

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia "E. Meneghetti"

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

***Infezione da Herpes simplex virus-1 nel sistema nervoso enterico:  
un innovativo modello di alterazione della motilità intestinale***

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Supervisore:** Ch.mo Prof. M. Cecilia Giron

**Dottorando:** Chiara Zoppellaro

15 Marzo 2010



# INDICE

|   |         |
|---|---------|
| RIASSUNTO   | pag. 1  |
| SUMMARY   | pag. 3  |
| INTRODUZIONE  | pag. 5  |
| <i>Infezione enterica da Herpes simplex virus-1: un innovativo modello di alterazione della motilità intestinale</i>                | pag. 7  |
| <i>Il sistema dell'adenosina nel tratto gi: potenziale bersaglio terapeutico nel trattamento dei DFGI</i>                           | pag. 10 |
| <i>I recettori Toll-like ed il loro coinvolgimento nelle malattie del tratto GI</i>   | pag. 14 |
| METODI  | pag. 17 |
| <i>Allestimento di un modello animale di infezione enterica da HSV-1</i>  | pag. 18 |
| <i>Procedura sperimentale</i>   | pag. 18 |
| <i>Valutazione del rilascio di acetilcolina triziata</i>  | pag. 19 |
| <i>Western blotting</i>   | pag. 19 |
| <i>Immunofluorescenza su preparati whole-mount</i>  | pag. 20 |
| <i>Analisi statistica dei risultati</i>   | pag. 21 |
| MATERIALI   | pag. 22 |
| RISULTATI   | pag. 23 |
| <i>Influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile dell'ileo di ratto</i>                                    | pag. 23 |
| <i>Influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile dell'ileo di ratto mediata dal sistema adenosinergico</i> | pag. 29 |
| <i>Effetto del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile di preparati di ileo isolato da topi WT</i>                 | pag. 35 |
| <i>Effetto della delezione del gene che codifica per il TLR2 sulla risposta contrattile di preparati di ileo isolato da topo</i>    | pag. 39 |
| <i>Effetto del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile di preparati di ileo isolato da topi TLR2 KO</i>            | pag. 42 |
| DISCUSSIONE   | pag. 45 |
| BIBLIOGRAFIA  | pag. 58 |

## ABBREVIAZIONI

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>ADA</b>               | adenosina deaminasi  |
| <b>AK</b>                | adenosina chinasi  |
| <b>CCPA</b>              | 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina                            |
| <b>CNTR</b>              | controllo  |
| <b>[<sup>3</sup>H]Ch</b> | colina triziata  |
| <b>DFGI</b>              | disordini funzionali gastrointestinali                     |
| <b>DNBS</b>              | acido 2,4-dinitrobenzensolfonico                           |
| <b>DPCPX</b>             | 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina                          |
| <b>DPM</b>               | disintegrazioni per minuto                                 |
| <b>EC</b>                | cellule enterocromaffini                                   |
| <b>ECL</b>               | enhanced chemiluminescence                                 |
| <b>EFS</b>               | stimolazione elettrica a campo                             |
| <b>GI</b>                | gastrointestinale  |
| <b>GM</b>                | gangli mioenterici   |
| <b>HSV-1</b>             | <i>Herpes simplex virus 1</i>                              |
| <b>5HT</b>               | serotonina   |
| <b>IBD</b>               | malattia infiammatoria intestinale                         |
| <b>IBS</b>               | sindrome dell'intestino irritabile                         |
| <b>IE</b>                | immediate early genes                                      |
| <b>IG</b>                | intragastrica  |
| <b>IN</b>                | intranasale  |
| <b>LAT</b>               | latency associated transcripts                             |
| <b>LMMP</b>              | muscolatura longitudinale con annesso il plesso mienterico |
| <b>L-NAME</b>            | N <sub>ω</sub> -nitro-L-arginina metil estere cloridrato   |
| <b>mN</b>                | milliNewton  |
| <b>MLC</b>               | catena leggera della miosina                               |
| <b>NANC</b>              | non adrenergica non colinergica                            |
| <b>NOS</b>               | NO sintetasi   |
| <b>NK-R</b>              | recettore per le neurochinine                              |
| <b>PAMP</b>              | componenti molecolari proprie dei patogeni                 |
| <b>PACAP</b>             | peptide ipofisario attivante l'adenilato ciclastasi        |
| <b>R-PIA</b>             | R(-)-N6-(2-fenilisopropil)adenosina                        |
| <b>SNC</b>               | sistema nervoso centrale                                   |
| <b>SNE</b>               | sistema nervoso enterico                                   |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>SP</b>     | sostanza P   |
| <b>TLR</b>    | recettore Toll-like  |
| <b>TLR KO</b> | topi deficienti del gene codificante per il recettore TLR2 |
| <b>TNBS</b>   | acidotrinitrobenzensulfonico                               |
| <b>tk</b>     | timidina chinasi   |
| <b>TTX</b>    | tetrodotossina   |
| <b>VGCC</b>   | canali del calcio voltaggio dipendenti                     |
| <b>WT</b>     | wild type  |



## RIASSUNTO

I disordini funzionali dell'apparato gastrointestinale (DFGI) presentano un'elevata prevalenza nella popolazione occidentale e possono essere estremamente invalidanti, compromettendo la qualità di vita dei pazienti che ne sono affetti (Talley, 2008). Anche se la patofisiologia è multifattoriale, recenti studi hanno evidenziato che anomalie del sistema nervoso enterico (SNE) sono alla base di DFGI. Il SNE occupa infatti un ruolo centrale nella modulazione delle funzioni intestinali e, di conseguenza, anche nella regolazione della motilità (De Giorgio e Camilleri, 2004).

Agenti infettivi, come i virus neurotropi, sembrano coinvolti nell'insorgenza di anomalie motorie del tratto gastrointestinale (GI), dal momento che sono in grado di alterare il SNE sia in modo diretto che attraverso reazioni immuno-mediate. L'*Herpes simplex virus* di tipo 1 (HSV-1), un virus neurotroppo comunemente diffuso nella nostra società, se somministrato nel lume esofageo del topo, è in grado di infettare il SNE e sembra essere coinvolto nella genesi di DFGI (Gesser e Koo, 1996). Abbiamo recentemente dimostrato che il virus, inoculato per via intragastrica (IG) nel ratto, infetta il SNE (De Giorgio et al., 2007).

Gli studi condotti nel mio periodo di dottorato hanno avuto come scopo la valutazione degli effetti del trattamento in vivo con HSV-1 sulla motilità intestinale degli animali trattati, mediante esperimenti di contrattilità su preparati di ileo, montati verticalmente in bagni per organo isolato.

L'infezione IG con HSV-1 ha determinato un aumento della risposta all'agonista muscarinico carbacolo ed al  $\text{CaCl}_2$  nell'ileo di ratti infettati da una e sei settimane. La contrazione indotta dal KCl e la risposta colinergica evocata dalla stimolazione elettrica a campo (EFS) sono risultate invece variate solamente dopo una-due settimane dalla somministrazione IG del virus. La liberazione di acetilcolina triziata in seguito a depolarizzazione dei segmenti con KCl è risultata ridotta dopo ad una e sei settimane dall'infezione, confermando che la presenza del virus nel SNE altera la trasmissione nervosa colinergica. Inoltre, gli esperimenti di EFS hanno evidenziato un aumento della risposta rilasciante non adrenergica non colinergica (NANC) ad una settimana, suggerendo che il virus modifica anche la neurotrasmissione inibitoria. I risultati ottenuti suggeriscono che HSV-1 modifica la risposta contrattile sia recettore-mediata che non- in maniera peculiare: nella prima fase dell'infezione il virus interagisce direttamente con il SNE, mentre nello stadio tardivo la variazione della contrattilità intestinale appare riconducibile ad un basso grado di infiammazione indotta dalla presenza del patogeno (Brun et al., 2010).

Lo studio della risposta recettore-mediata si è quindi focalizzato sull'effetto del trattamento in vivo sulla contrazione mediata dal sistema dell'adenosina, di cui è noto il ruolo nella

modulazione della motilità intestinale e della neurotrasmissione enterica. Anche in questo caso sono state evidenziate alterazioni funzionali dopo una e sei settimane dall'inoculo IG. Nell'ileo dei ratti infettati con HSV-1 è stata inoltre dimostrata una modificata espressione di ADA, enzima strettamente coinvolto nella fine regolazione dei livelli di adenosina, e dei recettori A1 ed A2a.

Il protocollo di infezione con il virus è stato quindi applicato a topi C57/Bl6 Wild Type (WT) ed a topi deficienti per il gene che codifica per il recettore Toll-like (TLR) 2, coinvolto nello sviluppo della risposta immunitaria innata contro i patogeni ed implicato nella produzione di citochine infiammatorie in risposta all'invasione di HSV-1. Sono state dunque indagate eventuali alterazioni della contrattilità intestinale imputabili alla delezione del gene e/o al trattamento in vivo con HSV-1. L'HSV-1 ha determinato nell'ileo evidenti variazioni della risposta recettore-mediata e non- sia nelle fasi iniziali che tardive dell'infezione. Inoltre, è stata dimostrato che anche nel topo l'infezione virale causa un'alterazione dell'eccitabilità neuronale e/o del rilascio di neurotrasmettitori a livello enterico. I risultati indicano altresì che i TLR2 rivestono un ruolo primario nella trasmissione neuromotoria enterica non solo durante l'infezione ma anche in condizioni fisiologiche.

Alla luce dei risultati ottenuti, il mio lavoro di ricerca evidenzia come l'infezione enterica da HSV-1 possa rappresentare un nuovo modello di alterazione della contrattilità intestinale per lo studio dei meccanismi base responsabili dell'insorgenza di DFGI ed, in particolare, nelle alterazioni motorie indotte dai virus neurotropi.



## SUMMARY

Functional gastrointestinal disorders (FGIDs) are common diseases in the general population, that range from life-threatening conditions to less severe but highly invalidating conditions (Talley, 2008). Although disturbances in gastrointestinal (GI) motility can occur as a result of a variety of factors, the damage to the functional and/or structural integrity of the enteric nervous system (ENS), plays a major role in FGIDs. (De Giorgio e Camilleri, 2004).

Infectious agents, such as neurotropic viruses, may be an important etiologic factor because of their ability to disrupt the integrity of the ENS, either directly or through immune-mediated mechanisms. *Herpes simplex virus* type 1 (HSV-1), a widespread neurotropic virus, when delivered intraluminally into mice, has been shown to affect the ENS and seems to be involved in the pathogenesis of FGIDs (Gesser and Koo, 1996). We have recently reported that, after intragastric (IG) administration, HSV-1 infects the ENS (De Giorgio et al., 2007).

The aim of this PhD research project was to evaluate the effect of HSV-1 infection on gut contractility following pharmacological/electrical stimulation of rat ileum segments, mounted vertically in organ baths.

A significant upward shift of the concentration-response curves to the muscarinic agonist, carbachol, and increased ileum contractions induced by  $\text{CaCl}_2$  were shown in ileum segments at 1 and 6 weeks (W) post IG infection (PI), whereas KCl-evoked contractions and neurally-mediated cholinergic responses to electric field stimulation (EFS) were significantly modified only at 1-2 W. KCl-evoked [ $^3\text{H}$ ]acetylcholine release was significantly reduced 1 and 6 W PI, further supporting the presence of an enteric cholinergic nerve dysfunction during viral infection. Nonadrenergic, noncholinergic (NANC; 20 Hz)-induced relaxation was significantly augmented at 1 W, which is indicative of an altered NANC inhibitory pathway during early HSV-1 infection. Our results suggest that HSV-1 infection in the ENS alters both receptor-mediated and nonreceptor-mediated responses of rat ileum in a complex mode since this virus directly invades the ENS and triggers a localized mild inflammatory reaction (Brun et al., 2010).

Considering the significant role of adenosine in regulating intestinal motility and influencing enteric neurotransmission, the effects of the virus were assessed on the mechanical responses of the rat small intestine to adenosinergic receptor stimulation. HSV-1 infection in rat ENS appears again to be associated with a compromised purinergic-control of ileum motility at 1 and 6 W PI. Western blotting and immunofluorescence experiments on whole mount preparations also revealed an alteration of adenosine deaminase expression and a modified distribution of A1 and A2a receptors, respectively.

Induction of inflammatory cytokines by HSV-1 is mediated by Toll-like receptor (TLR) 2, that plays a critical role in the early innate immune response to invading pathogens (Kurt-Jones et al., 2004; Kurt-Jones et al., 2005). To study the role of immune responses to HSV-1 in the

onset of intestinal dysmotility the infection protocol developed in rats was used in C57Bl/6 mice, since TLR2 knock out (KO) transgenic animals are available. Receptor-mediated and nonreceptor-mediated responses of ileum segments from wild type (WT) and KO mice were impaired in the early stages of infection as well as in the late study period. Moreover, an altered neuronal excitability and/or neurotransmitter release was shown in the infected gut. These results indicate that HSV-1 IG infection alters mouse small intestinal motility too and that the deletion of TLR2 gene leads to small bowel neuromuscular abnormalities, pointing out the involvement of innate immunity in intestinal motility, not only during HSV-1 infection but also under physiological conditions.

In conclusion, this PhD thesis highlights that HSV-1 infection in the ENS significantly affects gut motor function and appears to be a suitable model for studying the mechanisms responsible for the onset of FGIDs, especially when triggered by a neurotropic virus infection.

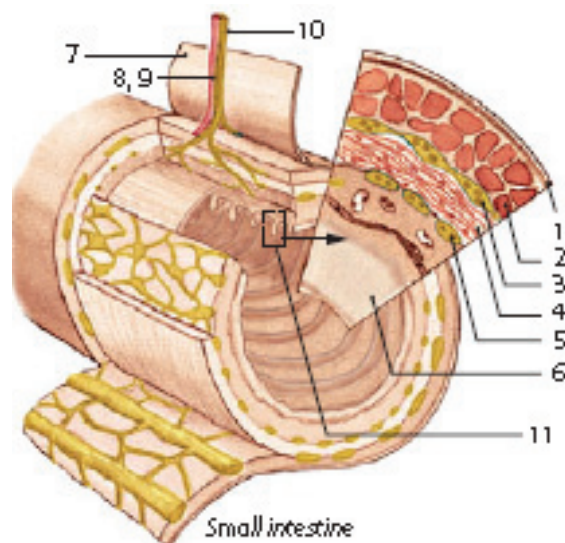
# INTRODUZIONE

I disordini funzionali dell'apparato gastrointestinale (DFGI) comprendono un gruppo eterogeneo di malattie croniche a forte impatto sociale, poichè presentano un'elevata prevalenza (tra il 10 e il 20% nella popolazione occidentale) e, pur non incidendo sulla sopravvivenza, determinano una riduzione significativa della qualità di vita dei pazienti che ne sono affetti (Chang, 2004; Jones et al., 2007; Talley, 1999; Talley, 2008). Per queste patologie negli otto paesi più industrializzati al mondo (Stati Uniti, Giappone, Germania, Francia, Regno Unito, Italia, Canada e Russia) si spendono ogni anno oltre 40 bilioni di dollari: ospedalizzazione, visite specialistiche, test diagnostici e trattamenti farmacologici costituiscono solo un terzo dei costi, dal momento che la principale spesa è dovuta alla ridotta capacità lavorativa dei pazienti (Quigley et al., 2006). La diagnosi è complessa e basata sulla valutazione della sintomatologia, non essendo disponibili specifiche analisi di laboratorio o strumentali (Talley, 1999; Costa 2007). I DFGI sono infatti caratterizzate da una combinazione di sintomi cronici e ricorrenti (dolore addominale, gonfiore, costipazione o diarrea), non riconducibili a specifiche alterazioni strutturali e/o biochimiche (Talley, 2008). La patofisiologia è multifattoriale ed ancora poco conosciuta; stress, fattori psicosociali, intolleranze alimentari, dieta a basso contenuto di fibre, esposizione a cure con antibiotici, precedenti episodi di gastroenterite acuta di origine infettiva e variabilità genetica sono fattori ricorrenti nei pazienti (Chang, 2004; Lea e Whorwell, 2002). In particolare, recenti studi hanno dimostrato che polimorfismi di geni che codificano per i trasportatori della serotonina (5HT), per i recettori  $\alpha_2$ -adrenergici e per le citochine (IL-6), TNF- $\alpha$ , IL-10) potrebbero influire sulla suscettibilità individuale alla sindrome dell'intestino irritabile (IBS), la più diffusa dei DFGI (Camilleri, 2009; Barkhordari et al., 2009).

È ormai ben noto che neuropatie del sistema nervoso enterico (SNE), caratterizzate da degenerazione e infiammazione neuronale, causano alterazioni motorie del tratto gastrointestinale (GI) (Di Nardo et al., 2008; De Giorgio et al., 2007; Camilleri, 2003). Negli ultimi anni studi sperimentali hanno inoltre evidenziato che spesso anomalie del SNE sono alla base di DFGI (De Giorgio e Camilleri, 2004).

Dal punto di vista anatomico, i neuroni del SNE sono organizzati in gangli nel plesso mienterico (o di Auerbach), situato tra la muscolatura longitudinale e quella circolare del tratto GI, e nel plesso sottomucoso (di Meissner), localizzato tra la muscolatura circolare e la muscolaris mucosa (Figura 1). Il SNE presenta importanti connessioni con il sistema nervoso autonomo e, tramite quest'ultimo, comunica con il sistema nervoso centrale (SNC) (Schemann e Neunlist, 2004). Il SNE, definito anche il "cervello dell'intestino", occupa un ruolo centrale nella fisiologia e nella patofisiologia del tratto digerente: disfunzioni del SNE sono in grado non solo di determinare variazioni motorie, secretorie ed insorgenza

d'infiammazione intestinale (Goyal e Hirano, 1996), ma anche un'alterata percezione sensoriale e nocicettiva della normale attività motoria (Wingate et al., 2002; De Giorgio et al., 2004; De Giorgio e Camilleri, 2004).



**Figura 1:** Anatomia dell'intestino tenue: (1) tonaca sierosa, (2) muscolatura longitudinale, (3) plesso mienterico, (4) muscolatura circolare, (5) plesso sottomucoso, (6) tonaca mucosa, (7) mesentere, (8) vasi sanguigni, (9) vasi linfatici, (10) nervi, (11) pliche di Kerckring (Despopoulos e Silbernagl, 2003).

Il ritrovamento di infiltrati linfocitari nel plesso mienterico di pazienti affetti da DFGI ha suggerito come possibile eziologia di queste malattie una reazione immuno-mediata dell'ospite ad agenti infettivi. In particolare, un'infezione da parte di virus neurotropi comunemente diffusi, come l'*Herpes simplex virus* di tipo 1 (HSV-1) e il polioma virus JC a livello del SNE, risulta coinvolta nel determinare anomalie della contrattilità muscolare e della peristalsi GI (Facco et al., 2008; Selgrad et al., 2008).

La terapia farmacologica dei DFGI è palliativa, principalmente rivolta alla cura dei sintomi più fastidiosi e debilitanti. Vengono infatti somministrati antispastici, modulatori della sensibilità viscerale, lassativi e procinetici (Paoletti et al., 1999; Camilleri e Andresen 2009). Attualmente i farmaci agonisti ed antagonisti dei recettori per la 5HT sono gli unici approvati per la terapia della sindrome dell'IBS, solamente dall'FDA, prescritti quando la sintomatologia è grave e sotto stretto controllo medico, a causa dei loro numerosi effetti collaterali (Mayer et al., 2008).

La difficoltà di determinare l'eziologia di queste malattie può essere in parte superata con la messa a punto di modelli animali sperimentali in grado di mimare le alterazioni che si verificano nei DFGI, allo scopo di individuare nuovi bersagli farmacologici, necessari per lo sviluppo di farmaci innovativi (Mayer e Collins, 2002).

## ***Infezione enterica da Herpes simplex virus-1: un nuovo modello di alterazione della motilità intestinale***

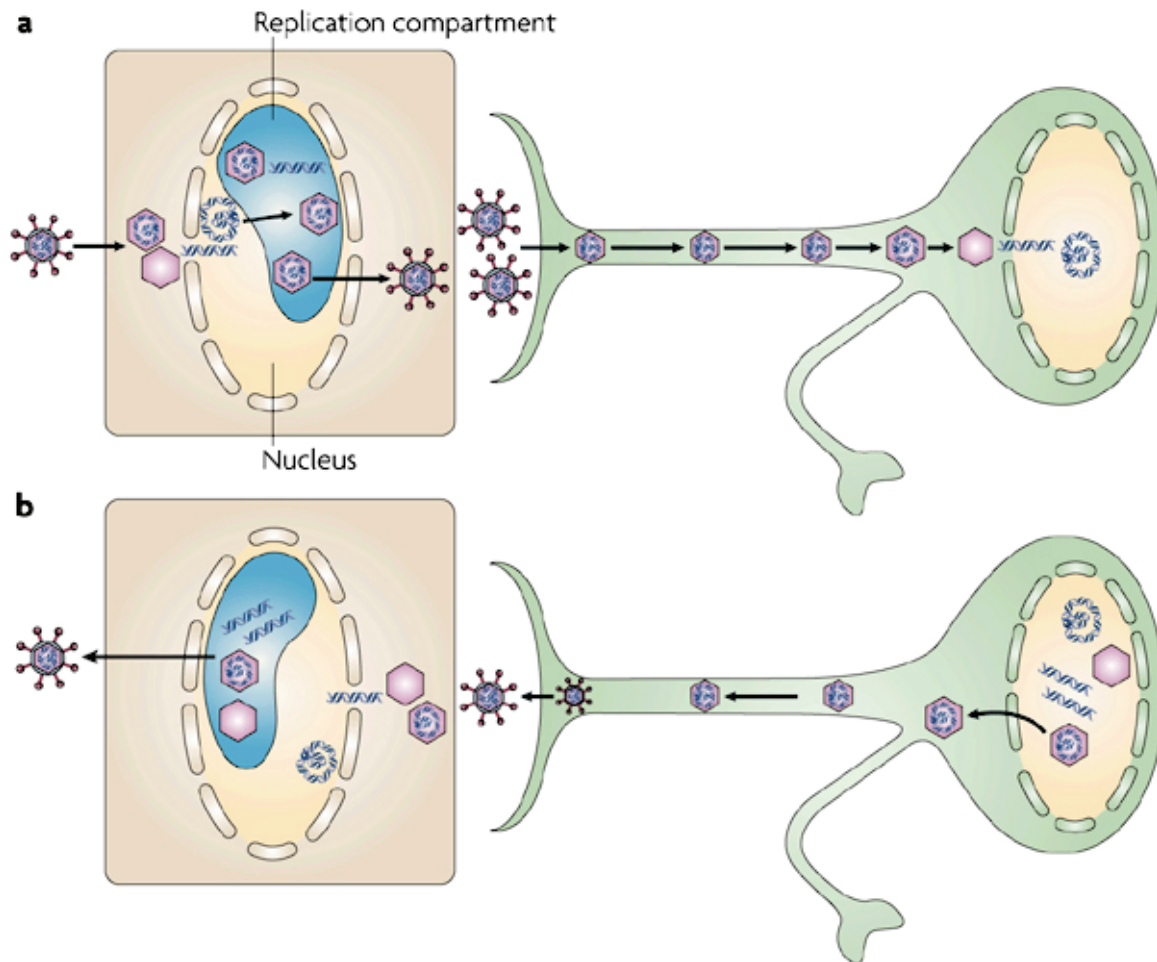
I modelli animali di DFGI attualmente utilizzati in campo sperimentale si possono suddividere in due categorie: quelli basati su fattori stressogeni del SNC (stress psicosociale neonatale, stress post traumatico) e modelli ottenuti mediante danno diretto del tratto digerente, come la gastrectomia (Gokoz et al., 2004) o la legatura della valvola ileo-cecale, al fine di indurre peritonite (Kaya et al., 2002). Altri modelli animali per lo studio delle alterazioni della motilità sono quelli che impiegano agenti irritanti per la parete enterica, quali l'acido trinitrobenzensulfonico (TNBS; Moreels et al., 2001) e l'acido 2,4-dinitrobenzensolfonico (DNBS; Antonioli et al., 2007), parassiti come lo *Schistosoma mansoni* (Moreels et al., 2000), e la *Trichinella spiralis* (Venkova et al., 1999). A tutt'oggi non sono ancora stati sviluppati modelli basati su patogeni più comuni.

L'HSV-1 colpisce circa un terzo della popolazione mondiale, presenta uno spiccato neurotropismo ed è in grado di stabilirsi allo stato di latenza nei neuroni che innervano il sito dell'infezione primaria e di persistere nell'organismo dell'ospite per tutta la durata della vita (Novak e Peng, 2005). L'HSV-1 viene trasmesso principalmente mediante il liquido infetto delle lesioni vescicolari e attraverso la saliva; tale modalità di trasmissione è la causa di ampia e facile diffusione di questa infezione tra gli individui (Chesler e Shoshkes Reiss, 2002). La replicazione virale avviene, nel caso di HSV-1 contratto per via salivare, a livello della mucosa orale. Da questa il virus accede alle terminazioni dei nervi sensori e raggiunge il ganglio del trigemino mediante trasporto retrogrado assonico, dove stabilisce lo stato di latenza. Durante la riattivazione il virus subisce una seconda replicazione, seguita da un trasporto di tipo anterogrado verso il sito periferico, in genere lo stesso in cui è avvenuta l'infezione primaria (Koelle e Corey, 2003; Figura 2).

Lo stato di latenza è caratterizzato, innanzitutto, dalla mancata espressione dei geni precoci del virus, definiti anche "immediate early genes" (IE), per cui il processo di replicazione risulta inibito (Efstathiou e Preston, 2005). La caratteristica peculiare associata alla latenza è, tuttavia, la deficitaria trascrizione che si verifica in questo stato; i trascritti LAT (Latency Associated Transcripts) sono gli unici mRNA prodotti dall'HSV-1 durante il periodo di quiescenza (Rozenberg, 2002), che non sembrano però tradursi in prodotti proteici (Mador et al., 2002).

L'ipotesi che HSV-1 potesse infettare i tessuti del tratto GI è nata alla fine degli anni settanta, quando alcuni lavori hanno messo in luce l'affinità tra ulcera peptica ed infezione erpetica: entrambe provocano, infatti, lesioni che si verificano nell'intersezione tra due diversi tipi di epitelio (Price e Notkins, 1975; Borg e Andren, 1980; Waldum et al., 1981). Entrambe, inoltre, si manifestano in modo ricorrente nello stesso sito e la loro riacutizzazione avviene prevalentemente in autunno e primavera (Borg e Andren, 1980). Infine, le vescicole

febrili sulle labbra, narici e bulbo oculare si manifestano in seguito alla riattivazione del virus, presente allo stato di latenza nei gangli del trigemino, dal momento che il taglio chirurgico di tale nervo ne previene la riattivazione. La vagotomia, inoltre, può essere utilizzata come trattamento per prevenire la ricorrenza dell'ulcera peptica (Warren et al., 1978).



**Figura 2:** Ciclo infettivo dell'HSV-1 nell'uomo. **a:** infezione primaria, replicazione periferica, trasporto assonale della capside virale verso il nucleo, persistenza del DNA virale nel nucleo dove il virus si stabilisce allo stato di latenza. **b:** riattivazione, trasporto del virus lungo l'assone verso i siti periferici, recrudescenza (da: [www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n3/fig\\_tab/nrmicro1794\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n3/fig_tab/nrmicro1794_F1.html)).

Nel 1990 Lohr e collaboratori hanno dimostrato la presenza del virus nelle cellule attigue alle lesioni ulcerose a livello gastrico. I risultati ottenuti da Lohr sono stati successivamente confermati nel 2005 da Tsamakidis e collaboratori in una più ampia coorte di pazienti, evidenziando la presenza di DNA virale appartenente a HSV-1 nel bordo e alla base delle ulcere non solo gastriche, ma anche duodenali. I campioni di mucosa prelevati nelle aree limitrofe all'ulcera, provenienti sia da pazienti che da controlli sani, sono risultati privi del genoma virale (Tsamakidis et al., 2005).

