



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

*Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia "E. Meneghetti"*

**DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA,  
TERAPIA RIANIMATIVA E INTENSIVA  
CICLO XX**

**Metabolismo dell'adenosina:  
correlazione tra processi biochimici e contrattilità  
nella muscolatura liscia intestinale in condizioni normali e patologiche**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Cotutore:** Dott. Maria Cecilia Giron

**Dottorando:** Anna Bin

31 gennaio 2008

Le scoperte consistono  
nel vedere ciò che tutti hanno visto  
e pensare ciò che nessuno ha pensato  
Albert Szent-Gyorgyi

*Ai miei genitori  
e a Roberto*

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	pag. 1
<b>SUMMARY</b> .....	pag. 3
<b>INTRODUZIONE</b> .....	pag. 5
Adenosina come potenziale agente endogeno antinfiammatorio	pag. 6
<i>Vie di sintesi dell'adenosina</i>	pag. 7
<i>I recettori per l'adenosina nell'intestino</i>	pag. 9
Adenosina e infiammazione intestinale: ricerca di nuove strategie terapeutiche	pag. 11
Herpes Simplex Virus-1: un nuovo modello di alterazione della motilità intestinale	pag. 14
<b>METODI</b> .....	pag. 19
Animali	pag. 19
<i>Allestimento di un modello animale di infezione enterica da HSV-1</i>	pag. 19
Esperimenti di contrattilità su ileo isolato di ratto	pag. 20
<i>Procedura sperimentale</i>	pag. 21
Colture cellulari di muscolatura liscia intestinale di ratto	pag. 21
Valutazione del metabolismo purinico nell'ileo di ratto	pag. 23
<i>Preparazione e trattamento del tessuto e delle cellule</i>	pag. 23
<i>Analisi qualitativa e quantitativa delle purine</i>	pag. 24
<i>Analisi statistica dei risultati</i>	pag. 25
Immunofluorescenza	pag. 25
<i>Studi di immunoistochimica (IHC)</i>	pag. 25
<i>Studi di immunocitochimica (ICC)</i>	pag. 27
<i>Acquisizione delle immagini con microscopia confocale</i>	pag. 27
Immunoprecipitazione e western blotting	pag. 28
<b>MATERIALI</b> .....	pag. 31

Soluzione fisiologica (Tyrode)	pag. 31
Sostanze utilizzate per colture cellulari, esperimenti di IHC, ICC e immunoblot	pag. 31
Sostanze utilizzate per gli studi di contrattilità e per la valutazione del metabolismo purinico	pag. 31
<b>RISULTATI</b> .....	pag. 33
Risposta della muscolatura liscia di ileo di ratto all'AMP ciclico esogeno	pag. 33
L'AMP ciclico esogeno è fonte di metaboliti adeninici extracellulari	pag. 36
Influenza del trattamento <i>in vivo</i> con reserpina sull'effetto contratturante dell'AMP ciclico e sulla sua degradazione nell'ileo di ratto	pag. 37
Influenza del trattamento con AMP esogeno sull'accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto	pag. 39
Studi di immunistochemica per CD73, ADA e recettori P1 nell'ileo di ratto	pag. 43
Coltura primaria di ISMC di ratto	pag. 48
Caratterizzazione delle ISMC in coltura	pag. 49
Cinetica di scomparsa dell'AMP esogeno e di formazione dei suoi metaboliti nel mezzo di incubazione delle ISMC di ratto	pag. 51
Ruolo di CD73 nel metabolismo dell'AMP nelle ISMC di ratto	pag. 53
Influenza della concentrazione di AMP esogeno sulla formazione dei suoi metaboliti	pag. 53
Cinetica di scomparsa di [ <sup>3</sup> H]-AMP ciclico e di formazione dei suoi metaboliti nel mezzo di incubazione delle ISMC di ratto	pag. 56
Studi di immunocitochemica per CD73, ADA e recettori P1 nelle ISMC di ratto	pag. 58
Influenza del trattamento <i>in vivo</i> con HSV-1 sull'espressione degli enzimi direttamente coinvolti nel metabolismo dell'adenosina nell'ileo di ratto	pag. 62
Influenza del trattamento <i>in vivo</i> con HSV-1 sull'espressione dei recettori purinergici P1 nell'ileo di ratto	pag. 65
<b>DISCUSSIONE</b> .....	pag. 71
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag. 97

## ABBREVIAZIONI

<b>8-PT</b>	8-fenilteofillina
<b>ADA</b>	adenosina deaminasi
<b>AOPCP</b>	$\alpha,\beta$ -metileneadenosina-5'-difosfato
<b>cAR</b>	recettori per l'AMP ciclico
<b>CD73</b>	ecto-5'nucleotidasi
<b>CNT</b>	trasportatori concentrativi per i nucleosidi
<b>Con A</b>	concanavalina A
<b>DPSPX</b>	1,3-dipropil-8-p-sulfofenilxantina
<b>Ecto-ADA</b>	ecto-adenosina deaminasi
<b>Ecto-PDE</b>	ecto-fosfodiesterasi
<b>ENT</b>	trasportatori equilibrativi per i nucleosidi
<b>GPCR</b>	recettori accoppiati alle proteine G
<b>HSV-1</b>	Herpes Simplex Virus di tipo 1
<b>IBD</b>	malattie infiammatorie intestinali croniche
<b>IBMX</b>	3-isobutil-1-metilxantina
<b>IBS</b>	sindrome dell'intestino irritabile
<b>ICC</b>	immunocitochimica
<b>IHC</b>	immunoistochimica
<b>IL</b>	interleuchina
<b>ISMC</b>	cellule muscolari lisce intestinali
<b>PA</b>	fosfatasi alcalina
<b>PDE</b>	fosfodiesterasi
<b>PKA</b>	protein chinasi A
<b>PKC</b>	protein chinasi C
<b>R</b>	recettore
<b>SMC</b>	cellule muscolari lisce
<b>SNC</b>	sistema nervoso centrale
<b>SNE</b>	sistema nervoso enterico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
<b>ZO-1</b>	Zonula Occludens-1



## RIASSUNTO

A livello intestinale, l'esposizione continua ad agenti patogeni e non determina una crescente attivazione del sistema immunitario nell'epitelio, facilitata probabilmente da un'ipersensibilità del sistema stesso e da alterazioni della funzione di barriera (Rijnierse *et al.*, 2007). È noto che una risposta infiammatoria prevalentemente a livello mucosale può causare alterazioni della motilità e della neurotrasmissione, anche lontano dal sito di infezione, provocando così un disturbo generale e diffuso nella fisiologia dell'intestino (Collins *et al.*, 2001).

Nel tratto gastrointestinale, l'AMP ciclico svolge un ruolo importante nel controllo della contrattilità del muscolo liscio ed esiste un sistema di estrusione dalle cellule che ne promuove l'accumulo nello spazio extracellulare, dove esso rappresenta un'importante fonte di adenosina attraverso la via extracellulare AMP ciclico-adenosina (Giron *et al.*, 2008).

Nella prima parte del mio lavoro di dottorato, ho valutato l'effetto dell'AMP ciclico sulla tensione sviluppata dalla muscolatura dell'ileo isolato di ratto, dove esso induce una rapida contrazione che risulta proporzionale alla concentrazione impiegata. Mediante l'uso di specifici inibitori enzimatici di endo- ed ecto-fosfodiesterasi e di ecto-5'nucleotidasi è stato dimostrato che l'effetto contratturante dell'AMP ciclico sulla muscolatura liscia è in parte diretto e in parte mediato dai suoi metaboliti. In particolare, il coinvolgimento dell'adenosina e dei recettori P1 è stato messo in evidenza dal trattamento dei preparati isolati con adenosina deaminasi (ADA) e 8-fenilteofillina, mentre la forskolina ha permesso di escludere un'influenza da parte dell'AMP ciclico estruso dalla cellula. D'altra parte, gli esperimenti condotti con [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico hanno dimostrato che il nucleotide ciclico non viene trasportato all'interno delle cellule, a comprovare l'effetto della purina esclusivamente in sede extracellulare. Sia l'effetto contratturante sia il metabolismo del nucleotide ciclico nell'ambiente extracellulare sembrano, inoltre, influenzati dalla componente simpatica che innerva l'intestino.

Vista l'importanza dell'adenosina in questa sede, l'attenzione del mio lavoro di dottorato si è focalizzata sugli enzimi direttamente coinvolti nel metabolismo del nucleoside extracellulare, CD73 ed ecto-ADA. Studi condotti incubando strip di ileo con AMP esogeno ne hanno dimostrato la presenza e l'elevata attività, sulla quale l'influenza del sistema adrenergico è tutt'altro che trascurabile. In parallelo, tramite tecniche di immunofluorescenza su sezioni di ileo, è stata rilevata l'espressione costitutiva ma non uniforme degli stessi enzimi, CD73 ed ADA, e dei recettori purinergici P1 a livello della parete intestinale.

Per meglio comprendere il ruolo di CD73 ed ecto-ADA nel controllo dei livelli dell'adenosina

nel muscolo liscio, è stato messo a punto il metodo per ottenere colture primarie di cellule di muscolatura liscia intestinale (ISMC) provenienti dallo strato di muscolatura longitudinale mediante la tecnica dell'espianto. L'incubazione delle ISMC con AMP esogeno per tempi differenti in presenza o in assenza di inibitori enzimatici ( $\alpha,\beta$ -metileneadenosina-5'-difosfato, concanavalina A, levamisolo) ha permesso di valutare direttamente, mediante tecnica HPLC, la capacità delle ISMC di metabolizzare l'AMP esogeno e di identificare CD73 come l'unico enzima in grado di degradare il nucleotide sulla superficie di queste cellule. Sulla membrana delle ISMC, l'attività di CD73 sembra essere molto più intensa rispetto a quella di ecto-ADA. Ad ulteriore conferma della diversa attività catalitica dei due enzimi sono i risultati ottenuti dallo studio del metabolismo di [ $^3$ H]-AMP ciclico che hanno permesso di dimostrare l'esistenza della via extracellulare AMP ciclico-adenosina anche nelle ISMC. Saggi di immunocitochimica analoghi a quelli condotti sul tessuto hanno evidenziato la causa della differenza funzionale di CD73 ed ecto-ADA: nelle ISMC, CD73 risulta distribuito esclusivamente sulla membrana plasmatica, mentre ADA appare principalmente un enzima citosolico. Inaspettatamente, anche la valutazione dell'espressione dei recettori P1 ne evidenzia una localizzazione principalmente citoplasmatica.

Nell'ultima parte del mio studio è stato impiegato un nuovo modello animale di alterazione della motilità intestinale causata da Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1) presente in forma di latenza nel sistema nervoso enterico. Mediante tecnica immunofluorimetrica, sull'ileo di questi animali è stata dimostrata un'alterazione nel profilo di espressione di CD73, ADA e recettori P1 causata non soltanto dalla presenza di HSV-1 nell'intestino, ma anche dalla progressione dell'infezione. Il trattamento con HSV-1, pur non inducendo un'inflammazione visibile istologicamente, sembra responsabile sia dell'alterazione del sistema adenosinergico che della dismotilità intestinale.

Alla luce dei risultati ottenuti, il mio lavoro di ricerca sottolinea l'importanza della componente purinergica nel controllo della motilità intestinale in condizioni fisiologiche e patologiche, e delinea CD73, ADA e recettori P1 come potenziali marker prognostici e/o target farmacologici nelle patologie neuromuscolari del sistema gastrointestinale.

## SUMMARY

In the gastrointestinal tract continued or repeated exposure to pathogens and non-pathogenic antigens may induce activation of epithelial immune system, potentially through dysregulation of barrier functions (Rijnierse *et al.*, 2007). It is well recognized that an inflammatory response, which is largely restricted to the intestinal mucosa, may cause profound changes in the function of smooth muscle and enteric nerves. Some of these changes also occur at remote non-inflamed sites, producing extensive disturbances in gut physiology (Collins *et al.*, 2001).

In the intestine, cyclic AMP has been shown to play a key role in the control of smooth muscle tension. This compound can be extruded from cells upon activation of adenylate cyclase leading to adenosine accumulation via the extracellular cyclic AMP-adenosine pathway (Giron *et al.*, 2008).

In my PhD research work, I first evaluated the mechanical effects of cyclic AMP on rat isolated ileum. Exogenous cyclic AMP concentration-dependently increased intestinal smooth muscle tension. Pretreatment of the preparations with specific inhibitors of ecto- and endo-phosphodiesterases and ecto-5'-nucleotidase demonstrated that extracellular cyclic AMP may act on smooth muscle both directly and indirectly through its degradation products. In particular, it was shown that extracellular cyclic AMP-induced ileum contraction was partially inhibited by adenosine inactivation using adenosine deaminase (ADA) or receptor blockade using 8-phenyltheophylline. Moreover, forskolin, that causes endogenous cyclic AMP accumulation, induced concentration-dependent ileum relaxation, supporting distinct roles for the extracellular cyclic AMP-adenosine pathway as opposed to intracellular-generated cyclic AMP. Accordingly, experiments with [<sup>3</sup>H]-cyclic AMP revealed that [<sup>3</sup>H]-cyclic AMP uptake in ileum strips was negligible. These findings corroborate the view that cyclic AMP is not only a second messenger but also a source of adenosine.

*In vivo* treatment of the animals with reserpine affects both contractile effects and metabolic fate of cyclic AMP in the intestine, indicating that the sympathetic system is involved in the modulation of the extracellular cyclic AMP-adenosine pathway.

Considering the significant role of adenosine in regulating intestinal motility, my attention was then focused on CD73 and ecto-ADA, enzymes which directly control extracellular adenosine metabolism. By monitoring the fate of AMP and the generation of adenosine and inosine in the incubation medium of ileum strips, the presence of highly active CD73 and ADA enzymes was demonstrated and the sympathetic system seems to play an important role in regulating these enzymes. The constitutive but regionally distinctive distribution of

CD73, ADA and P1 receptors in the intestinal tissue was confirmed by immunofluorescence experiments performed on frozen ileum sections.

In order to understand the functional role of the CD73 and ADA in the smooth muscle, a method for setting up primary cultures of longitudinal intestinal smooth muscle cells (ISMCs) from rat ileum was developed by using the explant technique. Enzyme activity on ISMC surface was investigated by incubation of these cells with exogenous AMP and HPLC detection of nucleotide metabolites. By using specific inhibitors ( $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-diphosphate, concanavalin A, levamisole) CD73 was confirmed to be the only enzyme able to degrade AMP on ISMC surface. On the other hand, high CD73 activity was not followed by activation of ecto-ADA, based on the experiments evaluating the fate of [<sup>3</sup>H]-cyclic AMP in the culture medium of ISMCs. These experiments also demonstrated that the extracellular cyclic AMP-adenosine pathway is also present in ISMCs. Immunocytochemical analyses confirmed high CD73 expression on the ISMC surface and revealed that ADA and adenosine receptors are primarily localized in the cytosol.

Finally, I evaluated whether the expression of CD73, ADA and P1 receptors in the rat ileum could be affected by an *in vivo* latent infection in the enteric nervous system induced by Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1). It has been shown that HSV-1 alters intestinal motility and transit, and is currently under evaluation as a potential animal model of gut motility disorders. Immunofluorescence analysis indicated that alterations in the expression of CD73, ADA and P1 receptors were induced not only by HSV-1 latency in the intestine, but also by the progress of infection. *In vivo* treatment with HSV-1 appears to be responsible for adenosinergic system modifications and intestinal dysmotility, even if histological examination showed no tissue damage.

In conclusion, this PhD thesis highlights the paramount role of CD73, ADA and adenosine receptors in the control of intestinal motility under physiopathological conditions. Furthermore, these proteins should be regarded as potential novel prognostic markers and/or pharmacological targets in neuromuscular abnormalities of the gastrointestinal tract.

## INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie intestinali croniche (IBD) e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) sono le più importanti disfunzioni a carico del tratto digerente sia per l'elevata frequenza con cui si presentano nei paesi industrializzati che per il rilevante impatto socio-economico (Gwee, 2005; Baumgart e Carding, 2007).

L'IBD è considerata una malattia autoimmune caratterizzata da un'alternanza tra episodi infiammatori e remissione dei sintomi, che comprendono crampi e dolore addominale, perdita di peso, diarrea, cattiva digestione, sanguinamento rettale e malessere generale. L'IBS invece si manifesta come un disturbo intestinale cronico ma di entità moderata associato ad alterazione della motilità (diarrea o costipazione) e a ipersensibilità viscerale; i sintomi in questo caso non sono correlati ad anomalie strutturali e biochimiche, anche se può essere presente un modesto grado di infiammazione. Pur essendo patologie distinte, IBD e IBS presentano alcune similitudini che hanno permesso di individuare una possibile relazione tra i due stati di malattia; da una parte, pazienti affetti da IBS possono sviluppare un'infiammazione intestinale cronica, dall'altra individui colpiti da IBD lamentano disturbi tipici dell'IBS durante le fasi di remissione della malattia. Potenziali antigeni responsabili di queste disfunzioni enteriche sono batteri, virus, parassiti nematodi, allergeni del cibo o proteine endogene non più riconosciute dall'organismo stesso. L'esposizione continua all'antigene induce reazioni infiammatorie e di ipersensibilità, caratterizzate dall'incremento e dall'attivazione delle mast-cellule e di effetti sul sistema nervoso che, a loro volta, portano ad aggravare le stesse situazioni di infiammazione cronica e di ipersensibilità riscontrate nell'IBD e nell'IBS (Quigley, 2005; Rijniere *et al.*, 2007; CCFA, 2007).

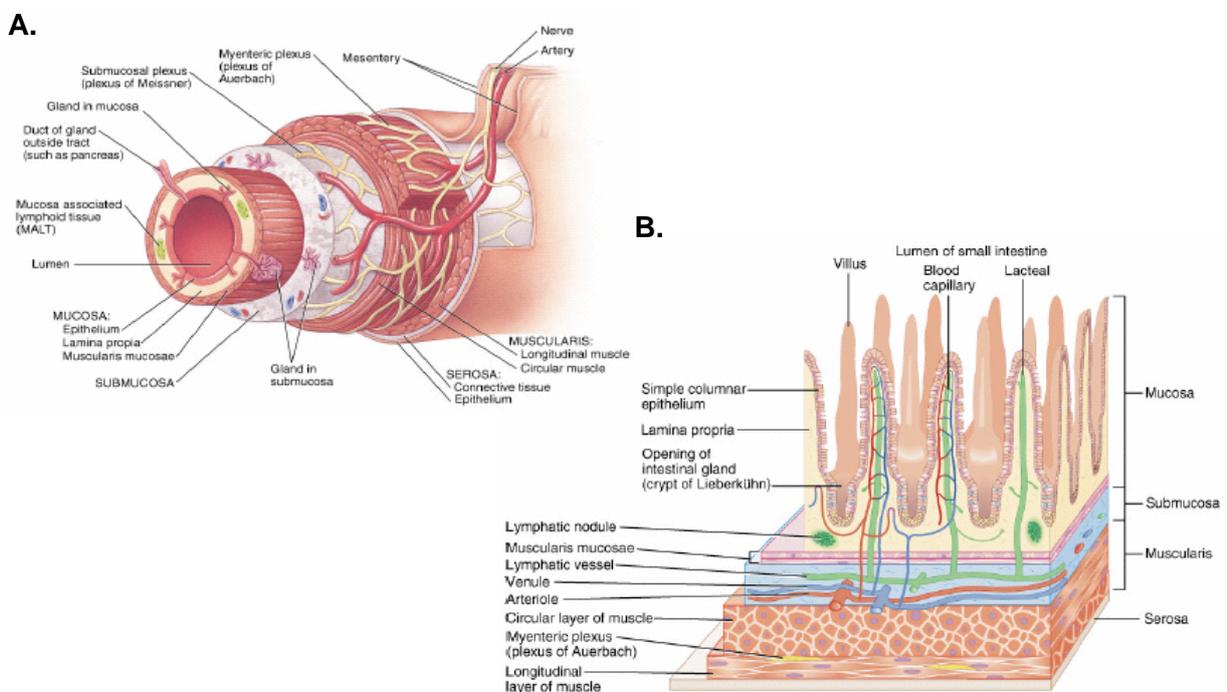
Al momento, le analogie osservate risultano un potenziale punto di partenza per determinare come l'infiammazione a livello della mucosa e della sottomucosa possa influenzare più o meno gravemente motilità e funzione intestinale.

I recenti progressi compiuti dalla ricerca nella conoscenza dell'immunopatogenesi enterica hanno individuato come nuovo bersaglio farmacologico il sistema adenosinergico e il suo coinvolgimento nelle disfunzioni infiammatorie intestinali (Haskò e Cronstein, 2004). In condizioni patologiche quali ipossia o infiammazione, il nucleoside è coinvolto nelle interazioni tra cellule immunitarie/infiammatorie e sistema nervoso enterico (SNE), responsabile delle concomitanti alterazioni della motilità intestinale (Christofi, 2001; Kadowaki *et al.*, 2003).

**Adenosina come potenziale agente endogeno antinfiammatorio**

I disturbi infiammatori intestinali insorgono, in genere, quando la barriera epiteliale non è completamente intatta, oppure quando microrganismi estranei entrano in contatto con l'epitelio (Figura 1). L'infiammazione a livello della mucosa si accompagna spesso ad alterazioni della motilità, imputabili a effetti dannosi del processo infiammatorio sia sul muscolo liscio che sull'innervazione dell'intestino, causando un disturbo generale e diffuso lungo il tratto digerente (Collins *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 2001). Alterazioni persistenti si osservano molto spesso anche dopo la risoluzione dell'infiammazione e comprendono modificazione delle proprietà contrattili del muscolo, secrezione anomala e variazioni della sensibilità viscerale (Collins *et al.*, 2001; Lomax *et al.*, 2007).

Nella colite indotta nel coniglio è stata riscontrata una debole, se non addirittura assente, infiltrazione di cellule immunitarie a livello della *muscularis mucosae* (Figura 1); tale risultato, in aggiunta all'esagerata produzione di prostaglandine (PG) da parte delle cellule muscolari lisce intestinali (ISMC), ha portato a considerare il muscolo come la sede di origine dei mediatori dell'infiammazione, responsabili, a loro volta, delle alterazioni funzionali motorie. Analogamente, la produzione locale di citochine, in particolare di interleuchina 6 (IL-6), contribuisce ad alterare la funzionalità neuromuscolare che accompagna l'infiammazione intestinale e l'attivazione immunitaria (Van Assche *et al.*, 1999).



**Figura 1. Anatomia del piccolo intestino.** (A) Strati che costituiscono la parete intestinale con (B) rappresentazione della struttura interna. (Da: [http://www.rivm.nl/interspeciesinfo/Images/small-intestine\\_tcm75-26441.gif](http://www.rivm.nl/interspeciesinfo/Images/small-intestine_tcm75-26441.gif))

L'adenosina è un nucleoside purinico che funge da importante molecola segnale sia in sede citosolica che nei fluidi interstiziali, tanto da essere definita come un "retaliatory metabolite", attraverso il quale le cellule comunicano tra di loro il proprio stato energetico (Haskò e Cronstein, 2004). Essa gioca un ruolo primario nel mantenere l'integrità tissutale attraverso la modulazione delle funzioni immunitarie, la riduzione delle reazioni flogistiche, l'interferenza con la sintesi di citochine proinfiammatorie e l'inibizione dell'adesione dei neutrofili, della degranolazione e dell'attività antiossidante (Haskò e Cronstein, 2004; Haskò *et al.*, 2007). In questo contesto, la concentrazione di adenosina riflette lo stato metabolico del tessuto, tanto che il sistema purinergico è stato proposto come "apparato sensore" che fornisce al sistema immunitario le informazioni necessarie alla salute del tessuto, contribuendo così a debellare lo stato infiammatorio (Haskò e Cronstein, 2004). A livello del tratto digerente, il nucleoside contribuisce anche al controllo della neurotrasmissione enterica e della contrattilità muscolare, regolando le normali funzioni motorie del sistema gastrointestinale (Duarte–Araujo *et al.*, 2004).

#### *Vie di sintesi dell'adenosina*

L'adenosina può essere sintetizzata sia a livello intracellulare, sia a livello extracellulare. All'interno della cellula, il nucleoside si forma attraverso due vie principali: l'idrolisi di S-adenosilomocisteina per intervento di S-adenosilomocisteina idrolasi e la degradazione del nucleotide adeninico AMP, catalizzata da 5'nucleotidasi citosoliche. Una volta formata, l'adenosina può diffondere attraverso la membrana plasmatica con un meccanismo di diffusione facilitata che implica l'intervento di trasportatori equilibrativi bidirezionali (ENT) e che favorisce l'equilibrio tra le concentrazioni intra- ed extracellulari della purina. Nello stesso tempo, i livelli del nucleoside nello spazio interstiziale dipendono anche da trasportatori concentrativi (CNT), un sistema energia-dipendente attraverso il quale il trasferimento della purina all'interno della cellula è intimamente associato al trasporto di ioni  $\text{Na}^+$ . In sede extracellulare la concentrazione dell'adenosina è sottoposta a uno stretto controllo enzimatico che coinvolge da una parte adenosina deaminasi (ADA) e adenosina chinasi (AK), enzimi deputati, rispettivamente, alla deaminazione di adenosina in inosina e alla fosforilazione del nucleoside ad AMP, dall'altra CD73/ecto-5'nucleotidasi che promuove la formazione del nucleoside dall'AMP. Mentre la presenza di ADA è stata dimostrata anche sulla superficie cellulare (ecto-ADA), AK è un enzima intracellulare che controlla in modo indiretto la concentrazione extracellulare di adenosina. Al contrario, CD73 esiste esclusivamente come glicoproteina ancorata al lato esterno della membrana plasmatica. Le azioni fisiologiche della purina dipendono dalla sua disponibilità a livello recettoriale, direttamente correlata ai processi di produzione, rilascio, uptake e metabolismo (Thorn e

Jarvis, 1997; Akkari *et al.*, 2006; Bours *et al.*, 2006).

Generalmente, si ritiene che le concentrazioni extracellulari del nucleoside in condizioni basali siano intorno a 100 nM, ma possono aumentare significativamente, anche di 100 volte, per raggiungere concentrazioni nel range del micromolare in condizioni patologiche quali ischemia, ipossia, trauma, stress, convulsioni e infiammazione (Akkari *et al.*, 2006). Studi condotti su modelli animali hanno riportato concentrazioni di adenosina pari a 1.200 nM nei tessuti ischemici e 500-600 nM nei tessuti infiammati. In condizioni fisiologiche, nell'uomo la concentrazione del nucleoside nel circolo sanguigno è pari a 300 nM (Cronstein, 1994) e uno studio recente ha dimostrato come i livelli del nucleoside nel plasma raggiungano valori di concentrazione dell'ordine di 4-10  $\mu$ M nei pazienti affetti da sepsi, condizione associata sia ad ischemia che ad infiammazione. Concentrazioni maggiori, comprese tra 10 e 100  $\mu$ M, sono state rilevate nel liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide (Haskò e Cronstein, 2004).

Attivando i recettori localizzati sulle cellule del sistema immunitario, l'adenosina esplica attività antinfiammatoria e proinfiammatoria a seconda del tipo di cellule, delle condizioni e della concentrazione stessa della purina (Akkari *et al.*, 2006). Stati patologici quali ipossia/ischemia e infiammazione sono caratterizzati non soltanto dalla variazione dei livelli di adenosina, ma anche da cambiamenti dinamici dell'espressione e/o della funzionalità degli ecto-enzimi e dei recettori adenosinici, al fine di mantenere il controllo sulle concentrazioni e sull'attività del nucleoside in ambiente extracellulare (Bours *et al.*, 2006).

L'induzione di ADA come risposta fisiologica all'ipossia può rappresentare una via catabolica per prevenire l'incremento di adenosina extracellulare a lungo termine, che potrebbe aggravare lo stato patologico (Eltzschig *et al.*, 2006). D'altra parte, anche l'inosina ha dimostrato una potente attività antinfiammatoria legandosi ai recettori A1 e A3 dell'adenosina; nell'intestino, essa partecipa, insieme al suo precursore, nel ridurre la flogosi e nel proteggere la funzionalità della barriera epiteliale, tanto che da qualche anno è stato valutato un suo potenziale impiego clinico nel trattamento della colite (Mabley *et al.*, 2003; Haskò e Cronstein, 2004).

Studi condotti sul colon di topo hanno messo in evidenza un ruolo protettivo dell'AMP, diretto precursore dell'adenosina, mediato dall'interazione con specifiche proteine presenti a livello delle giunzioni serrate (Walsh-Reitz *et al.*, 2005). Nella ghiandola tiroidea, invece, l'adenosina prodotta dall'ATP e dall'AMP ad opera di CD39 (ecto-ATPasi/ADPasi) e CD73, stimola l'espressione di connessina 43, costituente transmembrana delle giunzioni comunicanti; nell'intestino, attraverso queste strutture specializzate vengono sincronizzate le contrazioni che permettono i movimenti peristaltici (Lewis *et al.*, 2006).

Nel tratto gastrointestinale, come in molti altri tessuti, è stata identificata un'ulteriore fonte di

adenosina, rappresentata dall'AMP ciclico extracellulare estruso dalla cellula mediante un sistema di trasporto energia-dipendente. Il nucleotide ciclico viene degradato attraverso la ormai nota via extracellulare AMP ciclico-adenosina, catalizzata da ecto-fosfodiesterasi (ecto-PDE), che convertono l'AMP ciclico in AMP, e da ecto-5'nucleotidasi (CD73) (Hofer e Lefkimmatis, 2007; Jackson *et al.*, 2007; Giron *et al.*, 2008).

Molte patologie sono associate alla variazione dei livelli intracellulari di AMP ciclico e negli ultimi anni la ricerca si è rivolta alla sintesi di numerosi suoi analoghi come potenziali farmaci per il trattamento di diabete, asma, patologie cardiovascolari e tumorali (Schwede *et al.*, 2000). Benché meno note e tuttora oggetto di notevole interesse, le funzioni esercitate dall'AMP ciclico nello spazio extracellulare comprendono la normalizzazione dei suoi livelli intracellulari, l'attivazione di ecto-protein chinasi e/o di ipotetici recettori per il nucleotide ciclico, la generazione di molecole ad attività autocrina/paracrina grazie al suo metabolismo ad opera di ecto-enzimi (Hofer e Lefkimmatis, 2007; Jackson *et al.*, 2007).

Oltre a rappresentare un'importante fonte di adenosina endogena, il nucleotide ciclico è stato esso stesso riconosciuto come un modulatore della risposta infiammatoria (Hofer e Lefkimmatis, 2007). Elami e colleghi (2000) hanno dimostrato il coinvolgimento di una ecto-protein chinasi A (PKA) nella riduzione dell'espressione di PGHS-2 (una isoforma di prostaglandina H sintetasi) da parte dell'AMP ciclico extracellulare nelle cellule microvascolari dell'endotelio polmonare umano. È anche noto, però, che il nucleotide ciclico intracellulare ha un effetto opposto, ovvero induce l'espressione di PGHS-2 (Hofer e Lefkimmatis, 2007).

D'altra parte, l'estruzione di AMP ciclico dalla cellula in seguito ad attivazione dell'adenilato ciclasi suggerisce per questa molecola un ruolo come messaggero extracellulare, che potrebbe mediare il segnale attraverso specifici recettori di membrana. Strutture ritenute tali sono state caratterizzate sulla superficie dei procarioti, per i quali l'AMP ciclico è fondamentale nelle comunicazioni intercellulari; nell'ameba *Dictyostelium discoideum*, ad esempio, il processo di aggregazione cellulare è attivato da impulsi nanomolari di AMP ciclico extracellulare, per il quale sono stati identificati quattro tipi di recettori (cAR) che differiscono per l'affinità verso il substrato e il profilo di espressione durante lo sviluppo. Attualmente, nelle cellule eucariote non sono state identificate strutture omologhe ai cAR, anche se i recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) del *Dictyostelium* presentano alcune sequenze analoghe alla famiglia dei GPCR della secretina, tra cui i recettori per paratormone e calcitonina (Bankir *et al.*, 2002; Hofer e Lefkimmatis, 2007).

### *I recettori per l'adenosina nell'intestino*

Dal momento che i livelli di adenosina sono variabili a seconda del tessuto e dello stato

metabolico in cui esso si trova, la stimolazione dei recettori (R) purinergici P1 (A1R, A2aR, A2bR e A3R) da parte dell'agonista endogeno varia enormemente. Di conseguenza, è chiaro che anche l'espressione di queste proteine riveste un ruolo importante, non solo in condizioni fisiologiche ma soprattutto patologiche, partecipando attivamente alla risposta infiammatoria (Akkari *et al.*, 2006; Jacobson e Gao, 2006).

In questo contesto, attività ed espressione di CD73 sono considerate l'"interruttore" che regola l'attivazione dei recettori purinergici P1 e P2: in assenza dell'enzima, l'AMP extracellulare generato localmente può essere convertito in ADP e ATP, e attivare quindi i recettori purinergici P2; un'aumentata espressione di CD73 provoca la perdita di nucleotidi extracellulari, con generazione di adenosina e stimolazione dei recettori purinergici P1 (Hunsucker *et al.*, 2005).

Nell'ileo di ratto, i recettori A1 sono localizzati sulle terminazioni nervose del sistema colinergico che innerva il muscolo liscio, dove si trovano abbondantemente espressi i recettori muscarinici. Attivando gli A1R, l'adenosina riduce la liberazione di neurotrasmettitore, inducendo un effetto rilasciante indiretto. Al contrario, il nucleoside induce un effetto rilasciante diretto sulla muscolatura longitudinale di duodeno (A1R e A2bR), ileo (A1R) e colon (A2R) e un'azione contratturante sulla *muscularis mucosae* delle stesse regioni, attraverso gli A2bR nel duodeno e gli A1R nell'ileo e nel colon (Coupar, 1999; Storr *et al.*, 2002).

I recettori adenosinici partecipano in modo complesso al riflesso mienterico: gli A2aR mediano un effetto facilitatorio sul rilascio di acetilcolina, mentre la stimolazione degli A2bR determina una marcata inibizione dell'attività peristaltica nell'ileo di ratto (Coupar e Hancock, 1994; Duarte-Araujo *et al.*, 2004). Al tempo stesso, gli A1R sono importanti induttori della peristalsi, tanto che antagonisti di questi recettori mostrano una buona efficacia e un basso rischio di effetti collaterali nel trattamento della stipsi (Christofi, 2001). È stato dimostrato che, modulando il rilascio di acetilcolina, gli A1R potrebbero avere un ruolo nella protezione del SNE, dal momento che l'ipossia sperimentalmente indotta nel plesso mienterico determina un incremento di adenosina endogena che inibisce il rilascio del neurotrasmettitore (Lee *et al.*, 2001).

A livello intestinale è presente anche la componente nervosa adrenergica, le cui fibre agiscono sui gangli mienterici mediante l'inibizione presinaptica di neuroni colinergici (De Ponti *et al.*, 1996). Nel cuore di ratto, l'ischemia incrementa i livelli di noradrenalina nello spazio interstiziale come conseguenza di un aumentato rilascio della catecolamina a seguito della depolarizzazione delle terminazioni nervose simpatiche e di una diminuzione del suo uptake (Obata *et al.*, 2003). Il neurotrasmettitore, stimolando i recettori  $\alpha_1$ , porta all'attivazione della protein chinasi C (PKC), suggerendo che l'aumento di adenosina indotto

dall'elevata concentrazione di potassio extracellulare sia il risultato di una maggiore attività di CD73 via recettori  $\alpha_1$  PKC-dipendenti attivati dalla noradrenalina (Sato *et al.*, 1997; Obata *et al.*, 2003).

Sundaram e colleghi (2003) hanno riportato una sovraespressione di A1R e A3R nel corso di un evento infiammatorio intestinale nel coniglio. Uno studio più recente ha valutato le alterazioni dei recettori P1 nella progressione dell'infiammazione impiegando un modello di colite indotta da *Escherichia Coli* nel topo: l'espressione di A1R nel peritoneo raggiunge il livello più alto dopo 12 ore dall'inoculo con l'agente patogeno e ritorna a livelli basali entro le 24 ore successive. Sono state riscontrate anche variazioni nella concentrazione degli A2aR, il cui picco si misura dopo 24 ore dal trattamento, parallelamente al massimo incremento di adenosina nei fluidi interstiziali. Tali evidenze riflettono il fondamentale coinvolgimento di A1R con attività immunostimolante fin dalle prime fasi dell'infiammazione e, in un secondo momento, l'intervento predominante di A2aR, che sembra cruciale nel terminare e limitare la risposta infiammatoria prolungata (Rogachev *et al.*, 2006; Haskò e Pacher, 2008).

Benché gli effetti biologici dell'adenosina nell'intestino siano ormai conosciuti, l'espressione e le funzioni degli A2bR sono ancora poco chiare; è noto, tuttavia, che tali recettori possono essere controllati da fattori endogeni coinvolti nell'infiammazione, nella crescita e nella differenziazione cellulare, quali glucocorticoidi, fattori di crescita e citochine. Tra queste ultime, il Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sembra incrementare l'espressione di A2bR nella colite, potenziando così il segnale e la funzionalità dell'adenosina nelle cellule dell'epitelio intestinale umano e di topo (Kolachala *et al.*, 2005).

A livello del tratto digerente, A3R riveste un ruolo importante nel modulare i riflessi neuronali che coordinano la motilità e le risposte secretorie nel colon di roditori (Guzman *et al.*, 2006). In molti tipi di cellule, tra cui cardiomiociti, cellule endoteliali e muscolari lisce, l'attivazione di questa proteina induce una up-regulation dei sistemi antiossidanti cellulari promuovendo l'effetto citoprotettivo durante eventi di ischemia e infiammazione (Yaar *et al.*, 2005).

### ***Adenosina e infiammazione intestinale: ricerca di nuove strategie terapeutiche***

In condizioni normali la mucosa intestinale è mantenuta in uno stato di "infiammazione fisiologica", controllata da un perfetto equilibrio tra citochine pro- e anti-infiammatorie. È attualmente consolidato il fatto che patologie infiammatorie intestinali sono il risultato di un'appropriate risposta del sistema immunitario enterico a componenti della flora batterica, erroneamente riconosciuti come patogeni dalle cellule dendritiche, le quali promuovono la differenziazione delle cellule T e l'attivazione dei macrofagi, incrementando il rilascio di citochine proinfiammatorie quali IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Monteleone *et al.*, 2002; Baumgart e

Carding, 2007).

In questo contesto, l'adenosina esercita effetti antinfiammatori mediante inibizione del rilascio di tali citochine e dell'aggregazione piastrinica, induzione della formazione di eritropoietina e della funzione linfocitaria. Tuttavia, la somministrazione di adenosina esogena nella terapia di patologie infiammatorie o ischemiche non può essere praticata; considerate, infatti, la non specificità del nucleoside e l'espressione pressochè ubiquitaria dei suoi recettori, l'applicazione sistemica induce effetti collaterali, soprattutto a livello cardiaco, tali da non giustificare l'uso terapeutico (Haskò e Cronstein, 2004).

Negli anni '90 è stato riconosciuto il coinvolgimento del sistema purinergico negli effetti antinfiammatori esercitati da alcuni farmaci. Cronstein e collaboratori (1991) hanno dimostrato che l'effetto del metotrexato, farmaco attualmente di largo impiego nel trattamento dell'artrite reumatoide e di altri stati infiammatori, è mediato dall'adenosina attraverso i recettori A<sub>2</sub>. Successivamente, Morabito e colleghi (1998) hanno riportato che, in queste patologie, l'incremento dei livelli del nucleoside dipende dall'attività di CD73. Analogamente, altri farmaci quali sulfasalazina e FK-506 esercitano i loro effetti antinfiammatori promuovendo il rilascio di adenosina (Haskò e Cronstein, 2004).

Visto il ruolo fondamentale rivestito da A<sub>2a</sub>R nelle azioni antiflogistiche della purina, sono stati sviluppati e saggati su modelli animali agonisti selettivi per tale recettore. Tra questi, ATL-146e ha mostrato una buona efficacia nel migliorare l'infiammazione della mucosa intestinale, riducendo l'infiltrazione leucocitaria e inibendo la liberazione di citochine proinfiammatorie sia in caso di colite acuta e cronica indotta nel coniglio, sia in un modello di enterite da *Clostridium difficile* (Odashima *et al.*, 2005). Attualmente, l'impiego di ATL-146e è in fase di sperimentazione clinica per il trattamento di patologie infiammatorie intestinali e di sepsi, e per la prevenzione della restenosi dopo angioplastica (Gao e Jacobson, 2007).

Osservazioni preliminari identificano anche A<sub>2b</sub>R come un potenziale target per la cura di disfunzioni enteriche associate a stati infiammatori. Lo studio condotto da Kolachala e colleghi (2007) ha dimostrato che gli A<sub>2b</sub>R delle cellule epiteliali mediano le risposte proinfiammatorie dell'adenosina e che il trattamento con l'antagonista selettivo ATL-801 è efficace nel corso di colite indotta da destrano sodio solfato (DSS) nel topo.

Negli ultimi anni, è stata rivolta particolare attenzione ad A<sub>3</sub>R come possibile target farmacologico su cui intervenire nell'infiammazione intestinale. IB-MECA (N<sup>6</sup>-(3-iodobenzil)-adenosina-5-N-metiluronamide), agonista A<sub>3</sub>, induce un significativo miglioramento dello stato patologico sia nella colite indotta da DSS sia nella colite spontanea di topi knockout per IL-10. Questo composto si trova attualmente nella fase III della sperimentazione clinica per il trattamento di patologie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide, e sembra apparentemente privo di effetti collaterali (Guzman *et al.*, 2006). L'inibizione della crescita

tumorale sia *in vitro* che *in vivo* da parte di agonisti A3 e l'effetto sinergico che questi composti mostrano in associazione alla chemioterapia ha portato anche allo sviluppo di molecole che sono attualmente in sperimentazione clinica per tumori del colon (Gessi *et al.*, 2008).

