



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

Indirizzo: comune

CICLO XXVII

**Espressione e attività del recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ in
macrofagi intestinali di pazienti con malattie infiammatorie
croniche intestinali ed in modelli murini di neuropatie del
sistema nervoso enterico.**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Dottorando: Lisa Spagnol

ABSTRACT

The $\alpha 7$ nicotinic receptor is involved in the cholinergic anti-inflammatory pathway, the mechanism through which the nervous system influences leukocytes inflammatory responses. Vagus nerve releases the neurotransmitter acetylcholine which binds to the $\alpha 7$ nicotinic receptors on the surface of macrophages inhibiting pro-inflammatory mediators release, such as $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL1}\beta$.

Intestinal Bowel diseases (IBD), which comprise Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are chronic immune mediated diseases characterized by a deregulated immune response to commensal flora in a genetically susceptible host. Epidemiologic studies revealed the dual effect of smoke on IBD patients: smoke ameliorates CU, by suppressing macrophages and lymphocytes activity, but worsen the symptoms and the histologic damage in CD patients.

This thesis aimed to study the mechanism underlying the nicotine anti-inflammatory effect on CU patients (but not in CD patients), verifying the hypothesis that different expression levels of nicotinic receptor in IBD patients are responsible for its antithetic effects on diseases progress. Our main purpose was to verify first nicotinic receptor levels on mucosal macrophages during inflammation, and consequently whether macrophages' sensibility to the anti-inflammatory pathway, could be influenced by the integrity of the enteric nervous system (ENS).

Expression levels and functionality of $\alpha 7\text{nAChR}$ in UC and CD patients in clinical remission or mild activity was compared to control subjects (HV, healthy volunteers or patients in screening for colonic cancer) in peripheral blood-derived macrophages and intestinal macrophages isolated from colon-sigma biopsies. In blood-derived macrophages $\alpha 7\text{nAChR}$ levels were comparable between the three groups both at mRNA, quantified by Real Time-PCR, and protein, quantified by α -bungarotoxin-Alexa Fluor 488 binding, levels. On the contrary, the nicotinic receptors were more expressed in intestinal mucosal macrophages in UC patients than in healthy subjects and CD patients. Moreover, nicotine, the exogenous ligand of $\alpha 7\text{nAChR}$, significantly reduced LPS-induced $\text{TNF}\alpha$ synthesis in mucosal macrophages from UC but not MC and HV.

To determine the mechanism responsible for the altered expression of $\alpha 7\text{nAChR}$ in CD patients, we studied the cholinergic anti-inflammatory pathway in murine models of ENS neuropathy, since structural and functional damages in enteric neurons is well established in IBD patients. Our neuropathy models comprise TLR2 deficient mice ($\text{TLR2}^{-/-}$) and mice infected by Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1). We quantified $\alpha 7\text{nAChR}$ expression and inflammatory activation markers (F4/80 and caspase-1 activation) of intestinal macrophages in basal conditions and during early and late phases of experimental colitis induced by DSS. Mucosal macrophages showed no significant differences in $\alpha 7\text{nAChR}$ expression in WT and $\text{TLR2}^{-/-}$ mice, while HSV-1 induced neuropathy caused a significant increase of $\alpha 7\text{nAChR}$ levels. However, after three days of DSS administration, a significant increase of $\alpha 7\text{nAChR}$ occurred in WT mice, but not in mice with enteric neuropathy. In parallel, in mucosal macrophages of WT mice, but not in mice with ENS neuropathy, we observed the activation of caspase-1 and surface F4/80 overexpression. Moreover, only in

WT mice, nicotine reduced caspase-1 activation induced by LPS+ATP in mucosal macrophages. Furthermore, *in vivo* nicotine administration reduced the gravity of colitis in WT mice, but was ineffective in TLR2^{-/-} mice. Finally, by correcting the integrity of ENS of TLR2^{-/-} mice by administration *in vivo* of glial-derived neurotrophic factor (GDNF), caspase-1 activation in mucosal macrophages during colitis was normalized.

All together our data suggest that for the cholinergic anti-inflammatory pathway to have an optimal action, it is required an increased expression of α 7nAChR in mucosal macrophages in response to an inflammatory stimulus. Lack of α 7nAChR up-regulation in mucosal macrophages, such as in MC patients, causes the loss of nicotine anti-inflammatory effects. The presence of a neuropathy might contribute to the inadequate expression of α 7nAChR in mucosal macrophages during inflammatory processes, thus paving the way to amplified mucosal damage. Mediators that directly regulate α 7nAChR expression in mucosal macrophages are now under investigation.

INDICE

1. SOMMARIO	5
2. INTRODUZIONE	7
2.1 Le malattie infiammatorie croniche intestinali	7
2.2 Epidemiologia	7
2.3 Eziologia	8
2.3.1 Fattori genetici	8
2.3.2 Fattori immunologici	9
2.3.3 Fattori psicologici	10
2.3.4 Fattori ambientali	10
2.3.5 Fattori microbiologici	11
2.4 Caratteristiche generali della Malattia di Crohn e della Colite Ulcerosa	12
2.5 Terapie farmacologiche per le IBD	13
2.5.1 Aminosalicilati	13
2.5.2 Corticosteroidi	13
2.5.3 Immunomodulatori	14
2.5.4 Farmaci biologici	15
2.5.5 Antibiotici, prebiotici e probiotici	16
2.6 Il sistema nervoso enterico	16
2.6.1 I fattori neurotrofici	17
2.6.2 Le neuropatie del sistema nervoso enterico	18
2.7 L'asse intestino-cervello-microbiota	18
2.8 I macrofagi intestinali	19
2.8.1 Origine dei macrofagi intestinali	20
2.8.2 Macrofagi M1 e M2	20
2.8.3 Macrofagi intestinali ed IBD	21
2.8.4 La produzione di IL1 β : l'inflammosoma	22
2.9 Il sistema colinergico anti-infiammatorio	23
2.9.1 Acetilcolina, recettori nicotinici e α -bungarotossina	23
2.9.2 Meccanismi del sistema colinergico anti-infiammatorio	24
2.9.3 Studi su modelli animali	25
2.9.4 Interazione tra sistema colinergico e cellule immunitarie	25
2.9.5 L'analogo dell'acetilcolina: la nicotina	26
2.10 L'immunità innata e i recettori Toll-like	27
3. SCOPO	29
4. MATERIALI E METODI	31
4.1 Selezione dei pazienti	31
4.2 Isolamento dei monociti dal sangue periferico e differenziazione in macrofagi	32
4.3 Isolamento e coltura di macrofagi intestinali umani	33
4.4 Ceppi murini utilizzati nello studio	33

4.5 Allestimento di un modello murino con infezione del sistema nervoso enterico da parte di HSV-1	34
4.6 Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (CSE): topi chimera	34
4.7 Induzione della colite con DSS e valutazione della severità dell'infiammazione	35
4.8 Analisi isto-patologiche	36
4.9 Saggio della mieloperossidasi (MPO)	36
4.10 Saggi ELISA	36
4.11 Estrazione dell'RNA totale	38
4.12 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)	38
4.13 Determinazione dei livelli di mRNA mediante real time PCR	39
4.14 Immunoistochimica su preparati Whole Mount	40
4.15 Immunoistochimica su tessuto paraffinato	41
4.16 Western blot	42
4.17 Isolamento e coltura di macrofagi dalla mucosa colica di topo	43
4.18 Analisi dell'attività della caspasi-1	44
4.19 Caratterizzazione dei macrofagi intestinali mediante citofluorimetria a flusso	44
4.20 Espressione della proteina ricombinante GDNF	46
4.21 Purificazione della proteina ricombinante GDNF	46
4.22 Analisi statistica	47
5. RISULTATI	49
5.1 Il recettore $\alpha 7nAChR$ è espresso in eguale misura nei macrofagi ottenuti dal sangue periferico di pazienti con IBD e soggetti sani	49
5.2 La nicotina non inibisce la secrezione di citochine infiammatorie da parte di macrofagi derivati dal sangue periferico	50
5.3 Macrofagi della mucosa colica di pazienti affetti da CU esprimono livelli più elevati di recettore $\alpha 7nAChR$	51
5.4 La nicotina <i>in vitro</i> ha effetto anti-infiammatorio sui macrofagi mucosali di pazienti con CU ma non con MC	52
5.5 L'assenza del Toll-like receptor 2 e l'infezione del virus neurotrofico Herpes Simplex Virus di tipo 1 determinano alterazioni strutturali del sistema nervoso enterico	53
5.6 La presenza di neuropatia del SNE aggrava la severità della colite sperimentale	55
5.7 Mancata sovra-espressione di $\alpha 7nAChR$ in corso di colite in presenza di neuropatia del SNE	60
5.8 In presenza di neuropatia del SNE i macrofagi mucosali in corso di colite non sovra-esprimono il marcatore di attivazione F4/80	60
5.9 In presenza di neuropatia del SNE nei macrofagi mucosali in corso di colite non si attiva la caspasi-1	61
5.10 La nicotina riduce l'attivazione della caspasi-1 nei macrofagi mucosali WT in corso di colite ma non in presenza di neuropatia	62
5.11 La nicotina non riduce la severità della colite in topi portatori di neuropatia.	63
5.12 La correzione della neuropatia ripristina la sensibilità dei macrofagi agli stimoli infiammatori	65
6. DISCUSSIONE	67
7. BIBLIOGRAFIA	73
8. RINGRAZIAMENTI	85

1. SOMMARIO

Il recettore nicotino $\alpha 7$ è coinvolto nel sistema colinergico anti-infiammatorio, il meccanismo attraverso il quale il sistema nervoso regola la risposta infiammatoria dei leucociti. Il nervo vago rilascia acetilcolina che lega i recettori nicotinici $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) presenti nella superficie dei macrofagi, inibendo il rilascio di mediatori della risposta pro-infiammatoria, quali TNF α e IL1 β .

Le malattie infiammatorie croniche (in inglese IBD, Intestinal Bowel Disease) sono malattie idiopatiche caratterizzate da flogosi cronica che comprendono malattia di Crohn (MC) e colite ulcerosa (CU). Nell'uomo, studi epidemiologici hanno dimostrato che il fumo ha un effetto soppressivo su macrofagi e linfociti migliorando il decorso della CU mentre aggrava il quadro istologico della MC. I meccanismi responsabili di questa dicotomia non sono attualmente noti.

Questo lavoro di tesi si è proposto di studiare i meccanismi alla base dell'attività anti-infiammatoria espletata dalla nicotina nei pazienti affetti da CU ma non da MC verificando l'ipotesi che diversi livelli di espressione dei recettori nicotinici nei pazienti con CU ed MC possano giustificare il diverso effetto della nicotina sul decorso della malattia. Si è quindi verificato se l'espressione dei recettori nicotinici nei macrofagi mucosali in corso di infiammazione, e quindi la loro sensibilità al riflesso anti-infiammatorio colinergico, potesse essere influenzata dal sistema nervoso enterico.

I livelli di espressione e la funzionalità del recettore nicotino $\alpha 7$ nAChR in pazienti affetti da CU e MC in remissione clinica o in fase di attività lieve rispetto a soggetti di controllo (VS, volontari sani o soggetti in screening per cancro colico) sono stati studiati in macrofagi differenziati da monociti ottenuti da sangue periferico ed in macrofagi intestinali isolati da biopsie di colon-sigma. Nei macrofagi derivati dal sangue periferico, il recettore nicotino $\alpha 7$ nAChR è risultato paragonabile tra i tre gruppi sia a livello di mRNA, quantificato mediante Real Time-PCR, che di proteina, quantificata determinando il legame di α -bungarotossina-Alexa Fluor 488. Al contrario, il recettore nicotino è risultato invece maggiormente espresso nei macrofagi della mucosa intestinale dei soggetti con CU rispetto ai soggetti sani o con MC. Inoltre la nicotina, ligando esogeno di $\alpha 7$ nAChR, ha ridotto in maniera significativa l'espressione di TNF α stimolata da LPS nei macrofagi mucosali di CU ma non di MC.

Al fine di determinare il meccanismo responsabile dell'alterata espressione del $\alpha 7$ nAChR nella MC, il sistema colinergico anti-infiammatorio è stato studiato in diversi modelli murini caratterizzati dalla presenza di una neuropatia del sistema nervoso enterico, poiché è nota la presenza di danni strutturali e funzionali ai neuroni enterici nei pazienti con MC. In particolare sono stati utilizzati topi deficienti del recettore TLR2 (TLR2^{-/-}) o topi con infezione nel sistema nervoso enterico da Herpes Virus simplex di tipo 1 (HSV-1). In questi animali è stata determinata, in condizioni basali e durante le fasi precoci e tardive di una colite sperimentale da DSS, l'espressione di $\alpha 7$ nAChR nei macrofagi intestinali e il grado di attivazione pro-infiammatoria di queste cellule. I macrofagi della mucosa colica hanno evidenziato che in condizioni basali non vi è una significativa differenza tra topi WT e topi

TLR2^{-/-} nei livelli di espressione del recettore $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi intestinali, mentre nella neuropatia nei topi inoculati con HSV-1 si registra un significativo aumento del recettore $\alpha 7nAChR$. Tuttavia, a seguito della somministrazione di DSS per tre giorni si è osservato un significativo aumento del recettore $\alpha 7nAChR$ in topi WT, ma non nei topi portatori di neuropatia enterica, TLR2^{-/-} e infettati per via orogastrica con HSV-1. Parallelamente l'attivazione dei macrofagi mucosali è stata determinata quantificando l'espressione del marcatore di superficie F4/80 e l'attivazione della caspasi-1. Nei macrofagi della mucosa colica di topi WT ma non in topi portatori di neuropatia del SNE si osserva l'attivazione della caspasi-1 e la sovra-espressione di F4/80 durante le fasi iniziali della colite indotta da DSS. Inoltre, solo nei macrofagi ottenuti da topi WT la nicotina è in grado di ridurre l'attivazione della caspasi-1 indotta da LPS+ATP. La somministrazione *in vivo* di nicotina riduce la gravità della colite nei topi WT ma risulta inefficace nei topi TLR2^{-/-}. Infine, abbiamo quindi verificato che ristabilendo l'integrità del SNE mediante la somministrazione di fattore neurotrofico derivante dalla glia (GDNF) *in vivo* a topi TLR2^{-/-}, viene ripristinata una normale attivazione della caspasi-1 nei macrofagi mucosali in corso di colite.

In conclusione, un'ottimale azione del sistema colinergico anti-infiammatorio richiede l'aumentata espressione di $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi mucosali in risposta ad un processo flogistico. Tuttavia, in presenza di neuropatia (i.e. virale o trofica) l'aumentata espressione di $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi mucosali può risultare insufficiente portando eventualmente ad un danno mucosale amplificato. I mediatori che direttamente regolano l'espressione di $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi mucosali sono attualmente oggetto di studio.

2. INTRODUZIONE

2.1 Le malattie infiammatorie croniche intestinali

Con il termine malattie infiammatorie croniche intestinali, più comunemente indicate con l'acronimo inglese IBD (Inflammatory Bowel Diseases) s'intende un insieme di patologie infiammatorie croniche che colpiscono il tratto gastro-enterico caratterizzate da periodi di infiammazione e periodi di remissione. Le malattie infiammatorie croniche intestinali comprendono due forme principali: la Malattia di Crohn (MC) e la Colite Ulcerosa (CU). Sebbene i fenotipi clinici delle due patologie siano simili, esse possono essere classificate in base alla diversa distribuzione dell'infiammazione nel tratto gastro-intestinale e ai quadri immunologici ed istopatologici. La Malattia di Crohn è caratterizzata da un'infiammazione transmurale che può colpire tutto il tratto gastro-intestinale, anche se la sede più colpita è l'ileo terminale, mentre la colite ulcerosa è una infiammazione circoscritta alla mucosa colica. Inoltre nella MC sembrano coinvolti soprattutto i linfociti T-helper-1, mentre i linfociti T-helper-2 sono i principali protagonisti nella colite ulcerosa (Fakhoury et al.; 2014).

2.2 Epidemiologia

L'incidenza di MC e CU è aumentata in modo graduale a partire dalla seconda Guerra mondiale, specialmente nel Nord Europa e Nord America, dove vengono attualmente registrati i tassi di incidenza più alti. Al presente l'incidenza della MC è più alta nel Nord America (20.2 su 100000 per persona anno), mentre per la CU è più alta in Europa (24.3 su 100000 per persona anno). Inoltre, in Europa sono state registrate le prevalenze maggiori sia per MC che per CU (505 e 322 su 100000 per persona anno rispettivamente) (Ponder e Long; 2013).

In numerose aree dove tradizionalmente vi era una bassa presenza di queste malattie, come Asia ed Africa, è stato registrato un aumento di incidenza negli ultimi anni, in relazione ad industrializzazione ed occidentalizzazione dei paesi in via di sviluppo. Questi rapidi cambiamenti dell'incidenza delle IBD possono essere difficilmente spiegati con cambiamenti a livello genomico, ma evidenziano come fattori ambientali e stile di vita siano importanti co-fattori nell'insorgenza delle IBD. In altri casi invece, è stata riscontrata la predisposizione di alcune etnie allo sviluppo delle IBD, indipendentemente dall'area geografica o dal periodo storico, come nel caso del maggior rischio di MC tra gli ebrei (Ek et al.; 2014).

Per quanto riguarda il sesso invece non sono state rilevate differenze d'incidenza tra maschi e femmine, con distribuzione uguale in numerosi studi. In relazione all'età, l'incidenza delle IBD è maggiore tra i 20 e 40 anni, con una media leggermente più alta per la CU rispetto a MC. A ulteriore supporto di un cambiamento nella epidemiologia di queste patologie negli ultimi anni si è riscontrato un aumento delle diagnosi di IBD nei bambini (Ponder e Long; 2013).

2.3 Eziologia

L'esatta eziologia delle IBD deve ancora essere chiarita, ma l'ipotesi più accreditata è che esse siano scatenate da una complessa interazione tra fattori genetici, ambientali (ad esempio la microflora intestinale) e immunologici. La principale ipotesi è che le IBD siano il risultato di una risposta immunitaria eccessiva contro batteri endogeni, che si verifica in individui geneticamente predisposti (Scaldaferri et al.; 2013). Un'ipotesi di lavoro alternativa sostiene che le IBD sono il risultato di una risposta infiammatoria irregolare, piuttosto che eccessiva, causata da difetti del sistema immunitario intestinale. Altre ipotesi includono le IBD tra le malattie autoimmuni in cui gli antigeni, che attivano esageratamente la risposta immunitaria, sono batteri luminali, parassiti nematodi o allergeni presenti nei cibi (Kraneveld et al.; 2008).

Di seguito sono riassunti i fattori che sono stati associati all'insorgenza delle IBD.

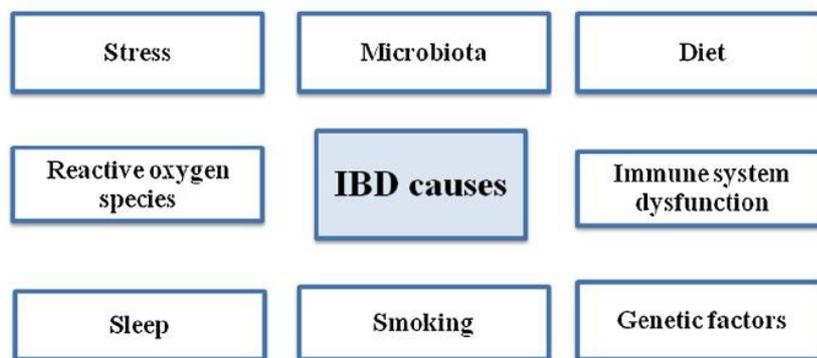


Figura 2.1 Fattori coinvolti nell'eziologia delle malattie infiammatorie intestinali (Sobczak et al.; 2014)

2.3.1 Fattori genetici

Sono state riscontrate numerose evidenze che descrivono MC e CU come il risultato di una predisposizione genetica, con multipli geni di suscettibilità, alcuni in comune in entrambe le malattie, altri legati indipendentemente a una o all'altra (Ardizzone e Porro; 2005).

Screening effettuati sull'intero genoma umano, hanno dimostrato che il gene NOD/CARD15 conferisce suscettibilità al MC. Localizzato nel cromosoma 16 in famiglie con diversi membri affetti dalla malattia, il gene codifica per proteine citosoliche che legano frammenti batterici, è espresso nei monociti e attiva il fattore di trascrizione NF-kB coinvolto nella risposta infiammatoria. Almeno una mutazione in questo gene è stata riscontrata nel 50% dei pazienti con MC e nel 17% dei casi è stata riscontrata la presenza di due mutazioni. Il numero di mutazioni di questo gene sembra inoltre essere correlato al grado di progressione dei sintomi (Sobczak et al.; 2014). La frequenza delle mutazioni in pazienti con CU è paragonabile a quella dei soggetti sani, a conferma che le due malattie sono correlate ma distinte. Per spiegare l'influenza di questo gene nella suscettibilità alle IBD, sono state avanzate due ipotesi: l'attivazione della caspasi-1 indica il ruolo di questo gene nell'apoptosi, mentre la presenza di un dominio ricco di leucine (caratteristico in proteine che identificano pattern molecolari di origine microbica) indica il suo ruolo nell'immunità innata. NF-kB è più espresso in lesioni del MC e di conseguenza anche numerose citochine

proinfiammatorie la cui trascrizione è mediata da NF- κ B, incluse TNF-alfa, IL1, IL6 e IL12 (Ardizzone e Porro; 2005).