Gesser e Koo (1996), inoculando HSV-1 nel lume esofageo del topo, hanno osservato che l'infezione, diffondendosi tramite il nervo vago, è in grado di raggiungere la superficie della

mucosa intestinale tramite le fibre del SNE, a dimostrazione che il virus, oltre ad infettare le terminazioni nervose, può penetrare nella lamina propria e nella mucosa gastroduodenale, interagendo direttamente con le cellule epiteliali. Prima del 1996, l'HSV-1 non era mai stato considerato un possibile agente patogeno a livello intestinale, ma i risultati di questo studio hanno sollevato l'ipotesi di un possibile coinvolgimento dell'HSV-1 nelle disfunzioni infiammatorie e funzionali del tratto GI (Gesser e Koo, 1996).

Nel 2004 Castagliuolo e collaboratori hanno proposto il coinvolgimento di HSV-1 nell'acalasia, un disordine motorio caratterizzato dall'assenza di peristalsi dell'esofago e dall'incompleto rilassamento dello sfintere esofageo inferiore. L'acalasia è il risultato di un processo infiammatorio cronico del plesso mienterico: neuriti e ganglioniti sono evidenti nel primo stadio della malattia e causano fibrosi, oltre ad una progressiva degenerazione delle cellule gangliari. Recentemente è stato dimostrato che cellule mononucleate prelevate dal plesso mienterico di pazienti affetti da acalasia risultano reattive all'HSV-1 (Castagliuolo et al., 2004; Facco et al., 2008).

Considerata l'elevata diffusione del virus nella popolazione e la sua capacità nell'infettare il SNE (Gesser e Koo, 1996; Gesser e Koo, 1997) è possibile presupporre che l'infezione intestinale con HSV-1 possa rappresentare un nuovo modello animale per lo studio delle alterazioni contrattili a livello intestinale.

Nei laboratori del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche della nostra Università è stato allestito un modello di infezione enterica da HSV-1 nel ratto mediante un protocollo che prevede una prima instillazione attraverso la via intranasale (IN) ed un secondo inoculo eseguito per via intragastrica (IG), al fine di mimare il processo di infezione che potrebbe avvenire nell'uomo in seguito a deglutizione di particelle virali provenienti dalle lesioni erpetiche. Tale infezione non determina né una significativa mortalità, né anomalie macroscopiche del tratto GI dal punto di vista sia clinico che istopatologico. Nei tre mesi successivi al trattamento è stata evidenziata la presenza del DNA di HSV-1 timidina chinasi (tk), proteina marker del virus, sia nel SNC che nel SNE degli animali. Non è stata ottenuta alcuna evidenza della presenza di HSV-1 nel SNE dei ratti esposti al virus soltanto per via IN. La presenza di mRNA di LATs dell'HSV-1 è stata dimostrata nel cervello di ratti dopo inoculo IN e nei gangli mienterici (GM) isolati fino a dieci settimane dall'inoculo IG. Al contrario, l'mRNA di trascritti tk e di geni precoci ICP4, ma non di quelli tardivi, come gD e VP16, è stata rilevata nei GM solo nelle prime due settimane dall'inoculo IG, ad indicare un'infezione latente nel SNE e probabilmente un inizio di replicazione che poi risulta di tipo abortivo (Brun et al., 2010).

Sebbene l'esame istologico di fettine di intestino di ratti controllo e trattati con HSV-1 non abbia evidenziato danni infiammatori né siano state rilevate alterazioni nell'attività della mieloperossidasi nello strato neuromuscolare, è stato osservato un incremento significativo e tempo-dipendente di IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Inoltre, sei settimane dopo l'inoculo IG è stata

rilevata la presenza di cellule CD3+ adiacenti ai GM (Brun et al., 2010). Ad una, due, sei settimane dall'infezione è stato inoltre dimostrato un aumento del transito intestinale in vivo (Brun et al., 2010).

Dal momento che, per poter utilizzare animali transgenici è preferibile il topo, il medesimo protocollo di infezione con il virus è stato recentemente applicato a topi C57/Bl6 WT e deficienti per il gene che codifica per i recettori Toll-like (TLR) 2, recettori coinvolti nella risposta immunitaria innata, al fine di valutare il ruolo della risposta immunitaria all'HSV-1 nell'eventuale alterazione della motilità intestinale. Nel cervello e nell'ileo degli animali trattati con il doppio inoculo è stata dimostrata la presenza di HSV-1 assieme all'assenza di anomalie macroscopiche nel tratto GI (Zoppellaro et al., 2009).

### ***Il sistema dell'adenosina nel tratto GI: potenziale bersaglio terapeutico nel trattamento di DFGI***

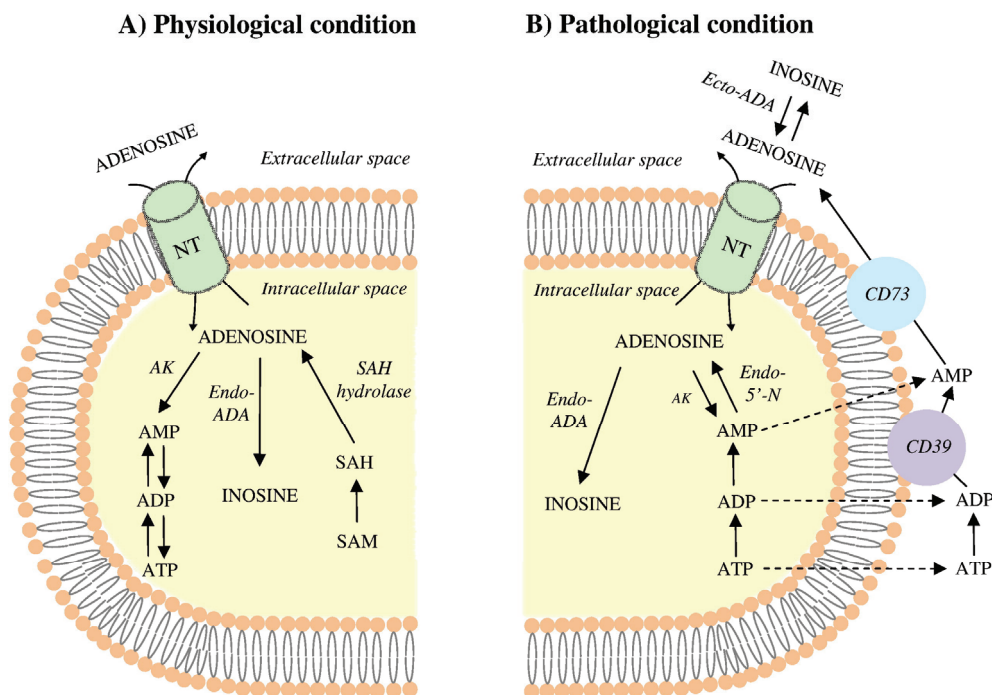
È ormai noto il ruolo dei nucleosidi e nucleotidi purinici nelle funzioni di tipo motorio e secretorio del tratto GI. Gli adenin nucleotidi/nucleosidi (adenosina, AMP, ADP e ATP) esercitano diversi effetti biologici mediante l'interazione con recettori situati sulla membrana plasmatica cellulare, chiamati purinocettori, la cui esistenza è stata proposta da Burnstock nel 1978. I purinocettori sono stati suddivisi in due principali famiglie: i recettori adenosinici o recettori P1 e i recettori P2, a elevata affinità per ATP e ADP (Burnstock, 2006).

L'adenosina non è un neurotrasmettitore classico, è piuttosto un autacoide, dal momento che non è ancora stato chiaramente dimostrato se viene immagazzinata e rilasciata da vescicole presinaptiche (Akkari et al., 2006; Ren e Bertrand, 2008). Le azioni fisiologiche dell'adenosina a livello extracellulare dipendono dalla sua concentrazione a livello recettoriale, regolata direttamente dai processi di produzione, rilascio, captazione e metabolismo (Thorn e Jarvis, 1996; Akkari et al., 2006; Bours et al., 2006). In seguito ad un insulto quale ischemia, ipossia, trauma, infiammazione, la concentrazione extracellulare di adenosina può raggiungere concentrazioni micromolari, cento volte superiori a quelle fisiologiche (Thorn Jarvis, 1997; Akkari et al., 2006; Bours et al., 2006).

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 defosforilazione del nucleotide adeninico AMP, catalizzata da 5'nucleotidasi citosoliche. Una volta formatasi, l'adenosina può diffondere attraverso la membrana plasmatica con un meccanismo di diffusione facilitata che implica l'intervento di trasportatori equilibrativi bidirezionali e che favorisce l'equilibrio tra le concentrazioni intra- ed extracellulari della purina. I livelli del nucleoside nello spazio interstiziale dipendono anche dalla presenza di trasportatori concentrativi, un sistema energia-dipendente attraverso il quale il trasferimento della purina all'interno della cellula è associato al trasporto di ioni Na<sup>+</sup>. Nel compartimento intracellulare la



concentrazione dell'adenosina è sottoposta ad 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 ed alla fosforilazione del nucleoside ad AMP, dall'altra dalla S-adenosilomocisteina idrolasi e dalla 5'-nucleotidasi. La presenza di ADA e di 5'-nucleotidasi è stata dimostrata anche sulla superficie cellulare (ecto-ADA e ecto-5'-nucleotidasi o CD73).



**Figura 3:** Sintesi e catabolismo dell'adenosina in condizioni fisiologiche e patologiche. S-adenosilomocisteina (SAH), S-adenosilomocisteina idrolasi (SAH hydrolase), trasportatori nucleosidici (NT), adenosina chinasi (AK), adenosina deaminasi (ADA), ecto-apirasi (CD39), ecto-5'-nucleotidasi (CD73), Endo-5'-nucleotidasi (Endo-5'-N), S-adenosilmetionina (SAM). (Antonioli et al., 2008).

I recettori P1 sono suddivisi in quattro sottotipi denominati A1, A2a, A2b, A3, tutti accoppiati a proteine G e caratterizzati da una specifica struttura molecolare, distribuzione tissutale e profili farmacologici (Kolachala et al., 2008a). I P1 ad alta affinità (A1 e A2a) sono attivati da basse concentrazioni di nucleoside (nanomolari, fisiologiche), mentre quelli a bassa affinità (A2b) richiedono concentrazioni micromolari (patologiche) di adenosina per la loro attivazione. Anche i recettori A3 sono definiti a bassa affinità, data la loro ridotta densità (Kolachala et al., 2008a).

A1 e A2a sono abbondantemente espressi a livello del SNE, possono coesistere nella stessa terminazione nervosa, come dimostrato nel plesso mienterico dell'ileo di ratto, e la loro attivazione controlla il rilascio di neurotrasmettitori. I recettori A1 sono definiti inibitori mentre gli A2a facilitatori (Kolachala et al., 2007). I recettori A1 situati sulle terminazioni nervose colinergiche che innervano la muscolatura liscia sono in grado di ridurre il rilascio di

acetilcolina, principale neurotrasmettitore eccitatorio a livello GI, regolando così la motilità intestinale. Al contrario, i recettori A2a espressi nei neuroni enterici di digiuno, ileo e cieco facilitano la liberazione di questo neurotrasmettitore (Duarte-Araujo et al., 2004; Vieira et al., 2009). Gli A2b pur essendo espressi in misura minore rispetto agli altri recettori P1 nella muscolatura liscia longitudinale, mediano la risposta rilasciante nel colon distale (Bailey e Hourani, 1992, Fozard et al., 2003) e nel duodeno di ratto (Nicholls et al., 1996). A livello del tratto digerente, A3 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).

Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato che l'adenosina induce una risposta di tipo rilasciante su preparati di intestino (Gaion et al., 1988; Nicholls et al., 1992; Gurden et al., 1993; Coupar, 1999; Kadowaki et al., 2000; Zizzo et al., 2006). La stimolazione dei recettori P1 con agonisti induce contrazione della muscolaris mucosae di ileo, colon e duodeno di ratto senza coinvolgere la componente colinergica neuronale (Bailey e Hourani, 1990; Bailey et al., 1992; Reeves et al., 1993; Reeves et al., 1995; Nicholls et al., 1996; Nicholls e Hourani, 1997).

Sebbene il ruolo dell'adenosina nella modulazione della motilità GI sia stato ampiamente dimostrato, gli studi riguardanti la trasmissione purinergica intestinale in condizioni patologiche non risultano numerosi. Alterazioni del sistema purinergico sono state comunque evidenziate in caso di ulcera gastrica, ischemia intestinale e tumore del colon (Burnstock, 2006).

In ratti trattati con DNBS per via intraperitoneale è stato evidenziato il ruolo dei recettori A1 e A2a nelle alterazioni neoplastiche del colon riconducibili allo stato di infiammazione enterica (Antonioli et al., 2006; Fornai et al., 2008). Nello stesso modello è stato dimostrato che, inibendo farmacologicamente in vivo l'ADA, si può osservare una riduzione delle alterazioni indotte dal DNBS (Antonioli et al., 2007). La somministrazione di ATL313, agonista dei recettori A2a, è risultata in grado di diminuire i danni e il grado di infiammazione indotta nei topi mediante trattamento con la tossina A del Clostridium Difficile (Cavalcante et al., 2006). Nei topi con peritonite da Escherichia Coli è stato inoltre osservato un aumento dei livelli di adenosina nel peritoneo, oltre ad una alterata espressione di A1, A2a, A2b nelle cellule mesoteliali dello stesso tratto (Rogachev et al., 2006). Recentemente è stato dimostrato nel topo che la somministrazione in vivo di ATL-801, antagonista selettivo del recettore A2b è efficace nel ridurre le alterazioni indotte dalla colite e che la delezione del gene che codifica per A2b riduce l'infiammazione del colon causata sia da agenti irritanti (DSS (destrano solfato di sodio) e TNBS) che da Salmonella typhimurium (Kolachala et al., 2008b; Kolachala et al., 2008c).

Variazioni nell'espressione e nell'attività sia dei recettori dell'adenosina che degli enzimi coinvolti nel metabolismo del nucleoside sono stati fino ad oggi dimostrati esclusivamente in modelli animali di infiammazione enterica indotta. D'altra parte, uno stato di flogosi a livello

della mucosa del tratto GI determina evidenti alterazioni delle funzioni motorie, secretorie e sensoriali, come conseguenza di gravi danni che si verificano, in particolare a carico del SNE (Antonioli et al., 2008).

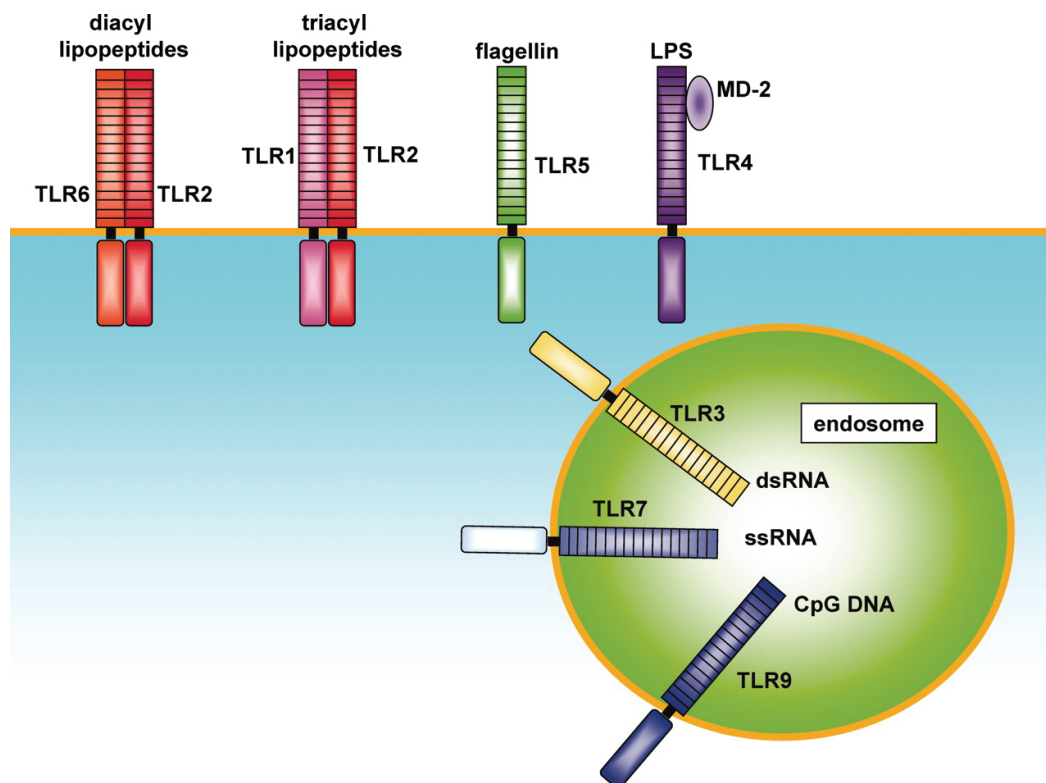
I recettori adenosinici non sono solamente espressi nel tessuto muscolare e nervoso, ma anche sulle cellule immunitarie (Kolachala et al., 2008a). Infatti, appare fondamentale il loro coinvolgimento nella modulazione della risposta infiammatoria, come dimostrato da numerosi studi che propongono l'adenosina ed i suoi analoghi come farmaci nel trattamento di patologie croniche quali l'artrite e l'asma. I ligandi dei recettori dell'adenosina sono inoltre in grado di regolare i livelli di citochine pro- ed anti-infiammatorie, come ad esempio il TNF- $\alpha$  e l'IL-10 (Kaiser e Quinn, 1999).

I recenti progressi compiuti dalla ricerca nella conoscenza dei meccanismi molecolari di patologie a carico del tratto GI hanno quindi dimostrato il coinvolgimento del sistema dell'adenosina nelle patologie infiammatorie enteriche e/o post-infettive indicandolo come un nuovo potenziale bersaglio farmacologico nel trattamento dei DFGI (Antonioli et al., 2007; Cavalcante et al., 2006; Fornai et al., 2008).

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

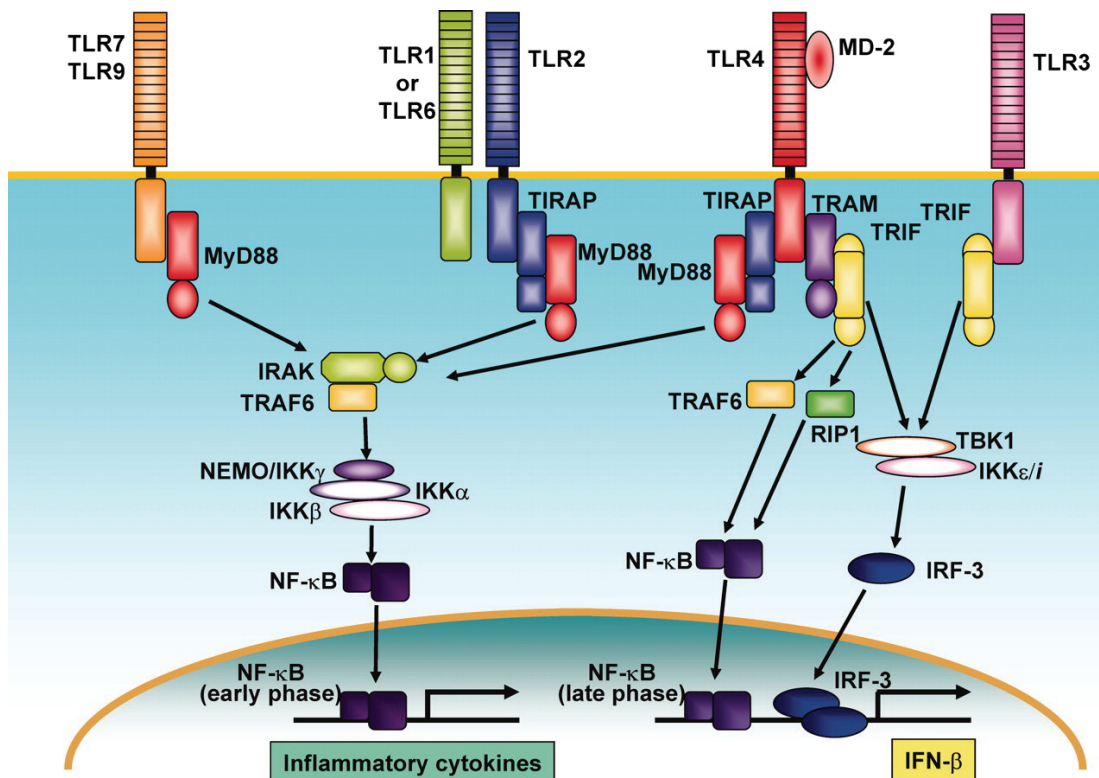
Nei mammiferi il sistema immunitario si divide in due componenti principali: quella innata e quella adattativa. Il sistema immunitario adattativo, peculiare dei vertebrati, richiede una precedente esposizione al patogeno, ha la funzione di identificare ed attaccare gli antigeni in maniera altamente specifica, richiede 7-10 giorni per essere attivato ed è in grado di ricordare e riconoscere a distanza di tempo l'organismo invasore. Al contrario, la risposta immunitaria innata non necessita di una precedente esposizione all'antigene e si sviluppa nell'arco di minuti o, al massimo, di qualche ora. L'immunità innata è stata considerata a lungo aspecifica, dal momento che è caratterizzata dall'inglobamento dei microrganismi da parte dei macrofagi. Negli anni più recenti si è scoperto però che il sistema immunitario innato è regolato dai TLR, che conferiscono un'elevata specificità nell'identificazione di una vasta gamma di patogeni, consentendo una risposta immediata ed efficace (Testro e Visvanathan, 2009).

I TLR prendono il nome dalla proteina di *Drosophila* chiamata Toll, della quale sono omologhi (Hausmann et al., 2002) ed appartengono ad un gruppo di recettori in grado di riconoscere componenti molecolari proprie dei patogeni (PAMP), presenti sulla superficie di un'ampia gamma di microrganismi esogeni e della flora batterica intestinale (Michelsen e Arditi, 2007; Figura 4). I TLR sono attivati anche da segnali endogeni di danno tissutale come il fibrinogeno, DNA endogeno, acido urico, eparan solfato (Gribar et al., 2008).



**Figura 4** Riconoscimento delle componenti molecolari dei patogeni, presenti sulla superficie dei microrganismi esogeni, da parte dei TLR (Takeda e Akira, 2005).

Attualmente sono stati identificati undici tipi di TLR nell'uomo e tredici nel topo, classificati in base al tipo di PAMP che sono in grado di riconoscere (Kawai e Akira, 2007). La famiglia dei TLR comprende recettori localizzati sia sulla superficie cellulare (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) che a livello intracellulare (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9), tutti caratterizzati da un dominio costituito da regioni ricche di leucina, responsabile del riconoscimento dei PAMP, ed un dominio definito TIR (Toll/IL-1 receptor), poichè presenta omologia con la famiglia dei recettori per l'IL-1 (Shibolet e Podolsky, 2007), fondamentale per la trasmissione del segnale (Cario, 2008). Il contatto con il ligando attiva due possibili vie di trasmissione del segnale, finalizzate all'induzione dei geni che codificano per citochine infiammatorie quali TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12. La prima via è innescata dall'interazione della proteina MyD88 con i recettori di tipo 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 9, mentre il TLR3 attiva una via MyD88 indipendente. Il TLR4 è il solo recettore conosciuto che attiva entrambe le vie (Shibolet e Podolsky, 2007; Figura 5). Nel tratto GI, i TLR sono inducibili o costitutivamente espressi in diversi tipi di cellule: cellule epiteliali, miofibroblasti, cellule enteroendocrine e cellule immunitarie della lamina propria, come ad esempio le cellule T e le cellule dendritiche (Cario, 2008). La distribuzione dei TLR sull'epitelio intestinale è particolarmente complessa, al fine di evitare un'eccessiva stimolazione recettoriale, dal momento che alcune regioni del tratto GI sono continuamente a contatto con la flora batterica (Gribar et al., 2008). Inoltre l'attivazione dei TLR è finemente regolata da meccanismi inibitori (Shibolet e Podolsky, 2007).



**Figura 5:** Vie di trasmissione del segnale di alcuni TLR (Takeda e Akira, 2005).

In condizioni fisiologiche il tratto GI presenta tolleranza immunitaria nei confronti dei microorganismi saprofiti, ma mantiene la capacità di organizzare una risposta efficace all'invasione dei patogeni. Nella malattia infiammatoria intestinale (IBD), ad esempio, questa omeostasi è alterata e si scatena una risposta immunitaria contro i batteri saprofiti, provocando uno stato di infiammazione cronica. Queste risposte non corrette, insieme ad una predisposizione genetica, contribuiscono alla patogenesi dell'IBD (Michelsen e Arditi, 2007). Alla luce di queste considerazioni numerosi studi hanno avuto come obiettivo l'approfondimento della distribuzione e del ruolo dei TLR nella mucosa enterica sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Hausmann et al., 2002; Tohno et al., 2006; Alvarez et al., 2008; Gribar et al., 2008; Gibson et al., 2008)

In un modello di colite necrotizzante indotta in ratti neonati è stato osservato un aumento dell'espressione di tutti i TLR (tranne il TLR5, che era invece risultato ridotto) nell'ileo. In particolare, la variazione più evidente riguardava i TLR2 (Liu et al., 2009). Altri studi condotti su modelli animali di colite hanno confermato che il TLR2 svolge un ruolo critico nel mantenimento dell'integrità della mucosa (Cario et al., 2007; Gibson et al., 2008). Nei pazienti con infiammazione enterica è stato dimostrato un aumento dell'espressione di TLR2 e TLR4 nella mucosa intestinale e di TLR2, 4, 5 nei macrofagi estratti dalla lamina propria (Hausmann et al., 2002; Frolova et al., 2008). Un recente studio ha dimostrato che l'esposizione a LPS, ligando dei TLR4, induce alterazioni contrattili in cellule muscolari umane isolate dal colon, suggerendo che l'attivazione dei TLR4 possa essere direttamente coinvolta nelle variazioni della contrattilità osservate (Scirocco et al., 2010).

È stato anche provato che i TLR sono implicati nella patogenesi di molti disordini a carico dell'apparato GI: l'infezione con *Helicobacter pylori*, la celiachia, la pancreatite, il danno da ischemia-riperfusion, l'epatite, la cirrosi, la fibrosi epatica, il cancro (Shibolet e Podolsky, 2007; Testro e Visvanathan, 2009). Per quanto riguarda il ruolo dei recettori TLR nell'IBS fino ad ora sono stati pubblicati solamente due lavori (Wang e Liu, 2008; Foell et al., 2008).

Dal momento che alterazioni dei TLR sembrano giocare un ruolo essenziale nella patogenesi dell'infiammazione intestinale, i TLR appaiono un bersaglio valido per lo sviluppo di terapie innovative. Tuttavia i risultati ottenuti da studi di somministrazione in vivo di agonisti ed antagonisti dei TLR, condotti su diversi modelli murini di colite, sono contraddittori. Anche se in molti casi l'attivazione, l'inibizione o la modulazione dei recettori ha migliorato lo stato di malattia, è stata evidenziata l'insorgenza di effetti avversi. Considerando però i notevoli successi ottenuti negli ultimi anni nello studio di questi recettori si può comunque prevedere ed auspicare una rapida svolta per una concreta applicazione dei modulatori dei TLR nelle malattie del tratto GI (Cario, 2008).

## METODI

Gli esperimenti su preparati di ileo sono stati condotti in vitro, utilizzando bagni per organi isolati della capacità di 10 ml. I bagni contenevano al loro interno soluzione fisiologica Tyrode o Krebs (la cui composizione è riportata in Tabella 1) utilizzate rispettivamente per gli esperimenti con intestino di ratto e di topo.

|   | TYRODE  | TYRODE<br>DEPOLARIZZANTE<br>SENZA CALCIO | TYRODE<br>DEPOLARIZZANTE | KREBS    |
|---|---------|--|--------------------------|----------|
| NaCl  | 136 mM  | 60 mM                                    | 78,7 mM                  | 118 mM   |
| KCl   | 2,7 mM  | 60 mM                                    | 60 mM                    | 4,7 mM   |
| CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O                | 1,4 mM  | —  | 1,4 mM                   | 2,5 mM   |
| MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O                | 0,49 mM | 0,49 mM                                  | 0,49 mM                  | —        |
| MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | —       | —  | —                        | 1,19 mM  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O | 0,32 mM | 0,32 mM                                  | 0,32 mM                  | —        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | —       | —  | —                        | 1,197 mM |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 12 mM   | 12 mM                                    | 12 mM                    | 24,99 mM |
| D(+)-Glucosio<br>Anidro                             | 5 mM    | 5 mM                                     | 5 mM                     | 11,1 mM  |

**Tabella 1:** Composizione delle soluzioni fisiologiche utilizzate per gli esperimenti con organo isolato.

Tale soluzione è stata mantenuta alla temperatura costante di 37°C grazie ad un termostato di circolazione (Julabo, Germania); il preparato, inoltre, è stato costantemente ossigenato con una miscela di O<sub>2</sub> al 95% e CO<sub>2</sub> al 5%. Queste condizioni sperimentali sono le più appropriate per garantire la sopravvivenza del tessuto per tutta la durata dell'esperimento.

