A), NT-3 (B), NT-5 (C) e CNTF (D). L'mRNA totale è stato estratto da colture cellulari (n=6) derivate da LMMP di topi (n=6) Ctrl e infettati in vitro con HSV-1. I dati riportati sono il risultato del rapporto tra i livelli di espressione dei geni che codificano per i fattori neurotrofici e i livelli di espressione del gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), impiegato come gene house-keeping. *P<0,05 vs Ctrl.

4.3 Ruolo della replicazione virale nelle alterazioni del SNE

4.3.1 Effetto dell'infezione in vivo con ICP27 KO sulla morfologia dei gangli mienterici del SNE

Indagini molecolari condotte presso il laboratorio del Prof. Castagliuolo del Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Padova sulla LMMP degli animali infettati in vivo con HSV-1 hanno dimostrato la presenza di trascritti virali associati alla latenza (LATs) a partire dalla prima settimana di infezione e la comparsa di trascritti dei geni immediatamente precoci (ICP4) e dei geni tardivi (VIP16 e gC) dalla sesta settimana di infezione con HSV-1, a suggerire che il virus, in questa fase, è in grado di attivare dei meccanismi associati alla replicazione virale. Alla luce di questi risultati si è voluto indagare il ruolo della replicazione virale nelle alterazioni fenotipiche e funzionali del SNE attraverso l'infezione in vivo degli animali con inoculo di un ceppo di HSV-1 delecto del gene immediatamente precoce ICP27 (ICP27 KO), essenziale per la replicazione virale poiché in grado di regolare la transattivazione di geni virali essenziali già nelle fasi iniziali della replicazione e quindi in grado di bloccare la formazione di una progenie virale (Uprichard and Knipe, 1996). Al fine di approfondire il ruolo della replicazione virale nell'insorgenza della neurodisfunzione del SNE, in questa serie di esperimenti sono stati impiegati topi trattati con doppio inoculo di ICP27 KO ad 1 e 8 W, intervalli di tempo dove l'infezione con HSV-1 determina significative alterazioni morfologiche, neurochimiche e funzionali del SNE, come dimostrato dai precedenti esperimenti.

La morfologia dei gangli mienterici dei topi infettati con doppio inoculo di ICP27 KO, analizzata mediante la marcatura dei neuroni con anti-HuC/D e della glia con anti-S100 β , è risultata paragonabile a quella riscontrata negli animali Ctrl (Figura 23B), a suggerire il coinvolgimento della replicazione virale nelle alterazioni strutturali dei gangli mienterici in seguito ad infezione con HSV-1 (Figura 23A). Tuttavia, a 1 W dall'infezione con ICP27 KO, l'immunoreattività del marcatore HuC/D è apparsa ridotta mentre a 8 W è ritornata a livelli paragonabili a quelli del Ctrl (Figura 23B). Come si può osservare dal grafico in Figura 24B, la densità delle cellule neuronali HuC/D positive è risultata significativamente ridotta a 1 W (-44%) dall'infezione con doppio inoculo di ICP27 KO. Questo dato ha messo in evidenza un comportamento simile di entrambi i virus nella prima fase di infezione mentre, nella fase tardiva, l'infezione con HSV-1 e con ICP27 KO ha determinato due effetti contrapposti, rispettivamente, una riduzione del 36% ed un aumento del 60% rispetto al Ctrl (Figura 24A/B). Come si può osservare in Figura 23B, l'infezione con ICP27 KO, diversamente dall'infezione con HSV-1, non ha riportato un'alterazione della densità delle cellule gliali S100 β positive (Figura 25A e B).

L'aspetto irregolare e frammentato della distribuzione disomogenea della periferina osservato nei gangli mienterici dei topi infettati con HSV-1, in modo particolare a 8 W, non è stato riscontrato nel plesso mienterico degli animali infettati con doppio inoculo di ICP27 KO a 1 e 8 W (Figura 26A e B), ad indicare che tali alterazioni derivano da meccanismi coinvolti nella replicazione virale.

4.3.2 Effetto dell'infezione in vivo con ICP27 KO sulle alterazioni del fenotipo neurochimico del SNE

L'infezione del SNE con HSV-1, potenzialmente in grado di passare dallo stato di

latenza a quello replicativo, ha dimostrato finora non solo di alterare la morfologia dei gangli mienterici, ma anche il fenotipo neurochimico durante il decorso dell'infezione. L'infezione virale con ICP27 KO non ha determinato effetti sulla distribuzione dell'enzima nNOS e sul numero di neuroni nNOS positivi (Figura 27A e B e Figura 28A e B).

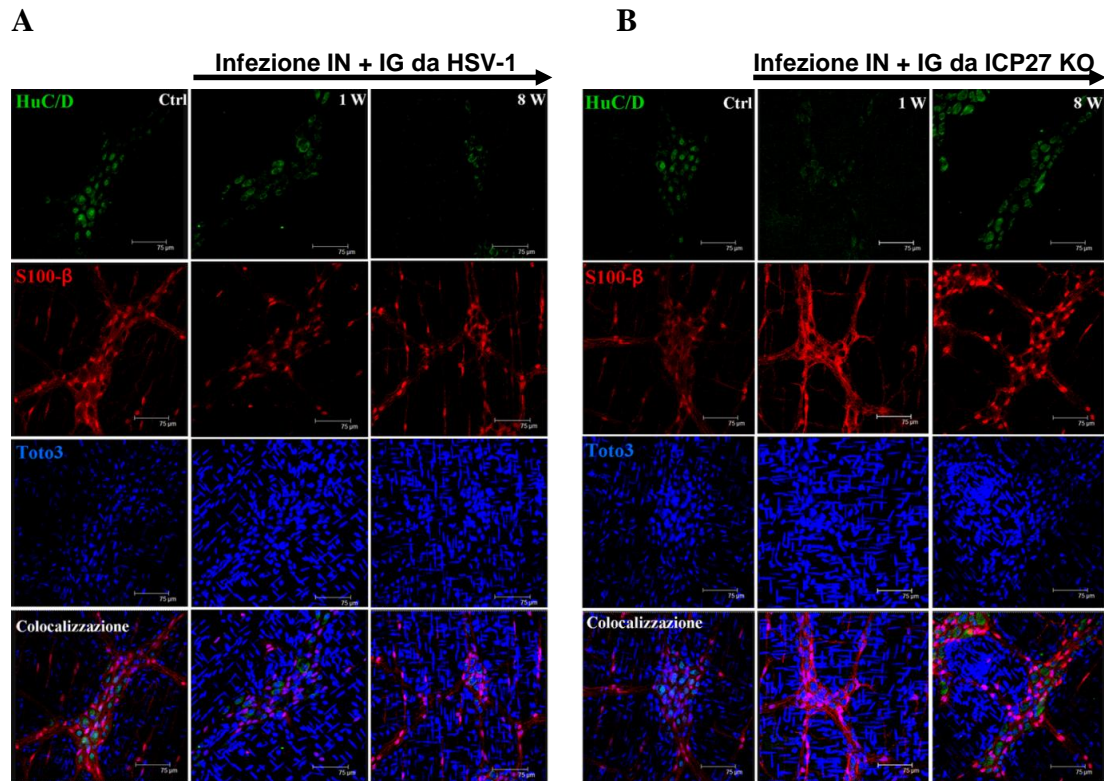


Figura 23. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 (A) o con ICP27 KO (B) a 1 e 8 W. I gangli mienterici sono stati marcati con anti-HuC/D (marcatore neuronale, in verde) e anti-S100 β (marcatore gliale, in rosso), Toto[®]-3 (marcatore nucleare, in blu). Barra=75 μ m.

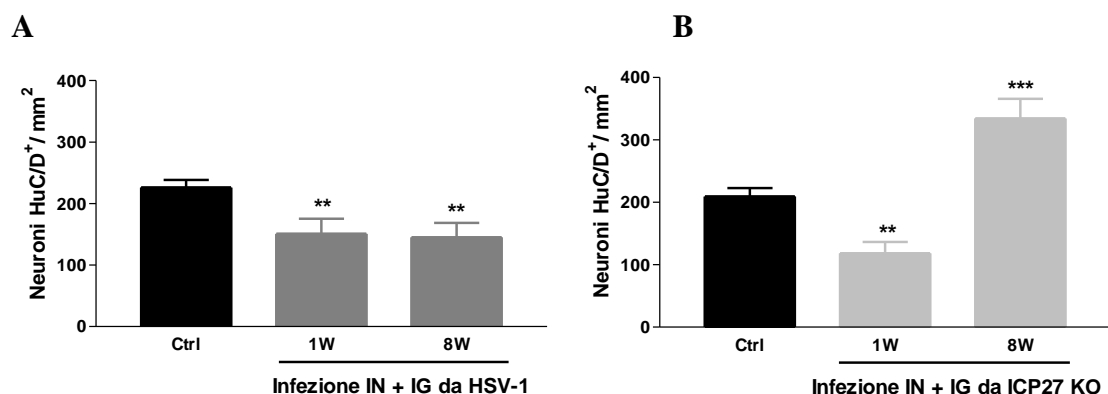


Figura 24. Effetti dell'infezione da HSV-1 (A) o da ICP27 KO (B) sulla densità delle cellule neuronali HuC/D positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$) Ctrl e infettati con HSV-1 o ICP27 KO a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni sezioni ≥ 5). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs Ctrl.

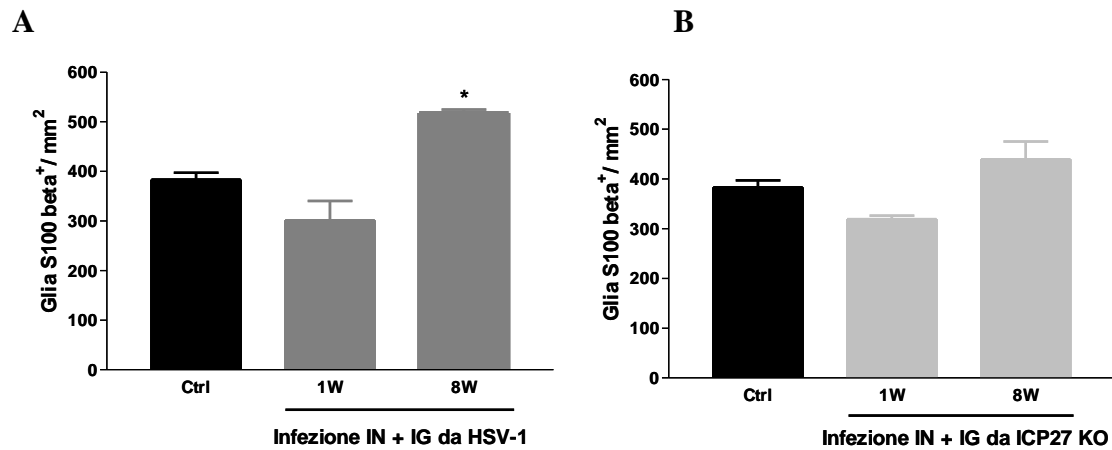


Figura 25. Effetti dell'infezione da HSV-1 (A) o da ICP27 KO (B) sulla densità delle cellule gliali S100β positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale) Ctrl e infettati con HSV-1 o ICP27 KO a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5). * $P < 0,05$ vs Ctrl.

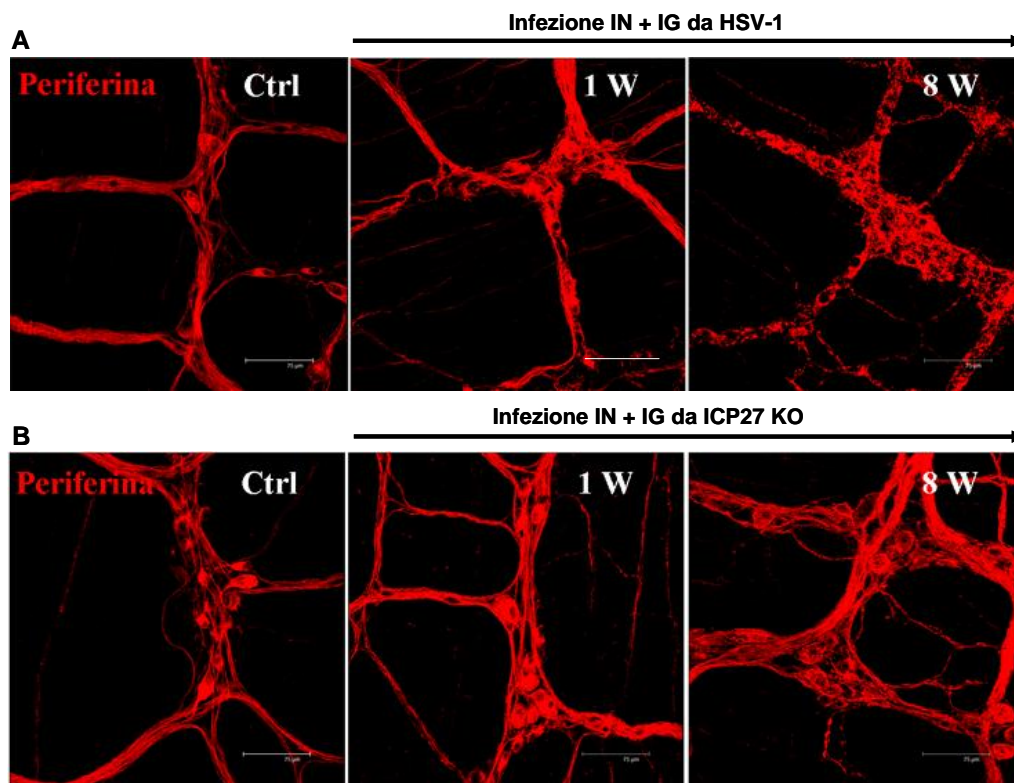


Figura 26. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale) Ctrl e infettati con HSV-1 (A) o con ICP27 KO (B) a 1 e 8 W. La fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali periferina positivi. Barra=75μm.

L'infezione del SNE con l'ICP27 KO ha evidenziato nel plesso mienterico una riduzione significativa della densità delle fibre colinergiche AChE positive del 35% ad 1W dall'infezione IG mentre, a 8W, contrariamente da quello che avviene nell'infezione con l'HSV-1, la distribuzione delle fibre colinergiche è ritornata paragonabile ai livelli del Ctrl (Figura 29A e B, Figura 30A e B).

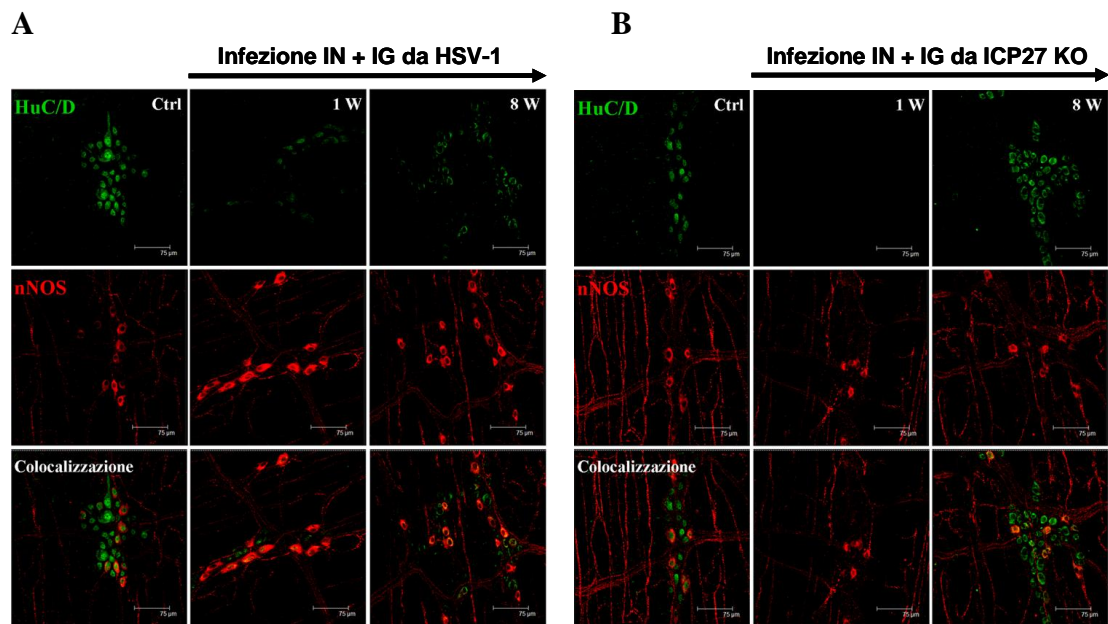


Figura 27. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale) Ctrl e infettati con HSV-1 (A) o con ICP27 KO (B) a 1 e 8 W. La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali HuC/D positivi, mentre la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali nNOS positivi. Barra=75µm.