Associato ai geni NOD1 e NOD2, il gene ATG16L1 ha dimostrato di predisporre alle IBD, in particolare in alcuni suoi polimorfismi. Questo gene è coinvolto nell'autofagia e la compromessa funzione di NOD2 e ATG16L1 può portare a cambiamenti della microflora intestinale.

Anche mutazioni nel gene della E-caderina (CDH1) hanno dimostrato di predisporre alle IBD, in modo particolare, un polimorfismo di questo gene è coinvolto nella MC provocando modificazioni della permeabilità intestinale e conseguente accesso dei batteri alla sottomucosa (Sobczak et al.; 2014).

La patogenesi delle IBD è stata associata a mutazioni nel gene Muc2, le cui mutazioni missenso possono portare a stress del reticolo endoplasmatico, all'inibizione delle cellule dendritiche e a una sovrapproduzione di citochine da parte di linfociti Th17, Th1 e Th2. Anche polimorfismi del gene IRGM possono contribuire alterando la risposta a batteri intracellulari.

Nei pazienti con CU mutazioni del gene MDR1, coinvolto nella resistenza ai farmaci, sembrano essere particolarmente comuni (Sobczak et al.; 2014). È stata riscontrata una forte associazione tra CU e la regione degli antigeni dei leucociti umani coinvolti nella risposta infiammatoria (Ardizzone e Porro; 2005).

Dal punto di vista genetico, oltre a mutazioni di alcuni geni, sono coinvolte un gran numero di miRNAs. L'espressione di alcuni miRNAs è modificata nella mucosa non infiammata di pazienti con CU o MC, condizione che potrebbe aumentare la suscettibilità della parete intestinale allo sviluppo o alle recidive delle IBD. I miRNA sovraespressi colpiscono soprattutto geni associati al rischio di IBD incluso ATG16L1 (Sobczak et al.; 2014).

Va tuttavia sottolineato come recenti meta-analisi su popolazioni molto numerose hanno definitivamente dimostrato che solo nel 20% dei pazienti con IBD sia possibile rilevare un'associazione genetica diretta, documentando come alla base di questa malattie ci sia l'influenza di numerosi fattori e non soltanto la ereditarietà di specifiche mutazioni in geni dell'immunità innata (Ek et al.; 2014; Leone et al.; 2014; Doecke et al.; 2014; NG et al.; 2012, Casanova et al.; 2009).

2.3.2 Fattori immunologici

In condizioni fisiologiche, il sistema immunitario del tratto gastrointestinale è impegnato a controllare i microbi presenti nel lume intestinale pur mantenendo una limitata o assente risposta ad antigeni di microorganismi commensali o presenti nel cibo (condizione indicata come anergia). La rottura dello stato di omeostasi e di attivazione prolungata della risposta immunitaria locale porta all'aumento della produzione di citochine e chemochine che attivano la risposta cellulare e umorale e stimolano il progredire delle malattie infiammatorie intestinali. L'insieme di citochine espresse dipende dal profilo di linfociti T helper che vengono reclutati. Storicamente la differenza tra MC e CU è stata descritta come infiammazione mediata da linfociti Th2 nei pazienti con CU, caratterizzato dall'aumento di IL-5, e mediata da un profilo TH1 nella MC con aumento di IL-2 e INF γ . Recentemente questa visione della CU è stata rivista, dopo la scoperta della popolazione Th17, produttrice di citochine IL17, IL-21, IL22 e IL26 (Basso et al.; 2014).

Anomalie nella composizione e nel comportamento di macrofagi intestinali umani sono state oggetto di numerosi studi negli ultimi anni. Nella mucosa di pazienti con MC è stato riscontrato l'accumulo di macrofagi pro-infiammatori. I profili di espressione dei recettori per le chemochine e di rilascio di citochine sono molto diversi tra macrofagi intestinali CD14+CD33+, rilevati in pazienti con MC, rispetto a macrofagi CD14-CD33+, considerati i tipici macrofagi intestinali. (Bain et al.; 2013; Kamada et al.; 2008). Inoltre alcuni dati recenti hanno rivelato la presenza di disfunzioni nei macrofagi di pazienti con MC. In particolare queste cellule hanno dimostrato l'incapacità di secernere livelli di citochine e chemochine paragonabili a macrofagi di individui sani, indicando le disfunzioni di queste cellule tra le principali cause della insorgenza delle IBD (Marks; 2011).

2.3.3 Fattori psicologici

L'ansia e la depressione possono essere causa o conseguenza delle IBD. Squilibri di umore possono contribuire allo sviluppo della CU, ma allo stesso tempo, i fastidiosi sintomi delle IBD possono determinare ansia e depressione. In particolare, le donne sono più soggette all'influenza negativa delle IBD sulla qualità della vita. Oltre ad ansia e depressione, anche lo stress influisce notevolmente nel decorso delle IBD (Ananthakrishnan; 2013). Condizioni di stress, infatti portano all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), che inibisce il sistema immunitario, e può indurre reazioni infiammatorie anomale nella mucosa intestinale nei pazienti con IBD. Lo stress può, infatti, indurre l'aumento della produzione di TNF- α e IL-6 ed il peggioramento dei sintomi della CU (Bonaz e Bernstein; 2013).

2.3.4 Fattori ambientali

L'importanza dei fattori ambientali è supportata dall'aumento della frequenza delle IBD nei paesi più sviluppati e nei paesi in via di sviluppo (Sobczak et al.; 2014). I fattori ambientali che possono influenzare sviluppo e attività del sistema immunitario mucosale e della microflora enterica sono elencati di seguito.

Dieta

Non è ancora stata dimostrata una diretta connessione tra dieta e malattie infiammatorie croniche intestinali e quindi la dieta non è considerata un fattore eziologico ma può influenzare l'attività e contribuire alla progressione della malattia. È stata riscontrata una correlazione positiva tra lo sviluppo delle IBD e il consumo di cibi ricchi di zuccheri e grassi animali mentre il rischio di IBD è ridotto nel caso di consumo di agrumi, verdura, pesce (Martin et al.; 2014).

Fumo

L'effetto o meno del fumo di sigaretta nelle due forme di IBD, rappresenta uno dei più intriganti fattori ambientali nelle malattie infiammatorie croniche intestinali. La nicotina gioca, infatti, un duplice ruolo nello sviluppo e nella progressione delle IBD: aumenta il rischio di MC, che si riduce solo 4 anni dopo che si è smesso di fumare, mentre sembra alleviare i sintomi della CU (Thomas et al.; 2005).

Il fumo di sigaretta ha effetto sull'immunità cellulare e umorale, aumenta la produzione di muco nella mucosa, mentre sia il fumo che la nicotina riducono la motilità colonica. Studi *in vivo* hanno dimostrato che la nicotina ha un effetto inibitorio sulla funzione delle cellule Th2, che sono predominanti nella CU, ma non ha effetto nelle cellule Th1, predominanti nella MC (Lakhan e Kirchgessner; 2011).

Gli effetti opposti del fumo rispecchiano l'effetto della nicotina nell'intestino, dove aumenta o diminuisce rispettivamente l'attività di ossido nitrico sintetasi (NOS) e può contribuire in modo indiretto alla formazione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Inoltre è stato dimostrato che nell'intestino tenue, la nicotina causa la riduzione dei livelli di IL-10, citochina dall'effetto anti-infiammatorio, ma media anche il rilascio di IL-6, citochina ad attività pro-infiammatoria, determinando la stimolazione dei linfociti e il conseguente aumento della produzione di ROS (Sobczak et al.; 2014).

Specie reattive dell'ossigeno

Lo stress ossidativo è definito come lo sbilanciamento tra processi ossidativi, responsabili della formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dei sistemi antiossidanti. Studi recenti riportano che i livelli di prodotti dello stress ossidativo e enzimi relativi, principalmente proteasi come elastasi e collagenasi, sono più alti in colite ulcerosa in stato di attività e in remissione.

Nelle IBD, è stato confermato l'incremento dell'attività dell'ossido nitrico sintetasi (NOS), che determina l'aumento dei livelli di ossido nitrico (NO), il quale può contribuire alla formazione dei ROS ma agisce anche come antiossidante. È stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli di NO e l'attività delle IBD e livelli elevati di NO sono stati registrati sia in MC che CU (Bhattacharyya et al.; 2014).

2.3.5 Fattori microbiologici

Nonostante gli agenti microbici sembrano essere coinvolti nella patogenesi delle IBD, l'infezione da parte di nessun singolo patogeno ha dimostrato in maniera convincente di essere causa universale delle IBD. Gruppi eterogenei di microorganismi sono stati riscontrati in queste patologie e in particolare alcuni microorganismi, quali *Mycobacterium paratuberculosis*, il virus della varicella e *Listeria monocytogenes* (Friswell et al.; 2010). Nel tratto intestinale, è presente un sistema immunitario mucosale complesso costituito da cellule epiteliali ed ematopoietiche che impedisce reazioni infiammatorie verso il normale microbiota. Negli ultimi anni si è ipotizzata la possibilità che, se queste interazioni vengono perturbate, i componenti della normale flora intestinale, possano in qualche modo innescare, iniziare o contribuire allo sviluppo delle IBD. I batteri all'interno del lume intestinale costituiscono un complesso ecosistema, non sono tuttavia state dimostrate significative differenze tra il microbiota intestinale di CU, MC ed individui sani, fatta eccezione per il significativo decremento di batteri anaerobi e di lattobacilli in pazienti con stato di malattia attiva ma non in IBD in stato inattivo. I pazienti con IBD, in confronto con soggetti controllo, presentano un numero minore di batteri con capacità anti-infiammatorie e/o più batteri con proprietà proinfiammatorie (Ferreira et al.; 2014).

Escherichia coli (*E. coli*), e in particolare il ceppo *E. coli* aderente invasivo (AIEC) è stato associato all'eziopatogenesi delle IBD. Numerosi studi molecolari hanno messo in luce l'importanza di *E. coli* come fattore implicato nel MC, ma non ne hanno ancora confermato

la rilevanza nella CU. La prevalenza, l'abbondanza e la ricchezza di ceppi potenzialmente patogeni in pazienti con IBD indicano l'associazione tra ceppi AIEC e danno alla mucosa intestinale in pazienti con CD. Condizioni ambientali dell'ospite potrebbero influire sulla presenza e abbondanza di AIEC nella popolazione totale di *E. coli* in ileo e colon di pazienti con MC. Inoltre questi ceppi patogeni si sono dimostrati un buon indicatore per la disbiosi nelle IBD e per la diagnosi differenziale tra IBD e IBS e tra i sottotipi di IBD (Lopez-Siles et al.; 2014; Conte et al.; 2014; Martinez-Medina et al.; 2009).

In conclusione, questa complessa interazione tra fattori genetici, ambientali e microbionici culmina in un'attivazione disordinata della risposta immunitaria della mucosa, probabilmente facilitata da un difetto nella barriera epiteliale e del sistema immunitario, risulta in una infiammazione continuata e nella distruzione del tessuto.

2.4 Caratteristiche generali della Malattia di Crohn e della Colite Ulcerosa

Il Morbo di Crohn è un disordine del sistema immunitario che può svilupparsi in ogni sezione del tratto gastroenterico, dalla bocca all'ano, e che coinvolge principalmente la regione ileo-colica dell'intestino.

A livello macroscopico il danno si estende nell'intero spessore della parete intestinale, con infiammazione transmurale dalla mucosa alla sierosa ed è molto frequente lo sviluppo di granulomi, ovvero aggregati linfoidi, nella parete intestinale.

La MC può essere suddivisa in tre tipi: infiammatoria, ostruttiva e con sviluppo di fistole. I primi due tipi si presentano generalmente insieme e sono dovuti a ispessimento della parete intestinale indotto dall'infiammazione che può causare ostruzione del lume. Nei casi più gravi, le ulcere transmurali possono perforare completamente l'intestino e generare delle fistole. Questa condizione richiede sempre l'intervento chirurgico (Bandzar et al.; 2013).

I sintomi associati al MC non sono specifici e dipendono dall'età d'insorgenza della patologia. Negli adulti prevalgono dolore addominale, spesso nella parte destra del basso addome, talora con alvo diarroico, perdita di peso, appetito ridotto. Sono possibili disturbi perianali come ragadi e fistole. Nel caso d'insorgenza in età pediatrica si possono manifestare anche crescita ridotta e maturazione sessuale ritardata. La complicazione più frequente è l'occlusione intestinale (Fakhoury et al.; 2014).

La CU è una patologia cronica che alterna fasi di attività e fasi di remissione. È caratterizzata da infiammazione ricorrente della mucosa colica che può avere un'estensione variabile e che generalmente inizia nel retto per poi espandersi verso il cieco. A differenza della MC, l'infiammazione nella CU interessa principalmente la mucosa ed è caratterizzata da ulcere superficiali, associate spesso a microascessi (Rogler; 2014).

I pazienti che soffrono di CU provano dolore principalmente nella parte sinistra del basso addome e soffrono di diarrea spesso sanguinolenta con perdita di peso. Il sanguinamento è più frequente rispetto alla MC.

Entrambe le malattie provocano spiacevoli disagi, riducendo in modo significativo la qualità della vita dei pazienti affetti (Fakhoury et al.; 2014).

2.5 Terapie farmacologiche per le IBD

Attualmente non è disponibile un trattamento in grado di guarire da queste patologie, ma le terapie, anche le più moderne, sono rivolte al controllo della sintomatologia. Essa è tradizionalmente costituita da farmaci 5-aminosalicilici, corticosteroidi e immunosoppressori. Negli ultimi quindici anni però si è sviluppato un nuovo approccio per la cura di queste malattie, basato su composti “biologici”, così chiamati per la loro natura proteica (anticorpi e citochine) e sull’uso di pro e pre-biotici (Kraneveld et al.; 2008).

Gli scopi del trattamento delle IBD sono l’induzione e il mantenimento della remissione, il miglioramento della qualità della vita e la prevenzione dello sviluppo di complicazioni e di ricorrere a interventi chirurgici. La ricerca mira quindi a bloccare l’attività del sistema immunitario e inibire l’attività di citochine proinfiammatorie, chemochine e integrine (Speight e Mansfield; 2013).

2.5.1 Aminosalicilati

Gli acidi 5-aminosalicilici (5-ASAs), quali mesalazina, olsolazina e sulfasalazina, sono stati a lungo la principale terapia nel trattamento delle IBD. Gli ASA agiscono inibendo la sintesi di prostaglandine e leucotrieni tramite acetilazione di serine nel sito attivo dell’enzima ciclo ossigenasi (COX-1 e COX-2). L’acetilazione impedisce la conversione dell’acido arachidonico in endoperossido PGG₂ da parte della 5-lipoossigenasi con conseguente inibizione dei mediatori chimici dell’infiammazione e della chemiotassi di neutrofili e macrofagi.

Farmaci 5-ASA esercitano la loro azione legando i recettori nucleari della proliferazione perossisomale (PPAR)- γ all’interno delle cellule epiteliali del colon e il loro effetto è dimostrato solo a livello topico. Per questo motivo risultano solo parzialmente efficaci nel trattamento del MC per la presenza di infiammazione transmurale. Recenti studi con ampie casistiche hanno, infatti, dimostrato l’assenza di significativa efficacia di questa classe di farmaci nel trattamento dei pazienti con MC. L’acido 5-aminosalicilico viene utilizzato per trattare i sintomi nella fase acuta e aiuta a mantenere la malattia in stato di remissione. Gli effetti benefici di questo gruppo di farmaci sono al contrario largamente dimostrati per il trattamento di pazienti con colite ulcerosa in stato di attività lieve o moderata. La dose ottimale di questo farmaco non è ancora stata stabilita ma recenti trial clinici (ASSCEND, Assessing the Safety and Clinical Efficacy of a New Dose of 5-ASA trials) hanno dimostrato che anche basse dosi di farmaco sono efficaci, ma il meccanismo di azione è ritenuto troppo lento, mentre elevate dosi, non si sono dimostrate migliori nel raggiungere lo stato di remissione rispetto a dosi moderate.

Fondamentale per l’efficacia del trattamento è l’efficienza del trasporto del farmaco sulla superficie della mucosa intestinale. La somministrazione topica ha dimostrato che la concentrazione del farmaco nella mucosa è circa 100 volte maggiore rispetto alla somministrazione sistemica, rendendo preferibile la somministrazione per via orale o rettale, rispetto a quella sistemica (Speight e Mansfield; 2013).

2.5.2 Corticosteroidi

I corticosteroidi hanno costituito per anni il miglior approccio nel trattamento delle esacerbazioni acute delle IBD. La loro azione costituisce nel sopprimere la trascrizione di

geni proinfiammatori, quali NF-kB, mediante l'interazione con i recettori dei glucocorticoidi situati nel nucleo cellulare. Essi inoltre inibiscono il reclutamento delle cellule immunitarie e l'espressione di molecole di adesione in tessuti infiammati (Hayashi et al.; 2004).

L'uso giornaliero e a lungo termine, anche a basse dosi di questi farmaci, determina, però, la comparsa di numerosi effetti collaterali, incluso il rischio di infezioni opportunistiche. Inoltre in numerosi pazienti si sono sviluppati vari gradi di resistenza ai glucocorticoidi, rendendo la terapia inefficace. Queste problematiche hanno portato allo sviluppo di Budesonide, un farmaco glucocorticosteroide che si è dimostrato particolarmente efficace nell'induzione della remissione in CU e nel MC ileo-colico. Esso, infatti, è stato sviluppato per essere disponibile a livello dell'ileo distale e del colon prossimale, ma la sua disponibilità a livello sistemico è particolarmente ridotta, e con essa anche i rischi di effetti collaterali (Ford et al.; 2011).

2.5.3 Immunomodulatori

A questa classe di farmaci appartengono i farmaci immunosoppressori chiamati *tiopurine*, 6-mercaptopurina (6-MP) e azatioprina (AZ). Nonostante il meccanismo di azione delle tiopurine non sia ancora del tutto chiaro, il loro effetto è stato associato all'inibizione della proliferazione dei linfociti e all'inibizione di sintesi di nucleotidi o proteine, svolta attraverso l'incorporazione del farmaco attivo nei nucleotidi cellulari, con effetti anti-infiammatori di soppressione delle funzioni di cellule T e dell'attività delle cellule Natural Killer. Inoltre si ritiene che esse siano in grado di indurre l'apoptosi in linfociti T attivati. La morte cellulare programmata può essere associata alla riduzione dell'infiammazione dovuta al blocco dell'espressione di molecole della famiglia dei Tumor Necrosis Factor (Thomas et al.; 2005, Sales-Campos et al.; 2014).

Essi sono utilizzati in particolare in pazienti in cui la terapia con corticosteroidi è ormai inefficace e per ridurre la ricorrenza di recidive dopo intervento in pazienti con MC. Le tiopurine si sono dimostrate inoltre particolarmente efficaci nella terapia a lungo termine di MC peri-anale e caratterizzata da fistole. Il loro uso è molto diffuso e ben stabilito, ma reazioni dose-indipendenti o di ipersensibilità sono state descritte con l'uso di 6-MP/AZA e includono epatiti, artriti e febbre (Zenlea e Peppercorn; 2014).

Metotrexate (MTX) è l'antagonista dell'acido folico maggiormente usato nella terapia per malattie autoimmuni. Il suo meccanismo d'azione è associato all'inibizione degli enzimi implicati nella via del folato ed è coinvolto nella sintesi di purina e pirimidina. Esso quindi interrompe la sintesi del DNA, determina l'aumento dei livelli extracellulari di adenosina, inibendo la produzione di IL-1 e sopprimendo la funzione delle cellule T (Sales-Campos et al.; 2014). La sua efficacia nelle terapie contro le IBD è dimostrata solo nell'induzione e mantenimento della remissione nella MC, dove è stato dimostrato essere affidabile. Esso viene utilizzato in pazienti refrattari e intolleranti alla terapia con tiopurine.

La *ciclosporina* è un inibitore della calcineurina e agisce bloccando la trascrizione delle citochine nei linfociti-T. Il complesso che essa forma con la proteina citoplasmatica ciclofilina A, inibisce la proteina calcineurina (PP2B) che defosforila il fattore di trascrizione NF-AT, prevenendone l'entrata nel nucleo e la conseguente mancata produzione di citochine proinfiammatorie quali IL-2. È stato dimostrato l'effetto di questo farmaco

nell'induzione della remissione nella CU, ma è considerato poco sicuro a causa del rischio di seri effetti collaterali (Zenlea e Peppercorn; 2014).

Tutti questi agenti terapeutici, pur con meccanismi diversi, agiscono sul sistema immunitario attivando la risposta mediata dalle cellule Th2 e diminuiscono l'infiammazione mediata da cellule Th1, inattivando i linfociti T CD4+ e CD8+ e prevenendo la produzione di IL-1, IL-2, IL-4 e INF- γ . Questo porta alla produzione di citochine anti-infiammatorie quali IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Questi composti, che hanno dimostrato ridurre l'infiammazione intestinale, sono generalmente somministrati per via orale. Il limite di questi farmaci è che non avendo un target cellulare specifico, se assunti ad alte dosi, possono determinare effetti collaterali indesiderati (Fakhoury et al.; 2014).