La tensione sviluppata dai preparati è stata misurata con l'ausilio di trasduttori isometrici (WPI, USA) che trasmettono il segnale al sistema di acquisizione dati PowerLab (ADInstruments, UK) che a sua volta lo converte da analogico in digitale. Il segnale è stato quindi visualizzato ed elaborato grazie al programma LabChart 6.0 (ADInstruments, UK), installato nel computer a cui il PowerLab è connesso.

Dopo aver applicato agli organi una tensione pari ad 1 grammo, i preparati di ratto sono stati lasciati equilibrare per 45 minuti, lavandoli ogni 15 minuti, mentre i segmenti di topo sono stati stabilizzati per 40 minuti, sostituendo la soluzione fisiologica ogni 10 minuti. Prima dell'inizio dell'esperimento i segmenti sono stati esposti per tre volte a carbacolo 1 µM, al fine di valutarne la vitalità.

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

Il modello animale di infezione da HSV-1 è stato allestito in ratti maschi Wistar di età pari a 8 mesi ed in topi maschi wild type (WT) o deficienti del gene codificante per il recettore TLR2 (TLR2 KO) di età pari a 3 mesi, mantenuti presso lo stabulario del Dipartimento di Anatomia e Fisiologia dell'Università di Padova.

Gli animali, sono stati inoculati per IN con  $10^3$  p.f.u. di HSV-1: la soluzione virale è stata depositata, mediante la punta di una pipetta, direttamente nella narice dell'animale ed assorbita interamente per aspirazione. Dopo un periodo di quattro settimane gli animali sopravvissuti all'inoculo IN, sono stati sottoposti ad una seconda somministrazione di  $10^8$  p.f.u. di HSV-1, condotta in questo caso per via IG con l'impiego di un ago bottonuto. Dopo 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane dal secondo inoculo sono stati sacrificati. Animali controllo inoculati con cellule Vero, sono stati inoltre utilizzati agli stessi tempi, allo scopo di determinare se la procedura di somministrazione del virus potesse indurre eventuali alterazioni.

### ***Procedura sperimentale***

I preparati di ileo di ratto mantenuti in soluzione Tyrode (Tabella 1) sono stati esposti a concentrazioni crescenti di carbacolo (0,01 – 100  $\mu$ M), KCl (3 – 80 mM), 5HT (0,1 – 50  $\mu$ M), adenosina (0,1-1,25 mM), R(-)-N6-(2-fenilisopropil)adenosina (R-PIA; 0,1-15  $\mu$ M), aggiunti in volumi opportuni così da ottenere, all'interno dei bagni, concentrazioni crescenti in modo cumulativo. La risposta all'adenosina 1,25 mM è stata valutata in presenza ed in assenza di 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) 10 nM e ZM 241385 10 nM. È stato saggiato inoltre l'effetto contratturante della 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina (CCPA) 10 nM e del CGS 21680 10 nM, agonisti selettivi rispettivamente dei recettori per l'adenosina A1 ed A2a.

Per valutare la risposta al  $\text{CaCl}_2$  5 mM, prima e dopo il pretrattamento con verapamile 0,1  $\mu$ M, i segmenti sono stati incubati in Tyrode depolarizzante senza calcio (Tabella 1).

I preparati di topo mantenuti in soluzione fisiologica Krebs (Tabella 1) sono stati esposti a carbacolo (0,01 a 3  $\mu$ M), KCl 60 mM, 5HT 3  $\mu$ M e sostanza P (SP) 3  $\mu$ M.

Gli esperimenti di stimolazione elettrica a campo (Electric Field Stimulation, EFS) sono stati condotti con l'ausilio di elettrodi di platino collegati ad uno stimolatore Grass S88 e posti parallelamente ai preparati all'interno dei bagni per organo isolato. Lo stimolo (applicato a 60 e 40V rispettivamente nei segmenti di ratto e topo) è costituito da un treno di 10 secondi di impulsi rettangolari della durata di 1 millisecondo. L'effetto contratturante di frequenze di stimolazione nell'intervallo da 2 a 40 Hz è stato valutato in presenza e in assenza di tetrodotossina (TTX) 1  $\mu$ M e di atropina 1  $\mu$ M. L'effetto contratturante della frequenza di stimolazione a 20 Hz è stato inoltre misurato in seguito a pretrattamento con atropina 1  $\mu$ M e guanetidina 3  $\mu$ M, in presenza ed in assenza di  $\text{N}_\omega$ -nitro-L-arginina metil estere cloridrato (L-



NAME) 100  $\mu$ M. Per eseguire gli esperimenti in presenza di antagonisti e/o inibitori il preparato è stato lavato per tre volte ad intervalli di 5 minuti dopo ogni prova, così da eliminare l'agente farmacologico e riportare i segmenti alle condizioni iniziali. I bloccanti sono stati aggiunti 20 minuti prima di un'ulteriore stimolazione con l'agente contratturante: la risposta registrata è stata poi confrontata con quella misurata inizialmente.

### ***Valutazione del rilascio di acetilcolina triziata***

Preparati di ileo di ratto sono stati montati verticalmente in bagni per organi isolati della capacità di 4 ml, predisposti alla superfusione con soluzione fisiologica Tyrode ossigenata. Al tessuto è stata applicata una tensione iniziale di 1 g. Dopo una stabilizzazione di 40 minuti è stata valutata la vitalità dell'organo mediante esposizione a carbacolo 1  $\mu$ M.

Le riserve neuronali di acetilcolina sono state marcate incubando l'organo per 45 minuti in Tyrode depolarizzante contenente colina triziata ( $[^3\text{H}]\text{Ch}$ ) 0,2  $\mu$ M. Al termine della fase di incubazione il preparato è stato lavato per 95 minuti in superfusione a flusso costante di 1 ml al minuto, contenente emicolinio-3 10  $\mu$ M ed eserina 10  $\mu$ M, al fine di prevenire rispettivamente il reuptake della colina e l'idrolisi di acetilcolina. I preparati sono stati stimolati mediante depolarizzazione con KCl 60 mM al 95° minuto (S1) e al 122° minuto (S2) dall'inizio della fase di campionamento. Aliquote (250  $\mu$ l) di campione di ciascuna frazione di superfusato, raccolto ogni 5 minuti, sono state aggiunte a 4 ml di liquido scintillante (Ultima Gold, Packard) e il contenuto in trizio è stato misurato con uno spettrometro a scintillazione liquida (Packard Tricarb 2100). La radioattività è stata espressa in disintegrazioni per minuto (DPM) e normalizzata per i grammi di tessuto. L'aumento del rilascio indotto dalla depolarizzazione è stato valutato come la differenza tra la liberazione di trizio durante la stimolazione farmacologica e la media di rilascio durante i 15 minuti precedenti.

### ***Western blotting***

L'identificazione di ADA mediante western blotting è stata condotta su tessuto intero e muscolo longitudinale con annesso il plesso mienterico (LMMP) di ileo di ratti controllo, inoculati con cellule Vero, e trattati con HSV-1 per via IG da una e sei settimane.

I tessuti, una volta isolati dall'ileo, sono stati omogenizzati in RIPA buffer non denaturante (NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, sodio desossicolato 0,5%,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, cocktail di inibitori delle proteasi 1X Calbiochem, Germania).

Dopo 45 minuti di incubazione a 4°C, i lisati sono stati centrifugati (13000 g per 5 minuti a 4°C) 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 Protein Assay Kit). Volumi di lisato contenenti 100  $\mu$ g di proteine sono stati sospesi nel tampone di caricamento SDS 2%, Tris 62,5 mM (pH 6), glicerolo 10%,  $\beta$ -mercaptoetanolo 5%, blu di bromofenolo

0,1%) e riscaldati a 100°C per 5 minuti al fine di permettere la reazione di denaturazione. Le proteine sono state separate su gel SDS-PAGE al 10% di acrilammide (Bio-Rad, Italia) e trasferite su membrana di PVDF (GE Healthcare, Italia) precedentemente attivata in metanolo. In seguito al trasferimento la membrana stata incubata per 1 ora in una soluzione contenente latte scremato al 5% in PBS – 0,05 % Tween 20 a temperatura ambiente sotto agitazione, al fine di bloccare tutti i siti di legame che possono interferire col successivo legame con l'anticorpo specifico. Dopo tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS – 0,05% Tween 20, la membrana è stata incubata per 12 ore a 4 °C con l'anticorpo primario policlonale anti-ADA (Santa Cruz Biotechnology) o con l'anticorpo primario monoclonale  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich), diluiti rispettivamente 1:200 e 1:3300 in una soluzione contenente latte scremato al 5% in PBS – 0,05 % Tween 20. A questo trattamento sono seguiti nuovamente tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS – 0,05% Tween 20, dopodiché la membrana è stata sottoposta ad incubazione per 2 ore a temperatura ambiente con l'opportuno anticorpo secondario coniugato a perossidasi di rafano (HRP): anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:4000 per la rivelazione di ADA e anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) 1:2000 per  $\beta$ -actina, in soluzioni contenenti il 5% latte scremato in PBS – 0,05% Tween 20. Infine, dopo tre lavaggi di 15 minuti ciascuno con PBS – 0,05% Tween 20 gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante reazione chemiluminescente esponendo la membrana a ECL (enhanced chemiluminescence). L'ECL è una tecnica utilizzata per la rivelazione degli anticorpi coniugati con l'HRP, il complesso enzimatico della perossidasi catalizza la conversione del substrato ECL, creando un reagente sensibile che emette luce (chemiluminescenza), impressionando le lastre fotografiche (GE Healthcare, Italia).

### ***Immunofluorescenza su preparati whole-mount***

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.

L'ileo distale (6-8 cm) è stato prelevato ed il lume è stato lavato con PBS. Sigillando un'estremità mediante un nodo con filo di cotone, i segmenti sono stati riempiti con soluzione fissativa (4% formaldeide, 0,2% acido picrico, 0,2 M PBS pH:7,4) con l'ausilio di una siringa, dopodichè anche l'altra estremità è stata chiusa. I preparati sono stati immersi in soluzione fissativa per 4 ore sotto agitazione. Al termine dell'incubazione le due estremità dell'intestino sono state tagliate e lavate 3 volte per 10 minuti. I segmenti (1 cm) sono stati stoccati in eppendorf contenenti PBS-Mertiolato (Thimerosal) a 4°C fino al momento dell'uso.

I tessuti sono stati tagliati lungo la direzione longitudinale e distesi su supporti di silicone con

la superficie della mucosa rivolta verso il basso, la LMMP è stata slaminata sotto stereomicroscopio ed ancorata con spilli a dei supporti di silicone nero. Le preparazioni LMMP sono state quindi lavate per tre volte in PBS contenente triton X allo 0,2% (Applichem, Italia). 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.

I tessuti sono stati incubati per 30 minuti con albumina (1%), sciolta in PBS contenente triton X-100 0,2%, al fine di mascherare i bloccanti antigenici aspecifici del preparato.

Dopo incubazione per un'ora con l'anticorpo primario (diluito in PBS contenente triton X-100 0,2% ed albumina 1%) sono stati eseguiti tre lavaggi di 10 minuti in PBS, così da rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato al tessuto. Le preparazioni sono state incubate al buio per un'ora con l'anticorpo secondario fluorescente (in PBS contenente triton X-100 0,2% ed albumina 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 tessuti sono stati infine montati su vetrini tipo SuperFrost, immersi in mowiol 40-88, liquido a base di glicerolo destinato a preservare la fluorescenza nel tempo ed infine ricoperti con vetrini coprioggetto e conservati al buio a 4°C fino all'analisi al microscopio confocale.

Gli anticorpi primari impiegati negli studi di immunofluorescenza e le corrispondenti diluizioni sono elencati in Tabella 2; gli anticorpi secondari, comprendono gli anti rabbit/biotina Alexa Fluor 488 e 555 (1:250) .

| Anticorpo primario | Animale ospite | Tipo        | Diluizione |
|--------------------|----------------|-------------|------------|
| anti-A1            | coniglio       | policlonale | 1:250      |
| anti-A2a           | coniglio       | policlonale | 1:200      |
| anti-Hu C/D        | mouse          | monoclonale | 1:40       |

**Tabella 2:** 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.

### ***Analisi statistica dei risultati***

Tutti i risultati sono stati espressi come la media  $\pm$  SEM dei dati ricavati dal numero di esperimenti indicati. Per l'analisi dei dati si sono utilizzati il test t di Student per dati accoppiati e non accoppiati o l'analisi della varianza ANOVA ad un solo criterio di valutazione (one-way), con post test di Neuman-Keuls, utilizzando il software Graph Pad Prism 3.03 (San Diego, CA-USA). Come limite di significatività statistica è stato assunto il valore di  $p < 0,05$ .

## MATERIALI

NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, D(+)-Glucosio Anidro, NaHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, metanolo sono stati acquistati dalla ditta J.T. Baker (Olanda); CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O e MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O sono stati comprati dall'azienda Merck, (Germania), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O dalla Riedel-Deheanag (Germania).

SP, CCPA, CGS 21680, ZM 241385 sono stati acquistati dalla Tocris (UK); la GE Healthcare (UK) ha fornito la [<sup>3</sup>H]Ch cloridrato. Glicerolo e Tris sono stati ottenuti dalla Carlo Erba Reagenti (Italia).

Tutte le altre sostanze utilizzate e di cui non è stata precedentemente specificata la provenienza sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich (Italia).

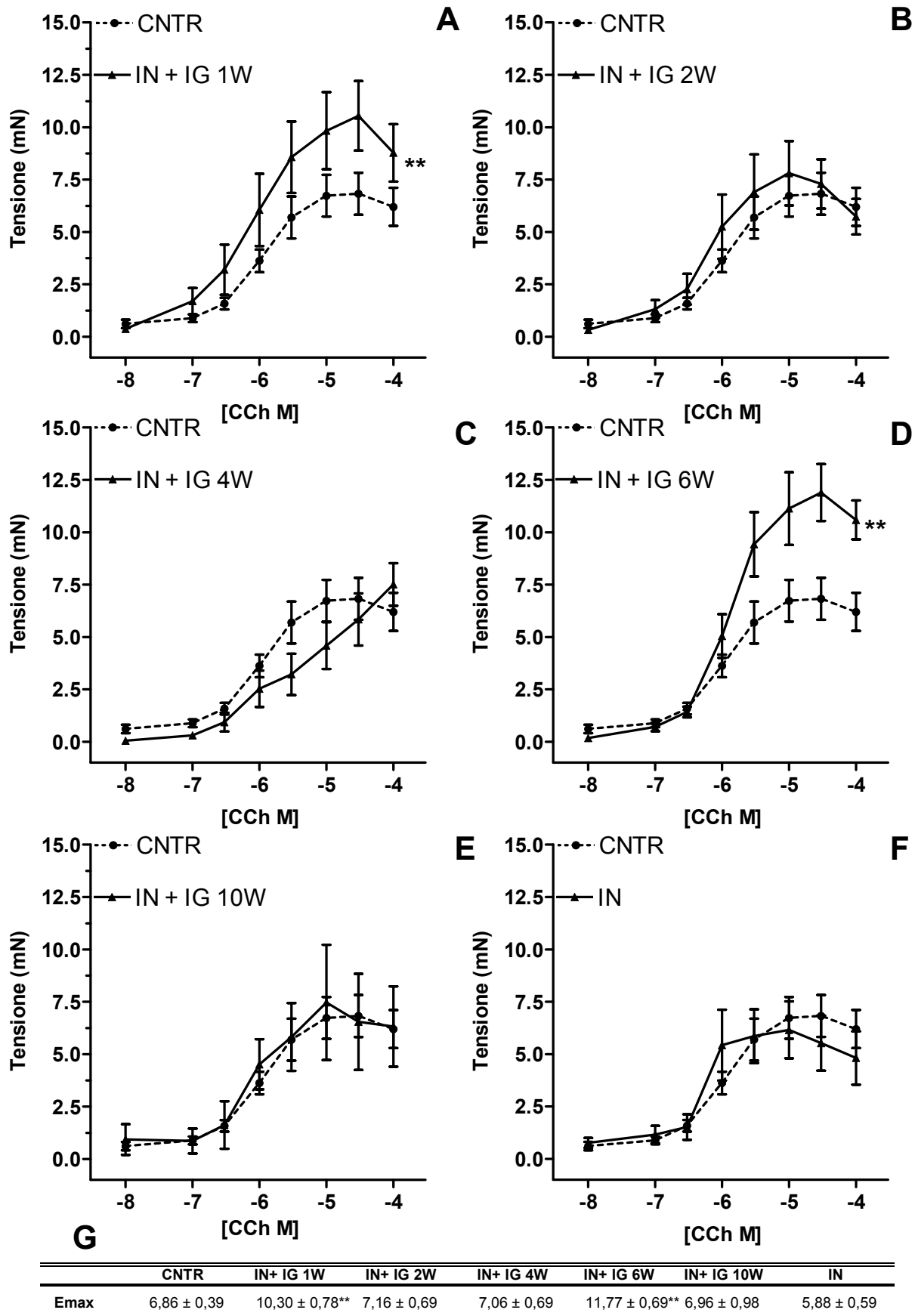
## RISULTATI

### ***Influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile dell'ileo di ratto***

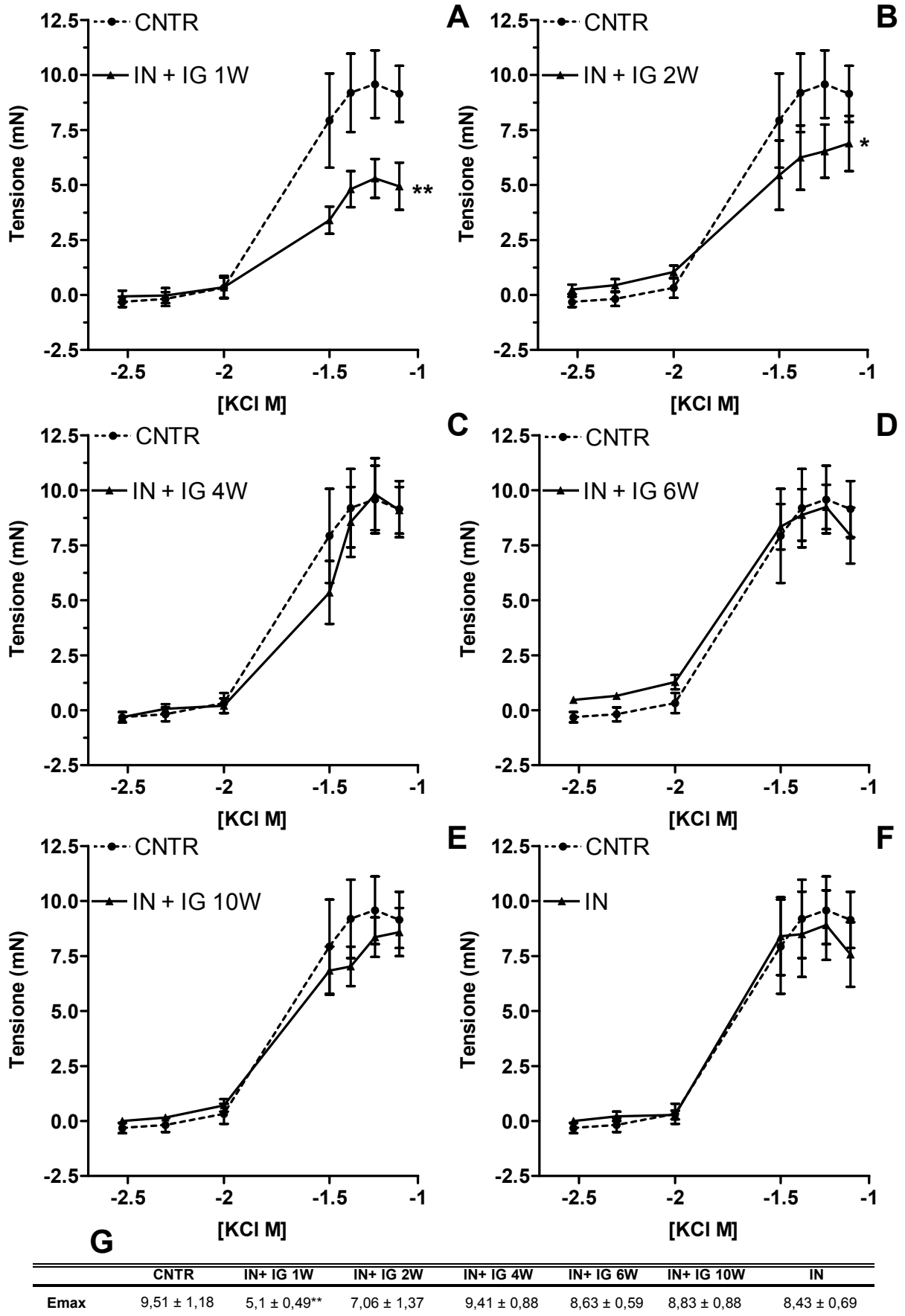
Al fine di valutare se il trattamento in vivo con HSV-1 influenzi la contrattilità della muscolatura liscia intestinale, i preparati isolati di ileo di ratto sono stati innanzitutto esposti a concentrazioni crescenti di carbacolo (0,01 - 100  $\mu$ M), agonista non selettivo dei recettori muscarinici, per ottenere curve concentrazione-risposta cumulative. Nell'ileo di ratti trattati da una e sei settimane per via IG con HSV-1, i valori di  $E_{max}$  per il carbacolo sono aumentati in maniera significativa, del 50% e del 72% rispetto ai non trattati (Figure 6A, 6D, 6G). Un solo inoculo IN del virus non ha alterato la risposta indotta dall'agonista (Figure 6F e 6G).

In maniera analoga è stato saggiato l'effetto di concentrazioni crescenti di KCl (3 - 80 mM), che induce depolarizzazione delle membrane. La curva concentrazione-effetto per il KCl nell'ileo di ratti esposti al virus da una e due settimane è spostata verso il basso rispetto al controllo (Figure 7A e 7B). I valori di  $E_{max}$  sono diminuiti del 46% dopo una settimana dall'infezione IG con HSV-1, senza significative variazioni dopo due settimane (Figure 7A e 7G). Anche in questo caso la sola instillazione IN del virus non è sufficiente a determinare alterazioni nella risposta contrattile (Figure 7F e 7G).

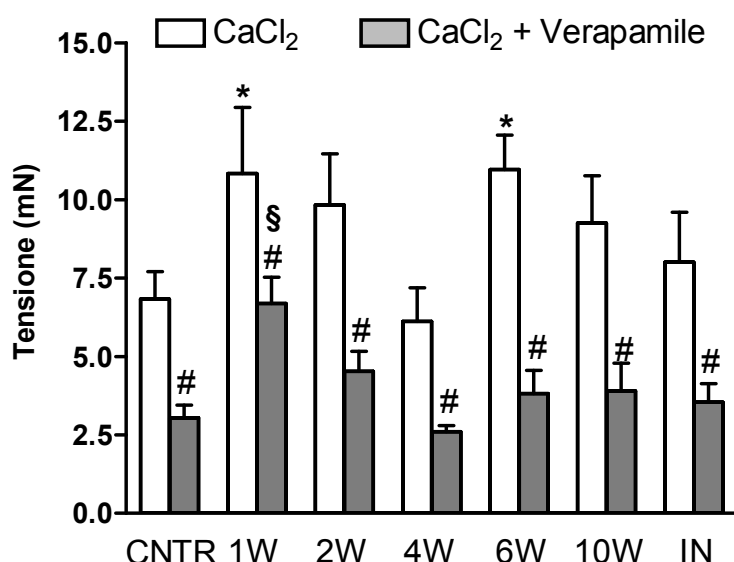
L'effetto contratturante del  $CaCl_2$  è stato valutato nei preparati di intestino mantenuti in soluzione Tyrode depolarizzante senza calcio. In queste condizioni l'aggiunta di  $CaCl_2$  5 mM ha determinato una contrazione dell'ileo di ratti controllo, che è aumentata del 76% ad una settimana dall'inoculo IG di HSV-1 e del 56% a sei settimane (Figura 8). Il pretrattamento con verapamile 0,1  $\mu$ M, bloccante dei canali del calcio di tipo L, ha ridotto significativamente la contrazione indotta dal  $CaCl_2$  in tutti i preparati, ma non ha abolito l'incremento della risposta nei segmenti isolati da ratti infettati per via IG da una settimana (Figura 8). E' nuovamente confermata l'incapacità del solo inoculo IN di determinare significative alterazioni della contrattilità (Figura 8).



**Figura 6:** Effetto del trattamento con **carbacolo** (CCh; 0,01 - 100  $\mu$ M; Pannelli A-F) e valori di Emax calcolati (Pannello G) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR), trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1, 2, 4, 6, 10 settimane (W) o con la sola instillazione intranasale (IN). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 8-14 esperimenti. \*\* =  $p < 0,01$ .



**Figura 7:** Effetto del trattamento con KCl (3 - 80 mM; Pannelli A-F) e valori di Emax calcolati (Pannello G) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR), trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1, 2, 4, 6, 10 settimane (W) o con la sola instillazione intranasale (IN). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media ± SEM dei risultati ottenuti da 8-14 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

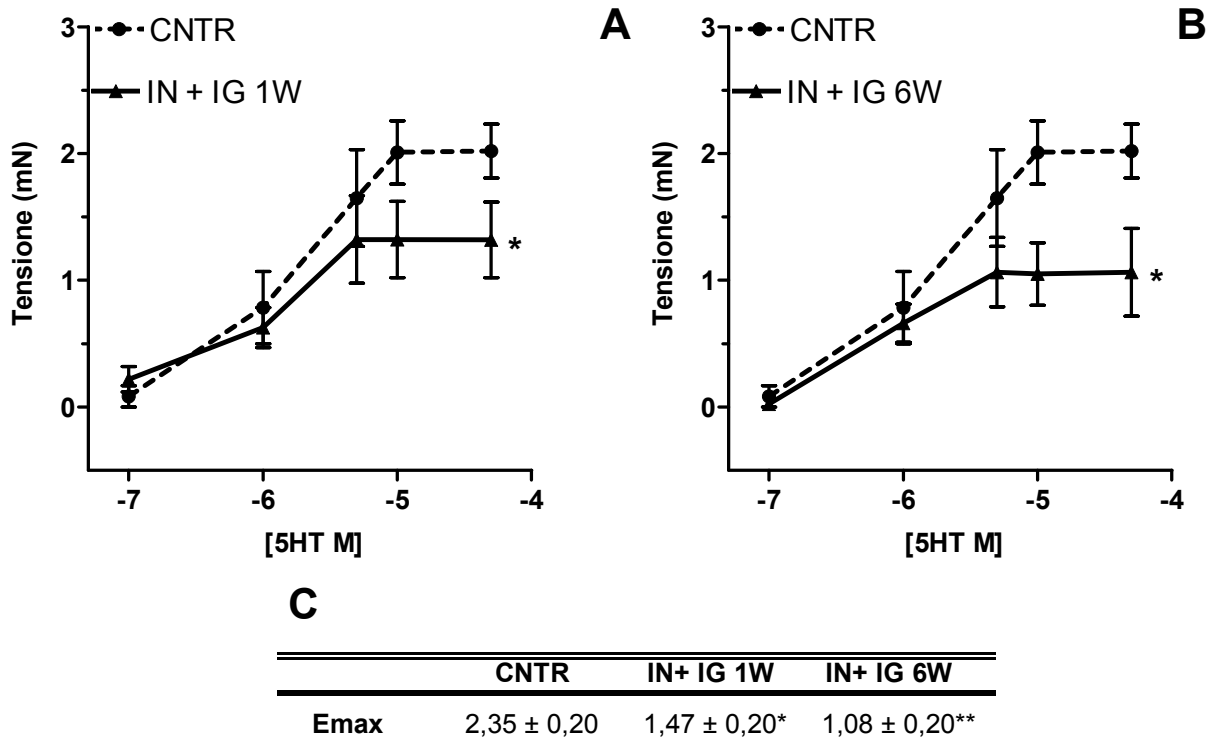


**Figura 8:** Tensione evocata dal **CaCl<sub>2</sub>** 5mM in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR), trattati con il doppio inoculo da 1, 2, 4, 6, 10 settimane (W) o con la sola instillazione intranasale (IN). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei valori ottenuti da 8-14 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; #= $p < 0,05$  vs CaCl<sub>2</sub>; §= $p < 0,05$  vs CNTR+Verapamil.