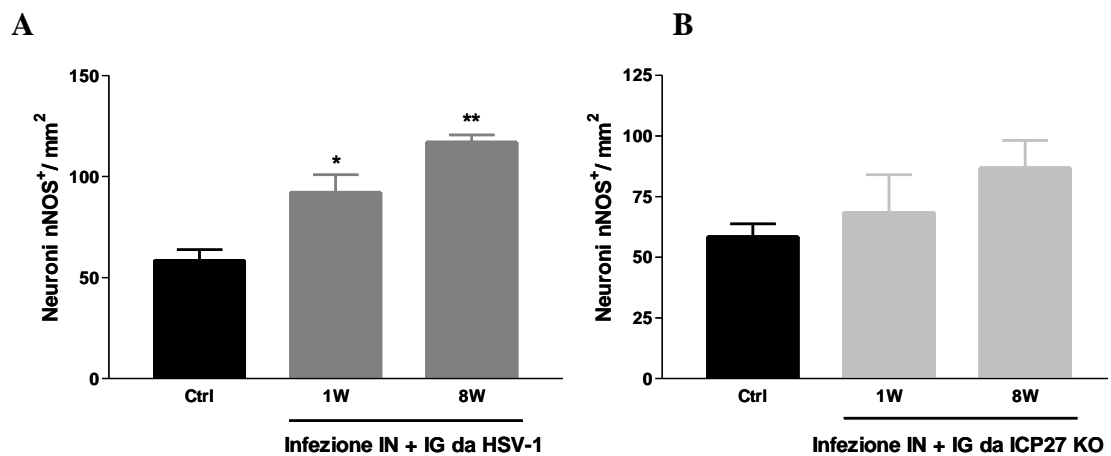


Figura 28. Effetti dell'infezione con HSV-1 (A) o con ICP27 KO (B) sulla densità delle cellule neuronali nNOS positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale) Ctrl e infettati con HSV-1 o ICP27 KO a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs Ctrl.

L'infezione enterica con ICP27 KO ha dimostrato un'aumentata immunoreattività al marcatore anti-VIP solamente a 8 W ed al marcatore anti-SP ad 1 W e 8 W dal trattamento con doppio inoculo (Figura 31 e 32), a suggerire un ruolo minore della replicazione virale nella alterazione fenotipica di questa via neurochimica.

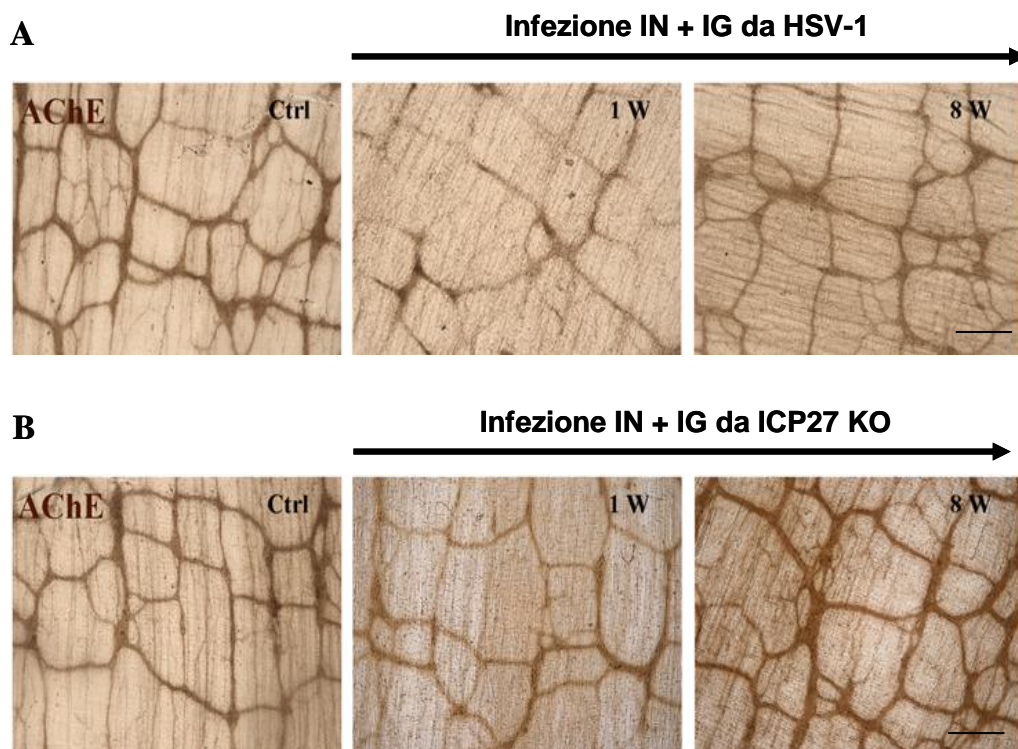


Figura 29. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio ottico della distribuzione dell'enzima AChE in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi Ctrl e infettati con HSV-1 (A) o ICP27 KO (B) a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). Barra=100 μ m.

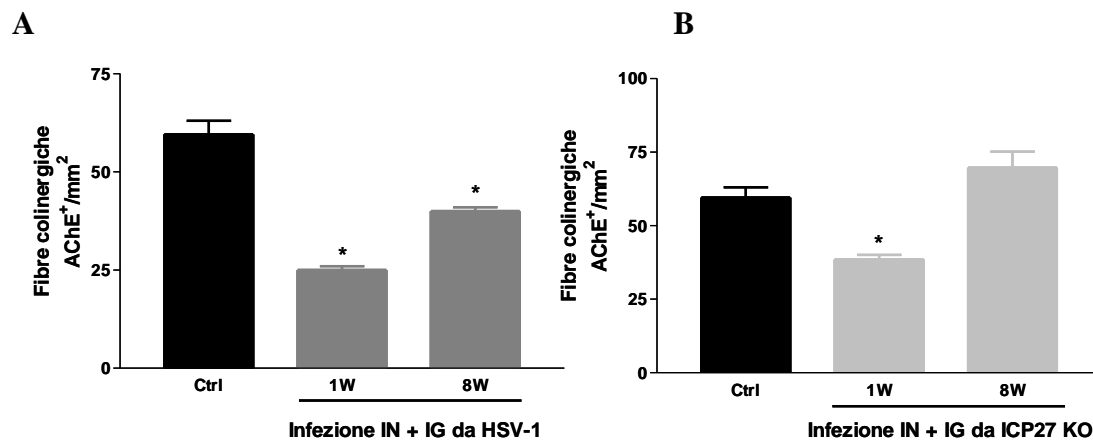


Figura 30. Densità delle fibre colinergiche AChE positive. Effetti dell'infezione da HSV-1 (A) o da ICP27 KO (B) nelle preparazioni WM di LMMP di animali ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale) Ctrl e infettati a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5). * $P < 0,05$ vs Ctrl.

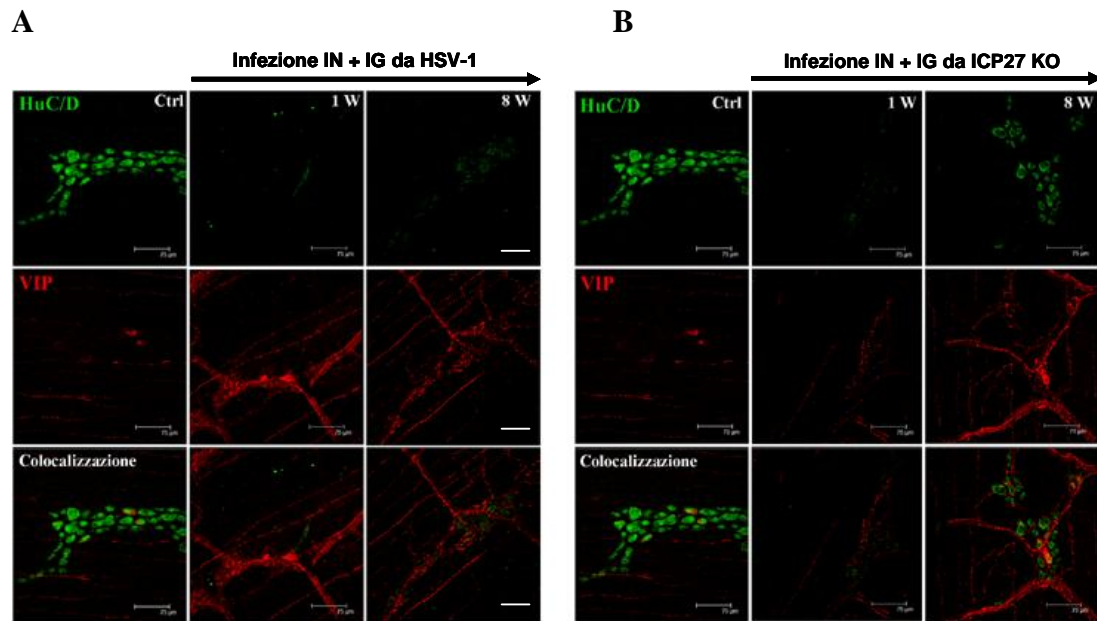


Figura 31. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi Ctrl e infettati con HSV-1 (**A**) o con ICP27 KO (**B**) a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi, mentre la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali VIP positivi. Barra=75 μ m.

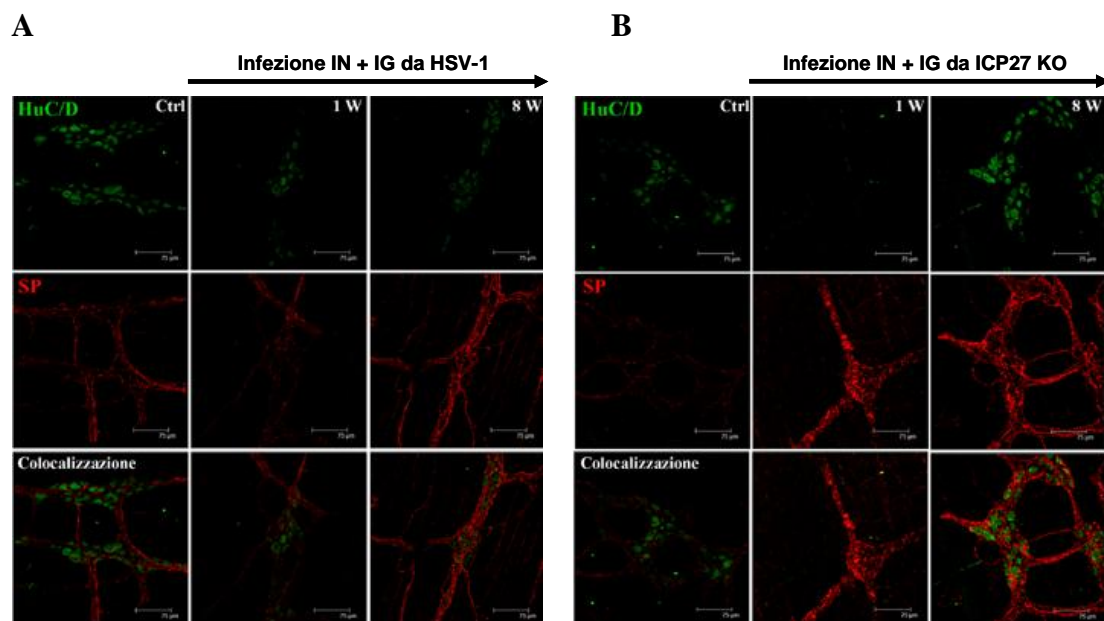


Figura 32. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi Ctrl e infettati con HSV-1 (**A**) o con ICP27 KO (**B**) a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi, mentre la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali SP positivi. Barra=75 μ m.

4.3.3 Ruolo della replicazione virale nelle alterazioni della contrattilità intestinale

Una volta dimostrato il coinvolgimento della replicazione virale nelle alterazioni morfologiche e neurochimiche del SNE, in modo particolare nella fase tardiva dell'infezione, è stato deciso di valutarne gli effetti sulla motilità intestinale.

La risposta dei preparati di ileo prelevati da topi infettati con ICP27 KO a EFS (1-40 Hz) ed in particolare allo stimolo di 20 Hz ha dimostrato una significativa riduzione della contrattilità solo a 1 W in maniera analoga a quanto osservato in presenza di infezione con HSV-1 allo stesso tempo di trattamento (Figura 33A e B).

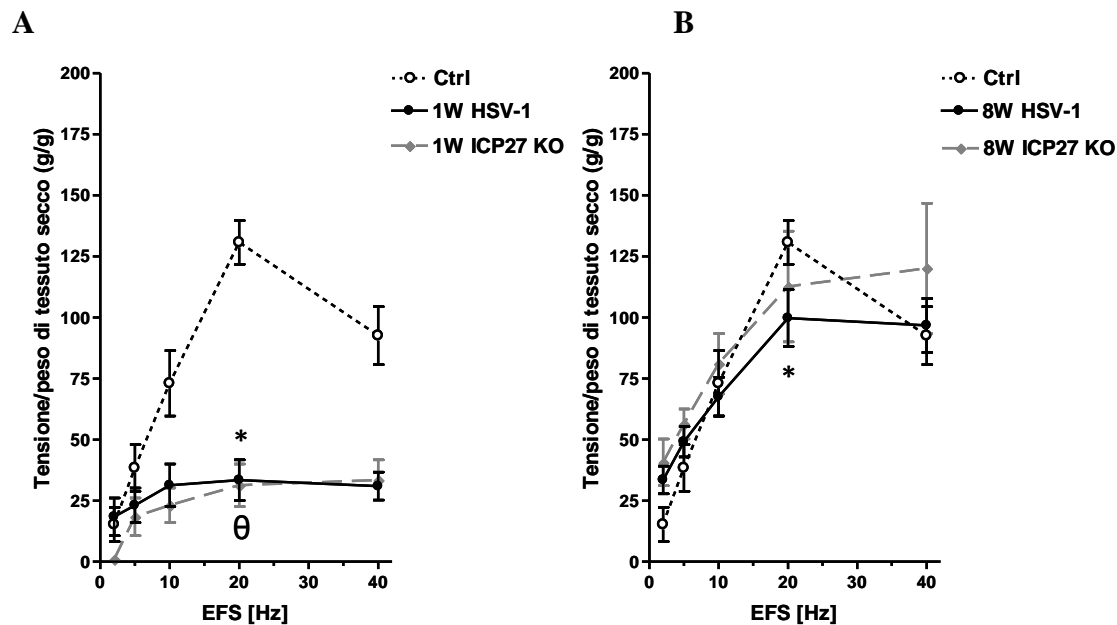


Figura 33. Effetto della stimolazione elettrica a frequenze crescenti (da 1 a 40 Hz; 40V) in preparati di ileo prelevati da topi infettati con HSV-1 o con ICP27 KO a 1 (A) e 8 W (B) ($n \geq 4$ per ogni gruppo sperimentale). * $P < 0,05$ (1W e 8W con HSV-1) vs Ctrl; ^o $P < 0,05$ (1W con ICP27 KO) vs Ctrl.

4.3.4 Ruolo della replicazione virale sull'espressione di fattori neurotrofici in colture tissutali di LMMP

L'infezione in vitro con ICP27 KO per 24 ore non ha prodotto variazioni nei livelli di espressione dei fattori neurotrofici in colture tissutali derivate da LMMP (Figura 34) come osservato in precedenza in seguito ad infezione delle cellule con HSV-1 (Figura 34C e D).