2.5.4 Farmaci biologici

Un passo importante nella terapia delle IBD è stato l'introduzione di anticorpi monoclonali anti-TNF α , in grado di ridurre la quantità di questa proteina nel tessuto infiammato, efficaci sia nel MC che nella CU. L'introduzione di anticorpi monoclonali anti-TNF, potente citochina proinfiammatoria dal ruolo fondamentale nelle IBD, ha rivoluzionato in particolar modo il trattamento del MC. Nonostante il meccanismo d'azione non sia del tutto chiaro, si pensa che gli anticorpi anti-TNF α causino l'apoptosi delle cellule infiammatorie che portano TNF legato alla membrana cellulare (Speight e Mansfield; 2013).

L'*Infliximab (IFX)* è un anticorpo monoclonale chimerico composto per il 75% da anticorpi umani e dal 25% di anticorpi murini, che agisce neutralizzando le molecole di TNF α , alle quali la regione variabile è complementare, impedendo loro di legarsi al recettore. Questo farmaco si è dimostrato efficace nel trattamento e mantenimento di MC in fase di attività severa, nell'induzione della remissione in pazienti con MC refrattario alla terapia con steroidi, di migliorare la CU di grado moderato o severo in pazienti refrattari alle terapie convenzionali. L'uso di questo farmaco è generalmente riservato a terapie di salvataggio. Inoltre esso non può essere somministrato per via orale poiché sarebbe distrutto dagli enzimi digestivi il che rende necessaria la somministrazione per via intravenosa a intervalli di 6-8 settimane.

Adalimumab (ADA) è un anticorpo monoclonale ricombinante completamente composto da anticorpi umani contro anti-TNF α e di conseguenza dimostra una minore immunogenicità rispetto a *Infliximab*. È somministrato per via subcutanea. Nel MC si è dimostrato efficace nell'induzione e nel mantenimento della remissione in pazienti non trattati con *Infliximab*, in pazienti con moderato e severo grado di malattia che non rispondono all'*Infliximab* e in pazienti con MC con fistole. In pazienti con CU induce e mantiene la remissione in pazienti con CU in attività moderata o severa refrattaria alla terapia convenzionale con steroidi o immunomodulatori.

Il farmaco *Thalidomide* è in grado di sopprimere l'azione delle principali citochine proinfiammatorie coinvolte nell'infiammazione intestinale. Infatti, questo farmaco destabilizza l'RNA messaggero determinando una diminuzione significativa della quantità di TNF- α . Inoltre stimola la produzione di cellule T citotossiche e ne aumenta il numero. Tra gli effetti collaterali vi sono sonnolenza, ipertensione, rash cutanei e neutropenia. Per migliorare

l'uso di questo farmaco bisognerà sviluppare un adeguato sistema di distribuzione del farmaco stesso verso le aree del tratto digerente più coinvolte (Zenlea e Peppercorn; 2014).

2.5.5 Antibiotici, prebiotici e probiotici

Il microbiota intestinale include un centinaio di specie diverse e più di 15000 ceppi diversi di batteri. Lo stomaco e l'intestino tenue sono relativamente poveri di batteri, mentre il colon ospita oltre 10-12 mila microorganismi, principalmente appartenenti ai Phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* in aggiunta a Archaea, Eukarya, virus e lieviti. La presenza del microbiota intestinale determina uno stato di infiammazione fisiologica di basso grado in cui il sistema immunitario è in continuo stato di attivazione e l'omeostasi mucosale richiede un continuo equilibrio tra componenti pro e anti-infiammatorie. Negli ultimi anni la ricerca si è concentrata nello studio della relazione tra disbiosi e malattie intestinali, tra le quali le IBD. Tra i batteri patogeni maggiormente coinvolti nell'eziologia delle IBD sono stati identificati *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Enterobacter* (Kostic et al.; 2014).

Gli antibiotici sono spesso utilizzati nella cura delle IBD e sono considerati particolarmente efficaci in MC con localizzazione perianale, nella paucite e nel postoperatorio. Alcuni dati promettenti hanno dimostrato che la terapia antibiotica può portare a remissione e prevenzione delle ricadute.

I probiotici contengono organismi vitali, una quantità sufficiente dei quali riesce a raggiungere l'intestino in stato attivo e ad espletare un effetto benefico. Sono principalmente batteri che producono acido lattico e lieviti. Nonostante il loro meccanismo di azione sia ancora poco chiaro, si ipotizza che essi modulino la permeabilità della mucosa e l'attività del sistema immunitario mucosale, allontanando i batteri patogeni dalla superficie intestinale. I più utilizzati sono *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* che inibiscono la crescita di patogeni e competono con questi ultimi per l'adesione alle cellule epiteliali.

Anche i prebiotici sono spesso utilizzati nelle IBD. Essi sono agenti fermentati selettivamente che permettono cambiamenti specifici nella composizione e/o nell'attività della microflora intestinale, conferendo benefici nella salute dell'ospite. Sono generalmente composti da oligosaccaridi non digeribili come frutto-oligosaccaridi (FOS) galatto-oligosaccaridi (GOS), inulina e altri e agiscono stimolando in modo specifico la crescita di batteri benefici per l'intestino.

Questi agenti agiscono modulando la produzione di citochine infiammatorie nella mucosa intestinale, modulando la composizione della flora intestinale (Scaldaferri et al.; 2013).

2.6 Il sistema nervoso enterico

Il sistema nervoso enterico (SNE) costituisce la più grande e complessa componente del sistema nervoso autonomo: esso è localizzato nella parete del tratto gastrointestinale e si distribuisce per tutta la sua circonferenza e lunghezza, dall'esofago allo sfintere anale, e nelle ghiandole associate. Il sistema nervoso enterico regola diverse funzioni incluse la motilità intestinale, la nocicezione, il flusso sanguigno locale, il trasporto e la secrezione nella mucosa, la risposta immunitaria e l'attività endocrina (Costa et al.; 2000).

Il SNE è organizzato in due cerchi concentrici di gangli, composti da una complessa rete di neuroni e cellule enterogliali, connessi da una fitta rete di fibre intergangliari. Questi cerchi concentrici sono chiamati plessi ganglionari maggiori e prendono il nome di plesso

mienterico (o Plesso di Auerbach) e plesso sottomucoso (o Plesso di Meissner). Il primo è localizzato tra gli strati di muscolatura liscia longitudinale e circolare e la sua funzione principale consiste nel regolare la contrazione e il rilassamento della parete intestinale. Il secondo è localizzato tra lo strato di muscolatura circolare e la muscolaris mucosae ed ha il compito di rilevare segnali provenienti dal lume, regolare il flusso sanguigno gastrointestinale e controllare la funzione e la secrezione delle cellule epiteliali (Hansen; 2002).

Il SNE è costituito da tre classi di neuroni: neuroni primari afferenti, che rilevano stimoli chimici e meccanici nell'ambiente luminale; interneuroni, che inviano segnali ascendenti e discendenti, e motoneuroni eccitatori e inibitori che controllano le funzioni delle cellule effettrici (Goldstein et al.; 2013).

Il controllo esercitato dal SNE sulle funzioni del tratto gastro-intestinale, avviene attraverso l'intensa interazione tra i diversi tipi cellulari presenti nell'intestino ed è mediato da un'ampia varietà di messaggeri chimici, quali neuropeptidi, neurotrasmettitori e gas (NO). La gamma di neurotrasmettitori rilasciata si differenzia in base al tipo di neurone e al segmento intestinale in cui si trova. SNC e SNE esprimono la stessa gamma di neurotrasmettitori: tra i principali acetilcolina, dopamina e serotonina, ma il sistema nervoso enterico non utilizza noradrenalina. In base alle sostanze prodotte, le cellule nervose sono classificate in eccitatorie, se producono acetilcolina e sostanza P, o inibitorie se producono norepinefrina o ossido nitrico (Nezami e Srinivasan; 2010).

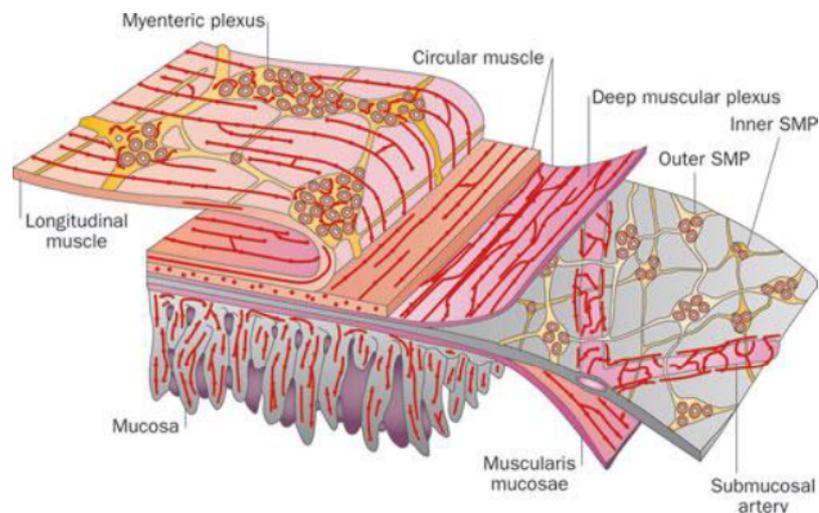


Figura 2.2 Rappresentazione degli strati che compongono il sistema nervoso enterico (Furness; 2012)

2.6.1 I fattori neurotrofici

Le cellule intestinali, durante lo sviluppo e per tutto il periodo della loro vita, sono esposte a numerosi fattori neurotrofici che modulano diverse attività cellulari, quali sopravvivenza e proliferazione, migrazione, differenziazione e mantenimento delle cellule progenitrici (Nezami e Srinivasan; 2010).

I principali fattori neurotrofici presenti a livello gastrointestinale sono: il fattore di crescita nervoso NGF (nerve growth factor), le neurotrofine NT-3 e NT-5, il fattore neurotrofico derivante dal cervello BDNF (brain-derived neurotrophic factor), il fattore neurotrofico

derivante dalla glia GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor), il fattore ciliare neurotrofico CNTF (ciliary neurotrophic factor) e il fattore inibitore della leucemia LIF (Leukemia inhibitory factor).

Tra questi il GDNF in particolare, è coinvolto nell'insieme di segnali necessari per la proliferazione e la migrazione dei precursori del SNE. Esso è espresso nel tessuto mesenchimale intestinale, si lega preferenzialmente ai recettori GFR- α 1 e attiva le tirosin chinasi RET, espresse nelle cellule precursori del SNE (Uesaka et al.; 2013). Questo fattore neurotrofo è prodotto soprattutto dalle cellule muscolari lisce della parete intestinale (Rodrigues et al.; 2011). La sua produzione in condizioni fisiologiche è regolata da stimoli provenienti anche dal lume intestinale (Brun et al.; 2013) e agisce anche preservando la funzione barriera dell'epitelio intestinale mentre aumenta durante processi flogistici (Von Boyen et al.; 2011). A sottolineare l'importanza di questo particolare fattore nel mantenimento del SNE, è stato recentemente dimostrato che anomalie strutturali e funzionali del SNE associate al deficit di segnali derivanti dai recettori TLR2, sono completamente corrette in seguito a somministrazione di GDNF (Brun et al.; 2013).

2.6.2 Le neuropatie del sistema nervoso enterico

L'insieme dei disordini in cui le funzioni del sistema nervoso enterico sono compromesse o anormali viene indicato con il termine neuropatie. Le cause di queste disfunzioni possono essere congenite, causate da deficit dello sviluppo, sporadiche o acquisite, secondarie ad altri stati di malattia o indotte da farmaci. Alcuni esempi di neuropatie del SNE sono la malattia di Hirschsprung, il megacolon aganglionico, la stenosi pilorica ipertrofica, la sindrome dell'intestino irritabile e la costipazione cronica (Goldstein et al.; 2013). Nel colon la presenza del SNE è di cruciale importanza e nelle neuropatie in cui è assente, come nella malattia di Hirschsprung, o severamente danneggiato, come nella malattia di Chagas, la stessa sopravvivenza del paziente è a rischio.

I target farmacologici per il trattamento delle neuropatie sono generalmente recettori di neurotrasmettitori o ormoni, tra i quali recettori per la serotonina, recettori muscarinici e dopaminici (Furness; 2008).

2.7 L'asse intestino-cervello-microbiota

La comunicazione tra sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso enterico (SNE) avviene in modo bidirezionale: il cervello è costantemente informato dai nervi afferenti riguardo l'attività intestinale, mentre è ormai noto come stress e stati psicologici influiscano sulle funzioni intestinali. Questa comunicazione prende il nome di asse intestino-cervello. Da anni è confermata la sua azione su digestione e motilità e studi recenti hanno dimostrato anche il suo coinvolgimento nei meccanismi immunologici (Wouters e Boeckxstaens; 2011). L'interazione tra il sistema nervoso e il sistema immunitario gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria e avviene attraverso una complessa serie di neurotrasmettitori, citochine e ormoni che agiscono come meccanismi contro-regolatori capaci di spegnere l'infiammazione e ripristinare l'omeostasi (Matteoli e Boeckxstaens; 2013).

Negli ultimi anni si è inserito un terzo elemento nell'asse, trasformandola in asse intestino-cervello-microbiota. Attraverso meccanismi di trasduzione endocrini, immunologici o

neuronal, i batteri sono in grado di influenzare il sistema nervoso enterico e regolano la capacità dell'ospite di combattere i batteri. Molecole di origine microbica possono interagire direttamente con i nervi afferenti in situazioni in cui la barriera epiteliale è compromessa e la permeabilità è aumentata (stress o infiammazione). Oppure il segnale può raggiungere i neuroni presenti nella parete intestinale mediante cellule trasducenti nell'epitelio, come le cellule enterocromaffini, attraverso cascate di segnali attivate dai recettori Toll-like (TLR) (Rhee et al.; 2009).

2.8 I macrofagi intestinali

I macrofagi intestinali rappresentano la più grande popolazione di fagociti mononucleati tessuto-specifici nel corpo. Cellule del sistema immunitario innato, essi sono posizionati nella lamina propria sottoepiteliale, in prima linea nel meccanismo di difesa intestinale. Questa posizione è ideale per la vicinanza al lume intestinale che contiene batteri e prodotti microbici. I macrofagi riconoscono velocemente i cambiamenti che avvengono nell'ambiente luminale o la presenza di sostanze estranee e trasmettono informazioni alle cellule adiacenti. La comunicazione avviene attraverso il rilascio di citochine che promuovono diversi tipi di risposta nelle altre cellule, come adesione cellulare, migrazione e presentazione degli antigeni. Le loro funzioni sono varie e comprendono: regolare la risposta infiammatoria verso batteri che riescono a oltrepassare la barriera epiteliale, proteggere la mucosa dai patogeni, raccogliere detriti cellulari e non, mantenere l'omeostasi influenzando la rigenerazione tissutale e il metabolismo (Platt e Mowat; 2008). I macrofagi intestinali preservano la capacità fagocitica e battericida di tutti i macrofagi, ma non esprimono in superficie i recettori per componenti batteriche e producono bassi livelli di citochine pro-infiammatorie come TNF α , IL6, IL12 e IL23 (Nakata et al.;2013).

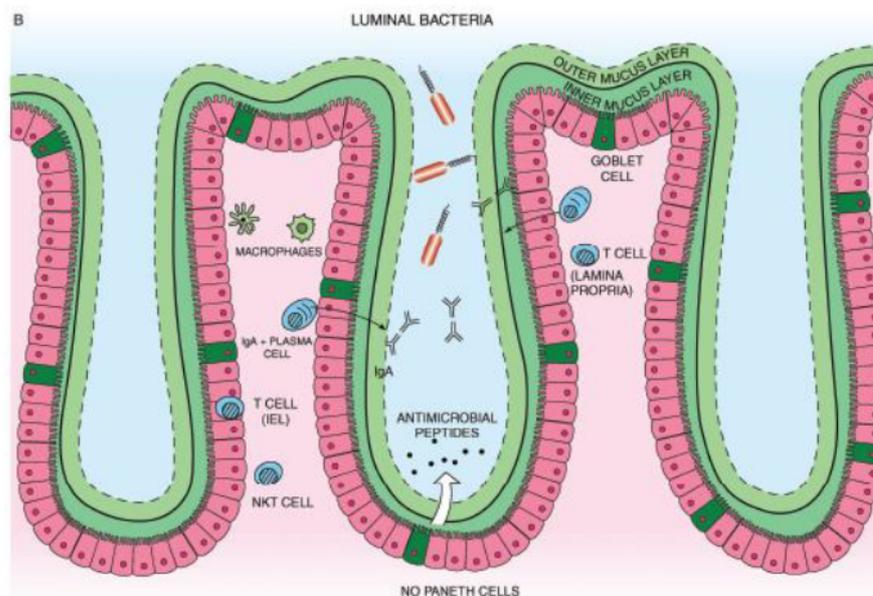


Figura 2.3 Rappresentazione schematica del sistema immunitario della mucosa del colon. I macrofagi occupano una posizione in prima linea nella difesa dell'intestino da parte dei batteri luminali, posizionandosi proprio al di sotto degli enterociti che compongono le cripte del colon (Cader e Kaser.; 2013).

2.8.1 Origine dei macrofagi intestinali

Tutti i macrofagi tissutali derivano da cellule staminali pluripotenti del midollo osseo, che si differenziano in macrofagi o granulociti in base alla cascata di citochine cui sono sottoposti. Mentre lo stimolo da parte di IL3 e GM-CSF (fattore di stimolazione delle colonie di macrofagi e granulociti) porta alla differenziazione sia in granulociti che monociti; lo stimolo con IL1, IL3 e M-CSF (fattore di stimolazione delle colonie di macrofagi) induce la proliferazione e differenziazione nei precursori dei monociti o cellule fagocitarie mononucleate. In condizioni omeostatiche, il precursore può svilupparsi sia in cellule dendritiche che in monociti. Questi ultimi, attraverso il circolo sanguigno, migrano nei diversi tessuti e si differenziano in macrofagi tessuto-specifici. La differenziazione dell'uno o l'altro fenotipo, oltre che dalle citochine, dipende anche da fattori di crescita e fattori di trascrizione (Smith et al.; 2011).

Nel gruppo di cellule fagocitarie mononucleate si distinguono macrofagi e cellule dendritiche in base all'espressione di particolari proteine della membrana cellulare. I macrofagi murini si differenziano dalle DC per l'espressione di marker di superficie quali F4/80 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1), CD11b e CD18 (conosciuti anche come MAC1), CD68 e recettori Fc. Per la caratterizzazione dei macrofagi oltre ai marker di superficie si studiano i profili di espressione di specifiche citochine e la risposta innescata in seguito a stimolazione microbica.

I macrofagi intestinali, a differenza di altre cellule mononucleate tissutali, non sono capaci di proliferare o di migrare da tessuti vicini, poiché incapaci di attività chemotattica. Il rimpiazzamento di cellule senescenti o apoptotiche avviene quindi solo mediante reclutamento da precursori nel circolo sanguigno nella mucosa del tratto gastrointestinale (Smith et al.; 2011).

In base alla loro posizione anatomica e al fenotipo funzionale i macrofagi intestinali sono suddivisi in sottopopolazioni che lavorano assieme per mantenere la tolleranza alla flora intestinale e ad antigeni alimentari (Murray e Wynn; 2011).

2.8.2 Macrofagi M1 e M2

Nell'intestino sono presenti due classi di macrofagi: M1 o M2. Macrofagi M1, o attivati per via classica, mediano la difesa dell'organismo da patogeni intracellulari (batteri, protozoi e virus) e partecipano all'immunità antitumorale. Essi sono attivati dai ligandi dei recettori Toll-like (per esempio, lipopolisaccaride) e da Interferon- γ (INF- γ), esprimono citochine pro-infiammatorie e ossido nitrico (NO). I macrofagi M2, o attivati per via alternativa, hanno funzioni anti-infiammatorie e regolano la guarigione del tessuto e la loro attivazione è stimolata da IL4 o IL13. Si differenziano dai macrofagi M1 perché esprimono in superficie, il recettore per il mannosio CD206 e la catena α del recettore per IL4 e secernono IL10, fattore di crescita trasformante (TGF)- β , Arginasi-1 (Arg1), importanti nella lotta contro parassiti extracellulari (Fairweather e Cihakova.; 2009).

2.8.3 Macrofagi intestinali ed IBD

Come precedentemente descritto, la mancanza di tolleranza da parte di macrofagi intestinali verso i batteri intestinali si è rivelata una delle concause legate alla patogenesi delle IBD (Nakata et al.; 2013).

Sono state riscontrate alcune differenze tra i meccanismi che si sviluppano nella difesa immunitaria innata di individui sani ed individui affetti da IBD.