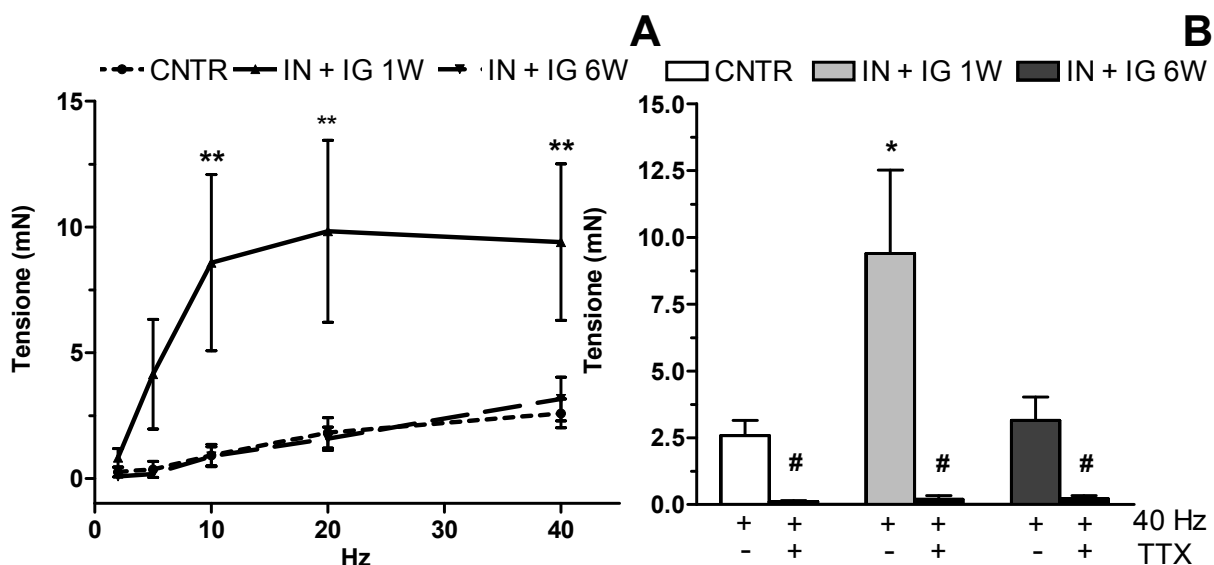
Una volta stabilito che le alterazioni della contrattilità nell'ileo di ratti inoculati con HSV-1 per via IG risultano evidenti dopo una e sei settimane, i successivi esperimenti sono stati eseguiti solo su preparati isolati da animali trattati a questi tempi. È stata così valutata la risposta alla 5HT, agente ad azione recettore-mediata, aggiunta nei bagni a concentrazioni crescenti (0,1 – 50  $\mu$ M). Nell'ileo di ratti trattati da una e sei settimane i valori di Emax sono diminuiti in maniera significativa, rispettivamente del 38% e del 52% (Figure 9A, 9B e 9C).

La risposta dei preparati di ileo a EFS è stata studiata per chiarire eventuali alterazioni funzionali del SNE. La stimolazione (60 V) ha evocato contrazioni frequenza-dipendenti nell'intervallo da 2 a 40 Hz (Figura 10A), completamente abolite dal pretrattamento con TTX 1  $\mu$ M, anche alla massima frequenza di stimolazione (40 Hz) (Figura 10B), ad indicarne l'origine neuronale. Tali contrazioni sono di natura prevalentemente colinergica, poiché sono state quasi completamente abolite dall'atropina 1  $\mu$ M, antagonista muscarinico non selettivo. La risposta evocata dalla EFS a 10, 20, 40 Hz è significativamente aumentata nei preparati di ileo isolati da animali esposti al virus per una settimana rispetto a quella sviluppata nei segmenti prelevati da ratti di controllo (Figure 10A e 10B).





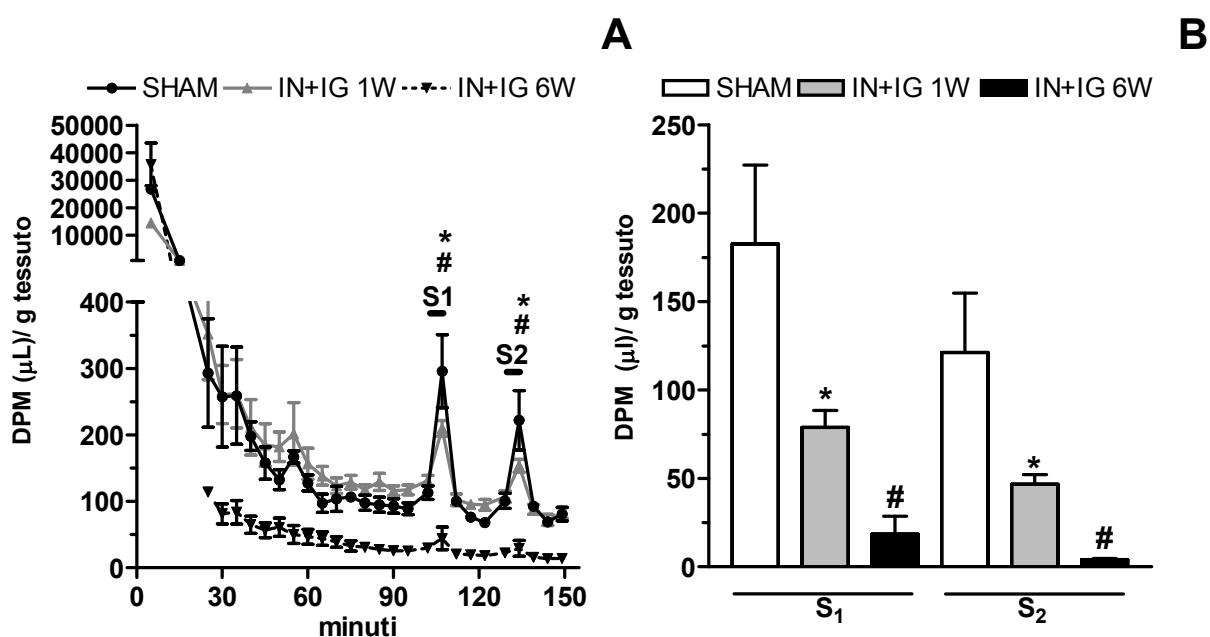
**Figura 9:** Effetto del trattamento con 5HT (0,1 - 50  $\mu$ M; Pannelli A e B), valori di Emax calcolati (Pannello C) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-9 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .



**Figura 10:** Effetto della **stimolazione elettrica** (60 V; Pannello A) e del pretrattamento con TTX 1 $\mu$ M sulla risposta a 40 Hz (Pannello B) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 5-11 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; # =  $p < 0,05$  vs 40 Hz.

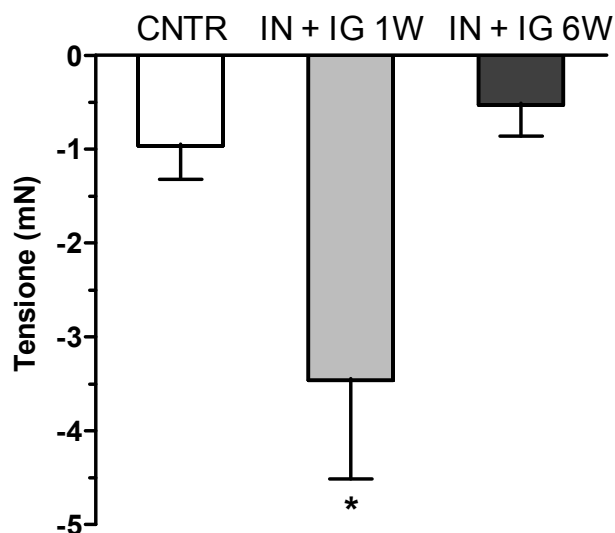
Per studiare l'influenza dell'infezione con HSV-1 sulla liberazione di acetilcolina, i segmenti di ileo sono stati trattati con [<sup>3</sup>H]Ch prima della depolarizzazione con KCl 60 mM.

L'analisi del contenuto di trizio nei campioni di liquido di perfusione, raccolti ogni cinque minuti dal termine del periodo di marcatura, ha evidenziato un decremento tempo-dipendente della radioattività, fino a raggiungere livelli stabili dopo 80 minuti (Figura 11A). I preparati sono stati quindi stimolati con KCl 60 mM al 95° minuto (S1) e al 122° minuto (S2) dall'inizio della fase di campionamento (Figure 11A e 11B). L'esposizione all'agente depolarizzante ha causato un aumento del contenuto di trizio nei campioni provenienti da tutti i preparati (Figura 11A), che risulta significativamente ridotto nei segmenti di ileo isolati da animali esposti al virus per una e sei settimane rispetto a quello evidenziato nei segmenti prelevati da ratti di controllo (Figure 11A e 11B).



**Figura 11:** Effetto del KCl 60 mM sulla liberazione di trizio (Pannello A) ed aumento della radioattività (Pannello B) per μL di campione di liquido di superfusione in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I segmenti sono stati incubati con colina triziata e stimolati con KCl 60 mM al 95° minuto (S1) e al 122° minuto (S2) dall'inizio della fase di campionamento. I dati, espressi in DPM, sono normalizzati sui grammi di tessuto e sono la media ± SEM dei risultati ottenuti da 4 esperimenti. \* = p < 0,05 IN + IG 1W vs CNTR; # = p < 0,05 IN + IG 6W vs CNTR.

La risposta alla EFS (60 V) è stata poi valutata in presenza di atropina 1 μM, antagonista muscarinico non selettivo, e guanetidina 3 μM, agente simpaticolitico, per evidenziare la componente non adrenergica non colinergica (NANC) di tale risposta. In queste condizioni la EFS a 20 Hz ha indotto in tutti i preparati un rilascio, che è risultato significativamente maggiore nei segmenti di ileo isolati da animali esposti al virus per una settimana, rispetto a quello sviluppato nei segmenti prelevati da ratti di controllo (Figura 12).

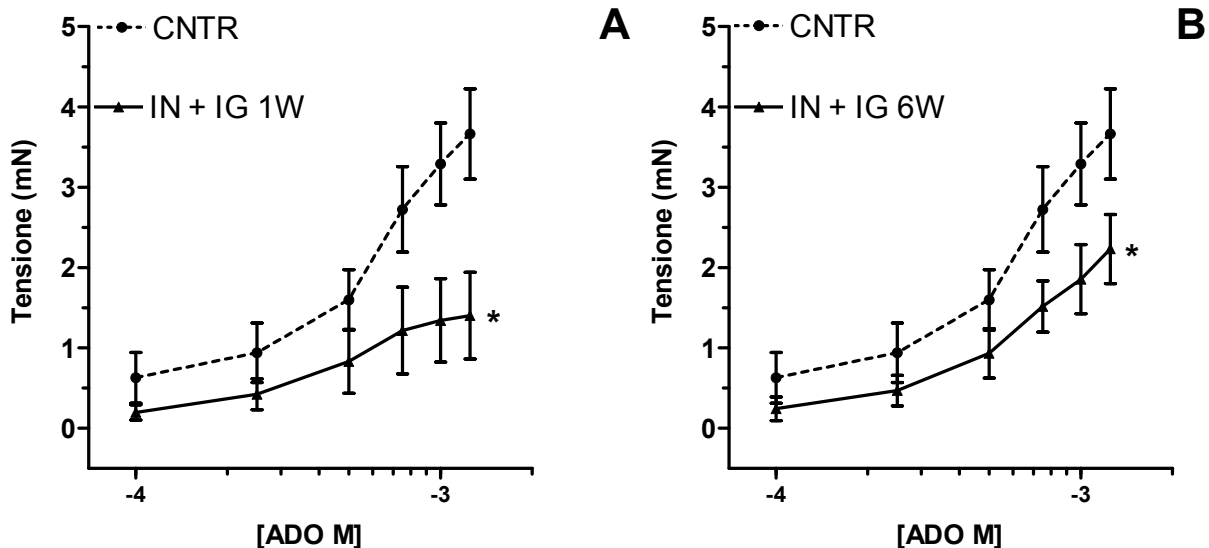


**Figura 12:** Effetto della **stimolazione elettrica** (60V) a 20 Hz in presenza di atropina 1  $\mu$ M e guanetidina 3  $\mu$ M in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ .

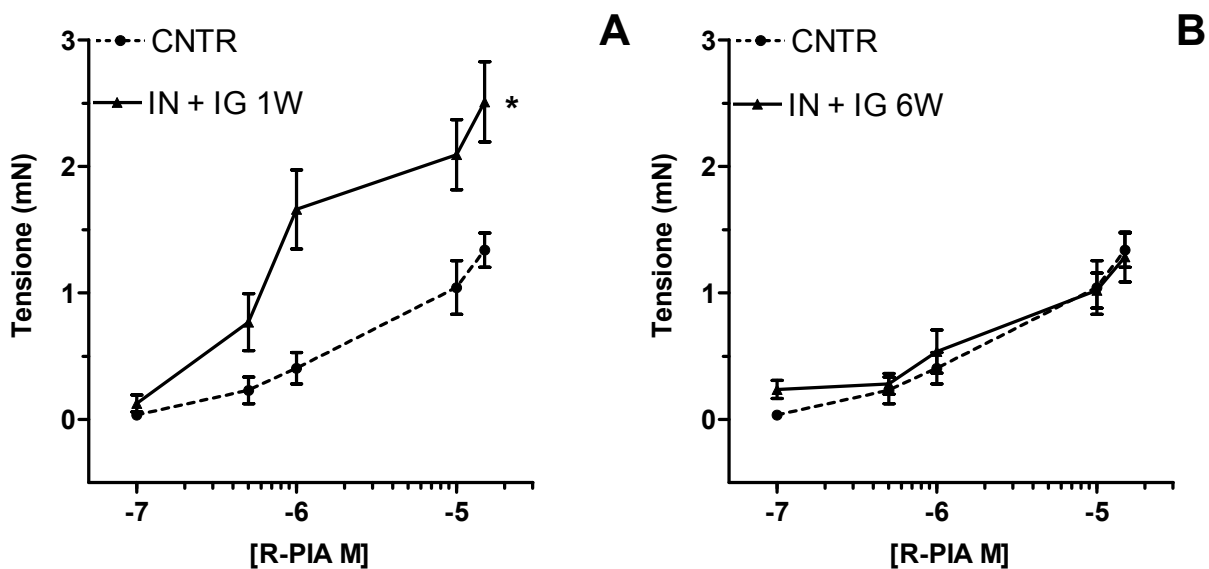
### ***Influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile dell'ileo di ratto mediata dal sistema adenosinergico***

Stabilita la presenza di evidenti alterazioni contrattili dell'ileo di ratto causate dal HSV-1, l'attenzione si è focalizzata sul sistema adenosinergico, di cui è noto il coinvolgimento nelle patologie enteriche infiammatorie e/o post-infettive (Antonioli et al., 2007; Cavalcante et al., 2006; Fornai et al., 2008).

Nell'ileo di ratti infettati da una e sei settimane la risposta a concentrazioni crescenti di adenosina (0,1 a 1,25 mM) risulta significativamente ridotta rispetto a quella dei controlli (Figure 13A e 13B). Al contrario, l'effetto dell'analogo stabile dell'adenosina, R-PIA (0,1 - 15  $\mu$ M) è aumentato in seguito al trattamento degli animali con il virus da una settimana (Figura 14A), senza significative variazioni a sei settimane (Figura 14B).

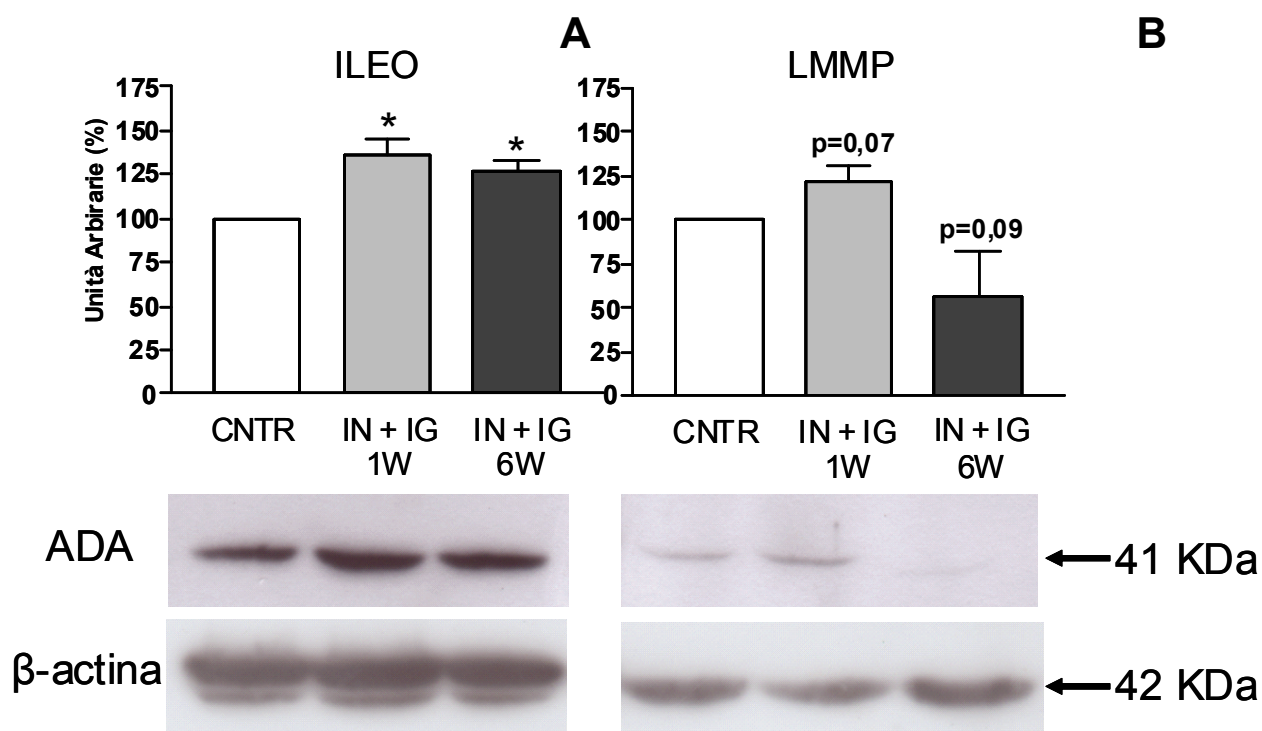


**Figura 13:** Effetto del trattamento con **adenosina** (ADO; 0,1–1,25 mM) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 (Pannello A) e 6 (Pannello B) settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ .



**Figura 14:** Effetto del trattamento con **R-PIA** (0,1-15  $\mu$ M) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 (Pannello A) e 6 (Pannello B) settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 6-12 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ .

Alla luce di questi risultati si è voluta quindi studiare, mediante tecnica di western blotting, l'espressione di ADA, enzima deputato alla conversione dell'adenosina in inosina. Queste indagini sono state condotte sia sul tessuto intero (Figura 15A) che nella LMMP (Figura 15B) dei ratti controllo e infettati con HSV-1. L'espressione di ADA è influenzata dalla presenza del virus (Figura 15): si è osservato infatti un incremento dell'espressione di tale proteina nel tessuto intero ad una (+35%) ed a sei settimane (+26%) (Figura 15A). Nella LMPP l'espressione di ADA appare aumentata ad una settimana dal trattamento con l'agente patogeno ( $121 \pm 7\%$ ), mentre dopo sei settimane è pari al  $55 \pm 26\%$  rispetto ai campioni isolati da animali sani: tali variazioni non raggiungono tuttavia la significatività statistica (Figura 15B).

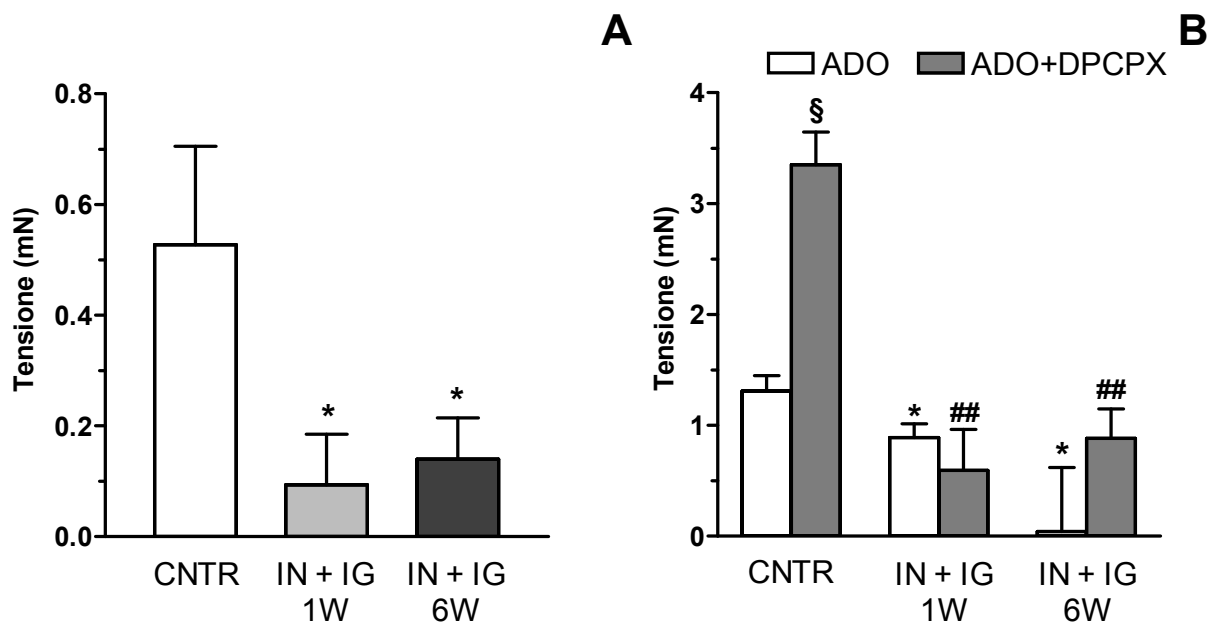


**Figura 15:** Espressione di **adenosina deaminasi (ADA)** e  $\beta$ -actina, valutata mediante tecnica di western blotting, nel tessuto intero (Pannello A) e nella muscolatura longitudinale di ileo contenente il plesso mienterico (LMMP; Pannello B) prelevato da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I dati sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4 esperimenti.

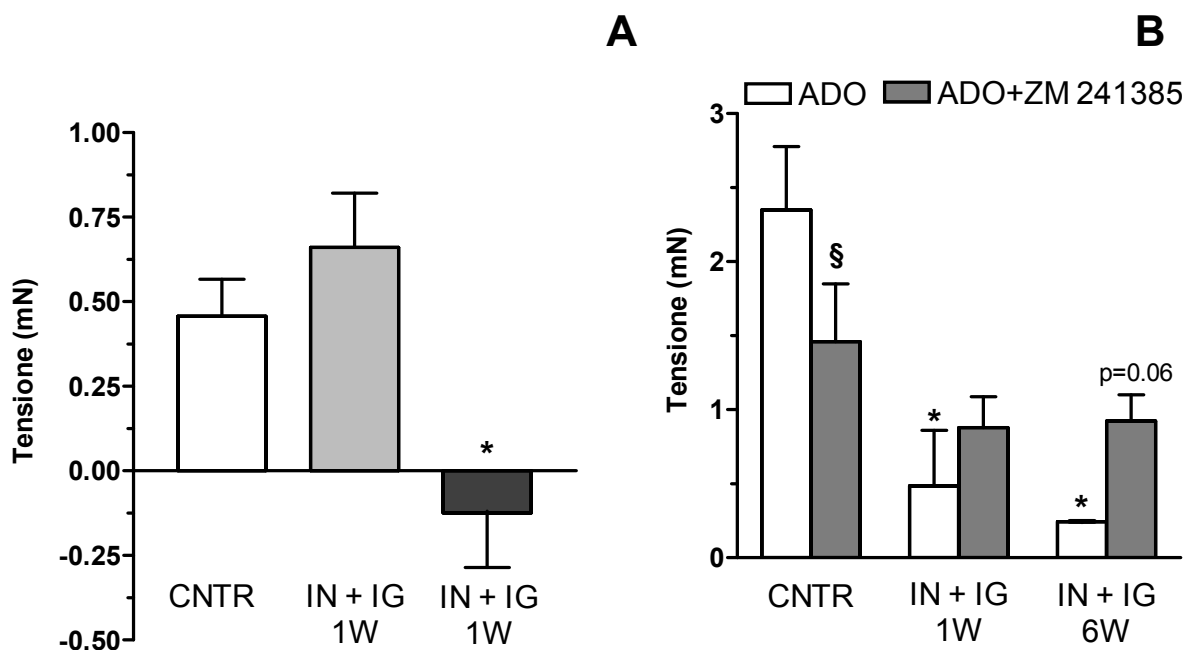
Al fine di evidenziare una possibile influenza dell'infezione da HSV-1 sulla risposta contrattile mediata dai recettori purinergici, di cui è ben noto il ruolo nel controllo della motilità intestinale (Antonioli et al., 2006; Duarte-Araujo et al., 2004) è stato valutato l'effetto indotto da CCPA 10 nM e da CGS 21680 10 nM (agonisti selettivi rispettivamente dei recettori A1 ed A2a), e la capacità di DPCPX (antagonista selettivo dei recettori A1) e ZM 241385 (antagonista selettivo dei recettori A2a) di prevenire la risposta all'adenosina.

Come si può osservare in Figura 16A, l'infezione ha ridotto la contrazione evocata dal CCPA 10 nM ad una ed a sei settimane dall'inoculo IG. Nell'ileo di ratti infettati da una e sei settimane la risposta all'adenosina 1,25 mM è risultata significativamente minore rispetto a quella dei controlli e tale alterazione si verifica anche in seguito a pretrattamento con l'antagonista dei recettori A1 (Figura 16B). La presenza di DPCPX ha determinato un significativo aumento della contrazione evocata dall'adenosina 1,25 mM solamente nei preparati isolati da ratti di controllo (Figura 16B).

La risposta al CGS 21680 10 nM non è variata nei segmenti prelevati da ratti trattati da una settimana, ma è diminuita a sei settimane (Figura 17A). Il pretrattamento con ZM 241385 ha inibito significativamente l'effetto dell'adenosina 1,25 mM esclusivamente nei segmenti prelevati da ratti inoculati con cellule Vero (controllo; Figura 17B).