Quelli riportati sono soltanto alcuni esempi: in realtà, la ricerca ha permesso di sviluppare un numero elevato di composti selettivi che, modulando i recettori purinergici P1, si rivelano promettenti per molteplici applicazioni terapeutiche nel campo non solo delle patologie intestinali, ma anche cardiovascolari, neurodegenerative e associate ad infiammazione cronica. Tuttavia, ci sono ancora molte incertezze relative all'impiego di tali molecole, viste le difficoltà legate, da una parte alla distribuzione ubiquitaria dei recettori bersaglio e quindi alla possibile insorgenza di molteplici effetti collaterali, dall'altra alla specie-specificità che rende poco attendibili le valutazioni precliniche su modelli animali (Jacobson e Gao, 2006).

Proprio per questo motivo, una possibile strategia alternativa prevede l'intervento farmacologico sugli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'adenosina, al fine di mantenere elevate le sue concentrazioni nella sede colpita dal danno; anche se, sfortunatamente, in molte circostanze la fonte del nucleoside non è nota, per ora sembra possibile intervenire quando esso deriva principalmente dal metabolismo di ATP e/o AMP (Colgan *et al.*, 2006).

L'intervento di CD73 a livello intestinale è importante nel corso di ischemia e infiammazione ma anche di infezioni batteriche e virali: in numerosi modelli, la somministrazione di 5'-nucleotidasi solubile risulta efficace nel promuovere la funzione di barriera endoteliale e nel ridurre l'accumulo dei neutrofilii. Il limite principale di tale approccio è dato dalla difficoltà di ottenere la proteina purificata. Al contrario, non sono ancora state sviluppate terapie dirette verso CD73, benché un inibitore dell'enzima,  $\alpha,\beta$ -metileneadenosina difosfato (AOPCP), sia stato usato su diversi modelli sperimentali di topo. Esso sembra ben tollerato e presenta una buona disponibilità per via orale, ma induce, nello stesso tempo, un incremento di aggressività e ansia, probabilmente a causa della sua capacità di raggiungere il SNC superando la barriera emato-encefalica (Colgan *et al.*, 2006).

Numerosi studi hanno riportato non solo il significativo incremento nell'espressione e nell'attività di ecto-ADA nei tessuti infiammati, tra cui l'intestino, ma anche una stretta relazione tra ridotta sintesi di adenosina e cronicizzazione della flogosi (Cavalcante *et al.*, 2006). Sulla base di queste premesse, Antonioli e collaboratori (2007a) hanno valutato le proprietà di APP (4-ammino-2-(2-idrossi-1-dodecil)pirazolo[3,4-d]pirimidina) rispetto ad EHNA (eritreo-9-(2-idrossi-3-noniladenina) nell'inibire l'attività enzimatica di ADA su un modello di colite indotta da DNBS (acido dinitrobenzen sulfonico). L'APP sembra intervenire con maggiore potenza nel bloccare la conversione di adenosina ad inosina e quindi nel proteggere il tessuto dal danno indotto dalla flogosi.

L'AK come possibile bersaglio per promuovere l'accumulo di adenosina e la down-regulation dell'infiammazione locale è stata valutata da Siegmund e collaboratori (2001), che hanno dimostrato il potenziale terapeutico di GP515, inibitore dell'enzima, nella colite indotta nel topo.

Il trasporto del nucleoside all'interno della cellula è un altro meccanismo che ne controlla le concentrazioni extracellulari e, di conseguenza, l'inibizione dei trasportatori per nucleosidi potrebbe rappresentare un ulteriore approccio farmacologico per incrementare gli effetti antinfiammatori dell'adenosina. A tal proposito, sono stati confrontati gli effetti immunomodulatori di dipiridamolo e metotrexato, valutando i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-10 rilasciati dalle cellule mononucleate intestinali ottenute da pazienti affetti dal morbo di Crohn e da controlli sani. Entrambi i farmaci riducono significativamente i livelli di TNF- $\alpha$ , ma il dipiridamolo sembra più efficace nell'aumentare le concentrazioni di IL-10 (Poturoglu *et al.*, 2007).

È necessario sottolineare che, anche se l'incremento di adenosina o la stimolazione dei suoi recettori si dimostrano utili nel trattamento di alcune forme di infiammazione e nell'ischemia acuta, in altri casi potrebbe essere richiesta una riduzione della purina in sede extracellulare. D'altra parte, particolari stati patologici associati ad alte concentrazioni del nucleoside a lungo termine quali asma, ostruzione polmonare cronica, sepsi e shock settico, richiedono una down-regulation del segnale adenosinergico. In questo contesto, le conseguenze dannose della stimolazione delle mast-cellule secondarie agli elevati livelli di adenosina durante la fase tardiva della sepsi, potrebbero essere bilanciate dall'inibizione dei recettori o dell'accumulo locale del nucleoside (Haskò e Cronstein, 2004). L'AOPCP, ad esempio, si è rivelato utile come agente antidiarroico nelle infezioni enteriche, riducendo il passaggio di fluidi attraverso l'epitelio intestinale (Colgan *et al.*, 2006).

### ***Herpes Simplex Virus-1: un nuovo modello di alterazione della motilità intestinale***

Caratteristica peculiare di tutti gli Herpes Virus è la capacità di stabilirsi in uno stato di latenza all'interno dell'ospite per tutta la vita ed essere periodicamente riattivati per diffondersi e invadere nuovi organismi. Nella maggior parte degli individui le manifestazioni cliniche dell'infezione primaria e delle successive riacutizzazioni sono spesso asintomatiche (Efsthathiou e Preston, 2005).

In questo studio l'attenzione si è focalizzata sull'Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1), agente patogeno che appartiene alla famiglia degli *alphaherpesvirus*, caratterizzato da uno spiccato neurotropismo e dalla capacità di stabilirsi in forma latente nei neuroni sensoriali che innervano il sito di infezione primaria. I due target cellulari più importanti per HSV-1 sono i

neuroni e le cellule epiteliali di pelle e mucosa (Spear, 2004); durante l'infezione primaria, il virus entra nelle terminazioni dei neuroni sensoriali e viene trasportato in senso retrogrado lungo gli assoni fino a raggiungere i corpi cellulari dei gangli del trigemino, dove si stabilisce in uno stato di latenza. La sua periodica riattivazione ne induce il trasporto in direzione anterograda verso la mucosa orale o nasale dove sviluppa le caratteristiche vescicole (Efsthathiou e Preston, 2005). Gli stimoli responsabili delle riacutizzazioni sono molteplici e comprendono trauma fisico, stress, eccessiva esposizione ai raggi UV e immunodepressione (Lachmann, 2003).

È ormai noto che durante lo stato di latenza, il DNA virale è localizzato nei tessuti sede di infezione, senza alcuna evidenza di antigeni virali. Tuttavia, è stata dimostrata la continua trascrizione del genoma virale, i cui prodotti si identificano in una famiglia di RNA nucleari definita "latency-associated transcripts" (LAT). La concentrazione di questi ultimi è proporzionalmente correlata al numero di neuroni infettati (Daheshia *et al.*, 1998). È stato ipotizzato che questi RNA nucleari non siano essenziali per la latenza, ma favoriscano tale condizione attraverso un meccanismo di protezione della cellula dall'apoptosi HSV-1 indotta o modulando l'espressione dei geni coinvolti nella prima fase del ciclo litico (immediate early (IE) gene) quali ICP0 e ICP4 (Efsthathiou e Preston, 2005).

In un modello di infezione latente riprodotto nei gangli di topo, è stata osservata un'inflammation prolungata che persiste oltre il tempo di replicazione del virus; tuttavia, non è chiaro se questi episodi di ganglionite enterica siano correlati in qualche modo allo stato di latenza. Il sistema immunitario interviene riducendo l'efficienza della diffusione di HSV-1 tra i gangli vicini impedendone la riattivazione (Daheshia *et al.*, 1998): sembra che sia i processi anticorpo-mediati che cellule-mediati siano clinicamente rilevanti nel combattere l'agente patogeno (Cao *et al.*, 2004).

È importante sottolineare che la latenza rappresenta per il virus una strategia di sopravvivenza evoluta ed estremamente efficiente; in questo modo, infatti, HSV-1 riesce a sfuggire alla risposta immunitaria che non riconosce i neuroni infetti, ma anche ai farmaci antivirali che interferiscono nel processo di replicazione (Daheshia *et al.*, 1998; Lachmann, 2003).

Attualmente, il farmaco antivirale più utilizzato è l'aciclovir, convertito nella forma attiva dalla timidina chinasi (HSV-1 tk) e dalle chinasi cellulari virali, ma sono disponibili anche agenti che inibiscono la DNA polimerasi e vaccini che interferiscono con il mantenimento della latenza e prevengono quindi le manifestazioni ricorrenti (Lachmann, 2003).

Nel 1996, Gesser e Koo hanno dimostrato che, dopo l'introduzione di HSV-1 nel lume esofageo di topo, il virus raggiunge le terminazioni nervose della parete intestinale e diffonde attraverso il SNE infettando i neuroni del plesso sottomucoso e del plesso

perigliandolare di esofago, stomaco e duodeno, senza una significativa diffusione ai tessuti sottostanti. Nelle terminazioni nervose delle fibre che terminano nella lamina propria della mucosa gastrica e duodenale, HSV-1 interagisce direttamente con le cellule epiteliali. Si è rivelato del tutto inatteso il fatto che HSV-1 colpisca in maniera molto ridotta l'epitelio intestinale rispetto ai neuroni enterici, probabilmente a causa di una minore suscettibilità di queste cellule all'infezione acuta o a una ridotta capacità del virus di diffondere tra le cellule della superficie epiteliale (Gesser e Koo, 1996). 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 e Koo, 1997). Questi risultati hanno portato a ipotizzare il possibile coinvolgimento del virus nelle disfunzioni infiammatorie e funzionali del tratto gastrointestinale, sia nell'animale che nell'uomo (Gesser e Koo, 1996).

Sulla base di queste premesse, il nostro studio ha impiegato HSV-1 come agente patogeno per ottenere un modello di alterazione della motilità intestinale: la scelta è nata dal fatto che molte patologie associate a dismotilità, tra cui l'acalasia esofagea, sono di origine infettiva e HSV-1 presenta un'ampia diffusione tra la popolazione adulta, pari all'80% in alcuni paesi (Smith e Robinson, 2002; Castagliuolo *et al.*, 2004; Khan e Collins, 2006).

Il protocollo di trattamento prevede un primo inoculo di HSV-1 per via nasale e, dopo quattro settimane, una seconda somministrazione per via orale. Il primo trattamento permette al virus di penetrare nell'organismo e raggiungere il SNC, dove si stabilisce in uno stato di latenza; la somministrazione per via intragastrica si rende necessaria affinché HSV-1 entri in contatto con l'epitelio intestinale, penetri nelle terminazioni nervose e stabilisca la latenza nei gangli enterici. Al fine di valutare eventuali alterazioni a breve e a lungo termine causate dal virus, gli animali sono stati sacrificati in momenti diversi dall'inoculo intragastrico (1, 2, 4, 6, 10 settimane) (De Giorgio *et al.*, 2004).

È importante sottolineare che il doppio inoculo permette di mimare il processo di infezione a livello dei neuroni del trigemino e nei gangli del SNE che avviene nell'uomo in seguito a deglutizione di particelle virali provenienti dalle lesioni erpetiche (Gesser e Koo, 1997).

Nel nostro modello animale è stata dimostrata la presenza della HSV-1 tk, proteina marker del virus, confermando la persistenza dell'agente patogeno sia nel SNC che nel SNE durante tutto il corso dell'infezione (1-10 settimane). In accordo con le considerazioni precedenti, non è stata ottenuta alcuna evidenza della presenza di HSV-1 nel SNE dei ratti esposti soltanto alla somministrazione del virus per via intranasale (De Giorgio *et al.*, 2004).

Lo stato di latenza di HSV-1 è stato valutato mediante l'identificazione dei trascritti LAT, presenti sia nel SNC che nel SNE per tutti i tempi di trattamento considerati; tuttavia, nei ratti esposti al virus da una e due settimane è stato rilevato anche il gene ICP4, un IE essenziale

per la riattivazione e la replicazione virale (Efstathiou e Preston, 2005), ad indicare come in questa fase HSV-1 sia ancora attivo (De Giorgio *et al.*, 2004). Gesser e Koo (1997) hanno dimostrato che il trascritto LAT può essere presente durante l'infezione acuta, pur essendo localizzato nel citoplasma anziché nel nucleo.

Nel nostro modello, inoltre, è stato messo in evidenza che il patogeno localizzato nei gangli mienterici provoca un modesto incremento nella liberazione dei mediatori dell'infiammazione, senza tuttavia indurre alcun danno tessutale o produrre infiltrato infiammatorio evidente (De Giorgio *et al.*, 2004). Una volta stabilita la latenza di HSV-1 nel SNE, le eventuali alterazioni della motilità imputabili all'agente patogeno sono state valutate sull'ileo isolato proveniente dagli animali trattati per tempi diversi; è stata dimostrata un'influenza del virus sulla risposta contrattile indotta dal carbacolo a 1 e 6 settimane dal trattamento (De Giorgio *et al.*, 2007; Zoppellaro *et al.*, 2007).

Sulla base di queste considerazioni, è stato proposto che l'infezione con HSV-1 ottenuta mediante il doppio inoculo (via intranasale + via intragastrica) rappresenti un buon modello di alterazione della motilità intestinale (De Giorgio *et al.*, 2007; Zoppellaro *et al.*, 2007).



## METODI

### ANIMALI

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando l'ileo distale di ratti maschi Wistar dell'età di 2-3 mesi (peso di  $250\pm 50$  g) e di 8-10 mesi (peso di  $750\pm 50$  g) stabulati, rispettivamente, presso il Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia e il Dipartimento di Anatomia e Fisiologia dell'Università di Padova.

Un gruppo di ratti di 2-3 mesi è stato trattato *in vivo* con reserpina 48 e 24 ore prima del sacrificio, allo scopo di indurre la completa deplezione delle riserve di catecolamine endogene. Il trattamento consiste in due iniezioni intraperitoneali di una soluzione costituita da reserpina (0.5 mg/Kg) sciolta in 1 ml di acqua bidistillata ed etanolo (1:1).

Dopo il sacrificio dell'animale per decapitazione, una porzione di ileo è stata prelevata e immersa immediatamente in soluzione fisiologica Tyrode, mantenuta ad una temperatura di 37°C e costantemente ossigenata con miscela biologica 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. La soluzione fisiologica Tyrode presenta la seguente composizione: NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.4 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.46 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.32 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, D(+)-glucosio anidro 5 mM.

Il tessuto è stato ripulito al suo interno iniettando nel lume la soluzione fisiologica con l'impiego di una siringa e all'esterno eliminando eventuali residui di tessuto mesenterico. I primi quattro centimetri di ileo a partire dall'estremità terminale sono stati scartati.

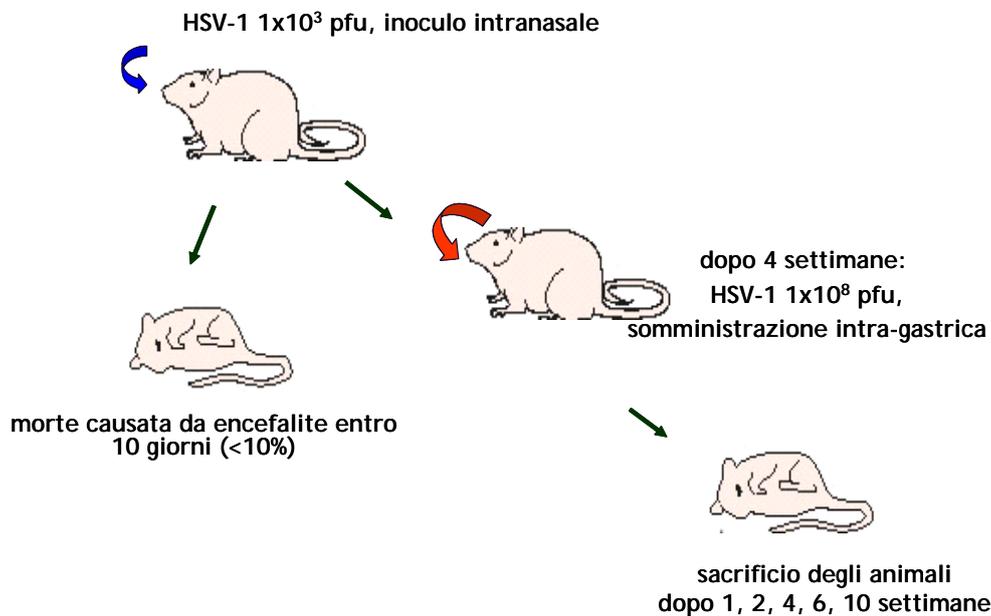
Le colture primarie di cellule muscolari lisce intestinali sono state ottenute impiegando esclusivamente l'ileo dei ratti giovani non trattati, mentre per le prove di immunofluorescenza è stato utilizzato l'organo proveniente sia dagli animali giovani non trattati che dagli animali di 8-10 mesi. Per gli studi su ileo isolato e sul metabolismo dei nucleotidi e nucleosidi purinici è stato impiegato il tessuto di entrambi i gruppi di animali di 2-3 mesi, non trattati e trattati *in vivo* con reserpina.

### ***Allestimento di un modello animale di infezione enterica da HSV-1***

Il modello animale di infezione provocata da Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1) è stato allestito nei ratti di 8-10 mesi (*Figura 2*). Gli animali, anestetizzati mediante inalazione di metossiflurano, sono stati inoculati per via nasale con 10<sup>3</sup> p.f.u. di HSV-1 vivo. 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, i ratti sopravvissuti all'inoculo per via nasale sono stati sottoposti ad una seconda somministrazione del virus, pari a 10<sup>8</sup> p.f.u., per via orale con

l'impiego di un ago bottonuto della lunghezza di 7 centimetri. Gli animali sono stati sacrificati a 1, 2, 4, 6 e 10 settimane dal secondo trattamento. Contemporaneamente, sono stati sacrificati anche ratti di controllo, inoculati secondo il medesimo protocollo con lo stesso volume di cellule Vero (mock infection).



**Figura 2.** Ratti maschi Wistar di  $9 \pm 1$  mesi sono stati infettati con HSV-1 ( $1 \times 10^3$  p.f.u.) per via intranasale. Quattro settimane dopo l'infezione primaria, i ratti sopravvissuti sono stati inoculati con HSV-1 ( $1 \times 10^8$  p.f.u.) per via intragastrica. Gli animali controllo sono stati trattati, agli stessi tempi, con il medesimo volume di lisato di cellule Vero (mock infection).

Valutazioni istopatologiche, studi di biologia molecolare (RT-PCR, western blotting, ibridizzazione *in situ*, test ELISA) e di contrattilità dell'intestino di questi animali hanno precedentemente dimostrato che HSV-1 si stabilisce in forma latente nel SNE degli animali trattati secondo il protocollo descritto. La presenza del virus in questa sede provoca modesti incrementi nella concentrazione dei mediatori dell'infiammazione associati ad alterazione della peristalsi e della contrattilità della muscolatura liscia, senza tuttavia indurre alcun danno tessutale o infezione macroscopica (De Giorgio *et al.*, 2007; Zoppellaro *et al.*, 2007).

## ESPERIMENTI DI CONTRATTILITÀ SU ILEO ISOLATO DI RATTO

Gli esperimenti intesi a valutare le risposte contrattili dell'ileo isolato di ratto sono stati condotti *in vitro* con l'utilizzo di quattro bagni per organi isolati (Ugo Basile S.r.l.), ciascuno della capacità di 10 ml e riempito con soluzione fisiologica Tyrode. La soluzione è stata opportunamente aerata e mantenuta a temperatura costante grazie a un bagno esterno termostato a  $37^\circ\text{C}$ ; queste condizioni sono le più adatte per riprodurre la situazione

fisiologica e per garantire la sopravvivenza dell'organo per tutto il periodo dell'esperimento. La tensione sviluppata dai preparati è stata misurata con l'ausilio di quattro trasduttori isometrici posti sopra ciascun bagno e collegati a due registratori bicanale (Recorder Gemini 7070, Ugo Basile). L'operazione preliminare di taratura dello strumento è stata effettuata impiegando un peso campione da 1 grammo.

### **Procedura sperimentale**

Si sono impiegati segmenti di ileo (1-1.5 cm) montati verticalmente nei bagni e lasciati equilibrare per 45 minuti, lavandoli ogni 15 minuti, al fine di consentire la ripresa del preparato dallo stress subito durante la fase di allestimento. Terminato il periodo di stabilizzazione, i segmenti di ileo sono stati trattati per tre volte in successione con carbacolo 1  $\mu$ M, concentrazione in grado di evocare una risposta contratturante submassimale da parte del preparato, così da stabilire la sensibilità ottimale del registratore. Gli esperimenti sono stati condotti esponendo il tessuto ad AMP ciclico 0.5 mM, al fine di valutare l'effetto del nucleotide ciclico sull'attività contrattile della muscolatura liscia intestinale. A seconda del protocollo sperimentale, i preparati sono stati esposti agli inibitori (IBMX, DPSPX, AOPCP, 8-PT) e all'enzima ADA, aggiunti 20 minuti prima di un'ulteriore stimolazione con il nucleotide ciclico. Per le curve concentrazione-effetto le aggiunte cumulative del nucleotide ciclico sono state eseguite quando la risposta alla precedente concentrazione aveva raggiunto la massima tensione. Gli effetti della forskolina sulla muscolatura liscia sono stati studiati incubando i preparati con concentrazioni crescenti non cumulative della sostanza.

Grazie alla taratura iniziale dello strumento, il valore in centimetri ottenuto dai tracciati è stato convertito in misura di tensione, espressa in grammi, al fine di confrontare tra loro le risposte muscolari. Gli effetti contratturanti sono stati espressi come percentuale della risposta iniziale del preparato al carbacolo nel caso delle curve concentrazione-risposta e normalizzati per la contrazione indotta dall'AMP ciclico quando i preparati sono stati pretrattati con antagonisti/enzimi.

### **COLTURE CELLULARI DI MUSCOLATURA LISCIA INTESTINALE DI RATTO**

Le colture primarie di cellule muscolari lisce intestinali (ISMC, Intestinal Smooth Muscle Cells) sono state ottenute con la tecnica dell'espianto dalla muscolatura liscia longitudinale di ileo (Giron *et al.*, 2008).

Per l'ottenimento e l'isolamento in coltura delle ISMC, l'ileo è stato suddiviso in segmenti di circa 2 cm, posti in piastre petri (Nunc) contenenti Phosphate Buffered saline (PBS) sterile

addizionato di antibiotico (gentamicina, 20 µg/ml) e antimicotico (fungizone, 0.25 µg/ml) e mantenute in ghiaccio.

Dopo aver ulteriormente lavato l'ileo in PBS, il muscolo longitudinale contenente il plesso mienterico è stato isolato, in ambiente sterile, dagli strati sottostanti e finemente suddiviso in frammenti, a loro volta disposti omogeneamente su piastre petri e messi in coltura in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) addizionato di gentamicina (20 µg/ml), L-glutamina (2 mM), NEAA (MEM Eagle Non-Essential Amino Acid Solution, 0.1 mM) e arricchito con il 20% di siero fetale bovino (FBS) inattivato a 56°C per 30 minuti.

Le petri sono state poste in incubatore in condizioni controllate di temperatura (37°C), atmosfera (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>) e umidità (90%). Durante la settimana successiva all'espianto i frammenti non sono stati sottoposti ad alcun trattamento; da questo momento, il medium di crescita è stato sostituito ogni tre giorni.

Le prime cellule migrate dai frammenti di ileo sono state osservate al microscopio ottico a contrasto di fase dopo circa 6 giorni dal momento dell'espianto. In due settimane circa, le cellule formano un monostrato con grado di confluenza variabile tra il 60 e l'80% dell'area totale. Nonostante le ISMC non siano giunte a completa confluenza, i frammenti devono essere eliminati perché, assumendo un colore scuro, potrebbero rilasciare mediatori dannosi per la sopravvivenza delle cellule stesse.

A questo punto, si è proceduto alla messa in linea: la subcoltura è stata ottenuta staccando le cellule, che crescono per adesione, dal fondo della petri con tripsina (2.5 g/L) ed EDTA\*4Na (0.38 g/L); questo procedimento porta ad una linea cellulare che mantiene le caratteristiche originali del clone di cellule da cui deriva.

Una volta giunte a confluenza, le cellule vengono ulteriormente subcoltivate, fino al momento dell'esperimento. Le ISMC sono state usate tra i passaggi 2 e 5, esaminate e fotografate con microscopio ottico Olympus T041 a contrasto di fase munito di macchina fotografica Olympus OM101.

Per la preparazione agli esperimenti, le ISMC ad un grado di confluenza pari al 90% circa sono state raccolte dalla petri mediante processo di tripsinizzazione e centrifugate (1000 g per 5 minuti). Una volta aspirato il surnatante, il precipitato è stato risospeso in terreno di coltura (1 ml), da cui è stata prelevata un'aliquota per la conta cellulare effettuata con camera di conta Bürker e trypan blue, colorante che penetrando all'interno delle cellule lese consente di discriminarle dalle cellule vitali. In base al conteggio, è stata prelevata l'esatta aliquota di sospensione cellulare da distribuire in piastre da 24 pozzetti per i saggi di immunofluorescenza o in piastre da 6 pozzetti per gli esperimenti sul metabolismo dell'AMP esogeno e sulla cinetica dell'[<sup>3</sup>H]-AMP ciclico esogeno.

## VALUTAZIONE DEL METABOLISMO PURINICO NELL'ILEO DI RATTO

### **Preparazione e trattamento del tessuto e delle cellule**

L'ileo proveniente da animali giovani non trattati e trattati *in vivo* con reserpina è stato tagliato in segmenti di due centimetri, suddivisi longitudinalmente in modo da ottenere 4 strip per ogni segmento. Le strip sono state introdotte in vial (due strip per ogni vial) contenenti un volume di Tyrode precedentemente calcolato in modo che, in seguito all'aggiunta delle sostanze da saggiare, il volume finale fosse pari a 2 ml. Le vial sono state poste in un bagno termostato a 37°C, mantenute costantemente ossigenate e sotto agitazione.

Dopo 30 minuti di stabilizzazione, al mezzo di incubazione è stato aggiunto il nucleotide di interesse, AMP ciclico 50 µM, AMP 50 µM o [2,8-<sup>3</sup>H]-AMP ciclico 50 nM (attività specifica 1,55 TBq/mmol; 42 Ci/mmol) e incubato per tempi variabili, come previsto dal protocollo sperimentale. Negli esperimenti con AOPCP (200 µM), l'inibitore di CD73 è stato addizionato 15 minuti prima dell'aggiunta del nucleotide.

Le ISMC seminate nelle piastre da 6 pozzetti (3x10<sup>5</sup> cellule per pozzetto) sono state incubate con DMEM arricchito del 10% di FBS fino a raggiungere la subconfluenza. A questo punto, il medium è stato aspirato, le ISMC sono state lavate con PBS e incubate per 24 ore con DMEM allo 0,4% di FBS, così da sincronizzarle nella stessa fase del ciclo cellulare.

Le cellule sono state lavate con PBS per eliminare ogni traccia di siero e stimolate con AMP alle concentrazioni indicate o con [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico 50 nM in terreno di coltura privo di siero, in presenza o in assenza degli inibitori enzimatici. Le piastre così preparate sono state incubate per tempi differenti (0.5, 5, 15, 30 e 60 minuti) a 37°C. Negli esperimenti con AOPCP (200 µM), concanavalina A (Con A, 0.1 mg/ml) e levamisolo (10 mM), gli inibitori sono stati aggiunti 15 minuti prima dell'AMP esogeno.

Al termine dell'incubazione, il surnatante (1 ml) prelevato dalle vial contenenti il tessuto o dai pozzetti con le ISMC è stato trasferito in provette poste in ghiaccio e contenenti HClO<sub>4</sub> 10 M. L'acido è stato aggiunto al fine di bloccare l'ulteriore degradazione enzimatica delle purine. I campioni sono stati filtrati con filtri PVDF (0.22 µm, Sartorius) così da eliminare eventuali residui di tessuto/cellule e conservati a -80°C.

Le strip sono state finemente triturate in azoto liquido e HClO<sub>4</sub> 1 M mentre le cellule, raccolte in HClO<sub>4</sub> 1 M, sono state sonicate per 5 minuti, al fine di rompere completamente le membrane cellulari e raccogliere la componente citosolica. L'omogenato ottenuto dalla centrifugazione (13000 rpm per 30 minuti a 0°C) dei lisati di tessuto e cellule è stato usato per la determinazione delle proteine con metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Il surnatante, neutralizzato con NaOH 1 M è stato filtrato e conservato a -80°C.

I campioni così ottenuti, provenienti dal mezzo di incubazione e dal lisato di tessuto e cellule, sono stati poi analizzati mediante tecnica HPLC per la determinazione quali e quantitativa delle purine e dei nucleotidi purinici.

### **Analisi qualitativa e quantitativa delle purine**

Il dosaggio delle purine è stato condotto mediante cromatografia a coppia ionica eseguita con HPLC Beckman, costituita da un sistema a due pompe (Beckman System Gold Programmable Solvent Module 125) con iniettore da 20  $\mu$ l (injector loop Rheodyne 7725i) e da un rivelatore spettrofotometrico UV (Beckman System Gold Detector 166) ad una lunghezza d'onda di 254 nm, collegato ad un computer SuntaQ 386, provvisto di software per la registrazione, l'identificazione e la calibrazione (Beckman System Gold V3.10). Per la separazione delle sostanze è stata utilizzata una colonna C-18 (Beckman C-18 Analytical P/N 243533, Ultrasphere ODS 4.6 mm-25 cm) munita di precolonna C-18.

I campioni sono stati preparati prelevando 167  $\mu$ l della soluzione da esaminare, ai quali sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di una soluzione di teofillina 0.5 mM in acqua MilliQ (standard interno, concentrazione finale 50  $\mu$ M) e 13  $\mu$ l di KOH 10 M per portare il pH a valori pari a 4-5.

Il metodo cromatografico impiegato ha permesso la separazione e la determinazione quantitativa di AMP ciclico, AMP, adenosina, inosina e ipoxantina. L'analisi è stata condotta usando una fase mobile costituita da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  73.5 mM e tetrabuttilammonio bromuro 6 mM a pH 5.8 (soluzione A) e metanolo (soluzione B), applicando un gradiente non lineare (0-7 minuti, 0% solvente B; 7-12 minuti, 0-16% solvente B; 12-30 minuti, 16% solvente B; 30-32 minuti, 16-25% solvente B; 32-36 minuti, 25% solvente B; 36-38 minuti, 25-0% solvente B; 38-45 minuti, 0% solvente B) con flusso pari a 1 ml/min (Giron *et al.*, 2008).

I picchi cromatografici delle sostanze presenti nelle soluzioni campione sono stati analizzati con l'ausilio di una curva di taratura (0,1-75  $\mu$ M) per la determinazione delle purine nel mezzo d'incubazione.

Per la rivelazione della radioattività, espressa in cpm/ $\mu$ l (cpm = counts per minutes), associata ad ogni sostanza separata e rivelata dal sistema HPLC è stato usato un detector radiochimico in serie (Flo-one 500 TR Packard Instrument) dotato di una cella a flusso. Il cocktail di scintillazione (Ultima-Flo M) è stato continuamente miscelato all'eluato proveniente dal sistema HPLC, con un flusso pari a 3 ml/min. La radioattività di fondo è stata sottratta da tutti i radio-cromatogrammi ottenuti. Anche in questo caso, i picchi relativi ai metaboliti marcati sono stati identificati confrontando i corrispondenti tempi di ritenzione con quelli di standard cromatografici soggetti alle stesse condizioni sperimentali.

### **Analisi statistica dei risultati**

Tutti i risultati rappresentano la media $\pm$ SEM dei dati ottenuti dal numero di esperimenti indicati. Per il confronto tra le medie è stato impiegato il test *t* di Student per dati accoppiati negli esperimenti di contrattilità e per dati non accoppiati negli esperimenti di valutazione del metabolismo purinico. L'analisi statistica delle curve della cinetica di scomparsa di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico e AMP e di accumulo dei relativi metaboliti è stata condotta utilizzando l'analisi della varianza (one-way ANOVA), seguita dal test di Newman-Keuls per confronti multipli, utilizzando il software GraphPad Prism 3.03. Come limite di significatività statistica è stato assunto il valore  $p < 0.05$ .

### **IMMUNOFLUORESCENZA**

L'immunofluorescenza è una tecnica che consente, mediante l'uso di specifici anticorpi, di rilevare l'espressione e la localizzazione di proteine o altri composti presenti in cellule o tessuti.

Prima del riconoscimento antigene-anticorpo, il tessuto e le cellule sono stati sottoposti a fissazione e a permeabilizzazione utilizzando, rispettivamente, formaldeide e triton X-100. La formaldeide è un composto in grado di creare legami crociati tra gruppi amminici liberi presenti nelle catene laterali degli amminoacidi che costituiscono una catena polipeptidica, mantenendo così stabili le strutture cellulari, comprese quelle della membrana plasmatica. Il triton X-100 è un agente detergente, destinato alla parziale degradazione delle membrane plasmatiche in modo da renderle permeabili agli anticorpi e permettere la rivelazione degli antigeni presenti in sede intracellulare.

Gli anticorpi primari impiegati negli studi di immunofluorescenza e le corrispondenti diluizioni sono elencati in *Tabella 1*; gli anticorpi secondari, selezionati in relazione alla specie animale in cui è stato prodotto il primario, comprendono gli anti-mouse/rabbit Alexa Fluor 488 e 555 (1:1000) prodotti nella capra.

### **Studi di immunoistochimica (IHC)**

Le sezioni di tessuto impiegate per questi esperimenti provengono da ratti giovani non trattati e da ratti vecchi di controllo o esposti a HSV-1 per 1, 2, 4, 6, 10 settimane. In tutti i casi, dopo prelievo e pulizia dell'organo, segmenti di ileo di circa 1 cm sono stati immediatamente inclusi in OCT (Tissue Tek Sakura), congelati in ghiaccio secco e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso. I blocchetti sono stati tagliati con un criostato Leica in sezioni trasversali di spessore pari a 8  $\mu\text{m}$ , che sono state raccolte su vetrini tipo SuperFrost con superficie attivata elettrostaticamente al fine di permettere una adesione

immediata; i vetrini sono stati poi mantenuti a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dei saggi di immunofluorescenza.

Anticorpo primario	Animale ospite	Tipo	Diluizione
anti- $\alpha$ -actina	topo	monoclonale	1:400
anti- $\gamma$ -actina enterica	topo	monoclonale	1:500
anti-adenosina deaminasi	coniglio	policlonale	1:100
anti-A1R	coniglio	policlonale	1:300
anti-A2aR	coniglio	policlonale	1:300
anti-A2bR	coniglio	policlonale	1:200
anti-A3R	coniglio	policlonale	1:400
anti-CD73	topo	monoclonale	1:500
anti-vinculina	coniglio	monoclonale	1:50
anti-ZO-1	coniglio	policlonale	1:100

**Tabella 1.** Anticorpi primari impiegati nei saggi di immunofluorescenza, identificati dalla specie animale in cui sono stati prodotti, dalla tipologia di preparazione e dalla diluizione d'uso.

Prima di iniziare l'esperimento di IHC, le sezioni di ileo sono state scongelate a temperatura ambiente (RT, room temperature) in modo da consentire una maggiore aderenza al vetrino e fissate con formaldeide per 15 minuti. Dopo successivi lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate in una soluzione di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05 M al fine di saturare eventuali gruppi aldeidici liberi e nuovamente lavate in TBS.

I vetrini sono stati incubati per 30 minuti a RT con normal goat serum (NGS, 2%), sciolto in TBS contenente triton X-100 0.3%, al fine di mascherare i bloccanti antigenici aspecifici del preparato.

Dopo incubazione per un'ora con l'anticorpo primario sono stati eseguiti tre lavaggi di 10 minuti in TBS, così da rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato al tessuto. I vetrini sono stati incubati al buio per un'ora a RT con l'anticorpo secondario fluorescente (diluito in TBS e NGS 1%) e nuovamente sottoposti a tre lavaggi. I controlli negativi, che permettono di determinare il segnale fluorescente di fondo, sono stati ottenuti incubando il tessuto in assenza di anticorpo primario.

I campioni sono stati montati su vetrini coprioggetto e mowiol 40-88, liquido a base di glicerolo destinato a preservare la fluorescenza nel tempo, e conservati al buio a  $4^{\circ}\text{C}$  fino all'analisi al microscopio confocale.

**Studi di immunocitochimica (ICC)**

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ( $5-8 \times 10^4$  cellule per ogni pozzetto) su vetrini preventivamente trattati con gelatina sterile allo 0.1% in acqua sterile; una volta raggiunta la subconfluenza, le cellule sono state lavate con PBS per tre volte, fissate con formaldeide 4% per 10 minuti e trattate con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05 M, successivamente rimosso mediante tre lavaggi in PBS.

I determinanti antigenici aspecifici sono stati mascherati lavando le cellule per 30 minuti (su bascula a RT) con una soluzione bloccante composta di albumina di siero bovino (BSA, 0.1%) e di NGS 10%, disciolti in PBS in presenza o in assenza di Triton X-100 0.1%, a seconda che il protocollo preveda o meno la permeabilizzazione delle cellule.

I vetrini sono stati incubati per un'ora a RT in una soluzione contenente l'anticorpo primario, NGS 10% e BSA 0.1% diluiti in PBS. Anche in questo caso, i controlli negativi sono stati ottenuti incubando le ISMC in assenza dell'anticorpo primario.

Dopo successivi lavaggi, i vetrini sono stati incubati al buio per un'ora a RT con l'anticorpo fluorescente e sottoposti a ulteriori lavaggi per eliminare l'anticorpo in eccesso.

La marcatura con anti- $\alpha$ -SMA-FITC non ha previsto l'incubazione con l'anticorpo secondario, dal momento che il primario è già coniugato al fluoroforo (FITC, fluorescein isothiocyanate).

Nelle prove di doppia marcatura, le ISMC sono state incubate con la miscela di anticorpi primari provenienti da animali differenti e, successivamente, con la miscela dei rispettivi anticorpi secondari legati a marcatori fluorescenti caratterizzati da spettri di emissione diversi.

A questo punto, le cellule sono state trattate con una soluzione di Ribonucleasi A (RNasi, 0.5 mg/ml) per 15 minuti a  $37^\circ\text{C}$ , a cui sono seguiti un lavaggio con  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata che permette di rimuovere l'enzima in eccesso e l'incubazione con ioduro di propidio (1:5000) per colorare i nuclei.

I campioni sono stati infine montati su vetrino portaoggetto utilizzando mowiol 40-88 e conservati al buio a  $4^\circ\text{C}$  fino al momento dell'analisi al microscopio confocale.

**Acquisizione delle immagini con microscopia confocale**

La microscopia confocale consente di effettuare una scansione completa di tutto il piano focale mediante l'impiego di una luce laser che converge tramite le lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato.

Le immagini provenienti dalle sezioni di tessuto congelato e dalle ISMC in coltura sono state analizzate usando il microscopio confocale a fluorescenza Leica TCS-NT/SP2. Per aumentare il rapporto segnale/rumore del campo di interesse, il piano focale è stato

acquisito tre volte, in modo da ottenere un'immagine finale sottoposta a processo di filtrazione selettiva dei pixel mediamente più luminosi. Per ogni regione analizzata (muscolo e mucosa) dei diversi gruppi sperimentali (non trattato, controllo, HSV-1) 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 i gruppi stessi. Nelle prove di doppia marcatura ciascun fluoroforo è stato acquisito su un canale separato (rosso/verde), avendo cura di mantenere inalterato il piano focale di acquisizione nel passaggio da un canale all'altro.

Le immagini sono state acquisite usando il software Leica abbinato al rispettivo microscopio confocale, con una risoluzione pari a 1024x1024 pixel, memorizzate in formato single-TIFF, che ha il vantaggio di mantenere separati i canali del colore (verde e rosso) 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 diversi canali.

### **IMMUNOPRECIPITAZIONE E WESTERN BLOTTING**

L'identificazione di CD73 mediante immunoblotting è stata condotta su ISMC in coltura, enterociti e muscolo longitudinale di intestino di ratti giovani non trattati.

Gli enterociti sono stati isolati dall'ileo secondo il metodo modificato di Weiser (1973) usando la soluzione B (PBS privo di ioni  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  addizionato di gentamicina 20  $\mu\text{g/ml}$ , EDTA 5 mM e ditiotreitolo 0.5 mM). Segmenti di tessuto sono stati lavati, tagliati in frammenti di 3-5 mm e incubati nella soluzione B a 37°C per 30 minuti sotto agitazione. Dopo la dissociazione, gli enterociti freschi sono stati ripetutamente lavati in PBS e lo studio di vitalità cellulare mediante la tecnica di esclusione del trypan blue ha rivelato una vitalità superiore al 90%.

La muscolatura liscia longitudinale, una volta isolata dall'ileo, è stata omogenata in RIPA buffer non denaturante (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, sodio desossicolato 0.25%, Nonidet P-40 0.1%,  $Na_3VO_4$  100  $\mu\text{M}$ , NaF 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM, aprotinina 10  $\mu\text{g/ml}$  e leupeptina 10  $\mu\text{g/ml}$ ) usando un omogenizzatore Polytron (Brinkmann Instruments).

Le ISMC seminate in petri da 100 mm di diametro, gli enterociti freschi e il muscolo longitudinale sono stati lisati in ghiaccio nel tampone di lisi costituito da RIPA buffer. Dopo 45 minuti di incubazione, i lisati sono stati centrifugati (15000 g per 5 minuti a 4°C) (Centrifuge 5415R, Eppendorf) per rimuovere il materiale particolato e il surnatante, contenente la frazione proteica, è stato raccolto e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il metodo di Bradford (Bio-Rad).