Come prima accennato, numerosi studi hanno analizzato come diversi fattori di crescita determinino lo sviluppo di diversi fenotipi cellulari. I monociti stimolati da GM-CSF si differenziano in macrofagi di tipo infiammatorio (M1), caratterizzati da iperproduzione di IL12 e IL23 dopo stimolo batterico, ma bassa espressione di IL10. Al contrario, il fattore di crescita M-CSF contribuisce alla differenziazione in macrofagi di tipo anti-infiammatorio (M2), che esprimono abbondantemente IL10, ma non producono IL12 e IL23. Un ambiente del colon ricco di M-CSF contribuisce quindi alla differenziazione in macrofagi dalle proprietà anti-infiammatorie in condizioni normali. È stato dimostrato come, in pazienti con Morbo di Crohn, i monociti non si differenzino correttamente in risposta a M-CSF, determinando lo sviluppo di un fenotipo anormale che può contribuire alla patogenesi dell'infiammazione intestinale. Allo stesso modo macrofagi derivati da topi difettivi del gene per IL10 differenziano in modo anormale in risposta a CSF-1 rispondendo con un eccesso di IL12 e IL23 a stimoli batterici e contribuendo alla patogenesi della colite. (Kamada et al.; 2005).

Un'altra differenza riscontrata consiste nel fatto che le cellule endoteliali dei vasi sanguigni della mucosa di pazienti con IBD, in particolare MC, esprimono molecole che promuovono il reclutamento, l'adesione e la migrazione trans-endoteliale di monociti circolanti nella mucosa infiammata in modo maggiore rispetto a pazienti sani (Burgio et al.; 1995, Thomas e Baumgart; 2012). Inoltre i macrofagi della mucosa intestinale sana, non esprimono il recettore CD14 (complesso proteico che comprende la proteina di legame dell'LPS), mentre gran parte di macrofagi intestinali di pazienti con IBD esprimono questo recettore, suggerendo un elevato tasso di reclutamento di monociti circolanti (Grimm et al.; 1995). Oltre all'espressione di questo recettore, i macrofagi di pazienti con IBD dimostrano anche altre caratteristiche che non hanno cellule di pazienti sani, come espressione di CD80 e attività di "burst" respiratorio (Smith et al.; 2011).

Nell'intestino umano sano, i macrofagi intestinali contribuiscono alla differenziazione dei linfociti Treg, sopprimendo invece la risposta immunitaria Th1 e Th17 indotta dalle cellule dendritiche. Al contrario macrofagi differenziati dal sangue periferico di pazienti con MC, mostrano una attività pro-infiammatoria acuta alterata scompensata verso *E. coli* ed agonisti dei TLR, associata ad una minore capacità di reclutamento dei neutrofili (Cader e Kaser; 2013). L'infiammazione acuta non deriva da un aumentato rilascio di citochine pro-infiammatorie per singola cellula, che risulta invece minore rispetto a macrofagi derivati da individui sani, ma dal sovrannumero di cellule presenti nella mucosa (Marks; 2011).

Studi recenti sembrano indicare che tra le cause principali della MC vi sia la disfunzione dei macrofagi. Smith e colleghi hanno dimostrato che macrofagi derivati da sangue periferico di pazienti affetti da MC non secernono citochine pro-infiammatorie e chemochine in seguito a stimolo esogeno. Alla base di questa incapacità non ci sono difetti nella trascrizione o nella traduzione, bensì un errore nel trasporto delle proteine indirizzate verso i lisosomi per

la degradazione, anziché alle vescicole secretorie per il rilascio (Smith et al.; 2009). Pertanto a seguito dell'errata distruzione delle citochine all'interno dei macrofagi i pazienti con MC sviluppano il danno intestinale per un'inappropriata risposta infiammatoria al contenuto luminale caratterizzata dall'inadeguato richiamo di neutrofili con la conseguente formazione di granulomi tipici della malattia costituiti da macrofagi (Casanova e Abel; 2009). La persistente attivazione di una grande quantità di macrofagi è successivamente in grado di determinare il rilascio di citochine che reclutano linfociti e indurre la caratteristica infiammazione dominata da cellule Th-1 della MC.

La caratterizzazione del MC come immunodeficienza ha portato a nuove potenziali terapie basate sulla somministrazione di fattore di stimolazione delle colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF) ricombinante (sargramostim) o terapia con cellule staminali per la ricostruzione del sistema immunitario. (Marks; 2011)

2.8.4 La produzione di IL1 β : l'inflammosoma

Il processamento del precursore inattivo di 31-kDa dell'Interleuchina-1 β nella sua forma bioattiva di 17-kDa e il suo rilascio mediante lisosomi secretori non sono controllati da un unico sistema, bensì da diversi meccanismi. Infatti, i responsabili del processamento in forma bioattiva, non solo di IL1 β , ma anche dell'interleuchina 18 (IL18), sono i complessi proteici chiamati inflammosomi. Diversi tipi di inflammosoma sono stati descritti e tutti includono membri della famiglia di recettori NOD-like (NLR). Questi grandi complessi macromolecolari formano una struttura adatta a reclutare e attivare la pro-caspasi-1 attraverso interazioni proteina-proteina di tipo CARD-CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain-containing proteins) o pirina-pirina (domini PYD). Il più studiato tra gli inflammosomi è il recettore NOD-like contenente il dominio pirina 3 (NLRP3), che forma complessi che includono la proteina adattatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein), responsabile dell'attivazione della caspasi-1. L'inflammosoma NLRP3 è attivato dall'interazione con sostanze di origine batterica (muramyl dipeptide, RNA batterico, RNA a doppio filamento), profili molecolari associati a danno (DAMPs) o a patogeni (PAMPs), cristalli di acido urico, amiloide- β ma anche componenti esogeni, quali silicio e asbesto (Wang et al.; 2013).

Come precedentemente descritto, i macrofagi intestinali devono mantenere uno stato di ridotta reattività verso i batteri intestinali, al fine di evitare una persistente infiammazione. Il meccanismo che regola la produzione di IL1 β è fondamentale per questo scopo. Vi è una sostanziale differenza tra l'attività della caspasi-1 nei monociti del sangue periferico rispetto a quella dei macrofagi intestinali. Infatti, la caspasi-1 è costitutivamente attivata nei monociti, che rilasciano IL1 β matura dopo la singola stimolazione da parte di ligandi dei Toll-like receptor (TLR) e la cui secrezione è indotta da rilascio endogeno di ATP. Al contrario, i macrofagi necessitano di una doppia stimolazione: il primo stimolo è costituito dai ligandi dei TLR che inducono la trascrizione di IL1 β , mentre il secondo è costituito da ATP esogeno che ne induce la secrezione (Netea et al.; 2010).

Recenti lavori si sono concentrati nello studio del ruolo di NLRP3 nel mantenimento dell'omeostasi intestinale attraverso la regolazione di processi protettivi innati. Modelli di colite sperimentale indotta da DSS e TNBS hanno dimostrato lo sviluppo di una colite più

severa in topi knockout per il gene NLRP3 (Hirota et al.; 2011). Inoltre polimorfismi di questo complesso sono stati associati alla malattia di Crohn (Schoultz et al.; 2009).

2.9 Il sistema colinergico anti-infiammatorio

2.9.1 Acetilcolina, recettori nicotinici e α -bungarotossina

L'acetilcolina è un importante neurotrasmettitore e neuromodulatore del sistema nervoso. Essa media la trasmissione neuronale nelle sinapsi gangliari in neuroni simpatici e parasimpatici ed è il principale neurotrasmettitore implicato nella comunicazione parasimpatica post-gangliare del nervo vago efferente.

L'acetilcolina agisce attraverso due tipi di recettori: i recettori muscarinici metabotropici e nicotinici ionotropici. Questi recettori oltre che in strutture neuronali, sono presenti in cellule immunitarie, la maggior parte delle quali sono anche in grado di produrre acetilcolina.

L'acetilcolina esplica due ruoli nell'organismo: quella neuronale agisce come neurotrasmettitore e fa da mediatore per una rapida comunicazione tra neuroni e cellule effettrici; quella non-neuronale agisce come molecola segnale coinvolta nella regolazione del fenotipo cellulare. L'acetilcolina è sintetizzata principalmente dalla colin-acetiltransferasi (ChAT) a partire da colina, derivata da fosfolipidi o extracellulare trasportata all'interno da trasportatori per la colina a alta affinità (CHT1), e acetilcoenzima A (AcCoA), principale prodotto del catabolismo di carboidrati, proteine e lipidi. Nelle terminazioni nervose l'acetilcolina intracellulare è immagazzinata in vescicole grazie ai trasportatori vescicolari per l'acetilcolina (VAcHT) e viene rilasciata nell'ambiente extracellulare dalle terminazioni nervose mediante esocitosi.

Le cellule non-neuronali che producono acetilcolina invece, poiché non possono generare potenziali d'azione o aprire canali calcio regolati dal voltaggio ed effettuare l'esocitosi, presentano trasportatori cationici (OCT), una famiglia di trasportatori responsabili del flusso di cationi organici attraverso la membrana cellulare. L'acetilcolina presenta un'emivita molto breve ed è rapidamente idrolizzata in colina e acetato dall'acetilcolinesterasi (AChE) e in minor parte da butirilcolinesterasi (BChE). L'azione dell'acetilcolina è limitata alle vicinanze delle cellule in cui viene sintetizzata e rilasciata (Zoheir et al.; 2012).

I recettori nicotinici per l'acetilcolina sono una famiglia di canali ionici pentamerici a controllo di ligando. Sono recettori cationici ionotropici rapidi, che mediano l'influsso di Na^+ e Ca^+ e l'efflusso di K^+ .

L'afflusso di calcio intracellulare attiva segnali di trasduzione mediati da protein-kinasi, come adenilato ciclasi (AC), protein-kinasi A (PKA), protein-kinasi C (PKC), protein-kinasi calcio-calmodulina dipendenti (CaMK) e fosfatidilinositolo 3 kinasi (PI3K). Le molecole fosforilate come la protein-kinasi ERK, attivata da mitogeni e regolata da segnali extracellulari, porta all'attivazione di fattori di trascrizione come cAMP response element-binding protein (CREB) e fattore nucleare NF- κ B. L'attivazione dei fattori di trascrizione modula l'espressione genica e porta a cambiamenti fenotipici nelle cellule (Zoheir et al.; 2012).

Nell'uomo sono presenti 16 subunità per il recettore nicotinico: 7 subunità α ($\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10$) e 6 subunità non α ($\beta 2, \beta 3, \beta 4, \delta, \epsilon$ e γ). $\alpha 2- \alpha 6, \beta 2- \beta 4, \delta, \epsilon$ e γ formano

recettori etero-oligomeric, mentre $\alpha 7$ e $\alpha 9$ formano recettori monomeric e dimostrano diverse proprietà strutturali e farmacologiche (Wang et al.; 2003). Il gruppo di Tracey ha documentato la presenza della subunità alfa7 del recettore nicotino per l'acetilcolina nei macrofagi (Pavlov et al.; 2003).

L' α -bungarotossina (α -btx) è una piccola proteina basica, che fa parte delle α -neurotossine presenti nel veleno dei serpenti Elapidi ed è un potente antagonista dei recettori nicotini per l'acetilcolina. Il morso di questi serpenti provoca, infatti, la paralisi della zona interessata (Huang et al.; 2013): la maggior parte dei recettori AChR sono localizzati nella membrana post-sinaptica dei muscoli volontari e contiene due siti di legame per l'acetilcolina accoppiati a un canale ionico intrinseco. Il legame della α -btx al recettore previene il legame dell'acetilcolina rilasciata dai nervi, provocando paralisi del muscolo. La ripresa della motilità è lenta a causa del basso tasso di dissociazione della tossina.

Le proprietà accoppiate di alta affinità e bassa dissociazione hanno fatto della bungarotossina un mezzo efficace per la localizzazione cellulare e subcellulare e per la quantificazione degli AChRs. Inoltre, poiché il legame delle piccole molecole agoniste o degli antagonisti è mutualmente esclusivo, la marcatura con bungarotossina è spesso utilizzata per determinare l'occupazione di sostanze non marcate (Sine et al.; 2013).

2.9.2 Meccanismi del sistema colinergico anti-infiammatorio

Con il termine sistema colinergico anti-infiammatorio s'intende la capacità del sistema nervoso autonomo parasimpatico di regolare parzialmente il rilascio di fattore di necrosi tumorale (TNF), interleuchina 1β (IL 1β), proteina di box-1 gruppo di alta mobilità (HMGB1) e altre citochine pro-infiammatorie prodotte dalle cellule immunitarie. All'inizio degli anni 2000, il gruppo di Tracey ha studiato abbondantemente come i segnali provenienti dal nervo vago efferente sopprimano il rilascio di citochine pro-infiammatorie e inibiscano di conseguenza l'infiammazione (Pavlov et al.; 2003). Studi condotti *in vivo* in ratti con endotossinemia, hanno dimostrato come uno stimolo elettrico applicato in modo diretto sul nervo vago inibisca la sintesi di TNF α nel fegato prevenendo lo sviluppo di shock. Su questa base, seguendo l'ipotesi che il sistema colinergico parasimpatico possa modulare la risposta infiammatoria sistemica verso le endotossine, hanno dimostrato che l'acetilcolina, il principale neurotrasmettitore vagale, attenua in modo significativo il rilascio di citochine quali TNF, IL 1β , IL6 e IL18 ma non IL10 antiinfiammatoria, in colture di macrofagi derivati da sangue umano stimolate con LPS (Borovikova et al.; 2000).

Wang nel 2003, ha indagato sull'identità del recettore colinergico presente nei macrofagi che risponde ai segnali del nervo vago. Mediante stimolazione elettrica del nervo vago in topi WT e $\alpha 7$ deficienti ha dimostrato che la subunità $\alpha 7$ del recettore nicotino è essenziale e responsabile dell'inibizione della sintesi delle citochine, in particolare TNF α , grazie al sistema colinergico anti-infiammatorio (Wang et al.; 2003).

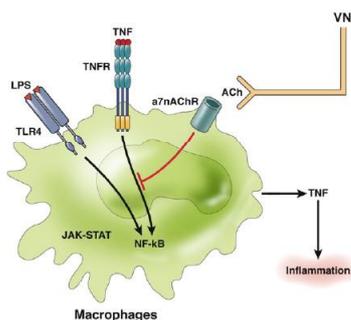


Figura 2.4 Rappresentazione schematica dell'effetto anti-infiammatorio del nervo vago sulla produzione di citochine da parte dei macrofagi. (Bonaz e Bernstein; 2013)

2.9.3 Studi su modelli animali

A supportare l'ipotesi d'interazione tra sistema nervoso e sistema immunitario sono stati presentati numerosi risultati sperimentali. Modelli animali di vagotomia hanno dimostrato lo sviluppo di una colite indotta da destrano sodio solfato, più severa sia a livello macroscopico che microscopico, con aumento dei livelli di NF-kB e citochine quali IL1 β , IL6 e TNF α , il cui effetto è stato riparato con la somministrazione di nicotina, analogo dell'acetilcolina prodotta dal nervo vago. L'effetto del nervo vago nell'attivazione di NF-kB si è dimostrato sufficientemente potente da poter essere rilevato *in vivo* con metodi di imaging bioluminescente, non solo in modelli di colite indotta ma anche in condizioni basali. È stato inoltre osservato che i livelli sistemici di NF-kB aumentano in modo significativo in animali vagotomizzati prima dell'induzione di colite mediante DSS (O'Mahony et al.; 2009). Una maggiore suscettibilità allo sviluppo di colite è stata dimostrata in modelli animali di depressione dovuta a separazione dalla madre, associata alla riduzione dei livelli di ACh nell'intestino. Questo fenomeno è stato invertito mediante trattamento con antidepressivi, l'effetto benefico del quale è stato in seguito eliminato da vagotomia. Nonostante il meccanismo non sia ancora stato chiarito, è stato osservato che la trasfusione di macrofagi isolati da topi depressi in topi riceventi sani aumenta la suscettibilità alla colite, dimostrando che i macrofagi sono il target del sistema colinergico anti-infiammatorio (Galitovskiy et al.; 2011).

2.9.4 Interazione tra sistema colinergico e cellule immunitarie

Il microambiente della mucosa e della sottomucosa determina l'attivazione della risposta immunitaria dopo esposizione ad antigeni non-self. La ricerca negli ultimi anni si è concentrata nel dimostrare che la modulazione da parte del sistema colinergico nel compartimento sottomucosale può avere un importante impatto nell'omeostasi del sistema immunitario mucosale.

Il sistema nervoso enterico forma una complessa rete di fibre nervose in vicinanza con cellule immunitarie intestinali sia nella sottomucosa, chiamata lamina propria, sia nella muscolaris externa dell'intestino. La via del segnale vagale potrebbe quindi essere condotta e amplificata dal SNE inducendo il rilascio di acetilcolina (ACh) nel microambiente intestinale portando alla modulazione della risposta immunitaria. Certamente, non può essere esclusa l'azione di altri neurotrasmettitori immunomodulatori quali peptide vasoattivo intestinale (VIP), glutammato e ossido nitrico. Tra le cellule influenzate dalla modulazione colinergica nel microambiente mucosale, vi sono i macrofagi sottomucosali e quelli localizzati tra gli strati muscolari longitudinali e circolari. Inoltre, altre cellule immunitarie, quali linfociti T, cellule dendritiche e mastociti, che esprimono i recettori nicotinici possono essere modulati dal sistema colinergico (Matteoli e Boeckxstaens; 2013). Recentemente è emerso che il nervo vago non interagisce direttamente con macrofagi intestinali ma che le fibre efferenti vagali stimolano neuroni mienterici che esprimono nNOS e ChAT, le cui terminazioni sono in prossimità di macrofagi residenti che esprimono $\alpha 7nAChR$. La modulazione vagale avviene quindi mediante neuroni enterici colinergici e nitrergici/VIPergici (Cailotto et al.; 2014)

2.9.5 L'analogo dell'acetilcolina: la nicotina

La nicotina è il principale alcaloide presente nel tabacco. Essa è rapidamente assorbita in polmoni, pelle e intestino e metabolizzata a cotinina nel fegato. L'effetto della nicotina si manifesta attivando i recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs). L'azione *in vivo* dipende dalla modalità di somministrazione, dalla dose e dall'organo target. L'effetto della nicotina nelle condizioni gastroenterologiche è probabilmente dovuto all'azione che svolge a livello locale e sistemico (Thomas et al.; 2005).

L'effetto della nicotina assunta mediante il fumo di sigaretta è stato ampiamente descritto. Il fumo riduce la severità della malattia in pazienti con CU, diminuendo i tassi di ospedalizzazione e portando a un sostanziale miglioramento del decorso della malattia nei fumatori rispetto ai non fumatori. Inoltre numerosi pazienti hanno dimostrato il peggioramento della malattia dopo aver smesso di fumare e miglioramento dopo la ripresa dell'abitudine al fumo. Nella MC, invece, il fumo esercita un effetto negativo, aumentando il rischio di ricadute, interventi e necessità di una terapia immunosoppressiva più aggressiva (Bastida e Beltrán; 2011).

La relazione tra CU e fumo è stata descritta da più di trent'anni. È stata inoltre dimostrata un'associazione dose-risposta tra la diminuzione del rischio di malattia e l'aumento dei livelli di fumo. Paragonando i dati di pazienti fumatori con quelli di pazienti che non hanno mai fumato, tutti gli studi indicano un'associazione protettiva nei fumatori che sviluppano un rischio minore di sviluppo di CU. Studi condotti sulle famiglie hanno dimostrato un'alta concordanza tra abitudine al fumo e il fenotipo delle IBD, con CU che si sviluppa nei non fumatori e MC nei fumatori. L'ipotesi avanzata è che data la predisposizione genetica a una forma d'infiammazione cronica intestinale, la presenza o meno dell'abitudine al fumo possa influire sullo sviluppo del fenotipo patologico rispettivamente di MC o CU. È stata inoltre studiata l'influenza del fumo sul decorso della malattia oltre che sullo sviluppo, confermando che il decorso della colite ulcerosa è più benigno nei fumatori che nei non fumatori per quanto riguarda riacutizzazioni, tasso di ospedalizzazione, bisogno di steroidi orali e colectomia. Lo smettere di fumare si è dimostrato dannoso per i pazienti affetti da UC (Bastida e Beltrán; 2011), mentre non è stata dimostrata nessuna significativa associazione tra esposizione al fumo passivo in infanzia e sviluppo di CU.

Le differenze tra il fumo attivo nella diagnosi tra MC, CU e popolazione sana è stata confermata. Per il MC gli studi hanno dimostrato che il fumo è un fattore di rischio per le riprese della malattia dopo intervento chirurgico. Studi sul fumo passivo hanno confermato il suo ruolo nell'aumentare il rischio di peggioramento della MC (Van der Heide et al.; 2009) ed è correlato a uno sviluppo precoce del MC nei bambini. Il fumo potrebbe alterare la composizione del microbiota intestinale, rompere i meccanismi immunitari protettivi bloccando il recupero da stress ossidativo attraverso il suo effetto sulle cellule mononucleate (Guo et al.; 2014).

Il fumo influisce anche sulla localizzazione e sul comportamento della malattia. Molti studi hanno riportato che i fumatori abbiano un decorso della malattia più grave rispetto ai non fumatori e hanno maggiori probabilità che la malattia si sviluppi in una forma più penetrante e che si aggravi più velocemente. Altri studi dimostrano un rischio maggiore di

coinvolgimento dell'intestino tenue e minor rischio di coinvolgimento del colon in pazienti fumatori (Mahid et al.; 2007).