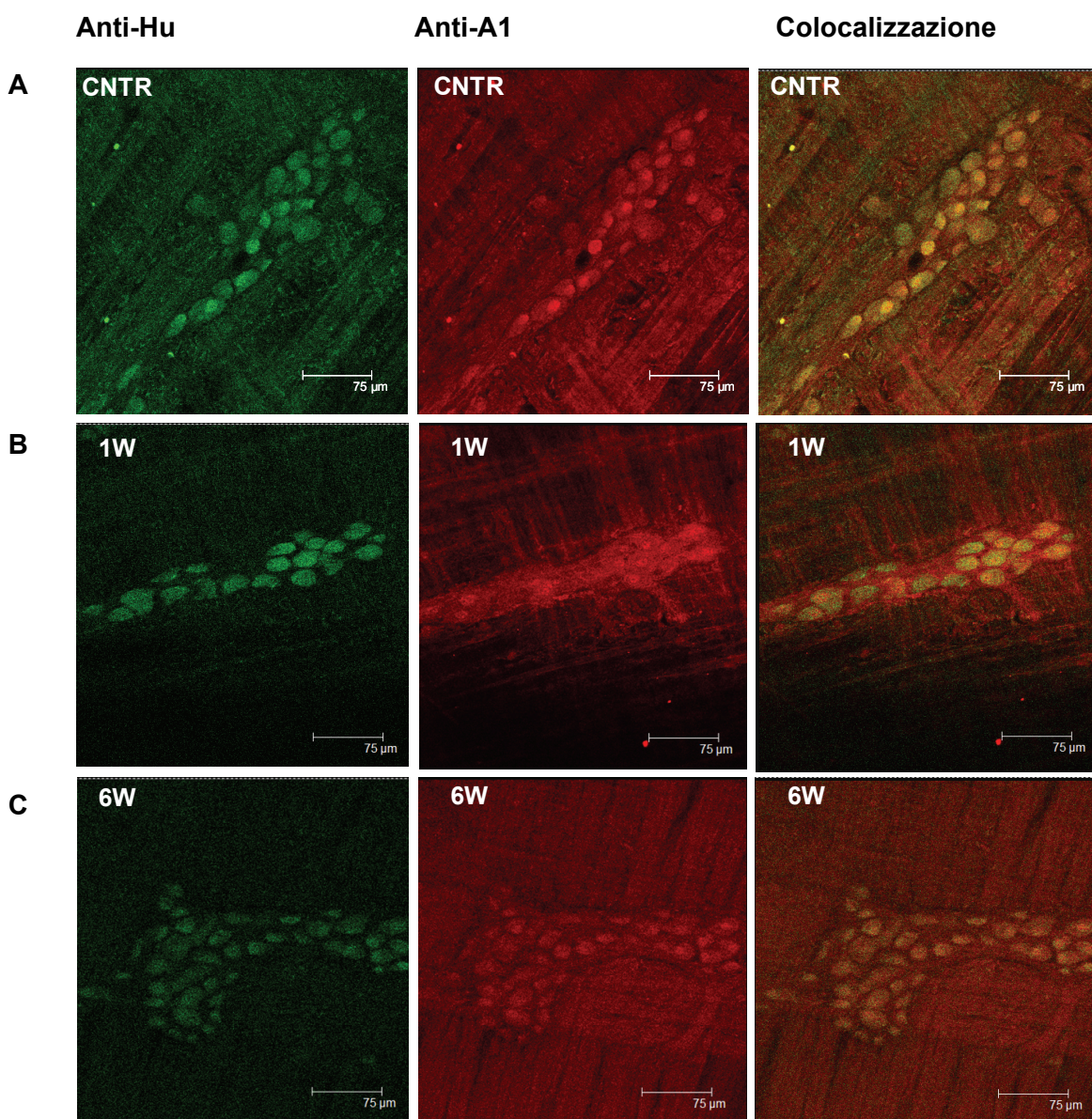
**Figura 16:** Effetto del trattamento con **CCPA** 10 nM (Pannello A) e dell'esposizione ad **adenosina** (ADO; 1,25 mM) in presenza ed in assenza di **DPCPX** 10 nM (Pannello B) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-12 esperimenti. \* =  $p < 0,05$  vs CNTR; § =  $p < 0,05$  vs ADO; ## =  $p < 0,01$  vs CNTR+DPCPX.



**Figura 17:** Effetto del trattamento con **CGS 21680** 10 nM (Pannello A) e dell'esposizione ad **adenosina** (ADO; 1,25 mM) in presenza ed in assenza di **ZM 241385** 10 nM (Pannello B) in preparati di ileo prelevati da ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR) e trattati con il doppio inoculo (IN + IG) da 1 e 6 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 3-12 esperimenti. \* =  $p < 0,05$  vs CNTR; § =  $p < 0,05$  vs ADO; p=0,06 vs ADO.

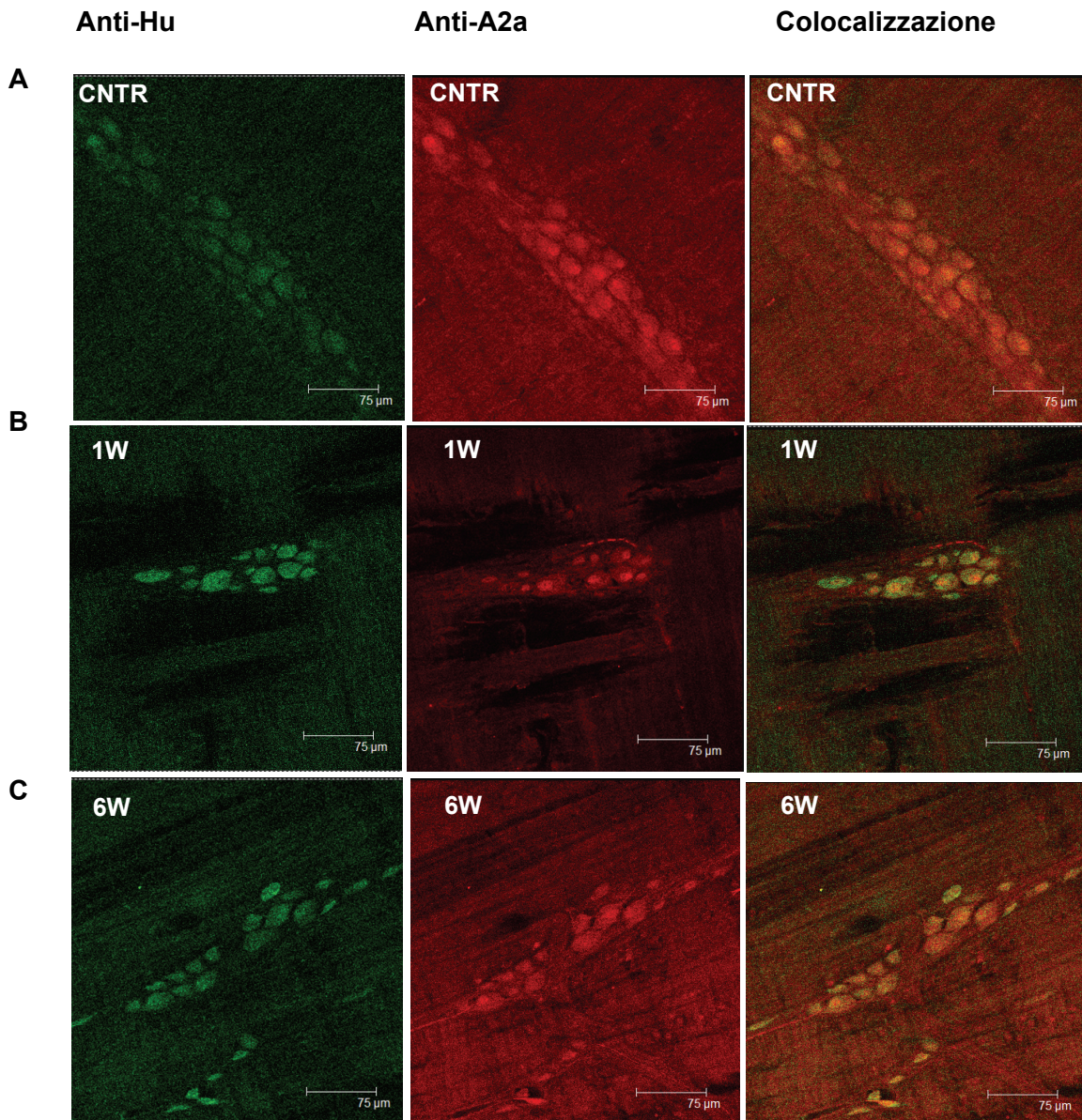
Per approfondire lo studio dell'influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sull'espressione dei recettori purinergici A1 ed A2a nella LMMP dell'ileo di ratto, sono stati condotti studi di immunofluorescenza su preparazioni whole mount di LMMP di ratti esposti al virus per una e sei settimane. I tessuti sono stati marcati sia con l'anticorpo anti-Hu, specifico per i neuroni, che con gli anticorpi anti-A1 o anti-A2a (Figure 18 e 19).

Nel controllo il recettore A1 sembra localizzato sia a livello dei gangli che della muscolatura longitudinale (Figura 18A). La presenza del virus nel SNE non sembra influenzare in maniera evidente l'espressione del recettore A1 ma, ad una settimana dall'inoculo IG, l'immunoreattività di A1 appare distribuita principalmente nei neuroni (Figura 18B).



**Figura 18:** Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni whole mount di LMPP di ileo di ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR; Pannello A) e trattati con il doppio inoculo da 1 (Pannello B) e 6 settimane (W; Pannello C) marcate con anti-Hu (in verde; pannelli di sinistra), anti-A1 (in rosso; pannelli centrali); colocalizzazione delle proteine marcate (pannelli di destra).

Come si può notare in Figura 19A, sia il tessuto muscolare che i neuroni dei preparati isolati da ratti controllo sono marcati per il recettore A2a. L'alterazione indotta da HSV-1 sul profilo di espressione del recettore ad una settimana dall'inoculo IG appare peculiare per la presenza di un aumento del segnale a livello intracellulare nei neuroni (Figura 19B). Dopo sei settimane dall'infezione, il profilo di distribuzione del recettore A2a risulta di nuovo analogo al controllo (Figura 19C).



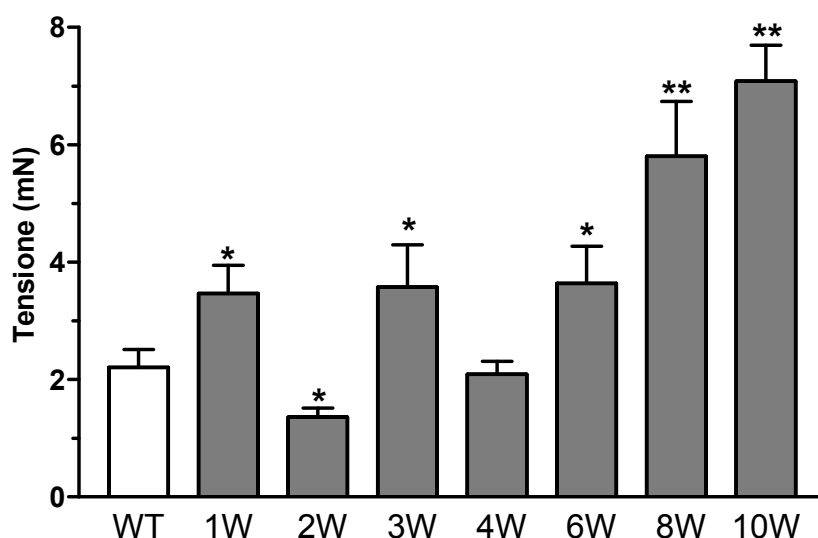
**Figura 19:** Microfotografie ottenute dall'analisi al microscopio confocale di preparazioni whole mount di LMPP di ileo di ratti controllo inoculati con cellule Vero (CNTR; Pannello A) e trattati con il doppio inoculo da 1 (Pannello B) e 6 settimane (W; Pannello C) marcate con anti-Hu (in verde; pannelli di sinistra), anti-A2a (in rosso; pannelli centrali); colocalizzazione delle proteine marcate (pannelli di destra).



### **Effetto del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile di preparati di ileo isolato da topi WT**

Al fine di evidenziare possibili differenze fra topo e ratto per quanto riguarda l'influenza del trattamento in vivo con HSV-1 sulla contrattilità dell'ileo, i preparati isolati da topi di controllo e infettati per via IG da una a dieci settimane sono stati esposti a carbacolo 1  $\mu$ M, KCl 60 mM ed EFS (40V; 20 Hz).

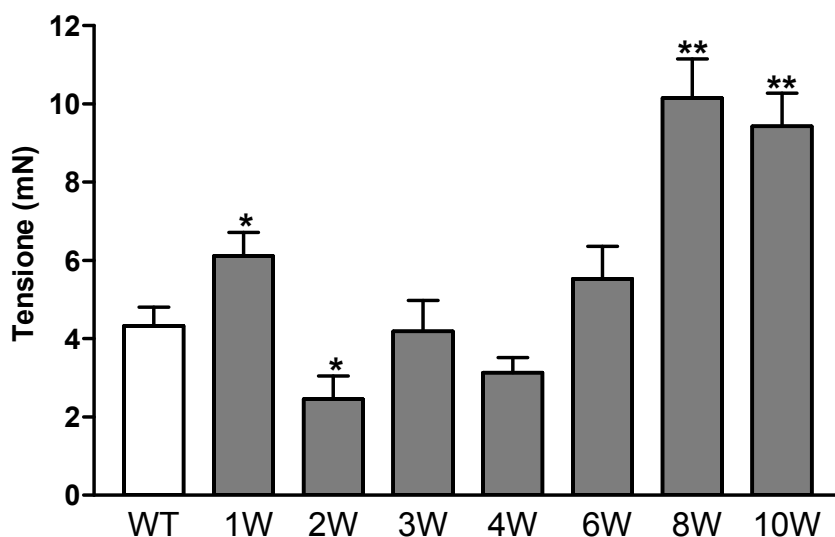
L'infezione con il virus determina una significativa variazione della contrazione indotta da carbacolo ad una (+57%), due (-38,5%), tre (+62%), sei (+65%), otto (+163%) e dieci (+221%) settimane dall'inoculo (Figura 20).



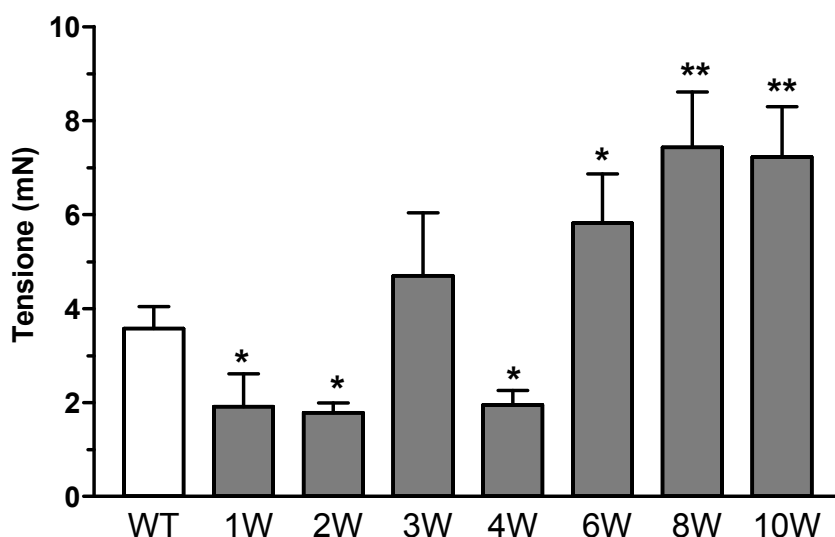
**Figura 20:** Effetto del trattamento con **carbacolo** 1  $\mu$ M in preparati di ileo prelevati da topi WT controllo, inoculati con cellule Vero (WT) e trattati con il doppio inoculo da 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 10-20 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

La somministrazione di HSV-1 altera in maniera significativa la risposta al KCl ad una (+41%) e due settimane (-43%), fino a tornare a valori paragonabili a quelli del controllo dopo tre, quattro e sei settimane dal trattamento IG (Figura 20). A otto (+134%) e dieci (+118%) settimane dall'esposizione al virus si osserva nuovamente un incremento significativo della contrazione (Figura 21).

La stimolazione elettrica (40V; 20 Hz) induce in tutti i segmenti una contrazione massimale, di origine neuronale e prevalentemente colinergica, poichè totalmente abolita dal pretrattamento con TTX 1  $\mu$ M e quasi completamente inibita dalla presenza di atropina 1  $\mu$ M. Come si può osservare in Figura 22, è stata evidenziata una riduzione significativa della risposta dopo una (-47%), due (-50%) e quattro (-46%) settimane dall'inoculo con HSV-1. Trascorse sei, otto e dieci settimane dall'infezione si ha invece un incremento della contrazione.



**Figura 21:** Effetto del trattamento con **KCl** 60 mM in preparati di ileo prelevati da topi WT controllo, inoculati con cellule Vero (WT) e trattati con il doppio inoculo da 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 10-20 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

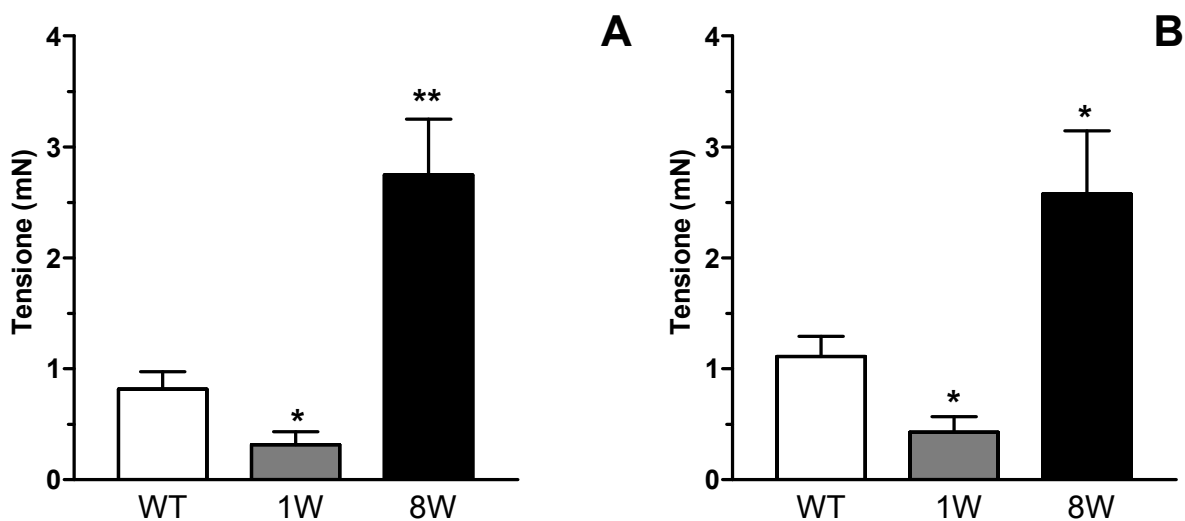


**Figura 22:** Effetto della **stimolazione elettrica** (40 V; 20 Hz) in preparati di ileo prelevati da topi WT controllo, inoculati con cellule Vero (WT) e da topi trattati con il doppio inoculo da 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 6-12 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

Una volta dimostrato che le alterazioni contrattili nell'ileo di topi trattati con HSV-1 per via IG risultano evidenti da una a dieci settimane, i successivi esperimenti sono stati eseguiti su preparati isolati da animali ad una ed a otto settimane, al fine di approfondire i meccanismi che stanno alla base di tali variazioni.

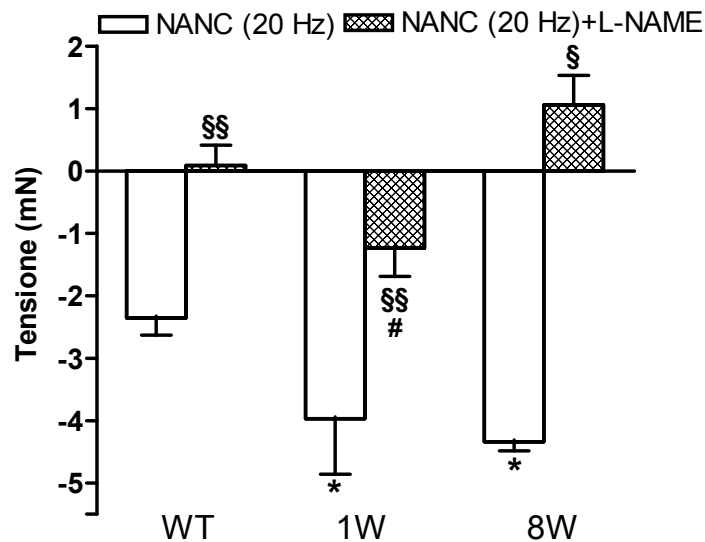
Esperimenti preliminari hanno evidenziato che l'esposizione a concentrazioni crescenti di 5HT (0,1 – 30  $\mu$ M), induce una risposta contrattile che raggiunge il suo massimo alla concentrazione di 3  $\mu$ M. A questa concentrazione la 5HT evoca una contrazione significativamente ridotta ad una settimana dall'inoculo IG, mentre ad otto settimane si osserva un incremento della risposta (Figura 23A).

E' stato anche saggiato l'effetto della SP, neuropeptide appartenente alla famiglia delle tachichinine, impiegando una concentrazione (3  $\mu$ M) che è in grado di evocare una risposta massimale. Come si può osservare in Figura 23B, anche in questo caso l'infezione da HSV-1 ha prodotto una riduzione della contrazione ad una settimana ed un aumento ad otto settimane.



**Figura 23:** Effetto del trattamento con **5HT** 3  $\mu$ M (Pannello A) e con **SP** 3  $\mu$ M (Pannello B) in preparati di ileo prelevati da topi WT controllo, inoculati con cellule Vero e infettati con HSV-1 da 1 e 8 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. \* = p<0,05.

In tutti i preparati la componente NANC della risposta alla EFS (40V; 20 Hz) consiste in un rilasciamento, che risulta maggiore rispetto al controllo nei segmenti di ileo isolati da animali esposti al virus per una ed otto settimane (Figura 24). La risposta NANC alla EFS (40V; 20 Hz) è stata valutata anche in presenza di L-NAME 100  $\mu$ M, per evidenziare l'eventuale coinvolgimento di NO in tale risposta. L'aggiunta di L-NAME ha pressoché abolito il rilasciamento in tutti i segmenti (Figura 24).



**Figura 24:** Effetto della **stimolazione elettrica** (40V; 20 Hz) in preparati di ileo prelevati da topi WT controllo, inoculati con cellule Vero, e infettati con HSV-1 da 1 e da 8 settimane (W), pretrattati con atropina 1  $\mu$ M e guanetidina 3  $\mu$ M in assenza (NANC) ed in presenza di L-NAME 100  $\mu$ M (NANC+L-NAME). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. \* =  $p < 0,05$  vs WT; § =  $p < 0,05$  vs NANC (20 Hz); §§ =  $p < 0,01$  vs NANC (20 Hz); # =  $p < 0,05$  vs WT NANC (20 Hz)+L-NAME.

I principali risultati ottenuti dallo studio dell'effetto dell'infezione con HSV-1 sulla contrattilità dei preparati di ileo di topo sono riassunti nella seguente tabella:

| HSV-1 vs WT                 | 1W | 8W |
|-----------------------------|----|----|
| Carbacolo (1 $\mu$ M)       | ↑  | ↑  |
| KCl (60 mM)                 | ↑  | ↑  |
| 5-HT (3 $\mu$ M)            | ↓  | ↑  |
| SP (3 $\mu$ M)              | ↓  | ↑  |
| EFS (20 Hz)                 | ↓  | ↑  |
| EFS NANC (20 Hz)            | ↑  | ↑  |
| EFS NANC (20 Hz)<br>+L-NAME | ↓  | —  |

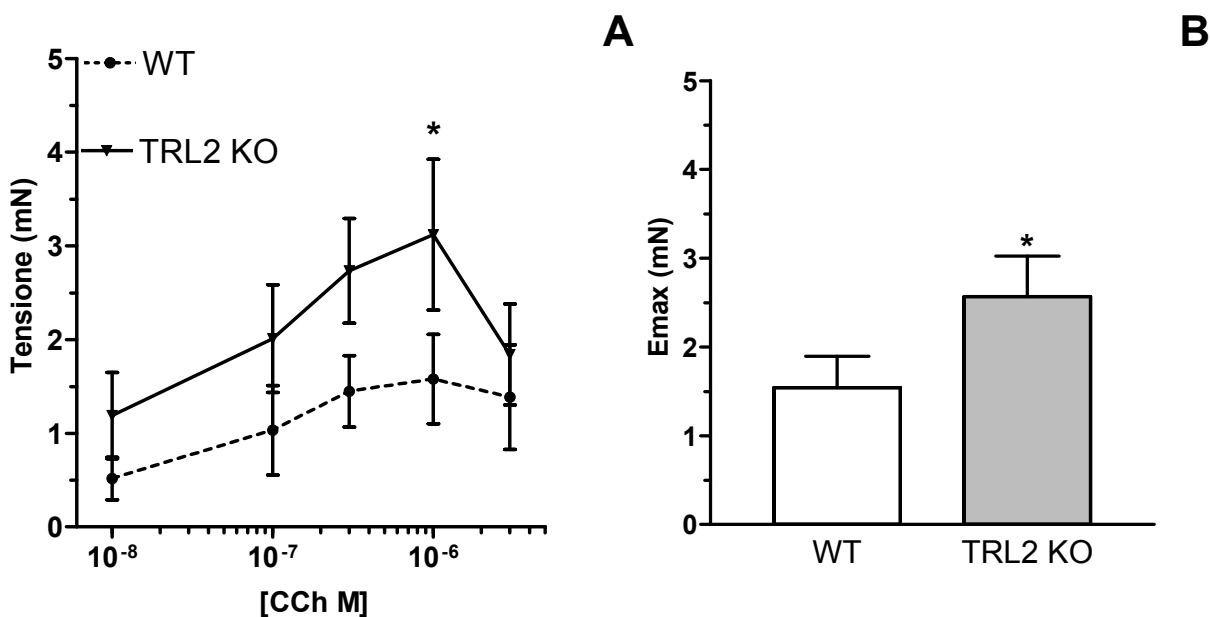
**Tabella 3:** Effetto del trattamento con HSV-1 sulla risposta contrattile recettore mediata e non- in preparati di ileo prelevati da topi infettati con HSV-1 da 1 e 8 settimane (W), rispetto a quella ottenuta da segmenti di topi WT controllo (WT), inoculati con cellule Vero.

### **Effetto della delezione del gene che codifica per il TLR2 sulla risposta contrattile di preparati di ileo isolato da topo**

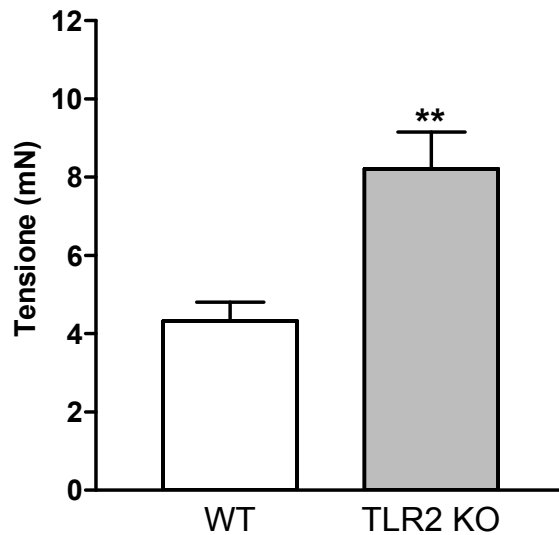
I segmenti di ileo isolati da topi WT e TLR2 KO sono stati esposti agli agenti carbacolo (0,01 - 3  $\mu$ M), KCl 60 mM ed EFS (2 - 40 Hz) per valutare se la delezione del gene influenzi la risposta dei preparati. Nei preparati isolati da topi TLR2 KO è stato dimostrato uno spostamento verso l'alto della curva concentrazione-risposta per l'agonista (0,01 - 3  $\mu$ M; Figura 25A), con conseguente aumento del valore di Emax (Figura 25B).

La depolarizzazione con KCl 60 mM ha indotto una contrazione significativamente maggiore nei segmenti di ileo isolati dai topi transgenici rispetto a quella ottenuta nei preparati di topi WT (Figura 26).