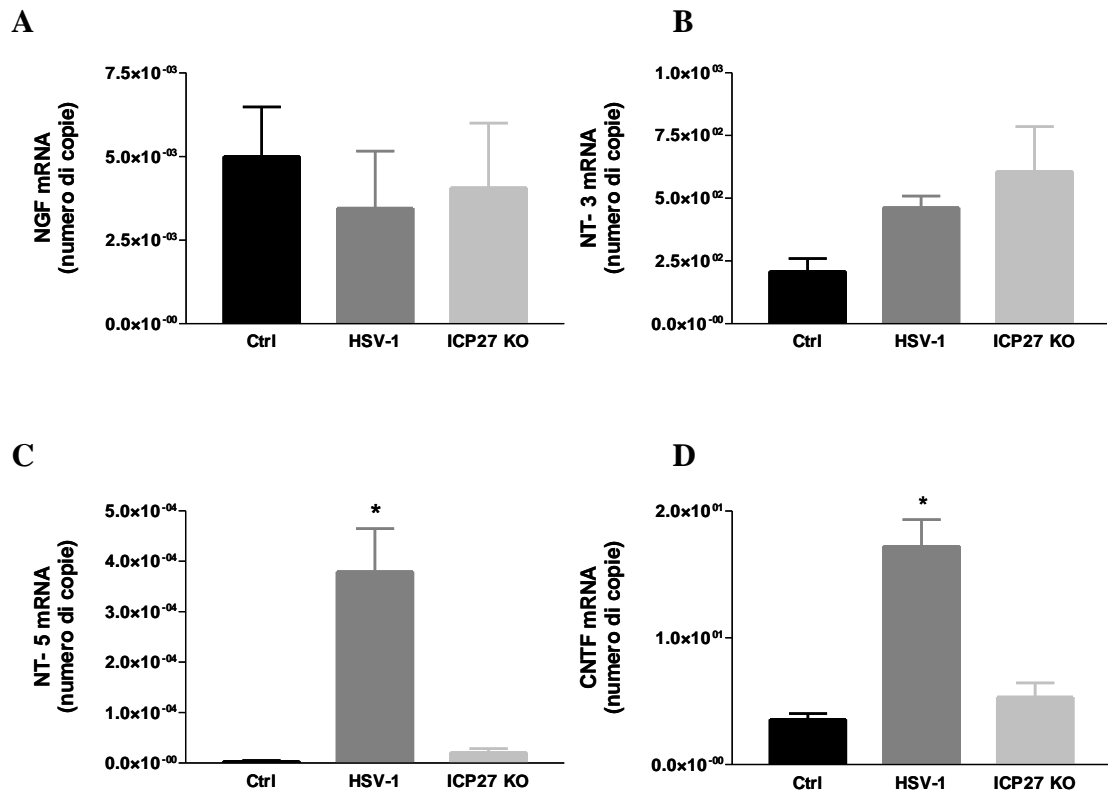


Figura 34. Analisi quantitativa in RT-PCR di mRNA dei fattori neurotrofici NGF (**A**), NT-3 (**B**), NT-5 (**C**) e CNTF (**D**). L'mRNA totale è stato estratto da colture cellulari derivate da LMMP di topi Ctrl infettati in vitro con HSV-1 o con ICP27 KO. I dati riportati sono il risultato del rapporto tra i livelli di espressione dei geni che codificano per i fattori neurotrofici e i livelli di espressione del GAPDH, impiegato come gene house-keeping. *P<0,05 vs Ctrl.

4.4 Caratterizzazione dell'espressione del recettore Toll-like 2 nell'ileo di topo

L'indagine immunohistochimica condotta sulle criosezioni ottenute da fettine congelate di ileo di topo hanno dimostrato la presenza dei TLR2 nella LMMP ed in particolare nei neuroni mienterici, grazie alla colocalizzazione di questi recettori (in verde) con il marcatore neuronale periferina (in rosso) (Figura 35).

L'indagine multiparametrica eseguita attraverso la marcatura in citofluorimetria di cellule dissociate dalla LMMP (Figura 36A, B, C e D) ha dimostrato l'espressione del TLR2 nel 7,4% \pm 1,6 dei neuroni mienterici HuD positivi, nel 10,7% \pm 5,6 delle cellule gliali GFAP positive e nel 17% \pm 7 delle cellule muscolari lisce α -SMA positive (Figura 36E), a suggerire un coinvolgimento del TLR2 non solo a livello dell'epitelio ma anche nel compartimento neuromuscolare intestinale.

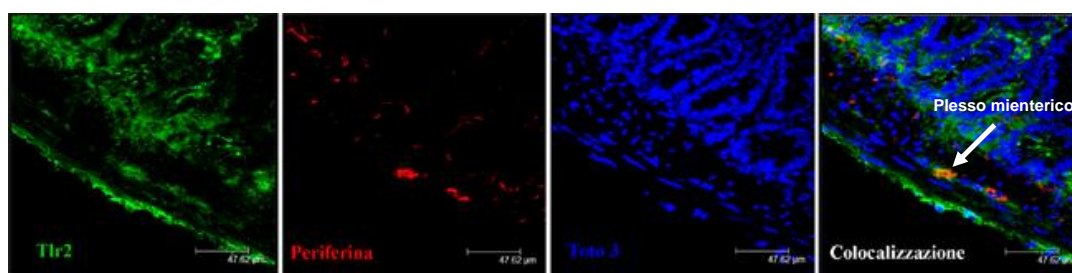


Figura 35. Immunohistochimica su sezioni di fettine di ileo congelate. Le immagini ottenute al microscopio confocale mostrano la distribuzione del TLR2 (in verde) nell'ileo ed in particolare, la colocalizzazione con il marcatore neuronale periferina (in rosso) nel plesso mienterico. I nuclei (in blu) sono stati marcati con il marcatore nucleare Toto[®]-3. Barra=48 μ m.

4.5 Ruolo dei TLR2 nelle alterazioni del SNE in seguito all'infezione virale

4.5.1 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sulla morfologia dei gangli mienterici di topi TLR2 KO

E' stata riconosciuta recentemente la capacità del TLR2 di riconoscere la presenza di HSV-1 nell'organismo e di attivare la risposta immunitaria (Morrison, 2004). Studi su topi TLR2 KO hanno evidenziato che la delezione di questo recettore migliora lo stato di encefalite indotta dalla somministrazione endovenosa di HSV-1, ad indicare che l'attivazione del TLR2 può determinare risposte per lo più nocive per l'organismo (Kurt-Jones et al., 2004).

Al fine di valutare il possibile coinvolgimento del TLR2 nelle alterazioni morfologiche insorte nel SNE in seguito all'infezione con HSV-1, sono stati utilizzati topi TLR2 KO trattati col virus a 1 e 8 W dall'inoculo IG. Nei topi TLR2 KO, l'infezione con HSV-1 non ha determinato rilevanti alterazioni della morfologia dei gangli mienterici evidenziata mediante la doppia marcatura dei neuroni HuC/D positive e della glia S100 β positiva, (Figura 37). Inoltre, come si può osservare in Figura 38B e 39B, l'infezione nei topi TLR2 KO non ha causato alterazioni della densità delle cellule neuronali e gliali rispetto ai valori misurati nei TLR2 KO Ctrl (Figura 38A e 39A).

L'aspetto irregolare e frammentato osservato dalla distribuzione disomogenea della periferina nei gangli mienterici dei topi WT infettati a 8 W dall'inoculo IG con HSV-1 non è stato riscontrato nel plesso mienterico degli animali TLR2 KO (Figura 40), a

suggerire che l'assenza di questo recettore determina un effetto protettivo del SNE nei confronti dell'infezione.

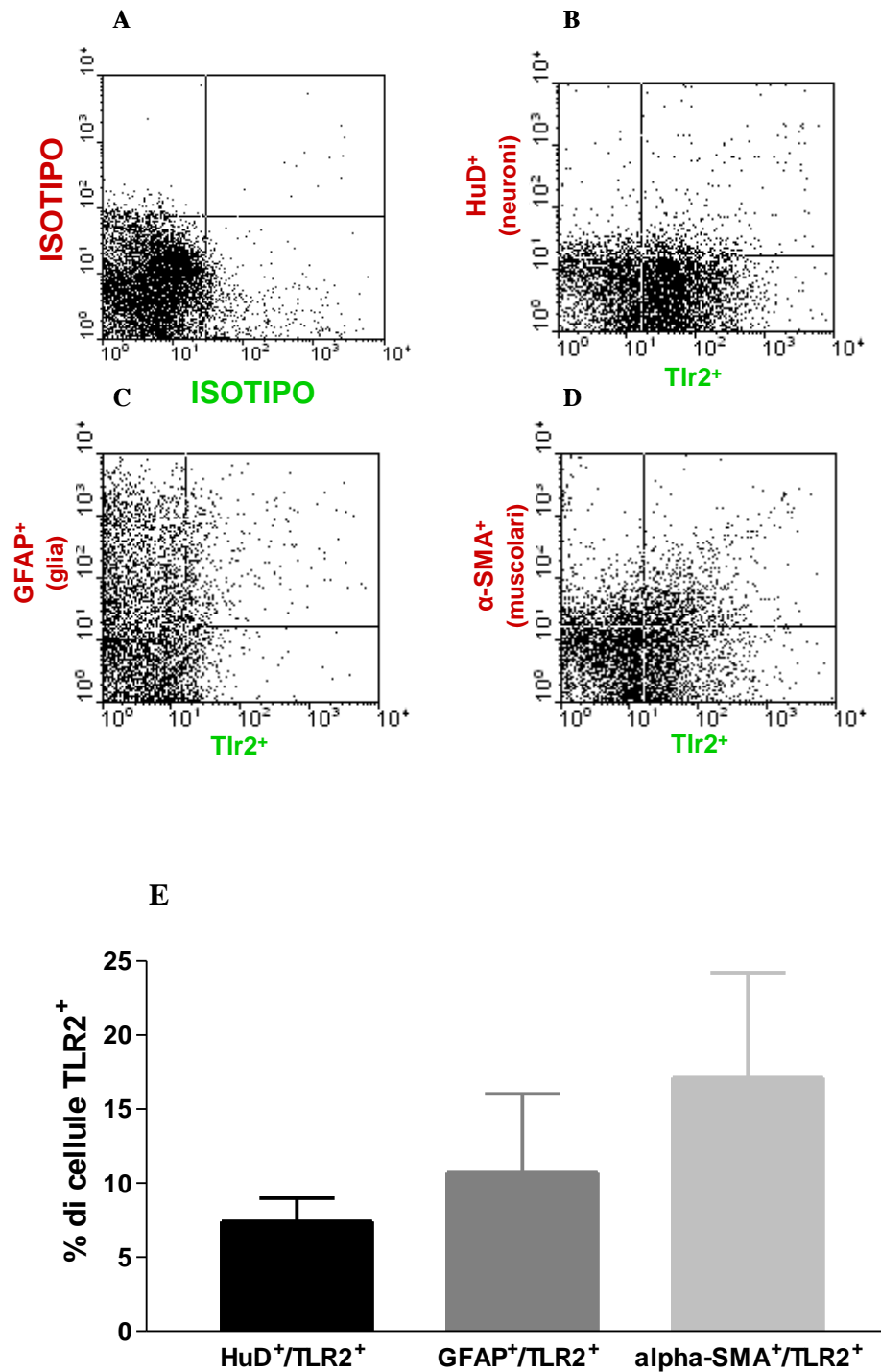


Figura 36. Analisi citofluorimetrica (rappresentazione dot-plot) di cellule ottenute da LMMP di topi WT. I diagrammi dot-plot sono stati ottenuti dall'analisi degli isotipi (A) e delle popolazioni di cellule neuronali HuD⁺ (B), gliali S100 β ⁺ (C) e muscolari lisce α -SMA⁺ (D) che coesprimono il recettore TLR2. Il grafico E riporta la percentuale di espressione di TLR2 in ciascuna popolazione cellulare (n=4 per ogni gruppo sperimentale).

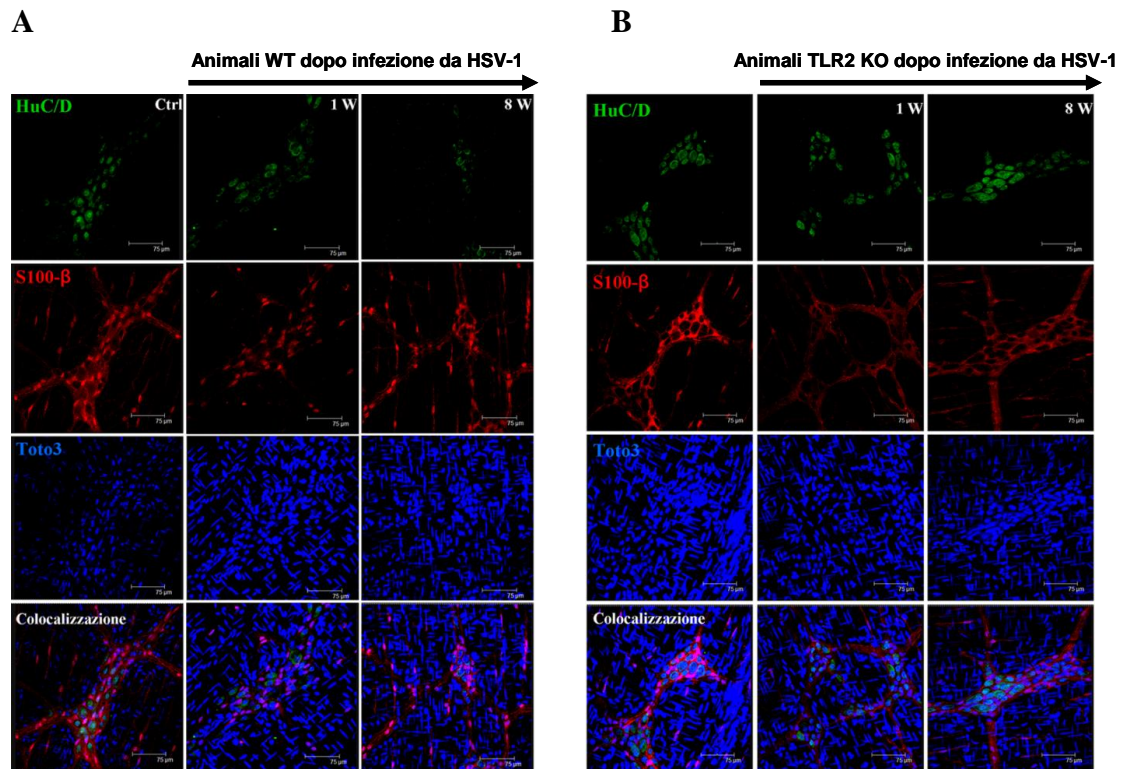


Figura 37. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (A) e TLR2 KO (B) infettati con HSV-1 a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). I gangli mienterici sono stati marcati con anti-HuC/D (marcatore neuronale, in verde) e anti-S100 β (marcatore gliale, in rosso), Toto[®]-3 (marcatore nucleare, in blu). Barra=75 μ m.

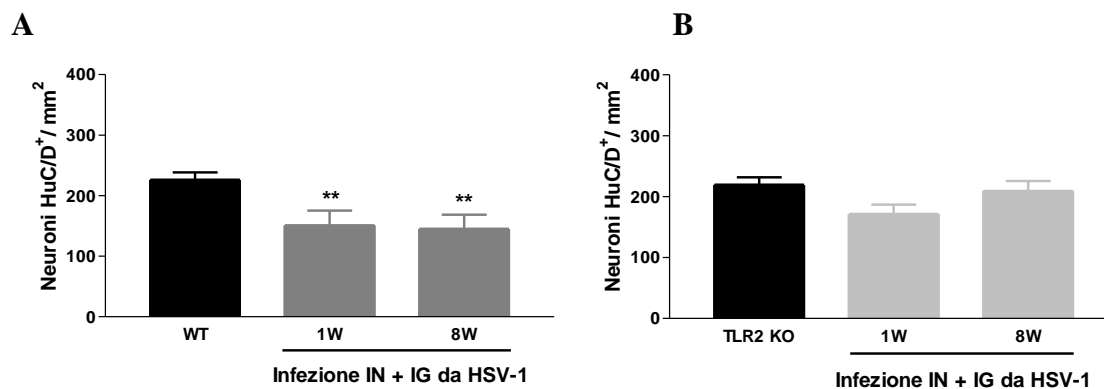


Figura 38. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla densità delle cellule neuronali HuC/D positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (A) e TLR2 KO (B), Ctrl e infettati a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5 ; $n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). ** $P < 0,01$ vs Ctrl.

4.5.2 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 sul fenotipo neurochimico del SNE

L'infezione del SNE con HSV-1 ha determinato nei topi TLR2 KO una evidente riduzione dell'immunoreattività al marcatore nitrgico anti-nNOS (Figura 41B). Questo risultato, opposto a quanto evidenziato nei topi WT (Figura 41A e 42A), si ripercuote anche sulla densità dei neuroni nitrgici dove, il numero di neuroni nNOS positivi per mm^2 è diminuito dell'80% a 1 W e del 86% a 8 W rispetto ai valori

ottenuti negli animali TLR2 KO Ctrl (Figura 42B).