Due modelli di colite murina indotta da oxazolone e acido 2,4,6-trinitrobenzen solfonico (TNBS) hanno dimostrato di mimare l'effetto della nicotina in CU e MC rispettivamente. Nella risposta mediata da Th2 caratteristica della colite oxazolone/CU, è stata registrata la sovraespressione del recettore $\alpha 7nAChR$, migliorando il decorso della colite, mentre nella risposta infiammatoria mediata da TH1/Th17 della colite da TNBS/MC l'espressione del recettore $\alpha 7$ è abolita, che può spiegare l'esacerbazione dell'infiammazione intestinale (Galitovskiy et al.; 2011).

2.10 L'immunità innata e i recettori Toll like (TLR)

L'immunità è la capacità di un organismo di sviluppare resistenza contro agenti esterni (infettivi e non) o componenti dell'organismo che non svolgono più le loro funzioni in maniera corretta. Con il termine di risposta immunitaria s'intende l'attività coordinata contro un potenziale agente lesivo, sviluppata dall'insieme delle cellule che compongono il sistema immunitario, il quale si divide in immunità innata e adattativa.

L'immunità innata provvede alla prima difesa verso i patogeni ed è costituita da meccanismi di difesa cellulari e umorali già presenti al momento dell'esposizione all'agente infettivo e pronti ad agire con rapidità. È costituita da un insieme di cellule e vie molecolari che comprendono le barriere chimico-fisiche (cute ed epiteli mucosali), cellule fagocitarie (macrofagi e neutrofili), cellule dendritiche, cellule Natural Killer e proteine (citochine). Le componenti dell'immunità innata riconoscono strutture condivise da varie classi di patogeni, ma che sono assenti sulle cellule dell'ospite, e reagiscono sostanzialmente in modo identico se l'infezione si ripete.

L'immunità adattativa si sviluppa più lentamente e costituisce una fase tardiva ma più efficace della risposta a un agente infettivo. Infatti, i principali componenti della risposta adattativa, i linfociti, producono anticorpi specifici verso l'antigene incontrato. Il sistema immunitario adattativo risponde in modo sempre più specifico, efficiente e rapido a ogni successivo contatto con lo stesso patogeno essendo in grado di ricordare e riconoscere a distanza di tempo l'organismo invasore (memoria immunologica).

Fino agli anni '90 si riteneva che l'immunità innata fosse innesca in maniera del tutto aspecifica. Negli ultimi anni però si è scoperto che il sistema immunitario innato riconosce i microrganismi attraverso una serie di recettori localizzati sia sulla superficie cellulare sia in compartimenti cellulari, i cosiddetti pattern recognition receptor (PRR) (Abbas et al.; 2010).

I PRR (pattern recognition receptor) riconoscono strutture conservate dei microorganismi chiamate profili molecolari associati a patogeni (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) e sono espressi sulla superficie cellulare o in organelli intracellulari di molte cellule effettrici del sistema immunitario innato. I Recettori Toll-like (TLR) appartengono a questa famiglia. Essi sono glicoproteine transmembrana caratterizzate da domini extracellulari con ripetizioni ricche di leucina (LRR) e domini citoplasmatici omologhi alla superfamiglia dei recettori per IL-1 (IL1R), chiamati TIR (Toll/IL1 receptor) (Shibolet e Podolsky; 2007). I ligandi dei TLR attivano due vie di trasduzione del segnale. I TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 attivano la via del segnale di MyD88, mediata da MyD88 stesso e TIRAP, mentre TLR3 attiva la via del

segnale alternativa "MyD88-indipendente", mediata da TRIF e TRAM; TLR4 è l'unico che le attiva entrambe. L'attivazione di queste vie determina la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NF- κ B e l'attivazione delle MAP chinasi (mitogen-activated protein kinases, MAPKs). Le proteine MyD88 e TIRAP sono responsabili dell'induzione di geni che codificano per citochine proinfiammatorie (TNF α , IL-1 β , IL-12), mentre TRIF e TRAM inducono la produzione di interferoni di tipo 1 (IFN α , IFN β) (Abraham e Medzhitov; 2011). I TLR hanno diverse localizzazioni all'interno della cellula in correlazione con i profili molecolari dei loro ligandi. TLR1, 2 e 4 sono espressi nella superficie cellulare e sono reclutati in un fagosoma in seguito ad interazione con il ligando. I TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 sono localizzati in compartimenti intracellulari, quali reticolo endoplasmatico, lisosomi ed endosomi (Akira e Takeda; 2004). Ogni TLR riconosce specifici PAMPS quali componenti della parete cellulare batterica (TLR2, 4 e 5), DNA di origine batterico (TLR9) e virale (TLR3, 7 e 8). A oggi sono noti 13 TLR nei mammiferi, dei quali TLR1-9 sono conservati nell'uomo e nel topo. In particolare, TLR2 forma degli eterodimeri con TLR1 e TLR6 che riconoscono rispettivamente triacil- e diacil-lipopeptidi derivati da batteri (Zheng et al.; 2013).

Poiché i TLR ricoprono un ruolo fondamentale nel riconoscimento dei patogeni, l'inappropriata attivazione delle vie del segnale da loro mediate può alterare il corso del processo infiammatorio e l'entità del danno tissutale (Shibolet e Podolsky; 2007), anche nel caso di malattie infiammatorie intestinali.

Numerosi studi riguardanti il coinvolgimento dei recettori Toll-like nelle IBD sono stati condotti su modelli animali. Topi knockout per i TLR hanno evidenziato profili di espressione dell'mRNA di specifici TLR alterati rispetto ai topi WT in risposta a stimoli infiammatori (Lundin et al.; 2008). L'assenza dei recettori predispone la barriera epiteliale al danno, determinando lo sviluppo di malattia e di stato d'infiammazione più severi in topi geneticamente modificati (Cario et al.; 2007).

Anche nell'uomo è stata riscontrata un'alterata espressione di TLR2 e TLR4 in diverse regioni del tratto gastrointestinale di pazienti con CU e MC (Frolova et al.; 2008). Inoltre polimorfismi nei geni codificanti per i TLR sono stati associati a un maggior rischio di sviluppo di IBD o ad una forma di malattia più estesa (Manolakis et al.; 2013; Török et al.; 2009; De Jager et al.; 2007).

3. SCOPO

L'esistenza del riflesso colinergico anti-infiammatorio che modula il rilascio di citochine pro-infiammatorie attraverso il recettore nicotinico $\alpha 7$ è ben documentata, tuttavia il suo ruolo nello sviluppo e persistenza dell'infiammazione intestinale cronica che caratterizza CU e MC non è del tutto chiaro. Inoltre studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato chiaramente che il fumo di sigaretta e in particolare la nicotina hanno un effetto soppressivo su macrofagi e linfociti, migliorando il decorso della CU, mentre paradossalmente aggravano il quadro clinico-istologico della MC. Pertanto nel mio progetto di dottorato mi sono proposta di studiare i meccanismi responsabili dell'attività anti-infiammatoria espletata dalla nicotina nei pazienti affetti da CU, ma non nei pazienti con MC. A tal fine dapprima sarà verificato se diversi livelli di espressione dei recettori nicotinici nei macrofagi dei pazienti con CU ed MC possa giustificare l'attività antitetica della nicotina sul decorso dell'infiammazione in questi pazienti. In seguito, sarà determinato se la neuropatia del sistema nervoso enterico, la cui presenza è descritta in questi pazienti, è responsabile dell'alterata modulazione/attività del recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi dei pazienti con IBD.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Selezione dei pazienti

Per lo studio dell'espressione dei recettori nicotinici (nAChR) nel MC e CU sono stati raccolti campioni di sangue e di mucosa colica e ileale. Sono stati studiati 92 pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali in conformità con la Dichiarazione dei Principi di Helsinki. Diagnosi ed estensione della CU e del MC sono state determinate mediante esami endoscopici, radiologici e istologici.

Sono stati inclusi nello studio pazienti con MC e CU secondo i seguenti criteri di inclusione:

- non fumatori o con sospensione del fumo da almeno 6 mesi (si intende abitudine al fumo di almeno 1 sigaretta/die per sei mesi continuativi), assenza di sostituti nicotinici (chewing-gum, cerotti)
- remissione di malattia o attività lieve, calcolata tramite l'indice di attività per la malattia di Crohn (Disease Activity Index, CDAI) e la scala di attività di Truelove-Witts (TW) per i pazienti con CU. Sono stati selezionati pazienti con MC con CDAI inferiore a 150 e 32 pazienti con CU con indice TW inferiore a 5.
- assenza di focolai infiammatori attivi
- assenza di terapia con farmaci immunosoppressori (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, anti-TNF α), corticosteroidi, e antimicrobici da almeno 3 mesi.
- anamnesi negativa per estesi interventi chirurgici all'intestino (pazienti con MC ileale o ileo-colica che abbiano subito solo resezione ileale inferiore a 10 cm sono stati inclusi nello studio).

Una volta selezionati i pazienti secondo i suddetti criteri di esclusione e una volta ottenuto il consenso alla raccolta e utilizzo dei tessuti, secondo il regolamento del Comitato Etico locale, sono stati raccolti i dati clinici sull'estensione e la durata di malattia e sull'abitudine al fumo, la terapia e successivamente l'esito dell'esame istologico.

Sono stati reclutati 24 volontari sani per i prelievi di sangue periferico e 17 controlli sani, costituiti da pazienti non fumatori sottoposti a screening per cancro colico. Tutti i soggetti reclutati hanno presentato esami bioumorali di routine negativi e assenza di lesioni macroscopiche ed istologiche alla colonscopia. I dati relativi ai pazienti inseriti nello studio sono riassunti nelle tabelle 4.1 e 4.2.

Malattia	M	F	Età media (anni)	Durata della malattia (anni)	Estensione della malattia
Colite Ulcerosa	28	18	51,26 ± 14,13	8 ± 8,34	Proctite 6 Colite colon sinistro 24 Pancolite 16
Malattia di Crohn	21	23	45,17 ± 15,37	9 ± 7,94	Colon 14 Ileo-colon 19 Ileo 7 Tratto GI superiore 4
Volontari Sani	6	18	26,43 ± 5,17		

Tabella 4.1 Soggetti inseriti nello studio condotto su macrofagi derivati da sangue periferico.

Malattia	M	F	Età media (anni)	Durata della malattia (anni)	Estensione della malattia
Colite Ulcerosa	7	6	53,32 ± 12,97	19,45 ± 8,34	Proctite 3 Colite colon sinistro 4 Pancolite 6
Malattia di Crohn	6	5	56,50 ± 15,70	33,36 ± 9,19	Colon 6 Ileo-colon 2 Ileo 1
Volontari Sani	7	10	62,76 ± 15,33		

Tabella 4.2 Soggetti inseriti nello studio condotto su macrofagi della mucosa colica.

4.2 Isolamento dei monociti dal sangue periferico e differenziazione in macrofagi

Da ciascun paziente sono stati prelevati circa 15 ml di sangue venoso periferico. Le cellule della frazione mononucleata del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich). Il sangue anticoagulato con EDTA è stato diluito 1:2 in soluzione fisiologica. Quindi 20 ml di sangue sono stati gentilmente stratificati su 10 ml di Ficoll e sottoposti a centrifugazione a 400xg per 20 minuti. Al termine della centrifugazione, le cellule mononucleate, stratificate nell'interfaccia Ficoll-plasma, sono state raccolte, diluite 1:10 con terreno RPMI sterile e centrifugate (1800 xg 10 min 4°C). Le PBMC sono state risospese in 5 ml di terreno di coltura DMEM completo (contenente 10% FBS v/v siero fetale bovino inattivato al calore, 1% antibiotico/antimicotico, 1% amminoacidi non essenziali, 1% sodio piruvato, 200 mM L-Glutamina in Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco) e contaminate con la camera di Bürker. Le PBMC sono state risospese alla concentrazione di 300000 cellule/ml (circa il 30% sono costituite da monociti) e seminate in piastre da 96 pozzetti (200 µl/pozzetto) ed incubate a 37°C in un'atmosfera composta dal 95% di O₂ e dal 5% di CO₂ e umidità al 90% per 2 ore. Le cellule non adese sono state rimosse mentre i monociti adesi sono stati lasciati in coltura per 7 giorni in DMEM completo addizionato con fattore di

differenziazione dei macrofagi (colony-stimulating factor M-CSF, 10 ng/mL, Immunotools). Il terreno è stato cambiato ogni 72 ore. Al termine dei 7 giorni di coltura, i macrofagi sono stati incubati con nuovo terreno e stimolati per 16 ore con o senza lipopolisaccaride (LPS, 1 µg/mL, Calbiochem) preceduto o meno da pretrattamento di 30 minuti con nicotina (1µM, Sigma-Aldrich). I surnatanti sono stati raccolti e conservati a -20°C per eseguire saggi ELISA mentre le cellule sono state raccolte per l'estrazione dell'RNA o per eseguire saggi citofluorimetrici.

4.3 Isolamento e coltura di macrofagi intestinali umani

Tutti i pazienti reclutati per lo studio sono stati sottoposti a pan-colonscopia. Per ciascun paziente nel corso della colonscopia sono state raccolte due biopsie a livello del sigma, a circa 10-15 cm dal margine anale. Le biopsie sono state poste in RPMI freddo e conservate in ghiaccio. Le biopsie sono state sminuzzate con bisturi e sottoposte a digestione enzimatica a 37°C con collagenasi tipo IV (0.5 mg/ml, Sigma-Aldrich) e DNasi-1 (10 µg/ml, AppliChem). Dopo 20 minuti gli aggregati cellulari sono stati dissociati meccanicamente mediante passaggio attraverso un filtro sterile (maglie 30 µm). Le cellule sono state centrifugate in terreno RPMI (1800 rpm per 8 minuti), e quindi risospese in DMEM completo (10% FBS, 1% antibiotico/antimicotico, 1% Amminoacidi non essenziali, 1% sodio piruvato, 200 mM L-Glutamina in Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco). Le cellule sono state risospese alla concentrazione di 400000 cellule/ml e un volume di 100 µl/pozzetto è stato seminato in piastre da 96 pozzetti ed incubate a 37°C in un'atmosfera composta dal 5% di CO₂ e umidità al 90% per 2 ore.

Le cellule sono quindi state stimolate con LPS (1 µg/ml, Calbiochem) in presenza o assenza di nicotina (10 µM, Sigma-Aldrich). L'inibitore del trasporto proteico intracellulare monesina (2 µM, eBioscience) è stato aggiunto durante le ultime 8 ore dell'incubazione. In altri pozzetti per determinare l'espressione dei recettori nicotinici α7, immediatamente dopo l'isolamento, le cellule sono state incubate per 30 min in ghiaccio con α-bungarotossina-AlexaFluor488 (diluizione 1/100, Molecular probes) in presenza o assenza di nicotina 500 µM (Sigma-Aldrich).

4.4 Ceppi murini utilizzati nello studio

Per lo studio sono stati utilizzati topi C57BL/6J acquistati da Harlan e topi transgenici deficienti per il recettore TLR2 (B6.129-Tlr2tm1Kir/J, TLR2^{-/-}) acquistati da Charles River.

Gli animali utilizzati nello studio sono stati stabulati presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco, sezione di Farmacologia e presso il Dipartimento di Medicina Molecolare, sezione di Fisiologia e di Anatomia Umana. Due topi per gabbia sono stati mantenuti in un ambiente a temperatura (22±2°C) e umidità controllate, con un ciclo luce/buio di 12 ore. Gli animali hanno avuto libero accesso a cibo e acqua nel corso della sperimentazione. Dopo una settimana di ambientazione, i topi sono stati casualmente desinati ai diversi gruppi sperimentali. La sperimentazione animale è stata condotta in osservanza alle normative europee e i protocolli sperimentali sono stati approvati dal CEASA (Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale) dell'Università di Padova, che ha il compito di verificare che gli esperimenti sugli animali siano scientificamente corretti,

metodologicamente appropriati, statisticamente congrui e l'impegno degli animali sia insostituibile, sotto licenza del Ministero della Salute Italiano.

4.5 Allestimento di un modello murino con infezione del sistema nervoso enterico da parte di HSV-1

Topi C57BL/6J di 10 settimane sono stati sottoposti a infezione da parte del virus neurotrofo Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) mediante un protocollo sperimentale caratterizzato da due somministrazioni. La prima somministrazione prevede l'inoculo intranasale (IN) di 10^2 pfu del virus. La soluzione virale in un volume totale di 10 μ l in PBS è stata instillata, mediante la punta di una pipetta, direttamente nelle narici dell'animale. La seconda somministrazione, eseguita a distanza di quattro settimane dalla prima, prevede un inoculo intragastrico di 10^8 pfu del virus HSV-1 in 100 μ l finali di PBS, somministrati mediante un ago bottonuto lungo 7 cm. I topi sono stati monitorati giornalmente per rilevare segni di danno neurologico o gastrointestinale. In base ad esperimenti condotti in precedenza che evidenziavano danni a carico del SNE dopo 1-2 e 6-10 settimane dall'inoculo intragastrico, gli animali sono stati utilizzati per questo studio dopo 6 settimane dall'inoculo intragastrico.

Il protocollo prevede un doppio inoculo. Il primo inoculo intranasale seguito da quello intragastrico, per evitare l'elevatissima mortalità che si osserva a seguito dell'inoculo diretto del virus a livello intestinale. Inoltre tale protocollo potrebbe mimare l'esposizione del tratto gastrointestinale umano a questo virus, in quanto la prima esposizione avviene tipicamente a livello labiale ma poi il virus viene rilasciato in maniera asintomatica dalla mucosa orale nel corso della vita potendo quindi raggiungere il sistema nervoso enterico.

Valutazioni istopatologiche, studi di biologia molecolare e di contrattilità dell'intestino di questi animali, hanno precedentemente dimostrato che HSV-1 infetta il SNE degli animali trattati secondo il protocollo descritto. La presenza del virus in questa sede provoca modesti incrementi della concentrazione dei mediatori dell'infiammazione associati ad alterazioni della peristalsi e contrattilità della muscolatura liscia e alterazioni strutturali del sistema nervoso enterico, senza tuttavia danno tessutale (Brun *et al.*; 2010; Brun *et al.*; 2013).

4.6 Trapianto allogeneico di cellule staminali emopoietiche (CSE): topi chimera

La sostituzione del compartimento staminale di un soggetto con le cellule di un donatore determina la convivenza nello stesso individuo del patrimonio genetico di due soggetti differenti; il ricevente in questo caso diventa genotipicamente una chimera. La cellula staminale non è presente solo a livello midollare o nel sangue periferico di un individuo, ma da essa derivano i macrofagi tissutali quali macrofagi degli alveoli polmonari, le cellule del Kupffer del fegato, gli osteoclasti, le cellule del Langherans della cute, le cellule microgliali del cervello.

I topi riceventi (C57BL/6J o TLR2^{-/-}) sono stati sottoposti a irraggiamento a 10-Gy totali mediante l'uso di un acceleratore lineare. Il midollo osseo, ottenuto dal femore del donatore (C57BL/6J o TLR2^{-/-}), è stato dissociato gentilmente mediante passaggio attraverso

un ago 16G e le cellule sono state contate. Un totale di 5×10^6 cellule è stato iniettato nella vena caudale del topo ricevente irradiato. Ai topi chimera sono stati somministrati 40 mg/L di neomicina in acqua da bere nelle due settimane successive al trapianto. Mentre i topi sono stati utilizzati 8 settimane dopo l'irraggiamento per consentire il completo recupero. Quattro gruppi di topi chimera per il midollo osseo sono stati formati (donatore → ricevente): i) WT riceventi midollo osseo da topi TLR2^{-/-} (TLR2^{-/-} → WT), ii) TLR2^{-/-} riceventi midollo osseo da topi WT (WT → TLR2^{-/-}), iii) WT riceventi midollo osseo da topi WT (WT → WT), iv) TLR2^{-/-} riceventi midollo osseo da topi TLR2^{-/-} (TLR2^{-/-} → TLR2^{-/-}). Il successo del trapianto è stato confermato mediante analisi di leucociti del sangue periferico positivi per TLR2 in citofluorimetria a flusso. Sono stati utilizzati per gli esperimenti solo topi che dimostravano un chimerismo nel sangue periferico maggiore dell'85%.

4.7 Induzione della colite con DSS e valutazione della severità dell'infiammazione

L'infiammazione del tratto digestivo è stata indotta mediante somministrazione di Sodio Destrano Solfato (DSS, 40kDa) al 3% nell'acqua da bere a topi dei diversi genotipi. La somministrazione è stata eseguita per 3 o 6 giorni. Durante questo periodo i topi hanno avuto libero accesso all'acqua nel corso della sperimentazione. Durante la somministrazione del DSS il peso corporeo degli animali è stato monitorato giornalmente assieme alle caratteristiche delle feci per determinare il grado di severità della colite. In particolare la severità della colite è stata calcolata utilizzando l'indice di attività di malattia (Disease Activity Index, DAI) che valuta perdita di peso, consistenza delle feci, sangue nelle feci. I sintomi sono stati registrati alla stessa ora ogni giorno dal giorno 0 al giorno 6. Lo score è stato calcolato come indicato in tabella 4.3.

Perdita di peso	Consistenza delle feci	Sanguinamento
0: <1%	0: normale	0: negativo
1: 1-5%	2: feci molli	2: positivo
2: 5-10%	4: diarrea	4: elevato
3: 10-15%		
4: >15%		

Tabella 4.3 Punteggio per determinare la severità della colite (DAI)

Dopo 3-6 giorni i topi sono stati sacrificati, la cavità addominale è stata aperta e il colon è stato immediatamente rimosso, aperto longitudinalmente, le feci rimosse ed utilizzate per estrarre i macrofagi mucosali, congelato in azoto liquido per la successiva estrazione di RNA o proteine, posto in liquido per inclusione (OCT) e congelato a -80°C, fissato in formalina e successivamente incluso in paraffina per analisi istopatologiche.