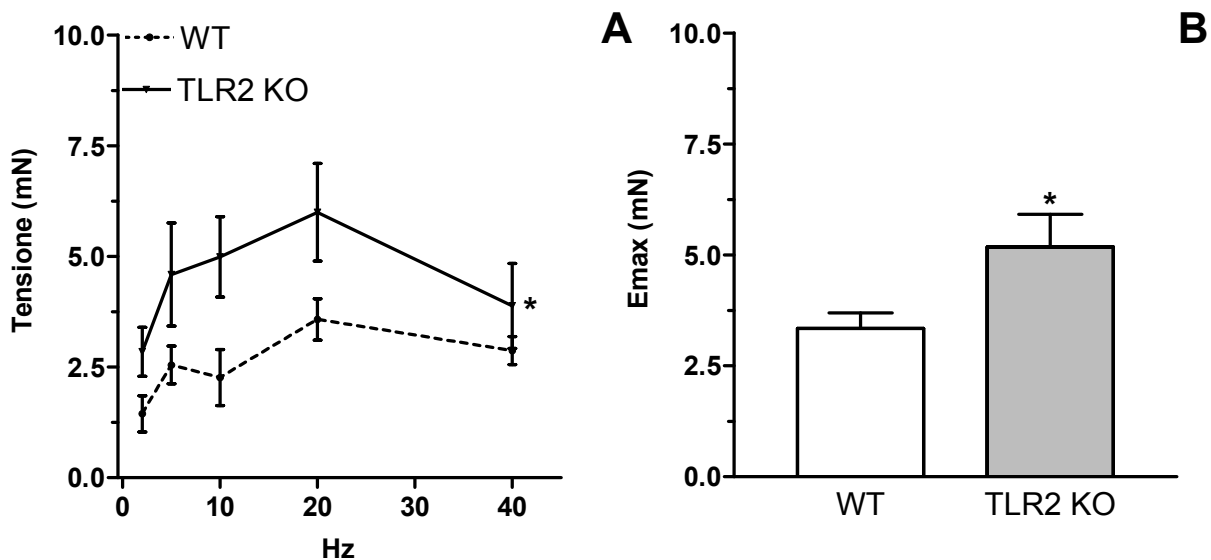
La stimolazione elettrica (40V) ha evocato contrazioni frequenza-dipendenti nell'intervallo compreso tra 2 e 40 Hz (Figura 27A), di origine nervosa e di natura prevalentemente colinergica. Come si può osservare in Figura 27A, la tensione sviluppata dai preparati isolati da topi TLR2 KO è risultata maggiore rispetto a quella misurata nei WT, con aumento dei valori di Emax del 55% (Figura 27B).



**Figura 25:** Curva concentrazione effetto del **carbacolo** (CCh; 0,01 - 3  $\mu$ M; Pannello A) e valori di Emax calcolati (Pannello B) in segmenti isolati ileo prelevati da topi WT e TLR2 KO, inoculati con cellule Vero. I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 10 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ .



**Figura 26:** Effetto del trattamento con **KCl** 60 mM in preparati di ileo prelevati da topi WT e TLR2 KO, inoculati con cellule Vero. I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 20 esperimenti. \*\* =  $p < 0,01$ .

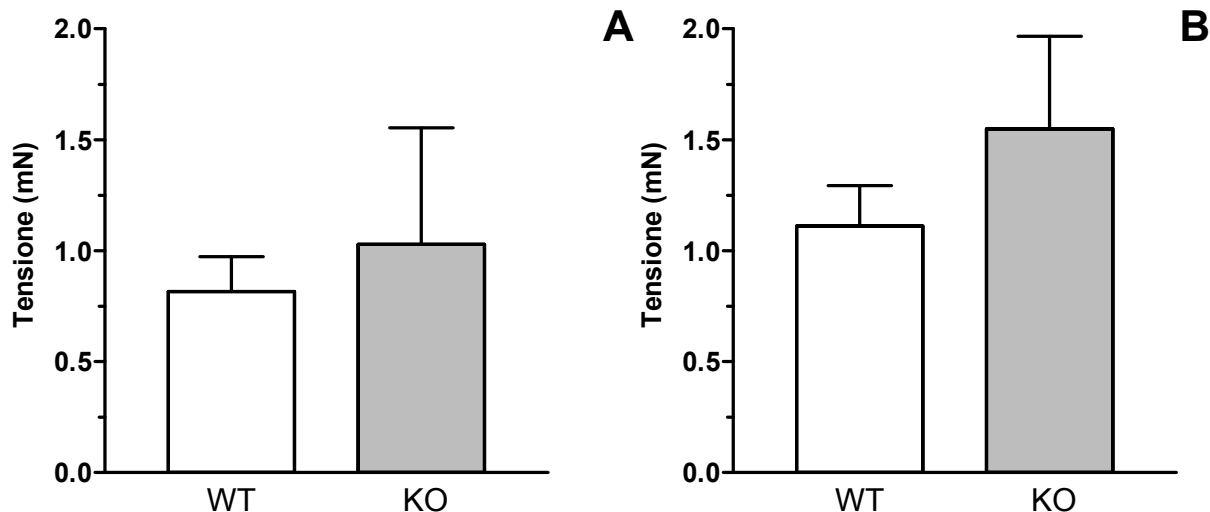


**Figura 27:** Effetto della **stimolazione elettrica** (40V) a frequenze crescenti (2-40 Hz; Pannello A) in preparati di ileo prelevati da topi controllo WT e TLR KO, inoculati con cellule Vero e valori di Emax (Pannello B) calcolati. I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 12 esperimenti. \* =  $p < 0,05$ .

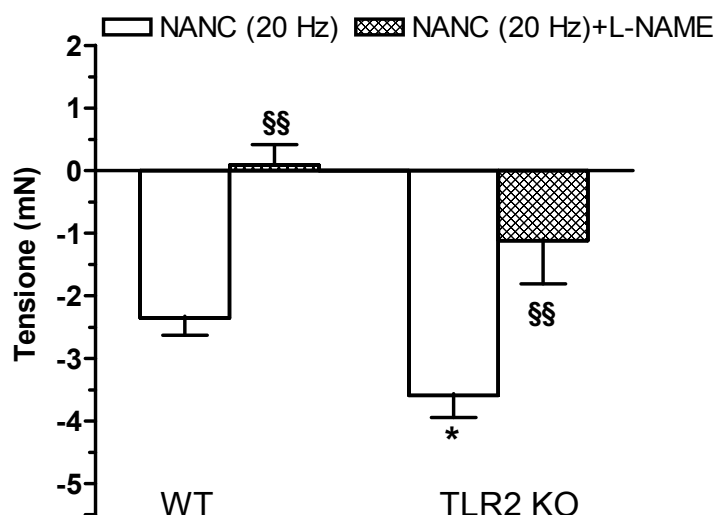
Si è anche studiato l'effetto della delezione del gene sulla risposta contrattile recettore-mediata, usando 5HT 3  $\mu$ M e SP 3  $\mu$ M.

Come si può osservare in Figura 28, per entrambi gli agonisti le risposte contrattili non evidenziano differenze fra topi KO per TLR2 e WT.

È stata infine valutata la risposta NANC alla EFS (40V; 20 Hz): la mancanza del TLR2 si traduce in un aumento del rilasciamento, che viene pressoché abolito dalla presenza di L-NAME (Figura 29).



**Figura 28:** Effetto del trattamento con 5HT 3 μM (Pannello A) e con SP 3 μM (Pannello B) in preparati di ileo prelevati da topi WT TLR KO, inoculati con cellule Vero. I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media ± SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. \* = p<0,05.



**Figura 29:** Effetto della **stimolazione elettrica** (40V; 20 Hz) in preparati di ileo prelevati da topi WT e TLR2 KO, inoculati con cellule Vero, pretrattati con atropina 1 μM e guanetidina 3 μM in assenza (NANC) ed in presenza di L-NAME 100 μM (NANC+L-NAME). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media ± SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. \* = p<0,05 vs WT; §§ = p<0,01 vs NANC (20 Hz).

I risultati ottenuti dallo studio dell'effetto della delezione del gene che codifica per il TLR2 sulla contrattilità di preparati di ileo di topo sono riassunti nella seguente tabella:

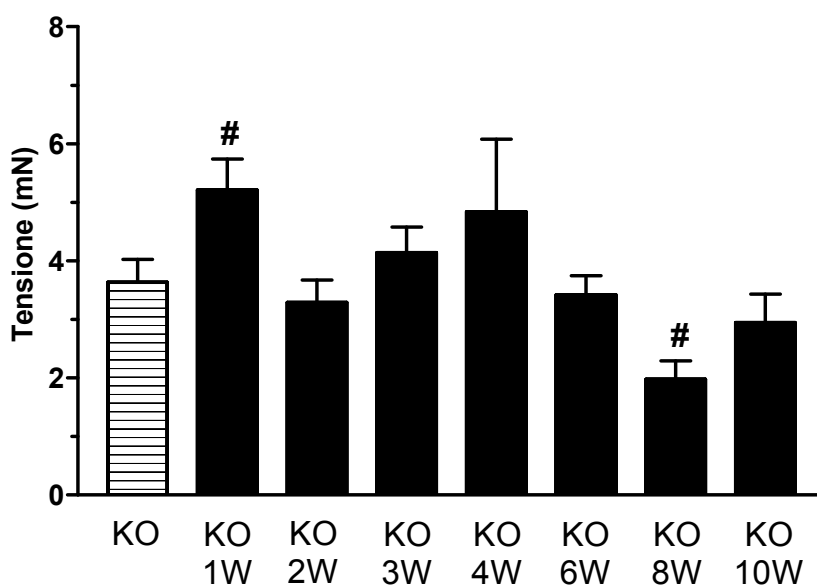
| TLR2 KO vs WT               |   |
|-----------------------------|---|
| Carbacolo (1 μM)            | ↑ |
| KCl (60 mM)                 | ↑ |
| 5-HT (3 μM)                 | — |
| SP (3 μM)                   | — |
| EFS (20 Hz)                 | ↑ |
| EFS NANC (20 Hz)            | ↑ |
| EFS NANC (20 Hz)<br>+L-NAME | ↓ |

**Tabella 4:** Effetto della delezione del gene che codifica per il TLR2 sulla risposta contrattile recettore-mediata e non- in preparati di ileo prelevati da topi WT e TLR2 KO, inoculati con cellule Vero.

### **Effetto del trattamento in vivo con HSV-1 sulla risposta contrattile di preparati di ileo isolato da topi TLR2 KO**

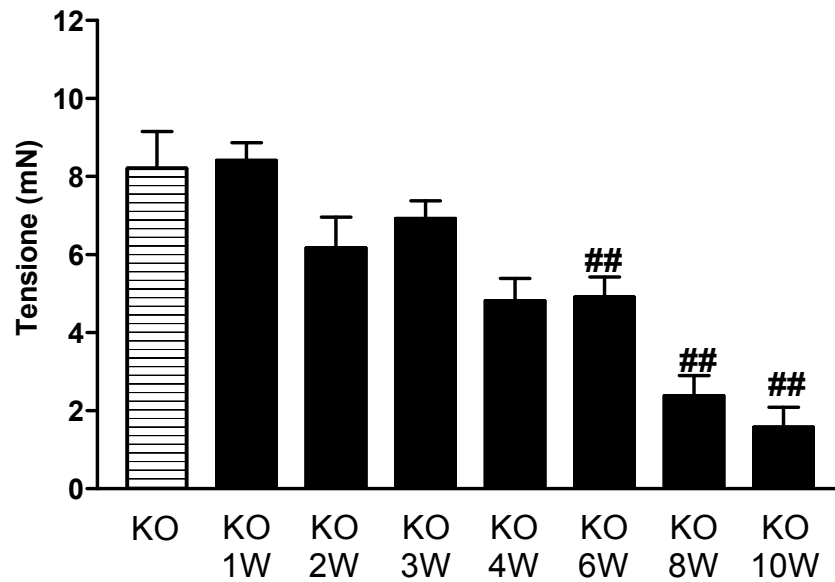
Per verificare l'ipotesi che i recettori TLR2 siano implicati nelle alterazioni contrattili osservate in seguito alla infezione con HSV-1, sono stati utilizzati topi TLR2 KO sottoposti al trattamento con il virus da una a dieci settimane.

Nei topi TLR2 KO l'infezione virale ha alterato la risposta contrattile al carbacolo 1  $\mu$ M solamente ad una (+44%) e ad otto settimane (-45%) dall'inoculo IG (Figura 30). L'esposizione a KCl 60 mM ha evidenziato nei TLR2 KO una riduzione della contrazione rispetto a quella ottenuta in preparati di animali di controllo a sei, otto e dieci settimane dal trattamento (Figura 31). La stimolazione elettrica (40V; 20 Hz) ha evocato contrazioni significativamente inferiori a partire da due e fino a dieci settimane dall'infezione (Figura 32). In esperimenti condotti ad una ed a otto settimane dalla somministrazione IG del virus, la delezione del gene che codifica per TLR2 non ha alterato significativamente le risposte alla 5HT 3  $\mu$ M, alla SP 3  $\mu$ M o alla stimolazione elettrica (40V; 20 Hz) NANC in presenza ed in assenza di L-NAME (Figure 33 e 34). Anche nei preparati isolati da animali transgenici inoculati con il virus l'inibizione della sintesi di ossido nitrico riduce o abolisce il rilascio NANC causato dalla EFS (Figura 34).

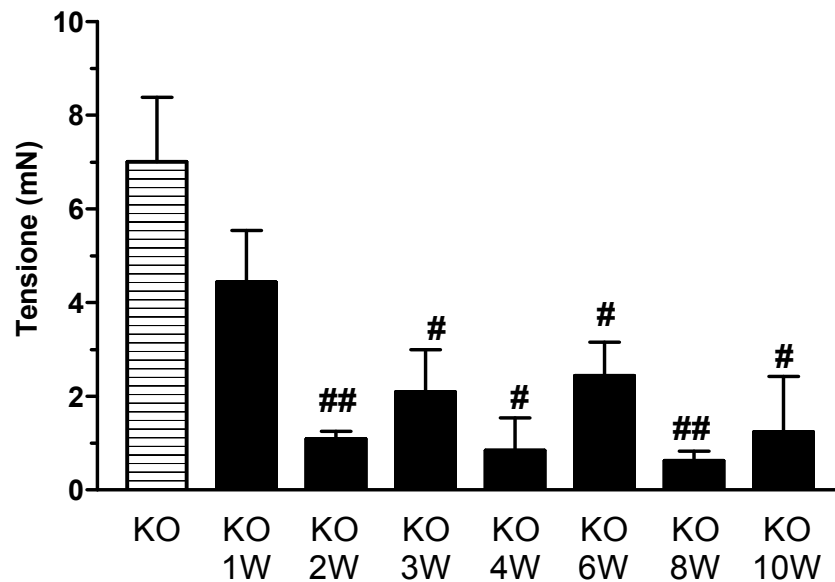


**Figura 30:** Effetto del trattamento con **carbacolo** 1  $\mu$ M in preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO (KO) controllo, inoculati con cellule Vero, e infettati con HSV-1 da 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 10-20 esperimenti. # =  $p < 0,05$  vs TLR2 KO.

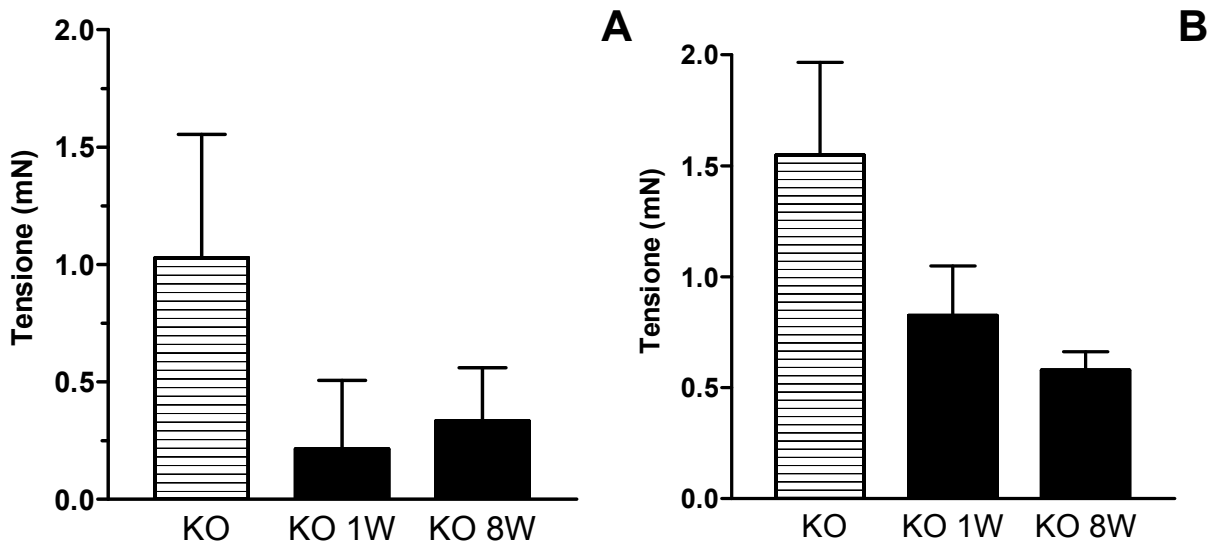




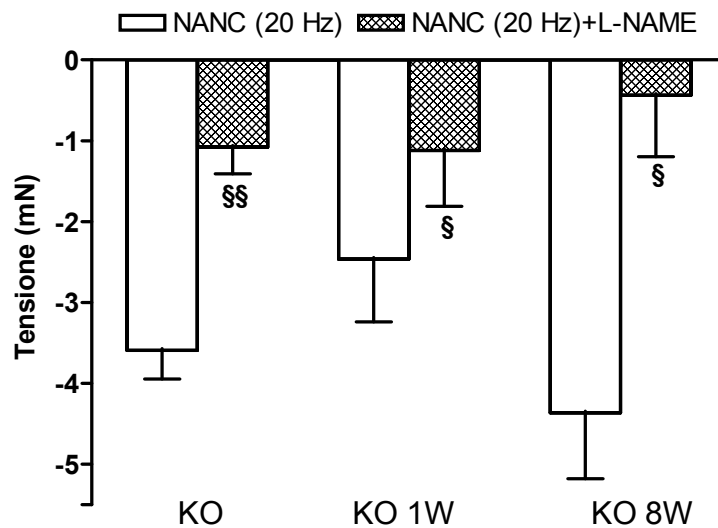
**Figura 31:** Effetto del trattamento con **KCl** 60 mM in preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO (KO) controllo, inoculati con cellule Vero, e infettati con HSV-1 da 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 10-20 esperimenti. ## =  $p < 0,01$  vs TLR2 KO.



**Figura 32:** Effetto della **stimolazione elettrica** (20 Hz) in preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO (KO) controllo, inoculati con cellule Vero, e infettati con HSV-1 da 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 6-12 esperimenti. \* =  $p < 0,05$  vs WT; # =  $p < 0,05$  vs TLR2 KO; ## =  $p < 0,05$  vs TLR2 KO.



**Figura 33:** Effetto del trattamento con **5-HT** 3  $\mu$ M (Pannello A) e con **SP** 3  $\mu$ M (Pannello B) in preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO (KO) controllo, inoculati con cellule Vero, e infettati con HSV-1 da 1 e 8 settimane (W). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti.



**Figura 34:** Effetto della **stimolazione elettrica** a 20 Hz in preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO (KO) controllo, inoculati con cellule Vero e infettati con HSV-1 da 1 e 8 settimane (W), pretrattati con atropina 1  $\mu$ M e guanetidina 3  $\mu$ M in assenza (NANC) ed in presenza di L-NAME 100  $\mu$ M (NANC+L-NAME). I dati, espressi in milliNewton (mN), sono la media  $\pm$  SEM dei risultati ottenuti da 4-6 esperimenti. § =  $p < 0,05$  vs vs NANC (20 Hz); §§ =  $p < 0,01$  vs NANC (20 Hz).

I principali risultati riguardanti l'effetto dell'infezione da HSV-1 sulla contrattilità di preparati di ileo di topo TLR2 KO sono riassunti nella seguente tabella:

| <b>TLR2 KO+HSV-1 vs TLR2 KO</b> | <b>1W</b> | <b>8W</b> |
|---------------------------------|-----------|-----------|
| Carbacolo (1 $\mu$ M)           | ↑         | ↓         |
| KCl (60 mM)                     | —         | ↓         |
| 5-HT (3 $\mu$ M)                | —         | —         |
| SP (3 $\mu$ M)                  | —         | —         |
| EFS (20 Hz)                     | —         | ↓         |
| EFS NANC (20 Hz)                | —         | —         |
| EFS NANC (20 Hz)<br>+L-NAME     | —         | —         |

**Tabella 5:** Effetto del trattamento con HSV-1 sulla risposta contrattile recettore-mediata e non- in preparati di ileo prelevati da topi TLR2 KO infettati con HSV-1 da 1 e 8 settimane (W), rispetto a quella ottenuta da segmenti di topi TLR2 KO controllo, inoculati con cellule Vero.

## DISCUSSIONE

Il virus HSV-1 è caratterizzato da uno spiccato neurotropismo e dalla capacità di permanere in uno stato di latenza nel sito primario di infezione. È noto ormai da tempo che l'HSV-1 è in grado di rimanere in forma quiescente nei gangli del trigemino, mentre la capacità di diffondere anche a livello enterico è stata dimostrata solamente nel 1996 da Gesser e collaboratori nel corso di esperimenti condotti su topi trattati con HSV-1 mediante inoculo nel lume esofageo (Gesser e Koo, 1996).

Recentemente, nei laboratori del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università di Padova è stato allestito un modello di infezione enterica da HSV-1 nel ratto mediante un protocollo che prevede una prima instillazione IN ed un secondo inoculo eseguito per via IG. Il trattamento non determina un significativo aumento della mortalità o anomalie macroscopiche del tratto Gi dal punto di vista clinico ed istopatologico (De Giorgio et al., 2007). Gli studi condotti nel mio periodo di dottorato hanno avuto come scopo la valutazione degli effetti del trattamento in vivo con HSV-1 sulla contrattilità intestinale in questi animali..

Nella prima fase dello studio è stata esaminata la risposta dei preparati di ileo di ratto a concentrazioni crescenti di carbacolo (0,01 - 100  $\mu$ M), agonista non selettivo dei recettori muscarinici. Il carbacolo contrae la muscolatura liscia intestinale mediante stimolazione dei recettori muscarinici. In particolare, nella muscolatura liscia GI i recettori M2 sono espressi in genere con un rapporto di 5:1 rispetto agli M3 (Okamoto et al., 2002). Studi condotti su preparati di ileo di ratto hanno dimostrato che la contrazione è mediata principalmente dai recettori M3 (Lecci et al., 2002; Uchiyama e Williams, 2004). Successivamente Ohama e collaboratori hanno evidenziato che questi recettori sono coinvolti in primo luogo nella contrazione della muscolatura circolare, mentre la risposta contrattile dello strato longitudinale sembra mediata soprattutto dagli M2 (Ohama et al., 2007).

Nell'ileo di ratti infettati con HSV-1 per una e sei settimane, i valori di Emax ottenuti dal trattamento con carbacolo sono aumentati in maniera significativa, rispettivamente del 50% e del 72% rispetto al controllo. Gli studi di biologia molecolare hanno stabilito che l'infezione con HSV-1 è presente allo stato di latenza nel cervello e nei GM di tutti gli animali trattati con il doppio inoculo. Tuttavia, l'espressione di HSV-1 tk, proteina indice della presenza del virus, è diminuita progressivamente nel SNE di ratti inoculati attraverso la via IG da una a dieci settimane. Inoltre, dopo una settimana e, in maniera meno evidente, dopo due settimane dall'inoculo IG è stata evidenziata nei GM l'espressione di trascritti ICP-4, sintetizzata da HSV-1 all'esordio dell'infezione (Brun et al., 2010). Dal momento che l'ICP-4 determina la repressione della trascrizione del gene virale LAT (Wyrwicz e Rychlewski, 2007), il ritrovamento di trascritti ICP-4 evidenzia che il virus si trova in uno stato di replicazione, che

tuttavia risulta essere di tipo abortivo, poiché è stata dimostrata l'assenza di espressione dei trascritti tardivi virali gD e VP16 (Brun et al., 2010).

Alla luce di queste osservazioni, l'alterazione della risposta alla stimolazione muscarinica ad una settimana dall'inoculo IG sembra verosimilmente riconducibile ad uno stato "acuto" dell'infezione, durante il quale il virus tenta di replicarsi. Tuttavia l'HSV-1 modifica la contrattilità intestinale anche a sei settimane, nello stadio tardivo dell'infezione.

Nello strato neuromuscolare dell'intestino dei ratti trattati con HSV-1, pur non essendo stata evidenziata la presenza di infiltrati infiammatori macroscopici né siano state rilevate alterazioni nell'attività della mieloperossidasi, è stato dimostrato un incremento significativo di IL-2 e INF- $\gamma$  ad una ed a sei settimane e di TNF- $\alpha$  a quattro e sei settimane dall'inoculo IG. Inoltre, è stata evidenziata la presenza di cellule CD3+ adiacenti ai GM dei ratti a sei settimane (Brun et al., 2010). È ben noto che i processi infiammatori e l'attivazione del sistema immunitario nel tratto GI modificano la contrattilità e che la tipologia e l'entità dell'alterazione neuromotoria sono strettamente correlate alla natura dell'attivazione immunitaria (Akiho et al., 2007; Khan e Collins, 2004, Collins, 1996). In particolare, numerosi studi su modelli animali hanno dimostrato che le citochine e le chemochine svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della contrattilità intestinale e che citochine diverse esercitano effetti differenti sulla risposta contrattile (Aubé et al., 1998; Moreels et al., 2001; Moreels et al., 2004; Ozaki et al., 2005; Kinoshita et al., 2006; Akiho et al., 2007). Oltre a questo, in modelli animali di infiammazione enterica è stata evidenziata una variazione del rapporto dell'espressione dei recettori M2 ed M3 verso una predominanza degli M2, con una conseguente variazione dalla risposta contrattile (Ohama et al., 2007).

Per chiarire i meccanismi che stanno alla base dell'alterata risposta, l'effetto contratturante del CaCl<sub>2</sub> è stato valutato nei preparati mantenuti in Tyrode depolarizzante senza calcio, che aumenta la sensibilità del tessuto nei confronti dello ione calcio (Edman e Schild, 1962). L'aumento di calcio citoplasmatico è considerato il principale meccanismo in grado di indurre la contrazione del muscolo liscio: lo ione, legandosi alla calmodulina, attiva la chinasi della catena leggera della miosina (MLC), fosforilandola. L'actina si lega poi alla MLC fosforilata provocando la contrazione della cellula attraverso l'accorciamento delle fibre actina-miosina (Webb, 2003). Un aumento di calcio nel citoplasma delle cellule nervose può invece determinare il rilascio di neurotrasmettitori. Il calcio può entrare nelle cellule attraverso i canali del calcio attivati da ligando o regolati dal voltaggio o attivati in seguito a deplezione dello ione nei siti di deposito (Rang et al., 2005). I canali del calcio voltaggio dipendenti (VGCC) sono stati classificati in base alle proprietà farmacologiche ed elettrofisiologiche in: L, N, P/Q, R e T (Catterall et al., 2005). Attualmente, sulle base delle informazioni ottenute dagli studi di clonaggio molecolare di  $\alpha_1$ , la principale subunità dei VGCC, è stata adottata anche una diversa nomenclatura. I VGCC L sono denominati CaV1.1 e CaV1.4, gli N CaV2.2, i P/Q CaV2.1, gli R CaV2.3, i T CaV3.1 e CaV3.3 (Catterall et al., 2005; Currò,

2010). I VGCC di tipo L (CaV1) sono attivati da una marcata depolarizzazione e rappresentano la principale via d'entrata dello ione muscolare nelle cellule muscolari lisce. E' stata comunque dimostrata la presenza di VGCC L anche nei neuroni enterici di ratto e di cavia (Kirchgessner, 1999; Currò, 2010), ma l'entrata di calcio attraverso questi canali non sembra determinare la liberazione di neurotrasmettitori dai neuroni mienterici nella cavia (Bian et al., 2004). I VGCC N, P/Q ed R sono espressi principalmente nei neuroni e richiedono anch'essi una forte depolarizzazione per essere attivati. L'apertura dei canali di tipo T, infine, è dovuta ad una debole depolarizzazione. Questi canali sono espressi in diverse tipi di cellule e sono coinvolti nella generazione del potenziale d'azione (Ertel et al., 2000; Currò, 2010).