Volumi di lisato contenenti 1 mg di proteine sono stati incubati prima con anti-CD73 (4.5 µg/mg di lisato) per tutta la notte a 4°C e successivamente con proteina-G di agarosio (Santa Cruz Biotechnology) per un'ora a 4°C. Dopo due lavaggi in RIPA buffer freddo e un terzo lavaggio in PBS freddo mediante centrifugazione (20 secondi, 12000 g), gli immunoprecipitati sono stati risospesi in 25 µl di loading buffer (SDS 2%, Tris 62.5 mM (pH 6.8), glicerolo 10%, β-mercaptoetanololo 5%, blu di bromofenolo 0.1%) e denaturati a 100°C per 5 minuti. Come controllo negativo sono state impiegate le IgG di topo non immunizzato, sottoposte allo stesso protocollo previsto per i lisati.

Le proteine sono state separate su gel SDS-PAGE al 12% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad). Il protocollo di rivelazione prevede l'esposizione della membrana per un'ora alla soluzione di blocco (5% di latte disidratato in TBS addizionato dello 0.05% di Tween 20) a RT sotto agitazione, incubazione con l'anticorpo policlonale anti-CD73 (Santa Cruz Biotechnology) per tutta la notte a 4°C sotto costante agitazione e successivamente con il secondario anti-rabbit coniugato con l'enzima perossidasi (Santa Cruz Biotechnology).

Gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante reazione chemiluminescente esponendo la membrana a ECL (Pierce). Tale sistema consiste nell'emissione di luce a seguito dell'ossidazione del luminolo da parte della perossidasi di rafano in presenza di attivatori chimici. Il segnale è stato acquisito ed analizzato usando il sistema Versa Doc imaging e il software Quantity One (Bio-Rad).



## MATERIALI

### ***Soluzione fisiologica (Tyrode)***

D(+)-Glucosio Anidro, KCl, NaCl e  $\text{NaHCO}_3$  sono stati ottenuti dalla J.T. Baker (Holland) mentre  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dalla Merck KGaA (Germania) e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dalla Riedel-Deheanag (Germania).

### ***Sostanze utilizzate per colture cellulari, esperimenti di IHC, ICC e immunoblot***

Aprotinina,  $\beta$ -mercaptoetanololo, blu di bromofenolo, concanavalina A, ditiotreitolo, EDTA, fenilsulfonil fluoruro, gelatina 2%, ioduro di propidio, leupeptina, levamisolo, mowiol 40-88, NaF,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Nonidet P-40, RNasi, SDS, trypan blue sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Italia). L-glutammina e PBS sono stati acquistati dalla Lonza (Svizzera), mentre fungizone, gentamicina, NEAA e tripsina-EDTA dalla Invitrogen (Italia); DMEM e siero (FBS) sono stati comprati dalla Celbio (Italia), mentre formaldeide (37%) e triton X-100 dalla Delchimica-Applichem (Italia). Glicerolo, Tris e Tris·HCl sono stati ottenuti dalla Carlo Erba Reagenti (Italia).

Gli anticorpi primari sono stati acquistati: anti-ADA, anti-A1R, anti-A2aR, anti-A2bR e anti-A3R dalla Alpha Diagnostic International Inc. (USA), anti-CD73 dalla BD Biosciences Pharmigen (Belgio), anti- $\gamma$ -SMA dalla MP Biomedicals (Francia), anti- $\alpha$ -SMA-FITC e anti-vinculina dalla Sigma-Aldrich (Italia), anti-ZO-1 dalla Zymed Laboratories (Invitrogen, Italia). Gli anticorpi secondari Alexa Fluor sono stati ottenuti dalla Molecular Probe (Invitrogen, Italia).

Il TBS 10x (1 litro) è stato preparato come segue:

60.55 g	Tris (idrossimetil)amminometano
88 g	NaCl

### ***Sostanze utilizzate per gli studi di contrattilità e per la valutazione del metabolismo purinico***

Acido citrico monoidrato, adenosina, albumina bovina, AMP, AMP ciclico, AOPCP, carbacolo, DPSPX, IBMX, inosina, ipoxantina, reserpina e teofillina sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia), mentre  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-AMP}$  ciclico dalla GE Healthcare (Italia).  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , desossicolato di sodio, NaOH, reattivo di Folin-Ciocalteu, tartrato sodico potassico e tetrabutylammonio bromuro sono stati ottenuti dalla Merck KGaA (Germania).  $\text{HClO}_4$  e KOH sono stati ottenuti dalla Prolabo (Italia), mentre l'8-PT dalla Calbiochem (Italia).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e i solventi DMSO, etanolo e metanolo sono stati acquistati dalla J.T. Baker (Holland).

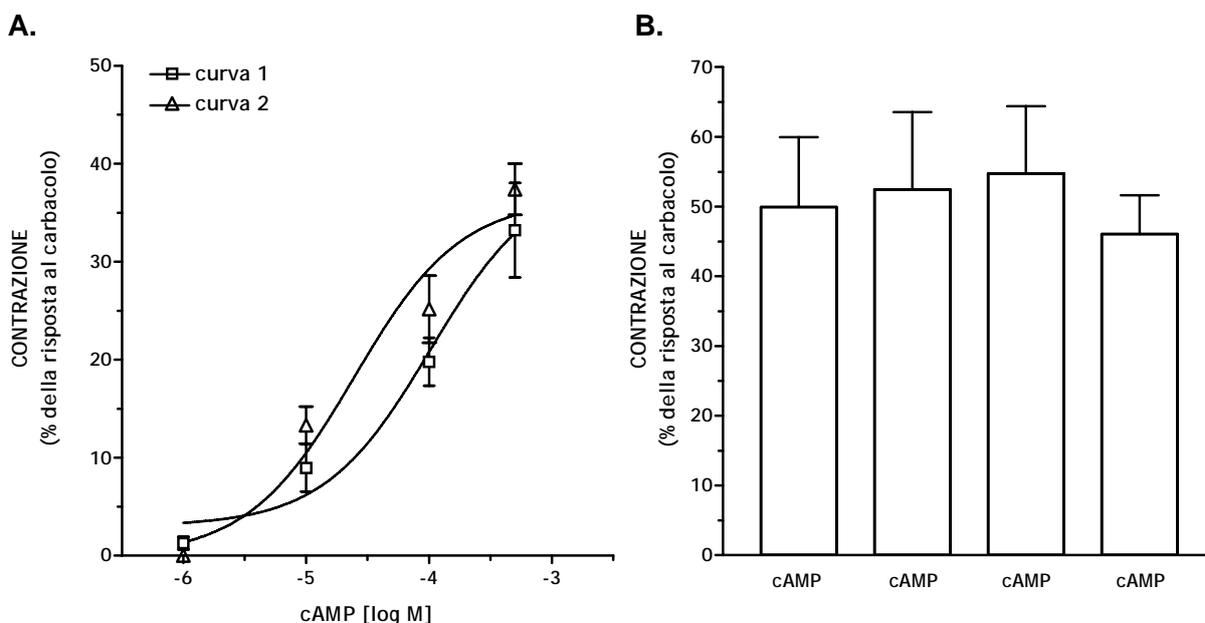
Le sostanze sono state preparate come soluzioni stock concentrate in acqua milliQ e conservate a -80°C fino al momento dell'uso. IBMX e 8-PT sono state solubilizzate, rispettivamente, in etanolo e DMSO; le concentrazioni finali dei solventi non superano lo 0.1% nel bagno.

## RISULTATI

### **Risposta della muscolatura liscia di ileo di ratto all'AMP ciclico esogeno**

Gli esperimenti *ex vivo* condotti su organo isolato sono volti a definire e caratterizzare la risposta indotta dall'AMP ciclico sulla muscolatura liscia dell'ileo di ratto.

L'esposizione dei preparati ad una concentrazione 0.5 mM del nucleotide ciclico si traduce in una iniziale e transitoria riduzione della tensione seguita da una rapida e duratura contrazione della muscolatura liscia; questo effetto raggiunge il suo massimo nell'arco di un minuto ed è mantenuto oltre i 15 minuti. Dal momento che il rilasciamento rappresenta solo un evento transitorio, è stata presa in considerazione esclusivamente la risposta contratturante, espressa come percentuale della massima contrazione indotta dal carbacolo (1  $\mu$ M).



**Figura 3.** Riproducibilità della risposta contratturante dell'AMP ciclico 0.5 mM su ileo di ratto giovane non trattato. (A) Curve cumulative concentrazione-risposta consecutive (B) Singoli trattamenti ripetuti. I dati, normalizzati rispetto alla risposta contrattile massima del carbacolo (1  $\mu$ M), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-8 esperimenti.

La Figura 3A mostra che il trattamento con concentrazioni crescenti di AMP ciclico evoca una contrazione concentrazione-dipendente, non soggetta a tachifilassi nell'intervallo 1–500  $\mu$ M, come dimostrato dalla sovrapposizione delle due curve concentrazione-risposta ottenute in modo consecutivo. L'assenza di questo fenomeno è stata ulteriormente confermata dalla riproducibilità della risposta ottenuta per esposizione ripetuta del tessuto ad AMP ciclico 0.5 mM ad intervalli di 15 minuti (Figura 3B).

Al fine di indagare se la risposta contratturante sia dovuta a un effetto diretto del nucleotide ciclico o indiretto mediato dai suoi prodotti di degradazione, i preparati sono stati trattati con inibitori specifici degli enzimi coinvolti nella via extracellulare AMP ciclico-adenosina. In particolare, si è studiata l'influenza dell'inibizione di ecto-PDE e CD73, che convertono, rispettivamente, l'AMP ciclico ad AMP e l'AMP ad adenosina in sede extracellulare. I risultati sono stati riportati come percentuale della massima risposta indotta dall'AMP ciclico, così da normalizzare le variazioni legate a risposte diverse dei preparati.

Per bloccare la prima tappa della via extracellulare AMP ciclico-adenosina è stato usato l'IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), un derivato xantinico che inibisce in maniera non selettiva le PDE intra- ed extracellulari (Jackson *et al.*, 2006). A differenza dell'IBMX, il DPSPX (1,3-dipropil-8-p-sulfopenilxantina) è una molecola dotata di una carica negativa a pH fisiologico: ad alte concentrazioni (0.1 mM) esso inibisce selettivamente le ecto-PDE (Hong *et al.*, 1999), mentre già a basse concentrazioni (10  $\mu$ M) agisce come antagonista non specifico ma debolmente selettivo verso i recettori A1 dell'adenosina (Chen *et al.*, 1996).

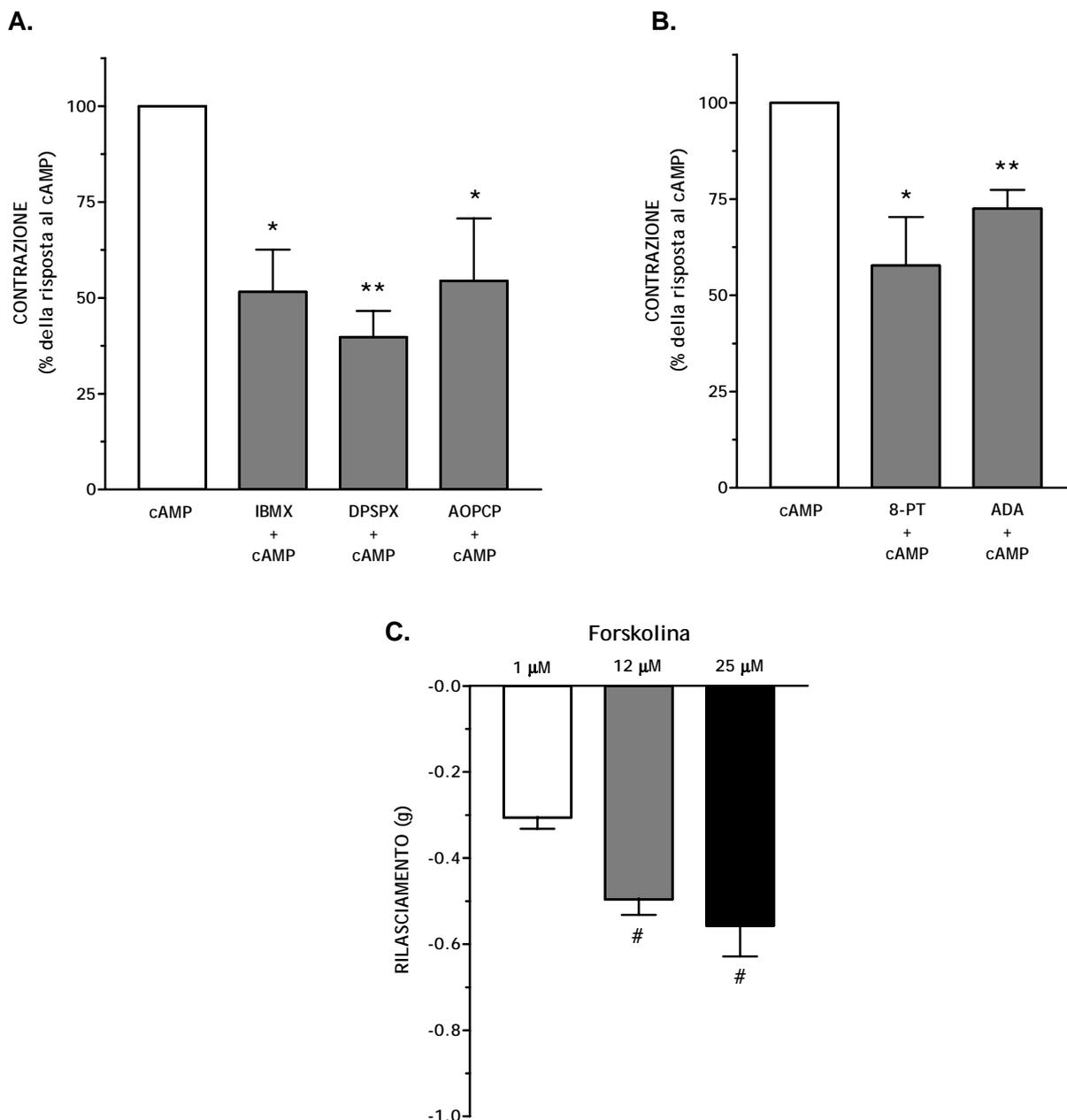
Il pretrattamento con IBMX (10  $\mu$ M) e DPSPX (0.1 mM) ha significativamente diminuito la risposta contratturante evocata dall'AMP ciclico (*Figura 4A*), riducendola rispettivamente del 48% ( $p < 0.01$ ) e del 60% ( $p < 0.001$ ), a suggerire che le PDE potrebbero essere coinvolte nell'effetto osservato sulla muscolatura liscia dell'ileo di ratto.

L'AOPCP è un analogo dell'ADP che inibisce in maniera specifica solo CD73, dal momento che le sue proprietà idrofile gli impediscono di attraversare la membrana plasmatica della cellula e di agire sulle 5'nucleotidasi citosoliche (Jackson *et al.*, 2006). Il trattamento dei preparati con AOPCP 0.1 mM induce una forte contrazione della muscolatura liscia ( $200 \pm 20\%$  di quella indotta dal carbacolo); tale effetto raggiunge il massimo entro due minuti e il ritorno al tono di base si osserva solo dopo circa 20 minuti dall'inizio del trattamento. La preesposizione del tessuto ad AOPCP 0.1 mM determina una riduzione significativa dell'effetto contratturante dell'AMP ciclico 0.5 mM (-46%) (*Figura 4A*).

Il pretrattamento dei segmenti di ileo con 8-fenilteofillina (8-PT, 10  $\mu$ M), antagonista non selettivo dei recettori dell'adenosina (Coupar, 1999), o con ADA (0.5 U/ml), enzima che blocca l'azione dell'adenosina degradandola a inosina (Franco *et al.*, 1988), riduce significativamente l'entità della contrazione, rispettivamente del 42% ( $p < 0.01$ ) e del 27% ( $p < 0.001$ ), a suggerire da un lato il contributo del nucleoside derivato dall'AMP ciclico all'effetto contratturante, dall'altro l'antagonismo del DPSPX sui recettori P1 (*Figura 4B*).

Per valutare l'influenza dell'AMP ciclico generato all'interno della cellula sulla tensione sviluppata dal muscolo, i segmenti di ileo sono stati trattati con forskolina, sostanza che incrementa i livelli del nucleotide ciclico intracellulare attivando l'adenilato ciclasi (Florio *et*

*al.*, 1999). Nell'ileo di ratto, la forskolina (1-25  $\mu\text{M}$ ) induce un rilascio concentrazione-dipendente (Figura 4C) che si sviluppa lentamente nell'arco di 10 minuti, ma si mantiene per un tempo prolungato (oltre 30 minuti).



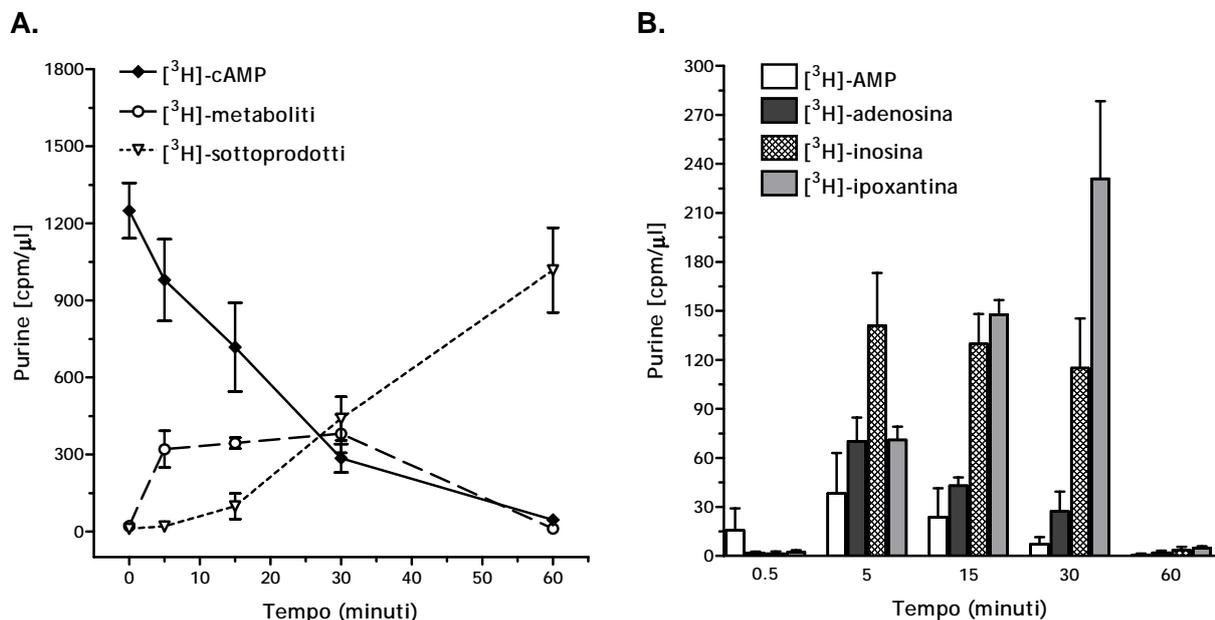
**Figura 4.** (A) Influenza dell'IBMX 10  $\mu\text{M}$  ( $n=12$ ), del DPSPX 0.1 mM ( $n=10$ ), dell'AOPCP 0.1 mM ( $n=9$ ), (B) dell'8-PT 10  $\mu\text{M}$  ( $n=9$ ) e dell'ADA ( $n=12$ ) sulla contrazione indotta dall'AMP ciclico 0.5 mM nell'ileo di ratto. I dati sono espressi come percentuale rispetto alla massima risposta contrattile evocata dall'AMP ciclico. (C) Curva concentrazione-risposta non cumulativa per la forskolina (1-25  $\mu\text{M}$ ;  $n=6$ ) nell'ileo di ratto. \*\* =  $p < 0.001$ ; \* =  $p < 0.05$  vs cAMP; # =  $p < 0.05$  vs 1  $\mu\text{M}$ .

### L'AMP ciclico esogeno è fonte di metaboliti adeninici extracellulari

Al fine di valutare il destino metabolico dell'AMP ciclico esogeno, strip di ileo sono state incubate con 2,8- $^3\text{H}$ -AMP ciclico 50 nM, marcato con trizio nelle posizioni 2 e 8 dell'anello purinico. Questo approccio permette di misurare i livelli del nucleotide ciclico extracellulare in rapporto alle concentrazioni intracellulari e la sua potenziale captazione all'interno della cellula.

A 30 e 60 minuti di incubazione, nel mezzo si rilevano, rispettivamente, il 24% e il 4% di  $^3\text{H}$ -AMP ciclico inizialmente aggiunto (Figura 5A). In assenza di tessuto, nel mezzo la purina marcata non viene metabolizzata in maniera significativa ( $1500 \pm 250$  cpm/ $\mu\text{l}$ ).

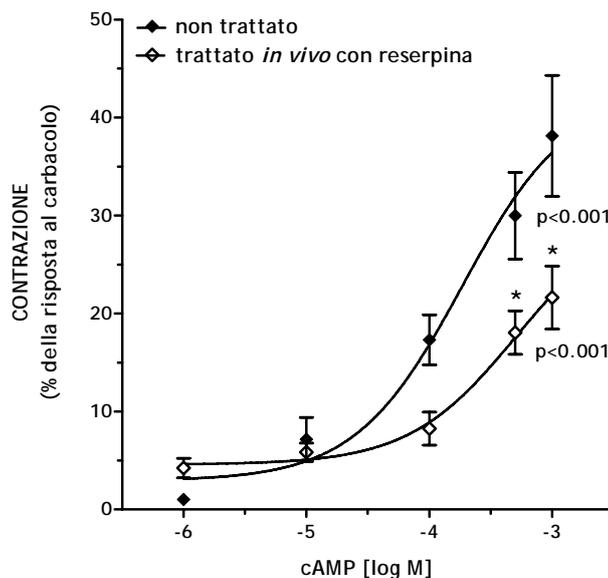
La scomparsa di  $^3\text{H}$ -AMP ciclico è accompagnata dalla formazione di  $^3\text{H}$ -AMP,  $^3\text{H}$ -adenosina,  $^3\text{H}$ -inosina,  $^3\text{H}$ -ipoxantina e  $^3\text{H}$ -sottoprodotti catabolici, identificati come  $^3\text{H}$ -xantina e  $^3\text{H}_2\text{O}$  (Figura 5A e 5B). Nell'omogenato delle strip di tessuto, a 0.5 e 30 minuti di incubazione è stata rilevata una radioattività pari, rispettivamente, a 1.0% e 0.9% del totale, che si è ulteriormente ridotta a 0.4% dopo 60 minuti. Analogamente, la radioattività di  $^3\text{H}$ -AMP,  $^3\text{H}$ -adenosina,  $^3\text{H}$ -inosina,  $^3\text{H}$ -ipoxantina e degli altri  $^3\text{H}$ -metaboliti è risultata al di sotto dell'1% di quella totale durante i 60 minuti di esposizione al nucleotide ciclico marcato.



**Figura 5. Metabolismo di  $^3\text{H}$ -AMP ciclico e accumulo dei suoi metaboliti.** (A) Scomparsa di  $^3\text{H}$ -AMP ciclico 50 nM e formazione dei suoi  $^3\text{H}$ -metaboliti ( $^3\text{H}$ -AMP+ $^3\text{H}$ -adenosina+ $^3\text{H}$ -inosina+ $^3\text{H}$ -ipoxantina) e dei prodotti finali del catabolismo  $^3\text{H}$ -sottoprodotti ( $^3\text{H}$ -xantina+ $^3\text{H}_2\text{O}$ ) nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto durante 60 minuti di incubazione. (B) Accumulo di  $^3\text{H}$ -AMP,  $^3\text{H}$ -adenosina,  $^3\text{H}$ -inosina e  $^3\text{H}$ -ipoxantina nel mezzo di incubazione durante il metabolismo di  $^3\text{H}$ -AMP ciclico. I risultati sono espressi come media $\pm$ SEM dei valori ottenuti da 4 esperimenti.

### **Influenza del trattamento *in vivo* con reserpina sull'effetto contratturante dell'AMP ciclico e sulla sua degradazione nell'ileo di ratto**

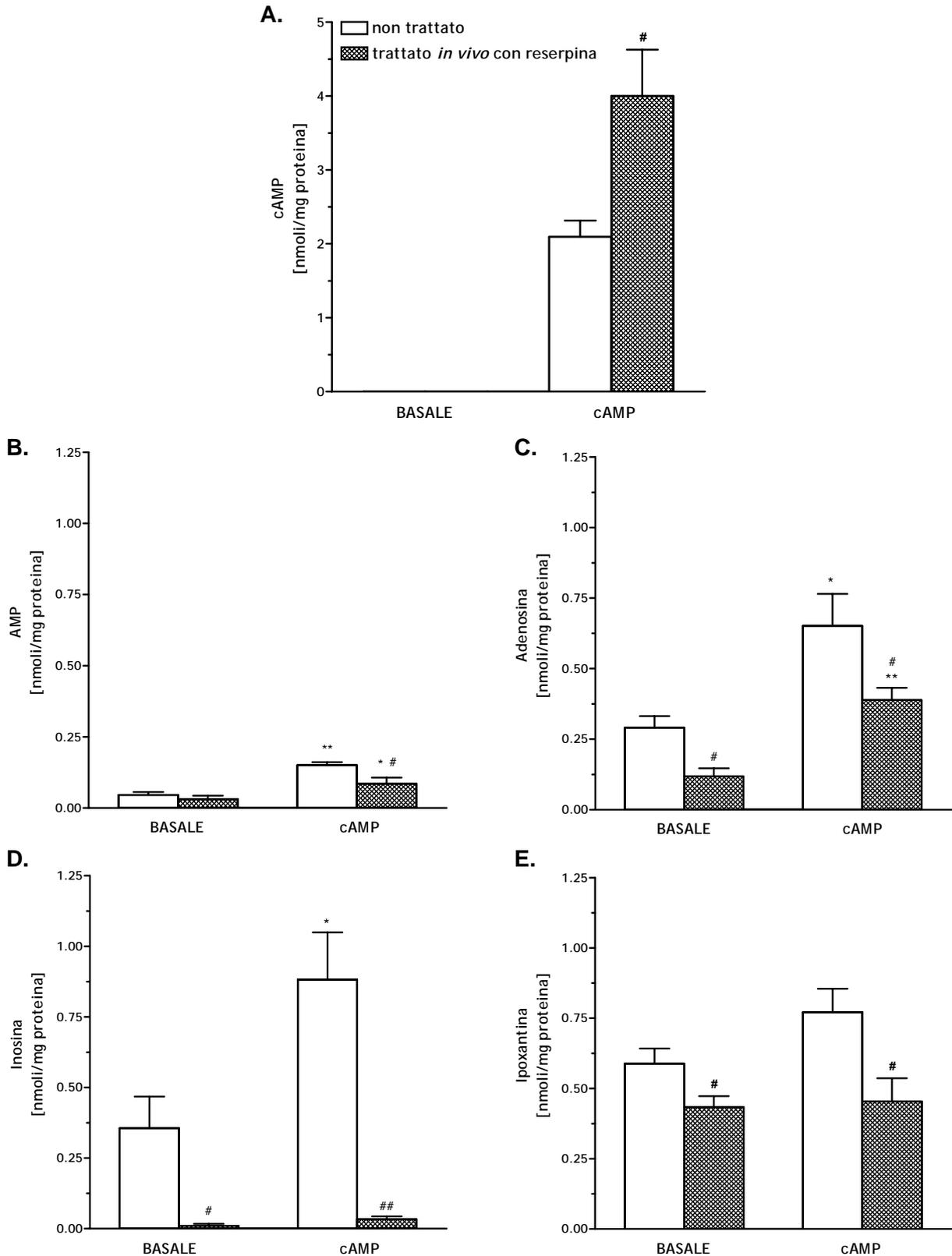
Al fine di delineare la possibile influenza del sistema simpatico sull'azione dell'AMP ciclico, una parte dei ratti è stata trattata *in vivo* con reserpina: l'esposizione dei preparati di ileo prelevato da questi animali al nucleotide ciclico 0.5 mM produce un effetto analogo a quello osservato nei preparati di animali non trattati, ovvero un iniziale e transitorio rilasciamento della muscolatura liscia, seguito da una rapida contrazione che si mantiene nel tempo.



**Figura 6.** Confronto tra le curve concentrazione-risposta per l'effetto contratturante dell'AMP ciclico 0.5 mM su ileo di ratti non trattati e trattati *in vivo* con reserpina. I dati, normalizzati rispetto al carbacolo (1  $\mu$ M), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-8 esperimenti. *p* è stato calcolato mediante one-way ANOVA. \* = *p* < 0.001 vs non trattato, calcolato mediante one-way ANOVA seguito dal test di Newman-Keuls.

Come si può osservare in *Figura 6*, in entrambi i tessuti il trattamento con concentrazioni crescenti di AMP ciclico (0.001-1 mM) induce una contrazione concentrazione-dipendente. La risposta dei preparati ottenuti da animali reserpinizzati, pur avendo un andamento analogo, è significativamente ridotta rispetto a quella ottenuta dall'ileo isolato di ratti non trattati (*p* < 0.001). Al contrario, entrambe le curve cumulative mettono in evidenza che la concentrazione 1 mM di nucleotide ciclico non è sufficiente ad evocare la risposta massimale da parte della muscolatura liscia.

D'altra parte, la risposta contratturante dell'AMP ciclico dipende anche dalla formazione dei suoi metaboliti. Per questo motivo, in parallelo si è studiato il metabolismo della purina da parte di strip di ileo provenienti da animali giovani non trattati e trattati *in vivo* con reserpina, mediante il dosaggio quali- e quantitativo dei nucleotidi e nucleosidi purinici nel mezzo di incubazione.



**Figura 7.** Influenza del trattamento dei ratti *in vivo* con reserpina (A) sulla degradazione dell'AMP ciclico esogeno (50  $\mu$ M) e sull'accumulo di (B) AMP, (C) adenosina, (D) inosina e (E) ipoxantina nel mezzo dopo 60 minuti di incubazione delle strip di ileo. I risultati sono la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 17-19 esperimenti. \*\* =  $p < 0.001$ ; \* =  $p < 0.05$  vs basale; ## =  $p < 0.001$ ; # =  $p < 0.05$  vs non trattato.

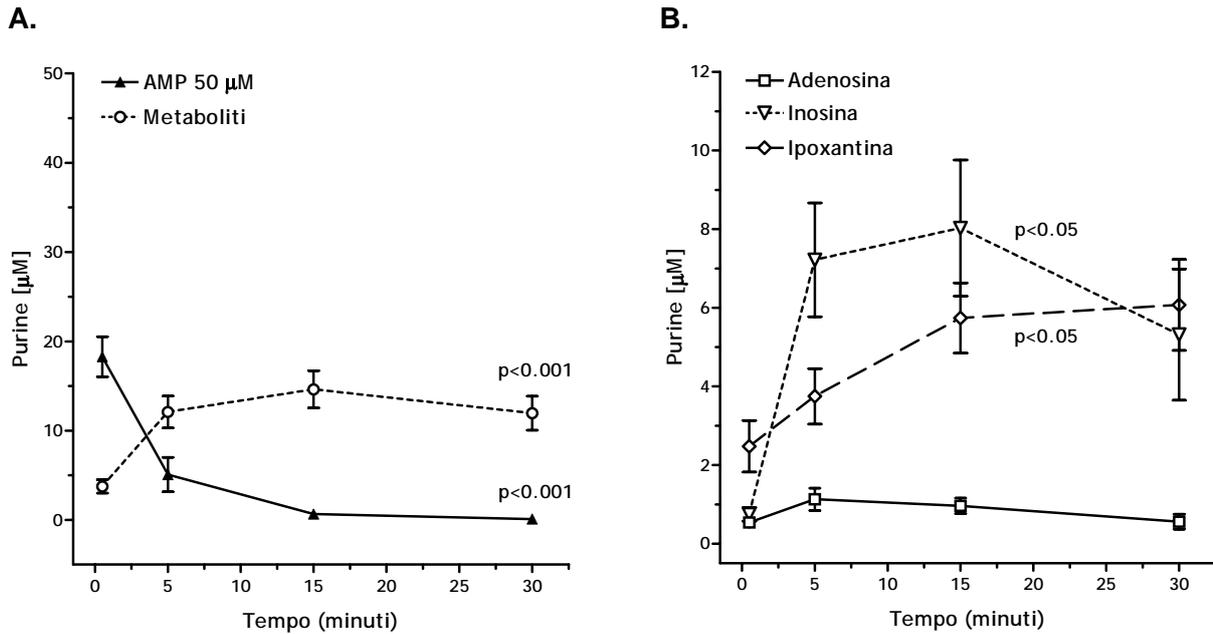
È risultato appropriato esprimere le concentrazioni dei metaboliti riportati in *Figura 7* come nmoli/mg proteina dal momento che la quantità prodotta e quella degradata sono direttamente correlate alla concentrazione di proteine enzimatiche (Giron *et al.*, 2008). In questo modo, si riduce la variabilità dei risultati dovuta alle piccole differenze nella quantità di tessuto incubato nelle diverse prove e, di conseguenza, della quantità di enzimi responsabili del metabolismo delle purine.

Come si può vedere in *Figura 7*, l'esposizione del tessuto ad AMP ciclico esogeno (50  $\mu$ M) determina un parziale recupero ( $2.10 \pm 0.22$  nmoli/mg proteina) del nucleotide ciclico (*Figura 7A*) e un significativo incremento dei suoi prodotti di degradazione: AMP (*Figura 7B*), adenosina (*Figura 7C*) e inosina (*Figura 7D*) nel mezzo di incubazione. Inoltre, si può osservare che il trattamento *in vivo* con reserpina induce un aumento statisticamente significativo dell'AMP ciclico esogeno recuperato nel mezzo ( $4.00 \pm 0.62$  nmoli/mg proteina) dopo 60 minuti di incubazione e riduce in maniera altrettanto significativa l'accumulo di tutti i suoi prodotti metabolici (*Figure 7B-E*), a suggerire un possibile intervento del sistema simpatico nella regolazione della via extracellulare AMP ciclico-adenosina. Le concentrazioni di inosina e ipoxantina risultano significativamente ridotte in seguito al trattamento *in vivo* con il farmaco ma, a differenza delle altre purine, non subiscono variazioni significative in presenza del nucleotide ciclico esogeno (*Figure 7D e 7E*).

#### ***Influenza del trattamento con AMP esogeno sull'accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto***

Dal momento che la presenza di CD73 è già stata dimostrata in molti tessuti, tra cui l'intestino di cavia (Nitahara *et al.*, 1995), si è voluto valutare direttamente la capacità dell'ileo di ratto di metabolizzare l'AMP esogeno. A tale scopo, le strip di tessuto provenienti da ratti giovani non trattati sono state esposte ad AMP 50  $\mu$ M per tempi differenti, da 0.5 a 30 minuti. La *Figura 8A* illustra la cinetica di degradazione del nucleotide esogeno e di comparsa dei suoi metaboliti nel mezzo di incubazione: le concentrazioni, in questo caso, sono espresse in  $\mu$ M per permettere il confronto diretto tra la concentrazione del nucleotide recuperato e quella inizialmente aggiunta, e delineare una possibile correlazione con la variazione nei livelli dei suoi metaboliti.

In *Figura 8A* si può osservare che la concentrazione di AMP risulta più che dimezzata nei primi 30 secondi di incubazione (-62%), raggiungendo un valore pari a  $18.27 \pm 2.24$   $\mu$ M fino a scomparire quasi completamente nell'arco di 15 minuti ( $0.67 \pm 0.44$   $\mu$ M). Le concentrazioni misurate hanno permesso di definire per l'AMP una cinetica di scomparsa di primo ordine e di calcolare un tempo di emivita pari a 0.3 minuti.



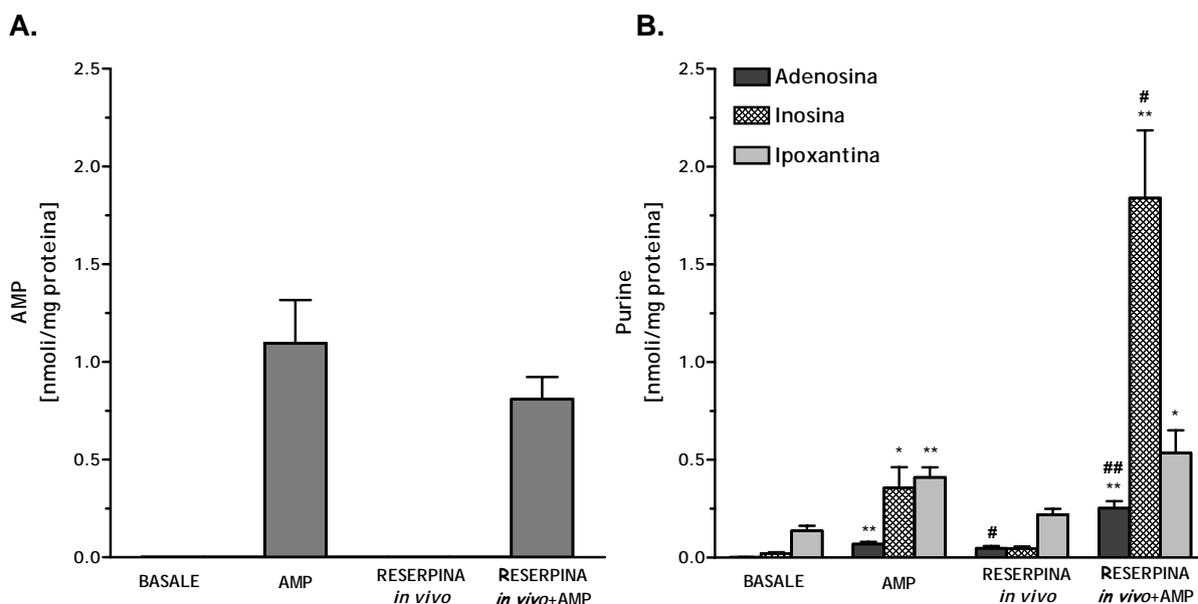
**Figura 8.** (A) Cinetica di degradazione dell'AMP esogeno (50  $\mu\text{M}$ ) e di comparsa dei suoi metaboliti (adenosina+inosina+ipoxantina). (B) Influenza del trattamento con AMP esogeno (50  $\mu\text{M}$ ) sulla formazione di adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione dell'ileo di ratto durante 60 minuti di incubazione. I risultati sono espressi come media $\pm$ SEM dei valori ottenuti da 10 esperimenti.  $p$  è stato calcolato mediante one-way ANOVA.

Contemporaneamente alla degradazione dell'AMP, dopo 5 minuti di incubazione è evidente un aumento significativo dei suoi metaboliti (Figura 8A), la cui concentrazione, espressa come somma di adenosina, inosina e ipoxantina, diventa pari a  $12.09 \pm 1.78 \mu\text{M}$  e si mantiene pressochè inalterata fino al termine dell'incubazione.

Le variazioni di concentrazione nel tempo dei singoli metaboliti sono riportate in Figura 8B: i livelli di adenosina e inosina risultano significativamente aumentati dopo 5 minuti di incubazione. Infatti, raggiungono valori rispettivamente pari a  $1.13 \pm 0.28$  e  $7.21 \pm 1.45 \mu\text{M}$  da livelli basali poco al di sopra del limite di rilevabilità (rispettivamente,  $0.19 \pm 0.06$  e  $0.41 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ). Mentre per l'adenosina si osserva un ritorno alle condizioni basali nell'arco di 15 minuti, la concentrazione di inosina rimane significativamente elevata fino al termine dell'incubazione, raggiungendo il picco massimo proprio a 15 minuti ( $8.02 \pm 1.73 \mu\text{M}$ ). Lo stesso intervallo di tempo è necessario affinché l'incremento di ipoxantina (Figura 8B) risulti significativo e si mantenga pressochè costante per tutto l'intervallo di incubazione.

Per valutare il possibile coinvolgimento della liberazione di catecolamine endogene dalle terminazioni nervose sull'attività degli ecto-enzimi responsabili del metabolismo dell'AMP sono stati condotti, in parallelo, esperimenti su strip di ileo prelevato da animali di 2-3 mesi non trattati e trattati *in vivo* con reserpina. L'attenzione è stata focalizzata, in particolar modo, su CD73, enzima di membrana che nel cuore di ratto sembra essere attivato dalla

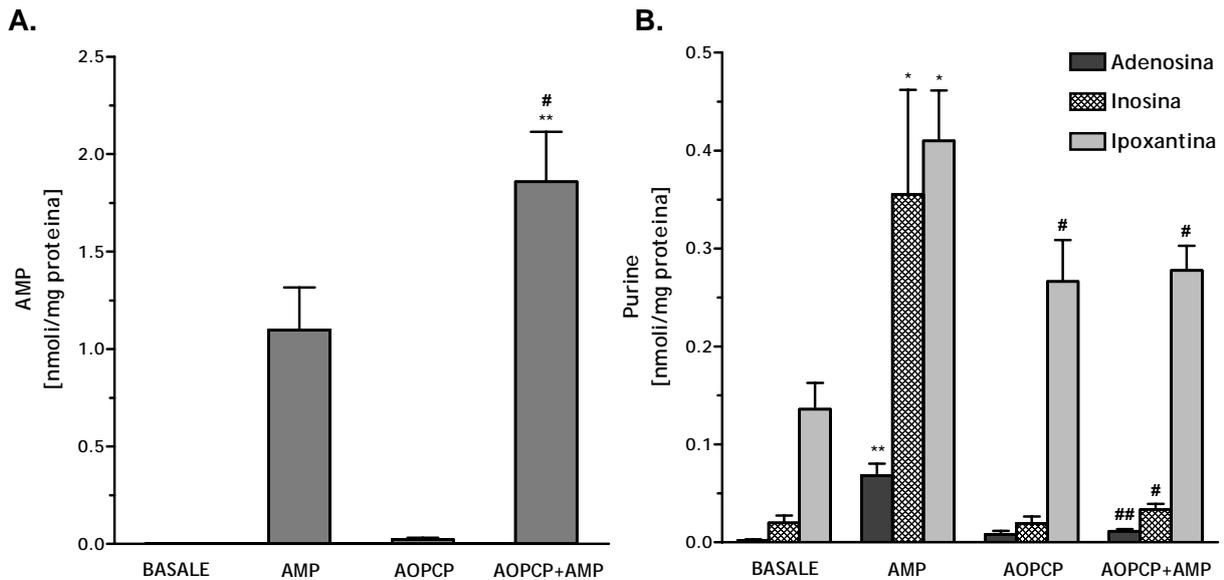
liberazione della noradrenalina endogena (Obata e Yamanaka, 2000). I preparati sono stati incubati con AMP esogeno (50  $\mu$ M), substrato per il quale l'enzima mostra una elevata specificità (Hunsucker *et al.*, 2005). È stato scelto un periodo di incubazione di 5 minuti, intervallo di tempo che permette di rilevare il nucleotide esogeno nel mezzo in concentrazione apprezzabile.