Quando indicato, i topi hanno ricevuto nicotina (25µg/ml, Sigma-Aldrich) nell'acqua da bere a partire da 3 giorni precedenti la somministrazione del DSS e durante la somministrazione del DSS per 5 giorni ed è di seguito stata determinata la severità della colite (AlSharari *et al.*; 2013). In un'altra serie di esperimenti topi TLR2^{-/-} (età 21 gg) sono stati trattati per una settimana con GDNF ricombinante (2µg/g) per via sottocutanea ed al termine del trattamento hanno ricevuto DSS 3% nell'acqua da bere per 3 giorni. Al termine

dell'esperimento è stato verificato il grado di attivazione della caspasi-1 nei macrofagi colici.

4.8 Analisi isto-patologiche

Sezioni di 5 µm di spessore sono state tagliate dai tessuti inclusi in paraffina. Per ciascun colon 6-8 sezioni sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina per la valutazione istologica. Per ogni campione sono stati analizzati 10 campi indipendenti a basso (x5) e alto (x20) ingrandimento mediante l'uso di microscopio Leica dotato di camera digitale. La valutazione del danno istologico causato dalla colite è stata effettuata con il seguente sistema di punteggio che va da 0 a 10 sulla base di tre criteri: infiltrato di cellule infiammatorie (0-3), danno tissutale (0-5) e presenza di edema (0-2).

4.9 Saggio della mieloperossidasi (MPO)

La mieloperossidasi è un enzima contenuto nei granuli azzurofilari dei leucociti polimorfonucleati. Saggi condotti su questo enzima sono stati utilizzati come indicatori dell'accumulo dei neutrofilari migrati nei tessuti durante un processo infiammatorio. I saggi della mieloperossidasi sono stati condotti su pezzi di colon murino dell'intero spessore.

Dieci mg di tessuto sono stati omogenizzati in 200 µl di bromuro di esadeciltrimetilammonio (HTAB) allo 0.5% solubilizzato in un tampone di fosfato di potassio 50 mM a pH 6.0, per 5 minuti alla frequenza di 20 Hertz (Mixer Mill MM300, Qiagen) e centrifugati per 10 minuti a 13000 rpm a 4°C. Per valutare l'attività della MPO sul supernatante prelevato, 7 µl di ciascun campione sono stati caricati in doppio in una piastra da 96. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di un buffer costituito da O-dianisidina diidrocloreuro (1.67 mg/ml) solubilizzata in un tampone di fosfato di potassio 50 mM a pH 6.0 e da perossido di idrogeno all'1%.

L'assorbanza è stata misurata a 450 nm con un lettore di piastra Sunrise (Tecan) eseguendo la lettura dopo 1, 2 e 3 minuti. L'attività della mieloperossidasi di ciascun campione è stata estrapolata considerando che un'unità di MPO è uguale ad 1 µmole di H₂O₂ convertita in un composto colorato che dà una variazione di assorbanza di 1.13 x 10⁻² nm/min. Le unità di MPO sono state infine espresse come unità di MPO/µg tessuto.

4.10 Saggi ELISA

Il saggio E.L.I.S.A è un dosaggio immuno-enzimatico che unisce la specificità degli anticorpi alla sensibilità della lettura spettrofotometrica di un substrato ossidato dell'enzima HRP (perossidasi della radice di rafano).

Il metodo ELISA sandwich per la determinazione di una proteina prevede che l'anticorpo specifico per la proteina d'interesse sia legato al fondo del pozzetto e che la sospensione contenente la proteina di cui si desidera determinare la concentrazione sia incubata successivamente. Al termine dell'incubazione si aggiunge l'anticorpo anti-proteina d'interesse marcato con l'enzima perossidasi di rafano, in seguito si aggiunge il substrato dell'enzima e infine si valuta l'attività enzimatica che risulta direttamente proporzionale alla quantità di proteina nel campione. È necessario fare una retta di taratura con concentrazione note di antigene/anticorpo. Si deve inoltre valutare il segnale aspecifico

(Non Specific Bound-NSB), che non deve superare il 5% che può essere dovuto all'impurità del tracciante, all'adsorbimento sulla piastra, all'intrappolamento fisico del ligando libero col complesso legato. Il NSB è valutato eseguendo il dosaggio sul solo tracciante, questo sarà poi sottratto ai campioni e alla retta di taratura. La sensibilità di ogni saggio ELISA può essere aumentata attraverso amplificazione enzimatica. In questo lavoro è stato utilizzato il sistema avidina-biotina: dopo che la proteina di interesse si è ancorata all'anticorpo legato alla base del pozzetto, si aggiunge l'anticorpo secondario marcato con la biotina, e poi l'avidina marcata con l'enzima. Aggiunto il substrato per l'enzima, si osserva che in condizioni standard l'attività enzimatica misurata è proporzionale alla quantità di antigene specifico presente nel campione in esame. In questo studio è stato impiegato metodo l'ELISA non competitivo indiretto "sandwich" per la determinazione dei livelli di IL1 β e TNF α e IL4 in topo e IL1 β , TNF α , IL10 nei saggi su uomo.

Preparazione dei campioni:

Sono stati utilizzati i) il surnatante delle colture di macrofagi derivanti dal sangue periferico umano e conservato a -80°C; ii) il surnatante derivante dall'omogeneizzazione di 25 mg di colon murino in 500 μ l di PBS contenente Inibitore delle Proteasi (estratto di pancreas 0.03mg/ml; proteinasi K 0.003 mg/ml; termolisina 0.0008 mg/ml; chimotripsina 0.0015 mg/ml; tripsina 0.0002 mg/ml; papaina 1.0 mg/ml; Roche). I tessuti sono stati omogenati per 5 minuti alla frequenza di 20 Hertz (Mixer Mill MM300, Qiagen) e quindi centrifugati a 13.000xg per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato prelevato e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Esecuzione del saggio:

La quantificazione delle proteine è stata eseguita con l'utilizzo di kit specifici: TNF α , IL1 β e IL4 murini (eBioscience) e TNF α , IL1 β e IL10 umani (DB Biosciences). Ogni campione è stato analizzato in duplicato. Micropiastre da 96 pozzetti ad alta capacità di legame (Costar) sono state incubate con lo specifico Coating Antibody alla concentrazione di 1-4 μ g/ml in Coating Buffer o Buffer carbonato a 4°C per 16 ore. L'anticorpo non legato ai pozzetti è stato rimosso e i siti di legame aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione con blocking buffer (PBS con 0,5% BSA e 0,1% Tween-20) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggio con washing buffer (PBS-Tween-20 0,05%, pH 7.4) nei pozzetti sono stati aggiunti i campioni e parallelamente è stata allestita una curva standard con diluizioni successive 1:2 della citochina di interesse partendo da una concentrazione di 2000 pg/ml fino ad arrivare alla concentrazione di 0 pg/ml. In seguito è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato alla biotina e la piastra è stata quindi incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi, il substrato tetrametilbenzidina (TBM solution) è stato aggiunto ai pozzetti e la piastra è stata incubata al buio. La reazione è stata quindi bloccata con Stop Solution (H₃PO₄ 1M). La lettura dell'assorbanza è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 450 nm, tramite un lettore per micropiastre (Sunrise, Tecan). La densità ottica rilevata di ciascun pozzetto è stata convertita in termini di concentrazione (pg/ml) mediante regressione lineare con la curva standard allestita della citochina di interesse.

4.11 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA è una tecnica che permette l'isolamento dell'RNA totale a partire da una piccola quantità di materiale di partenza. L'estrazione prevede quattro fasi: la lisi delle cellule, la denaturazione dei complessi nucleoproteici, la precipitazione dell'RNA e la rimozione delle contaminazioni di DNA e proteine.

L'estrazione di RNA totale da cellule in coltura o tessuti è stata effettuata utilizzando il kit E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I (Omega) a colonnine, seguendo il protocollo indicato. I tessuti (<30 mg di tessuto, omogeneizzati per 5 minuti a 20 Hz, Mixer Mill MM300, Qiagen) o le cellule (<10⁶ di cellule) sono stati lisati in 350 µL di TRK Lysis Buffer addizionato dell'agente riducente β-mercaptoetanololo (20 µL per 1 mL di TRK Lysis Buffer) che riduce i legami disolfuro responsabili del mantenimento della struttura e quindi dell'azione delle ribonucleasi che degraderebbero l'RNA. Dopo centrifugazione a 10000xg per 10 minuti, il surnatante è stato raccolto e addizionato di un uguale volume di etanolo al 70%, mescolato accuratamente e trasferito in colonnine (HiBind RNA column) munite di resina per fissare gli acidi nucleici. I campioni sono stati centrifugati a 10000xg per 2 minuti, in modo tale che l'RNA precipitasse fissandosi alla resina. Successivamente è stato eseguito un lavaggio con 250 µL di RNA Wash Buffer I.

A questo punto segue una fase di trattamento con 75 µL di DNasi DNA-free™ Kit (Ambion) per ridurre eventuali contaminazioni di DNA genomico, per 15 minuti a temperatura ambiente. Sono in seguito stati effettuati due lavaggi con RNA Wash Buffer II. Dopo l'inserzione delle colonnine nei tubi di eluizione, l'RNA è stato eluito in 40 µL di acqua DEPTC mediante centrifugazione. L'RNA totale estratto è stato conservato a -80°C.

Il contenuto di acidi nucleici (ng/µL) nelle preparazioni di RNA è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica (NanoDrop[®] ND-1000) alla lunghezza d'onda di 260 nm, mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti di assorbanza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . L'RNA è considerato puro se il rapporto $A_{260}/280$ è ~2. Acqua DEPTC è stata usata come bianco.

4.12 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)

Partendo da un filamento di RNA, la trascrizione inversa o retrotrascrizione, consente di produrre una molecola di DNA ad esso complementare (cDNA), grazie all'utilizzo di un enzima DNA polimerasi-RNA dipendente (o trascrittasi inversa) del virus della leucemia murina (MuLV) e sequenze nucleotidiche d'innesco, i primers universali (random hexamers), richiesti per poter iniziare la reazione. Tutte le procedure sono state eseguite in cappa a flusso laminare continuo al fine di evitare contaminazioni.

La miscela per la retrotrascrizione (RT) è costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5.5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 2.5 µM oligonucleotidi innesco universali (random hexamers), 60 U di inibitore dell' RNasi, 1.25 U di trascrittasi inversa MuLV, 200ng di RNA estratto ed acqua MilliQ fino ad un volume finale di 20 µL. La miscela viene quindi posta in un termociclatore (Mastercycler Personal, Eppendorf[®]). Il ciclo di reazione è costituito da tre fasi: la fase di appaiamento (innesco) dei random primer (25°C, 10 minuti); la fase di sintesi di molecole ibride cDNA-RNA da parte dell'enzima trascrittasi inversa (allungamento; 48°C, 60 minuti); la fase di eliminazione dell'RNA tramite l'utilizzo di RNase (95°C, 5 minuti) e di inattivazione dell'enzima trascrittasi inversa.

Successivamente, 1 µl del cDNA ottenuto è stato amplificato utilizzando primers specifici per i geni di interesse per valutare la presenza nell'mRNA di interesse. Gli oligonucleotidi di sintesi sono stati disegnati in base alla sequenza genica codificante la proteina d'interesse ricavata dall'analisi della GenBank mediante software per l'analisi delle sequenze e il disegno dei primer, Primer-Blast.

La reazione di amplificazione è stata condotta in 21 µl di una miscela contenente Tris-HCl pH 8.3 (20mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (250 µM) (Applied Biosystem), primer senso e antisenso (0.24 µM, Invitrogen), Taq polimerasi (0.625 U), acqua MilliQ e 1 µL cDNA. La reazione è avvenuta in un termociclatore (Eppendorf®Mastercycler personal) mediante 40 cicli di amplificazione. Dopo una fase iniziale di denaturazione del cDNA di 10 minuti a 95°C, ogni ciclo prevede 10 secondi a 95°C (fase denaturazione), 1 minuto alla temperatura specifica per ogni coppia di primer (fase di appaiamento) e 30 secondi a 72°C (fase di allungamento), seguiti al termine dei 40 cicli da 7 minuti a 72°C (termine). Le sequenze dei primers, le temperature di appaiamento e le dimensioni degli amplificati dei primer utilizzati sono riportate in tabella 4.4 .

Al termine della reazione di PCR, gli amplificati sono stati frazionati mediante elettroforesi su gel di agarosio a diverse concentrazioni in base alla lunghezza dell'amplificato (0.8-1.5% p/v). La visualizzazione delle bande alla luce UV (295nm) è stata possibile grazie all'intercalante nucleare gel red ed il software GelDoc4.

Come controllo è stata eseguita una PCR qualitativa per verificare la presenza, nei campioni utilizzati, di un gene espresso costitutivamente, il GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi).

4.13 Determinazione dei livelli di mRNA mediante real time PCR

La quantificazione dell'mRNA nei campioni retrotrascritti in cDNA è stata effettuata mediante PCR Real-Time quantitativa, che permette la contemporanea amplificazione e quantificazione del DNA, utilizzando il sistema ABI PRISM 7700 (Perkim Elmer), uno strumento che racchiude le funzioni di termociclatore, rivelatore di fluorescenza laser e software applicativi specifici che acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica d'amplificazione del cDNA.

I sistemi di rivelazione utilizzati sono il sistema UPL "TaqMan" e il sistema sonda "SYBR® Green I dye".

Il primo metodo, il sistema "TaqMan", utilizza sonde oligonucleotidiche fluorescenti sequenza-specifiche complementari alle regioni geniche bersaglio legate covalentemente all'estremità 5' da un fluoroforo ad alta energia che emette fluorescenza, il "Reporter" (R), e all'estremità 3' da un fluoroforo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter, il "Quencher" (Q) .

Il Reporter è rappresentato dalla 6-carbossifluoresceina (FAM), mentre il Quencher è rappresentato da 6-carbossitetrametilrodamina (TAMRA). Inoltre le sonde UPL sono coniugate alla sequenza LNA (Locked Nucleic Acid) che conferisce stabilità di legame una volta che la sonda si è appaiata alla sequenza bersaglio.

Quando la sonda è intatta, e R e Q sono quindi separati dalla sequenza nucleotidica, la sonda non emette fluorescenza perché la fluorescenza del reporter è spenta dalla vicinanza

del quencher che ne assorbe i fotoni. Durante la reazione di amplificazione innescata dai primers specifici per il trascritto da quantificare, l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi stacca l'R presente all'estremità 5' che viene utilizzata per allungare l'amplificato. L'allontanamento di R da Q permette l'emissione di fluorescenza, in modo direttamente proporzionale alla quantità di amplificato.

La metodica descritta presenta elevata specificità garantita dalla combinazione di primers (circa 20 paia di basi) e sonda a sequenza nucleotidica (sonde UPL, 8-9 nucleotidi) disegnati e scelti in maniera complementare e specifica per il trascritto genico di interesse. Il sistema UPL (Universal Probe Library), Roche®, si avvale di 165 sonde (nominate con numero progressivo da 1 a 165). Primers e sonde utilizzate sono indicate nella tabella 4.4.

Gene	Sequenza del primer	Dimensioni amplicone	T _A	Sistema
CHRNA7	F 5' CAATGACTCGCAACCACTCA 3' R 5' TGTTGGTGGTTAAACTTGGTTC 3'	92	60°C	Sonda UPL 7
GAPDH	F 5' TGAACGGGAAGCTCACTGG 3' R 5' GGTCCACCACTGACACGTTG 3'	63	59°C	Sonda 6-FAM- ATGGCCTTCCGTGTCCCCTG- TAMRA (Applied Biosystem)

Tabella 4.4 Primers umani utilizzati. T_A=temperatura di melting; F=forward; R=reverse

4.14 Immunoistochimica su preparati Whole Mount

La tecnica Whole Mount permette di separare mucosa e sottomucosa con annesso plesso sottomucoso dagli strati muscolari. Tale tecnica accoppiata all'immunoistochimica ed all'analisi dei campioni mediante microscopio confocale permette di visualizzare i gangli sottomucosi nel loro intero spessore e valutarne l'integrità strutturale.

Dopo il sacrificio dell'animale, il colon è stato rimosso, il lume lavato con una soluzione di PBS 1X e quindi un'estremità chiusa con filo di seta. Successivamente, il colon è stato riempito con una soluzione fissativa (formaldeide al 4%, acido picrico allo 0,2% in PBS 1X) e quindi chiuso anche all'estremità opposta in modo da ottenere un'ottimale distensione delle pareti. Il colon è stato quindi immerso nella stessa soluzione fissativa e mantenuto a temperatura ambiente per un'ora sotto lenta e costante agitazione. Al termine di tale incubazione le due estremità sono state tagliate e il colon è stato delicatamente lavato in PBS e poi tagliato in pezzi della lunghezza di circa 1 cm. Tali preparati sono stati conservati a 4°C in eppendorf contenenti PBS-Mertiolato (Thimerosal) fino al momento dell'uso.

Per ottenere preparati Whole Mount segmenti di circa un cm di lunghezza del colon sono stati tagliati longitudinalmente e la mucosa è stata esposta. Mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio, forbici e pinze si procede alla separazione degli strati. Il segmento di colon è stato quindi slaminato per ottenere lo strato della mucosa e sottomucosa con annesso plesso sottomucoso o di Meissner (SMMP).

I campioni così ottenuti sono stati distesi e ancorati mediante spilli di acciaio inossidabile su supporti di silicone con la superficie serosale o mucosale rivolta verso il basso e lavati per tre volte per 10 minuti con PBS 1X e Triton X-100 allo 0,2% v/v sotto costante agitazione al fine di permeabilizzare le membrane cellulari. Ogni campione è stato poi incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di albumina sierica bovina (BSA) 2% p/v

in PBS 1X e Triton X-100 0,02%, per bloccare i siti di legame aspecifici che potrebbero interagire con gli anticorpi.

I campioni sono stati poi incubati in camera umida per tutta la notte con 50 μ L di una soluzione di anticorpo diluito in BSA 2% p/v, PBS 1X e Triton X-100 0,02% v/v. I tessuti sono stati quindi lavati per 3 volte per eliminare l'anticorpo primario in eccesso. Le preparazioni sono state in seguito incubate al buio per un'ora con l'anticorpo secondario fluorescente (in PBS contenente Triton X-100 0,02% e BSA al 2%), sottoposti a tre lavaggi e trasferiti su vetrini porta-oggetto su cui era stata apposta una goccia di liquido di montaggio e sigillati con vetrini copri-oggetto. I vetrini sono stati quindi analizzati mediante microscopia confocale a fluorescenza. Gli anticorpi usati sono riportati nella Tabella 4.5.

4.15 Immunoistochimica su tessuto paraffinato

Campioni di colon di topo fissati in formalina sono stati sottoposti a progressiva disidratazione in alcool, inclusi in paraffina e sezioni di 5 μ m sono state tagliate con un microtomo e lasciate aderire a vetrini porta-oggetto. Lo scopo principale della fissazione è di preservare la morfologia dei tessuti evitando la distruzione delle molecole antigeniche che devono essere individuate nella loro posizione originale mantenendole accessibili, all'anticorpo primario.

Prima dell'analisi immunoistochimica i tessuti vengono dapprima deparaffinizzati e reidratati con lavaggi di Xilene e scala decrescente degli alcoli (alcool 100%, alcool 95%, alcool 70%). Per rendere nuovamente accessibili agli anticorpi gli antigeni d'interesse (antigen retrieval) i tessuti sono trattati con una soluzione 10mmol/L di sodio citrato a pH 6.0 per 20 minuti a 90°C. Successivamente le sezioni vengono incubate prima con una soluzione di H₂O₂ allo 0.3% per eliminare perossidasi endogene e quindi con soluzione di blocco contenente 0.04% albumina di siero e 0.5% di siero normale di capra per trenta minuti in TBS. A questo punto si procede con l'incubazione dell'anticorpo primario, anti-F4/80 (Abcam) per un'ora a temperatura ambiente. Dopo aver lavato il tessuto con PBS per tre volte con incubazioni di 5 minuti, il tessuto è stato esposto per trenta minuti all'anticorpo secondario anti-ratto coniugato ad HRP (perossidasi di rafano). Al termine dell'incubazione i tessuti sono stati sottoposti a 4-5 lavaggi da 5 minuti in TBS per rimuovere l'anticorpo in eccesso non legato. Infine il tessuto è stato incubato con il substrato 3,3-diaminobenzidina (DAB) per 3-4 minuti sino allo sviluppo di un'adeguata colorazione e quindi dopo lavaggio in acqua per bloccare la reazione è stato colorato con ematossilina ed eosina, coperto con vetrini copri-oggetto e analizzato usando il microscopio a luce trasmessa Leica DM4500B. Gli anticorpi usati sono riportati nella Tabella 4.5.

4.16 Western blot

Il western blot è una tecnica immuno-enzimatica che permette di identificare e quantificare le proteine d'interesse, attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici, dopo averle frazionate in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi su un gel di acrilamide.