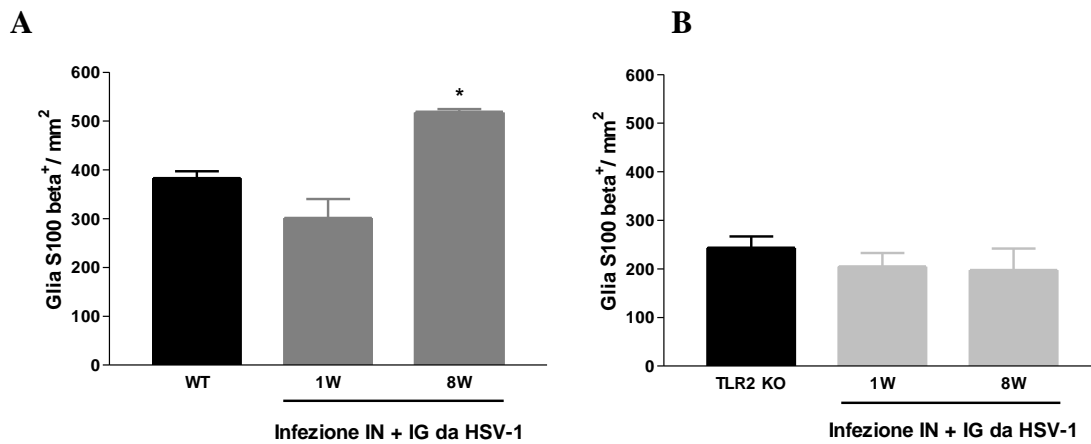


Figura 39. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla densità delle cellule gliali S100 β positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (**A**) e TLR2 KO (**B**), Ctrl e infettati a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni \geq 5; n \geq 3 per ogni gruppo sperimentale). **P<0,01 vs Ctrl.

A differenza di quanto osservato nei topi WT (Figura 43 A e 44A) lo studio della distribuzione dell'enzima AChE nelle preparazioni WM di LMMP di topi TLR2 KO in seguito ad infezione con HSV-1, non ha evidenziato la presenza di alterazioni nella distribuzione e nella densità delle fibre colinergiche (Figura 43B e 44 B) sia a 1 che a 8 W dall'inoculo IG.

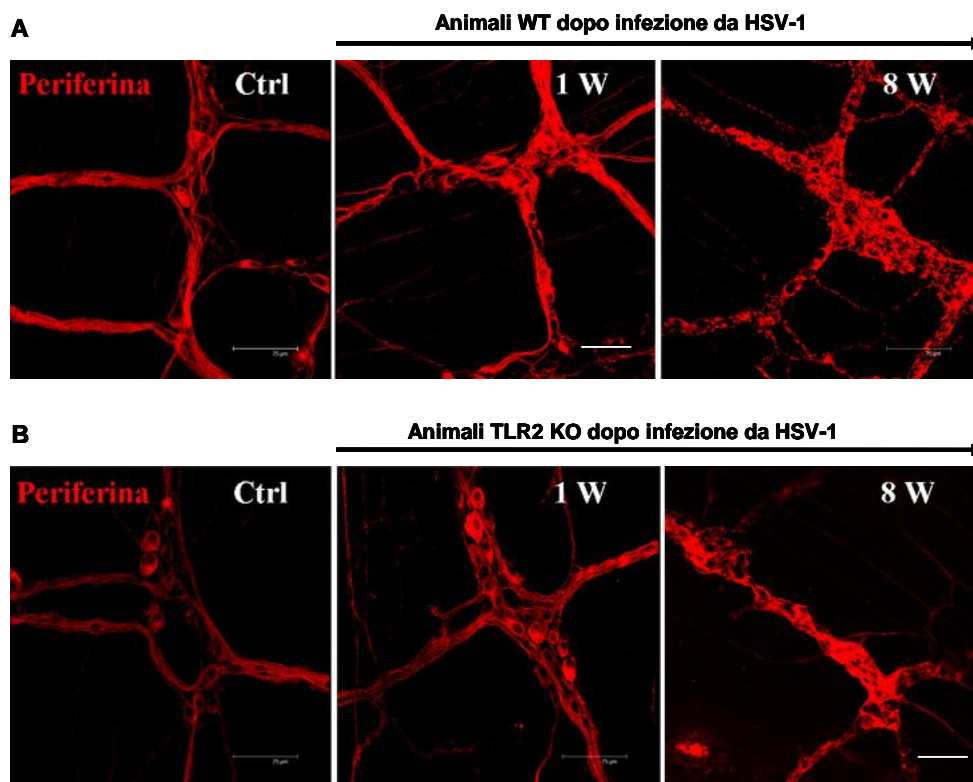


Figura 40. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (**A**) e TLR2 KO (**B**) Ctrl e infettati con HSV-1 a 1 e 8 W (n \geq 3 per ogni

gruppo sperimentale). La fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali periferina positivi. Barra=75µm.

Nei topi TLR2 KO il trattamento con doppio inoculo di HSV-1 determina, come nei topi WT (Figura 45A e 46A), un'aumentata immunoreattività ai marcatori anti-VIP e anti-SP (Figura 45B e 46B).

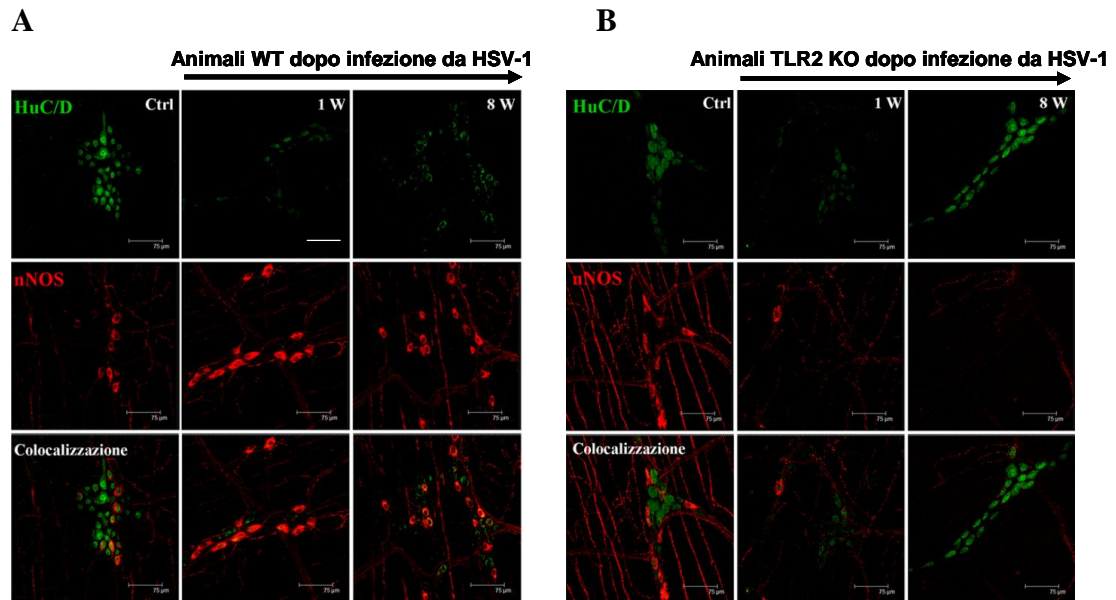


Figura 41. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (**A**) e TLR2 KO (**B**), Ctrl e infettati con HSV-1 a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi mentre, la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali nNOS positivi. Barra=75µm.

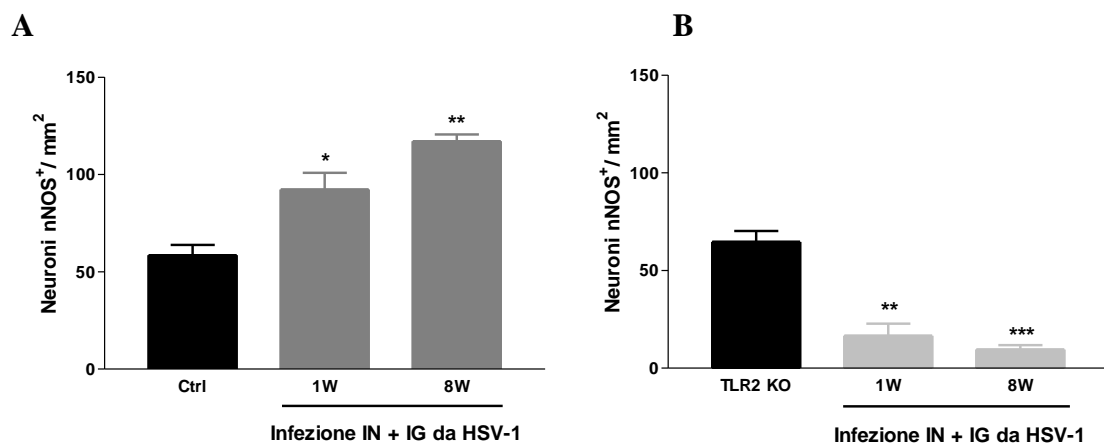


Figura 42. Effetti dell'infezione da HSV-1 sulla densità delle cellule neuronali nNOS positive in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (**A**) e TLR2 KO (**B**), Ctrl e infettati a 1 e 8 W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5 ; $n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,01$ vs Ctrl.

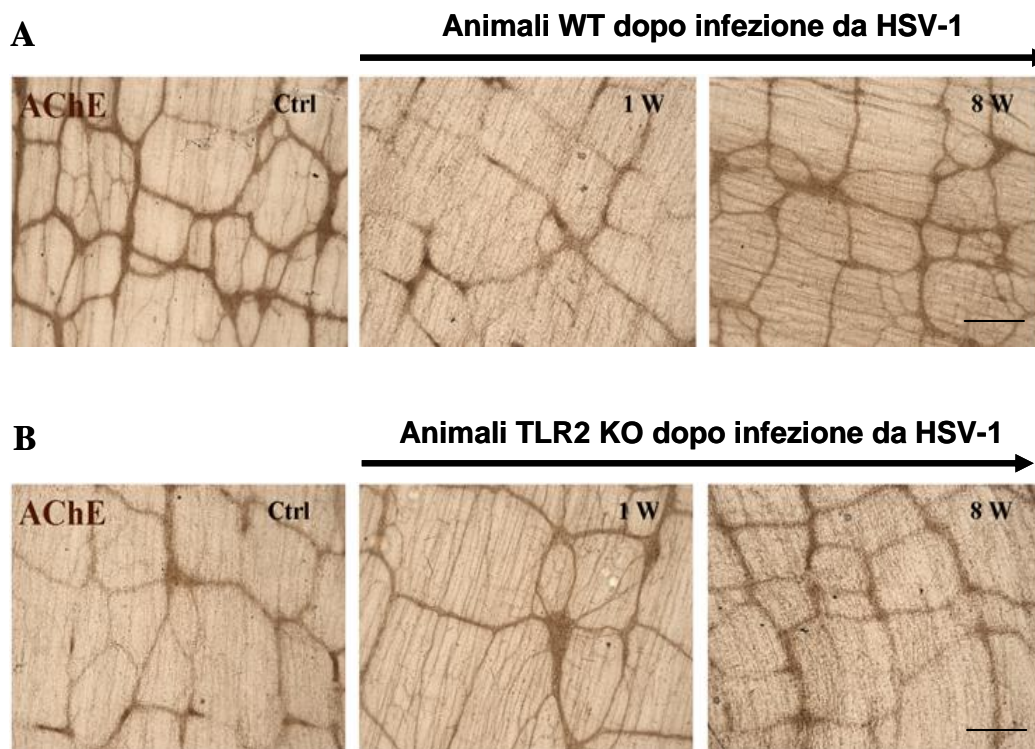


Figura 43. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio ottico della distribuzione dell'enzima AChE in preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (A) e TLR2 KO (B), Ctrl e infettati con HSV-1 a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). Barra=100 μ m.

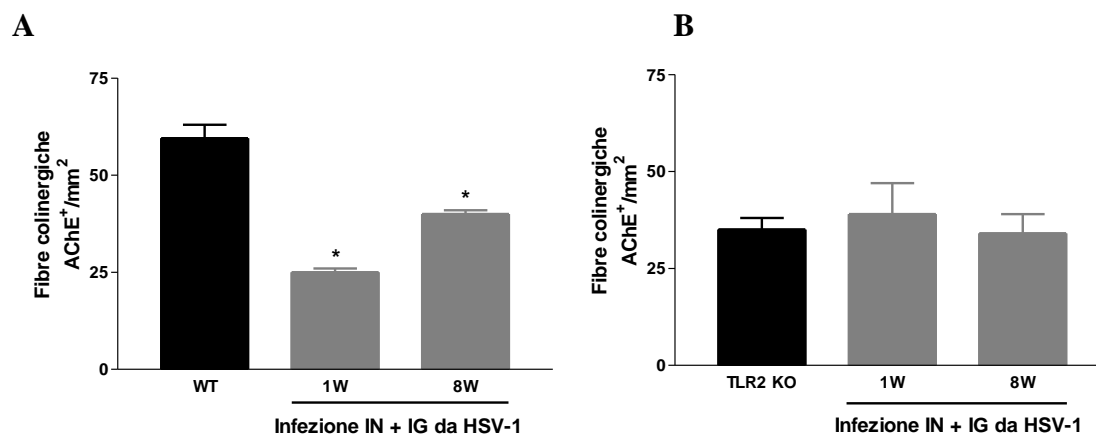


Figura 44. Densità delle fibre colinergiche AChE-positive. Effetti dell'infezione da HSV-1 nelle preparazioni WM di LMP di animali WT (A) e TLR2 KO (B), Ctrl e infettati a 1 e 8W (campi=5, numero di sezioni ≥ 5 ; $n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). * $P < 0,05$ vs Ctrl.

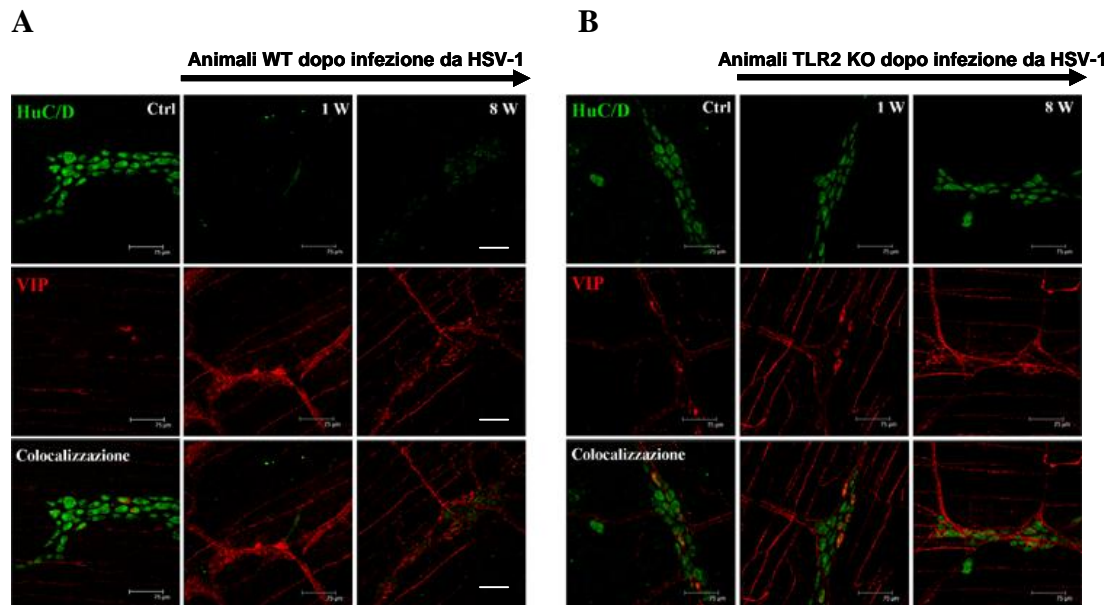


Figura 45. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (A) e TLR2 KO (B), Ctrl e infettati con HSV-1 a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali HuC/D positivi mentre, la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali VIP positivi. Barra=75 μ m.