**Figura 9.** Influenza del trattamento dei ratti *in vivo* con reserpina (**A**) sulla degradazione dell'AMP esogeno 50  $\mu$ M e (**B**) sull'accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo dopo 5 minuti di incubazione delle strip di ileo. I risultati sono la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 10-12 esperimenti. \*\* =  $p < 0.001$ ; \* =  $p < 0.05$  vs (-AMP); ## =  $p < 0.001$ ; # =  $p < 0.05$  vs non trattato.

Il trattamento *in vivo* con reserpina non induce variazioni significative nella concentrazione di AMP ancora presente nel mezzo dopo esposizione al nucleotide esogeno, pur essendo visibile una tendenza alla diminuzione nei preparati provenienti da animali reserpinnizzati (Figura 9A). Tale osservazione è comprovata dal contemporaneo e significativo incremento di adenosina e inosina, i cui livelli raggiungono valori rispettivamente 3.6 e 5 volte superiori rispetto a quanto rilevato dopo esposizione ad AMP del tessuto proveniente da ratti non trattati. Al contrario, la reserpinnizzazione non modifica le concentrazioni di ipoxantina, che aumentano significativamente dopo incubazione con il nucleotide in maniera analoga nei due gruppi di animali (Figura 9A).

In condizioni basali, si può osservare un incremento di adenosina prodotto esclusivamente dal trattamento dei ratti *in vivo* con reserpina, a confermare l'induzione di CD73 in assenza di catecolamine endogene.



**Figura 10.** Influenza del trattamento con AOPCP 200  $\mu$ M (**A**) sulla degradazione dell'AMP esogeno (50  $\mu$ M) e (**B**) sui livelli dei suoi metaboliti adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo dopo 5 minuti di incubazione delle strip di ileo di ratto. I risultati sono la media $\pm$ SEM dei valori ottenuti da 10-12 esperimenti. \*\* =  $p < 0.001$ ; \* =  $p < 0.05$  vs (-AMP); ### =  $p < 0.001$ ; # =  $p < 0.05$  vs (-AOPCP).

L'inibizione di CD73 con AOPCP, oltre a confermare l'azione catalitica dell'enzima a livello dell'ileo di ratto, consente di definire il suo diretto coinvolgimento nel destino metabolico dell'AMP. Si può osservare, innanzitutto, che a 5 minuti di incubazione, la presenza nel mezzo del solo inibitore (*Figura 10A*) permette il recupero, seppur minimo, dell'AMP endogeno, la cui concentrazione in condizioni basali è al di sotto del limite di rilevabilità del metodo. Il pretrattamento delle strip con AOPCP 200  $\mu$ M modifica l'entità di degradazione del nucleotide (*Figura 10A*) aumentandone il recupero in modo statisticamente significativo, da  $1.10 \pm 0.22$  a  $1.86 \pm 0.26$  nmoli/mg proteina.

Parallelamente, l'inibitore annulla gli effetti causati dal nucleotide esogeno sull'accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina (*Figura 10B*), riducendo significativamente le concentrazioni delle purine (rispettivamente 84%, 91% e 32%) che diventano paragonabili a quelle rilevate in presenza di solo AOPCP. Si può osservare, inoltre, che i livelli di ipoxantina (*Figura 10B*), in condizioni basali, risultano significativamente incrementati dal solo trattamento con l'inibitore, rimanendo inalterati dopo la successiva esposizione del tessuto ad AMP esogeno.

### **Studi di immunoistochimica per CD73, ADA e recettori P1 nell'ileo di ratto**

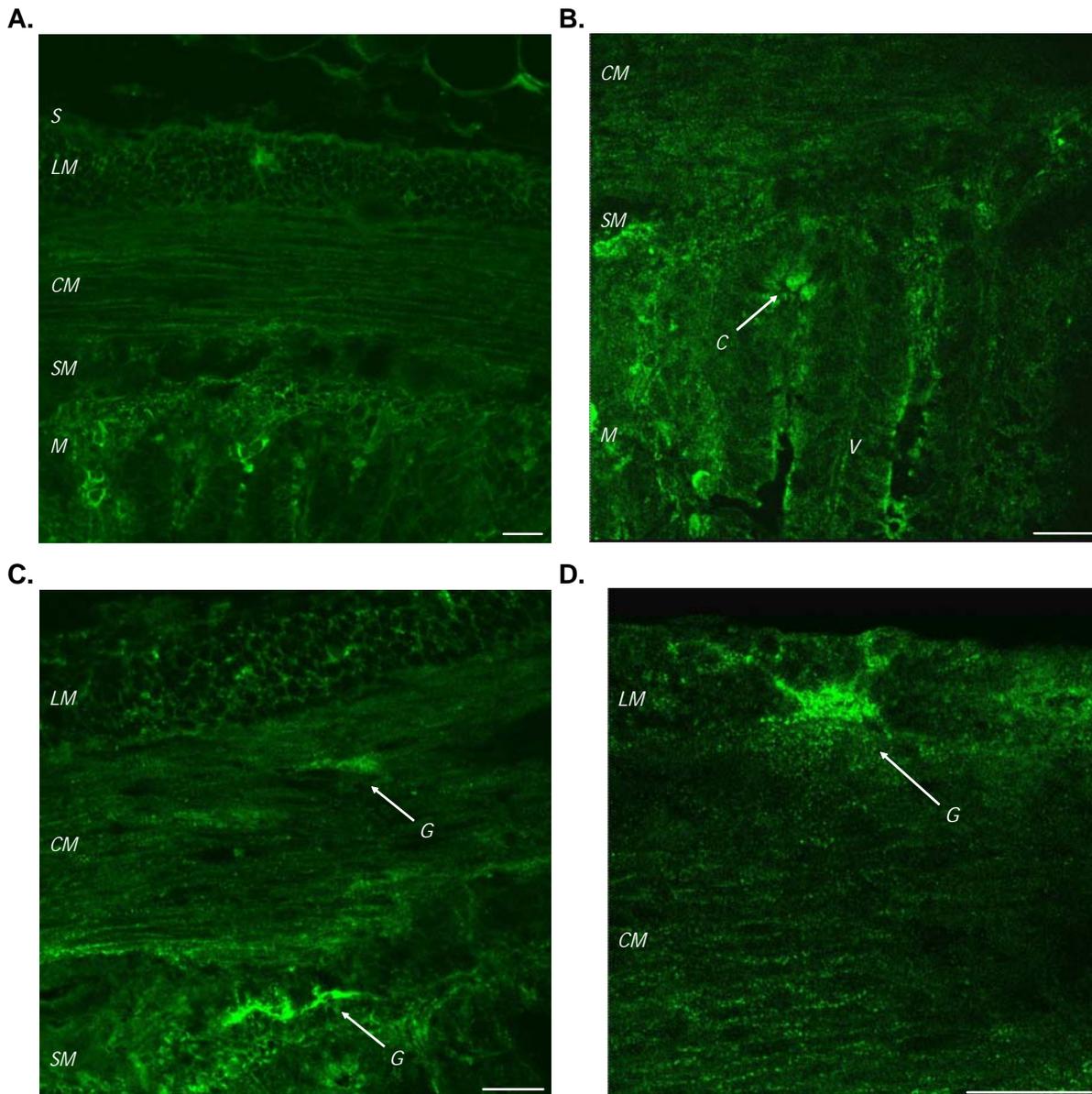
CD73 e ADA sono enzimi chiave nel metabolismo purinico, essenziali per regolare e mantenere i livelli di adenosina extracellulare; essi sono già stati caratterizzati in diversi tessuti animali e nell'uomo, per cui è ormai noto che il grado di attività e le modalità di espressione sono specie- e tessuto-specifiche (Hunsucker *et al.*, 2005; Moriwaki *et al.*, 2004). In ogni caso, mentre ADA è presente sia nel citoplasma che sulla superficie delle cellule (Franco *et al.*, 1988), CD73 è una glicoproteina ancorata esclusivamente sul lato esterno della membrana plasmatica (Zimmermann, 1992).

Dal momento che l'ileo di ratto è in grado di degradare l'AMP esogeno con conseguente accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina nel mezzo di incubazione, con la tecnica dell'immunofluorescenza si è voluto confermare la presenza e studiare il profilo di espressione dei due enzimi direttamente coinvolti nel metabolismo extracellulare dell'adenosina: CD73 e ADA. A tale scopo, la distribuzione tessutale è stata valutata su sezioni di ileo tagliate al criostato e fissate in formaldeide, usando l'anticorpo monoclonale anti-CD73 (*Figura 11*) e l'antisiero anti-ADA (*Figura 12*).

In *Figura 11A* si può osservare la distribuzione costitutiva, ma non uniforme, di CD73 nell'ileo di ratto: l'intensità del segnale è variabile a seconda della regione presa in esame. Sia gli strati muscolari che la mucosa risultano essere positivi per la presenza dell'enzima. In quest'ultima regione (*Figura 11B*), una intensa marcatura è individuabile sulla porzione apicale delle cellule epiteliali che costituiscono le ghiandole intestinali e le cripte, particolari invaginazioni della superficie mucosa dalle quali si protendono i villi.

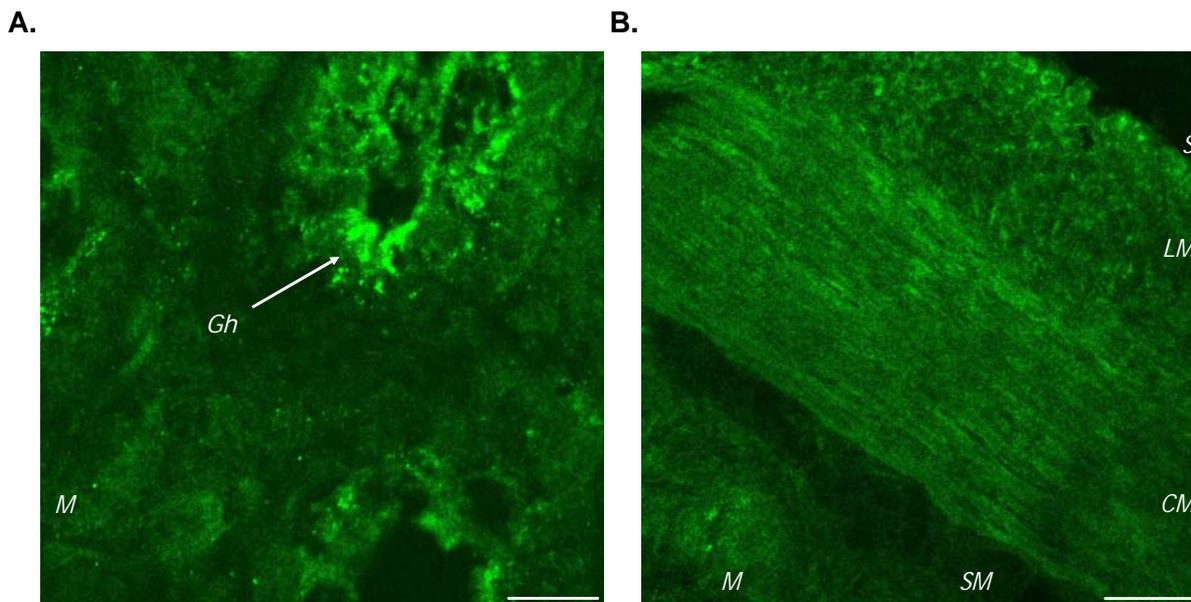
La *Figura 11C* evidenzia l'immunoreattività positiva per CD73 nella *muscularis externa*. La sezione trasversale del tessuto permette di rilevare la distribuzione di membrana dell'enzima: nello strato circolare, esso si dispone disegnando i fasci che decorrono parallelamente all'asse longitudinale delle cellule. Nello strato longitudinale il segnale delinea in modo preciso il contorno della cellula all'interno della quale la marcatura è del tutto assente. Le prove di IHC suggeriscono, quindi, che CD73 è espressa esclusivamente sulla membrana plasmatica.

Un segnale molto intenso e puntiforme è visibile a livello di particolari strutture localizzate tra i due strati di muscolatura liscia: in base alla morfologia e alla distribuzione, si può ipotizzare che questi gruppi di cellule corrispondano ai gangli enterici che formano il plesso di Auerbach e il plesso sottomucoso (*Figure 11C e 11D*). In queste regioni la fluorescenza appare più marcata, a suggerire una maggiore concentrazione dell'enzima nel SNE rispetto al muscolo.



**Figura 11. Localizzazione immunoistochimica di CD73 nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale delle sezioni di tessuto marcate con anti-CD73 mostrano la distribuzione dell'enzima (A) nel tessuto intestinale, dove si distinguono (B) la mucosa, (C) la muscularis externa e, all'interno di questa, (D) un ganglio mienterico. **S** = serosa; **LM** = muscolatura longitudinale; **CM** = muscolatura circolare; **SM** = sottomucosa; **M** = mucosa; **C** = cripta; **V** = villo; **G** = ganglio enterico. Barra = 50  $\mu$ m.

In *Figura 12* sono illustrate due sezioni di ileo di ratto marcate con anti-ADA, dalle quali risulta evidente la distribuzione costitutiva dell'enzima a livello della parete intestinale. Nella mucosa (*Figura 12A*) si può osservare un segnale molto forte e selettivo nella porzione apicale delle cellule epiteliali che costituiscono le ghiandole intestinali. La *Figura 12B* evidenzia uno staining diffuso e uniforme su entrambi gli strati muscolari, a definire una localizzazione principalmente citosolica della proteina, senza tuttavia escludere la sua



**Figura 12. Localizzazione immunoistochimica di ADA nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale delle sezioni di tessuto marcate con anti-ADA mostrano la distribuzione dell'enzima (A) nelle ghiandole della mucosa e (B) nella muscularis externa dell'ileo di ratto. **S** = serosa; **LM** = muscolatura longitudinale; **CM** = muscolatura circolare; **SM** = sottomucosa; **M** = mucosa; **Gh** = ghiandola intestinale. Barra = 60  $\mu$ m.

presenza anche sulla superficie della membrana plasmatica, dal momento che l'anticorpo impiegato in questo studio non discrimina tra le due forme: ecto-ADA e ADA citosolica.

Gli importanti effetti dell'adenosina a livello intestinale sono influenzati non soltanto dall'attività di CD73 e ADA sul controllo delle concentrazioni extracellulari della purina, ma anche dalla presenza dei suoi recettori nel tessuto in esame (Akkari *et al.*, 2006). Di conseguenza, si è voluta indagare la presenza dei recettori P1 nell'ileo di ratto, marcando le sezioni di tessuto con anticorpi specifici che riconoscono i recettori A1, A2a, A2b e A3.

La *Figura 13* evidenzia lo staining positivo del tessuto per tutti e 4 i sottotipi recettoriali. Queste proteine mostrano una presenza costitutiva, ma non uniforme, compatibile con una diversa concentrazione a seconda della regione e del recettore presi in esame.

Nel muscolo si può osservare che i recettori purinergici si distinguono per un profilo di distribuzione tra loro diverso (*Figura 13*, pannelli di sinistra). Il recettore A1 (*Figura 13A*) è altamente espresso sia nella muscolatura longitudinale che circolare (*Figura 13A*, pannello di sinistra); nella regione di contatto tra i due strati, un segnale molto intenso è visibile a livello dei gangli mienterici che formano il plesso di Auerbach. In queste aree (*Figura 13A*, pannello centrale), la fluorescenza è diffusa e apparentemente più intensa rispetto al muscolo, tanto da delineare in modo abbastanza netto il contorno dei nuclei delle cellule che costituiscono il ganglio stesso.

La sezione trasversale del tessuto in *Figura 13B* rivela la presenza di A2aR nella *muscularis*

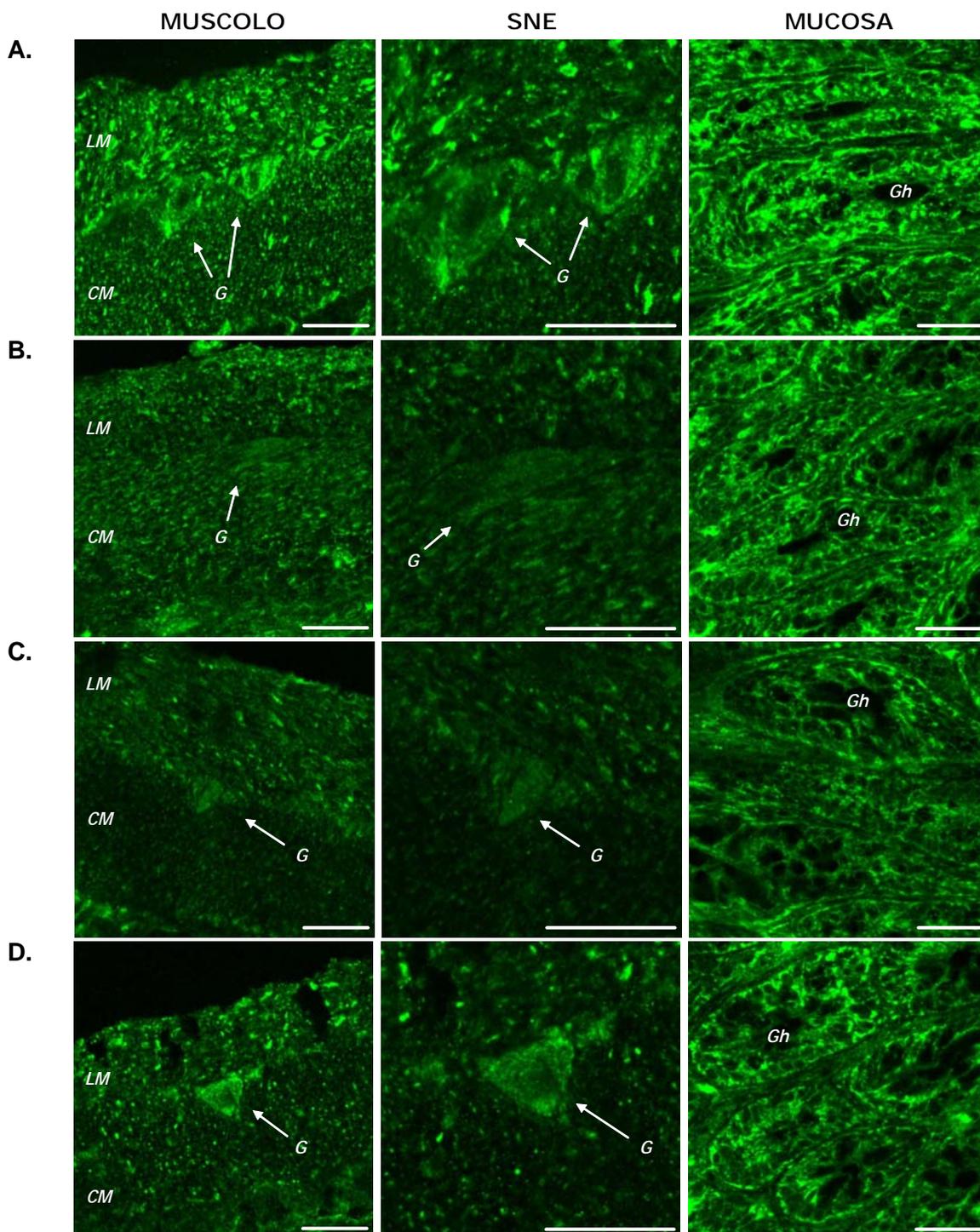
*externa* (Figura 13B, pannello di sinistra) dell'ileo di ratto, senza tuttavia evidenziare significative differenze tra i due strati muscolari che manifestano una fluorescenza diffusa e uniforme. Anche A2aR mostra una localizzazione neuronale (Figura 13B, pannello centrale) dove l'intensità del segnale è paragonabile a quella del muscolo.

Per il recettore A2b (Figura 13C), nel distretto muscolare è possibile osservare una marcatura ridotta, ma regione-specifica (Figura 13C, pannello di sinistra); il segnale, infatti, quasi assente nella muscolatura circolare, è circoscritto alla muscolatura longitudinale e ai gangli mienterici (Figura 13C, pannello centrale).

Pur non presentando una colorazione molto intensa, il profilo di distribuzione di A3R (Figura 13D) appare simile a quello di A1R: il segnale tende ad essere puntiforme negli strati muscolari (Figura 13D, pannello di sinistra), diffuso e uniforme all'interno dei gangli (Figura 13D, pannello centrale).

Caratteristica comune a tutti i recettori P1, e ben visibile in Figura 13, è lo staining significativamente maggiore nella mucosa (Figure 13A-D, pannelli di destra) rispetto al muscolo (Figure 13A-D, pannelli di sinistra). La marcatura sembra essere intensa e selettiva sulla superficie dell'epitelio a livello della porzione basale e apicale delle cellule epiteliali, con un profilo pressochè sovrapponibile, benché di intensità diversa, dei recettori A1, A2a, A2b e A3 nella mucosa intestinale. Parallelamente a quanto osservato nel muscolo, A2bR (Figura 13C, pannello di destra) appare il recettore meno espresso, mentre A1R (Figura 13A, pannello di destra) e A2aR (Figura 13B, pannello di destra) presentano la concentrazione più elevata. Le immagini evidenziano che in questa regione il segnale relativo ai 4 recettori P1 delinea il contorno delle cellule epiteliali che costituiscono le ghiandole (Figure 13A-D, pannelli di destra), suggerendo una localizzazione di membrana. Al contrario, la colorazione dello strato muscolare permette di ipotizzare anche una distribuzione citosolica di queste proteine (Figure 13A-D, pannelli di sinistra).

Le prove condotte incubando le sezioni di ileo in assenza di anticorpi (sia primari che secondari) hanno dimostrato una autofluorescenza pressochè assente del tessuto. Anche i controlli negativi, ottenuti per esposizione al solo anticorpo secondario, hanno evidenziato un segnale di fondo trascurabile.

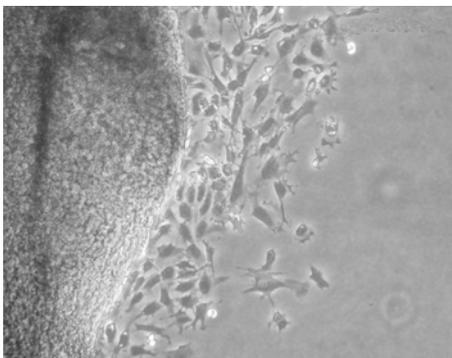


**Figura 13. Localizzazione immunoistochimica dei recettori dell'adenosina nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale delle sezioni di tessuto marcate con gli anticorpi anti-A1R, anti-A2aR, anti-A2bR e anti-A3R mostrano la distribuzione dei recettori dell'adenosina A1 (A), A2a (B), A2b (C) e A3 (D) nel tessuto intestinale, dove si distinguono la muscularis externa (pannelli di sinistra) e la mucosa (pannelli di destra). I pannelli centrali sono relativi a particolari del plesso mienterico, fotografati con uno zoom 2x. **LM** = muscolatura longitudinale; **CM** = muscolatura circolare; **G** = ganglio mienterico; **Gh** = ghiandola intestinale. Barra = 40  $\mu$ m.

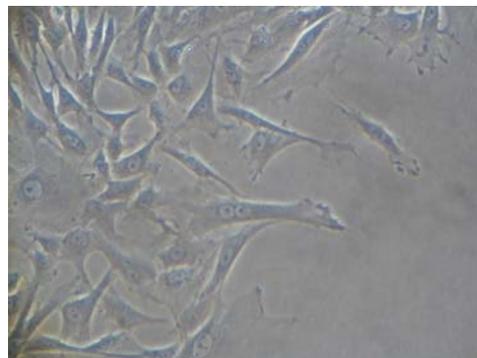
### **Coltura primaria di ISMC di ratto**

La mucosa intestinale è già stata ampiamente studiata, pertanto nel mio lavoro si è focalizzata l'attenzione sul muscolo liscio e, in particolare, sulla muscolatura longitudinale. Il metodo per ottenere colture primarie di cellule muscolari lisce di intestino di ratto è stato messo a punto al fine di integrare e approfondire da una parte i risultati sul metabolismo di AMP ciclico e AMP esogeni da parte del tessuto, ottenuti attraverso dosaggi HPLC dei nucleotidi e nucleosidi purinici, dall'altra la valutazione mediante tecnica dell'organo isolato del coinvolgimento dell'adenosina nell'effetto contratturante dell'AMP ciclico esogeno sulla muscolatura liscia intestinale. La tensione del preparato in seguito all'esposizione ad agenti rilascianti o contratturanti è, infatti, direttamente legata a questo tipo di muscolatura.

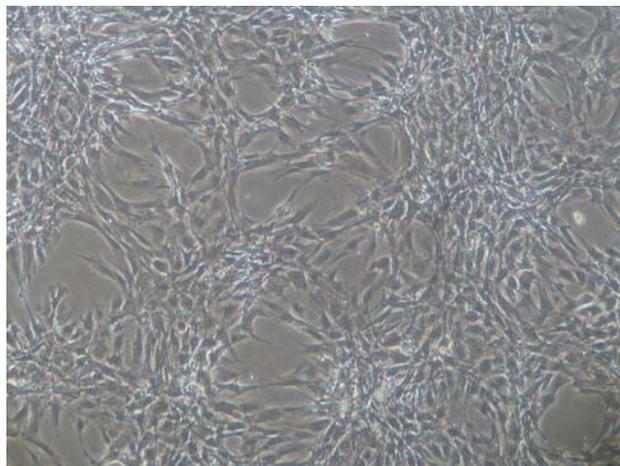
**A.**



**B.**



**C.**



**Figura 14. Coltura primaria di ISMC di ratto.** (A) Crescita delle ISMC dai frammenti di muscolatura liscia longitudinale di ileo di ratto dopo 6 giorni dall'espianto (obiettivo 6x). (B) Cellula in fase di mitosi (obiettivo 15x), all'interno della quale si può identificare una coppia di nuclei. (C) Morfologia delle ISMC in linea (obiettivo 4x): le cellule (passaggio 1) mostrano la tipica forma affusolata, disponendosi a formare regioni multistrato intervallate da zone a bassa densità cellulare.

La tecnica impiegata per ottenere colture primarie di ISMC implica l'espianto dell'ileo, l'isolamento dello strato di muscolatura liscia longitudinale e un periodo di tempo per

permettere alle cellule muscolari di migrare dai frammenti di tessuto messi in coltura.

Gli espianti vengono osservati, senza subire alcun trattamento, almeno due volte durante la prima settimana di incubazione, per controllare l'assenza di eventuali contaminanti biologici; le prime cellule compaiono non prima di sei giorni dalla messa in coltura, crescono lentamente dall'espianto originale e presentano una forma affusolata (*Figura 14A*). In genere, nell'arco di due settimane raggiungono un grado di confluenza di circa il 60-80% dell'area totale a disposizione sulla piastra; questo risultato è perfettamente riproducibile per ogni singola procedura di isolamento, ovvero per ogni linea cellulare ottenuta.

Una volta in subcultura, le ISMC mostrano un aspetto eterogeneo a bassa densità, disponendosi in maniera estremamente dispersa con un numero minimo di contatti cellula-cellula. La singola cellula è spesso caratterizzata da una struttura ampia e allungata, all'interno della quale è possibile individuare la presenza di un doppio nucleo, a indicare un elevato indice di attività mitotica (*Figura 14B*).

Raggiunta la confluenza, le ISMC in linea mostrano una morfologia uniforme, uguale a quella osservata nella coltura primaria, ovvero la tipica forma affusolata. Esse inoltre formano aree locali ad alta densità, intervallate da zone a densità minore, presentandosi così sotto il tipico aspetto "hill and valley" (*Figura 14C*), caratteristico di molti tipi di cellule muscolari lisce (SMC) in coltura (Ross e Kariya, 1980). Al microscopio ottico, le cellule sembrano avere larghe aree citoplasmatiche che contengono una serie di linee parallele che corrispondono, probabilmente, ai fasci di miofilamenti. A volte, inoltre, sono caratterizzate dalla presenza di lunghi e stretti processi citoplasmatici che passano da una cellula all'altra (*Figura 14C*). È importante sottolineare che la morfologia della cellula differenziata viene mantenuta in tutte le fasi di crescita in coltura delle ISMC.

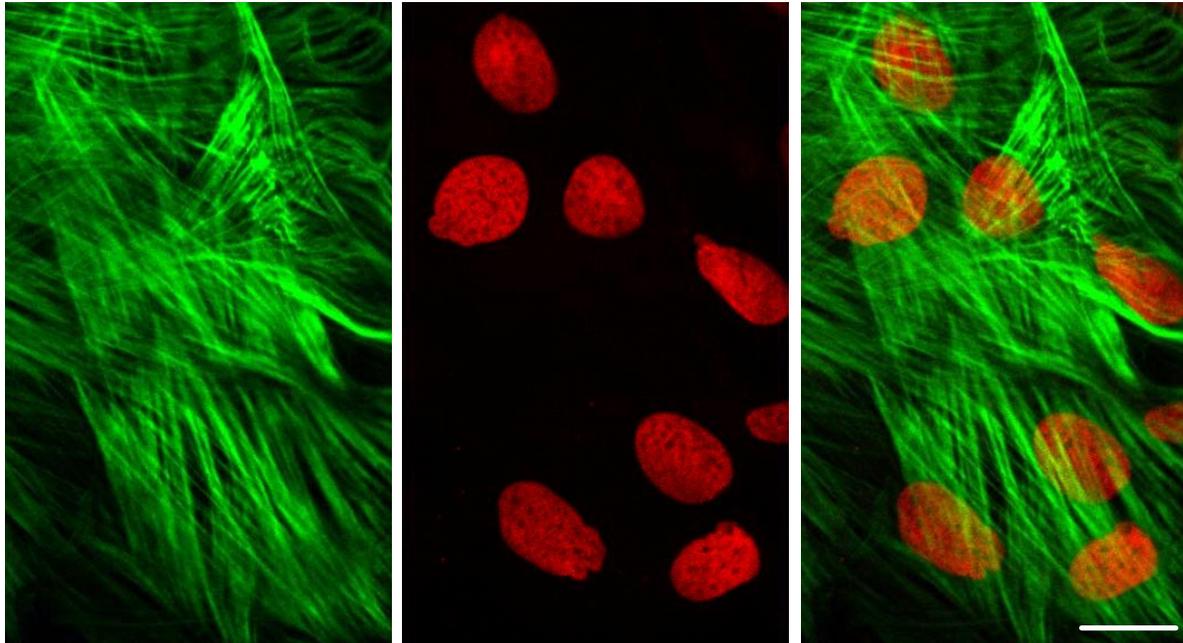
### **Caratterizzazione delle ISMC in coltura**

Al fine di dimostrare il fenotipo della SMC, le ISMC in coltura sono state impiegate per studi di immunofluorescenza diretta e indiretta usando, rispettivamente, gli anticorpi che riconoscono la  $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) e la  $\gamma$ -actina enterica del muscolo liscio ( $\gamma$ -SMA), filamenti contrattili ampiamente utilizzati come proteine marker per il riconoscimento delle cellule muscolari lisce.

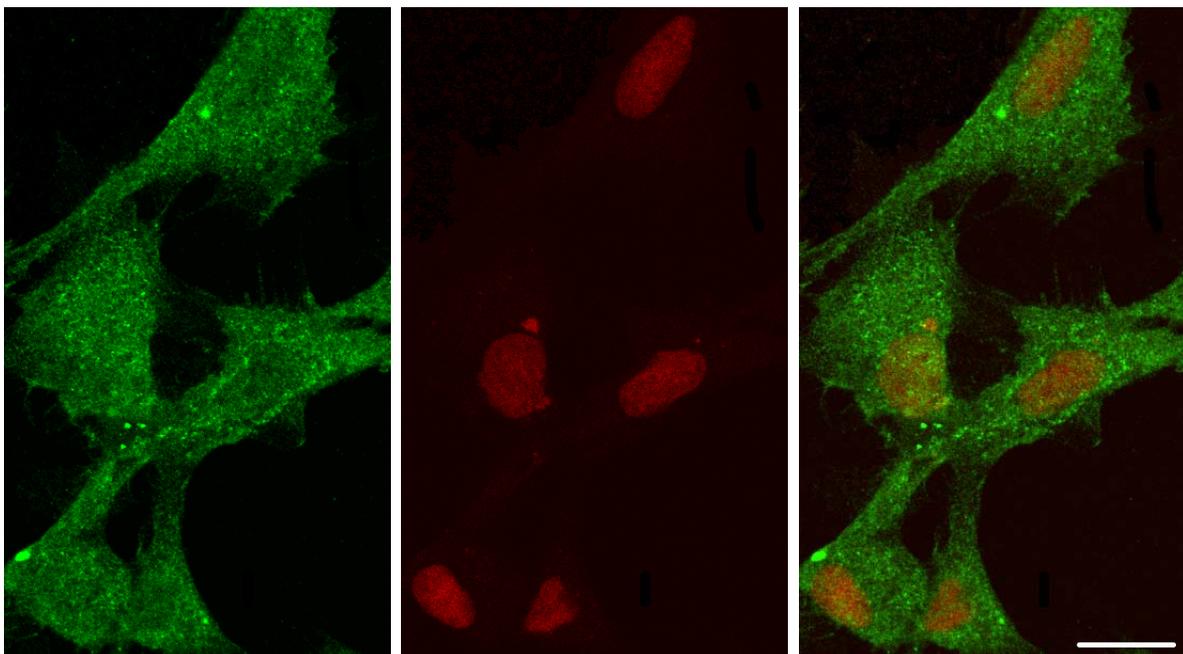
Come illustrano le *Figure 15A* e *15B*, le ISMC isolate dalla muscolatura longitudinale mostrano un'intensa immunoreattività sia per l' $\alpha$ -SMA (*Figura 15A*) che per la  $\gamma$ -SMA (*Figura 15B*) ed evidenziano la tipica distribuzione a fasci, caratteristica delle SMC. Le immagini ottenute al microscopio confocale hanno permesso di stimare una percentuale di marcatura superiore al 98% della popolazione totale, a dimostrare il fenotipo della SMC e, nello stesso

tempo, la purezza della linea cellulare ottenuta.

A.



B.



**Figura 15.** Caratterizzazione delle ISMC in coltura. Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle ISMC marcate con anti- $\alpha$ -SMA e anti- $\gamma$ -SMA enterica evidenziano l'intensa immunoreattività di (A)  $\alpha$ -SMA e (B)  $\gamma$ -SMA (in verde, pannello di sinistra); la marcatura con lo ioduro di propidio mette in evidenza i nuclei delle ISMC (in rosso, pannelli centrali). Le immagini integrate sono illustrate nei pannelli di destra. Barra = 20  $\mu$ m.

### **Cinetica di scomparsa dell'AMP esogeno e di formazione dei suoi metaboliti nel mezzo di incubazione delle ISMC di ratto**

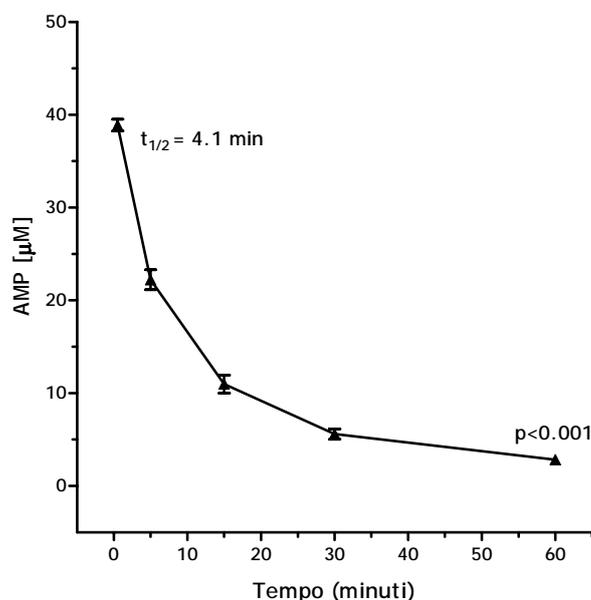
Nonostante l'ileo di ratto sia in grado di degradare l'AMP esogeno, è noto che la parete del lume intestinale è costituita da molteplici strati e sistemi integrati così che risulta difficile stabilire a priori dove si localizzino gli enzimi responsabili del veloce catabolismo del nucleotide e in quale modo ogni singolo strato contribuisca a tale processo, quando il substrato viene aggiunto al mezzo di incubazione delle strip di tessuto intero.

Al fine di valutare direttamente la capacità delle ISMC di ratto di metabolizzare l'AMP e di definire il ruolo di CD73 e ADA nel metabolismo dell'adenosina, le stesse cellule in coltura sono state esposte al nucleotide esogeno (50  $\mu\text{M}$ ) per tempi differenti, da 0.5 a 60 minuti.

La *Figura 16* illustra la cinetica di degradazione dell'AMP nel terreno di coltura delle ISMC: si può osservare come il nucleotide venga rapidamente metabolizzato già nell'arco dei primi 30 secondi dall'aggiunta, raggiungendo una concentrazione pari a  $38.87 \pm 0.62 \mu\text{M}$ ; il processo procede in maniera altrettanto veloce, tanto che dopo 5 minuti oltre il 50% del nucleotide è stato degradato e la quantità recuperata è pari a  $22.22 \pm 1.07 \mu\text{M}$ , ma un ritorno alle condizioni basali è visibile solo dopo 60 minuti.

Sulla base delle concentrazioni rilevate, l'AMP esogeno viene degradato secondo una cinetica di primo ordine, con un tempo di emivita medio di scomparsa di 4.1 minuti.

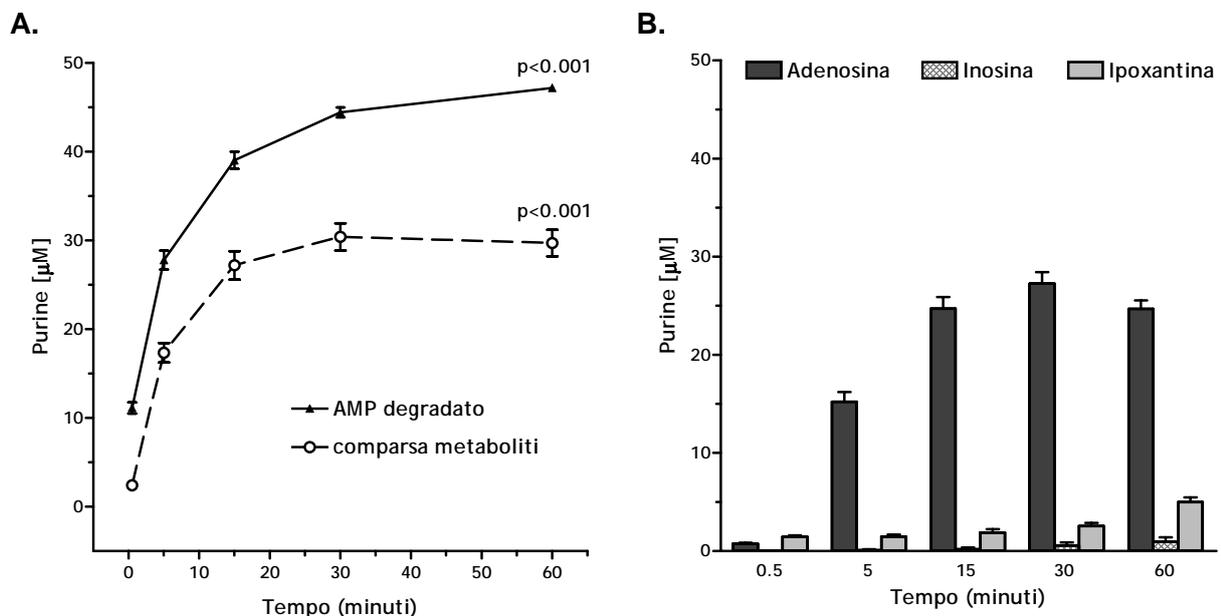
Nella stessa serie di esperimenti è stata misurata la concentrazione dei suoi prodotti di



**Figura 16.** Cinetica di degradazione dell'AMP esogeno 50  $\mu\text{M}$  nel terreno di coltura delle ISMC di ratto durante 60 minuti di incubazione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 10 esperimenti.  $p$  è stato calcolato mediante one-way ANOVA.

degradazione: adenosina, inosina e ipoxantina. In *Figura 17A* è riportato il confronto tra la cinetica di scomparsa dell'AMP esogeno dal terreno di coltura e la cinetica di accumulo del pool di metaboliti; quest'ultimo raggiunge lo steady-state dopo 15 minuti di incubazione con una velocità pari a  $1.8 \mu\text{M}/\text{min}$ . Come si può osservare, la formazione di adenosina+inosina+ipoxantina è più lenta rispetto all'eliminazione del nucleotide e, anche dopo 60 minuti, solo il 59.4% dell'AMP viene recuperato nel mezzo sotto forma di questi prodotti di degradazione.