Il trattamento in vivo con HSV-1 ha incrementato significativamente la risposta al  $\text{CaCl}_2$  nell'ileo ad una settimana dall'inoculo IG, indicando una aumentata sensibilità allo ione. Danni a livello della muscolatura intestinale possono essere associati ad un aumento dei livelli di calcio intracellulare, modificando l'omeostasi e variando l'accumulo dello ione nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri. Tale evento può essere causa di alterazioni contrattili, in particolare nella risposta mediata da agonisti (Lopes et al., 2006).

La contrazione indotta dall'elevata concentrazione di calcio si è mantenuta tendenzialmente elevata nei segmenti di ileo a due settimane dal secondo inoculo con il virus, per poi ritornare a livelli paragonabili a quelli del controllo negli animali trattati da quattro settimane. Il pretrattamento con verapamile, bloccante dei VGCC di tipo L, ha ridotto significativamente la contrazione evocata dal  $\text{CaCl}_2$  in tutti i preparati, ma non ha abolito l'aumento della risposta nei segmenti isolati da ratti trattati per via IG da una settimana, suggerendo che a breve termine la sensibilizzazione al calcio in risposta ad HSV-1 non dipende dall'apertura dei canali L. La tensione sviluppata in seguito ad esposizione a  $\text{CaCl}_2$  è aumentata rispetto al tessuto dei ratti di controllo anche nei preparati di ileo a sei settimane dalla seconda esposizione al virus. In questo caso, però, il verapamile ha abolito tale aumento, che in questa fase tardiva dell'infezione sarebbe quindi legato strettamente all'apertura dei VGCC di tipo L. È stato dimostrato che i canali di tipo L, N e P contribuiscono solo per il 50% all'entrata di calcio nei neuroni mienterici di cavia, i VGCC R sembrano contribuire per il restante 50% (Bian et al., 2004). Ad una settimana dal secondo inoculo si può quindi ipotizzare una variazione contrattile dovuta principalmente ad alterazioni a livello neuronale, riconducibile all'interazione diretta del virus con il SNE. A sei settimane dal trattamento IG la variazione della contrattilità potrebbe invece essere causata da anomalie muscolari, verosimilmente imputabili all'infiammazione enterica indotta da HSV-1 (Brun et al., 2010).

Le alterazioni delle risposte contrattili al carbacolo e al  $\text{CaCl}_2$  sembrano seguire lo stesso andamento ed appaiono strettamente collegate. In animali affetti da diabete mellito è stato dimostrato un aumento della risposta alla stimolazione muscarinica: tale variazione è stata attribuita all'aumento di densità e di sensibilità dei recettori muscarinici oltre ad una maggiore

reattività del muscolo nei confronti del calcio (Uchiyama e Williams, 2004). In un modello di stress neonatale indotto nel ratto è stato documentato un aumento della contrazione evocata dall'acetilcolina e dal BAY K 8644 (un attivatore dei VGCC di tipo L), oltre ad un'incremento dell'espressione della subunità  $\alpha 1c$  dei VGCC L a livello del colon (Zhang et al., 2010).

La depolarizzazione indotta da un'elevata concentrazione di potassio determina l'apertura dei VGCC presenti nella membrana plasmatica delle cellule intestinali, con una conseguente entrata di calcio nello spazio citoplasmatico (Sanders, 2000). Tale evento è responsabile della contrazione della muscolatura liscia e del rilascio di neurotrasmettitori nelle cellule nervose (Ganong, 1991; Paton e Zar, 1968).

Ad una ed a due settimane dal secondo inoculo con HSV-1 la risposta contratturante al KCl è risultata significativamente diminuita. L'ipotesi di una ridotta capacità contrattile dei preparati nella prima fase dell'infezione è in disaccordo con l'aumento della risposta al carbacolo ed al calcio, dimostrata nelle precedenti serie di esperimenti. Considerato lo spiccato neurotropismo dell'HSV-1, appare plausibile ipotizzare un'alterata risposta imputabile ad un modificato rilascio di neurotrasmettitori in seguito a stimolazione con KCl. Per verificare l'influenza di HSV-1 sulla liberazione di acetilcolina, il principale neurotrasmettitore eccitatorio nell'intestino, i segmenti di ileo isolato da ratti trattati per via IG da una e sei settimane sono stati incubati con [ $^3$ H]Ch prima della depolarizzazione con KCl 60 mM. La depolarizzazione ha causato un aumento del rilascio di trizio da tutti i preparati, che è risultato significativamente minore del controllo nei segmenti isolati da animali esposti al virus sia ad una che a sei settimane dall'inoculo IG. I risultati ottenuti sui segmenti prelevati da ratti infettati da una settimana confermano dunque che la ridotta risposta contrattile indotta dal KCl sarebbe causata da un ridotto rilascio di acetilcolina neuronale dalle terminazioni nervose, a ulteriore supporto dell'ipotesi formulata sulla base dei dati ottenuti negli esperimenti con  $\text{CaCl}_2$  in presenza di verapamile (Brun et al., 2010). Al contrario, dal momento che a sei settimane la riduzione del rilascio di acetilcolina non si traduce in una variazione della risposta all'agente depolarizzante, si può proporre che l'aumento della contrazione a livello muscolare compensi l'incapacità dell'organo di liberare il neurotrasmettitore.

La sola instillazione IN del virus non è sufficiente a determinare alterazioni nella risposta al carbacolo, al KCl ed al  $\text{CaCl}_2$ . È stato dimostrato che tale inoculo non è in grado di promuovere la diffusione del virus fino ai neuroni enterici (Brun et al., 2010): è quindi necessaria la presenza dell'HSV-1 nel SNE per produrre variazioni di contrattilità.

La stimolazione elettrica ha indotto contrazioni proporzionali alla frequenza degli stimoli nell'intervallo da 2 a 40 Hz, completamente abolite dal pretrattamento con TTX, ad indicarne l'origine esclusivamente neuronale e prevalentemente colinergica, poiché sono state quasi completamente abolite dall'atropina. La risposta evocata dalla stimolazione elettrica a 10, 20, 40 Hz è risultata significativamente aumentata in seguito a trattamento degli animali con il

virus per una settimana, confermando la presenza di un'alterazione della neurotrasmissione colinergica nella prima fase dell'infezione con HSV-1.

L'alterazione della contrazione promossa dall'acetilcolina endogena liberata in risposta alla EFS può essere dovuta, oltre ad una risposta contrattile abnorme, frutto di anomalie recettoriali, anche a variazioni della sintesi, del deposito o del rilascio del neurotrasmettitore. A differenza della risposta alla stimolazione elettrica, che riflette la funzionalità delle terminazioni colinergiche, l'esposizione a KCl determina depolarizzazione dei neuroni, con conseguente rilascio di tutta l'acetilcolina presente nel tessuto (Bercik et al., 2002).

Oltre ai neurotrasmettitori del sistema colinergico e adrenergico, anche peptidi (tachichinine, SP, VIP), ammine (5HT, dopamina), nucleotidi e nucleosidi purinici e piccole molecole di origine gassosa (NO) regolano la motilità del tratto intestinale e per questo sono definiti neurotrasmettitori NANC (Ganong, 1991). L'acetilcolina e le tachichinine sono considerate trasmettitori eccitatori, mentre ATP, NO, VIP, PACAP (peptide ipofisario attivante l'adenilato ciclasi), sono i mediatori della trasmissione inibitoria (Olsson e Holmgren, 2002).

In presenza di atropina e guanetidina, atte ad impedire l'attivazione colinergica e quella adrenergica, la stimolazione elettrica a 20 Hz ha prodotto un significativo aumento del rilasciamento nei segmenti di ileo isolati da animali esposti al virus per una settimana, ad indicare che l'infezione ha influenzato anche la componente NANC della trasmissione nervosa enterica.

La 5HT è un neurotrasmettitore del SNC, ma la sua presenza è stata dimostrata anche nel tratto GI sia a livello dei neuroni che delle cellule enterocromaffini (EC) (Tack e Sarnelli, 2002). Si conoscono sette classi di recettori per la 5HT, ma solo cinque (5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>7</sub>) sembrano coinvolte nella regolazione della motilità intestinale (Upadhyay, 2003; Zhao et al., 2006). Il legame dell'agonista con il recettore 5HT<sub>2</sub> causa un effetto di tipo eccitatorio diretto sulle cellule muscolari lisce, mentre l'interazione con i recettori 5HT<sub>3</sub> e 5HT<sub>4</sub> controlla il rilascio di neurotrasmettitori dalle cellule nervose (Rang et al., 2005).

Nell'ileo di ratti trattati da una e sei settimane i valori di E<sub>max</sub> per la 5HT sono diminuiti del 38% e del 52%, indicando una compromissione del sistema serotonergico a livello neuronale e/o muscolare. In modelli animali (Linden et al., 2003; Linden et al., 2005; Wheatcroft et al., 2005) come pure nel colon di pazienti affetti da IBS (Coates et al., 2004) è stato in precedenza dimostrato che, ai processi di tipo infiammatorio che coinvolgono la mucosa intestinale, è associata una marcata riduzione dei trasportatori che permettono la ricaptazione della 5HT. Una minore espressione dei trasportatori induce la desensibilizzazione dei recettori della 5HT, determinando una riduzione della risposta alla stimolazione serotonergica (Linden et al., 2003). È stata inoltre evidenziata un'alterata espressione dei recettori per la 5HT (in particolare del recettore 5HT<sub>2a</sub>) in modelli animali di infiammazione enterica (Wells e Blennerhassett, 2005; Zhao et al., 2006).

Nella maggior parte degli studi condotti su modelli animali di dismotilità intestinale l'alterazione è univoca: aumento della risposta a tutti gli stimoli, recettoriali e non, oppure diminuzione della stessa (Kaya et al., 2002; Moreels et al., 2001; Venkova et al., 1999; Koyluoglu et al., 2002; Barbara et al., 1997). I modelli di alterazione della motilità più utilizzati sono caratterizzati da marcata infiammazione, associata al danno tissutale ottenuto con l'impiego di agenti irritanti o patogeni o trattamento chirurgico. Il sacrificio di questi animali avviene in tempi ben precisi, corrispondenti alla fase di infiammazione acuta, a quella di risoluzione dell'evento infiammatorio ed a quella di eliminazione del fattore scatenante. In questo studio le alterazioni della contrattilità dovute al trattamento in vivo con HSV-1 sono invece riconducibili ad un basso grado di infiammazione oppure a variazioni che la presenza del virus determina a livello muscolare e/o nervoso. Nel 1977 McComas ha suggerito che la maggior parte delle miopatie possa essere in realtà causata da neuropatie e che il coinvolgimento del muscolo può dunque essere solamente un evento secondario. Nervo e muscolo, in ogni caso, risultano così strettamente collegati che spesso è difficile discriminare il tessuto da cui origina l'anomalia (Vrbova, 1983).

Le alterazioni della contrattilità causate dal HSV-1 presentano un andamento di tipo "on and off", poiché nei ratti sacrificati a tempi intermedi non si osservano variazioni. È stato proposto che l'infezione latente con HSV-1 possa essere "persistente" oppure "intermittente", poiché sembra caratterizzata da una ridotta ma dinamica espressione genica virale. I linfociti T e l'espressione di citochine antivirali (come l'IFN- $\gamma$  e il TNF- $\alpha$ ) e di chemochine (RANTES), sembrano svolgere un ruolo fondamentale nel controllo dello stato di latenza del virus (Khanna et al., 2004). Durante lo stato di riattivazione, come è stato dimostrato nelle infezioni erpetiche ricorrenti sulla cute umana, l'infezione stimola la produzione di IFN- $\gamma$  dalle cellule T CD4+ del sangue e la liberazione di IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , chemochine di tipo  $\beta$  e IL-12 sia dalle cellule epiteliali che dalle cellule immunitarie dell'infiltrato infiammatorio nel caso di lesioni citopatiche (Cunningham et al., 2006). Nel 2004 Mogensen e collaboratori hanno dimostrato inoltre che l'HSV-1 tende a sopprimere la risposta antivirale dell'ospite, influenzando la produzione di citochine nei differenti stadi dell'infezione. L'interazione tra il virus e risposta immunitaria potrebbe essere quindi alla base delle differenti alterazioni osservate ai diversi tempi dall'inoculo. È stato dimostrato inoltre, in colture di neuroni sensoriali, che nel corso delle prime ore dall'esposizione ad HSV-1 sono rilevabili alterazioni di eccitabilità delle cellule nervose, probabilmente dovute alla soppressione della sintesi proteica che si verifica nello stadio attivo dell'infezione. Il turnover delle proteine di membrana della cellula ospite potrebbe in questo caso risultare ridotto per il blocco della sintesi proteica dovuta alla presenza del virus (Mayer et al., 1986). Kramer e collaboratori hanno dimostrato che l'HSV-1 può determinare evidenti alterazioni dell'espressione genica in colture neuronali murine, infettate da trenta giorni e in cui il virus è allo stato di latenza. E' stata dimostrata anche la variazione dell'espressione dei geni che regolano la neurotrasmissione, compresi quelli che



codificano per i canali del potassio voltaggio-dipendenti e i recettori muscarinici (Kramer et al., 2003). L'ipotesi generalmente più accreditata è che il virus abbia effetti sulla risposta immunitaria e sul sistema nervoso, inducendo alterazioni motorie con conseguente variazioni di espressione genica. L'HSV-1 potrebbe invece esercitare effetti diretti nell'ospite, modificando l'espressione genica e determinando così alterazioni croniche nell'organismo che lo ospita. Non esistono comunque evidenze che escludano il verificarsi di entrambi i meccanismi (Kramer et al., 2003).

Una volta stabilito che l'infezione enterica con HSV-1 rappresenta un modello innovativo di alterazione della motilità intestinale, valido sia per indagare le alterazioni indotte dai virus neurotropi sull'attività neuromuscolare del tratto digerente che i meccanismi patofisiologici coinvolti nei disturbi motori a carico del tratto GI, l'attenzione si è focalizzata sul sistema purinergico, di cui è noto il coinvolgimento nelle patologie infiammatorie enteriche e/o post-infettive (Cavalcante et al., 2006; Antonioli et al., 2007; Fornai et al., 2008). Le azioni fisiologiche dell'adenosina presente nello spazio extracellulare dipendono dalla sua disponibilità in prossimità dei suoi recettori, che a sua volta è direttamente correlata ai processi di produzione, rilascio, captazione e metabolismo (Thorn Jarvis, 1997; Akkari et al., 2006; Bours et al., 2006). In seguito ad un insulto quale ischemia, ipossia, trauma, infiammazione, la concentrazione extracellulare di adenosina può raggiungere livelli cento volte superiori a quelli rilevati in condizioni fisiologiche. Studi di immunoistochimica condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che tutti e quattro i recettori dell'adenosina sono espressi in maniera costitutiva nell'ileo di ratto e mostrano una distribuzione regione-specifica (Bin, 2008). L'esposizione dei preparati di ileo ad adenosina si traduce in una lenta contrazione della muscolatura liscia, talvolta preceduta da una marginale e transitoria riduzione della tensione. La curva concentrazione-risposta per l'azione contratturante dell'adenosina è risultata significativamente spostata verso il basso nell'ileo di ratti trattati con HSV-1 da una e da sei settimane, suggerendo una riduzione nell'espressione o della funzionalità dei recettori P1.

L'analogo stabile dell'adenosina R-PIA è considerato agonista A1 nell'intervallo di concentrazioni 0,001-3  $\mu$ M (Reeves et al., 1993; Peachey et al., 1994; Duarte-Araùjo et al., 2004). La risposta a questo agonista è aumentata significativamente solamente ad una settimana dal trattamento con il virus. La riduzione della risposta all'adenosina sia ad una che a sei settimane dal trattamento con il virus appare in disaccordo con questo risultato. Dal momento che R-PIA è un analogo stabile dell'adenosina non soggetto a fenomeni di degradazione enzimatica, non è da escludere che la ridotta risposta evocata dal nucleoside dipenda da eventuali variazioni nell'espressione di ADA, enzima responsabile della conversione della purina ad inosina. Esperimenti di western blotting hanno infatti dimostrato che l'espressione di ADA è influenzata dalla presenza del virus, che ne induce un aumento ad una ed a sei settimane dall'infezione nell'ileo dei ratti trattati. Nella muscolatura

longitudinale l'espressione di ADA appare aumentata solamente ad una settimana dal trattamento con l'agente patogeno. Al contrario dopo sei settimane la sua espressione sembra ridotta rispetto ai campioni isolati da animali sani.

Il ruolo di ADA nell'infiammazione intestinale è stato dimostrato in modelli di colite indotta, dove l'inibizione dell'enzima non solo determina un miglioramento dei parametri indicatori dello stato patologico (come ad esempio l'aumento di peso) ma anche una riduzione dei livelli di alcune citochine nel plasma degli animali, ad esempio di TNF- $\alpha$  (Antonioli et al., 2007). Anche nel nostro modello, è stato evidenziato un aumento di TNF- $\alpha$  nell'intestino dei ratti trattati con HSV-1 da quattro e sei settimane e di IL-2 e IFN- $\gamma$  ad una e sei settimane dall'inoculo IG, a suggerire che anche un basso grado di infiammazione enterica può influenzare l'espressione di ADA.

Studiando gli effetti di concentrazioni massimali di CCPA e dal CGS 21680 (agonisti selettivi rispettivamente dei recettori A1 ed A2a), e la capacità di DPCPX (antagonista selettivo dei recettori A1) e ZM 241385 (antagonista selettivo dei recettori A2a) di prevenire la risposta all'adenosina, si è osservato che l'HSV-1 ha ridotto la contrazione evocata dal CCPA ad una ed a sei settimane dall'inoculo IG, ad indicare una variazione della sensibilità o dell'espressione dei recettori A1. Nell'ileo di ratti infettati da una e sei settimane la risposta massimale all'adenosina è risultata significativamente minore rispetto a quella dei controlli, tuttavia tale alterazione si verifica anche in seguito a pretrattamento con l'antagonista dei recettori A1. Questo risultato, è in contrasto con la risposta osservata al CCPA. La stimolazione dei recettori P1 con agonisti induce contrazione della muscolaris mucosae di ileo, colon e duodeno di ratto senza coinvolgere la componente colinergica neuronale (Bailey e Hourani, 1990; Bailey et al., 1992; Reeves et al., 1993; Reeves et al., 1995; Nicholls et al., 1996; Nicholls e Hourani, 1997), tuttavia è stato dimostrato che agonisti come R-PIA e CGS 21680 influenzano anche la liberazione di acetilcolina dalle terminazioni nervose dell'ileo di ratto (Duarte-Araujo et al., 2004).

La DPCPX ha determinato un significativo aumento della contrazione evocata dall'adenosina solamente nei preparati isolati da ratti di controllo, a confermare il noto effetto inibitorio mediato dagli A1 sulle terminazioni colinergiche. Ad una ed a sei settimane tale influenza non è apprezzabile, dal momento che è già stato dimostrato che la presenza di HSV-1 modifica il rilascio di acetilcolina dai neuroni enterici nei ratti trattati (Brun et al., 2010). Gli studi di immunofluorescenza su preparazioni whole mount di LMPP hanno dimostrato che nei tessuti prelevati da animali di controllo il recettore A1 sembra localizzato sia a livello dei gangli che della muscolatura longitudinale. La presenza del virus nel SNE non sembra influenzare in maniera evidente l'espressione del recettore A1: tuttavia, ad una settimana dall'inoculo IG, l'immunoreattività di A1 è distribuita principalmente nei gangli. La risposta al CGS 21680 non è variata nei segmenti prelevati da ratti infettati da una settimana, ma è diminuita a sei settimane, suggerendo una riduzione della sensibilità o dell'espressione dei

recettori A2a in questa fase dell'infezione. La presenza dell'antagonista degli A2a ha inibito significativamente l'effetto del nucleoside esclusivamente nei segmenti prelevati da ratti di controllo. Anche in questo caso l'effetto facilitatorio degli A2a è stato dimostrato solamente nell'ileo dei ratti non trattati, plausibilmente perchè il virus di per sé influenza il rilascio di acetilcolina endogena dalle terminazioni colinergiche ad una ed a sei settimane dal trattamento IG (Brun et al., 2010). Gli esperimenti di immunofluorescenza hanno evidenziato che sia il tessuto muscolare che i neuroni del tessuto isolato da ratti di controllo sono marcate per il recettore A2a.

Ad una settimana dall'inoculo IG l'immunofluorescenza di A2a è paragonabile al controllo, anche se si è stato osservato un aumento del segnale a livello intracellulare nei neuroni. Dopo sei settimane dall'infezione, il profilo di distribuzione del recettore A2a si mantiene analogo al controllo.

I risultati ottenuti in questa serie di esperimenti confermano che l'infezione con HSV-1 modifica la motilità dell'ileo dopo una e sei settimane dall'inoculo IG e che in tali alterazioni è coinvolto anche il sistema adenosinergico, indicandolo come un potenziale bersaglio farmacologico nel trattamento dei disordini della motilità intestinale.

Il medesimo protocollo di infezione con il virus è stato recentemente applicato a topi C57/Bl6 WT e deficienti per il gene che codifica per i TLR2, recettori coinvolti nella risposta immunitaria innata. Usando questi topi, si è potuto valutare il ruolo di questi recettori nelle alterazioni della motilità intestinale causate dall'HSV-1.

Nel cervello e nell'ileo dei topi trattati con il doppio inoculo è stata dimostrata nel tratto GI la presenza di HSV-1 e l'assenza di anomalie macroscopiche dal punto di vista clinico e istopatologico (Zoppellaro et al., 2009).

In un primo momento è stata esaminata la risposta evocata dal carbacolo 1  $\mu$ M, dal KCl 60 mM e da EFS (20 Hz) dei segmenti isolati da topi WT di controllo e da WT infettati per via IG da una a dieci settimane. L'infezione da HSV-1 ha determinato un significativo aumento della contrazione indotta dal carbacolo e dalla depolarizzazione ad una, otto e dieci settimane, mentre a due settimane dal trattamento IG la risposta è significativamente ridotta. La colinergica risposta contratturante ad EFS segue un andamento analogo, eccetto ad una ed a quattro settimane, tempi a cui la risposta risulta ridotta.

Questi risultati suggeriscono che la presenza del virus sembra modificare la funzionalità dei neuroni nella prima fase dell'infezione IG, verosimilmente alterando la trasmissione colinergica. Dopo due, otto e dieci settimane dell'inoculo IG è stato invece dimostrato che il virus induce una variazione generalizzata della capacità contrattile della muscolatura, indipendente dall'agente impiegato, indice tipico della presenza di uno stato infiammatorio.

Dal momento che nel topo la valutazione dello stato dell'infezione enterica con tecniche di biologia molecolare e lo studio dell'effetto di HSV-1 sulla risposta immunitaria a livello intestinale è appena iniziata, è possibile solo ipotizzare che il virus alteri la contrattilità

dell'ileo di topo con meccanismi analoghi a quelli evidenziati nel ratto. Anche nel topo HSV-1 sembra modificare la risposta sia nelle fasi iniziali che in quelle tardive dell'infezione: tali alterazioni sembrano essere strettamente correlate allo stato dell'infezione, dal momento che seguono anche in questo caso un andamento di tipo "on and off".

I successivi esperimenti sono stati condotti esclusivamente nell'intestino di topi WT infettati ad una ed a otto settimane, al fine di approfondire i meccanismi che stanno alla base delle alterazioni osservate sia nella fase acuta che in quella tardiva dell'infezione. Si è quindi valutata l'eventuale compromissione della risposta alla stimolazione serotonergica in seguito all'infezione virale esponendo i preparati a concentrazioni massimali di 5HT. Ad una settimana dall'inoculo IG la contrazione da 5HT era inferiore rispetto ai preparati di controllo, mentre ad otto settimane si è osservato un incremento della risposta. Dal momento che ad una settimana è stata dimostrata anche la riduzione della risposta evocata dalla stimolazione elettrica a 20 Hz e considerato il neurotropismo del virus, questo risultato avvalorava l'ipotesi di una probabile interferenza del virus sulla trasmissione nervosa. A otto settimane è stato osservato nuovamente un aumento della risposta, confermando che nello stadio tardivo l'infezione sarebbe in grado di aumentare la contrattilità muscolare, indipendente dallo stimolo.

Nei mammiferi sono state identificate cinque tachichine: la SP, la neurochinina A (NKA), il neuropeptide K, il neuropeptide  $\gamma$  e la neurochinina B (NKB) (O'Connor et al., 2004). Questa famiglia di peptidi è coinvolta nella regolazione di varie funzioni a livello GI: contrattilità della muscolatura liscia, propulsione GI, microcircolazione enterica, assorbimento e secrezione, trasmissione nocicettiva (De Giorgio et al., 2007). Numerosi studi evidenziano inoltre il ruolo delle tachichinine nell'interazione tra sistema nervoso, risposta immunitaria ed epitelio intestinale in situazioni di infiammazione (Lecci et al., 2006). L'azione delle tachichinine è mediata da tre diversi recettori. Nell'intestino i recettori per le neurochinine (NK-R) di tipo 1 e 2 sono espressi a livello della muscolatura liscia e dei neuroni, mentre gli NK-3R sono recettori prevalentemente localizzati sulle cellule nervose, anche se nell'uomo è stata dimostrata la loro espressione nelle cellule della muscolatura circolare e longitudinale del colon. NK-1R ed NK-3R sono inoltre presenti sulle cellule interstiziali del Cajal (De Giorgio et al., 2007; Lecci et al., 2006). Ogni tachichinina si lega preferenzialmente ad un distinto NK-R, ma è in grado di attivare tutti i sottotipi recettoriali (Lecci et al., 2006). Il NK-1R è attivato preferenzialmente dalla SP, il NK-2R dalla NKA e il NK-3R dalla NKB (O'Connor et al., 2004; Lecci et al., 2006). In generale, l'effetto contrattile indotto dagli agonisti esogeni degli NK-1R è meno evidente di quello evocato dalla stimolazione degli NK-2R, dal momento che il recettore di tipo 1 può anche mediare effetti inibitori (Lecci et al., 2006).

Nel nostro modello ancora una volta l'infezione da HSV-1 ha prodotto una riduzione della risposta contrattile alla SP ad una settimana. Considerando l'elevata affinità della SP per NK-1R e che la stimolazione di questo recettore determina nell'intestino una risposta miogenica

eccitatoria e neurogenica inibitoria (Lecci et al., 1999), questo risultato sembra confermare che il virus, in questo stadio dell'infezione, potrebbe verosimilmente modificare la trasmissione nervosa enterica, come già evidenziato negli esperimenti precedenti. Anche in questo caso ad otto settimane si verifica un aumento della risposta contrattile.

Dal momento che NO e SP sono considerati i trasmettitori principalmente coinvolti nella risposta NANC alla EFS (Iancheva et al., 1998), la risposta NANC alla stimolazione elettrica è stata valutata nei preparati di ileo isolato da topi WT in presenza ed in assenza di L-NAME, inibitore della sintesi di NO.

È stato dimostrato che l'NO è il principale neurotrasmettitore inibitorio NANC. L'NO è prodotto dalla L-arginina ad opera della NO sintetasi (NOS). Due tipi di NOS sono costitutivi: la nNOS, prevalentemente espressa dai neuroni, e la eNOS, localizzata nelle cellule dell'endotelio vascolare. La terza forma è inducibile (iNOS) ed è espressa nei tessuti in situazioni di danno ed infiammazione (Takahashi, 2003).

In presenza di atropina e guanetidina, cioè quando vengono bloccati gli effetti mediati dal sistema colinergico e da quello adrenergico, la stimolazione elettrica dei segmenti di ileo a 20 Hz ha prodotto in tutti i preparati un rilasciamento, che in quelli isolati da animali esposti al virus per una e otto settimane è risultato maggiore rispetto ai non esposti. Questo dimostra che l'infezione determina anche un'alterazione della risposta mediata dai trasmettitori NANC. Il pretrattamento con L-NAME ha inibito la risposta NANC, in accordo con gli studi che hanno già da tempo dimostrato che l'NO viene rilasciato dal plesso mienterico in seguito a stimolazione elettrica del tessuto intestinale ed è responsabile del rilasciamento della muscolatura liscia (Barbara et al., 1997; Iancheva et al., 1998; Takahashi, 2003). Ad una settimana dall'infezione IG la stimolazione elettrica ha determinato un rilasciamento anche in presenza di L-NAME, quantitativamente maggiore rispetto alla risposta ottenuta nei segmenti di controllo che hanno subito il medesimo pretrattamento. A otto settimane con l'inibizione della sintesi di NO è stata evidenziata l'abolizione pressoché totale della risposta, come nel controllo. Questo suggerisce che una aumentata espressione o attività di NOS potrebbe rendere ragione dell'effetto sensibilizzante del virus sulla risposta NANC.