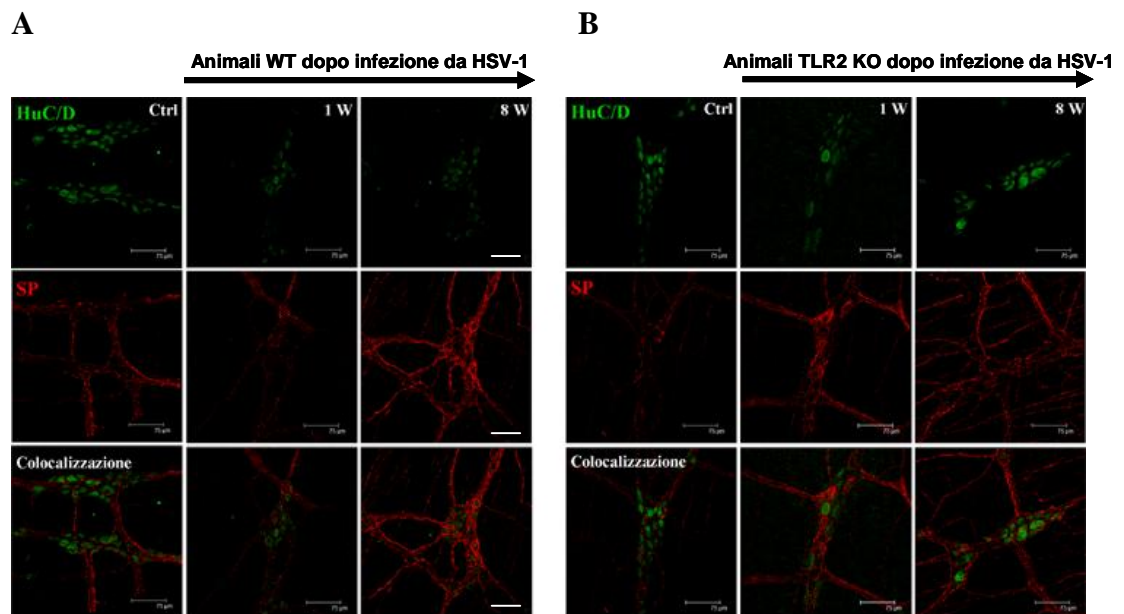
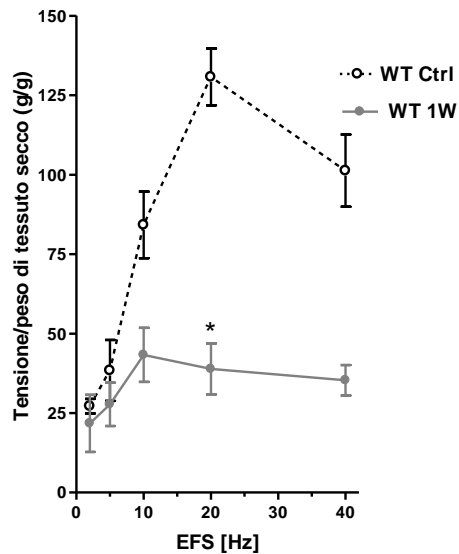


Figura 46. Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni WM di LMMP di ileo di topi WT (A) e TLR2 KO (B), Ctrl e infettati con HSV-1 a 1 e 8 W ($n \geq 3$ per ogni gruppo sperimentale). La fluorescenza in verde rappresenta i corpi cellulari neuronali totali HuC/D positivi mentre, la fluorescenza in rosso rappresenta i corpi cellulari e le fibre neuronali SP positivi. Barra=75 μ m.

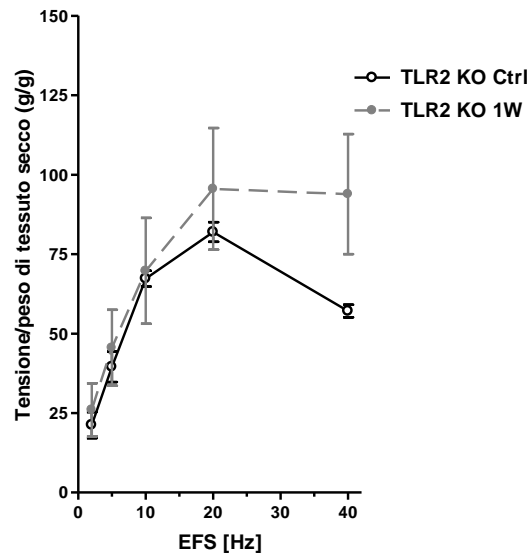
4.5.3 Effetto dell'infezione in vivo con HSV-1 nelle alterazioni della contrattilità intestinale di topi TLR2 KO

La risposta dei preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO infettati con HSV-1 a EFS (1-40 Hz) fino a 20 Hz non ha dimostrato significative riduzioni della contrattilità a 1 W e a 8 W rispetto ai TLR2 KO Ctrl (Figura 47B e D).

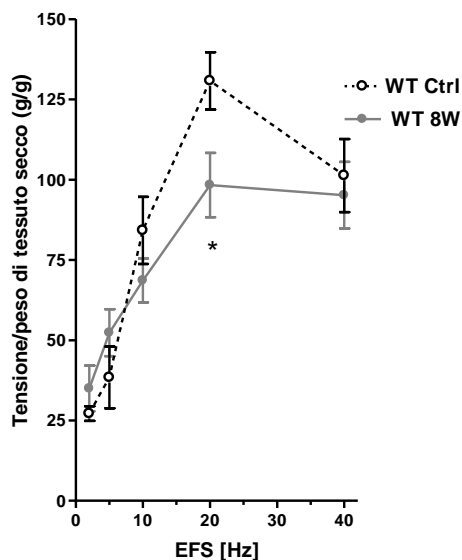
A



B



C



D

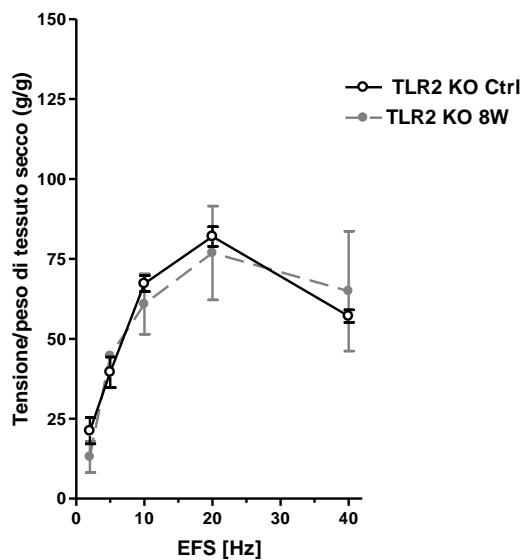


Figura 47. Effetto della stimolazione elettrica a frequenze crescenti (da 1 a 40 Hz; 40V) in preparati di ileo prelevati da topi WT (A e C) e da topi TLR2 KO (B e D), Ctrl e infettati con HSV-1 a 1 e 8W ($n \geq 4$ per ogni gruppo sperimentale). * $P < 0,05$ vs Ctrl.

4.5.4 Effetto dell'infezione in vitro con HSV-1 o con ICP27 KO sull'espressione di fattori neurotrofici in colture tissutali di LMMP di topi TLR2 KO

L'indagine dell'espressione del mRNA dei fattori neurotrofici NGF, NT-3, NT-5 e CNTF è stata eseguita anche in colture tissutali di cellule derivate da LMMP di topi TLR2 KO infettate in vitro con HSV-1 o ICP27 KO. In queste cellule solo il trascritto per l'NGF (Figura 48A) e non quelli degli altri fattori neurotrofici (Figura 48B-D), è risultato ridursi significativamente dopo 24 ore di infezione con HSV-1 o con ICP27 KO (Figura 48).

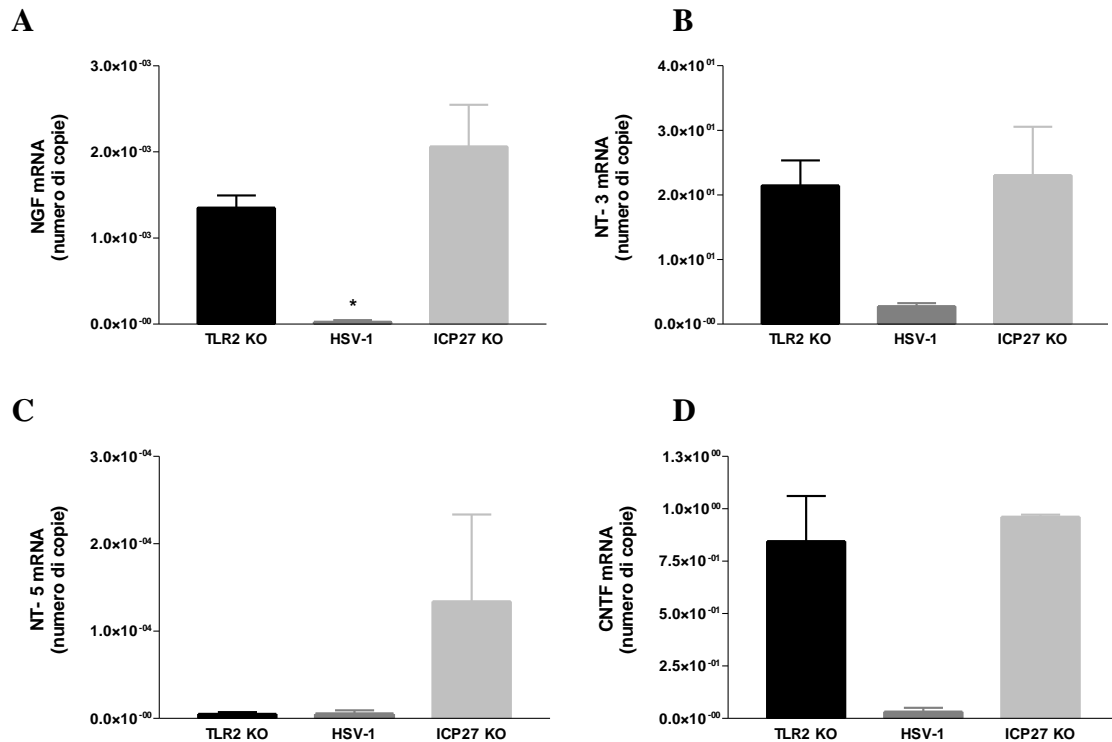


Figura 48. Analisi quantitativa in RT-PCR di mRNA dei fattori neurotrofici NGF (A), NT-3 (B), NT-5 (C) e CNTF (D). L'mRNA totale è stato estratto da colture cellulari derivate da LMMP di topi TLR2 KO, Ctrl e infettati in vitro con HSV-1 o con ICP27 KO. I dati riportati sono il risultato del rapporto tra i livelli di espressione dei geni che codificano per i fattori neurotrofici e i livelli di espressione del GAPDH, impiegato come gene house-keeping. *P<0,05 vs Ctrl.

5. DISCUSSIONE

Alterazioni del SNE svolgono un ruolo principale nell'insorgenza dei DFGI (De Giorgio et al., 2004). Questo è dovuto all'elevata complessità morfologica del SNE e alla sua capacità di controllare in maniera indipendente dal SNC tutte le funzioni intestinali (Goyal and Hirano, 1996). Anomalie del SNE sono tradizionalmente collegate a disturbi motori o della sensibilità viscerale, tuttavia negli ultimi anni il coinvolgimento del SNE è emerso anche in patologie infiammatorie croniche intestinali e in disordini degenerativi a carico del SNC (Natale et al., 2008; Giordano et al., 2008). Sebbene i meccanismi fisiopatologici di danno enterico neuronale sono ad oggi poco definiti, l'infiammazione e la compromissione della funzione neuronale sembrano essere una caratteristica comune di questi disturbi (De Giorgio et al., 2004).

Virus neurotropi sono tuttora considerati dei possibili candidati in grado di interferire con l'integrità del sistema nervoso enterico e di scatenare anomale risposte a carico del sistema immunitario (Chen et al., 2003). A supporto del ruolo di virus neurotropi nell'insorgenza di neuropatie, un crescente numero di osservazioni indirette ha documentato la presenza di materiale genomico virale nel SNC o SNE, nonché la presenza di specifici anticorpi antivirali nel siero di pazienti con malattie neurodegenerative (Ringheim and Conant, 2004). L'ipotesi che virus neurotropi potessero essere coinvolti nella neurodegenerazione è stata fortemente consolidata dalla scoperta che il sistema nervoso è dotato di una macchina molecolare in grado di organizzare una risposta immunitaria innata nei confronti dell'infezione virale, nonché di coordinare l'insorgenza di risposte adattative per limitare la diffusione del virus (Barajon et al., 2009).

Il nostro gruppo di ricerca ha di recente descritto un nuovo modello sperimentale in roditori nel quale un'infezione persistente nel SNE ad opera del virus neurotroppo HSV-1 causa delle complesse anomalie neuromuscolari caratterizzate da alterata contrattilità e transito intestinale in assenza di evidenti danni istologici o segni di malattia (Brun et al., 2010).

Lo studio condotto nel mio progetto di dottorato ha avuto come obiettivo l'analisi dei meccanismi responsabili dell'insorgenza dell'alterata contrattilità e transito intestinale in seguito ad infezione da HSV-1 nel SNE. Nella prima parte del mio progetto ho caratterizzato il fenotipo del SNE nel plesso mienterico di topi sottoposti all'infezione virale a 1-10 W dalla somministrazione intragastrica del virus. Le preparazioni whole mount di LMMP hanno permesso la visualizzazione dei gangli mienterici in seguito alla doppia marcatura con gli anticorpi anti-HuC/D, specifico marcatore neuronale e anti-S100 β , specifico marcatore di cellule gliali. L'anticorpo anti-HuC/D riconosce specificatamente gli antigeni HuC e D, proteine leganti mRNA, presenti nel citoplasma delle cellule neuronali, permettendo così la visualizzazione dei corpi cellulari neuronali (soma) mienterici in modo omogeneo. Studi di immunistochemica in LMMP hanno dimostrato che il marcatore HuC/D presenta una maggior efficienza nella quantificazione numerica delle cellule neuronali mienteriche rispetto ad altri comuni marcatori, tra cui NSE (Neuron Specific Enolase) e PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5), proprio per la sua selettività di marcatura del soma ma non delle fibre nervose come evidenziato con gli altri

antigeni. L'anticorpo anti-S100 β riconosce specificatamente la subunità β dell'antigene S100, proteina legante il calcio, presente nel citoplasma e nuclei delle cellule gliali dei plessi mienterici. Questa proteina risulta specifica sia per i corpi delle cellule gliali che per le fibre che avvolgono il soma dei neuroni permettendo così la definizione dei confini dei gangli mienterici (Phillips et al., 2004; Murphy et al., 2007; Ippolito et al., 2009).

Gli esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che la presenza del virus nel SNE causa visibili alterazioni della peculiare architettura della rete nervosa enterica. Nel plesso mienterico degli animali infettati, la morfologia dei gangli mienterici è risultata apparentemente modificata a 1, 8 e 10 W dall'esposizione al virus per via intragastrica. A questi tempi di infezione le cellule neuronali e le fibre gliali sono risultate meno definite data la ridotta immunoreattività presente particolarmente nei neuroni mienterici. Tali alterazioni potrebbero indicare la presenza di una sofferenza neuronale mediata attraverso la sottoregolazione della proteina HuC/D, a suggerire che il virus potrebbe alterare dei meccanismi cellulari fin ad ora poco esplorati. Le proteine Hu sono state identificate per la prima volta come target di autoanticorpi trovati in pazienti affetti da encefalomielite paraneoplastica (Voltz et al., 1997). Gli anticorpi diretti verso questi antigeni sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e causare disturbi di tipo neuroimmunitario. Queste proteine sono le omologhe umane delle ELAV nella *Drosophila*, una famiglia di proteine leganti l'RNA, la delezione delle quali causa in questi insetti un'anomalia visiva embrionale letale (embryonic letal abnormal vision, ELAV) (Okano and Darnell, 1997). Nei mammiferi, sono state identificate quattro proteine Hu, ciascuna codificata da geni differenti, HuA (o HuR), HuB (o Hel-N1), HuC e HuD, le cui ultime tre sono espresse esclusivamente nei neuroni. L'attività post-trascrizionale, esercitata da queste specifiche proteine neuronali, svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nel mantenimento del sistema nervoso. Le proteine Hu legano specifici RNA messaggeri, regolandone il trasporto, la stabilità e la seguente traduzione in proteine. Una serie di evidenze ha dimostrato che la proteina HuD è coinvolta nella stabilità di diversi mRNA, compresi quelli per le proteine c-fos, tau (proteina associata a microtubuli, particolarmente abbondante nei neuroni), GAP-43 (proteina 43 associata alla crescita) e neuroserpina (inibitore delle proteasi seriniche); tutte proteine coinvolte nella neuroprotezione, mantenimento del citoscheletro, crescita neuritica, rigenerazione e plasticità neuronale (Cuadrado et al., 2002; Perrone and Bolognani, 2002; De Giorgio et al., 2003).

Alcuni studi hanno evidenziato la capacità dell'HSV-1 di alterare l'espressione di specifici geni nei neuroni dove il virus risiede allo stato di latenza (Kramer et al., 2003). È verosimile che la presenza di HSV-1 nei neuroni enterici potrebbe causare una sottoregolazione dell'espressione delle proteine Hu con conseguente depressione del metabolismo cellulare e sofferenza neuronale. In alternativa, le modifiche cellulari nell'espressione genica potrebbero rappresentare la conseguenza di una risposta immunitaria dell'ospite attivata dall'HSV-1 al fine di indurre la repressione del ciclo replicativo virale, caratteristica peculiare dell'infezione latente (Kramer et al., 2003). Di particolare interesse potrebbero rivelarsi proprio i geni che codificano per proteine che regolano l'espressione genica, funzione esercitata per l'appunto anche dalla proteina Hu. Una sottoespressione di questa proteina potrebbe suggerire l'attivazione di un processo da

parte della cellula ospite volto ad impedire al virus di replicarsi attraverso dei meccanismi che, destabilizzando gli mRNA, impediscono la traduzione delle proteine strutturali con conseguente arresto della formazione di una progenie virale.