La *Figura 17B* illustra la formazione dei singoli metaboliti in seguito all'esposizione delle ISMC all'AMP esogeno. La scomparsa del nucleotide è accompagnata da un aumento pressoché speculare di adenosina, la cui concentrazione diventa pari a  $15.21 \pm 0.99 \mu\text{M}$  a 5 minuti; si osserva il maggior accumulo del nucleoside a 30 minuti ( $27.24 \pm 1.18 \mu\text{M}$ ) e una tendenza, seppur non significativa, alla diminuzione all'ultimo tempo di incubazione.



**Figura 17. Degradazione dell'AMP e comparsa dei suoi metaboliti.** (A) Confronto tra la cinetica di scomparsa dell'AMP esogeno e la cinetica di accumulo del pool dei metaboliti (adenosina+inosina+ipoxantina). (B) Influenza del trattamento con AMP esogeno  $50 \mu\text{M}$  sull'accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina nel terreno di coltura delle ISMC durante 60 minuti di incubazione. I risultati sono espressi come  $\text{media} \pm \text{SEM}$  dei valori ottenuti da 10 esperimenti.  $p$  è stato calcolato mediante one-way ANOVA.

A differenza dell'adenosina, inosina e ipoxantina mostrano una tendenza all'accumulo solo alla fine dell'incubazione. In particolare, nel caso dell'ipoxantina l'aumento di concentrazione diventa statisticamente significativo a 60 minuti.

Dal momento che l'AMP non può diffondere attraverso le membrane, la diminuzione della sua concentrazione, associata all'aumento dei livelli di adenosina e ipoxantina nel mezzo,

indica verosimilmente che il nucleotide viene metabolizzato ad opera di enzimi di superficie delle ISMC.

In condizioni basali, ovvero in assenza del substrato esogeno, i livelli di AMP, adenosina, inosina e ipoxantina sono risultati al limite della rilevabilità del metodo.

### ***Ruolo di CD73 nel metabolismo dell'AMP nelle ISMC di ratto***

Per definire il coinvolgimento di CD73 nel metabolismo dell'AMP nelle ISMC, sono stati impiegati due inibitori enzimatici chimicamente distinti: AOPCP, un analogo dell'ADP, e Con A, un derivato non nucleosidico. Per escludere il possibile intervento di PA nella degradazione dell'AMP, in questi esperimenti è stato impiegato anche un inibitore selettivo dell'enzima, il levamisolo (10 mM). PA, infatti, è in grado di defosforilare l'AMP e sembra presente nell'intestino in concentrazione elevata (Calhau *et al.*, 2000).

Le cellule sono state esposte ai diversi inibitori e poi ad AMP esogeno. Le curve di cinetica mostrano che i pretrattamenti con AOPCP 200  $\mu$ M (*Figura 18A*) e Con A 0.1 mg/ml (*Figura 18B*), molecole idrofile che non attraversano la membrana plasmatica, riducono in maniera analoga la clearance dell'AMP esogeno, aumentandone significativamente il tempo di emivita, che raggiunge valori, rispettivamente, pari a 9.9 e 9.7 minuti.

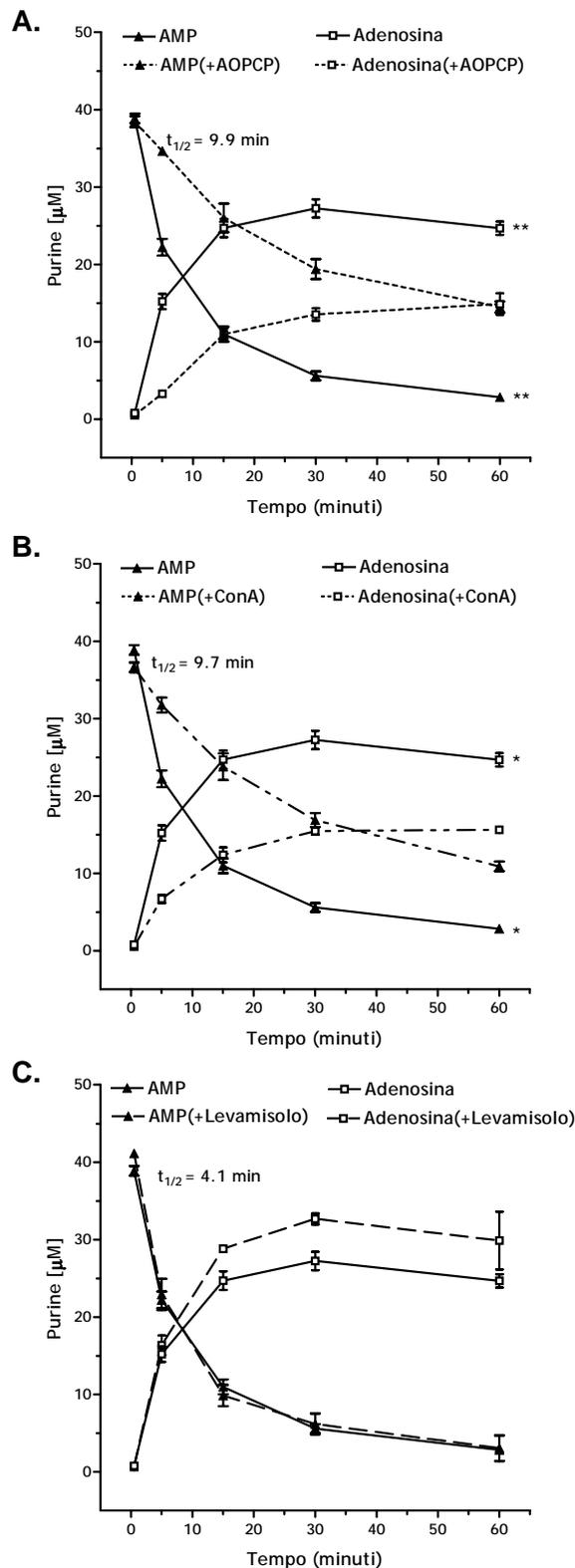
Contemporaneamente, dopo esposizione ad AOPCP e Con A, il recupero dell'AMP nel terreno di coltura è accompagnato da un ridotto accumulo di adenosina extracellulare, le cui concentrazioni rilevate al termine dell'incubazione sono, rispettivamente, di  $14.87 \pm 1.39$  e  $15.61 \pm 0.24$   $\mu$ M.

Al contrario, come si può osservare dalla perfetta sovrapposizione delle due curve in *Figura 18C*, la preincubazione delle cellule con levamisolo non modifica l'entità di degradazione dell'AMP esogeno, ad indicare che le ISMC convertono il nucleotide ad adenosina esclusivamente ad opera di CD73.

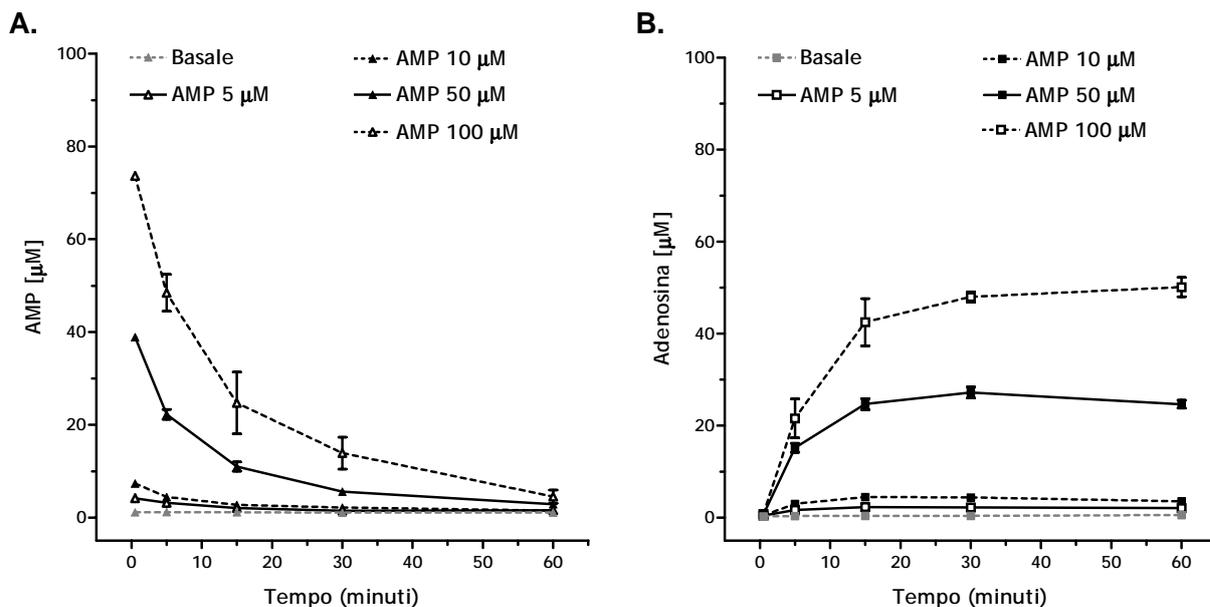
### ***Influenza della concentrazione di AMP esogeno sulla formazione dei suoi metaboliti***

Dal momento che l'inosina tende ad accumularsi nel mezzo solo al termine dell'incubazione, si è valutato se questo fenomeno dipendesse dai livelli di adenosina in sede extracellulare. A tale scopo, le ISMC sono state incubate con AMP 5-100  $\mu$ M.

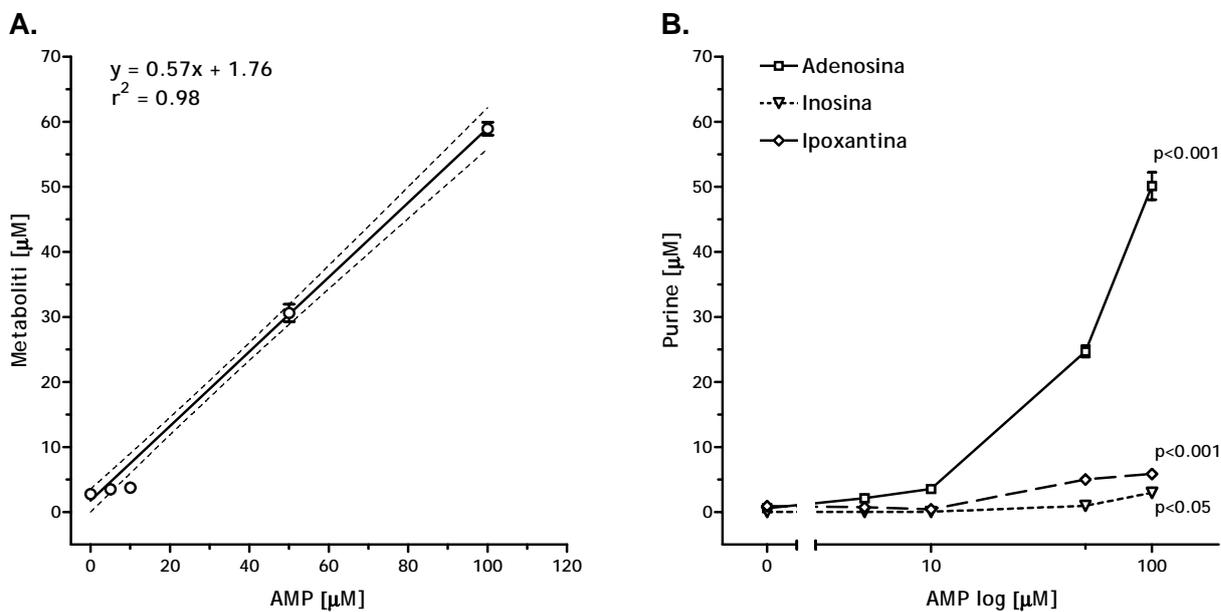
In *Figura 19A* si può osservare che l'esposizione delle ISMC ad alte concentrazioni di AMP esogeno non altera l'andamento della curva di scomparsa del nucleotide, dal momento che il tempo di emivita del substrato rimane pressochè invariato. Analogamente, l'accumulo di adenosina nel terreno di coltura raggiunge lo steady-state a 15 minuti (*Figura 19B*), ad indicare che l'enzima responsabile della conversione dell'AMP in adenosina non è saturato



**Figura 18.** Influenza del trattamento con (A) AOPCP 200  $\mu\text{M}$ , (B) Con A 0.1 mg/ml e (C) levamisolo 10 mM sulla degradazione dell'AMP esogeno 50  $\mu\text{M}$  e sulla formazione di adenosina nel terreno di coltura delle ISMC di ratto durante 60 minuti di incubazione. I risultati sono espressi come  $\text{media} \pm \text{SEM}$  dei valori ottenuti da 3-10 esperimenti. \* =  $p < 0.05$  vs (+Con A); \*\* =  $p < 0.01$  vs (+AOPCP).



**Figura 19.** (A) Scomparsa dell'AMP esogeno e (B) influenza del trattamento con concentrazioni crescenti di AMP esogeno (5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) sulla formazione di adenosina nel terreno di coltura delle ISMC di ratto. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 3-10 esperimenti.



**Figura 20.** (A) Regressione lineare fra l'aumento della concentrazione di AMP esogeno (5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) e l'accumulo dei suoi metaboliti a 60 minuti di incubazione nel terreno di coltura delle ISMC di ratto. (B) Influenza del trattamento con concentrazioni crescenti di AMP, espresse in scala logaritmica, sui livelli di adenosina, inosina e ipoxantina. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 3-10 esperimenti.  $p$  è stato calcolato mediante one-way ANOVA.

dal substrato. Ciò è confermato dal fatto che la velocità di scomparsa del nucleotide esogeno aumenta all'aumentare della sua concentrazione.

La *Figura 20A* illustra la correlazione diretta tra la comparsa dei metaboliti (adenosina+inosina+ipoxantina) e la concentrazione di AMP a 60 minuti di incubazione. La scelta di questo intervallo di tempo è nata dai risultati ottenuti dagli studi precedenti sulla cinetica del nucleotide. Si può osservare che la velocità di formazione di adenosina+inosina+ipoxantina è direttamente proporzionale alla quantità di AMP aggiunto al terreno di coltura delle ISMC, a confermare che l'idrolisi del nucleotide ad opera di CD73 segue una cinetica di primo ordine e che l'enzima non è ancora saturato quando il substrato raggiunge una concentrazione pari a 100  $\mu$ M.

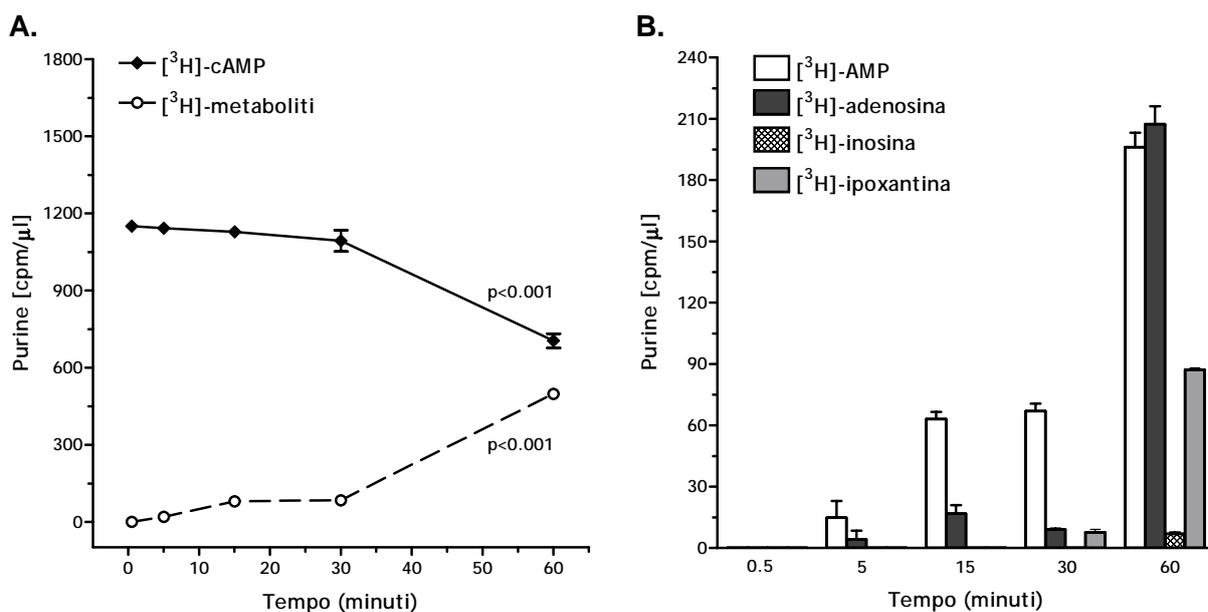
Per lo stesso tempo di incubazione, in *Figura 20B* vengono riportate le curve relative alle concentrazioni dei singoli metaboliti in funzione della concentrazione di AMP, espressa in scala logaritmica. Nel terreno di coltura, l'accumulo di adenosina è direttamente dipendente dalla concentrazione del nucleotide esogeno, mentre inosina e ipoxantina mostrano un aumento significativo quando l'AMP è presente alle concentrazioni più alte, rispettivamente 100 e 50  $\mu$ M, a suggerire un intervento di ecto-ADA nel metabolismo dell'adenosina soltanto quando il nucleoside raggiunge concentrazioni molto elevate nel mezzo di incubazione.

### ***Cinetica di scomparsa di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico e di formazione dei suoi metaboliti nel mezzo di incubazione delle ISMC di ratto***

Gli studi *in vitro* condotti su strip di tessuto intero hanno dimostrato che l'ileo di ratto è in grado di metabolizzare l'AMP ciclico esogeno attraverso la ormai nota via extracellulare AMP ciclico-adenosina che porta alla formazione di AMP, adenosina, inosina e ipoxantina per intervento di ecto-fosfodiesterasi, CD73 ed ecto-ADA.

L'AMP ciclico rappresenta il diretto precursore dell'AMP; vista l'importanza della via AMP ciclico-adenosina come fonte di adenosina extracellulare nell'intestino e dell'attività del nucleoside sulla muscolatura liscia intestinale (Giron *et al.*, 2008), si è voluto studiare il destino metabolico dell'AMP ciclico nelle ISMC in condizioni simili a quelle fisiologiche. A tale scopo, le ISMC sono state incubate con [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico 50 nM per tempi diversi, da 0.5 a 60 minuti. La radioattività è espressa in cpm/ $\mu$ l.

La *Figura 21A* riporta il confronto delle cinetiche di scomparsa dell'AMP ciclico e di accumulo dei suoi metaboliti. Il nucleotide ciclico esogeno viene degradato lentamente, secondo una cinetica di ordine zero durante i primi 30 minuti di incubazione, a cui segue un metabolismo molto rapido, tanto che la radioattività misurata diminuisce da 1093.27 $\pm$ 41.87 (30 minuti) a 704.45 $\pm$ 27.75 (60 minuti) cpm/ $\mu$ l, pari rispettivamente al 13% e al 44% di nucleotide ciclico metabolizzato.



**Figura 21. Scomparsa di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico e formazione dei suoi metaboliti.** (A) Confronto tra le cinetiche di scomparsa di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico 50 nM e di accumulo dei metaboliti ([<sup>3</sup>H]-AMP+[<sup>3</sup>H]-adenosina+[<sup>3</sup>H]-inosina+[<sup>3</sup>H]-ipoxantina). (B) Influenza del trattamento con [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico 50 nM sulla formazione di [<sup>3</sup>H]-AMP, [<sup>3</sup>H]-adenosina, [<sup>3</sup>H]-inosina e [<sup>3</sup>H]-ipoxantina nel terreno di coltura delle ISMC durante 60 minuti di incubazione. I risultati sono espressi come media±SEM dei valori ottenuti da 2 esperimenti. p è stato calcolato mediante one-way ANOVA.

In maniera speculare l'accumulo dei metaboliti è lineare nei primi 30 minuti di incubazione e subisce un significativo incremento nell'ultimo intervallo di tempo, fino a raggiungere una concentrazione di  $497.60 \pm 15.40$  cpm/μl a 60 minuti.

La degradazione di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico è accompagnata dalla comparsa nel mezzo di incubazione di [<sup>3</sup>H]-AMP, [<sup>3</sup>H]-adenosina, [<sup>3</sup>H]-inosina e [<sup>3</sup>H]-ipoxantina (Figura 21B), a dimostrare l'esistenza della via extracellulare AMP ciclico-adenosina anche nelle ISMC. In particolare, l'incremento di AMP diventa significativo dopo 15 minuti di incubazione e raggiunge il valore più alto di radioattività a 60 minuti ( $196.15 \pm 7.05$  cpm/μl), a sottolineare che le ISMC metabolizzano in modo completamente diverso l'AMP ciclico e l'AMP esogeni. In modo analogo all'AMP, la degradazione di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico induce la comparsa di inosina e ipoxantina nel terreno di coltura solo al termine dell'incubazione, rispettivamente a 60 ( $6.87 \pm 0.72$  cpm/μl) e 30 minuti ( $87.12 \pm 1.07$  cpm/μl).

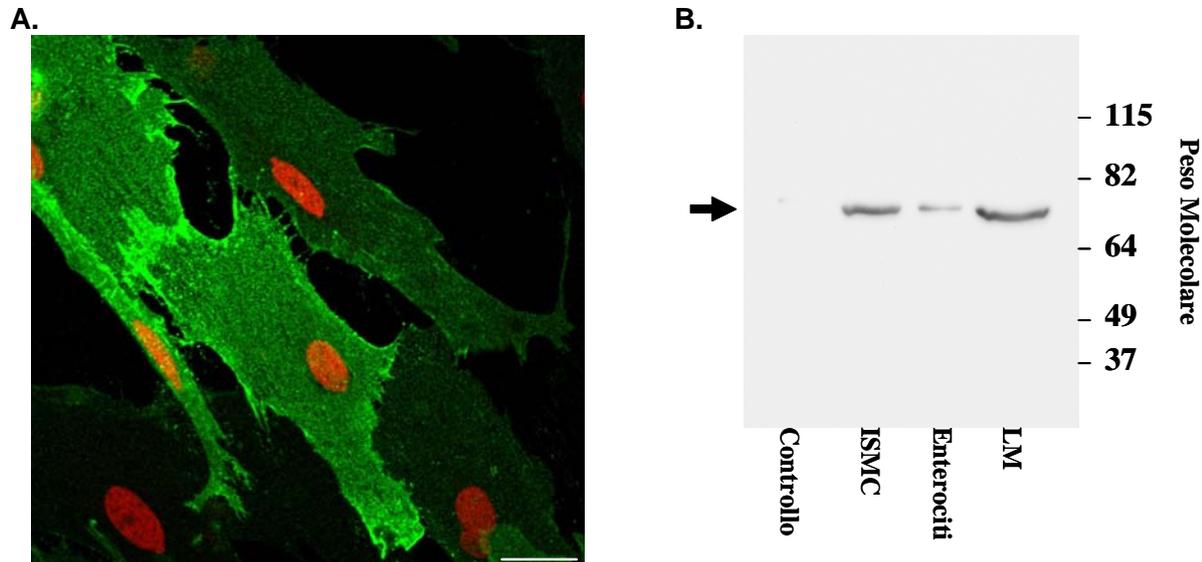
È importante sottolineare che nel lisato cellulare è stata rilevata una radioattività intorno al valore del 2.5% del totale a tutti i tempi di incubazione presi in considerazione.

### Studi di immunocitochimica per CD73, ADA e recettori P1 nelle ISMC di ratto

Dal momento che gli studi funzionali e le prove di immunofluorescenza sul tessuto hanno dimostrato e confermato la presenza di CD73, ADA e recettori P1 nell'ileo di ratto, si è voluta approfondire l'indagine relativa alla distribuzione di queste proteine anche a livello cellulare.

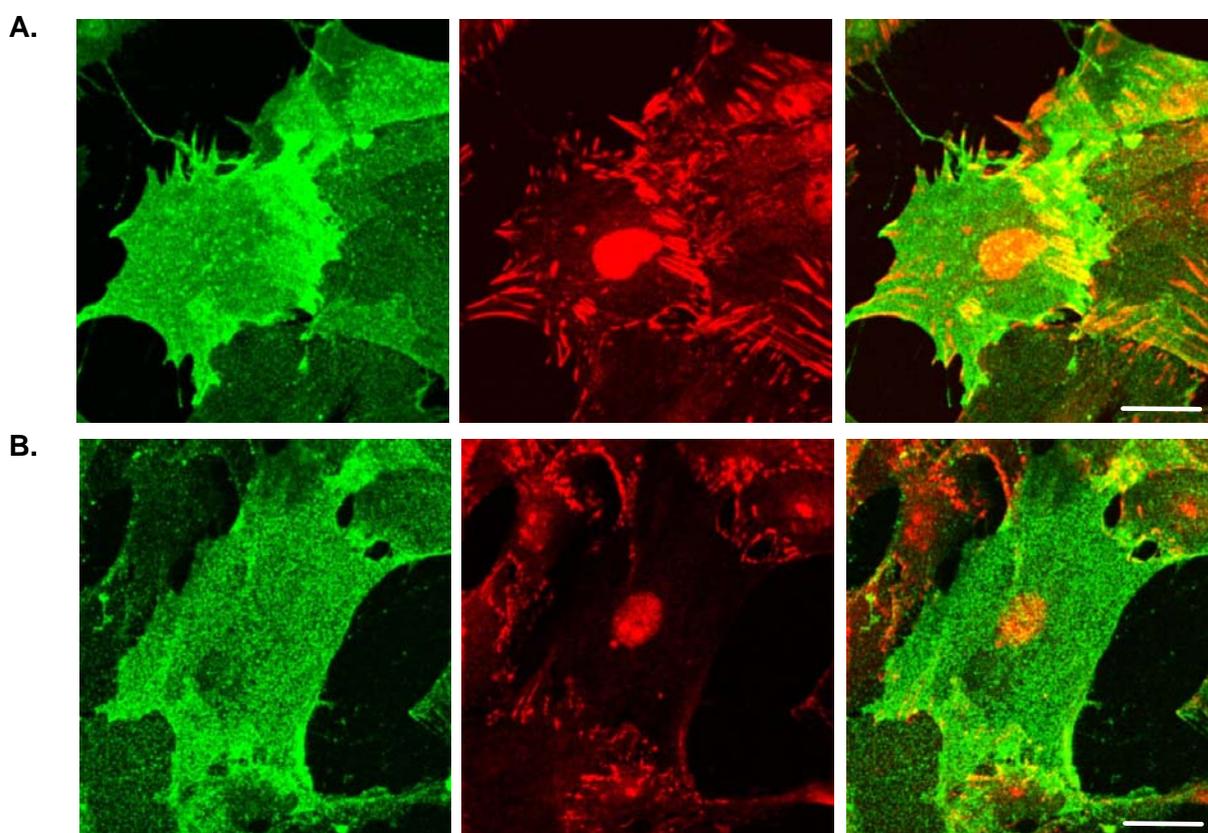
La *Figura 22A* evidenzia l'intensa fluorescenza sulla superficie delle ISMC in coltura marcate con anti-CD73, a confermare che l'enzima è localizzato esclusivamente sulla membrana plasmatica e apparentemente più concentrato in corrispondenza delle giunzioni intercellulari. L'identificazione della proteina è stata ulteriormente studiata mediante immunoprecipitazione e immunoblotting, non soltanto sulle ISMC in coltura, ma anche su enterociti freschi e muscolo longitudinale isolati dall'ileo di ratto (*Figura 22B*). La rilevazione di una singola banda, indicata dalla freccia, per ogni campione considerato in corrispondenza di un peso molecolare pari a 70 KDa dimostra l'espressione di CD73 a livello sia della muscolatura liscia longitudinale che dell'epitelio intestinale e, al tempo stesso, la specificità dell'anticorpo impiegato.

Dal momento che CD73 è coinvolta in molteplici processi extra-enzimatici tra cui le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, si è voluto approfondire l'aspetto legato all'espressione apparentemente più elevata dell'enzima nei punti di contatto tra le



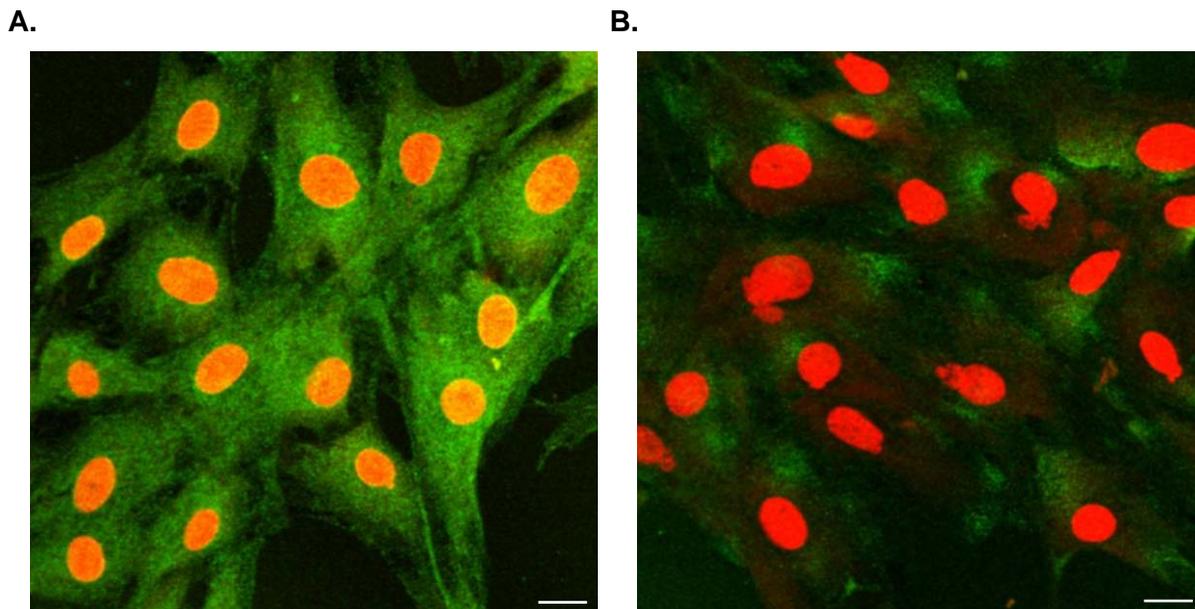
**Figura 22. (A) Localizzazione immunocitochimica di CD73 sulla superficie delle ISMC.** Le microfotografie ottenute al microscopio confocale sulle ISMC marcate con anti-CD73 mostrano lo staining della proteina (in verde) esclusivamente sulla membrana plasmatica; la colorazione con lo ioduro di propidio evidenzia i nuclei delle ISMC (in rosso). Barra = 25  $\mu$ m. **(B) Immunoblot di CD73.** I lisati di ISMC, enterociti, muscolatura liscia longitudinale (LM) e del controllo negativo sono stati immunoprecipitati con anti-CD73. La specificità dell'anticorpo monoclonale è dimostrata dalla rilevazione di una singola banda a circa 70 KDa (indicata dalla freccia).

ISMC. A tale scopo, le stesse cellule sono state impiegate per studi di doppia marcatura per CD73 e due proteine marker delle giunzioni cellulari: vinculina, tipica delle giunzioni aderenti, e ZO-1 (Zonula Occludens-1), tipica delle zonulae occludens. La *Figura 23* riporta, in verde, la marcatura per CD73 (*Figura 23A* e *23B*, pannelli di sinistra) e, in rosso, la distribuzione di vinculina (*Figura 23A*, pannello centrale) e ZO-1 (*Figura 23B*, pannello centrale), per le quali è evidente lo staining del nucleo e dei contatti della cellula con il substrato e con le cellule che la circondano. A livello di giunzioni, si delinea un segnale caratteristico che dà origine a linee sottili e dentellate. L'analisi delle immagini sovrapposte suggerisce la parziale colocalizzazione di CD73 e vinculina (*Figura 23A*, pannello di destra) e di CD73 e ZO-1 (*Figura 23B*, pannello di destra) nei punti di contatto tra le cellule.



**Figura 23. Localizzazione immunocitochimica di CD73 e di proteine marker delle giunzioni cellulari nelle ISMC di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle ISMC marcate con anti-CD73 (in verde) mostrano la distribuzione dell'enzima sulla superficie della membrana plasmatica (A e B, pannelli di sinistra) e la sua parziale colocalizzazione (A e B, pannelli di destra) con due proteine marker delle giunzioni cellulari (in rosso, pannelli centrali), vinculina (A) e ZO-1 (B). Barra = 25  $\mu$ m.

Le ISMC in coltura mostrano una immunoreattività positiva per ADA (*Figura 24A*), a confermare la sua presenza nella muscolatura longitudinale. La proteina sembra avere una

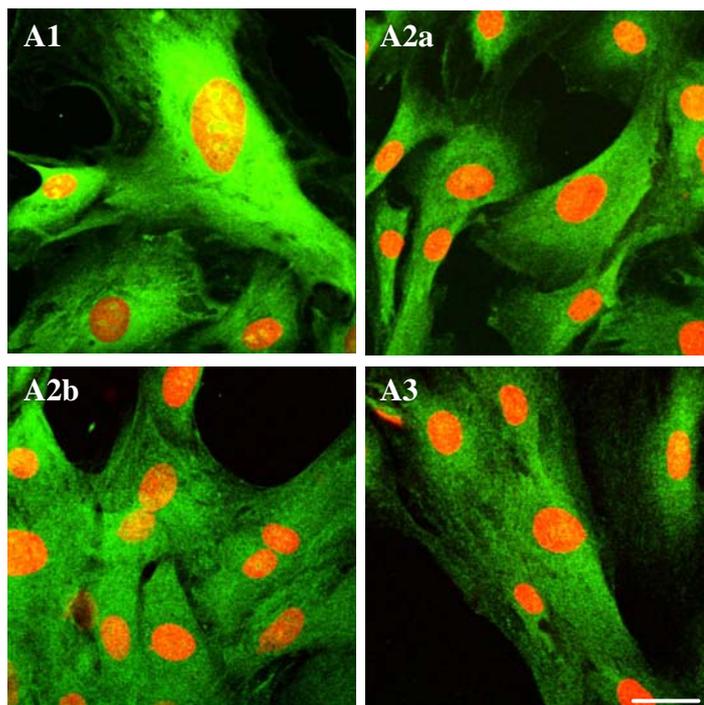


**Figura 24. Localizzazione immunocitochimica di ADA nelle ISMC di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale delle ISMC marcate con anti-ADA mostrano (A) lo staining diffuso della proteina e (B) la sua specifica distribuzione sulla membrana plasmatica (in verde), ottenuta in assenza dell'agente permeabilizzante; la marcatura con lo ioduro di propidio mette in evidenza i nuclei delle ISMC (in rosso). Barra = 20  $\mu$ m.

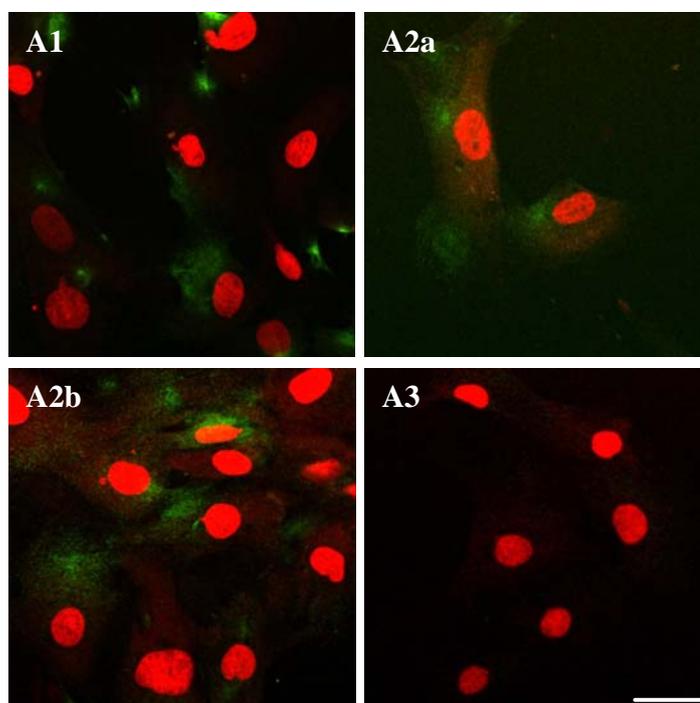
distribuzione principalmente citoplasmatica, come confermato dalle prove di ICC condotte in assenza dell'agente permeabilizzante (*Figura 24B*), che hanno permesso di limitare la permeabilità della membrana all'anticorpo e marcare, quindi, soltanto la proteina sulla superficie cellulare.

Per approfondire anche la specifica localizzazione cellulare dei recettori P1 nella muscolatura longitudinale, le ISMC sono state marcate con gli stessi anticorpi usati nelle prove di immunofluorescenza sul tessuto. Come si può osservare in *Figura 25*, le cellule sono positive per tutti i recettori dell'adenosina, A1, A2a, A2b e A3, a confermarne la presenza in questo distretto. L'analisi delle immagini al microscopio confocale suggerisce, inoltre, una localizzazione principalmente citoplasmatica degli stessi recettori. Dal momento che un profilo di questo tipo è apparentemente in contraddizione con il ruolo funzionale di tali proteine, sono state condotte, anche in questo caso, ulteriori prove di ICC seguendo un protocollo che non prevede l'uso dell'agente permeabilizzante. I risultati ottenuti (*Figura 26*) confermano la localizzazione citosolica, come si osserva dalla quasi totale assenza di marcatura per tutti i recettori, ad indicare che in condizioni fisiologiche sulla superficie delle ISMC tali proteine si trovano espresse in maniera molto ridotta.

I controlli negativi ottenuti per esposizione delle cellule al solo anticorpo secondario hanno evidenziato un segnale di fondo trascurabile.



**Figura 25. Localizzazione immunocitochimica dei recettori dell'adenosina nelle ISMC di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale delle ISMC mostrano, in verde, la distribuzione dei recettori dell'adenosina (A1, A2a, A2b e A3); la marcatura con lo ioduro di propidio mette in evidenza i nuclei delle ISMC (in rosso). Barra = 30  $\mu$ m.



**Figura 26. Localizzazione immunocitochimica dei recettori dell'adenosina sulla membrana plasmatica delle ISMC di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale delle ISMC mostrano, in verde, la distribuzione superficiale dei recettori dell'adenosina (A1, A2a, A2b e A3), ottenuta in assenza dell'agente permeabilizzante; la marcatura con lo ioduro di propidio mette in evidenza i nuclei delle ISMC (in rosso). Barra = 30  $\mu$ m.

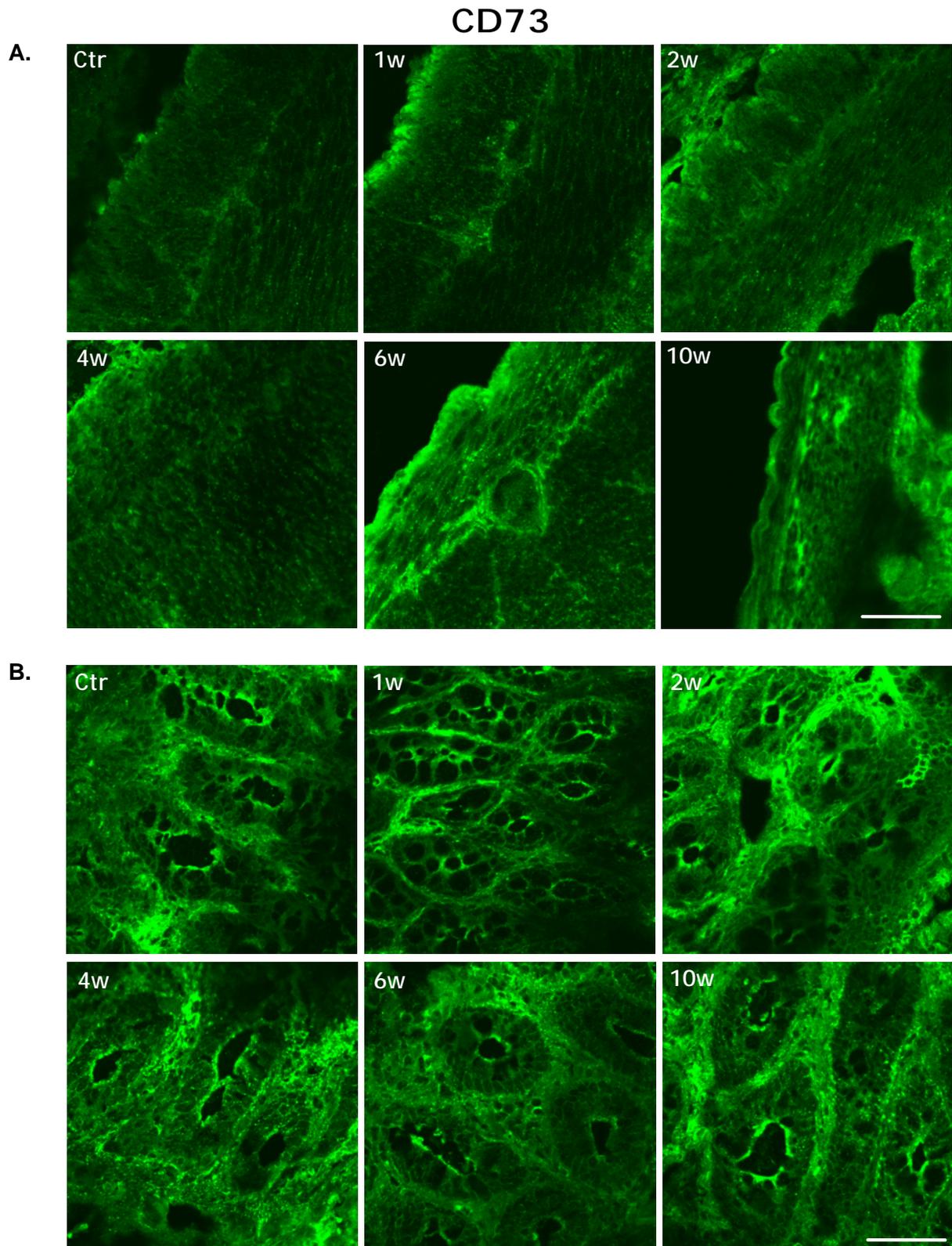
***Influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sull'espressione degli enzimi direttamente coinvolti nel metabolismo dell'adenosina nell'ileo di ratto***

Nell'ultima parte dello studio, gli esperimenti sono stati condotti impiegando un modello animale di alterazione della motilità intestinale causata da Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1), la cui persistenza in forma latente nel SNE è stata precedentemente dimostrata (De Giorgio *et al.*, 2007). Per studiare se il sistema purinergico a livello intestinale possa essere influenzato dall'infezione da HSV-1 sono state inizialmente valutate eventuali alterazioni nell'espressione di CD73 e ADA mediante studi di immunofluorescenza su sezioni di ileo proveniente da ratti esposti al virus per tempi diversi.