Sezioni di colon murino sono state omogenate in 500 µl di RIPA buffer (5% Triton-X100; 2,5% di sodiodesossicolato; 2,5% di SDS 10% in PBS) contenente Inibitore delle Proteasi (estratto di pancreas 0,03 mg/ml; proteinasi K 0,003 mg/ml; termolisina 0,0008 mg/ml; chimotripsina 0,0015 mg/ml; tripsina 0,0002 mg/ml; papaina 1,0 mg/ml; Roche) per 5 minuti mediante omogenizzatore alla frequenza di 20 Hertz (Mixer Mill MM300, Qiagen). I campioni sono stati lasciati nella soluzione di lisi per 45 minuti e in seguito centrifugati a 13000xg per 5 minuti per far depositare il materiale corpuscolato. Il surnatante è stato raccolto e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. La concentrazione di proteine totali è stata determinata mediante saggio dell'acido bicinconinico (BCA) (Pierce Biotechnology): proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico; gli ioni rameosi reagiscono con il reagente acido bicinconinico per formare un complesso viola-porpora, la cui assorbanza è stata misurata alla lunghezza d'onda di 562 nm. La concentrazione proteica nel campione è stata calcolata tramite una retta di taratura di albumina di siero bovino (BSA; Sigma-Aldrich).

A 40 µg di proteine totali estratte da tessuto è stato aggiunto loading buffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8; 10% v/v glicerolo; 2% SDS 10%; 5% v/v di β-mercaptoetanol; 0,1% p/v blu di bromo fenolo). Le proteine sono state denaturate a 95°C in bagnetto termostato per 5 minuti prima di essere frazionate mediante corsa elettroforetica su gel di poliaccrilamide al 10% e trasferite su membrana di polivinidenefluoruro (PVDF, Bio-rad). Dopo attivazione della membrana per qualche minuto in etanolo, il trasferimento è stato condotto per 1 ora a 100 mV in bagno di ghiaccio in buffer di trasferimento (20 mM Tris-Base; 150mM glicina; 20% v/v metanolo). Una volta terminato il trasferimento, la membrana è stata lavata con una soluzione di PBS-Tween-20 allo 0,05% ed incubata per 1 ora in soluzione di blocco (5% p/v latte non grasso (Oncogene); 0,05% v/v Tween-20 in PBS) per bloccare eventuali legami aspecifici. In seguito la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse (Tabella 4.5) diluito in soluzione di blocco. L'incubazione è stata protratta per 16 ore a 4°C sotto costante agitazione. Avvenuta l'incubazione, la membrana è stata lavata abbondantemente (tre volte per 15 minuti) in PBS-Tween-20 e successivamente incubata con l'opportuno anticorpo secondario coniugato con HRP (perossidasi di rafano) per 1 ora a temperatura ambiente (Tabella 4.5) in soluzione di blocco. Rimosso l'anticorpo non legato mediante successivi lavaggi, gli immunocomplessi proteina-anticorpo sono stati visualizzati incubando la membrana in substrato chemiluminescente (ECL, Millipore) e quindi esponendola ad una lastra fotografica. La β-actina, proteina costitutiva, è stata utilizzata per la normalizzazione dell'espressione delle proteine.

Anticorpo	Diluizione	Animale ospite	Tecnica	Ditta fornitrice
Anti-periferina	1:150 1:1000	Rabbit	WM WB	Millipore
Anti- β III Tubulina	1:5000	Rabbit	WB	Covance
Anti-F4/80	1:100	Rat	IHC	Abcam
Anti- β actina	1:5000	Mouse	WB	Sigma-Aldrich
Anti-rabbit -TRITC	1:200	Goat	WM	Chemicon
Anti-rabbit-HRP	1:2000	Goat	WB	Sigma-Aldrich
Anti-rat-HRP	1:500	Goat	IHC	Sigma-Aldrich
Anti-mouse-HRP	1:2000	Goat	WB	Sigma-Aldrich

Tabella 4.5 Anticorpi utilizzati identificati dalla diluizione, dalla specie animale in cui sono stati prodotti, dall'uso e dalla ditta fornitrice. WM=whole mount; WB= western blot, IHC=immunoistochimica.

4.17 Isolamento e coltura di macrofagi dalla mucosa colica di topo

I colon sono stati estratti dai topi controllo o sottoposti al protocollo d'infezione con HSV-1 o colite da DSS, aperti, puliti e incubati per 20 minuti in agitazione in RPMI contenente DTT (ditiotreitolo, 10mM, Applichem) al fine di rimuovere il muco. La mucosa è stata successivamente raschiata dal sottostante strato di muscolatura con l'ausilio di due vetrini portaoggetti e il materiale raccolto è stato sottoposto a digestione enzimatica con DNasi-1 (2 μ g/ml, Applichem) e Collagenasi IV (0.2 mg/ml, Sigma-Aldrich) per 20 minuti a 37°C. Al termine della digestione enzimatica i pezzi di tessuto non interamente digeriti sono stati dissociati meccanicamente mediante passaggio attraverso colino. Il materiale è stato raccolto e i detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione (1800xg per 8 minuti a 4°C). Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in 4 ml di RPMI. In particolare la sospensione cellulare è stata posta per 20 minuti a 2000 rpm, al fine di isolare le cellule mononucleate della mucosa che si posizionano in un anello tra la fasi di Ficoll e quella di terreno RPMI. Le cellule sono state raccolte e lavate mediante centrifugazione.

Le cellule così ottenute sono state sottoposte a due differenti protocolli.

i) Per purificare i macrofagi mediante immunosorting, le cellule (max 10⁸ cellule) sono state risospese in 400 μ l di buffer (0.5%BSA, 2mM EDTA in PBS, pH7.2). I macrofagi sono stati quindi incubati con 50 μ l di anticorpo anti-CD11b (CD11b MicroBeads, Miltenyi Biotec) coniugato a microbiglie metalliche per 30 minuti in ghiaccio. Al termine dell'incubazione l'anticorpo non legato alle cellule è stato rimosso mediante aggiunta di 2 ml dello stesso buffer d'incubazione e centrifugazione. Le cellule sono state quindi risospese in 500 μ l di buffer e fatte passare attraverso una MS column (Miltenyi Biotec) posta in un campo magnetico. Gli anticorpi marcati, e con essi le cellule che esprimono il CD11b, sono state trattenute all'interno della colonnina grazie al campo magnetico, mentre le cellule non marcate sono state eluite con il buffer. Una volta inserita in colonnina l'intera sospensione cellulare, la colonnina è stata lavata con 5 volumi di buffer per rimuovere le cellule non marcate con lo specifico anticorpo e quindi le cellule CD11b sono state eluite rimuovendo la colonna dal campo magnetico e lavando la colonna con 1 ml di buffer. Dopo un lavaggio

mediante centrifugazione, il pellet cellulare è stato risospeso in terreno di coltura DMEM addizionato di 10% FBS, 1% antibiotico-antimicotico, 2mM L-glutamina (Gibco) e seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 1×10^5 cellule a pozzetto e poste in incubatore a 37°C a 5% di CO₂ per due ore. Le cellule sono state di seguito stimulate con LPS (100 ng/ml, Calbiochem) in presenza o assenza di nicotina (10 μM, Sigma-Aldrich) per 16 ore. Al termine delle 16 ore, i supernatanti sono stati raccolti e conservati a -20°C per i successivi saggi ELISA e le cellule sono state immediatamente utilizzate in citofluorimetria a flusso.

ii) Per determinare l'attività dell'inflammosoma nei macrofagi della mucosa del colon, le cellule mononucleate, ottenute dal frazionamento attraverso il gradiente di Ficoll, sono state risospese in terreno DMEM addizionato di 10% FBS, 1% antibiotico-antimicotico, 2mM L-glutamina (Gibco) e seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 3×10^5 cellule a pozzetto e poste in incubatore a 37°C a 5% di CO₂ per due ore. Le cellule sono state quindi stimulate con LPS (100 ng/ml, Calbiochem) e/o ATP (1mM, Sigma-Aldrich), in presenza o assenza di nicotina (10 μM, Sigma-Aldrich) per 16 ore. Al termine delle 16 ore, le cellule sono state sottoposte al protocollo di marcatura per determinare l'attività della caspasi-1 ed analizzate in citofluorimetria a flusso (vedi paragrafo 4.19).

4.18 Analisi dell'attività della caspasi-1

Al fine di valutare l'attività dell'enzima caspasi-1 (o ICE, interleukin-converting enzyme), enzima responsabile della conversione della pre-interleuchina 1β nella forma bioattiva, è stato utilizzato il kit FLICA® 660 *in vitro* Caspase-1 detection kit (Immunochemistry Technology). La sonda inibitrice contiene la sequenza di legame preferenziale della caspasi-1 (YVAD). La sequenza è coniugata con un fluoroforo che opportunamente eccitato emette nel profondo rosso ed è legato a una entità reattiva FMK (fluoromethyl ketone). La risultante sonda fluorescente inibitrice della caspasi-1 forma un legame covalente irreversibile con l'enzima caspasi-1 attivato, legando efficacemente il target e può essere rilevato attraverso comuni metodi di analisi della fluorescenza. L'inibitore è stato aggiunto alla sospensione cellulare secondo protocollo: 2×10^5 cellule/ml sono state incubate con inibitore della caspasi-1 (1:60) per 40 minuti a 37°C. Dopo un lavaggio con un Wash Buffer (Immunochemistry Technology), le cellule sono state incubate con un anti-CD11b-PE, anticorpo diretto contro i macrofagi tissutali (diluizione 1/100, eBioscience), per 30 minuti a 4°C e, dopo un ulteriore lavaggio, i campioni sono stati letti in citofluorimetria.

4.19 Caratterizzazione dei macrofagi intestinali mediante citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso, abbreviata con l'acronimo inglese FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting) permette di analizzare contemporaneamente numerose caratteristiche di una popolazione cellulare. Una sospensione cellulare monodispersa viene iniettata in un sistema fluidico che trasporta le cellule in maniera separata e ordinata attraverso una camera di flusso, dove vengono diluite ed allineate tramite il sistema fluidico a flusso laminare, e a livello del quale riflettono/rifraggono la luce ed eventuali fluorofori legati alle cellule con anticorpi specifici emettono fluorescenza. Una volta emessa, la luce viene

raccolta, filtrata e convertita ad un valore digitale che viene inviato al computer. Il primo momento dell'analisi citoflorimetrica è rappresentato dunque dal passaggio delle cellule in sospensione che attraversano il raggio laser dell'opportuna lunghezza d'onda, in fila ad una ad una.

Il citofluorimetro utilizzato è il BD FACSCalibur™, il quale ha una sorgente luminosa, a ioni Argon, su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Questo tipo di luce consente un'efficace misura dei parametri fisici, oltre a permettere la contemporanea eccitazione di diversi fluorocromi.

L'eccitazione dà origine a un segnale che viene captato dal sensore che raccoglie la luce dello Scatter frontale (forward) e che fornisce informazioni sul volume cellulare, e dà origine anche ad un secondo segnale che viene captato dal sensore che raccoglie la luce dello Scatter laterale (side), posto a 90° rispetto a quello frontale, fornendo informazioni sulla densità/granularità della cellula. La combinazione di questi due tipi di segnali porta alla formazione di un citogramma, ovvero un diagramma bidimensionale che permette di discriminare diverse popolazioni cellulari basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche. Una volta ottenuto il citogramma, i segnali sono raccolti e inviati ai sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) dove sono amplificati, digitalizzati e inviati ad un analizzatore che provvede alla loro visualizzazione su monitor, la rappresentazione grafica, e la definizione statistica.

L'elaborazione dei dati è eseguita grazie a software dedicati che provvedono a tradurre i segnali in grafici e alla loro rappresentazione su display video in tempo reale.

Per eseguire l'analisi citofluorimetrica 2×10^5 cellule sono state raccolte e marcate con gli appropriati isotipi. Le cellule in cultura sono state staccate dalla piastra con una soluzione di EDTA e centrifugate per 8 minuti a 1800 rpm in PBS/BSA (0.05%, Sigma-Aldrich). La BSA è stata utilizzata per bloccare i siti di legame aspecifici.

Per analisi effettuate su macrofagi umani derivati da sangue periferico, una volta rimosso il surnatante, le cellule sono state sospese in 100µl in una soluzione di PBS/BSA contenente l'anticorpo anti-CD13-PE (diluizione 1/100, eBioscience) e α -bungarotossina-Alexa Fluor 488 (diluizione 1/100, Molecular probes). L' α -bungarotossina è uno specifico antagonista dei recettori nicotinici. Dopo un'incubazione di 30 minuti a 4°C al buio, la sospensione cellulare è stata nuovamente centrifugata e sospesa in 100 µl di PBS/BSA e i campioni sono conservati a 4°C fino al momento della lettura.

Per l'analisi della produzione di TNF- α e INF- γ intracellulare in macrofagi mucosali umani, dopo la marcatura per CD13-PE, 2×10^5 cellule sono state permeabilizzate mediante incubazione in soluzione permeabilizzante (fixation/permeabilization buffer set, eBiosciences) per 20 minuti a 4°C. Le cellule sono state incubate in 100µl di soluzione permeabilizzante con anticorpo anti-TNF α -FITC (diluizione 1/100, eBioscience) o anticorpo anti-IFN γ -PE-Cy7 (diluizione 1/100, eBioscience). Al termine dell'incubazione le cellule sono centrifugate e quindi lavate due volte con PBS e 0,2% BSA.

L'analisi citofluorimetrica di α -bungarotossina e F4/80 è stata eseguita separatamente su macrofagi della mucosa colica di topo purificati mediante immunosorting. 1×10^5 cellule sono state lavate in PBS/BSA mediante centrifugazione, risospese in 100µl di una soluzione OPBS/BSA contenente α -bungarotossina-Alexa Fluor 488 e incubate per 30 minuti a 4°C al buio. Al termine dell'incubazione è stato effettuato un lavaggio e le cellule sono state

sospese in 100 µl di PBS/BSA e i campioni sono conservati a 4°C fino al momento dell'analisi.

Per la colorazione della proteina di membrana F4/80, 1×10^5 cellule sono state incubate per 30 minuti a 4°C al buio in 100µl di PBS/BSA contenente l'anticorpo primario non coniugato a fluoroforo F4/80 (1/100, Abcam). Dopo lavaggio mediante centrifugazione, le cellule sono state ri-sospese in PBS-BSA 0,2% e incubate con l'anticorpo secondario anti-ratto-Alexa Fluor 488 (1/200, Abcam). Dopo 20 minuti di incubazione a 4°C al buio, l'eccesso di anticorpo secondario è stato rimosso mediante due lavaggi con PBS e quindi le cellule sono state analizzate al citofluorimetro.

10^4 eventi sono stati acquisiti al FACS e analizzati usando il software Cell Quest (Becton Dickinson) e i dati sono stati analizzati mediante il software WinMDI software (developed by JC Trotter).

4.20 Espressione della proteina ricombinante GDNF

La sequenza codificante la proteina GDNF era stata in precedenza subclonata nel vettore pETb151/D/lacZ secondo protocollo del kit Invitrogen pET topo, recante a valle del gene clonato una sequenza di 6 istidine. Batteri *E.Coli* BL21 Star TM (DE3) One Shot sono stati trasformati con 10 ng di vettore: cellule e vettore sono stati incubati per 30 minuti in ghiaccio e poi sottoposti a shock termico per 30 secondi a 42°C e infine messi in coltura per 30 minuti a 37°C in terreno S.O.C (2% sale triptone; 0,5% estratto di lievito; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glucosio). Dopo coltura in 10 ml di terreno LB (1% sale triptone; 0,5% estratto di lievito (BD); 1% NaCl) addizionato di ampicillina (50µg/ml, Applichem) a 37°C per 16 ore, 3 litri di terreno LB/ampicillina sono stati inoculati con 4 ml di coltura e lasciati crescere in agitazione (250 rpm) a 37°C fin al raggiungimento di OD₆₀₀ ~0,5. Il promotore *Lac I* è stato indotto mediante aggiunta al brodo di coltura di 0,5 mM IPTG (Applichem) e i batteri sono quindi stati incubati per ulteriori 16 ore a 37°C. Dopo centrifugazione (3000 rpm, 10 min, 4°C), i precipitati sono stati risospesi in 12 ml di specifico buffer di lisi contenente guanidina (soluzione denaturante; 6M guanidina idroclorito; 20mM sodio fosfato pH7.8; 500mM NaCl) in agitazione. Dopo centrifuga (3000 rpm per 15 minuti), il precipitato è stato sottoposto a sonicazione con 6 impulsi di 30 secondi ciascuno in ghiaccio, per evitare il riscaldamento degli estratti. Le cellule sonicate sono state centrifugate per 30 minuti a 3000rpm per far precipitare i detriti cellulari e i supernatanti sono stati raccolti.

4.21 Purificazione della proteina ricombinante GDNF

La proteina ricombinante GDNF è stata purificata mediante colonna con resina di agarosio-Ni-NTA (Invitrogen). Un ml di resina è stato posto in falcon da 15 ml e incubato con 12 ml di sovranatante derivato dalla sonicazione di cellule BL21 trasformate. Il legame della proteina alla resina è stato facilitato mediante incubazione di due ore in movimento, al termine del quale la resina è stata fatta depositare nel fondo della falcon mediante centrifugazione (800rpm per 1 minuto). Sono stati eseguiti una serie di lavaggi con diverse soluzioni, tutti consistenti in aggiunta della soluzione, incubazione per 2 minuti in agitazione e centrifuga a 800rpm per 1 minuto. Nell'ordine, sono stati effettuati due lavaggi con 4 ml di soluzione denaturante di legame (8M urea; 20mM Sodio fosfato pH7.8; 500nM NaCl), due lavaggi con

4 ml di soluzione denaturante di lavaggio (8M urea; 20mM sodio fosfato, pH6; 500mM NaCl); 4 lavaggio con 8 ml di soluzione nativa di lavaggio (20mM Imidazolo; 50mMNaH₂PO₄; 0,5 M NaCl, pH 8). Le proteine di fusione sono state infine eluite in soluzione nativa di eluizione (250 mM Imidazolo; 50mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl, pH 8) contenente imidazolo 10 mM. Sono state raccolte in successione quattro frazioni da 1 ml e conservate a -80°C fino al successivo utilizzo. Il protocollo ibrido con soluzioni native e denaturanti è stato scelto poiché la proteina GDNF sovra-espressa in *E. coli* forma aggregati insolubili detti corpi di inclusione, solubilizzabili solamente utilizzando detergenti che tuttavia danneggiano la struttura attiva della proteina stessa.

4.22 Analisi statistica

I dati sono riportati come media \pm errore standard della media. La significatività statistica è stata calcolata mediante analisi non parametrica a una coda con test di Wilcoxon per dati appaiati per gli studi condotti sull'uomo e con il *t* test di Student o con l'analisi della varianza ANOVA one-way seguita da post-test Bonferroni per gli studi condotti su topo, avvalendosi del software GraphPad Prism 4.00. Sono stati considerati statisticamente significativi i risultati con valori di $p < 0,05$.

5. RISULTATI

5.1 Il recettore $\alpha 7$ nAChR è espresso in eguale misura nei macrofagi ottenuti dal sangue periferico di pazienti con IBD e soggetti sani

E' stato inizialmente valutato il livello di mRNA per il gene CHRNA7 e del recettore nicotino $\alpha 7$ nAChR in macrofagi derivati da monociti del sangue periferico isolati da volontari sani e da pazienti affetti da CU o MC con malattia in stato di remissione o attività lieve.

La quantificazione del trascritto di CHRNA7, effettuata mediante RT-PCR, ha evidenziato livelli di mRNA analoghi tra i tre gruppi (Figura 5.1 A). Questo dato è stato confermato a livello proteico quantificando, mediante analisi di citofluorimetria a flusso, il legame di α -bungarotossina-Alexa Fluor 488 a macrofagi differenziati da monociti del sangue periferico. I livelli di recettore nicotino $\alpha 7$ nAChR sono stati calcolati quantificando l'intensità di fluorescenza media per cellula data dal legame dell' α -bungarotossina-Alexa Fluor 488. Come si evince dalla Figura 5.1 B, l'intensità di fluorescenza media risulta paragonabile tra i macrofagi dei diversi gruppi in esame, indicando uno stesso livello di espressione del recettore $\alpha 7$ nAChR nelle diverse popolazioni.