La riduzione della densità dei neuroni sia nel plesso mienterico che nel sottomucoso è stata riportata in diversi modelli animali di IBD o di IBS post-infezione indicando come causa di questo danno i processi infiammatori e la presenza di infiltrati linfocitari, mentre come meccanismo, la morte cellulare per apoptosi mediata dall'attivazione della caspasi-3 (Sanovic et al., 1999; Poli et al., 2001; Boyer et al., 2005).

Dal momento che l'HSV-1 è risultato capace di determinare delle alterazioni fenotipiche nel plesso mienterico dell'ileo degli animali infettati è stato deciso di proseguire l'indagine analizzando quantitativamente la densità delle cellule neuronali immunoreattive a HuC/D e la densità delle cellule gliali immunopositive a S100 β .

I dati ottenuti hanno dimostrato che il virus è in grado di ridurre la densità dei neuroni enterici positivi al marcatore anti-HuC/D a 1 e 8 W dall'infezione, e di aumentare la densità delle cellule gliali positive a S100 β , ad indicare una loro attivazione in seguito all'infezione da HSV-1. In risposta a differenti stimoli, come traumi fisici, infiammazione o infezioni, gli astrociti del SNC rispondono rapidamente con un processo di astrogliosi reattiva in cui le cellule gliali proliferano (Sharkey and Kroese, 2001). Lo stesso meccanismo di iperplasia è stato documentato anche per la glia enterica in seguito ad infiammazione intestinale (Bradley et al., 1997) ipotizzando un suo ruolo nella risposta infiammatoria, nonché nella neuroprotezione e nella preservazione della funzione del sistema nervoso in seguito a danno (Sofroniew, 2005). Considerato l'aumento della densità delle cellule gliali nell'ultima fase di infezione da HSV-1, cioè a 8 e 10 W, possiamo ipotizzare anche nel nostro modello animale di infezione con HSV-1 una gliosi reattiva coinvolta probabilmente nella risposta infiammatoria verso il virus e nella protezione delle cellule neuronali del plesso mienterico. Per comprovare ulteriormente la presenza di una neuropatia intestinale si è deciso di valutare il fenotipo dei neuroni mienterici attraverso lo studio della distribuzione di periferina e β III-tubulina, proteine presenti nelle inclusioni assoniche e nei soma neuronali. La periferina è una proteina filamento intermedio di tipo III, espressa nei neuroni del sistema nervoso enterico e periferico, dove si presume sia coinvolta nella crescita e nel mantenimento dei prolungamenti neuritici, nonché della forma della stessa cellula. Durante lo sviluppo del sistema nervoso in concomitanza con la formazione e la crescita assonica, aumenta significativamente l'espressione della periferina e questo aumento è di nuovo visibile durante la ricrescita assonica in seguito ad assotomia nel ganglio della radice dorsale, ad indicare che in seguito a danno questa proteina neuronale è coinvolta nei processi rigenerativi e di rimodellamento del citoscheletro (Helfand et al., 2003).

Le immagini al microscopio confocale delle sezioni di tessuto provenienti da topi trattati in vivo con HSV-1 hanno dimostrato un'alterata organizzazione della rete neuronale mienterica in diverse fasi dell'infezione. In particolare, nella fase tardiva dell'infezione, cioè a 6 e 8 W dal trattamento con HSV-1, l'aspetto dei gangli è risultato marcatamente modificato rispetto ai topi non infetti, con una distribuzione disomogenea della proteina, caratterizzata dalla formazione di piccoli aggregati intracellulari che alterano la struttura

dei neuroni e dei fasci di nervi del plesso mienterico a sostegno dell'ipotesi di una probabile interferenza del virus con la rete di neurofilamenti intermedi di cui la periferina fa parte. Infatti, un accumulo anomalo della periferina risulta essere una comune caratteristica di molte patologie neurodegenerative umane anche se il ruolo neuropatologico di questi aggregati è ancora poco conosciuto (Lariviere and Julien, 2004; Cairns et al., 2003; Liem and Messing, 2009; Omary, 2009).

La β III-tubulina è una proteina dei microtubuli, componenti fondamentali delle cellule eucariotiche coinvolti in un'estesa varietà di funzioni che comprendono la mitosi, il trasporto di vari organelli e il mantenimento della morfologia cellulare. Essi permettono il trasporto di diversi componenti cellulari come organuli e mitocondri in ambedue i sensi; uno stesso microtubulo è, inoltre, in grado di trasportare due particelle in senso opposto. Questa importante caratteristica diventa indispensabile a livello neuronale dove il nucleo e l'apparato biosintetico sono localizzati nel corpo cellulare, assai lontano dalle regioni distali dei dendriti e soprattutto dell'assone (Fanarraga et al., 1999). La β III-tubulina sembra risiedere quasi esclusivamente nei neuroni e spesso viene considerata come il principale marcatore neuronale associato al citoscheletro durante lo sviluppo. Nel cervello neonatale ed adulto, la β III-tubulina esibisce una distribuzione sia a livello del soma che nei prolungamenti asso-dendritici dei neuroni. In contrasto, risulta completamente assente nelle cellule gliali adulte. Sembrerebbe che la β III-tubulina svolga un ruolo cruciale nella neurogenesi in concomitanza o in coordinamento con altre proteine associate ai microtubuli, come le MAPs (proteine associate ai microtubuli). L'espressione di β III-tubulina è maggiore durante il periodo di crescita e maturazione neuronale; i livelli diminuiscono nel sistema nervoso centrale adulto, mentre rimangono elevati nel sistema nervoso periferico (Jiang and Oblinger, 1992).

L'indagine morfologica eseguita sulle sezioni di tessuto provenienti da topi trattati in vivo con HSV-1 hanno dimostrato una evidente alterazione della β III-tubulina solamente a 4 W dall'infezione con inoculo intragastrico. In questa fase dell'infezione è stato possibile valutare oltre ad una marcata riduzione dell'immunoreattività anche un'alterazione della morfologia dei gangli mienterici, ad indicare un riarrangiamento del citoscheletro neuronale probabilmente indotto dal virus. Uno studio condotto in vitro su colture primarie di cellule derivate dal SNC ha dimostrato che l'HSV-1 è in grado di indurre nei neuroni un riarrangiamento dei microtubuli, a poche ore dall'infezione. Queste alterazioni avvenivano inizialmente attraverso un aumento della dinamicità microtubulare attorno al soma neuronale, a suggerire una modificazione del citoscheletro necessaria per la diffusione del virus nel nucleo e quindi per la sua replicazione. In seguito a 16 ore dall'infezione virale, le alterazioni si verificavano nei processi neuritici incrementando la stabilità del citoscheletro nei neuroni sopravvissuti allo scopo di facilitare il trasporto e di permettere la fuoriuscita del virus dalle terminazioni nervose. Infine, nelle successive 18 ore dall'infezione virale, l'80% dei neuroni mostrava una riduzione dei processi neuritici, mentre la vitalità cellulare si riduceva del 40% dimostrando quindi la capacità dell'HSV-1 di danneggiare il citoscheletro neuronale (Zambrano et al., 2008).

Inoltre un'alterata espressione della periferina e della β III-tubulina nella LMMP è stata riscontrata negli animali durante il decorso dell'infezione. L'aumento di espressione di

periferina a 8 e 10 W dalla somministrazione IG del virus potrebbe essere un segnale di neurodegenerazione dal momento che l'associazione fra sovraespressione di periferina e neurodegenerazione dei motoneuroni è stata dimostrata in diverse patologie, quali la sclerosi laterale amiotrofica, il Parkinson o l'Alzheimer (Beaulieu et al., 2002; Helfand et al., 2003; McLean et al., 2010). Uno studio molto recente ha inoltre evidenziato i meccanismi molecolari alla base di un coinvolgimento della periferina nella neurodegenerazione. Gli autori, infatti, hanno dimostrato che gli aggregati citoplasmatici dei filamenti intermedi originati dalla sovraespressione della periferina intrappolano e danneggiano i mitocondri e il reticolo endoplasmatico neuronale inducendo così un'attivazione inappropriata delle chinasi (caspasi 3, 9 e 12) con conseguente morte cellulare per apoptosi (Lee et al., 2012). Altri studi invece effettuati con topi KO per i neurofilamenti hanno messo in rilievo come la mancanza di queste proteine non sia causa di disturbi neuronali pur avendo un ruolo primario sullo stato di mielinizzazione degli assoni (Elder et al., 1999; Kriz et al., 2000; Robertson et al., 2001).

L'alterata espressione della β III-tubulina lungo tutto il decorso dell'infezione suggerisce la capacità del virus di modificare le proteine del citoscheletro neuronale. E' verosimile che una riorganizzazione dei microtubuli durante l'infezione con HSV-1 faciliti la traslocazione nucleare di specifici componenti virali (es. VP22) utili a determinare la formazione di una progenie virale (Kotsakis et al., 2001). D'altra parte la riduzione dei livelli di espressione della β III-tubulina a 1, 4, 6 e 8 W dall'infezione con HSV-1 potrebbe essere associata ad un danno neuronale. Infatti, in seguito ad assotomia del nervo ottico, è stato riscontrato nei ratti una riduzione dei livelli di espressione dei trascritti della β III-tubulina con successivo aumento durante il periodo di rigenerazione dei neuroni lesionati (Fournier and McKerracher, 1997).

L'espressione della proteina S100 β è risultata alterata durante tutto il periodo dell'infezione con picchi di sovraespressione a 2 e a 10 W, ad indicare che l'HSV-1 è in grado di alterare il metabolismo delle cellule gliali a loro volta indispensabili per il mantenimento dell'integrità del SNE. Questa proteina difatti esercita importanti funzioni intra- ed extracellulari (Donato et al., 2009). A livello intracellulare essa regola l'omeostasi del calcio, la trascrizione, la dinamicità dei microtubuli e dei filamenti intermedi di tipo III, l'attività enzimatica e il metabolismo (Donato, 2001). A livello extracellulare, il rilascio di S100 β in dosi nanomolari esercita sui neuroni effetti neurotrofici: migliora la sopravvivenza durante lo sviluppo ed in seguito a danno, stimola la crescita e la rigenerazione dei neuriti, previene la degenerazione dei motoneuroni proteggendoli da stimoli tossici attraverso la sovraespressione di fattori anti-apoptotici (Barger et al., 1995; Iwasaki et al., 1997; Huttunen et al., 2000). E' stato invece osservato che elevate dosi extracellulari di S100 β (≥ 500 nM) esercitano sui neuroni effetti tossici mediati dalla sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che portano all'attivazione della caspasi-3 ed infine a morte cellulare neuronale per apoptosi (Vincent et al., 2007). La sovraespressione della proteina S100 β è stata associata anche all'infiammazione duodenale cronica che si verifica nella celiachia (Esposito et al., 2007).

L'aumentata espressione della proteina GFAP riscontrata nella LMMP dei topi nel corso dell'infezione con HSV-1 ci induce a considerare la gliosi reattiva come un probabile

meccanismo attraverso il quale l'infezione determina le alterazioni osservate finora nel SNE. La proteina GFAP, il più importante filamento intermedio presente negli astrociti e nella glia enterica, è associata a patologie neurodegenerative del SNC dove la sua sovraespressione modula una reazione astrocitaria capace di dare origine ad astrogliosi, condizione tipica di queste patologie (Eng et al., 2000; Middeldorp and Hol, 2011).

I risultati ottenuti in questa serie di esperimenti confermano che l'infezione con HSV-1 determina una sofferenza e/o plasticità neuronale e che in tali alterazioni sembrano essere coinvolte, direttamente o indirettamente, anche le cellule gliali enteriche in quanto parte integrante dei processi infiammatori nell'intestino.

La plasticità del SNE comprende dunque una vasta gamma di cambiamenti strutturali e/o funzionali a carico dei neuroni enterici e delle cellule gliali (Lomax et al., 2005). Infatti, in seguito ad un determinato danno o a particolari stimoli, al fine di mantenere l'omeostasi della funzione intestinale, i neuroni enterici sembrano capaci di modificare la propria struttura, funzione o fenotipo neurochimico; come eccitabilità ed espressione di neurotrasmettitori (Giaroni et al., 1999). Tali alterazioni possono essere transitorie se causate da uno stimolo acuto o divenire permanenti in seguito ad un grave danno o ad un processo patologico cronico (Ekblad and Bauer 2004).

In base a questi presupposti si è deciso di valutare l'effetto dell'infezione enterica con HSV-1 sul fenotipo neurochimico del SNE, in particolare sulla trasmissione nervosa nitrgergica, colinergica, VIPergica e tachichinergica.

Nel decorso dell'infezione è stato determinato un incremento dell'immunopositività dell'enzima nNOS. La densità delle cellule nitrgergiche nei gangli mienterici è aumentato significativamente a 1, 6 e 8 W, mentre l'espressione dell'nNOS dopo un'iniziale riduzione è aumentata in maniera significativa a 8 e 10 W, a suggerire il coinvolgimento dell'NO nei meccanismi di risposta al danno e di neuroplasticità.

La distribuzione di VIP e SP è risultata visibilmente aumentata nei gangli mienterici degli animali nel corso dell'infezione con HSV-1, ad indicare un tentativo da parte del SNE di preservare l'omeostasi funzionale dell'intestino minacciata dal virus. Dato il ruolo anti-infiammatorio del VIP (Delgado and Ganea, 2003; Sandgren et al., 2003) e pro-infiammatorio della SP (Lieb et al., 1997; Zhao et al., 2002; Karagiannides et al., 2006), l'aumentata espressione di questi due neuropeptidi nel plesso mienterico dei topi infettati potrebbe essere un meccanismo che permette al SNE di interagire con il sistema immunitario al fine di circoscrivere l'infezione e di proteggere i neuroni enterici dal danno indotto dal virus. La sovraespressione di questi due neuropeptidi è stata spesso associata in letteratura a patologie piuttosto gravi a carico del tratto gastrointestinale, come il morbo di Crohn o la colite ulcerosa e, in diversi modelli animali di colite indotta da sostanze chimiche o agenti patogeni (Belai et al., 1997; Castagliuolo et al., 1997; Gross and Pothoulakis, 2007).

L'indagine sulla neurotrasmissione eccitatoria colinergica ha rilevato una significativa riduzione delle fibre colinergiche AChE-positivo nella LMMP degli animali a 1, 8 e 10 W dalla somministrazione IG del virus (Harrington et al., 2010). Contemporaneamente, l'espressione dell'enzima ChAT è incrementata in maniera significativa in tutti i tempi di infezione, a suggerire un meccanismo compensatorio da parte del sistema colinergico utile

probabilmente nella risposta all'infezione virale nel SNE (Wang et al., 2003; Fernandez-Cabezudo et al., 2010).

La contrazione indotta dall'ACh endogena liberata in risposta all'EFS alla frequenza di 20 Hz è risultata significativamente ridotta a 1, 4, 8 e 10 W dall'infezione degli animali con HSV-1, confermando l'evidenza di un'alterata neurotrasmissione colinergica dovuta ad anomalie nel metabolismo dell'ACh.

Con l'obiettivo di determinare se le anomalie funzionali potessero dipendere da un alterato metabolismo di ACh, le colture tissutali derivate da LMMP di topi controllo o esposti all'infezione virale da 1-10 W sono state incubate con colina triziata e poi sottoposte a stimolo depolarizzante con KCl 60 mM. La depolarizzazione ha causato un ridotto rilascio di ACh marcata con trizio quasi in tutti i tempi di infezione virale a suggerire la compromissione dei meccanismi di rilascio, nonché di immagazzinamento o di produzione dell'ACh. E' verosimile che le alterazioni evidenziate nel sistema colinergico del SNE degli animali infettati siano una conseguenza della risposta infiammatoria dell'ospite verso il virus (Khan and Collins, 1994; Galeazzi et al., 2000; Poli et al., 2001). Questi dati sono un ulteriore sostegno all'ipotesi che l'HSV-1 è in grado di alterare il SNE ed innescare meccanismi di neuroplasticità a sua volta responsabili dell'anomala attività motoria intestinale.

I fattori neurotrofici sono delle proteine solubili essenziali per lo sviluppo, il mantenimento e la sopravvivenza dei neuroni nel SNC e periferico (Thoenen, 2000). L'identificazione dei fattori neurotrofici e dei relativi recettori nei neuroni maturi del tratto GI ne dimostra il coinvolgimento in un ampio spettro di effetti fisiologici, inclusa la conservazione del fenotipo di espressione dei neurotrasmettitori e dell'integrità intestinale (De Giorgio et al., 2000; Giaroni et al., 1999).