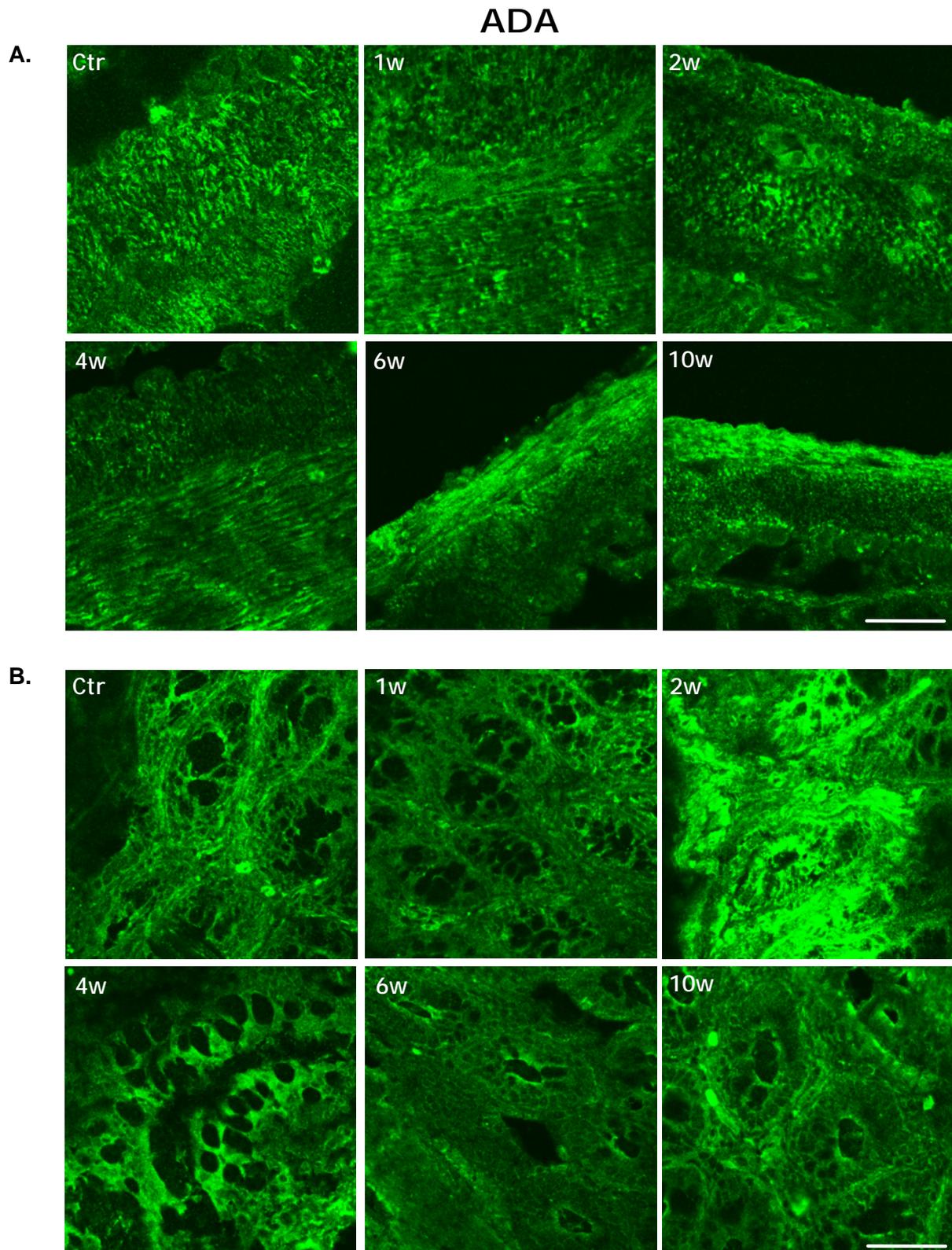
La *Figura 27* mostra il profilo di distribuzione per CD73 nel muscolo (*Figura 27A*) e nella mucosa (*Figura 27B*) dell'ileo di ratti trattati *in vivo* con HSV-1 e sacrificati a 1, 2, 4, 6 e 10 settimane dall'inoculo per via intragastrica. Nella muscolatura liscia (*Figura 27A*) l'espressione dell'ecto-enzima appare aumentata già negli animali esposti al virus da 1 settimana. Dopo 1 settimana lo staining è maggiore a livello di quelle regioni che sembrano coincidere con i gangli mienterici. La fluorescenza più intensa si osserva a 6 settimane, momento che coincide anche con un'alterazione dell'attività contrattile del muscolo: l'immagine mette in evidenza, da una parte una maggiore espressione della proteina nella muscolatura longitudinale (rispetto al ratto di controllo e al muscolo circolare), dall'altra un ingrossamento e un'intensa marcatura dei gangli mienterici, a suggerire l'induzione di CD73 nel distretto neuromuscolare da parte di HSV-1. È interessante sottolineare che a 6 settimane il cambiamento strutturale dei gangli sembra essere accompagnato da un'apparente alterazione della morfologia del muscolo. L'intensità del segnale nella muscolatura longitudinale e nel plesso mienterico si mantiene elevata rispetto al controllo anche a 10 settimane, ma le dimensioni dei gangli tendono a ristabilirsi.

Analogamente, l'espressione di CD73 è indotta da HSV-1 anche nella mucosa, in particolare nella porzione apicale delle cellule epiteliali nei tessuti provenienti da animali trattati da 2 e 10 settimane (*Figura 27B*).

Le stesse sezioni di tessuto marcate con l'anticorpo anti-ADA (*Figura 28*) mostrano che HSV-1 modifica anche il profilo di distribuzione dell'enzima responsabile della degradazione dell'adenosina. A tempi brevi di esposizione al virus (1 e 2 settimane) si può riconoscere un forte ingrossamento dei gangli nel plesso mienterico (*Figura 28A*). Nel tessuto a 2 settimane, in particolare, la marcatura permette di delineare le singole cellule all'interno della struttura nervosa, pur non essendone stata identificata la precisa natura (neuroni o cellule gliali). Uno staining molto intenso nel muscolo si sviluppa a 6 e 10 settimane e, analogamente a CD73, interessa in modo specifico la muscolatura longitudinale.



**Figura 27. Localizzazione immunohistochemica di CD73 nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle sezioni di tessuto marcate con anti-CD73 mostrano la distribuzione dell'enzima nella muscularis externa (**A**) e nella mucosa (**B**) dell'ileo prelevato da ratti controllo ed esposti ad HSV-1 per 1, 2, 4, 6 e 10 settimane. Barra = 50  $\mu$ m.



**Figura 28. Localizzazione immunoistochimica di ADA nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle sezioni di tessuto marcate con anti-ADA mostrano la distribuzione dell'enzima nella muscularis externa (**A**) e nella mucosa (**B**) dell'ileo prelevato da ratti controllo ed esposti ad HSV-1 per 1, 2, 4, 6 e 10 settimane. Barra = 50  $\mu$ m.

Nella mucosa (*Figura 28B*), ADA mantiene inalterato, rispetto al controllo, il profilo di distribuzione in tutti i tessuti trattati e la sua espressione viene indotta dal virus a 2 settimane di esposizione; tuttavia, a differenza di CD73, l'enzima è indotto sia in posizione basolaterale che apicale.

### ***Influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sull'espressione dei recettori purinergici P1 nell'ileo di ratto***

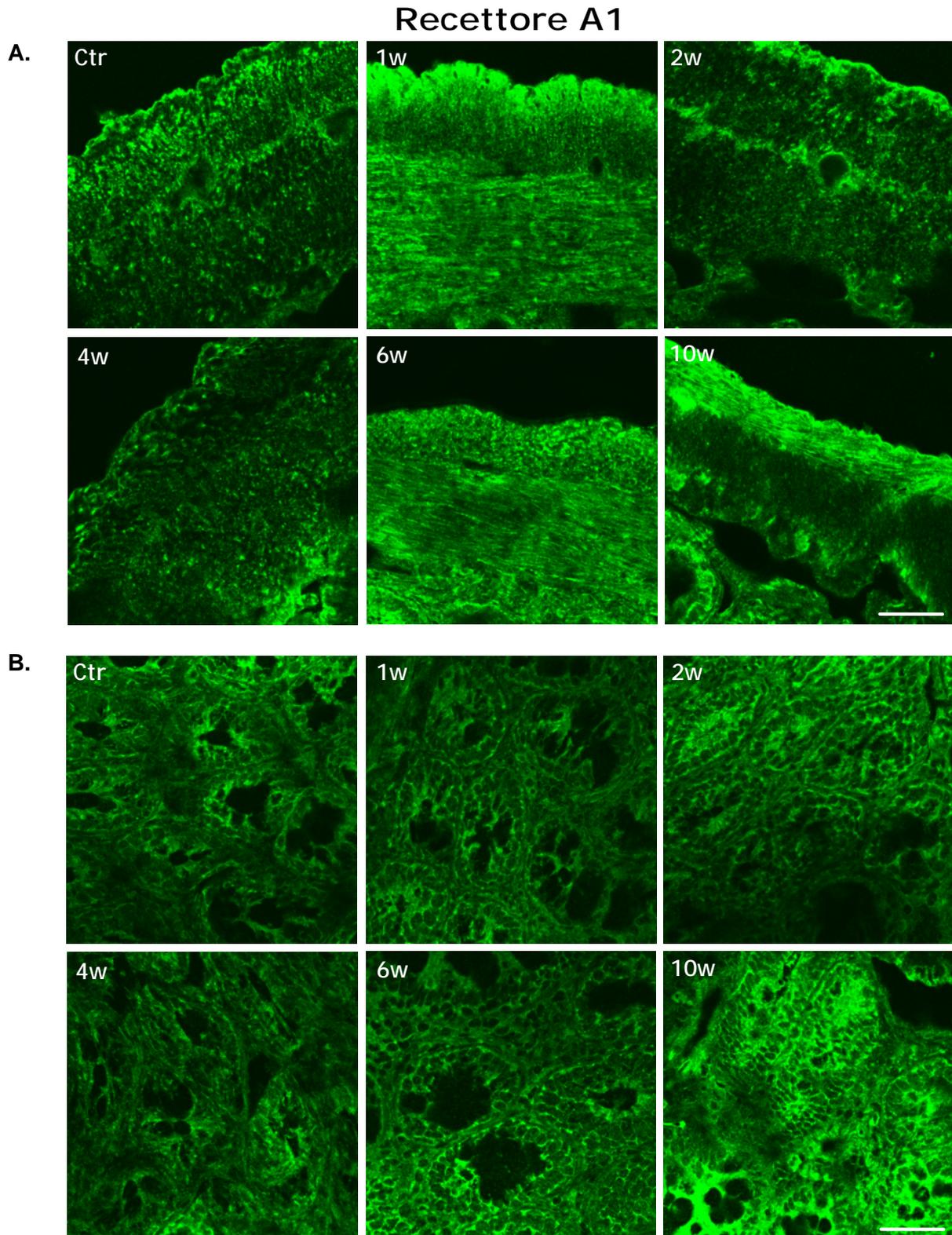
Dal momento che nell'ileo di ratto sono presenti i quattro recettori P1 e che gli effetti dell'adenosina sono direttamente legati alla concentrazione di tali proteine nel tessuto, questa serie di esperimenti di immunofluorescenza è stata completata valutando anche eventuali effetti di HSV-1 sull'espressione di A1 (*Figura 29*), A2a (*Figura 30*), A2b (*Figura 31*) e A3 (*Figura 32*).

Il recettore A1 sembra essere influenzato dalla presenza del virus nel SNE (*Figura 29*). Nel muscolo (*Figura 29A*) si osserva una sovraespressione di A1 nei tessuti a 1 e 6 settimane dal trattamento con HSV-1, condizione che si mantiene a 10 settimane solo nella muscolatura longitudinale, probabilmente più sensibile al virus o soggetta a uno stato di fibrosi. Nella mucosa (*Figura 29B*), si evidenzia un significativo incremento solo a 10 settimane dal trattamento.

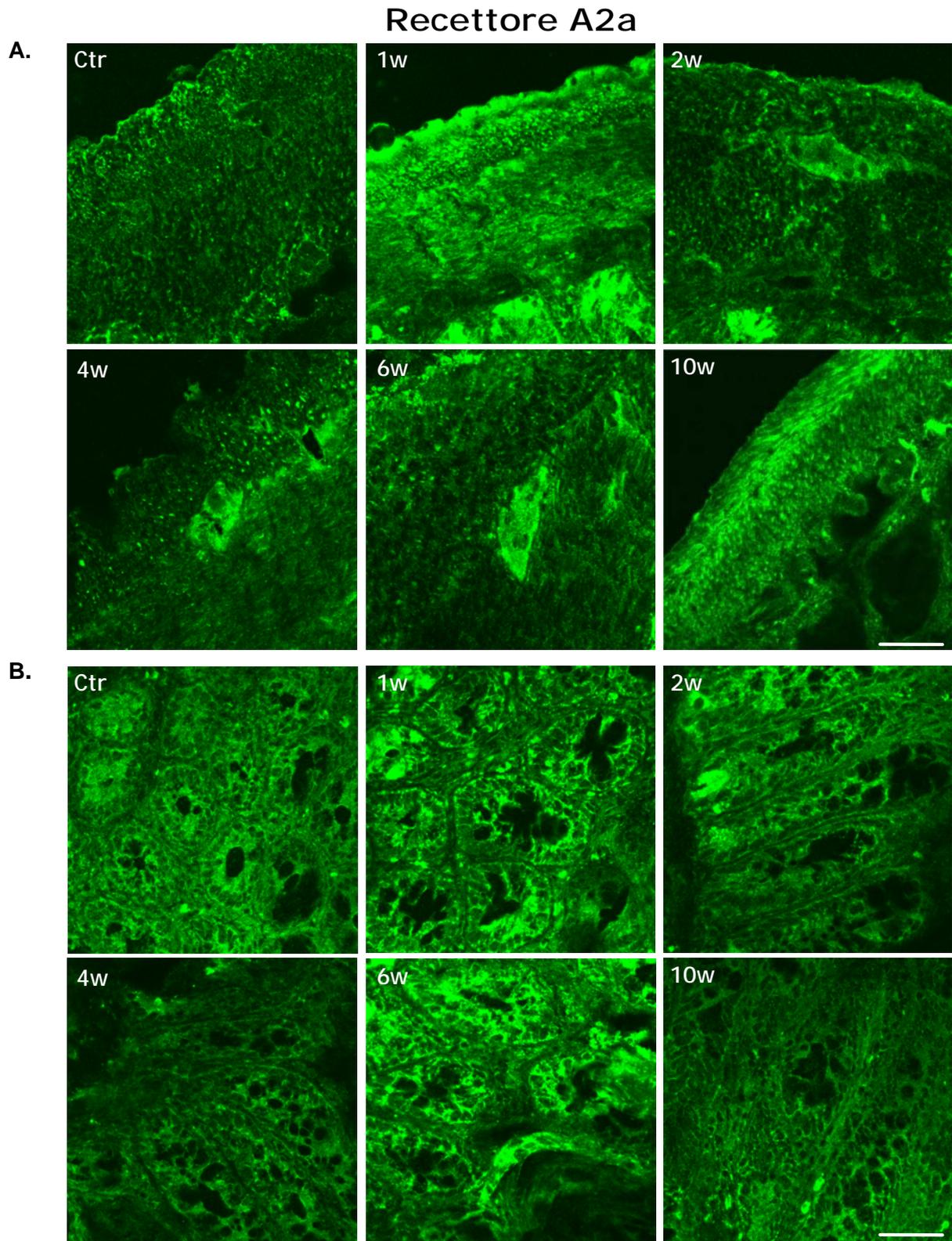
Le alterazioni indotte da HSV-1 sul profilo di espressione del recettore A2a (*Figura 30*) nel tessuto neuromuscolare (*Figura 30A*) appaiono peculiari: le immagini evidenziano, infatti, una marcatura molto intensa rispetto al controllo dello strato muscolare a 1 e 10 settimane dall'esposizione al virus. Al contrario, a 2, 4 e 6 settimane nel muscolo si osserva un segnale paragonabile al controllo, mentre diventano ben visibili i gangli mienterici, che appaiono ingrossati e fortemente marcati. Nella mucosa (*Figura 30B*), nonostante il profilo di distribuzione del recettore A2a venga mantenuto, è evidente una sovraespressione della proteina soltanto nel tessuto a 6 settimane dal trattamento con HSV-1.

Come illustra la *Figura 31A*, a livello del muscolo il recettore A2b, pur evidenziando uno staining ridotto, sembra subire l'influenza di HSV-1 a 1, 6 e 10 settimane, quando l'espressione della proteina tende ad aumentare rispetto al controllo. Durante tutto il periodo considerato si può osservare un cambiamento nell'aspetto dei gangli, che tuttavia non mostrano una marcatura significativamente più intensa rispetto al muscolo, così da escludere, probabilmente, l'intervento di questo recettore nelle anomalie neuromuscolari indotte dall'agente patogeno. Nella mucosa (*Figura 31B*) non sono evidenti alterazioni significative nello staining relativo ad A2b.

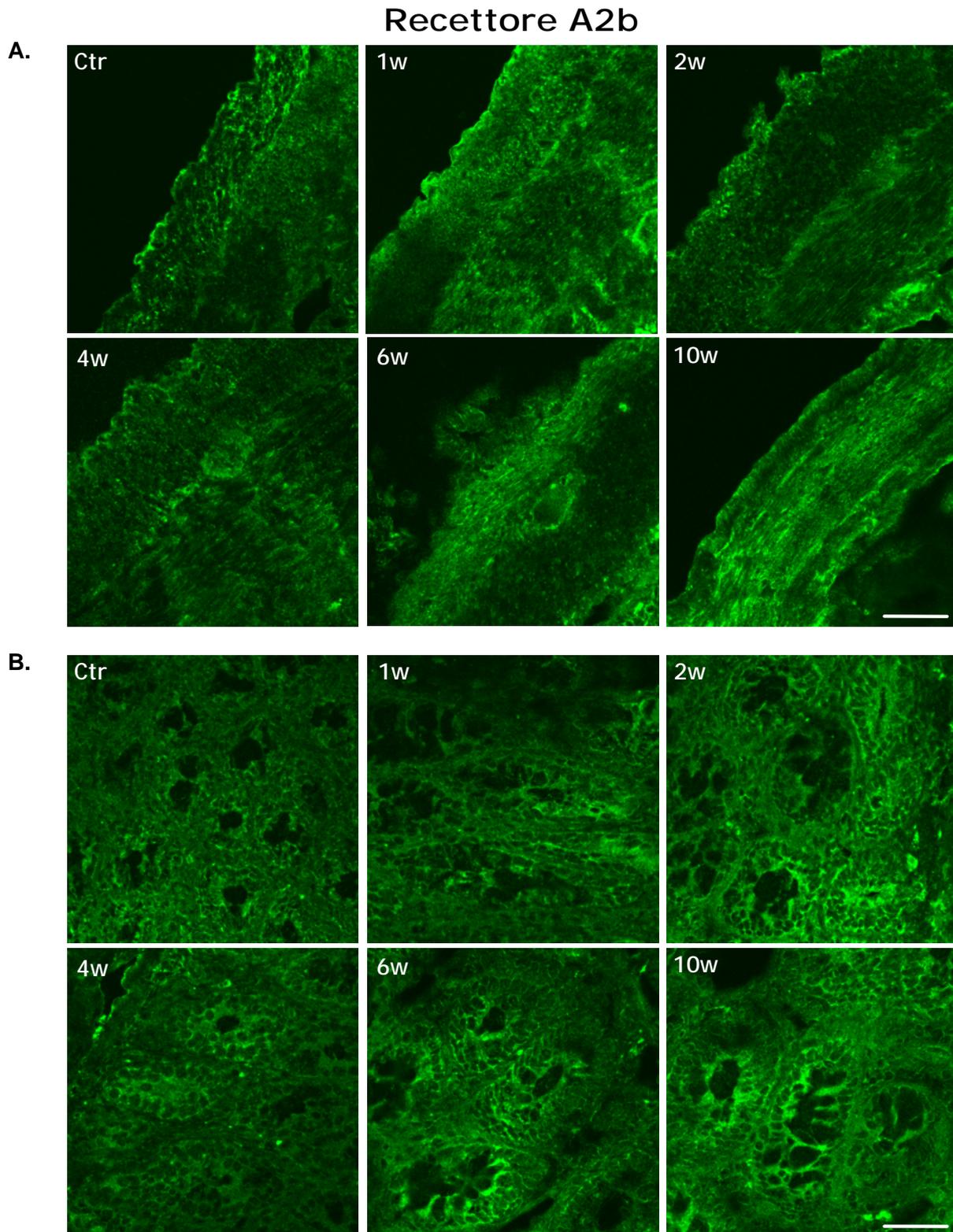
Al contrario, la latenza di HSV-1 nel SNE induce una forte sovraespressione del recettore A3 a livello dei gangli mienterici (*Figura 32A*), intensamente marcati e ingrossati in



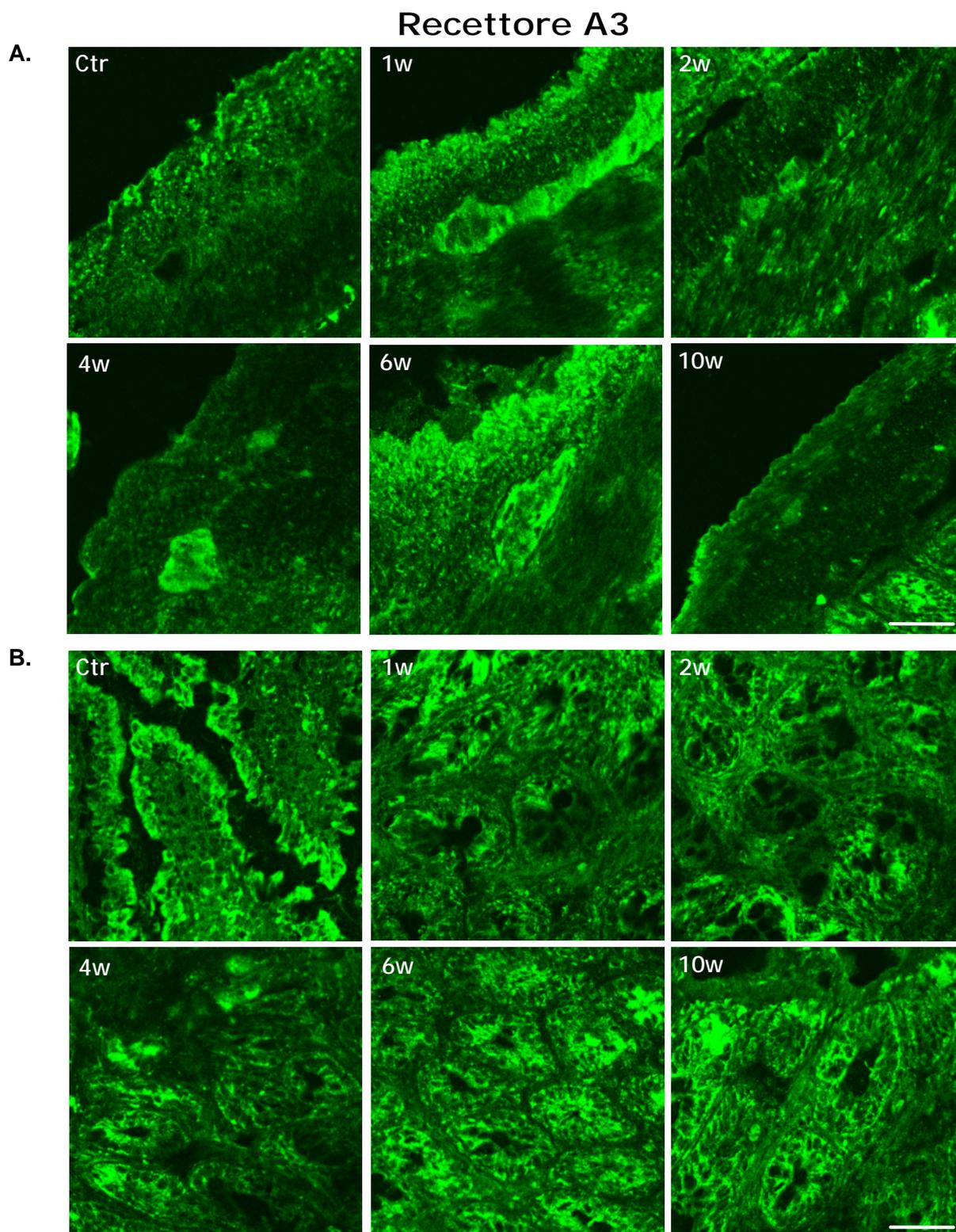
**Figura 29. Localizzazione immunocistochemica del recettore A1 nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle sezioni di tessuto marcate con anti-A1R mostrano la distribuzione del recettore A1 nella muscularis esterna (A) e nella mucosa (B) dell'ileo prelevato da ratti controllo ed esposti ad HSV-1 per 1, 2, 4, 6 e 10 settimane. Barra = 40  $\mu$ m.



**Figura 30. Localizzazione immunoistochimica del recettore A2a nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle sezioni di tessuto marcate con anti-A2aR mostrano la distribuzione del recettore A2a nella muscularis esterna (A) e nella mucosa (B) dell'ileo prelevato da ratti controllo ed esposti ad HSV-1 per 1, 2, 4, 6 e 10 settimane. Barra = 40  $\mu$ m.



**Figura 31. Localizzazione immunoistochimica del recettore A2b nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle sezioni di tessuto marcate con anti-A2bR mostrano la distribuzione del recettore A2b nella muscularis externa (A) e nella mucosa (B) dell'ileo prelevato da ratti controllo ed esposti ad HSV-1 per 1, 2, 4, 6 e 10 settimane. Barra = 40  $\mu$ m.



**Figura 32. Localizzazione immunoistochimica del recettore A3 nell'ileo di ratto.** Le microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale sulle sezioni di tessuto marcate con anti-A3R mostrano la distribuzione del recettore A3 nella muscularis esterna (A) e nella mucosa (B) dell'ileo prelevato da ratti controllo ed esposti ad HSV-1 per 1, 2, 4, 6 e 10 settimane. Barra = 40  $\mu$ m.

particolare a 1, 4 e 6 settimane, a cui segue la tendenza a un ritorno alle condizioni basali dopo 10 settimane dall'esposizione al virus. Il tessuto muscolare (*Figura 32A*), in particolare la muscolatura longitudinale, risente in modo significativo della presenza del virus nell'intestino a 1 e 6 settimane dal trattamento. In condizioni basali, il recettore A3 sembra essere già abbondantemente espresso nella mucosa (*Figura 32B*), ma la sua concentrazione aumenta ulteriormente negli stadi tardivi dell'infezione, a 6 e 10 settimane.

## DISCUSSIONE

Nell'infiammazione intestinale cronica sono evidenti alterazioni della motilità gastrointestinale e della neurotrasmissione, ma l'esatto meccanismo di questi disturbi è ancora poco noto (De Man *et al.*, 2003). L'adenosina è un nucleoside che si accumula in sede extracellulare in molti tessuti colpiti da ischemia e infiammazione, condizioni che interessano molteplici stati patologici quali sepsi, artrite reumatoide, aterosclerosi, tumori, IBD e IBS (Sands e Palmer, 2005; Korzenik e Podolsky, 2006; Rijniere *et al.*, 2007). Dal momento che diversi studi hanno identificato l'adenosina come un potenziale modulatore della risposta infiammatoria, recentemente il nucleoside o suoi analoghi sono stati proposti quali potenziali agenti farmacologici nella terapia di queste patologie (Haskò e Cronstein, 2004).

Il tono della muscolatura liscia intestinale dipende da una fine regolazione tra contrazione e rilasciamento mediata da diversi trasmettitori fisiologici, tra cui ATP e adenosina (Nicholls e Hourani, 1997; Storr *et al.*, 2002). Nel ratto, attraverso i recettori P1, il nucleoside modula direttamente il tono intestinale e funge da regolatore fisiologico della secrezione e dei riflessi motori (Christofi *et al.*, 2001; Nicholls e Hourani, 1997). L'azione dell'adenosina sulla muscolatura liscia intestinale è stata studiata in modo approfondito: il nucleoside induce un effetto rilasciante dovuto all'interazione con i recettori A1 e la diminuzione del tono basale è inibita in maniera concentrazione-dipendente da teofillina e 8-PT, antagonisti dei recettori P1 (Gaion *et al.*, 1988; Storr *et al.*, 2002).

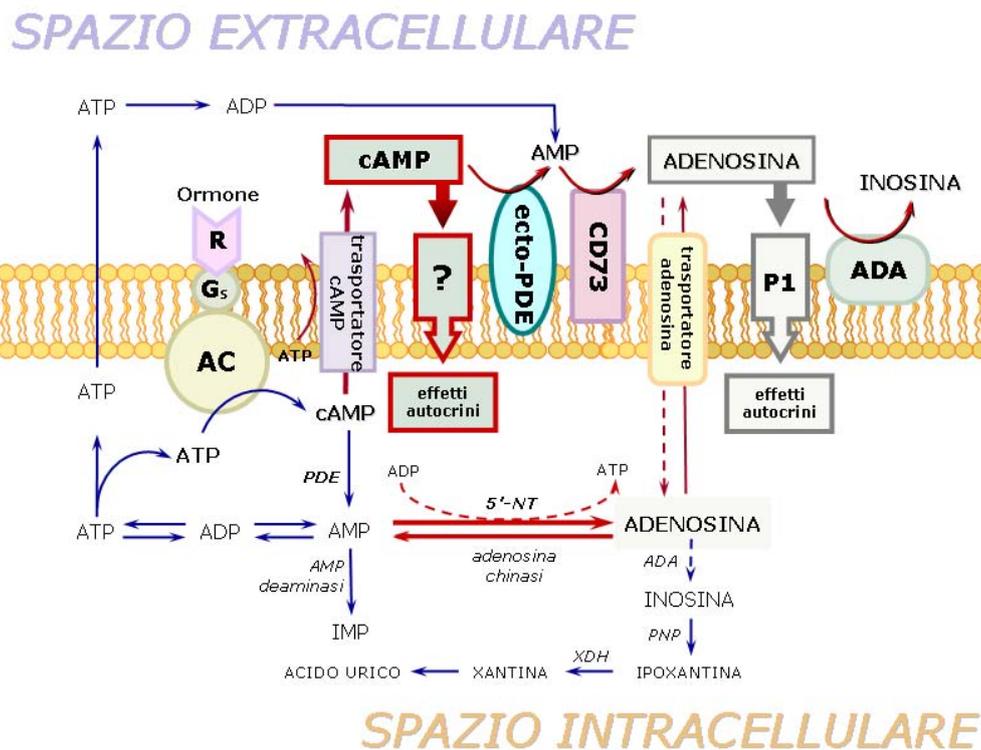
Nel 1969, Kawasaki e collaboratori hanno studiato la risposta dell'ileo isolato di ratto ai precursori dell'adenosina, AMP ciclico e AMP, evidenziando che entrambi i nucleotidi provocano un iniziale e transitorio rilasciamento della muscolatura liscia, seguito in alcuni casi da contrazione. L'impiego di dibutiril-AMP ciclico, un analogo del nucleotide ciclico in grado di attraversare la membrana plasmatica, causa esclusivamente una risposta rilasciante.

Nel mio lavoro di dottorato ho focalizzato l'attenzione sull'effetto dell'AMP ciclico nell'ileo di ratto: questo induce una risposta bifasica, caratterizzata da un transitorio rilasciamento seguito da contrazione (Giron *et al.*, 2008). Inoltre, l'esposizione consecutiva dei preparati alle stesse concentrazioni e a concentrazioni crescenti di AMP ciclico dà origine a una risposta concentrazione-dipendente non soggetta a fenomeni di tachifilassi.

Dal momento che studi di binding condotti su ippocampo di ratto hanno dimostrato che il nucleotide ciclico non mostra, per i recettori P1, un'affinità tale da giustificare i suoi effetti, è probabile che la risposta contratturante indotta dall'AMP ciclico possa essere mediata

dall'interazione con specifici recettori di membrana o dai metaboliti del nucleotide ciclico stesso (Brundege *et al.*, 1997; Hofer e Lefkimmiatis, 2007; Giron *et al.*, 2008).

I recettori per l'adenosina appartengono alla famiglia dei recettori di superficie accoppiati a proteine G (GPCR) a 7 domini transmembrana e sono suscettibili, analogamente a tutte le proteine di questa categoria, a una diminuzione della risposta recettoriale in seguito a prolungata esposizione all'agonista, dovuta a desensitizzazione (Sitaraman *et al.*, 2002). Pertanto, l'assenza di tachifilassi dimostrata dai preparati di ileo depone a favore dell'esistenza di recettori specifici per il nucleotide ciclico (Figura 33) (Giron *et al.*, 2008).



**Figura 33. Rappresentazione schematica della via extracellulare AMP ciclico-adenosina.** 5'NT = 5'nucleotidasi intracellulare; ADA = adenosina deaminasi; ecto-PDE = ecto-fosfodiesterasi; Gs = proteina G stimolatoria; Ormone = attivatore dell'adenilato ciclasi (AC); P1 = recettori dell'adenosina; PNP = purina nucleoside fosforilasi; R = recettore accoppiato all'A; XDH = xantina deidrogenasi. (Da: Giron *et al.*, 2008).

È stato proposto che una classe di GPCR di recente scoperta possa mediare gli effetti dell'AMP ciclico extracellulare nelle cellule eucariote (Bankir *et al.*, 2002; Hofer e Lefkimmiatis, 2007). Nel 1991, Sorbera e Morad hanno ipotizzato la presenza di strutture di questo tipo, specifiche per il nucleotide ciclico, deputate all'inattivazione dei canali del sodio sulla superficie cellulare dei cardiomiociti di diverse specie di mammiferi. Nelle cellule mieloidi progenitrici, concentrazioni nanomolari di AMP ciclico (ma non di adenosina) incrementano la formazione di colonie, effetto antagonizzato da un aumento dei livelli intracellulari del secondo messaggero (Detrick *et al.*, 1992). È stato inoltre dimostrato che il

nucleotide ciclico extracellulare, interagendo con purinocettori non convenzionali, diversi da P1 e P2, riduce l'espressione della prostaglandina H sintetasi attraverso PKA, attenuando così la risposta infiammatoria (Elalami *et al.*, 2000). Uno studio molto recente condotto da Vendetti e collaboratori (2006) ha messo in evidenza che l'AMP ciclico rilasciato dai linfociti umani T CD4<sup>+</sup> pretrattati con tossina colerica inibisce la proliferazione delle cellule T, agendo come un messaggero extracellulare nella modulazione della risposta immunitaria.

Dal momento che studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato l'esistenza della via extracellulare AMP ciclico-adenosina nell'ileo di ratto (*Figura 33*) (Giron *et al.*, 2008), si è voluto indagare se l'effetto sulla muscolatura liscia fosse indotto esclusivamente dal nucleotide ciclico o anche dai suoi prodotti di degradazione.

Per definire il coinvolgimento delle PDE nel destino metabolico dell'AMP ciclico, segmenti di ileo isolato sono stati incubati con IBMX, inibitore non selettivo di questi enzimi e con DPSPX, antagonista dei recettori A1 già a basse concentrazioni e inibitore delle ecto-PDE a concentrazioni maggiori (Forman *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2006). Aumentando la concentrazione intracellulare di AMP ciclico con conseguente attivazione della PKA, l'IBMX esercita un'azione rilasciante sulla muscolatura liscia dell'ileo (Abdel-Latif, 2001). La xantina inibisce tutte le PDE eccetto la 8A e la 8B, che non sembrano espresse nell'intestino, oltre a bloccare le vie neuronali eccitatorie, deprimendo così la trasmissione sinaptica (Izzo *et al.*, 1998; Soderling e Beavo, 2000).

Sia il DPSPX che l'IBMX provocano una riduzione significativa della risposta contratturante dell'ileo di ratto all'AMP ciclico, risultato in contrapposizione con un'azione diretta della purina, dal momento che inibitori delle PDE ne determinano l'accumulo, bloccandone la degradazione ad AMP e adenosina. Si può ipotizzare che, almeno in parte, l'AMP ciclico sia responsabile, di per sé o attraverso altri mediatori, dell'effetto contratturante, che, seppur ridotto, è ancora visibile; tuttavia, la degradazione del nucleotide ciclico ad AMP e/o adenosina sembra necessaria per ottenere la massima risposta.

Dal momento che IBMX e DPSPX modulano molteplici effetti, è possibile che la riduzione della contrazione indotta dall'AMP ciclico sia in parte imputabile a queste xantine: probabilmente, sono coinvolti da una parte l'AMP ciclico intracellulare prodotto dall'IBMX, dall'altra i recettori P1 inibiti in presenza di DPSPX.

È stata dimostrata l'esistenza di ecto-PKA sulla superficie della membrana di cellule gliali e adipose di ratto, di piastrine e di cellule di carcinoma del colon nell'uomo (Hatmi *et al.*, 1996; Cvijic *et al.*, 2000; Baraldi *et al.*, 2008). L'AMP ciclico che si accumula per inibizione delle ecto-PDE, interagendo con le ecto-PKA, potrebbe indurre processi di fosforilazione responsabili del rilascio o dell'inibizione della contrazione della muscolatura liscia. Non si può escludere, tuttavia, che in presenza di inibitori di PDE il nucleotide ciclico

raggiunga concentrazioni elevate tali da indurre desensitizzazione dei suoi stessi recettori, dal momento che l'assenza di tachifilassi nei preparati di ileo è stata dimostrata solo fino alla concentrazione 0.5 mM della purina.

Per bloccare la seconda tappa della via extracellulare AMP ciclico-adenosina è stato impiegato l'AOPCP, molecola idrofila che inibisce soltanto CD73, la 5'nucleotidasi ancorata sul lato esterno della membrana plasmatica. Nell'ileo di ratto, l'AOPCP provoca una rapida e immediata contrazione che si riduce in pochi secondi, anche se un completo ritorno al tono di base si osserva solo dopo circa 20 minuti. Questo analogo dell'ADP è in grado di attivare alcuni recettori P2 (Ralevic e Burnstock, 1998), ma anche di promuovere rilascio di PG e liberazione di acetilcolina (Naramatsu *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2005).

Il pretrattamento dei preparati con AOPCP si traduce in una significativa riduzione della risposta contratturante indotta dall'AMP ciclico, a suggerire che l'accumulo di AMP o altre vie attivate dall'inibitore possono influenzare gli effetti del nucleotide ciclico sulla muscolatura liscia intestinale. In particolare, raggiungendo concentrazioni molto elevate, l'AMP potrebbe interagire direttamente o previa conversione ad ADP e/o ATP con i recettori P2, responsabili del rilasciamento della muscolatura liscia intestinale (Giaroni *et al.*, 2002) portando così a una riduzione della contrazione.

La diminuzione dell'effetto contratturante che si osserva dopo pretrattamento con ADA e 8-PT indica il coinvolgimento di adenosina e l'attivazione dei suoi recettori nella risposta indotta dall'AMP ciclico sulla muscolatura liscia (Giron *et al.*, 2008), in accordo con i risultati ottenuti dalle prove con IBMX, DPSPX e AOPCP.

La conferma che il contributo dell'AMP ciclico intracellulare risulta trascurabile nell'effetto contratturante è data dall'esposizione del tessuto a forskolina, attivatore dell'adenilato ciclasi che promuove l'accumulo del secondo messaggero all'interno della cellula (Florio *et al.*, 1999; Giron *et al.*, 2008). Il rilasciamento concentrazione-dipendente indotto dalla forskolina evidenzia il ruolo specifico per l'AMP ciclico intracellulare, opposto a quello riportato per il nucleotide ciclico extracellulare. Quest'ultimo, come dimostrato negli esperimenti sul destino metabolico di [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico, non viene captato dalle cellule (Giron *et al.*, 2008), ma induce i suoi effetti in sede extracellulare prima di essere metabolizzato dagli ecto-enzimi presenti nello spazio interstiziale (Hofer e Lefkimmatis, 2007; Giron *et al.*, 2008).

Si è voluta valutare, a questo punto, l'influenza delle catecolamine endogene sulla risposta contrattile della muscolatura liscia intestinale all'AMP ciclico: l'eliminazione dell'attività simpatica causata dal trattamento degli animali *in vivo* con reserpina ha portato a una significativa riduzione della contrazione dei preparati quando l'AMP ciclico è stato aggiunto in concentrazioni maggiori a 100 µM. Un effetto analogo si è osservato nel muscolo anococcigeo isolato di ratto esposto a KCl, agente contratturante che modula il suo effetto

depolarizzando direttamente la muscolatura liscia e inducendo il rilascio di noradrenalina endogena, che attiva a sua volta i recettori post-sinaptici  $\alpha_1$  sensibili alla prazosina sulle cellule muscolari lisce (Araujo e Bendhack, 2003).