I recettori TLR2 sono coinvolti nella risposta immunitaria innata ed attivati da componenti molecolari di patogeni quali micobatteri, funghi, spirocheti e virus dell'epatite C, citomegalovirus ed Herpes (Testro e Visvanathan, 2009). I TLR2, inoltre, sembrano implicati nella patogenesi dei disordini a carico dell'apparato GI (Liu et al., 2009; Cario et al., 2007; Gibson et al., 2008; Hausmann et al., 2002; Frolova et al., 2008). Questo ha suggerito di continuare lo studio infettando con il virus topi deficienti per il gene che codifica per i TLR2.

In questo contesto è stata innanzitutto caratterizzata la funzionalità intestinale dei topi KO per TLR2. È stato così dimostrato un significativo incremento della risposta indotta dalla stimolazione muscarinica, dal KCl e dalla EFS. Nell'ileo prelevato da questi animali è aumentato anche il rilasciamento indotto dalla stimolazione NANC, che resta sensibile,

anche se solo parzialmente, all'inibizione da parte del L-NAME. D'altra parte le risposte alla 5HT e alla SP non risentono della mancanza del recettore.

È stato proposto che i TLR non siano implicati solamente nella risposta immunitaria innata e nello sviluppo di quella adattativa contro i patogeni (Gibson et al., 2008), ma anche nell'interazione tra cellule epiteliali intestinali e batteri saprofiti (Michelsen e Arditi, 2007). Il tratto GI presenta infatti tolleranza immunitaria nei confronti dei microorganismi saprofiti, ma mantiene la capacità di organizzare una efficace risposta all'invasione di patogeni. Nell'IBD, caratterizzata da uno stato di infiammazione cronica, si verifica una risposta immunitaria abnorme contro i batteri che costituiscono la flora intestinale. Nell'ileo dei topi che non esprimono questo recettore potrebbe quindi verificarsi una perturbazione di questo equilibrio, con conseguente insorgenza di anomalie motorie.

Nei topi TLR2 KO una settimana dopo il trattamento IG con HSV-1 si è verificato un aumento dell'effetto contratturante solamente per il carbacolo 1  $\mu$ M. Quindi la mancanza del gene che codifica per il TLR2 potrebbe, almeno in parte, svolgere un'azione protettiva in questa fase dell'infezione. È già stato dimostrato che i TLR2 mediano la risposta delle citochine all'HSV-1 (Kurt-Jones et al., 2004; Kurt-Jones et al., 2005). Ad esempio, in colture primarie di cellule della microglia di topi WT e TLR2 KO infettate con HSV-1 è stato provato che la produzione di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e delle chemochine CXCL1 e CXCL2 avviene solamente nelle cellule che esprimono questi recettori (Aravalli et al., 2005).

L'interazione tra il virus e l'ospite porta alla produzione di citochine infiammatorie essenziali per lo sviluppo di cellule T e anticorpi, principali componenti della risposta immunitaria adattativa. Allo stesso tempo però, il rilascio di citochine (o di altri mediatori) può provocare uno stato di infiammazione, che può a sua volta causare danni localizzati e/o sistemici (Finberg e Kurt-Jones, 2005). Studi su topi TLR2 KO hanno evidenziato che la delezione del gene migliora lo stato di encefalite indotta dalla somministrazione endovenosa di HSV-1, indicando che l'azione mediata dei TLR2 in questo caso non è protettiva (Kurt-Jones et al., 2004). Tuttavia, non è stato escluso che in altri tessuti l'attivazione dei TLR in risposta al virus possa migliorare i danni provocati dall'infezione (Morrison, 2004).

Dopo otto settimane dall'inoculo IG di HSV-1 nei topi transgenici è stata osservata una riduzione della risposta contrattile evocata da tutti gli agenti saggati. Inoltre, in tutti i segmenti la stimolazione elettrica a 20 Hz ha evocato contrazioni di origine neuronale e prevalentemente colinergica, significativamente diminuite tra le due a le dieci settimane dall'infezione. Il virus provoca quindi evidenti alterazioni funzionali anche nei topi transgenici e tali alterazioni sembrano riconducibili principalmente a variazioni della trasmissione colinergica, mentre non sembrano imputabili a modificazioni del sistema serotonergico, tachichinergico e della neurotrasmissione NANC. Infatti, negli animali trattati, la delezione del gene non ha alterato le risposte a 5HT, SP e alla stimolazione elettrica NANC in presenza ed in assenza di L-NAME.

L'effetto della delezione del gene che codifica per il TLR2 è stato in parte descritto in alcuni modelli di colite (Cario et al., 2007; Cario, 2008). Attualmente non sono presenti in letteratura lavori che riguardino l'effetto diretto di agonisti del TLR2 e della mancanza del recettore sulle cellule muscolari enteriche e sulla contrattilità intestinale. È stato comunque ipotizzato che i TLR2 possano essere coinvolti nella modulazione della motilità enterica direttamente, influenzando la funzionalità neuronale e/o indirettamente, attraverso la produzione di prostaglandine (Buchholz e Bauer, 2010).

I risultati qui descritti, ottenuti negli esperimenti su ileo di topo, confermano che il trattamento in vivo con HSV-1 rappresenta un buon modello di alterazione della contrattilità intestinale. Inoltre, evidenziano che i TLR2 hanno un ruolo funzionale nel controllo della attività neuromuscolare dell'intestino non solo in presenza di un agente infettante, ma anche in condizioni fisiologiche.

Concludendo, è stato messo a punto un nuovo modello di dismotilità intestinale, valido per indagare l'influenza dei virus neurotropi sull'attività motoria enterica. L'identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti in tali alterazioni potrebbe aprire la strada alla comprensione della fisiopatologia dei DFGI, allo scopo di delineare nuovi razionali approcci diagnostici e terapeutici.

## BIBLIOGRAFIA

- Akiho H, Khan WI, Al-Kaabi A, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM (2007) Cytokine modulation of muscarinic receptors in the murine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G250-5.
- Akkari R, Burbiel JC, Hockemeyer J, Müller CE (2006) Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drug. *Curr Top Med Chem* 6(13):1375-99.
- Alvarez B, Revilla C, Doménech N, Pérez C, Martínez P, Alonso F, Ezquerra A, Domínguez J (2008) Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues. *Vet Res* 39(2):13.
- Antonoli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Blandizzi C, Del Tacca M (2006) A2a receptors mediate inhibitory effects of adenosine on colonic motility in the presence of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 12(2):117-22.
- Antonoli 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, Del Tacca M. (2007) Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 322:435-42.
- Antonoli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M, Blandizzi C (2008) Regulation of enteric functions by adenosine: Pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacol Ther* 120(3):233-53.
- Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Palmquist JM, Lokensgard JR (2005) Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol* 175(7):4189-93.
- Aube AC, Cherbut C, Galmiche JP (1998) Intestinal inflammation and motility. *Gastroenterol Clin Biol* 22(5):509-18.
- Barbara G, Vallance BA, Collins SM (1997) Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 113(4):1224-32
- Barkhordari E, Rezaei N, Ansaripour B, Larki P, Alighardashi M, Ahmadi-Ashtiani HR, Mahmoudi M, Keramati MR, Habibollahi P, Bashashati M, Ebrahimi-Daryani N, Amirzargar AA (2009) Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome. *J Clin Immunol* 30(1):74-9.
- Bailey SJ, Hourani SM (1990) A study of the purinoceptors mediating contraction in the rat colon. *Br J Pharmacol* 100(4):753-6.
- Bailey SJ, Hourani SM (1992) Effects of purines on the longitudinal muscle of the rat colon. *Br J Pharmacol* 105(4):885-92.



- Bercík P, De Giorgio R, Blennerhassett P, Verdú Ef, Barbara G, Collins SM (2002) Immune-mediated neural dysfunction in a murine model of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 123(4):1205-15.
- Bian X, Zhou X, Galligan JJ (2004) R-type calcium channels in myenteric neurons of guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(1):G134-42.
- Bin A (2008) Metabolismo dell'adenosina: correlazione tra processi biochimici e contrattilità nella muscolatura liscia intestinale in condizioni normali e patologiche. *Tesi di dottorato*.
- Borg I, Andren L (1980) Herpes simplex virus as a cause of peptic ulcer. *Scand. J. Gastroenterol* 15:56-61.
- Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 112:358-404.
- Brun P, Giron MC, Zoppellaro C, Bin A, Porzionato A, De Caro R, Barbara G, Stanghellini V, Corinaldesi R, Zaninotto G, Palù G, Gaion RM, Tonini M, De Giorgio R, Castagliuolo I (2010) Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of the Rat Enteric Nervous System Evokes Small-Bowel Neuromuscular Abnormalities. *Gastroenterology* doi:10.1053/j.gastro.2010.01.036.
- Buchholz BM, Bauer AJ (2010) Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol Motil* 22(3): 232 - 45
- Burnstock G.(2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58(1):58-86.
- Camilleri M (2003) Diagnosis and treatment of enteric neuromuscular diseases. *Clin Auton Res* 13(1):10-5.
- Camilleri M (2009) Genetics and irritable bowel syndrome: from genomics to intermediate phenotype and pharmacogenetics. *Dig Dis Sci* 54(11):2318-24.
- Camilleri M, Andresen V (2009) Current and novel therapeutic options for irritable bowel syndrome management. *Dig Liver Dis* 41(12):854-62.
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK (2007) Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 132(4):1359-74.
- Cario E (2008) Therapeutic impact of toll-like receptors on inflammatory bowel diseases: a multiple-edged sword. *Inflamm Bowel Dis* 14:411-21.
- Castagliuolo I, Brun P, Costantini M, Rizzetto C, Palù G, Costantino M, Baldan N, Zaninotto G (2004) Esophageal achalasia: is the herpes simplex virus really innocent? *J Gastrointest Surg* (1):24-30.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch Tp, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57(4):411-25.

- Cavalcante IC, Castro MV, Barreto ARF, Sullivan GW, Vale M, Almeida PRC, Linden J, Rieger JM, Cunha FQ, Guerrant RL, Ribeiro RA, Brito GAC (2006) Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on Clostridium difficile toxin A-induced murine ileal enteritis. *Infect Immunol* 74:2606-12
- Chang L (2004) Review article: epidemiology and quality of life in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 7:31-9.
- Chesler D, Reiss SC (2002) The role of IFN  $\gamma$  in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine & Growth Factor Rev* 13: 441-54.
- Collins SM (1996) The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111(6):1683-99.
- Costa F, Mumolo MG, Marchi S, Bellini M (2007) Differential diagnosis between functional and organic intestinal disorders: is there a role for non-invasive tests? *World J Gastroenterol* 14;13(2):219-23.
- Coupar IM (1999) Characterization and tissue location of the neural adenosine receptor in the rat ileum. *Br J Pharmacol* 126(5):1269-75.
- Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, Douglas MW (2006) The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* 15;194 S1:S11-8.
- Currò D (2010) Voltage-gated calcium channels involved in the inhibitory motor responses and vasoactive intestinal polypeptide release in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 25;628(1-3):207-13.
- De Giorgio R, Camilleri M (2004) Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 16: 515-31.
- De Giorgio R, Brun P, Zoppellaro C, Giron MC, Felicani C, Barbara G, Stanghellini V, Bracceschi M, Pal G, Zaninotto G, Tonini M, Coriandolesì R, Gaion RM, 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. *108th Annual Meeting of the AGA Institute. May 19-24, 2007. Supplement to Gastroenterology* 132:A136-7.
- De Giorgio R, Barbara G, Furness JB, Tonini M (2007) Novel therapeutic targets for enteric nervous system disorders. *Trends Pharmacol Sci* 28(9):473-81.
- Despopoulos A, Silbernagl S (2003) Color Atlas of Physiology. *Thieme* 6th edition.
- Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, Colucci R, Stanghellini V, Barbara G, Del Tacca M, Tonini M, Corinaldesi R, De Giorgio R (2008) Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Aliment Pharmacol Ther* 28(1):25-42.
- 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* 141:925-34.
- Vieira C, Duarte-Araújo M, Adães S, Magalhães-Cardoso T, Correia-De-Sá P (2009) Muscarinic M(3) facilitation of acetylcholine release from rat myenteric neurons depends on adenosine outflow leading to activation of excitatory A(2A) receptors. *Neurogastroenterol Motil* 21(10):1118-95.
- Edman KA, Schild HO (1962) The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. *J Physiol* 161:424-41.
- Efstathiou S, Preston CM (2005) Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research* 11: 108-19.
- Facco M, Brun P, Baesso I, Costantini M, Rizzetto C, Berto A, Baldan N, Palù G, Semenzato G, Castagliuolo I, Zaninotto G (2008) T cells in the myenteric plexus of achalasia patients show a skewed TCR repertoire and react to HSV-1 antigens. *Am J Gastroenterol* 103(7):1598-609.
- Finberg RW, Knipe DM, Kurt-Jones EA (2005) Herpes simplex virus and toll-like receptors. *Viral Immunol* 18:457-65.
- Fornai M, Antonioli L, Colucci R, Ghisu N, Buccianti P, Marioni A, Chiarugi M, Tuccori M, Blandizzi C, Del Tacca M (2008) A(1) and A(2a) receptors mediate inhibitory effects of adenosine on the motor activity of human colon. *Neurogastroenterol Motil* 21(4):451-66.
- Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J, Clancy R (2008) Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol* 216(2):183-92.
- Fozard JR, Baur F, Wolber C (2003) Antagonist pharmacology of adenosine A2B receptors from rat, guinea pig and dog. *Eur J Pharmacol* 15;475(1-3):79-84.
- Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H (2008) Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 56(3):267-74.
- Gaion RM, Dorigo P, Trolese B, Borin E, Adami R, Gambarotto L (1988) Involvement of P1-purinoreceptors in the relaxing effect of adenosine in rat duodenum. *J Auton Pharmacol* 8(2):135-40.
- Ganong WF (1991) *Fisiologia medica*. Edizioni Piccin.
- Gesser RM, Koo SC (1996) Oral inoculation with herpes simplex virus type 1 infects enteric neurons and mucosal nerve fibers within the gastrointestinal tract in mice. *Journal of Virology* 6: 4097-4102.
- Gesser RM, Koo SC (1997) Latent herpes simplex virus type 1 gene expression in ganglia innervating the human gastrointestinal tract. *J Virol* 71:4103-6.

- Gibson DL, Ma C, Rosenberger CM, Bergstrom KS, Valdez Y, Huang JT, Khan MA, Vallance BA (2008) Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cell Microbiol* 10:388-403.
- Gokgoz S, Koyluoglu G, Saraydin S, Kaya T, Gursoy S, Sen M (2004) Altered contractile responsiveness in ileal longitudinal muscle after total gastrectomy in a rat model. *Surg Today* 34(2):138-44.
- Goyal RK, Hirano I (1996) The Mechanisms of disease. The enteric nervous system. *New England Journal of Medicine* 334: 1106-15.
- Gribar SC, Anand RJ, Sodhi CP, Hackam DJ (2008) The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukoc Biol* 83(3):493-8.
- Gurden MF, Coates J, Ellis F, Evans B, Foster M, Hornby E, Kennedy I, Martin DP, Strong P, Vardey CJ (1993) Functional characterization of three adenosine receptor types. *Br J Pharmacol* 109(3):693-8
- Guzman J, Yu JG, Suntres Z, Bozarov A, Cooke H, Javed N, Auer H, Palatini J, Hassanain HH, Cardounel AJ, Javed A, Grants I, Wunderlich JE, Christofi FL (2006) ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis: proof by validated high-density oligonucleotide microarray analysis. *Inflamm Bowel Dis* 12(8):766-89.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122(7):1987-2000.
- Ivancheva C, Itzev D, Lolova I, Radomirov R (1998) Contribution of nitric oxide and substance P to nonadrenergic, noncholinergic transmission in the guinea pig ileum. *Gen Pharmacol* 31(1):101-5.
- Jones MP, Crowell MD, Olden KW, Creed F (2007) Functional gastrointestinal disorders: an update for the psychiatrist. *Psychosomatics* 48(2):93-102.
- Kadowaki M, Takeda M, Tokita K, Hanaoka K, Tomoi M (2000) Molecular identification and pharmacological characterization of adenosine receptors in the guinea-pig colon. *Br J Pharmacol* 129(5):871-6.
- Kaya TT, Koyluoglu G, Soydan As, Arpacik M, Karadas B (2002) Effects of nimesulide and pentoxifylline on decreased contractile responses in rat ileum with peritonitis. *Eur J Pharmacol* 442: 147-53.
- Kaiser SM, Quinn RJ (1999) Adenosine receptors as potential therapeutic targets. *Drug Discov Today* 4(12):542-51.
- Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-9.
- Khan WI, Collins SM (2004) Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol* 26(8-9):319-26.

- Khanna KM, Lepisto AJ, Decman V, Hendricks RL (2004) Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol* 16:463-9.
- Kinoshita K, Hori M, Fujisawa M, Sato K, Ohama T, Momotani E, Ozaki H (2006) Role of TNF-alpha in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF-alpha-deficient mice. *Neurogastroenterol Motil* 18(7):578-88.
- Kirchgessner AL, Liu MT (1999) Differential localization of Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunits in the enteric nervous system: presence of alpha1B channel-like immunoreactivity in intrinsic primary afferent neurons. *J Comp Neurol* 409(1):85-104.
- Koelle DM, Corey L (2003) Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 16: 96-113.
- Kolachala V, Bajaj R, Chalasani M, Sitaraman SV (2008a) Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(2):G401-10.
- Kolachala V, Vijay-Kumar M, Dalmasso G, Yang D, Linden J, Wang L, Gewirtz A, Ravid K, Merlin D, Sitaraman SV (2008b) A2B adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* 135(3):861-70.
- Kolachala V, Ruble B, Vijay-Kumar M, Wang L, Mwangi S, Figler H, Figler R, Srinivasan S, Gewirtz A, Linden J, Merlin D, Sitaraman S (2008c) Blockade of adenosine A2B receptors ameliorates murine colitis. *Br J Pharmacol* 155(1):127-37.
- Koyluoglu G, Kaya T, Bagcivan I, Yildiz T (2002) Effect of L-NAME on decreased ileal muscle contractility induced by peritonitis in rats. *J Pediatr Surg* 37: 901-05.
- Kramer MF, Cook WJ, Roth FP, Zhu J, Holman H, Knipe DM, Coen DM (2003) Latent herpes simplex virus infection of sensory neurons alters neuronal gene expression. *J Virol* 77(17):9533-41.
- Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1315-20.
- Kurt-Jones EA, Belko J, Yu C, Newburger PE, Wang J, Chan M, Knipe DM, Finberg RW (2005) The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates. *J Infect Dis* 191(5):746-8.
- Lea R, Whorwell PJ (2002) Infection and irritability. *Gut*, 51:305-6.
- Lecci A, De Giorgio R, Barthó L, Sternini C, Tramontana M, Corinaldesi R, Giuliani S, Maggi CA (1999) Tachykinin NK(1)receptor-mediated inhibitory responses in the guinea-pig small intestine. *Neuropeptides* 33(1):91-7.
- Lecci A, Santicoli P, Maggi CA (2002) Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol* 2(6):630-41.
- Lecci A, Capriati A, Altamura M, Maggi CA (2006) Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. *Auton Neurosci* 30;126-127:232-49.

- Liu Y, Zhu L, Fatheree NY, Liu X, Pacheco SE, Tatevian N, Rhoads JM (2009) Changes in intestinal Toll-like receptors and cytokines precede histological injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297(3):G442-50.
- Löhr JM, Nelson JA, Oldstone MB (1990) Is herpes simplex virus associated with peptic ulcer disease? *J Virol* 64(5):2168-74.
- Mayer MI, James MH, Russell RJ, Kelly JS, Pasternak CA (1986) Changes in excitability induced by herpes simplex viruses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 6(2):391-402.
- Mayer EA, Collins S (2002) Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 122: 2032-48.
- Mayer EA, Bradesi S, Chang L, Spiegel Bm, Bueller Ja, Naliboff BD (2008) Functional GI disorders: from animal models to drug development. *Gut* 57(3):384-404.
- Michelsen KS, Arditi M (2007) Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology. *Curr Opin Hematol* 14:48-54.
- Moreels TG, De Man JG, Bogers JJ, De Winter BY, Vrolix G, Herman AG, Van Marck EA, Pelckmans PA (2001) Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1030-42.
- Moreels TG, Nieuwendijk RJ, De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Van Marck EA, Pelckmans PA (2004) Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut* 53(1):99-107.
- Morrison LA (2004) The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol* 12:353-6.
- Nicholls J, Brownhill VR, Hourani SM (1996) Characterization of P1-purinoceptors on rat isolated duodenum longitudinal muscle and muscularis mucosae. *J Pharmacol* 117(1):170-4.
- Nicholls J, Hourani SM (1997) Characterization of adenosine receptors on rat ileum, ileal longitudinal muscle and muscularis mucosae. *Eur J Pharmacol* 338(2):143-50.
- Novak N, Peng WM (2005) Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* 142: 405-410.
- O'connor TM, O'connell J, O'brien Di, Goode T, Bredin Cp, Shanahan F (2004) The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201(2):167-80.
- Okamoto H, Prestwich SA, Asai S, Unno T, Bolton TB, Komori S (2002) Muscarinic agonist potencies at three different effector systems linked to the M(2) or M(3) receptor in longitudinal smooth muscle of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 135(7):1765-75.

- Ohama T, Hori M, Ozaki H (2007) Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? *J Smooth Muscle Res* 43(2):43-54.
- Olsson C, Holmgren S (2001) The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128:481-503.
- Ozaki H, Hori M, Kinoshita K, Ohama T (2005) Intestinal dysmotility in inflammatory bowel disease: mechanisms of the reduced activity of smooth muscle contraction. *Inflammopharmacology* 13(1-3):103-11.
- Paoletti R, Nicosia S, Clementi F, Fumagalli G (1999) Farmacologia e terapia dell'apparato digerente. Ed. UTET.
- Paton WD, Zar MA (1968) The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *J Physiol* 194(1):13-33.
- Peachey JA, Hourani SM, Kitchen I (1994) The binding of 1,3-[3H]-dipropyl-8-cyclopentylxanthine to adenosine A1 receptors in rat smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* 113(4):1249-56.
- Price RW, Notkins AL (1975) Viral infections of the autonomic nervous system and its target organs: pathogenetic mechanisms. *Med. Hypotheses* 3:33-36.
- Quigley EM, Bytzer P, Jones R, Mearin F (2006) Irritable bowel syndrome: the burden and unmet needs in Europe. *Dig Liver Dis* 38(10):717-23.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (2005) Farmacologia. III Edizione, Casa Editrice Ambrosiana.
- Reeves JJ, Coates J, Jarvis JE, Sheehan MJ, Strong P (1993) Characterization of the adenosine receptor mediating contraction in rat colonic muscularis mucosae. *Br J Pharmacol* 110(3):1255-9.
- Reeves JJ, Jarvis JE, Sheehan MJ, Strong P (1995) Further investigations into adenosine A1 receptor-mediated contraction in rat colonic muscularis mucosae and its augmentation by certain alkylxanthine antagonists. *Br J Pharmacol* 114(5):999-1004.
- Ren J, Bertrand PP (2008) Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signal* 4(3):255-66.
- Rogachev B, Ziv NY, Mazar J, Nakav S, Chaimovitz C, Zlotnik, M Douvdevani A (2006) Adenosine is upregulated during peritonitis and is involved in downregulation of inflammation. *Kidney Int* 70:675-81.
- Rozenberg F (2002) Infection par le virus herpes simplex: interaction virus-hôte. *Pathol Biol* 50: 414-18.
- Sanders KM (2000) Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. *Gut* 47: IV 23-25.

- Scirocco A, Matarrese P, Petitta C, Cicenia A, Ascione B, Mannironi C, Ammoscato F, Cardì M, Fanello G, Guarino Mp, Malorni W, Severi C (2010) Exposure of Toll-like receptors 4 to bacterial lipopolysaccharide (LPS) impairs human colonic smooth muscle cell function. *J Cell Physiol* 223(2):442-50.
- Schemann M, Neunlist M (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:55-9.
- Shibolet O, Podolsky DK (2007) TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1469-73.
- Selgrad M, De Giorgio R, Fini L, Cogliandro RF, Williams S, Stanghellini V, Barbara G, Tonini M, Corinaldesi R, Genta RM, Domiati-Saad R, Meyer R, Goel A, Boland CR, Ricciardiello L (2009) JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* 58:25-32.
- Talley NJ (1999) Irritable bowel syndrome: definition, diagnosis and epidemiology. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 13: 371-384.
- Talley NJ (2008) Functional gastrointestinal disorders as a public health problem. *Neurogastroenterol Motil* 20 Suppl 1:121-9.
- Tack J, Sarnelli G (2002) Serotonergic modulation of visceral sensation: upper gastrointestinal tract. *Gut* 51: i77-i80.
- Takahashi T (2003) Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol* 38(5):421-30.
- Testro AG, Visvanathan K (2009) Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 24(6):943-54.
- Thorn JA, Jarvis SM (1996) Adenosine transporters. *General Pharmacology: The Vascular System* 27:613-20.
- Tohno M, Shimosato T, Moue M, Aso H, Watanabe K, Kawai Y, Yamaguchi T, Saito T, Kitazawa H (2006) Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. *Vet Res* 37(6):791-812.
- Tsamakidis K, Panotopoulou E, Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Christodoulou M, Papadokostopoulou A, Karagiannis I, Kouroumalis E, Paraskevas E (2005) Herpes simplex virus type 1 in peptic ulcer disease: an inverse association with *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 11(42):6644-9.
- Uchiyama T, Chess-Williams R (2004) Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res* 40(6):237-47.
- Venkova K, Palmer Jm, Greenwood-Van Meerveld B (1999) Nematode-induced jejunal inflammation in the ferret causes long-term changes in excitatory neuromuscular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 96-103.



- Vrbova G (1983) Neuromuscular diseases viewed as a disturbance of nerve-muscle interactions. *Somatic and Autonomic nerve-muscle interactions*. Elsevier Science Publishers.
- Waldum KG, Bjorvatn B, Burthol PG (1981) Gastritis, peptic ulcer disease, inflammatory bowel disease and stomach and colon cancers: are they all caused by viral infections? *Med. Hypotheses* 7:1329-38.
- Warren KG, Brown SM, Wroblewska Z, Gilden D, Koprowski H, Subak-Sharpe J (1978) Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings. *N Engl J Med* 11;298(19):1068-9.
- WANG XM, LIU YL (2008) Signal transduction pathway of colonic Toll-like receptor 4 in patients with irritable bowel syndrome. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 88(48):3415-7.
- WEBB RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27: 201-206.
- Wingate D, Hongo M, Kellow J, Lindberg G, Smout A (2002) Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification. *J Gastroenterol Hepatol* 17 Suppl:S1-14.
- Wyrwicz LS, Rychlewski L (2007) Fold recognition insights into function of herpes ICP4 protein. *Acta. Biochim Pol* 54(3):551-9.
- Zhang M, Leung Fp, Huang Y, Bian ZX (2010) Increased colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome is associated with up-regulation of L-type calcium channels in colonic smooth muscle cells. *Neurogastroenterol Motil* doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01467.x.
- Zhao A, Urban JF, Morimoto M, Elfrey JE, Madden KB, Finkelman FD, Shea-Donohue T (2006) Contribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in nematode infection-induced murine intestinal smooth muscle hypercontractility. *Gastroenterology* 131(2):568-78.
- Zizzo MG, Mulè F, Serio R (2006) Inhibitory responses to exogenous adenosine in murine proximal and distal colon. *Br J Pharmacol* 148(7):956-63.
- Zoppellaro C, Brun P, Bin A, Castagliuolo I, Gaion RM, Giron MC (2009) Small bowel functional abnormalities in an in vivo animal model of herpes simplex virus-1 infection of the enteric nervous system. *34° Congresso Nazionale della SIF. Book of Abstract P-2/2:275*.