L'espressione dei fattori neurotrofici (NGF, NT-3, NT-5 e CNTF) in colture tissutali derivate da LMMP infettate per 24 ore con HSV-1 ha evidenziato la capacità del virus di determinare un aumento dell'espressione della neurotrofina NT-5 e del fattore neurotrofico CNTF, a suggerire il loro coinvolgimento nel mantenimento dell'omeostasi del SNE in presenza di stimoli dannosi quale l'infezione virale. Verosimilmente, la reazione neuroprotettiva indotta da queste neurotrofine potrebbe essere mediata attraverso la modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori e/o mediante una diretta interazione con le cellule del sistema immunitario (Vasina et al., 2006).

In conclusione, in questa prima parte del mio progetto di dottorato abbiamo confermato che l'infezione persistente nel SNE ad opera del virus neurotrofico HSV-1 causa un'evidente neuroplasticità che a sua volta determina un'anomala motilità intestinale. L'HSV-1 risulta quindi un utile modello per esplorare i meccanismi coinvolti nell'insorgenza di una neuropatia del SNE, responsabile di disturbi funzionali gastrointestinali (Qesari et al., 2011).

L'identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti in tali alterazioni potrebbe aprire la strada alla comprensione della fisiopatologia dei DFGI, allo scopo di delineare nuovi razionali approcci diagnostici e terapeutici. Per questo motivo, nella seconda parte del mio progetto di dottorato ci siamo posti l'obiettivo di indagare probabili meccanismi coinvolti

direttamente o indirettamente nell'insorgenza dei sintomi della neuropatia enterica indotta dall'infezione virale.

In base a risultati preliminari prodotti nel Laboratorio del Prof. Castagliuolo, dove ci sono evidenze che l'HSV-1 tenta di riattivarsi, in questa successiva serie di esperimenti siamo andati a valutare l'influenza della replicazione virale nella comparsa delle alterazioni fenotipiche, neurochimiche e funzionali del SNE infettando i topi con un ceppo di HSV-1 deficiente per il gene ICP27 (ICP27 KO), un gene immediatamente precoce indispensabile per la replicazione virale e quindi responsabile dell'infezione produttiva (Uprichard and Knipe, 1996). I seguenti esperimenti sono stati condotti su topi infettati con il medesimo protocollo con il virus ICP27 KO ad 1 e 8 W, intervalli di tempo dove l'infezione con HSV-1 ha determinato alterazioni significative.

L'infezione con ICP27 KO non ha alterato la morfologia del plesso mienterico degli animali a 1 e 8 W dall'infezione IG come evidenziato dallo studio della distribuzione delle proteine HuC/D, S100 β e periferina. Tuttavia, a 1 W dall'infezione con ICP27 KO, l'immunoreattività del marcatore HuC/D è apparsa ridotta, mentre a 8 W è ritornata paragonabile ai topi controllo. Il virus ICP27 KO sembrerebbe non alterare la morfologia dei gangli mienterici, il fenotipo e la densità delle cellule gliali, ma ridurre l'immunopositività all'HuC/D e la densità delle cellule neuronali HuC/D-positivo solamente a 1 W dall'infezione, a suggerire il coinvolgimento della replicazione virale principalmente nelle alterazioni del SNE che si osservano nella fase tardiva dell'infezione, cioè a 8 W.

La valutazione del sistema nitregico in seguito all'infezione con ICP27 KO non ha riportato alcuna alterazione a carico dei gangli mienterici degli animali infettati, né sull'espressione della proteina nNOS né sulla densità dei neuroni nitregici, ad indicare che la replicazione virale influisce sulla liberazione di NO (McCann et al., 2000).

Le alterazioni osservate durante l'infezione con HSV-1 potrebbero quindi essere imputabili, direttamente, a tentativi di replicazione da parte del virus e/o, indirettamente, ad una risposta immunitaria capace di esacerbare il danno prodotto dal virus.

L'immunopositività del VIP è risultata alterata a 8 W dall'infezione IG con ICP27 KO, mentre il segnale della SP è incrementato a partire dalla prima settimana di infezione. Il virus transgenico sembrerebbe quindi determinare un incremento del segnale del VIP e della SP, sia nella fase iniziale di infezione (SP) che nella fase tardiva (VIP e SP), a suggerire che il virus anche se incapace di replicarsi è in grado di attivare una cascata di risposte pro ed anti infiammatorie nel SNE degli animali sottoposti all'infezione.

La distribuzione delle fibre colinergiche AChE-positivo nel plesso mienterico degli animali infettati con il virus ICP27 KO ha subito a 1 W dall'infezione una significativa riduzione, ritornando a valori paragonabili a quelli dei topi controllo a 8 W. Questo dato è in accordo col dato funzionale, dove proprio ad una settimana di infezione con il virus ICP27 KO si ha una ridotta risposta contrattile a stimolazioni crescenti di EFS ad indicare che c'è una compromissione nella produzione e rilascio di ACh. Una riduzione dell'attività colinergica è stata dimostrata insorgere in presenza di encefalomieliti di origine virale e spesso è segno di infiltrato linfocitario (McCann et al., 2000; Gies et al., 2001), a suggerire che anche in

assenza di replicazione virale la presenza del virus induce la risposta immunitaria dell'ospite.

L'infezione in vitro con ICP27 KO in colture tissutali di LMMP, dopo 24 ore di incubazione, non ha riportato alterazioni nell'espressione dei fattori neurotrofici. Probabilmente, il virus non essendo capace di replicarsi determina un'infezione meno grave, incapace di stimolare segnali di neuroprotezione mediati da neurotrofine e fattori neurotrofici (NT-3, NT-5, NGF e CNTF) nel SNE.

La replicazione virale sembrerebbe quindi essere in parte coinvolta nel decorso della neuropatia del SNE (Qesari et al., 2012).

L'espressione dei recettori TLR nella rete nervosa enterica mette in luce l'esistenza di un sistema neuronale di sorveglianza ed evidenzia che derivati virali o batterici possano attivare risposte neuronali in maniera diretta, senza l'interposizione di cellule immunitarie o epiteliali intestinali (Barajon et al., 2009). E' ben noto negli ultimi anni che l'HSV-1 è in grado di innescare sia la risposta immunitaria innata che in seguito quella adattativa grazie all'interazione con i TLR2 (Morrison, 2004), ma ad oggi è ancora sconosciuta la loro distribuzione nel compartimento neuromuscolare del SNE.

L'indagine immunohistochimica condotta sulle criosezioni ottenute da fettine congelate di ileo di topo hanno dimostrato per la prima volta la presenza del TLR2 nella LMMP ed in particolare nei neuroni mienterici, grazie alla colocalizzazione di questi recettori con il marcatore neuronale anti-periferina. L'indagine citofluorimetrica eseguita successivamente sulle cellule dissociate della LMMP ha individuato la presenza del TLR2 non solo nei neuroni ma anche nelle cellule gliali e nelle cellule muscolari lisce, a suggerire che i TLR2 potrebbero partecipare alla via del segnale attraverso la quale i neuroni sensoriali sviluppano una rapida azione protettiva. Risulta verosimile che questo processo includa l'attivazione di riflessi locali, come il rilascio dalle terminazioni nervose di differenti mediatori e neuropetidi in grado di rispondere a stimoli dannosi (Holzer, 2006; Holzer, 2007).

Nel SNC, l'interazione tra HSV-1 e TLR2 determina l'espressione di citochine pro-infiammatorie volte a sopprimere l'infezione virale con il rischio di indurre un'esagerata risposta infiammatoria e di conseguenza neurodegenerazione e/o morte dell'animale (Kurt-Jones et al., 2004; Kurt-Jones et al., 2005; Wang et al., 2012). Partendo da questi presupposti e dall'osservazione di un'aumentata espressione tempo-dipendente di citochine pro-infiammatorie e del reclutamento di macrofagi non residenti attivati a 1 e 2 W con conseguente infiltrazione di cellule T CD8+ reattive a 8 W (Brun et al., 2011) dall'infezione con HSV-1, abbiamo deciso di valutare, nell'ultima parte del mio progetto di dottorato, il ruolo dei TLR2 nell'insorgenza della neuropatia enterica scatenata dall'infezione con HSV-1.

Per questo motivo, animali deficienti per il TLR2 sono stati impiegati ed infettati con HSV-1 per 1 e 8 W seguendo il medesimo protocollo di infezione virale. L'infezione degli animali TLR2 KO non ha alterato la morfologia dei gangli mienterici e nemmeno la densità delle cellule neuronali HuC/D-positive o delle cellule gliali S100 β positive rispetto ai topi TLR2 KO non infettati. La mancanza del gene che codifica per il TLR2 potrebbe, almeno in parte, svolgere un'azione protettiva nel SNE. Il segnale mediato dall'attivazione

dei TLR2 è stato descritto come "un'arma a doppio taglio" data la sua capacità di circoscrivere l'infezione inducendo risposte pro-infiammatorie che a loro volta potrebbero indurre un danno di natura neuroimmunitaria. In risposta all'infezione da HSV-1, la microglia del SNC mostra una sovraespressione dei TLR2. E' presumibile che una sovraregolazione di questi recettori possa promuovere una risposta pro-infiammatoria esagerata che amplifica in maniera eccessiva le risposte immunitarie (Aravalli et al., 2005). Infatti, topi TLR2 KO presentano una morte per encefalite da HSV-1 significativamente inferiore rispetto agli animali WT, a suggerire che l'azione delle citochine mediata dai TLR2 possa avere un effetto dannoso per l'ospite (Kurt-Jones et al., 2004; Kurt-Jones et al., 2005).

Nel nostro modello animale, l'assenza del TLR2 non sembra influenzare il segnale VIPergico e tachichinergico nel corso dell'infezione dato che il segnale dei neuropeptidi VIP e SP è aumentato anche nel plesso mienterico degli animali TLR2 KO. In questi animali, l'immunoreattività dell'enzima nNOS e la densità dei neuroni nitreggici nNOS-positivi sono risultati marcatamente ridotti. E' verosimile che tali alterazioni siano attribuibili ad altri recettori della stessa famiglia dei TLR. Infatti, l'HSV-1 ha dimostrato indurre una risposta pro-infiammatoria anche attraverso i recettori TLR9 (Olson and Miller, 2004). Questi recettori sono in grado di riconoscere i motivi CpG del DNA dell'HSV-1 e di attivare di conseguenza una cascata di segnali che portano all'attivazione dell'NF- κ B e alla secrezione di citochine (Luna et al., 2002).

L'infezione da HSV-1 nei topi TLR2 KO non ha riportato alterazioni nelle fibre colinergiche sia in termini di distribuzione dell'enzima AChE che di risposta contrattile dei preparati di ileo in seguito a stimolazione EFS, ad indicare il coinvolgimento della risposta immunitaria TLR2-dipendente nelle alterazioni del sistema colinergico e nell'anomala motilità intestinale da essa provocata.

Nelle colture tissutali derivate da LMMP di topi Ctrl TLR2 KO, l'espressione dei fattori neurotrofici non sembra subire rilevanti alterazioni in seguito all'infezione in vitro con HSV-1, a suggerire il ruolo dell'immunità innata nella modulazione della plasticità del SNE e nel rilascio di fattori neurotrofici (Saffrey and Burnstock 1994; von Boyen et al., 2002).

Concludendo, abbiamo dimostrato che le alterazioni del SNE indotte dall'infezione con HSV-1 sono il risultato di un'azione virale diretta amplificata dalla reazione del sistema immunitario innato attraverso l'attivazione del segnale TLR2-dipendente. In questa enteroneuropatia i TLR2 risultano essere un valido bersaglio molecolare dal momento che la loro modulazione potrebbe rappresentare un'utile approccio per il trattamento di neuropatie di origine virale.

BIBLIOGRAFIA

Abad, C. et al. (2012). "VIP in Inflammatory Bowel Disease: State of the Art." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*; 12(4):316-22

Abreu, MT. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." *Nat Rev Immunol*; 10(2): 131-44

Adam, B. et al. (2007). "Mechanisms of disease: genetics of functional gastrointestinal disorders-searching the genes that matter." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*; 4(2): 102-10

Akira, S. and Takeda, K. (2004). "Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice." *C R Biol*; 327(6): 581-9

Ammoury, RF. et al. (2009). "Functional gastrointestinal disorders: past and present." *World J Pediatr*; 5(2): 103-12

Anitha, M. et al. (2012). "Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling." *Gastroenterology*; 143(4): 1006-16.e4

Anitha, M. et al. (2006). "Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y." *Gastroenterology*; 131(4): 1164-78

Antonioli, L. et al. (2007). "Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis." *J Pharmacol Exp Ther*; 322: 435-42

Aravalli, RN. et al. (2005). "Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus." *J Immunol*; 175(7): 4189-93

Arduino, PG. and Porter, SR. (2008). "Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features." *J Oral Pathol Med*; 37(2): 107-21

Aubé, AC. et al., (2006). "Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption." *Gut*; 55(5): 630-7

Barajon, I. et al. (2009). "Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia." *J Histochem Cytochem*; 57(11): 1013-23

Barbara, G. et al. (1997). "Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice." *Gastroenterology*; 113(4): 1224-32

Barger, SW. et al. (1995). "S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation." *Brain Res*; 677(1): 167-70

Barkhordari, E. et al. (2009). "Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome." *J Clin Immunol*; 30(1): 74-9

Bassotti, G. et al., (2007). "Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies." *World J Gastroenterol*; 13(30): 4035-41

- Beaulieu, JM. et al. (2002).* "Induction of peripherin expression in subsets of brain neurons after lesion injury or cerebral ischemia." *Brain Res*; 946(2): 153-61
- Belai, A. et al. (1997).* "Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease." *Gut*; 40(6): 767-74
- Benardini, N. et al. (2012).* "Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis." *J Cell Mol Med*; 16(2): 318-27
- Boyer, L. et al. (2005).* "Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis." *Auton Neurosci*; 117: 41-53
- Bradley, JC. et al. (1997).* "Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum." *Cell Tissue Res*; 289(3): 455-61
- Brun, P. et al. (2010).* "Herpes simplex virus type 1 infection of the rat enteric nervous system evokes small-bowel neuromuscular abnormalities." *Gastroenterology*; 138(5): 1790-801
- Brun, P et al. (2012).* "Role of Toll-Like Receptor 2 in intestinal immune response and dysfunction induced by Herpes Symplex virus type 1 infection of murine enteric nervous system." Abstract; *Digestive Disease Week: May 19-22, San Diego, U.S.A*
- Bush, TG. et al. (1998).* "Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice." *Cell*; 93(2): 189-201
- Cabarrocas, J. et al. (2003).* "Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease." *Glia*; 41(1): 81-93
- Cairns, NJ. et al. (2003).* "Molecular neuropathology of transgenic mouse models of Down syndrome." *J Neural Transm Suppl*; (61): 289-301
- Camilleri, M. (2009).* "Genetics and irritable bowel syndrome: from genomics to intermediate phenotype and pharmacogenetics." *Dig Dis Sci*; 54(11): 2318-24
- Cario, E. (2010).* "Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later." *Inflamm Bowel Dis*; 16(9): 1583-97
- Cario, E. et al. (2007).* "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." *Gastroenterology*; 132(4): 1359-74
- Cario, E. et al. (2007).* "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." *Gastroenterology*; 132(4): 1359-74
- Castagliuolo, I. et al. (1997).* "Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats." *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(9): 4788-93
- Chen, JJ. et al. (2003).* "Latent and lytic infection of isolated guinea pig enteric ganglia by varicella zoster virus." *J Med Virol*; 70 Suppl 1: S71-8

Cirillo, C. et al. (2011). "Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production." *Neurogastroenterol Motil*; 23(9): e372-82

Clarke, G. et al. (2009). "Irritable bowel syndrome: towards biomarker identification." *Trends Mol Med*;15:478-89

Corazziari, E. (2004). "Definition and epidemiology of functional gastrointestinal disorders." *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 18(4): 613-31.