Nell'ileo di ratto, la reserpina aumenta la permeabilità di membrana al calcio, probabilmente a causa di un parziale effetto depolarizzante: questo favorisce una fuoriuscita dello ione  $\text{Ca}^{2+}$  maggiore di quella che si osserva in condizioni normali (Gandhi e Venkatakrishna-Bhatt, 1993). Nel cuore di ratto, invece, è stato dimostrato che la reserpina può prevenire la produzione dell'adenosina endogena poiché, bloccando il rilascio di noradrenalina, viene ridotta l'attività di CD73 (Obata e Yamanaka, 2000). Come dimostrato nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo di ratto, anche l'attività di PDE4, enzima coinvolto nella formazione dell'adenosina extracellulare dall'AMP ciclico (Brundege *et al.*, 1997), è strettamente associata a variazioni della trasmissione simpatica, poiché viene significativamente ridotta in seguito a trattamento cronico con propranololo e 6-idrossidopamina (Farooqui *et al.*, 2000).

Vista la stretta correlazione tra sistema simpatico ed enzimi coinvolti nella via AMP ciclico-adenosina, si è proceduto alla determinazione delle purine liberate nel mezzo di incubazione dopo esposizione ad AMP ciclico esogeno di strip di ileo proveniente da ratti trattati e non con reserpina.

Il trattamento dei ratti *in vivo* con l'alcaloide sembra indurre una diminuzione nell'attività di ecto-PDE nell'ileo di questi animali, dove la concentrazione di AMP ciclico, nel mezzo di incubazione, risulta maggiore se confrontata con quella rilevata usando il tessuto di animali non trattati. L'aumento di AMP ciclico è in pieno accordo con la riduzione dell'effetto contratturante osservata su ileo isolato sia dopo la preesposizione agli inibitori delle PDE, sia in seguito al trattamento *in vivo* con reserpina. A supporto della possibile influenza dell'attività simpatica sulle PDE e, in generale, sulla via extracellulare AMP ciclico-adenosina, si osserva un ridotto accumulo dei prodotti di degradazione del nucleotide ciclico nel mezzo di incubazione delle strip di ileo proveniente da animali trattati.

Nel tratto gastrointestinale, l'adenosina è dotata di un'attività regolatoria su motilità, assorbimento e secrezione; di conseguenza, i suoi livelli nello spazio extracellulare devono essere finemente regolati, non soltanto in condizioni patologiche ma anche fisiologiche, al fine di mantenere la normale funzionalità intestinale (Akkari *et al.*, 2006). Negli esperimenti condotti su strip di ileo, l'attenzione si è focalizzata sugli enzimi direttamente deputati alla formazione e alla degradazione del nucleoside in sede extracellulare: CD73 che defosforila l'AMP ad adenosina ed ecto-ADA che converte l'adenosina in inosina (Correia-de-Sà *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2006).

Si è voluto, innanzitutto, valutare direttamente la capacità dell'ileo di ratto di metabolizzare

l'AMP esogeno, incubando i preparati con AMP 50  $\mu$ M: la progressiva diminuzione della concentrazione indica che il nucleotide viene rapidamente metabolizzato dal tessuto, tanto che dopo 30 secondi di incubazione la riduzione è pari al 62%. La curva di scomparsa dell'AMP evidenzia che esso è degradato secondo una cinetica di primo ordine, con un tempo di emivita di 0.3 minuti.

Il contemporaneo aumento delle concentrazioni di adenosina e inosina risulta in pieno accordo con la degradazione extracellulare del substrato ad opera di CD73, prima, e, successivamente, di ecto-ADA (*Figura 33*). Dal momento che l'incremento di adenosina non è speculare rispetto alla curva di scomparsa del suo precursore, si può ipotizzare che il nucleoside, una volta prodotto nel mezzo, venga prontamente degradato da ecto-ADA per dare inosina, i cui livelli si mantengono significativamente maggiori rispetto alla condizione basale fino al termine dell'incubazione. Non si può escludere, tuttavia, l'intervento dei trasportatori per l'adenosina, i CNT che lavorano secondo il gradiente transmembrana dello ione  $\text{Na}^+$ , e gli ENT, sistemi di trasporto bidirezionali che equilibrano i livelli intra- ed extracellulari della purina (Thorn e Jarvis, 1996). Il nucleoside, quando presente nel mezzo ad alte concentrazioni, può essere captato dal tessuto, dove è deaminato ad inosina dall'ADA intracellulare, principale enzima responsabile della clearance dell'adenosina in caso di accumulo (Latini e Pedata, 2001). L'inosina così prodotta può essere estrusa dalla cellula, a spiegazione del fatto che i suoi livelli rimangono elevati anche quando l'AMP esogeno è completamente scomparso.

Diversi studi dimostrano che nelle cellule di mammifero sono presenti due enzimi in grado di defosforilare l'AMP in adenosina nello spazio extracellulare: CD73 e PA (Picher *et al.*, 2003). Le PA sono fosfomonoesterasi non specifiche presenti essenzialmente in tutti i tessuti, ma esistono in concentrazioni molto elevate soprattutto nel rene e nell'intestino (Calhau *et al.*, 2000). Esse rappresentano uno specifico marker di membrana espresso in molte cellule epiteliali, compresi i microvilli intestinali, le cellule dell'orletto a spazzola del tubulo prossimale nel rene e dei canalicoli biliari (Zimmermann e Braun, 1996). La presenza di CD73 e il probabile coinvolgimento della PA intestinale potrebbero essere la causa per cui l'AMP esogeno viene degradato così velocemente dall'ileo.

In condizioni fisiologiche, nei cardiomiociti di ratto è difficile osservare un'attivazione di CD73, in quanto la concentrazione extracellulare di AMP è molto bassa e la sintesi di adenosina endogena è mediata quasi esclusivamente dalla S-adenosilomocisteina idrolasi. Al contrario, l'idrolisi dell'AMP ad opera di CD73 è la via principale di produzione della purina in condizioni di ischemia e infiammazione: precursori del nucleotide possono essere l'ATP liberato dalla cellula e/o l'AMP ciclico prodotto a livello intracellulare e successivamente estruso e degradato (Latini e Pedata, 2001). L'aggiunta di AMP esogeno al mezzo di

incubazione permette, quindi, di mimare una condizione patologica in cui si verifica un incremento del nucleotide all'esterno della cellula. Vista la rapida scomparsa dell'AMP una volta aggiunto al mezzo di incubazione delle strip di ileo, per gli esperimenti successivi è stato scelto un periodo di incubazione di 5 minuti.

Nel cuore di ratto, in corso di ischemia si osserva anche un incremento di catecolamine endogene, la cui interazione con i recettori  $\alpha_1$  determina l'attivazione di CD73 mediante fosforilazione di residui di serina e treonina ad opera della PKC. La reserpina, provocando deplezione delle riserve delle ammine endogene e bloccandone la ricaptazione all'interno delle vescicole sinaptiche, riduce l'attività di CD73 e quindi la produzione di adenosina (Kitakaze *et al.*, 1999; Obata e Yamanaka, 2000; Obata *et al.*, 2003).

Negli esperimenti condotti sull'ileo di ratto incubato con AMP esogeno non abbiamo rilevato significative variazioni indotte dal trattamento *in vivo* con reserpina sulla concentrazione di AMP misurata nel mezzo, anche se è visibile una tendenza alla diminuzione nei preparati provenienti da animali reserpinizzati. Probabilmente, l'esposizione del tessuto al nucleotide esogeno per 5 minuti è troppo prolungata per permettere di osservare una differenza significativa, dal momento che oltre il 60% del nucleotide esogeno è già stato degradato. La tendenza a una maggior degradazione dell'AMP è confermata dal contemporaneo incremento di adenosina nell'ileo degli animali trattati, a suggerire un'aumentata attività di CD73 in seguito alla deplezione delle catecolamine endogene, risultato in contrasto con quanto dimostrato nel cuore di ratto da Obata e collaboratori (2003).

Nelle cellule endoteliali dei vasi, il nucleoside prodotto da CD73 durante un evento infiammatorio attiva gli A2bR, provocando una diminuzione della permeabilità di barriera; nello stesso tempo, incrementando la produzione dell'AMP ciclico citosolico, la purina promuove l'espressione di CD73 attraverso un processo di up-regulation, creando così un circuito a feedback positivo per proteggere la barriera endoteliale (Narravula *et al.*, 2000).

Le variazioni dei livelli di inosina vengono influenzate dalla reserpinizzazione in modo analogo a quanto osservato per il suo precursore, ad indicare non tanto una possibile influenza delle catecolamine endogene sull'attività di ecto-ADA, quanto invece che tale enzima possa rappresentare il rate-limiting step nel metabolismo dell'AMP. In molti tessuti, ecto-ADA, sembra essere localizzata in vicinanza di CD73, da cui il ruolo cruciale nel regolare i livelli di adenosina extracellulare (Franco *et al.*, 1988; Xu e Kellems, 2000).

Per meglio definire il coinvolgimento di CD73 nel metabolismo dell'AMP, il tessuto è stato esposto ad AMP esogeno in presenza e in assenza di AOPCP. L'inibitore permette il recupero non solo di AMP endogeno, ma anche del 42% del nucleotide aggiunto al mezzo di incubazione delle strip di ileo, come ulteriore conferma della presenza e dell'efficienza catalitica di CD73. Assumendo che l'incremento di adenosina osservato dopo il trattamento

con AMP esogeno sia dovuto alla defosforilazione del nucleotide da parte di CD73 (*Figura 33*), la variazione dei livelli del nucleoside riflette l'attività dell'enzima (Sato *et al.*, 1997). Quando nel mezzo è presente anche l'AOPCP, infatti, l'incremento di adenosina AMP-indotto è completamente inibito.

Uno studio recente condotto da Synnestvedt e collaboratori (2002) sulle cellule epiteliali intestinali ha dimostrato *in vivo* che CD73 funge essa stessa da elemento protettivo di barriera nell'intestino: nel lume di animali non trattati esposti ad AOPCP si è osservato un significativo incremento della permeabilità, ad indicare che l'enzima è dotato di una importante funzione fisiologica in questo contesto. La sua importanza aumenta nel tessuto di animali ipossici, dove si osserva un'induzione della trascrizione dell'RNA messaggero per l'ecto-enzima. CD73, quindi, può rappresentare un importante bersaglio terapeutico per patologie infiammatorie intestinali (Colgan *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2007b).

L'esposizione ad AMP esogeno causa nel mezzo un incremento significativo non solo di adenosina, ma anche di inosina; l'analogia che si osserva nell'andamento della formazione delle due purine è spiegata dal fatto che la reazione di deaminazione avviene principalmente quando l'adenosina è presente in concentrazione elevata, condizione associata a stati di ipossia e infiammazione o altre forme di stress metabolico nelle quali aumenta anche l'inosina, che raggiunge persino livelli più alti rispetto al suo stesso precursore (Linden, 2001). I nucleosidi hanno, entrambi, accesso allo spazio intracellulare attraverso gli ENT e i CNT, quindi competono tra loro per tale trasporto: in questo modo l'inosina extracellulare può aumentare i livelli di adenosina extracellulare impedendone l'uptake e favorendo di conseguenza gli effetti biologici secondari al legame del nucleoside con i suoi recettori (Haskò e Cronstein, 2004).

La dimostrazione della capacità dell'ileo di degradare l'AMP con formazione di adenosina comprova che l'effetto contratturante indotto dall'AMP ciclico è in parte diretto e in parte mediato dall'adenosina e dall'attivazione dei recettori P1.

Una volta dimostrata l'attività di CD73 ed ecto-ADA nell'ileo di ratto, con la tecnica dell'immunofluorescenza si è voluto caratterizzare il profilo di espressione di questi enzimi. CD73 risulta essere costitutivamente espresso sulla superficie cellulare e mostrare una distribuzione regione-specifica. In accordo con lo studio condotto da Strohmeier e collaboratori (1997) sull'epitelio intestinale umano, il segnale è ristretto alla regione apicale delle cripte. Il legame di CD73 sulla superficie delle cellule epiteliali permette la rapida conversione dell'AMP in adenosina, che una volta formata può attivare i suoi recettori oppure essere internalizzata. A seconda della via seguita, il nucleoside può promuovere il rilascio dei nucleotidi adeninici durante fenomeni di ipossia, stimolare la secrezione di acido cloridrico, regolare l'adesione epiteliale dei linfociti, attivare la funzione di barriera

endoteliale (Synnestvedt *et al.*, 2002). Nell'epitelio intestinale, l'espressione di CD73 può essere indotta da HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1), fattore che, incrementando la concentrazione di adenosina extracellulare, annulla gli effetti sulla permeabilità intestinale causati dall'ipossia stessa e protegge la barriera epiteliale (Synnestvedt *et al.*, 2002; Karhausen *et al.*, 2004).

L'identificazione di CD73 nel muscolo liscio rappresenta un'importante punto di partenza per lo studio di un suo possibile coinvolgimento nel controllo, di per sé o per la sua capacità di generare adenosina, della motilità intestinale. Analogamente, l'elevata espressione nel plesso mienterico porta a considerare l'enzima quale importante modulatore della trasmissione del SNE. In questo distretto, l'enzima sembra essere responsabile, in cooperazione con CD39, della terminazione del segnale post-sinaptico indotta dall'ATP e della produzione di adenosina, originata dall'ATP stesso, come agente inibitorio presinaptico. È interessante notare che l'ultima tappa nella degradazione del nucleotide può essere catalizzata da una 5'-nucleotidasi solubile rilasciata dalle terminazioni nervose simpatiche, che collabora con CD73 nell'inattivare l'ATP (Todorov *et al.*, 1997; Duarte-Araujo *et al.*, 2004).

Nell'ileo di ratto, la mucosa e i plessi mienterico e sottomucoso rappresentano, probabilmente, sedi in cui il metabolismo purinico è molto attivo non soltanto in condizioni patologiche, ma anche fisiologiche.

Impiegando l'anticorpo anti-ADA, l'analisi IHC ha evidenziato la presenza costitutiva anche di ADA nella parete intestinale: lo staining uniforme indica che l'enzima è localizzato in sede citoplasmatica, senza tuttavia escludere il suo possibile legame alla membrana cellulare. Ecto-ADA, infatti, esibisce identiche caratteristiche molecolari e stessa attività catalitica dell'ADA citosolica, pur essendo ancorata alla superficie esterna della parete cellulare mediante CD26, proteina altamente espressa nelle cellule epiteliali (tubuli renali, intestino, dotto biliare). In altri casi l'enzima colocalizza con i recettori adenosinici A1 e A2b, regolandone il segnale indotto da agonisti, la desensitizzazione e l'internalizzazione (Beraudi *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2005). Moriwaki e collaboratori (2004) hanno rilevato un'alta concentrazione di ADA nell'intestino umano, dove sembra che la localizzazione dell'enzima sia strettamente correlata a specifiche funzioni fisiologiche, quali motilità intestinale, trasmissione nervosa e immunomodulazione. In accordo con la presenza di ecto-ADA nei linfociti e nelle cellule dendritiche (Desrosiers *et al.*, 2007), l'enzima è stato rivelato anche nelle nostre sezioni di ileo a livello delle ghiandole intestinali, a sottolineare il suo ruolo chiave nei processi immunitari.

Non solo gli enzimi modulano i livelli e quindi gli effetti dell'adenosina nell'intestino, ma anche i recettori del nucleoside sono parte integrante del sistema adenosinergico. Per

questo motivo, si è deciso di valutare il profilo di espressione di tutti e quattro i recettori adenosinici nell'ileo di ratto.

Il recettore A1 è, probabilmente, il più caratterizzato e mostra un profilo di distribuzione prevalentemente nel SNC (Dixon *et al.*, 1996; Yaar *et al.*, 2005). Gli studi di immunofluorescenza su sezioni di ileo tagliate al criostato rivelano la presenza di A1R sia nella mucosa che nella *muscularis externa*: in questo distretto, in particolare, lo staining è più intenso a livello dei gangli mienterici, ad indicare una maggiore espressione della proteina nel SNC anziché nel muscolo. Questo risultato sembra essere in contraddizione con lo studio condotto da Stehle e collaboratori (1992) che hanno riscontrato livelli di RNA messaggero per A1R molto bassi, se non addirittura assenti, nell'ileo di ratto. Al contrario, Coupar (1999) ha dimostrato la presenza degli A1R nei neuroni colinergici che innervano la muscolatura circolare e ha sottolineato l'efficacia degli agonisti A1 nel ridurre gli effetti dell'adenosina sulla motilità intestinale.

A differenza di A1R, A2aR non mostra un'ampia diffusione nel SNC, pur essendo fondamentale in questo distretto il suo ruolo neuroprotettivo (Yaar *et al.*, 2005). Elevate concentrazioni della proteina sono state invece rilevate in molti tessuti periferici, quali cuore, aorta, retina, cellule del sangue, testicoli, polmoni, utero, pelle, vescica e muscolo scheletrico (Dixon *et al.*, 1996). L'analisi immunistochemica condotta in questo studio permette di aggiungere a questa serie anche l'ileo, dove l'espressione di A2aR risulta maggiore nella mucosa rispetto al muscolo. La proteina si localizza anche nel plesso mienterico, in misura analoga a quella rilevata nel tessuto muscolare.

Diversamente da A1R e A2aR, A2bR mostra una ridotta distribuzione nell'ileo di ratto, in accordo con il fatto che in molte specie animali la proteina è espressa in diversi distretti, ma in quantità molto bassa (Yaar *et al.*, 2005). Nel tessuto in esame, A2bR appare principalmente concentrato nella mucosa; nel muscolo esso presenta una distribuzione regione-specifica, localizzandosi principalmente nella muscolatura longitudinale e nel plesso mienterico. Dixon e collaboratori (1996) hanno riportato, nel ratto, la presenza di A2bR in tutti i tessuti esaminati, individuando la concentrazione più alta nel colon. L'attivazione di A2bR nella mucosa intestinale permette il controllo della secrezione di ioni Cl<sup>-</sup> da parte delle cellule epiteliali; questo processo sembra avvenire durante eventi infiammatori, quando si osserva, contemporaneamente, il rilascio di adenosina da parte delle cellule che costituiscono le cripte alla base dei villi intestinali e la conseguente insorgenza di episodi di diarrea (Strohmeier *et al.*, 1995).

A2aR e A2bR mediano in genere risposte eccitatorie nel SNC. Nell'uomo, entrambe le proteine sono state identificate nei neuroni del plesso mienterico e sottomucoso; nella cavia, è stata dimostrata la presenza di A1R inibitori e A2R eccitatori nei neuroni enterici (Christofi

*et al.*, 2001).

La marcatura delle sezioni di ileo con l'anticorpo che riconosce il recettore A3 ha permesso di individuare questa proteina all'interno dei gangli mienterici con un segnale uniforme, nel muscolo con un profilo di espressione simile a quello di A1R, e nella mucosa, la cui colorazione ancora una volta risulta più intensa se confrontata con il tessuto neuromuscolare. Pur presentando un'ampia distribuzione, dal punto di vista funzionale A3R è ancora poco conosciuto nell'intestino. Tuttavia, il recettore sembra essere coinvolto in diverse condizioni fisiopatologiche, quali ischemia, infiammazione e cancro (Gessi *et al.*, 2008).

Il nostro studio ha caratterizzato l'espressione di A1R, A2aR, A2bR e A3 nel plesso mienterico e nel muscolo dell'ileo di ratto, a suggerire che tutti e quattro i sottotipi recettoriali potrebbero essere coinvolti nel controllo neurofisiologico del tratto gastrointestinale.

Nell'epitelio intestinale i recettori P1 sembrano localizzati principalmente a livello delle porzioni basale e apicale delle cellule epiteliali, mostrando un profilo di distribuzione simile, in accordo con quanto osservato nel SNE umano e a livello del SNC e dell'intestino di cavia (Christofi *et al.*, 2001; Yaar *et al.*, 2005). La presenza costitutiva dei recettori purinergici nel tratto intestinale suggerisce il loro fondamentale coinvolgimento nelle funzioni neuronali, secretorie e motorie in questo distretto. Le differenze relative alla loro espressione nelle diverse regioni dell'ileo indica che ogni recettore potrebbe avere una funzione ben precisa nella fisiologia del tratto digerente e tali differenze potrebbero rappresentare un meccanismo per regolare intensità, qualità e induzione della modulazione adenosinergica.

La maggior parte delle informazioni relative alla fisiologia e alla biochimica della muscolatura liscia intestinale provengono da studi condotti su strip di muscolo liscio, usate per valutare i fenomeni di contrazione e rilasciamento, e su cellule muscolari lisce isolate per delineare i meccanismi intracellulari che mediano l'attività contrattile. È ancora poco chiaro in quale modo le SMC isolate riflettono i processi che avvengono *in vivo*; infatti, la loro preparazione con le metodiche normalmente utilizzate prevede l'impiego di trattamenti enzimatici che potrebbero causare la perdita di funzionalità nelle stesse cellule. D'altra parte, le strip di tessuto fisiologicamente analoghe all'intestino intatto, contengono un'ampia varietà di altri tipi di cellule, inclusi fibroblasti, tessuto nervoso e immunitario, cellule epiteliali, che portano a complicare l'interpretazione dei risultati.

Al fine di evitare tali difficoltà, nel corso di questo lavoro è stato messo a punto il metodo per ottenere colture primarie a lungo termine di cellule di muscolatura liscia longitudinale di ileo di ratto mediante la tecnica dell'espianto. Il metodo non prevede la digestione enzimatica del tessuto, bensì l'isolamento dello strato longitudinale del muscolo intestinale e la sua messa in coltura. Nelle condizioni opportune, dai frammenti di ileo originano le ISMC che

lentamente crescono in adesione, migrano e occupano tutta la superficie a disposizione. Con questa metodica è stato possibile ottenere cellule che mantengono le caratteristiche del tessuto da cui provengono. Nell'intestino, il tessuto muscolare è strettamente associato al tessuto nervoso e, inevitabilmente, la muscolatura longitudinale è isolata insieme al plesso mienterico di Auerbach. I neuroni del SNE necessitano di particolari fattori di crescita per sopravvivere e risultano essere completamente assenti dopo 7-10 giorni dall'espianto quando la coltura primaria di ISMC è stabilizzata e mantenuta in solo DMEM arricchito con il 10% di FBS (Blennerhassett e Lourenssen, 2000). Tuttavia, in questo studio si è proceduto alla caratterizzazione del fenotipo delle cellule in coltura, al fine di evitare eventuali contaminazioni da parte non solo di cellule enterogliali, ma anche epiteliali, immunitarie e miofibroblasti. La caratterizzazione è stata ottenuta con studi di immunofluorescenza diretta e indiretta, usando gli anticorpi che riconoscono, rispettivamente, l' $\alpha$ -actina e la  $\gamma$ -actina enterica del muscolo liscio.

L'actina è la componente principale sia dell'apparato contrattile che citoscheletrico delle SMC: le isoforme muscolari ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) sono associate ai filamenti contrattili, mentre quelle citoplasmatiche ( $\beta$  e  $\gamma$ ) formano il citoscheletro. La forma dominante nelle SMC degli organi viscerali è la  $\gamma$ -SMA, quella principale nel sistema vascolare è la  $\alpha$ -SMA (Shynlova *et al.*, 2005). Poiché quest'ultima è espressa anche nei miofibroblasti, nelle cellule cardiache e muscolari scheletriche, non può identificare in modo inequivocabile la linea cellulare di ISMC. D'altra parte, la  $\gamma$ -SMA enterica è stata riconosciuta come marker per le SMC differenziate, in quanto le cellule del muscolo striato e le cellule non muscolari ne sono prive (Szucsik *et al.*, 2004).

L'ICC sulle ISMC evidenzia un'intensa marcatura sia per l' $\alpha$ -SMA che per la  $\gamma$ -SMA enterica, a dimostrare il fenotipo della SMC e la purezza della linea cellulare, che risulta superiore al 98%. Nello stesso tempo, questo risultato permette di sottolineare l'efficienza della metodica di isolamento e delle condizioni di coltura utilizzate nello studio.

Le ISMC in coltura sono state impiegate, a questo punto, per lo studio del metabolismo dell'AMP esogeno. Gli esperimenti condotti hanno evidenziato una progressiva diminuzione del nucleotide secondo una cinetica di primo ordine: dopo 5 minuti oltre il 50% dell'AMP aggiunto è stato degradato. La cinetica dimostra che le ISMC sono in grado di metabolizzare l'AMP con un tempo di emivita pari a 4.1 minuti. Un ritorno ai livelli basali si osserva soltanto a 60 minuti di incubazione, a differenza di quanto precedentemente riscontrato nelle strip di tessuto intero, dove la degradazione più rapida determina la scomparsa del substrato nell'arco di 15 minuti (Bin *et al.*, 2007), a suggerire l'intervento tutt'altro che trascurabile di CD73 localizzata sulla mucosa intestinale. Probabilmente, quando si considera il tessuto

intatto, l'AMP a diretto contatto con il lume intestinale viene degradato quasi completamente dal sistema enzimatico epiteliale, raggiungendo solo in parte lo strato muscolare. Di conseguenza, l'evidenza di CD73 sulle ISMC assume un'importanza fondamentale nel metabolismo dell'AMP prodotto *in situ* e derivante dall'idrolisi di ATP e AMP ciclico rilasciati dalle cellule nervose e/o muscolari enteriche in seguito a un danno tissutale. L'adenosina prodotta è in grado di modulare, a sua volta, l'attività delle stesse cellule nervose e muscolari lisce (Duarte-Araujo *et al.*, 2004). De Man e collaboratori (2003) hanno riportato che l'infiammazione intestinale cronica incrementa l'attività contrattile a causa, in parte, della neuromodulazione colinergica mediata dall'autacoide attraverso gli A1R.

Contemporaneamente alla degradazione dell'AMP esogeno, nel terreno di coltura è stata osservata la comparsa dei metaboliti adenosina, inosina e ipoxantina, in pieno accordo con la degradazione extracellulare del nucleotide, analogamente dimostrata nelle cellule di Sertoli di ratto (Casali *et al.*, 2001), negli enterociti (Strohmeier *et al.*, 1997) e nelle cellule endoteliali vascolari ed epiteliali bronchiali umane (Narravula *et al.*, 2000; Picher *et al.*, 2003).

Ad opera delle ISMC trattate con AMP esogeno, la concentrazione di adenosina aumenta fino al quindicesimo minuto per mantenersi poi inalterata, mentre i suoi prodotti di degradazione, inosina e ipoxantina, cominciano ad accumularsi solo alla fine dell'incubazione, a suggerire un intervento di ecto-ADA solo quando i livelli del nucleoside raggiungono concentrazioni che, probabilmente, diventano dannose per la cellula (Eltzschig *et al.*, 2006). È interessante notare che le ISMC metabolizzano l'AMP esogeno in modo diverso rispetto alle strip di ileo, dove il tempestivo intervento di ecto-ADA localizzata sulla mucosa intestinale mantiene elevati i livelli di inosina fino al termine dell'incubazione (Bin *et al.*, 2007).

Nelle ISMC l'accumulo dei metaboliti (adenosina+inosina+ipoxantina), che raggiunge lo steady-state dopo 15 minuti, è più lento rispetto all'eliminazione del precursore, tanto che al termine dell'incubazione solo il 59.4% del nucleotide viene recuperato nel terreno di coltura sotto forma di prodotti di degradazione. Questo risultato suggerisce il possibile intervento di ENT o di CNT, a favorire l'entrata dell'adenosina all'interno della cellula (Thorn e Jarvis, 1996).

Alla luce di questi risultati, si può affermare che la clearance dell'AMP da un lato e l'accumulo di adenosina, inosina e ipoxantina dall'altro si verificano grazie a reazioni extracellulari di tipo enzimatico promosse dalle ISMC, catalizzate verosimilmente da CD73 (AMP → adenosina), ecto-ADA (adenosina → inosina) e purina nucleoside fosforilasi (inosina → ipoxantina) (Figura 33).

Per meglio definire il ruolo di CD73 nel metabolismo purinico le ISMC sono state incubate

con AMP esogeno in presenza di AOPCP, analogo non idrolizzabile dell'ADP che inibisce in modo non competitivo CD73 e PA, senza bloccare le 5'-nucleotidasi citosoliche (Picher *et al.*, 2003). L'aggiunta di AOPCP al mezzo modifica l'entità di degradazione dell'AMP esogeno, aumentandone il tempo di emivita (9.9 minuti) e permettendone il parziale recupero anche a 60 minuti. Dal momento che i molteplici effetti di questo composto potrebbero influire sull'interpretazione dei risultati, il ruolo di CD73 nel metabolismo dell'adenosina è stato valutato impiegando anche un inibitore selettivo non nucleosidico, Con A, molecola impermeabile alla membrana plasmatica che non presenta alcun effetto sulle PA. L'inibitore riduce la clearance dell'AMP esogeno in maniera analoga all'AOPCP, aumentando il tempo di emivita del substrato a 9.7 minuti. In presenza di AOPCP o di Con A, il recupero statisticamente significativo del nucleotide nel terreno di coltura è paragonabile e accompagnato da un ridotto accumulo di adenosina extracellulare, ad indicare che, effettivamente, le ISMC metabolizzano l'AMP attraverso CD73 localizzata sulla superficie cellulare. Duarte-Araujo e collaboratori (2004) hanno precedentemente dimostrato la capacità di preparati di muscolatura liscia adesa al plesso mienterico dell'ileo terminale di ratto di degradare l'AMP esogeno prima ad adenosina e successivamente a inosina, mediante l'attività sequenziale di CD73 ed ecto-ADA.

La preincubazione delle ISMC con levamisolo, inibitore delle PA, ha permesso di escludere l'intervento di questi enzimi nel metabolismo extracellulare dell'AMP, a confermare che il nucleotide è esclusivamente substrato di CD73. Probabilmente, la degradazione molto più rapida da parte del tessuto intero è imputabile non soltanto alla maggiore concentrazione dell'enzima presente sull'epitelio intestinale, ma anche alla contemporanea idrolisi ad opera delle PA distribuite in questa sede (Calhau *et al.*, 2000).

Gli esperimenti condotti incubando le ISMC con concentrazioni crescenti di AMP esogeno (5-100  $\mu\text{M}$ ) dimostrano che la degradazione del nucleotide mantiene una cinetica di primo ordine e che l'accumulo di adenosina è speculare all'AMP residuo a tutte le concentrazioni impiegate. In assenza di AMP esogeno, il nucleotide nel mezzo risulta al limite della sensibilità del metodo di rivelazione. Il fatto di aver usato concentrazioni di AMP molto superiori a quelle fisiologiche e di aver riscontrato una proporzionalità diretta tra quantità di AMP incubato e velocità di formazione dei metaboliti nel mezzo, dimostra che le ISMC di ratto hanno una capacità molto alta di metabolizzare il nucleotide: di conseguenza, la disponibilità di substrato rappresenta un fattore limitante ai fini della velocità di degradazione. Allo stesso tempo, la proporzionalità diretta indica che alle concentrazioni di AMP usate CD73 non ha ancora raggiunto la saturazione. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata a 60 minuti di incubazione, quando nel mezzo sono presenti anche inosina e ipoxantina in concentrazioni rilevabili.

Nella stessa serie di esperimenti, sono state valutate le variazioni dei singoli metaboliti in relazione all'aumento dell'AMP esogeno nel terreno di coltura: i risultati ottenuti confermano ulteriormente che l'accumulo di adenosina è direttamente dipendente dalla concentrazione del precursore e che inosina e ipoxantina mostrano un aumento significativo solo quando l'AMP, e quindi l'adenosina, sono presenti a concentrazioni molto più alte rispetto a quelle fisiologiche.

Nel complesso, questi risultati indicano che l'intervento di ecto-ADA potrebbe richiedere non solo un'elevata concentrazione di adenosina, ma anche un certo intervallo di tempo dal momento di insorgenza del danno. Elevati livelli di AMP, infatti, mimano una condizione patologica di ipossia/infiammazione, associata sia a una induzione di CD73 che di ecto-ADA sulla superficie delle cellule endoteliali. Dal momento che l'ipossia mette in atto efficienti meccanismi per incrementare la concentrazione di adenosina extracellulare (induzione di CD73 e dei recettori adenosinici, repressione di ENT), non sorprende che essa coordini anche una via metabolica che termina il segnale attivato dal nucleoside. Tale via è rappresentata proprio da ecto-ADA, la cui espressione nelle cellule endoteliali è tardiva e di minore entità rispetto a quanto osservato per CD73, suggerendo che l'induzione dell'enzima quale risposta fisiopatologica all'ipossia prevenga l'accumulo di adenosina extracellulare che a lungo termine potrebbe mediare effetti dannosi (Eltzschig *et al.*, 2006).

Ritenuta in passato un metabolita inattivo dell'adenosina, attualmente l'inosina sta assumendo un'importanza sempre maggiore, in quanto ha dimostrato proprietà antinfiammatorie in molti distretti dell'organismo, anche a livello intestinale, dove contribuisce, insieme all'adenosina, a proteggere la funzionalità della barriera epiteliale (Mabley *et al.*, 2003).

Vista l'importanza degli effetti del nucleotide ciclico sulla muscolatura liscia longitudinale e l'esistenza della via extracellulare AMP ciclico-adenosina nell'ileo di ratto (Giron *et al.*, 2008), si è voluto studiare se questa via metabolica fosse presente anche nelle ISMC di ratto utilizzando come substrato [<sup>3</sup>H]-AMP ciclico. L'incubazione delle ISMC con AMP ciclico triziato porta alla formazione extracellulare di [<sup>3</sup>H]-AMP, [<sup>3</sup>H]-adenosina, [<sup>3</sup>H]-inosina e [<sup>3</sup>H]-ipoxantina, ad indicare la presenza di ecto-PDE che idrolizzano il nucleotide ciclico ad AMP e a confermare l'attività di CD73 ed ecto-ADA, anche in condizioni che mimano una concentrazione fisiologica di AMP ciclico in sede extracellulare (Bankir *et al.*, 2002). La scomparsa del nucleotide ciclico segue una cinetica di ordine zero, caratteristica dei processi saturati dove, nell'unità di tempo, viene degradata una quantità costante di substrato. Di conseguenza, si può affermare che nelle ISMC la conversione dell'AMP ciclico ad AMP rappresenta il rate-limiting step della degradazione del nucleotide ciclico, in accordo con i risultati riportati per le cellule adipose ed epatiche, dove l'incubazione con AMP porta

alla scomparsa del nucleotide dal mezzo molto più rapidamente rispetto a quando si usa AMP ciclico come substrato (Gorin e Brenner, 1976; Zacher e Carey, 1999).

Nel tessuto adiposo di maiale e nel rene di ratto è stata evidenziata una ecto-PDE con bassa  $K_m$ , rapidamente saturata dal substrato (Zacher e Carey, 1999); analogamente, si può pensare che sulle ISMC di ratto esista una ecto-PDE con proprietà simili. Nel tessuto, considerati i diversi tipi di cellule presenti e la maggiore numerosità, la stessa concentrazione di [ $^3$ H]-AMP ciclico non è sufficiente a saturare le ecto-PDE, quindi la degradazione del nucleotide ciclico procede con una cinetica differente, tanto che quando non c'è più [ $^3$ H]-AMP ciclico si osserva la quasi completa scomparsa dei suoi metaboliti (Figura 5).

Anche il catabolismo di [ $^3$ H]-AMP ciclico nelle ISMC induce la comparsa di inosina e ipoxantina solo al termine dell'incubazione, a ulteriore riprova che in questo sistema ecto-ADA interviene dopo un certo intervallo di tempo rispetto alla nucleotidasi.

Negli esperimenti successivi, le ISMC sono state impiegate per studi di immunofluorescenza, al fine di stabilire la precisa localizzazione cellulare delle proteine la cui espressione è stata dimostrata nel tessuto. L'analisi al microscopio confocale delle cellule marcate con anticorpo anti-CD73 ha confermato la distribuzione dell'enzima soltanto sulla superficie delle ISMC, dove il segnale sembra più marcato in corrispondenza delle giunzioni intercellulari, suggerendo il suo possibile coinvolgimento nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. La presenza di CD73 è ulteriormente dimostrata mediante immunoprecipitazione della proteina non solo nelle ISMC, ma anche negli enterociti freschi e nella muscolatura longitudinale isolati dall'ileo di ratto, a dimostrare che l'enzima non viene indotto dalla coltura, ma è costitutivamente espresso dai principali componenti della parete intestinale (Giron *et al.*, 2008).

L'induzione di CD73 in corso di ischemia/infiammazione produce nel compartimento extracellulare un aumento di adenosina che stimola gli A2bR dei polimorfonucleati, rinforzando la risposta di barriera a livello endoteliale. L'attivazione di questi recettori si accompagna ad un incremento nella concentrazione di AMP ciclico intracellulare che, attraverso la PKA, induce fosforilazione di VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), responsabile del controllo della geometria dei filamenti di actina all'interno della cellula. La sintesi di adenosina da parte di CD73 permette quindi, mediante VASP, di controllare le variazioni nella distribuzione delle proteine di giunzione, influenzandone le caratteristiche e promuovendo la funzione di barriera (Eltzschig *et al.*, 2003).

Al fine di approfondire l'apparente sovraespressione di CD73 nei punti di contatto tra le cellule, sono state condotte prove di doppia marcatura per CD73 e due proteine marker delle giunzioni cellulari, vinculina e ZO-1. Vinculina è una proteina intracellulare localizzata

in prossimità delle membrane a livello delle giunzioni aderenti delle cellule dell'epitelio intestinale e delle SMC; essa partecipa in modo diretto al legame dei fasci di microfilamenti di actina alle membrane e un suo deficit influenza un'ampia gamma di funzioni, quali l'adesione e la migrazione cellulari (Geiger *et al.*, 1980; Eddinger *et al.*, 2005). ZO-1 è una proteina caratteristica delle zonulae occludens (o giunzioni serrate), zone di contatto cellula-cellula specializzate ed essenziali per la funzione di barriera da parte di epitelio ed endotelio (Balda e Matter, 1998).

In questo studio, gli esperimenti di ICC condotti sulle ISMC dimostrano che non tutte le zone positive per CD73 lo sono anche per le due proteine di giunzione e, viceversa, il segnale puntiforme e segmentato relativo a tali proteine ai bordi delle cellule non si sovrappone sempre alle regioni in cui CD73 sembra sovraespressa, a suggerire una parziale colocalizzazione CD73/vinculina e CD73/ZO-1. Tuttavia, la comarcatura appare più evidente per CD73 e vinculina, in accordo con il fatto che le giunzioni aderenti sono strutture tipiche delle cellule muscolari e vinculina ne rappresenta il costituente principale (Eddinger *et al.*, 2005). Soltanto di recente, invece, è stata dimostrata l'esistenza sia dei componenti citoplasmatici che dei componenti integrali di membrana delle giunzioni serrate nella muscolatura liscia dei vasi, a sostegno che ZO-1 possa essere parte di un meccanismo complesso coinvolto nelle interazioni cellula-cellula non solo a livello epiteliale ed endoteliale (Adams *et al.*, 1999).

Nelle ISMC, vinculina e ZO-1 hanno rivelato una caratteristica distribuzione nelle giunzioni cellulari ma anche un inaspettato segnale nucleare. Uno studio condotto su linee differenti di cellule epiteliali ha dimostrato la localizzazione nucleare di ZO-1, che sembrerebbe inversamente correlata all'entità e/o alla maturità dei contatti cellula-cellula. È stato ipotizzato che la perdita o la riduzione dei contatti cellula-cellula rappresenti il segnale che induce l'accumulo di ZO-1 nel nucleo e che tale segnale possa essere trasdotto proprio dalla proteina stessa, a suggerire il suo coinvolgimento nella regolazione dei processi nucleari associati a variazioni negli stati di crescita o differenziazione cellulare (Gottardi *et al.*, 1996). Lo staining nucleare di vinculina e ZO-1 è in accordo con il fatto che le ISMC sono state fissate e trattate a un grado di confluenza pari all'80% circa, ovvero prima di raggiungere la completa maturità dei contatti cellula-cellula.

I successivi esperimenti di ICC per ADA sono stati importanti nel chiarire i risultati precedentemente ottenuti sul tessuto, dove l'uniformità del segnale portava a evidenziare la presenza costitutiva dell'enzima nell'ileo di ratto, senza poterne discriminare la localizzazione cellulare. Grazie agli studi su ISMC permeabilizzate e non è stato possibile confermare che ADA è un enzima principalmente citosolico, ma presente anche sulla membrana cellulare. La ridotta espressione di ADA sulla superficie delle ISMC è in accordo

con la formazione quasi trascurabile di inosina nel terreno di coltura dopo esposizione delle cellule ad AMP esogeno: probabilmente, l'adenosina derivata dall'idrolisi del nucleotide satura completamente ecto-ADA fino a quando l'enzima non viene traslocato sulla membrana cellulare. Si può ipotizzare che in questa sede la proteina sia colocalizzata con i recettori A1, dei quali potrebbe modularne la funzione, in analogia a quanto dimostrato per le SMC vascolari DDT<sub>1</sub>MF-2 (Sun *et al.*, 2005). È stato proposto che il ruolo dell'enzima nel complesso ecto-ADA/A1R dipenda dalla concentrazione di adenosina: l'interazione ecto-ADA/A1R facilita la trasmissione del segnale a basse concentrazioni di nucleoside, mentre quando l'autacoide si accumula nello spazio extracellulare la stessa interazione costituisce una via automatica di desensitizzazione a breve termine del recettore. In questo caso, infatti, viene favorita la degradazione del nucleoside da parte di ecto-ADA, che così previene o minimizza la down-regulation di A1 (Franco *et al.*, 1997).