Cornet, A. et al. (2001). "Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease?" *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98(23): 13306-11

Cuadrado, A. et al. (2002). "HuD binds to three AU-rich sequences in the 3'-UTR of neuroserpin mRNA and promotes the accumulation of neuroserpin mRNA and protein." *Nucleic Acids Res*; 30: 2202-11

De Giorgio, R. and Camilleri, M. (2004). "Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology." *Neurogastroentero. Motil*; 16: 515-31

De Giorgio, R. et al. (2000). " Neurotrophin-3 and neurotrophin receptor immunoreactivity in peptidergic enteric neurons." *Peptides*; 21(9): 1421-6

De Giorgio, R. et al. (2003). "Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility." *Gastroenterology*; 125: 70-9

De Giorgio, R. et al. (2004). "Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system." *Gastroenterology*; 126(7): 1872-83

Delgado, M. and Ganea, D. (2003). "Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma." *FASEB J*; 17(13): 1922-4

Dijkstra, G. et al. (2004). "Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract." *Curr Opin Investig Drugs*; 5(5): 529-36

Donato, R. (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." *Int J Biochem Cell Biol*; 33(7): 637-68

Donato, R. et al. (2009). "S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal." *Biochim Biophys Acta*; 1793(6): 1008-22

Drossman, DA. (2006). "The functional gastrointestinal disorders and the Rome III Process." *Gastroenterology*; 130: 1377-1390

Efstathiou, S. and Preston, CM. (2005). "Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency." *Virus Res*; 111(2): 108-19

Ekblad, E. and Bauer, AJ. (2004). "Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity." *Neurogastroenterol Motil*; 16 Suppl 1: 123-8

Elder, GA. et al. (1999). "Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in the mid-sized neurofilament subunit." *J Cell Biol*; 146: 181-92

Eng, LF. et al. (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." *Neurochem Res*; 25(9-10): 1439-51

Esposito, G. et al. (2007). "Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease." *Gastroenterology*; 133: 918-25

Facco, M. et al. (2008). "T cells in the myenteric plexus of achalasia patients show a skewed TCR repertoire and react to HSV-1 antigens." *Am J Gastroenterol*; 103(7): 1598-609

Fanarraga, ML. et al. (1999). "Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation." *Eur J Neurosci*; 11(2): 517-27

Feng, B. et al. (2012). "Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 302(10): G1085-98

Fernandez-Cabezudo, MJ. et al. (2010). "Cholinergic stimulation of the immune system protects against lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Immunology*; 130(3): 388-98

Fichna, J. and Storr, MA. (2012). "Brain-Gut Interactions in IBS." *Front Pharmacol*; 3: 127

Fournier, AE. and McKerracher, L. (1997). "Expression of specific tubulin isotypes increases during regeneration of injured CNS neurons, but not after the application of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." *J Neurosci*; 17(12): 4623-32

Furness, JB. (2012). "The enteric nervous system and neurogastroenterology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 9(5): 286-94

Furness, JB. et al. (1995). "Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract." *Gastroenterology*; 108(2): 554-63

Furness, JB. et al. (1998). "Intrinsic primary afferent neurons of the intestine." *Prog Neurobiol*; 54(1): 1-18

Furness, JB. et al. (2004). "Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine." *Prog. Neurobiol*; 72: 143-164

Galeazzi, F. et al. (2000). "Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 278(2): G259-65

Garthwaite, J. (2010). "New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications." *Mol Cell Biochem*; 334(1-2): 221-32

Giaroni, C. et al. (1999). "Plasticity in the enteric nervous system." *Gastroenterology*; 117(6): 1438-58

Gies, U. et al. (2001). "Cortical cholinergic decline parallels the progression of Borna virus encephalitis." *Neuroreport*; 12(17): 3767-72

Giordano, C. et al. (2008). "Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion." *Am J Pathol*; 173(4): 1120-8

Goyal, RC. and Hirano, I. (1996). "Enteric nervous system." *N Engl J Med*; 334(17): 1106-15

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

Halland, M. and Talley, NJ. (2012). "New treatments for IBS." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 10(1): 13-23

Hanevik, K. et al. (2009). "Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection." *BMC Gastroenterol*; 9: 27

Hardwicke, MA. and Sandri-Goldin, RM. (1994). "The herpes simplex virus regulatory protein ICP27 contributes to the decrease in cellular mRNA levels during infection." *J Virol*; 68(8): 4797-810

Harrington, AM. et al. (2010). "Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system." *Prog Histochem Cytochem*; 44(4): 173-202

Helfand, BT. et al. (2003). "A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells." *Mol Biol Cell*; 14: 5069-81

Ho, WZ. et al. (1997). "Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor." *J Immunol*; 159(11): 5654-60

Holzer, P. (2006). "Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: Blood flow regulation and tissue protection." *Auton Neurosci*; 125(1-2): 70-5

Holzer, P. (2007). "Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense." *Curr Opin Pharmacol*; 7(6): 563-9

Huttunen, HJ. et al. (2000). "Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation." *J Biol Chem*; 275(51): 40096-105

Ippolito, C. et al. (2009). "Quantitative evaluation of myenteric ganglion cells in normal human left colon: implications for histopathological analysis." *Cell Tissue Res*; 336: 191-201

Iwasaki, Y. et al. (1997). "S100 beta prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section." *J Neurol Sci*; 151(1): 7-12

Jiang, YQ. and Oblinger, MM. (1992). "Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development." *J Cell Sci*; 103 (Pt 3): 643-51

Johnson, G. et al. (1995). "Acetylcholinesterase of human intestinal tissue affected by Hirschsprung's disease: effect of magnesium chloride on isoforms." *Clin Chim Acta*; 243(2): 115-28

Jones, MP. et al. (2007). "Functional gastrointestinal disorders: an update for the psychiatrist." *Psychosomatics*; 48: 93-102

Karagiannides, I. et al. (2006). "Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103(13): 5207-12

Kawai, T. and Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol*; 11(5): 373-84

Kawashima, K. et al. (2007). "Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells." *Life Sci*; 80(24-25): 2314-9

Khan, I. and Collins, SM. (1994). "Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat." *Gastroenterology*; 107(3): 691-700

Knipe, DM. and Cliffe, A. (2008). "Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection." *Nat Rev Microbiol*; 6(3): 211-21

Kotsakis, A. et al. (2001). "Microtubule reorganization during herpes simplex virus type 1 infection facilitates the nuclear localization of VP22, a major virion tegument protein." *J Virol*; 75(18): 8697-711

Kramer, MF. et al. (2003). "Latent herpes simplex virus infection of sensory neurons alters neuronal gene expression." *J Virol*; 77: 9533-41

Kraneveld, AD. et al. (2008). "Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: future therapeutic targets." *Eur J Pharmacol*; 585(2-3): 361-74

Kriz, J. et al. (2000). "Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H." *Brain Res*; 885: 32-44

Kurt-Jones, EA. et al. (2004). "Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis." *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101(5): 1315-20

Kurt-Jones, EA. et al. (2005). "The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates." *J Infect Dis*; 191(5): 746-8

Lai, JP. et al. (1998). "Human lymphocytes express substance P and its receptor." *J Neuroimmunol*; 86(1): 80-6

Larauche, M. et al. (2012). "Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies." *Exp Neurol*; 233(1): 49-67

Lariviere, RC. and Julien, JP. (2004). "Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease." *J Neurobiol*; 58(1): 131-48

Lee, WC. et al. (2012). "A neuronal death model: overexpression of neuronal intermediate filament protein peripherin in PC12 cells." *J Biomed Sci*; 19:8

Lieb, K. et al. (1997). "The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells." *J Immunol*; 159(10): 4952-8

Liem, RK. and Messing, A. (2009). "Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease." *J Clin Invest*; 119(7): 1814-24

Lima, GK. et al. (2010). "Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection." *Am J Pathol*; 177(5): 2433-45

Lomax, AE. et al. (2005). "Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation." *Neurogastroenterol Motil*; 17(1): 4-15

Luna, C. et al. (2002). "Characterization of four Toll related genes during development and immune responses in *Anopheles gambiae*." *Insect Biochem Mol Biol*; 32(9): 1171-9

Mayer, EA. and Collins, SM. (2002). "Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders." *Gastroenterology*; 122(7): 2032-48

Mayer, EA. et al. (2008). "Functional GI disorders: from animal models to drug development." *Gut*; 57(3): 384-404

McCann, SM. et al. (2000). "The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection." *Acad Sci*; 917: 4-18

McCarthy, AM. et al. (1989). "Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient." *J Virol*; 63(1): 18-27

McLean, J. et al. (2010). "Distinct biochemical signatures characterize peripherin isoform expression in both traumatic neuronal injury and motor neuron disease." *J Neurochem*; 114(4): 1177-92

Middeldorp, J. and Hol, EM. (2011). "GFAP in health and disease." *Prog Neurobiol*; 93(3): 421-43

Morrison, LA. (2004). "The Toll of herpes simplex virus infection." *Trends Microbiol*; 12(8): 353-6

Murphy, EM. et al. (2007). "Quantification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to Hu, choline acetyltransferase and nitric oxide synthase." *Neurogastroenterol Motil*; 19: 126-134

Natale, G. et al. (2008). "Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation." *Neurogastroenterol Motil*; 20(7): 741-9

Neunlist, M. et al. (2007). "Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 292(1): G231-41

Okano, HJ. and Darnell, RB. (1997). "A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons." *J Neurosci*; 17(9): 3024-37

Okun, E. et al. (2009). "Toll-like receptors in neurodegeneration." *Brain Res Rev*; 59(2): 278-92.

Olson, JK. and Miller, SD. (2004). "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs." *J Immunol*; 173(6): 3916-24

Omary, MB. (2009). "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases." *J Clin Invest*; 119(7): 1756-62

Perng, GC. and Jones, C. (2010). "Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle." *Interdiscip Perspect Infect Dis*; 2010: 262415

Perng, GC. et al. (2000). "Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript." *Science*; 287(5457): 1500-3

Perrone-Bizzozero, N. and Bolognani, F. (2002). "Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity." *J Neurosci Res*; 68: 121-6

Phillips, RJ. et al. (2004). "Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat." *Anat Embryol*; 209: 19-30

Poli, E. et al. (2001). "Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis." *Neurochem Res*; 26: 1085-93

Qesari, M. et al. (2012). "Severity of enteric nervous system neuropathy during Herpes simplex virus type 1 infection is related to viral replication" Oral communication; 6th European Congress of Pharmacology: July 17-20, Granada, Spain

Qesari, M. et al. (2011). "Neuropatia enterica in un modello murino di infezione del sistema nervoso enterico con herpes simplex virus di tipo 1." Abstract; XIV Congresso Nazionale GISMAD: 18-19 Marzo, Mestre, Italia

Qesari, M. et al. (2011). "Herpes Simplex virus type-1 infection of the enteric nervous system leads to gut neuroanatomical and neurochemical abnormalities." Abstract; 35° Congresso Nazionale della SIF: 14-17 Settembre, Bologna, Italia

Qin, HY. et al. (2012). "Key factors in developing the trinitrobenzene sulfonic acid-induced post-inflammatory irritable bowel syndrome model in rats." *World J Gastroenterol*; 18(20): 2481-92

Quigley, EM. (1999). "Disturbances in small bowel motility." *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 13: 385-95

Quigley, EM. et al. (2012). "A global perspective on irritable bowel syndrome: a consensus statement of the World Gastroenterology Organisation Summit Task Force on irritable bowel syndrome." *J Clin Gastroenterol*; 46(5): 356-66

Rakoff-Nahoum, S. et al. (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell*; 118(2): 229-41

Rakoff-Nahoum, S. et al. (2006). "Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis." *Immunity*; 25(2): 319-29

Reske, A. et al. (2007). "Understanding HSV-1 entry glycoproteins." *Rev Med Virol*; 17(3): 205-15

Ringheim, GE. and Conant, K. (2004). "Neurodegenerative disease and the neuroimmune axis (Alzheimer's and Parkinson's disease, and viral infections)." *J Neuroimmunol*; 147(1-2): 43-9

Rivera, RL. (2011). "The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies." *Neurogastroenterol Motil*; 23(11): 980-8

Robertson, J. et al. (2001). "Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α ." *Journal of Cell Biology*; 155: 217-226

Rodrigues, D. M. et al. (2011). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system." *Neurogastroenterol Motil*; 23(2): e44-56

Roizman, B. and Knipe, DM. (2007). "Herpes simplex viruses" p. 2501-2602. In Knipe, DM., Howley, PM., Griffin, DE., Lamb, RA., Martin, MA., Roizman, B. and Straus, SE. *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA

Rolls, A. et al. (2007). "Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis." *Nat Cell Biol*; 9(9): 1081-8

Rühl, A. et al. (2001). "Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat." *Neurogastroenterol Motil*; 13(1): 95-106

Rühl, A. et al. (2004). "Enteric glia." *Neurogastroenterol Motil*; 16 Suppl 1: 44-9

Saeed, RW. et al. (2005). "Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation." *J Exp Med*; 201(7): 1113-23

Saffrey, MJ. and Burnstock, G. (1994). "Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system." *J Auton Nerv Syst*; 49(3): 183-96

Samaniego, LA. et al. (1995). "Functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4." *J Virol*; 69(9): 5705-15

Sandgren, K et al. (2003). "Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture." *J Neurosci Res*; 72(5): 595-602

Sandri-Goldin, RM. (2008). "The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection." *Front Biosci*; 13: 5241-56

Sanovic, S. et al. (1999). "Damage to the enteric nervous system in experimental colitis." *Am J Pathol*; 155: 1051-7

Selgrad, M. et al. (2009). "JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction." *Gut*; 58: 25-32

Shah, RN. et al. (2004). "Achalasia presenting after operative and nonoperative trauma." *Dig Dis Sci*; 49(11-12): 1818-21

Sharkey, KA. and Kroese, AB. (2001). "Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators." *Anat Rec*; 262(1): 79-90

Sloane, JA. et al. (2010). "Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2." *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107(25): 11555-60

Soberman, RJ. Et al. (2012). "CD200R1 supports HSV-1 viral replication and licenses pro-inflammatory signaling functions of TLR2. *PLoS One*; 7(10): e47740

Sofroniew, MV. (2005). "Reactive astrocytes in neural repair and protection." *Neuroscientist*; 11(5): 400-7

Takeda, K. and Akira, S. (2004). "Microbial recognition by Toll-like receptors." *J Dermatol Sci*; 34(2): 73-82

Takeda, K. and Akira, S. (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol*; 17(1): 1-14

Talley, NJ. (2008). "Functional gastrointestinal disorders as a public health problem." *Neurogastroenterol Motil*; 20 Suppl 1: 121-9

Terhorst, D. et al. (2007). "Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic individuals are not impaired in their pro-inflammatory response to toll-like receptor ligands." *Clin Exp Allergy*; 37(3): 381-90

Texereau, J. et al. (2005). "The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections." *Clin Infect Dis*; 41 Suppl 7: S408-15

Thoenen, H. (2000). "Neurotrophins and activity-dependent plasticity." *Prog Brain Res*; 128: 183-91

Tjong, YW. *et al.* (2011). "Role of neuronal nitric oxide synthase in colonic distension-induced hyperalgesia in distal colon of neonatal maternal separated male rats." *Neurogastroenterol Motil*; 23(7): 666-e278

Törnblom, H. *et al.* (2002). "Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome." *Gastroenterolog.*; 123: 1972-9

Törnblom, H. *et al.* (2007). "Autoantibodies in patients with gut motility disorders and enteric neuropathy." *Scand J Gastroenterol*; 42: 1289-93

Turer, EE. *et al.* (2008). "Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20." *J Exp Med*; 205(2): 451-64

Uprichard, SL. and Knipe, DM. (1996). "Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes." *J Virol*; 70(3): 1969-80

Vasina, V. *et al.* (2006). "Enteric neuroplasticity evoked by inflammation." *Auton Neurosci*; 126-127: 264-72

Vincent, AM. *et al.* (2007). "Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress." *Endocrinology*; 148(2): 548-58

Voltz, RD. *et al.* (1997). "Paraneoplastic encephalomyelitis: an update of the effects of the anti-Hu immune response on the nervous system and tumour." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 63(2): 133-6

von Boyen, GB. *et al.* (2004). "Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia." *Gut*; 53(2): 222-8

von Boyen, GB. *et al.* (2001). "Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors." *J Gastroenterol*; 37(8): 583-8

Wang, H. *et al.* (2003). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation." *Nature*; 421(6921): 384-8

Wang, JP. *et al.* (2012). "Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system." *J Virol*; 86(4): 2273-81

Weir, JP. (2001). "Regulation of herpes simplex virus gene expression." *Gene*; 271(2): 117-30

Zambrano, A. *et al.* (2008). "Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1." *J Alzheimers Dis*; 14(3): 259-69

Zhao, D. *et al.* (2002). "Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases." *Biochem J*; 368(Pt 2): 665-72

Zhou, L. and Zhu, DY. (2009). "Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications." Nitric Oxide; 20(4): 223-30

Zoppellaro, C. (2010). "Infezione da Herpes simplex virus-1 nel sistema nervoso enterico: un innovativo modello di alterazione della motilità intestinale." Tesi di Dottorato della Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Padova