In analogia con quanto proposto per lo sviluppo del sistema immunitario, l'eterogenea ma precisa localizzazione della proteina nel cervello ha permesso di sostenere l'ipotesi di un ruolo di ecto-ADA nello sviluppo del sistema nervoso e nelle interazioni cellula-cellula (Franco *et al.*, 1997). Dal momento che le ISMC sono a stretto contatto con il plesso mienterico, non è da escludere che ecto-ADA rivesta un ruolo importante nel modulare la comunicazione intercellulare tra SNE e muscolatura liscia.

Ipossia e infiammazione sono due condizioni che inducono l'espressione di ecto-ADA: l'incremento della proteina è stato dimostrato sulla superficie delle cellule endoteliali associato ad un aumento di CD26, proteina di ancoraggio dell'enzima sulla membrana cellulare (Eltzschig *et al.*, 2006).

Gli esperimenti di ICC hanno confermato anche la presenza di A1R, A2aR, A2bR e A3R nelle ISMC e le immagini ottenute al microscopio confocale mettono in evidenza una localizzazione principalmente citoplasmatica per tutte le proteine, ad indicare che in condizioni fisiologiche esse sono presenti sulla superficie delle ISMC in concentrazione molto ridotta. Questo profilo di espressione risulta del tutto inaspettato, dal momento che i GPCR si trovano in genere associati alla membrana plasmatica e apparentemente in contraddizione con il ruolo funzionale degli stessi recettori P1, che mediano gli importanti effetti biologici dell'adenosina extracellulare.

Uno studio recente condotto da Milojević e collaboratori (2006) ha dimostrato che molti GPCR possono essere substrato, all'interno della cellula, di enzimi che ne provocano la deubiquitinazione e ne inducono la traslocazione dal citoplasma alla membrana, dove vengono attivati. La localizzazione principalmente citoplasmatica di A2aR è stata precedentemente riscontrata nelle cellule PC12 (Arslan *et al.*, 2002); la proteasi ubiquitino-specifica Usp4 sembra essere il partner che permette il movimento di A2aR neo-sintetizzato

dal reticolo endoplasmatico verso la superficie della cellula. Il motivo per cui A2aR è concentrato principalmente nel citoplasma non è ancora noto, ma è stato ipotizzato che in questa sede esso possa ricoprire un ruolo importante nel legare l'adenosina citosolica; in alternativa, esso potrebbe essere trattenuto in forma di "riserva", così da essere prontamente disponibile nelle situazioni che richiedono la sua presenza in superficie (Milojevič *et al.*, 2006; Toews, 2006). Sulla base di queste recenti scoperte, la manipolazione degli enzimi di ubiquitinazione potrebbe diventare un innovativo approccio terapeutico che si aggiunge a quelli già noti nel modulare l'attività di A2aR in diverse patologie.

Attraverso studi biochimici e di biologia molecolare condotti sulle cellule epiteliali T84, Sitaraman e colleghi (2002) hanno dimostrato che A2bR in forma inattiva è un recettore intracellulare e viene reclutato sulla membrana in seguito alla stimolazione da parte di un agonista. La traslocazione è mediata dalle proteine SNARE (N-ethylmaleimide (NEM)-sensitive factor attachment protein receptor), in particolare VAMP-2 e SNAP-23; una volta stimolati, gli A2bR compaiono sulla membrana come complessi multiproteici associati a E3KARP (NH3-kinase regulatory protein), PKA ed ezrina. Il segnale richiesto per il reclutamento di A2bR è ancora sconosciuto, ma è stato proposto che l'adenosina, entrando nella cellula, sia in grado di legarsi agli stessi recettori presenti in sede citosolica, attivando essa stessa il segnale che ne promuove la traslocazione sulla membrana plasmatica. Dal momento che A2bR media un aumento della secrezione di ioni Cl<sup>-</sup> (causando diarrea) e di IL-6 (citochina proinfiammatoria), è plausibile che la sua localizzazione intracellulare possa rappresentare un freno all'inappropriata stimolazione (Sitaraman *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Sulla superficie cellulare, A2bR costituisce anche una molecola di ancoraggio per ecto-ADA, che a sua volta ne modula l'affinità per il substrato (Herrera *et al.*, 2001).

Analogamente, A1R colocalizza con ecto-ADA fungendo da molecola di ancoraggio: nelle cellule DDT<sub>1</sub>MF-12 le due proteine seguono la stessa via endocitotica, essendo internalizzate in particolari microdomini specializzati della membrana plasmatica, le caveolae, ma subiscono poi un destino diverso e, indipendentemente, sono riciclate in superficie per formare nuovamente il complesso funzionale ad alta attività ecto-ADA/A1R (Escriche *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). Nei cardiomiociti di ratto, A1R in condizioni basali è localizzato principalmente all'interno delle caveolae; al contrario di altri recettori noti, esso viene trasportato all'esterno, anziché all'interno, di questi microdomini verso la membrana in seguito all'attivazione agonista-indotta (Lasley *et al.*, 2000). Mentre la presenza di ecto-ADA in prossimità di A1R è necessaria per il legame ad alta affinità con il ligando (Sun *et al.*, 2005), le conseguenze della traslocazione sulla trasduzione del segnale da parte del recettore non sono ancora note (Lasley *et al.*, 2000).

Analogamente agli altri recettori adenosinici, anche A3R mostra una localizzazione quasi

esclusivamente citosolica nelle ISMC. In molti tipi di cellule, tra cui le SMC, l'attivazione di questa proteina porta ad una sovraregolazione dei sistemi cellulari antiossidanti, che contribuiscono all'azione citoprotettiva degli A3R nel corso di un evento ischemico (Yaar *et al.*, 2005).

Pur essendo ormai assodato che distribuzione e funzionalità dei recettori P1 sono specie- e tessuto-specifici, questi risultati rappresentano un importante punto di partenza per lo studio del loro coinvolgimento negli effetti mediati dall'adenosina nell'ileo di ratto, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Proprio in riferimento ai risultati ottenuti, nell'ultima parte dello studio è stato impiegato un modello animale di alterazione della motilità intestinale causata da HSV-1 per valutare gli effetti sul sistema purinergico della presenza del virus nel SNE, dove ne è stata precedentemente dimostrata la persistenza in uno stato di latenza (Gesser e Koo, 1996; De Giorgio *et al.*, 2007). A tale scopo, sono stati inizialmente condotti esperimenti di IHC su sezioni di ileo proveniente da ratti esposti ad HSV-1 per tempi differenti, così da delineare eventuali alterazioni nell'espressione di CD73, ADA e AR.

Pur essendo ancora poco note le cause di insorgenza dell'IBD, la teoria maggiormente accreditata è che il sistema immunitario dell'organismo venga indotto dalla presenza di sostanze estranee nell'intestino, quali virus o batteri, attivando un processo infiammatorio che diventa persistente e incontrollato (CCFA, 2007).

La scelta di HSV-1 come agente patogeno è nata dal fatto che è attualmente riconosciuto che molte patologie intestinali caratterizzate da dismotilità sono di origine infettiva, sia virale che batterica (Khan e Collins, 2006). D'altra parte, gli studi epidemiologici dimostrano la persistenza e l'ampia diffusione di HSV-1 tra la popolazione adulta, pari all'80% in alcuni paesi (Gesser e Koo, 1996; Smith e Robinson, 2002). Il virus entra nell'organismo attraverso un ciclo litico a livello delle cellule epiteliali e si stabilisce in forma latente nei gangli del trigemino, per essere riattivato in seguito a stimoli quali stress, traumi, immunodepressione (Gesser e Koo, 1996). De Giorgio e collaboratori (2007) hanno recentemente dimostrato che la somministrazione di HSV-1 per via orale a seguito di un precedente inoculo per via intranasale nel ratto permette al virus di stabilirsi in forma latente nel SNE; a livello intestinale, questo comporta un modesto incremento nel rilascio di mediatori dell'infiammazione, associato ad alterazione della peristalsi e della motilità, senza tuttavia causare alcun danno tissutale evidente o infiammazione a livello macroscopico.

Poiché nel tratto digerente l'adenosina partecipa alla regolazione fisiologica delle funzioni motorie intestinali ed è significativamente coinvolta nelle interazioni tra cellule immunitarie/infiammatorie e SNE (Christofi *et al.*, 2001), ogni variazione nella sua concentrazione sarà determinante in un contesto patologico associato a dismotilità. Il SNE

rappresenta parte integrante della parete intestinale e svolge un ruolo fondamentale nel controllo di molteplici funzioni quali motilità, secrezione esocrina ed endocrina, assorbimento e risposta immunitaria, tanto da essere conosciuto come il “cervello dell’intestino” (De Giorgio *et al.*, 2004).

Gli esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che la presenza del virus nel SNE causa visibili alterazioni nell’espressione degli enzimi direttamente coinvolti nel metabolismo dell’adenosina. Nel nostro modello di alterazione della motilità intestinale CD73 sembra essere indotto in modo significativo nei gangli mienterici e nella muscolatura liscia a 1 e 6 settimane dall’esposizione al virus, fasi dell’infezione che si accompagnano anche ad un’alterazione della funzione contrattile della muscolatura liscia (Zoppellaro *et al.*, 2007). In particolare, a 6 settimane le immagini evidenziano anche un’apparente variazione della morfologia dei gangli, che risultano ingrossati, e del muscolo longitudinale, principale responsabile della risposta contrattile dell’intestino all’adenosina e ai suoi agonisti (Nicholls e Hourani, 1997). La sovraespressione di CD73 potrebbe essere un meccanismo di difesa per la cellula, al fine di migliorare la funzione di barriera e di modulare le reazioni immunitaria e infiammatoria indotte dal virus, come è stato dimostrato nelle cellule endoteliali infettate con citomegalovirus (Kas-Deelen *et al.*, 2001). La peculiare espressione di CD73 nei neuroni del SNE potrebbe rappresentare anche un marker di sofferenza neuronale, analogamente a quanto riscontrato nelle cellule della microglia, di Schwann, satellite e nei fibroblasti, dove l’elevata attività delle nucleotidasi in seguito a un danno sembra essere riconducibile al coinvolgimento di CD73 nei processi di rigenerazione neuronale (Zimmermann, 1992).

Le immagini al microscopio confocale delle sezioni di tessuto provenienti da ratti trattati *in vivo* con HSV-1 ha dimostrato un’alterata espressione di ADA in diverse fasi dell’infezione enterica. In particolare, si può osservare un’intensa marcatura per l’enzima nei gangli mienterici già a tempi brevi di esposizione al virus, mentre nel muscolo si sviluppa uno staining molto intenso, che interessa in modo specifico la muscolatura longitudinale, a 6 e 10 settimane. Questi risultati indicano che l’induzione di ADA, pur inizialmente parallela a quella di CD73, viene mantenuta per un periodo di tempo maggiore. La deaminazione extracellulare rappresenta il meccanismo più efficiente nel controllare la concentrazione di adenosina a livello sinaptico e, di conseguenza, l’attivazione tonica dei recettori facilitatori A2a sulle terminazioni nervose del plesso mienterico (Duarte-Araujo *et al.*, 2004).

Un’incrementata attività plasmatica di ADA è stata osservata nel sangue di pazienti affetti da malattie infettive causate da microrganismi che colpiscono principalmente i macrofagi, tra cui i virus dell’epatite B e C (Kaya *et al.*, 2007). Nel nostro modello animale sono state misurate concentrazioni significativamente elevate di IL-2 nel siero di ratti esposti al virus

per 4 e 6 settimane. IL-2 è una citochina proinfiammatoria che induce una up-regolazione di ADA sulla superficie dei linfociti umani. È stata anche evidenziata l'importanza della formazione del complesso di ADA con A2bR anziché con CD26 in alcuni tipi di cellule del sistema immunitario (Cordero *et al.*, 2001).

In accordo, probabilmente, con il suo ruolo chiave nell'immunità, ADA è sovraespressa a 2 settimane dall'esposizione al virus nella mucosa intestinale, analogamente a CD73. In molti tessuti i due enzimi mostrano una distribuzione simile, da cui l'ipotesi di un "sistema enzimatico accoppiato", fondamentale nel metabolismo dell'AMP e dell'adenosina per regolare le concentrazioni extracellulari del nucleoside (Moriwaki *et al.*, 2004).

La possibile relazione tra sistema purinergico e HSV-1 è stata studiata intorno agli anni '80 su modelli di topo infettati con il virus: i risultati hanno messo in evidenza un importante effetto profilattico dell'AMP sull'insorgenza dell'infezione primaria e sui successivi episodi di riacutizzazione. Il meccanismo d'azione ipotizzato prevede la conversione dell'AMP in adenosina che, legandosi a specifici recettori, porta a una riduzione dell'AMP ciclico intracellulare, deprimendo il metabolismo cellulare e rendendo così le cellule contenenti il virus incapaci di attivare i processi di replicazione (Blue *et al.*, 1981).

In accordo con questo lavoro, i nostri risultati preliminari rappresentano un'ulteriore dimostrazione della stretta relazione tra sistema purinergico e latenza di HSV-1 nel SNE. Negli ultimi anni, la ricerca si è sviluppata seguendo due direzioni diverse, aventi come obiettivo comune quello di migliorare condizioni patologiche croniche agendo sul controllo degli effetti dell'adenosina extracellulare. La manipolazione delle vie metaboliche per il controllo della concentrazione della purina è stata proposta quale approccio terapeutico nel trattamento dell'ischemia e della leucemia, e potrebbe rivelarsi importante anche nell'infezione, se non addirittura nella sepsi (Adanin *et al.*, 2002). Dal momento che una attenta modulazione dell'espressione dei recettori purinergici sembra alla base di una adeguata risposta infiammatoria ed immunitaria da parte del tessuto, lo sviluppo e la sintesi di agonisti e antagonisti recettoriali dell'adenosina rappresenta un'altra area di notevole interesse nell'intervento e nella cura di diverse malattie (Akkari *et al.*, 2006).

Poiché nell'ileo di ratto è stata messa in evidenza la presenza di tutti e quattro i recettori P1, tali considerazioni hanno indirizzato la nostra ricerca verso la valutazione di un'eventuale influenza di HSV-1 anche sulla distribuzione di A1R, A2aR, A2bR e A3R.

L'alterazione dell'espressione genica di specifiche proteine è stata proposta quale parte integrante della risposta immunitaria da parte dell'ospite, al fine di mantenere il virus in uno stato di latenza. Nel topo infettato con HSV-1 è stata dimostrata la modulazione genica a livello neuronale di alcuni GPCR (Kramer *et al.*, 2003). Analogamente, nella colite indotta da TNBS (acido trinitro-benzen sulfonico) sono state riconosciute molteplici alterazioni

nell'espressione di geni che codificano per proteine neuronali e, tra queste, i recettori purinergici: in particolare, si osserva una up-regulation di A1R, A2aR e A3R (Guzman *et al.*, 2006). Queste evidenze sono in accordo con i nostri risultati ottenuti sul SNE analizzando i tessuti dei ratti trattati con HSV-1. A livello del plesso mienterico, A2bR è l'unico recettore che non mostra alterazioni significative del segnale fluorescente nel corso dell'infezione. Al contrario, nel tessuto muscolare il recettore è sovraespresso rispetto al controllo a 1, 6 e 10 settimane, pur mantenendo uno staining ridotto rispetto agli altri recettori.

Patologie infiammatorie croniche, quali IBD o enteriti batteriche e virali, sono caratterizzate da un aumentato rilascio di TNF- $\alpha$  nel siero e nella mucosa intestinale; il TNF- $\alpha$  è un'importante citochina proinfiammatoria che modula l'espressione, il segnale e la funzionalità di A2bR, promuovendone la trascrizione e il reclutamento sulla membrana cellulare (Kolachala *et al.*, 2005). L'incremento della concentrazione plasmatica di TNF- $\alpha$  è stata riscontrata anche nei ratti esposti ad HSV-1 per 4 e 6 settimane; dal momento che il meccanismo di induzione di A2bR da parte della citochina non è immediato, si può ipotizzare che anche nel nostro modello TNF- $\alpha$  promuova l'espressione di A2bR nella muscolatura liscia a 6 e a 10 settimane dopo l'inoculo con il virus, in accordo con l'induzione di ADA agli stessi tempi di esposizione.

In condizioni fisiologiche, la stimolazione di questo recettore determina una marcata inibizione dell'attività peristaltica nell'ileo di ratto (Storr *et al.*, 2002), da cui l'ipotesi che la sovraespressione di A2bR nel muscolo degli animali esposti al virus per 1 settimana contribuisca alle alterazioni del transito intestinale indotte dal trattamento.

Analogamente ad A2bR, anche A1R potrebbe rappresentare per ecto-ADA un'importante molecola di ancoraggio sulla superficie delle ISMC in condizioni patologiche, come suggerito dalla parallela induzione delle due proteine a 6 e a 10 settimane dal trattamento dei ratti *in vivo* con HSV-1. È interessante sottolineare anche la corrispondente sovraespressione di A1R e CD73 a 6 e 10 settimane, dal momento che il recettore mostra un importante effetto neuroprotettivo mediato dall'adenosina (Yaar *et al.*, 2005).

Si ritiene che A2aR sia il recettore principalmente coinvolto nella modulazione funzionale delle cellule immunitarie da parte dell'adenosina e nella risoluzione dell'infiammazione per inibizione dell'attivazione dei macrofagi e dell'attività dei neutrofili (Rogachev *et al.*, 2006; Haskò e Pacher, 2008). HSV-1 influenza A2aR in maniera complementare nel muscolo e nel SNE, così da mantenerne una sovraespressione nel tessuto neuromuscolare per tutto il corso dell'infezione. Uno studio condotto su BSC-40 (cellule epiteliali di rene di scimmia) infettate con Vaccinia Virus ha dimostrato che l'adenosina inibisce la replicazione del DNA virale e la sintesi delle proteine prodotte dal virus nella fase tardiva dell'infezione; l'effetto è

mediato dai recettori A2 e dalla successiva attivazione della PKA (Leão-Ferreira *et al.*, 2002).

Nella peritonite indotta da *Escherichia Coli* nel topo, è stata osservata una up-regulation di A1R immediatamente dopo l'inoculo dell'agente patogeno; l'attivazione del recettore porta alla riduzione delle concentrazioni di AMP ciclico intracellulare, responsabile della migrazione locale di citochine e leucociti pro-infiammatori, promuovendo così un'adeguata risposta immunitaria verso il microrganismo. Al contrario, l'induzione di A2aR e A2bR nelle ultime fasi della peritonite è probabilmente associata ad un aumento dei livelli intracellulari di AMP ciclico, che riduce significativamente le concentrazioni dei mediatori proinfiammatori e il reclutamento dei leucociti, contenendo quindi l'infiammazione (Rogachev *et al.*, 2006).

Soltanto negli ultimi anni A3R è stato considerato un nuovo potenziale target purinergico nel trattamento di patologie associate a stati infiammatori e a cancro: ad esempio, nella colite indotta da TNBS, IB-MECA (N<sup>6</sup>-(3-iodobenzil)-adenosina-5-N-metiluronamide), agonista A3, può prevenire lo sviluppo dell'infiammazione cronica e della disregolazione genica, le alterazioni istopatologiche, i segni clinici di danno e la perdita di peso (Guzman *et al.*, 2006; Baraldi *et al.*, 2008).

Nei ratti trattati *in vivo* con HSV-1 si osserva una sovraespressione di A3R nel tessuto neuromuscolare a 1, 4 e 6 settimane. In condizioni fisiologiche, A3R non è presente in concentrazione elevata nel SNC ma il suo coinvolgimento nell'attività motoria sembra essere determinante. Tale recettore, inoltre, riveste un ruolo importante nella modulazione dell'apoptosi e nell'attivazione dei sistemi cellulari antiossidanti (Yaar *et al.*, 2005). La sovraespressione di A3R è stata dimostrata anche nel cancro del colon, sia a livello del tessuto sia a livello periferico nelle cellule del sangue, rendendo così il recettore un possibile marker diagnostico per questa neoplasia (Baraldi *et al.*, 2008).

È interessante osservare che a 6 settimane dall'esposizione ad HSV-1 tutti i recettori P1 mostrano un alterato profilo di espressione nel tessuto neuromuscolare, in perfetto accordo con la compromissione della motilità intestinale riportata dagli studi *in vitro* condotti sull'ileo isolato degli stessi animali (Zoppellaro *et al.*, 2007).

L'adenosina rappresenta un importante immunoregolatore e neuromodulatore delle funzioni del tratto gastrointestinale. L'interazione reciproca tra il sistema adenosinergico (che comprende recettori, enzimi e trasportatori) e le citochine rilasciate da cellule immunitarie e infiammatorie in risposta ad un insulto permette il monitoraggio dello stato metabolico del tessuto e il mantenimento dell'omeostasi tissutale (Antonioli *et al.*, 2007b).

Il modello animale impiegato nel nostro studio ha evidenziato a livello dell'ileo significative alterazioni dell'espressione sia di CD73 e ADA che dei recettori P1 durante il corso dell'infezione, a sottolineare il ruolo del sistema adenosinergico nell'infiammazione, ma

anche in presenza di un'infezione virale. Di conseguenza, gli enzimi deputati al metabolismo dell'adenosina e i recettori P1 potrebbero rappresentare marcatori prognostici innovativi di IBD e IBS e/o potenziali bersagli farmacologici nel trattamento di queste patologie e, in generale, di anomalie neuromuscolari a carico del tratto gastrointestinale.



## BIBLIOGRAFIA

- Adams LD, Lemire JM and Schwartz SM (1999) A systematic analysis of 40 random genes in cultured vascular smooth muscle subtypes reveals a heterogeneity of gene expression and identifies the tight junction gene Zonula Occludens 2 as a marker of epithelioid "pup" smooth muscle cells and a participant in carotid neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:2600-2608.
- Adanin S, Yalovetskiy IV, Nardulli BA, Sam AD, Jonjev ZS and Law WR (2002) Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**:R1324-1332.
- Airas L, Niemelä J, Yegutkin G and Jalkanen S (2007) Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine. *Ann N Y Acad Sci* **1110**:641-648.
- Akkari R, Burbiel J, Hockemeyer J and Müller C (2006) Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr Top Med Chem* **6**:1375-1399.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Da Settimo F, Natale G, Kastsuchenka O, Duranti E, Viridis A, Vassalle C, La Motta C, Mugnaini L, Breschi MC, Blandizzi C and Del Tacca M (2007a) Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:435-442.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M and Blandizzi C (2007b) Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* doi:10.1002/ibd.20316.
- Balda MS and Matter K (1998) Tight junctions. *J Cell Sci* **111**:541-547.
- Bankir L, Ahloulay M, Devreotes PN and Parent CA (2002) Extracellular cAMP inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved? *Am J Physiol Renal Physiol* **282**:F376-392.
- Baumgart DC and Carding SR (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet* **369**:1627-1640.
- Bin A, Giron MC, Calligaro G, Castagliuolo I and Gaion RM (2007) Adenosine receptors and metabolism in the intestinal tract. *Book of Abstract Cagliari*, June 6-9.
- Bin A, Giron MC, Etteri S, Bongiovanni F, Florio C and Gaion RM (2006) Ecto-5' nucleotidase (CD73) activity and expression in the rat ileum. *Purinergic Signalling* **2**:181-182.
- Blue WT, Winland RD, Stobbs DG, Kirksey DF and Savage RE (1981) Effects of adenosine monophosphate on the reactivation of latent herpes simplex virus type 1 infections of

- mice. *Antimicrob Agents Chemother* **20**:547-548.
- Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN and Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* **112**:358-404.
- Cabarrocas J, Savidge TC and Roland SL (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**:81-93.
- Calhau C, Martel F, Hipolito-Reis C and Azevedo I (2000) Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clinical Biochemistry* **33**:571-577.
- Cao L, Martin A, Polakos N and Moynihan JA (2004) Stress causes a further decrease in immunity to herpes simplex virus-1 in immunocompromised hosts. *Journal of Neuroimmunology* **156**:21-30.
- Carneiro-Ramos MS, Silva VBd, Júnior MBC, Battastini AMO, Sarkis JJF and Barreto-Chaves MLM (2004) Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **265**:195-201.
- Castagliuolo I, Brun P, Costantini M, Rizzetto C, Palu G, Costantino M, Baldan N and Zaninotto G (2004) Esophageal achalasia: is the herpes simplex virus really innocent? *Journal of Gastrointestinal Surgery* **8**:24-30.
- Cavalcante IC, Castro MV, Barreto ARF, Sullivan GW, Vale M, Almeida PRC, Linden J, Rieger JM, Cunha FQ, Guerrant RL, Ribeiro RA and Brito GAC (2006) Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on Clostridium difficile toxin A-induced murine ileal enteritis. *Infect Immun* **74**:2606-2612.
- CCFA (2007). *About Crohn's Disease*. Crohn's and Colitis Foundation of America, New York.
- Childs KF, Ning XH and Bolling SF (1996) Simultaneous detection of nucleotides, nucleosides and oxidative metabolites in myocardial biopsies. *J Chromatogr B Biomed Appl* **678**:181-186.
- Christofi FL (2001) Unlocking mysteries of gut sensory transmission: is adenosine the key? *News Physiol Sci* **16**:201-207.
- Christofi FL, Zhang H, Yu JG, Guzman J, Xue J, Kim M, Wang YZ and Cooke HJ (2001) Differential gene expression of adenosine A1, A2a, A2b, and A3 receptors in the human enteric nervous system. *J Comp Neurol* **439**:46-64.
- Colgan S, Eltzschig H, Eckle T and Thompson L (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* **2**:351-360.
- Collins S, Blennerhassett P, Blennerhassett M and Vermillion D (1989) Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of Trichinella-infected rats. *Am J Physiol* **257**:G898-903.

- Collins SM, Piche T and Rampal P (2001) The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* **49**:743-745.
- Cordero OJ, Salgado FJ, Fernandez-Alonso CM, Herrera C, Lluís C, Franco R and Nogueira M (2001) Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* **70**:920-930.
- Correia-de-Sa P, Aadaes S, Timoteo MA, Vieira C, Magalhaes-Cardoso T, Nascimento C and Duarte-Araujo M (2006) Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: on the role of secreted adenosine deaminase. *Autonomic Neuroscience* **126-127**:211-224.
- Coupar I and Hancock D (1994) The adenosine agonist NECA inhibits intestinal secretion and peristalsis. *J Pharm Pharmacol* **46**:801-804.
- Coupar IM (1999) Characterization and tissue location of the neural adenosine receptor in the rat ileum. *Br J Pharmacol* **126**:1269-1275.
- Cronstein BN (1994) Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* **76**:5-13.
- Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE and Levin RI (1991) Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**:2441-2445.
- Daheshia M, Feldman LT and Rouse BT (1998) Herpes simplex virus latency and the immune response. *Current Opinion in Microbiology* **1**:430-435.
- De Giorgio R, Brun P, Zoppellaro C, Giron M, Felicani C, Barbara G, Stanghellini V, Bracceschi M, Pal G, Zaninotto G, Tonini M, Coriandolesi R, Gaion R and Castagliuolo I (2007) Evidence of small bowel neuro-muscular abnormalities in a rat model of Herpes Simplex Virus-1 (HSV1) infection of the Enteric Nervous System. *Supplement to Gastroenterology* **132**:A136-A137.
- De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA and Mawe GM (2004) Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* **126**:1872-1883.
- De Man JG, Seerden TA, De Winter BY, Van Marck EA, Herman AG and Pelckmans PA (2003) Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* **139**:172-184.
- De Ponti F, Giaroni C, Cosentino M, Lecchini S and Frigo G (1996) Adrenergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility: from basic science to clinical applications. *Pharmacology & Therapeutics* **69**:59-78.
- Dixon A, Gubitza A, Sirinathsinghji D, Richardson P and Freeman T (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* **118**:1461-1468.

- Duarte-Araujo M, Nascimento C, Alexandrina Timoteo M, Magalhaes-Cardoso T and Correia-de-Sa P (2004) Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A2A and extrajunctional inhibitory A1 receptors. *Br J Pharmacol* **141**:925-934.
- Eddinger TJ, Schiebout JD and Swartz DR (2005) Smooth muscle adherens junctions associated proteins are stable at the cell periphery during relaxation and activation. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**:C1379-1387.
- Efstathiou S and Preston CM (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research* **111**:108-119.
- Elalamy I, Said FA, Singer M, Couetil JP and Hatmi M (2000) Inhibition by extracellular cAMP of phorbol 12-myristate 13-acetate-induced prostaglandin H synthase-2 expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. Involvement of an ecto-protein kinase activity. *J Biol Chem* **275**:13662-13667.
- Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P, Odegard KC, Laussen PC, Thompson LF and Colgan SP (2006) Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* **108**:1602-1610.
- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC and Colgan SP (2003) Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* **198**:783-796.
- Escrive M, Burgueno J, Ciruela F, Canela EI, Mallol J, Enrich C, Lluís C and Franco R (2003) Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Experimental Cell Research* **285**:72-90.
- Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI and Lluís C (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology* **52**:283-294.
- Gao Z-G and Jacobson KA (2007) Emerging adenosine receptor agonists. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **12**:479-492.
- Geiger B, Tokuyasu K, Dutton A and Singer S (1980) Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:4127-4131.
- Gesser R and Koo S (1996) Oral inoculation with herpes simplex virus type 1 infects enteric neuron and mucosal nerve fibers within the gastrointestinal tract in mice. *J Virol* **70**:4097-4102.

- Gesser RM and Koo SC (1997) Latent herpes simplex virus type 1 gene expression in ganglia innervating the human gastrointestinal tract. *J Virol* **71**:4103-4106.
- Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S and Borea PA (2008) The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacology & Therapeutics* **117**:123-140.
- Giron MC, Bin A, Brun P, Etteri S, Bolego C, Florio C and Gaion RM (2008) Cyclic AMP in rat ileum: evidence for the presence of an extracellular cyclic AMP-adenosine pathway. *Gastroenterology* doi:10.1053/j.gastro.2008.1001.1030.
- Gorin E and Brenner T (1976) Extracellular metabolism of cyclic AMP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **451**:20-28.
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS and Louvard D (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *PNAS* **93**:10779-10784.
- Guzman J, Yu J, Suntres Z, Bozarov A, Cooke H, Javed N, Auer H, Palatini J, Hassanain H, Cardounel A, Javed A, Grants I, Wunderlich J and Christofi F (2006) ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis: proof by validated high-density oligonucleotide microarray analysis. *Inflamm Bowel Dis* **12**:766-789.
- Gwee KA (2005) Irritable bowel syndrome in developing countries - a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterology & Motility* **17**:317-324.
- Haskò G and Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* **25**:33-39.
- Haskò G and Pacher P (2008) A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol* **83**:1-9.
- Haskò G, Pacher P, Deitch EA and Vizi ES (2007) Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **113**:264-275.
- Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C and Franco R (2001) Adenosine A2b receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* **59**:127-134.
- Hofer AM and Lefkimiatis K (2007) Extracellular calcium and cAMP: second messengers as "third messengers"? *Physiology* **22**:320-327.
- Hunsucker SA, Mitchell BS and Spychala J (2005) The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* **107**:1-30.
- Jackson EK, Mi Z and Dubey RK (2007) The extracellular cAMP-adenosine pathway significantly contributes to the in vivo production of adenosine. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:117-123.
- Jackson EK, Zacharia LC, Zhang M, Gillespie DG, Zhu C and Dubey RK (2006) cAMP-

- adenosine pathway in the proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* **317**:1219-1229.
- Jacobson KA and Gao Z-G (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**:247-264.
- Kadowaki M, Nagakura Y, Tokita K, Hanaoka K and Tomoi M (2003) Adenosine A1 receptor blockade reverses experimental postoperative ileus in rat colon. *European Journal of Pharmacology* **458**:197-200.
- Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP and Haase VH (2004) Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* **114**:1098-1106.
- Kas-Deelen AM, Bakker WW, Olinga P, Visser J, de Maar EF, van Son WJ, The TH and Harmsen MC (2001) Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Letters* **491**:21-25.
- Kaya S, Cetin E, Aridogan B, Arikian S and Demirci M (2007) Adenosine deaminase activity in serum of patients with hepatitis - a useful tool in monitoring clinical status. *J Microbiol Immunol Infect* **40**:288-292.
- Khan I, Blennerhassett MG, Kataeva GV and Collins SM (1995) Interleukin 1 beta induces the expression of interleukin 6 in rat intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **108**:1720-1728.
- Khan WI and Collins S (2006) Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clinical & Experimental Immunology* **143**:389-397.
- Kolachala V, Asamoah V, Wang L, Obertone T, Ziegler T, Merlin D and Sitaraman S (2005) TNF- $\alpha$  upregulates adenosine 2b (A2b) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A2bR overexpression in colitis. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **62**:2647-2657.
- Kolachala VL, Bajaj R, Chalasani M and Sitaraman SV (2007) Purinergic mechanisms in gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* doi:10.1152/ajpgi.00454.02007.
- Kramer MF, Cook WJ, Roth FP, Zhu J, Holman H, Knipe DM and Coen DM (2003) Latent herpes simplex virus infection of sensory neurons alters neuronal gene expression. *J Virol* **77**:9533-9541.
- Lachmann R (2003) Herpes simplex virus latency. *Expert Rev Mol Med* **5**:1-14.
- Lasley RD, Narayan P, Uittenbogaard A and Smart EJ (2000) Activated cardiac adenosine A1 receptors translocate out of caveolae. *J Biol Chem* **275**:4417-4421.
- Latini S and Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry* **79**:463-484.

- Leão-Ferreira LR, Paes-de-Carvalho R, de Mello FG and Moussatché N (2002) Inhibition of vaccinia virus replication by adenosine in BSC-40 cells: involvement of A2 receptor-mediated PKA activation. *Archives of Virology* **147**:1407-1423.
- Lecci A, Santicoli P and Maggi CA (2002) Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Current Opinion in Pharmacology* **2**:630-641.
- Lee JJ, Talubmook C and Parsons ME (2001) Activation of presynaptic A1-receptors by endogenous adenosine inhibits acetylcholine release in the guinea-pig ileum. *Journal of Autonomic Pharmacology* **21**:29-38.
- Lewis BM, Pexa A, Francis K, Verma V, McNicol AM, Scanlon M, Deussen A, Evans WH, Rees DA and Ham J (2006) Adenosine stimulates connexin 43 expression and gap junctional communication in pituitary folliculostellate cells. *FASEB J* **20**:2585-2587.
- Linden J (2006) New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* **116**:1835-1837.
- Lomax AE, O'Reilly M, Neshat S and Vanner SJ (2007) Sympathetic vasoconstrictor regulation of mouse colonic submucosal arterioles is altered in experimental colitis. *J Physiol* **583**:719-730.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Haskò G, Marton A, Szabo C and Salzman AL (2003) Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G138-144.
- Milojevic T, Reiterer V, Stefan E, Korkhov VM, Dorostkar MM, Ducza E, Ogris E, Boehm S, Freissmuth M and Nanoff C (2006) The ubiquitin-specific protease Usp4 regulates the cell surface level of the A2a receptor. *Mol Pharmacol* **69**:1083-1094.
- Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G and Pallone F (2002) Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* **50**:60-64.
- Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, Balter L, Thompson LF, Resta R, Carlin G, Huie MA and Cronstein BN (1998) Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* **101**:295-300.
- Moriwaki Y, Takahashi S, Tsutsumi Z, Ka T, Hada T and Yamamoto T (2004) Immunohistochemical demonstration of adenosine deaminase (ADA 1) in human tissues. *Acta Histochem Cytochem* **37**:173-182.
- Naramatsu M, Yamashita T and Kokubun S (1997) The signalling pathway which causes contraction via P2-purinoceptors in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* **122**:558-562.

- Nicholls J and Hourani SMO (1997) Characterization of adenosine receptors on rat ileum, ileal longitudinal muscle and muscularis mucosae. *European Journal of Pharmacology* **338**:143-150.
- Odashima M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Linden J, Nast CC, Moskaluk CA, Marini M, Sugawara K, Kozaiwa K, Otaka M, Watanabe S and Cominelli F (2005) Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **129**:26-33.
- Opazo Saez A, Zhang W, Wu Y, Turner CE, Tang DD and Gunst SJ (2004) Tension development during contractile stimulation of smooth muscle requires recruitment of paxillin and vinculin to the membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**:C433-447.
- Pesi R, Camici M, Micheli V, Notarantonio L, Jacomelli G and Tozzi M (2008) Identification of the nucleotidase responsible for the AMP hydrolysing hyperactivity associated with neurological and developmental disorders. *Neurochemical Research* **33**:59-65.
- Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J and Boucher RC (2003) Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* **278**:13468-13479.
- Poturoglu S, Kaymakoglu S, Polat NG, Ibrism D, Ahishali E, Akyuz F, Badur S, Demir K and Mungan ZA (2007) A new agent for Tumour Necrosis Factor-alpha inhibition: in vitro effects of dipyridamole in Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**:A-558.
- Quigley EMM (2005) Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: interrelated diseases? *Chinese Journal of Digestive Diseases* **6**:122-132.
- Ralevic V and Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**:413-492.
- Rijnierse A, Nijkamp FP and Kraneveld AD (2007) Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacology & Therapeutics* **116**:207-235.
- Rogachev B, Ziv NY, Mazar J, Nakav S, Chaimovitz C, Zlotnik M and Douvdevani A (2006) Adenosine is upregulated during peritonitis and is involved in downregulation of inflammation. *Kidney Int* **70**:675-681.
- Ross R and Kariya B (1980) Morphogenesis of vascular smooth muscle in atherosclerosis and cell structure. In: *Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HY, eds. Handbook of physiology. The cardiovascular system. Bethesda: American Physiological Society*, 69.
- Sainz de la Maza M, Wells P and Foster CS (1989) Cyclic nucleotide modulation of herpes simplex virus latency and reactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**:2154-2159.
- Sands WA and Palmer TM (2005) Inhibition of pro-inflammatory cytokine receptor signalling by cAMP in vascular endothelial cells. *Biochem Soc Trans* **33**:1126-1128.

- Sato T, Obata T, Yamanaka Y and Arita M (1997) Stimulation of alpha 1-adrenoceptors and protein kinase C-mediated activation of ecto-5'-nucleotidase in rat hearts in vivo. *J Physiol* **503**:119-127.
- Schwede F, Maronde E, Genieser H-G and Jastorff B (2000) Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacology & Therapeutics* **87**:199-226.
- Siegmund B, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bidlingmaier C, Firestein GS, Boyle D, Lehr H-A, Loher F, Hartmann G, Endres S and Eigler A (2001) Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:99-105.
- Sitaraman SV, Wang L, Wong M, Bruewer M, Hobert M, Yun CH, Merlin D and Madara JL (2002) The adenosine A2b receptor is recruited to the plasma membrane and associates with E3KARP and ezrin upon agonist stimulation. *J Biol Chem* **277**:33188-33195.
- Smith JS and Robinson NJ (2002) Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *The Journal of Infectious Diseases* **186**:S3-S28.
- Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology* **6**:401-410.
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD and Reppert SM (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* **6**:384-393.
- Storr M, Thammer J, Dunkel R, Schusdziarra V and Allescher H-D (2002) Modulatory effect of adenosine receptors on the ascending and descending neural reflex responses of rat ileum. *BMC Neuroscience* **3**:21.
- Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, Thompson LF, Carlson SL, Moe SJ, Carnes DK, Mrsny RJ and Madara JL (1997) Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest* **99**:2588-2601.
- Strohmeier GR, Reppert SM, Lencer WI and Madara JL (1995) The A2b adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. *J Biol Chem* **270**:2387-2394.
- Sun WC, Cao Y, Jin L, Wang LZ, Meng F and Zhu XZ (2005) Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A1 receptors. *Acta Pharmacologica Sinica* **26**:160-165.
- Sundaram U, Hassanain H, Suntres Z, Yu JG, Cooke HJ, Guzman J and Christofi FL (2003) Rabbit chronic ileitis leads to up-regulation of adenosine A1/A3 gene products, oxidative stress, and immune modulation. *Biochemical Pharmacology* **65**:1529-1538.
- Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF and Colgan SP (2002) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*

110:993-1002.

Thorn JA and Jarvis SM (1996) Adenosine transporters. *General Pharmacology: The Vascular System* **27**:613-620.

Toews ML (2006) Adenosine receptors find a new partner and move out. *Mol Pharmacol* **69**:1075-1078.

Trofatter KFJ and Daniels CA (1980) Effect of prostaglandins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate modulators on herpes simplex virus growth and interferon response in human cells. *Infect Immun* **27**:158-167.

Van Assche G, Barbara G, Deng Y, Lovato P, Gauldie J and Collins S (1999) Neurotransmitters modulate cytokine-stimulated interleukin 6 secretion in rat intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **116**:346-353.

Vendetti S, Patrizio M, Riccomi A and De Magistris MT (2006) Human CD4+ T lymphocytes with increased intracellular cAMP levels exert regulatory functions by releasing extracellular cAMP. *J Leukoc Biol* **80**:880-888.

Walsh-Reitz MM, Huang EF, Musch MW, Chang EB, Martin TE, Kartha S and Toback FG (2005) AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**:G163-171.

Wang L, Kolachala V, Walia B, Balasubramanian S, Hall RA, Merlin D and Sitaraman SV (2004) Agonist-induced polarized trafficking and surface expression of the adenosine 2b receptor in intestinal epithelial cells: role of SNARE proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G1100-1107.

Weiser MM (1973) Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *J Biol Chem* **248**:2536-2541.

Yaar R, Jones M, Chen JF and Ravid K (2005) Animal models for the study of adenosine receptor function. *Journal of Cellular Physiology* **202**:9-20.

Zacher LA and Carey GB (1999) Cyclic AMP metabolism by swine adipocyte microsomal and plasma membranes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **124**:61-71.

Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* **285**:345-365.

Zimmermann H and Braun N (1996) Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol* **16**:397-400.

Zoppellaro C, Brun P, Giron MC, Bin A, Gaion RM and Castagliuolo I (2007) Herpes Simplex Virus-1 infection alters the carbachol- and KCl-induced contractions in rat small intestine. *Book of Abstract Cagliari*, June 6-9.