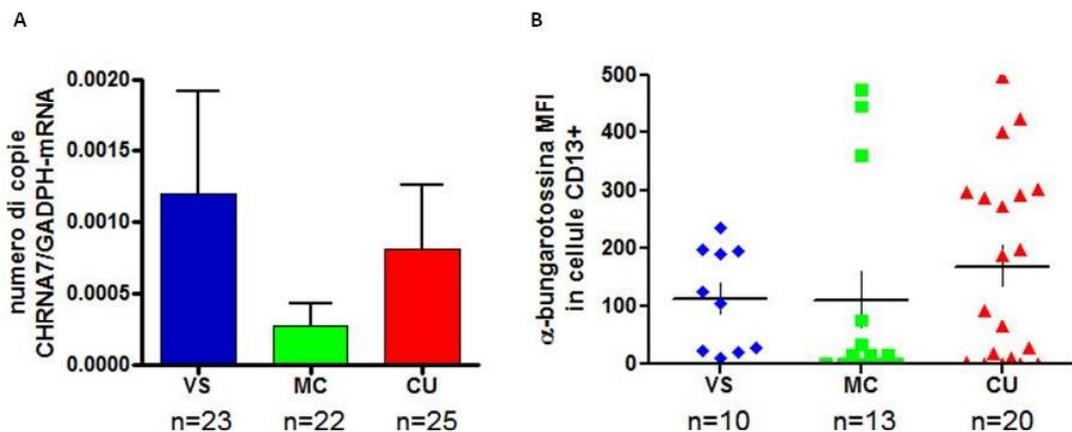
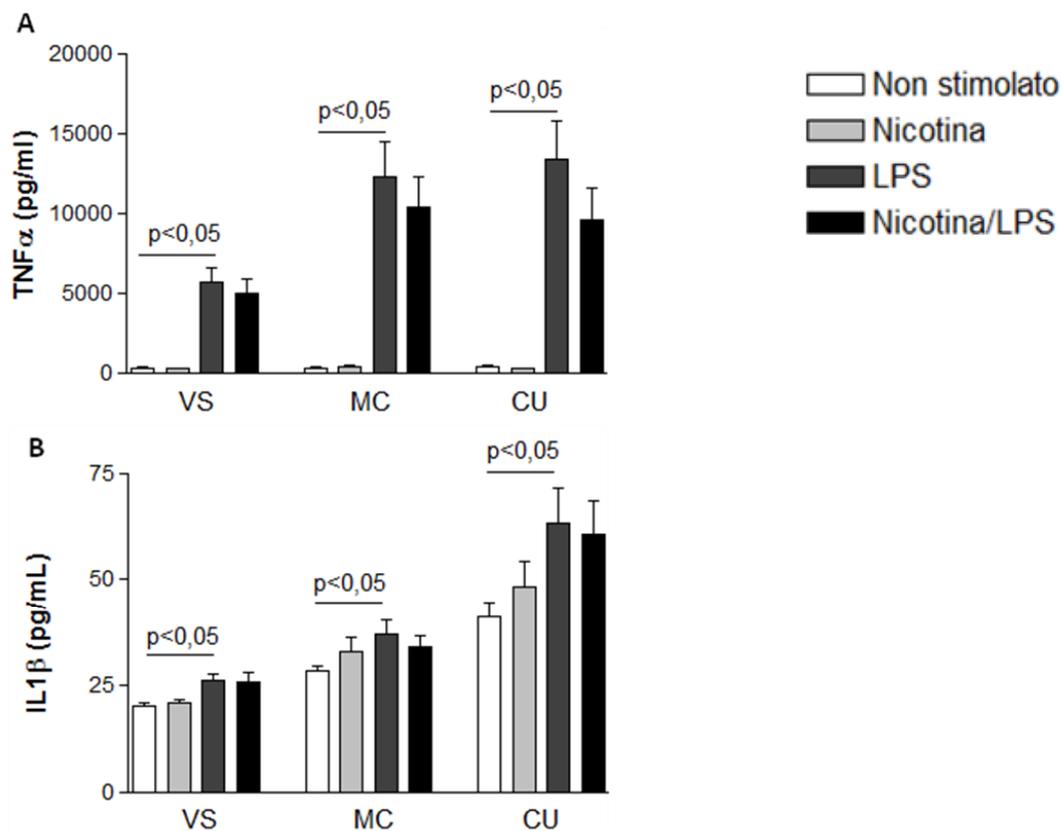


Figura 5.1. Espressione del recettore nicotino $\alpha 7$ nAChR in sangue periferico di pazienti con IBD. (A) L'RNA totale è stato estratto da macrofagi derivati da monociti del sangue periferico di pazienti con MC, CU e VS e l'mRNA specifico del gene CHRNA7 è stato quantificato mediante Real Time PCR quantitativa. I dati sono espressi come media del numero di copie di CHRNA7 normalizzate per il gene house-keeping GADPH \pm SE ($p > 0,05$ tra tutti i gruppi sperimentali). **(B)** L'espressione di $\alpha 7$ nAChR è stata determinata quantificando in citofluorimetria a flusso la fluorescenza data dall' α -bungarotossina-alexa fluor 488 legata ai macrofagi. I dati sono espressi come media dell'intensità di fluorescenza media (MFI) \pm SE ($p > 0,05$ tra tutti i gruppi sperimentali).

5.2 La nicotina non inibisce la secrezione di citochine infiammatorie da parte di macrofagi derivati dal sangue periferico

Abbiamo quindi verificato l'effetto della nicotina sulla secrezione di citochine indotta da LPS nei macrofagi derivati da sangue periferico di pazienti con CU, MC e VS. In condizioni basali, le quantità di TNF α , IL-1 β ed IL10 secrete sono paragonabili tra i macrofagi derivati da sangue periferico di pazienti con malattia infiammatoria cronica dell'intestino e volontari sani.

Lo stimolo con lipopolisaccaride (LPS) induce un aumento significativo nella secrezione sia delle citochine infiammatorie (TNF α , IL-1 β) che anti-infiammatorie (IL-10), peraltro l'incremento risulta maggiore nei pazienti CU ed MC rispetto ai soggetti controllo per quanto riguarda TNF α ed IL-1 β . Il pretrattamento con nicotina non produce effetti significativi sulla secrezione di TNF α e IL-1 β nei macrofagi di sangue periferico dei soggetti controllo e dei pazienti con MC e CU (Figure A e B). Al contrario la nicotina riduce in maniera statisticamente significativa la secrezione di IL-10 indotta da LPS in macrofagi da sangue periferico di pazienti con CU o MC ma non nei soggetti controllo (Figura 5.2 C).



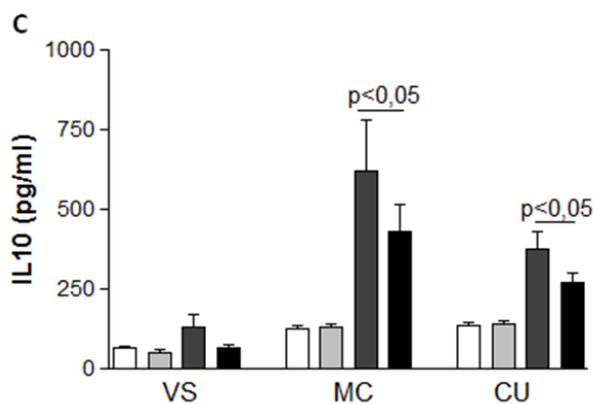


Figura 5.2. Effetto della nicotina sul rilascio di citochine pro- e anti-infiammatorie da macrofagi di sangue periferico. Macrofagi derivati da monociti del sangue periferico di pazienti con MC, CU e VS sono stati incubati in presenza o assenza di LPS e/o nicotina e dopo 24 ore il fattore di necrosi tumorale α (Tumor Necrosis Factor α , TNF α) (A), l'interleuchina 18 (IL18) (B) e l'interleuchina 10 (IL10) (C) rilasciate nel terreno di coltura sono state quantificate mediante saggi ELISA. I dati sono espressi come media di pg/ml \pm SE.

5.3 Macrofagi della mucosa colica di pazienti affetti da CU esprimono livelli più elevati di recettore $\alpha 7nAChR$

Poiché le IBD coinvolgono in prevalenza la mucosa intestinale, abbiamo deciso di verificare l'espressione di recettore nicotino $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi presenti nella mucosa colica. A tal fine, biopsie prelevate da pazienti con CU o MC in stato di remissione o di attività lieve, sono state sottoposte a digestione enzimatica e il legame di α -bungarotossina-Alexa Fluor 488 ai macrofagi tissutali (CD13+) è stato determinato mediante analisi citofluorimetrica. Come mostrato nella Figura 5.3, i macrofagi tissutali ottenuti dai pazienti con CU mostrano un livello di fluorescenza media significativamente più elevato rispetto ai soggetti controllo ed ai pazienti con MC.

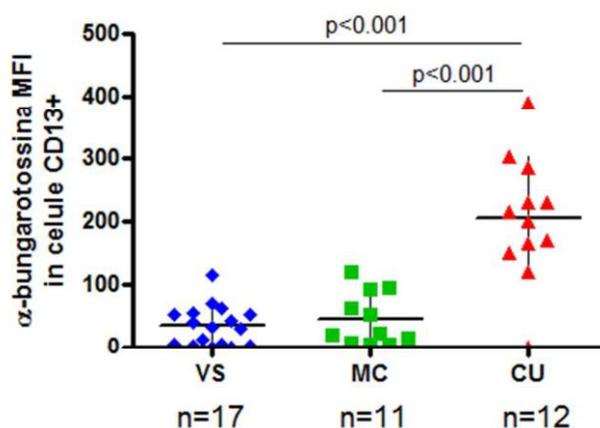


Figura 5.3. Espressione del recettore nicotino $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi del colon-sigma di pazienti con IBD. L'espressione di $\alpha 7nAChR$ è stata determinata quantificando in citofluorimetria a flusso la fluorescenza dei macrofagi mucosali (CD13+) data dal legame con l' α -bungarotossina-alexa fluor 488. Sono stati studiati macrofagi isolati dalla mucosa del colon-sigma di pazienti con MC, CU e in pazienti in screening per cancro colico. I dati sono espressi come media dell'intensità di fluorescenza media (MFI) \pm SE.

5.4 La nicotina *in vitro* ha effetto anti-infiammatorio sui macrofagi mucosali di pazienti con CU ma non con MC

Abbiamo quindi verificato se l'aumentata espressione del recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi della mucosa colica garantisce un maggior effetto anti-infiammatorio della nicotina in queste cellule. Pertanto, abbiamo determinato l'effetto della nicotina sull'espressione indotta da LPS di $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ nei macrofagi mucosali colici. Il trattamento con nicotina inibisce in maniera significativa l'espressione di $TNF\alpha$ -LPS indotto in macrofagi derivati da pazienti con CU ma non ha alcun effetto sui macrofagi dei soggetti sani o con MC (Figura 5.4 A). Infine, la nicotina non ha invece dimostrato un effetto anti-infiammatorio significativo sulla produzione di $IFN\gamma$ in nessun gruppo sperimentale (Figura 5.4 B).

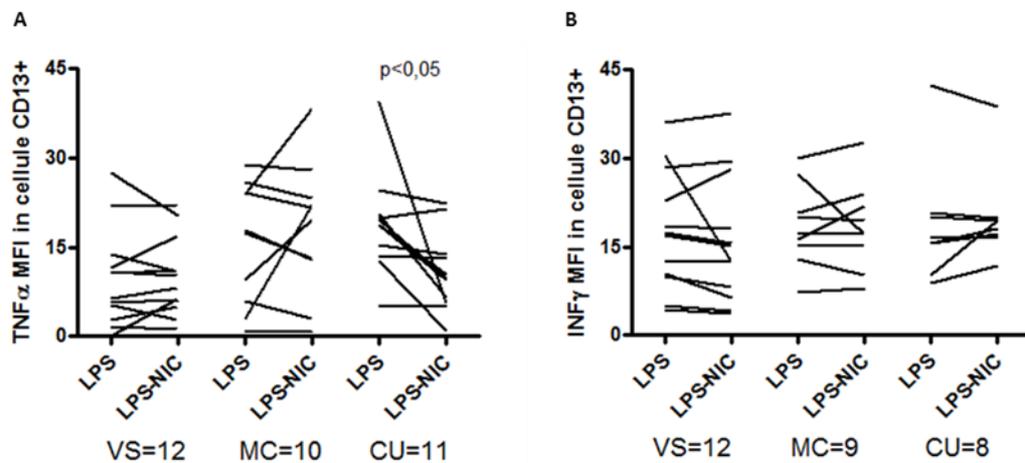


Figura 5.4. Espressione di citochine pro- e anti-infiammatorie nei macrofagi del colon-sigma di pazienti con IBD. Macrofagi della mucosa colica (CD13+) di pazienti con MC, CU e VS (pazienti in screening per cancro colico) sono stati stimolati con LPS in presenza o assenza di nicotina e dopo 16 ore l'espressione di citochine pro-infiammatorie è stata determinata mediante citofluorimetria a flusso (test intrakine). Per ciascun paziente è indicato il valore di espressione del (A) $TNF\alpha$ e di (B) Interferone γ ($IFN\gamma$). Solo nei macrofagi da pazienti con CU la nicotina riduce in maniera statisticamente significativa ($p < 0,05$) i livelli di $TNF\alpha$ indotti da LPS.

5.5 L'assenza del Toll-like receptor 2 e l'infezione del virus neurotropo Herpes Simplex Virus di tipo 1 determinano alterazioni strutturali del sistema nervoso enterico

Poiché nei pazienti con MC sono descritte anomalie dei nervi della parete intestinale caratterizzate da anomalie del network neuro-gliale nella parete intestinale soprattutto dei pazienti con MC (Vasina et al.; 2006, Cabarrocas et al.; 2003), abbiamo ipotizzato che questa alterazioni contribuiscano alla anomala regolazione del recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi della mucosa colica. Per investigare questa ipotesi abbiamo deciso di utilizzare due modelli murini che potessero presentare alterazioni strutturali dell'innervazione colica, in particolare topi deficienti per il recettore Toll-like 2 (TLR2^{-/-}) e topi infettati da 6 settimane per via intragastrica con HSV-1. In entrambi questi modelli il nostro gruppo di ricerca ha in precedenza dimostrato la presenza di alterazioni del SNE ileale (Brun et al.; 2013), pertanto abbiamo inizialmente verificato la presenza di anomalie nel network neuronale anche a livello della mucosa colica. Utilizzando preparazioni "whole mount" della mucosa-sottomucosa di colon di topi WT sani con il marcatore neuronale periferina si evidenziano gangli di piccole dimensioni costituiti da 3-12 neuroni collegati da un fitto reticolo di neurofilamenti. Al contrario, nei topi TLR2^{-/-} ed in quelli infettati con HSV-1, si osservano gangli di dimensioni ridotte, con una immunoreattività disomogenea e puntiforme nei filamenti di periferina che appaiono interrotti (Figura 5.5 A). La presenza di alterazioni dei neuroni colici nei due ceppi murini in esame è stata anche confermata mediante analisi in Western Blot dei due neurofilamenti periferina e βIII -tubulina (Figura 5.5 B).

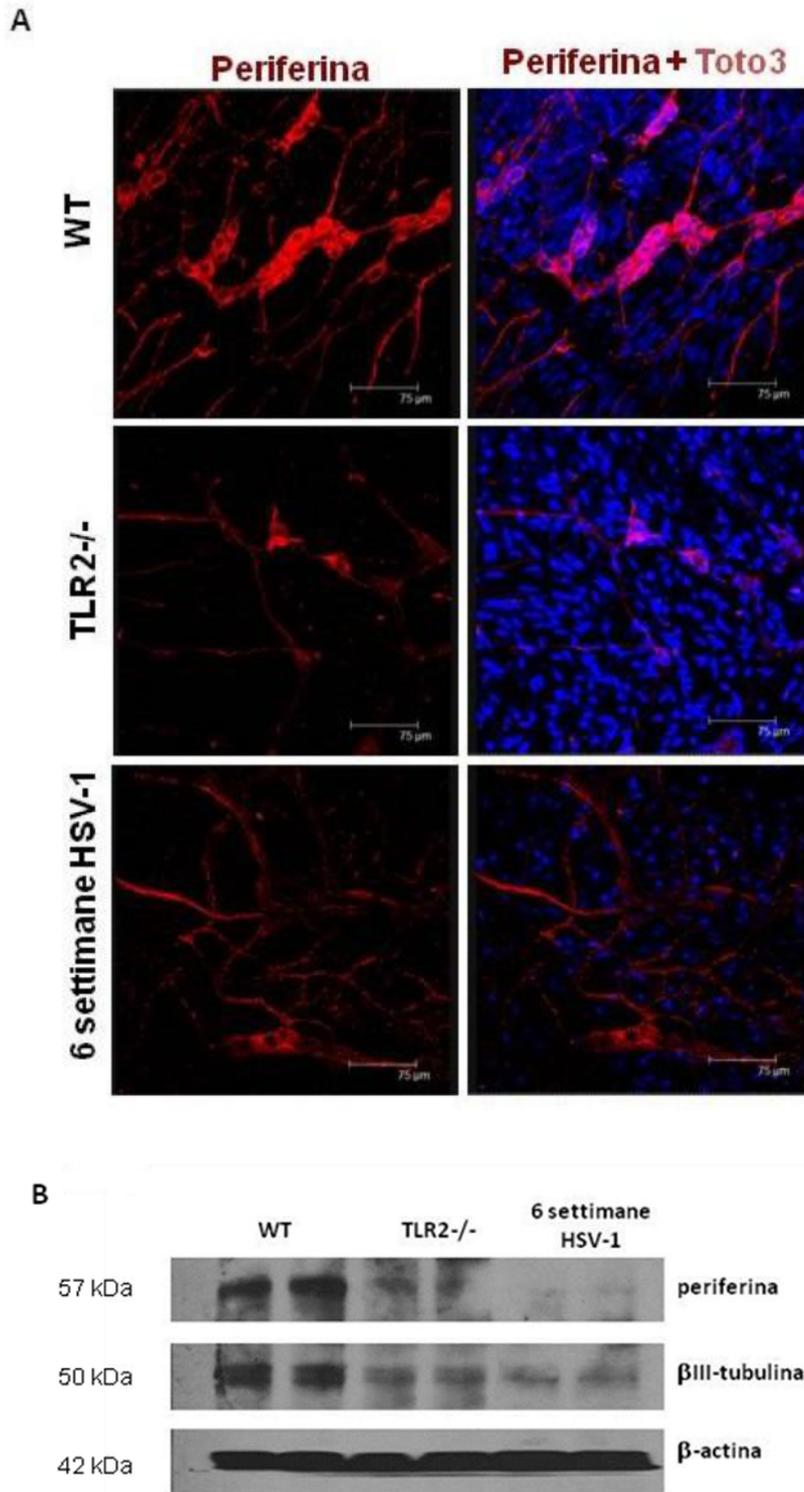


Figura 5.5 Alterazioni nei neuroni del plesso sottomucosa nel colon di topi TLR2^{-/-} o infettati per via intragastrica con HSV-1. (A) Preparati whole mount di mucosa-sottomucosa di colon di topo sano o TLR2^{-/-} o WT infettato per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane, sottoposti ad immunostochimica per la periferina e gli immunocomplessi sono stati evidenziati mediante microscopia confocale. Immagini rappresentative di tre animali per gruppo. **(B)** Le proteine totali sono state estratte da campioni di colon ed analizzate mediante Western Blot. Il pannello riporta la valutazione semiquantitativa dell'espressione di βIII-tubulina e periferina normalizzata con la β-actina.

5.6 La presenza di neuropatia del SNE aggrava la severità della colite sperimentale

Al fine di valutare l'effetto della neuropatia sul decorso dell'infiammazione intestinale, abbiamo verificato l'andamento della colite sperimentale indotta con DSS nei topi TLR2^{-/-} e infettati per via orogastrica con HSV-1 e portatori di neuropatia. Come atteso, i topi WT hanno mostrato una progressiva perdita di peso a partire dalla 3^a-4^a giornata di somministrazione del DSS sino ad una perdita di peso corporeo di circa il 16% rispetto al peso iniziale (figura 5.6). La severità della colite è dimostrata dall'indice di attività della malattia DAI (disease activity index) (figura 5.7) e dal significativo danno istologico dopo 6 giorni di somministrazione di DSS (figura 5.8 A e B). L'infiltrazione dei leucociti polimorfonucleati e dei macrofagi, quantificata determinando l'attività della mieloperossidasi nella parete colica e la presenza di cellule F4/80+, è significativamente aumentata dopo 6 giorni di somministrazione di DSS (figure 5.9 A e 5.10 D). Inoltre si evidenzia un'attività basale della mieloperossidasi leggermente superiore in topi affetti da neuropatia rispetto a topi WT (figure 5.10 D). Infine, dopo 6 giorni di somministrazione di DSS i livelli di citochine pro-infiammatorie nella parete colica sono significativamente aumentati, mentre non si registrano variazioni significative nella produzione della citochina anti-infiammatoria IL4 (Figure 5.10 A, B, C).

Va sottolineato che nei topi WT dopo 3 giorni di somministrazione di DSS sono evidenziabili le prime evidenze della colite, come un lieve incremento dell'MPO e dell'infiltrato infiammatorio nella mucosa, e l'aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie in assenza però di danni strutturali significativi (i.e. ulcere) nella mucosa colica (Figure 5.8 A, 5.9 A, 5.10).

La somministrazione di DSS a topi TLR2^{-/-} o topi WT inoculati per via orogastrica con HSV-1 determina lo sviluppo di una colite significativamente più severa (Figure 5.6 e 5.10 D). Infatti, i topi TLR2^{-/-} o inoculati con HSV-1 presentano un danno istologico ad insorgenza più precoce e più severo per la presenza di ampie ulcerazioni ed un massivo infiltrato infiammatorio (Figure 5.8 A e B, 5.9 B e C). Inoltre, i livelli di citochine infiammatorie risultano significativamente più elevati rispetto ai topi WT (Figure 5.10 A, B e C).

Nel loro insieme questi esperimenti dimostrano che la presenza di una neuropatia del SNE porta ad un aggravamento del decorso della colite sperimentale da DSS.

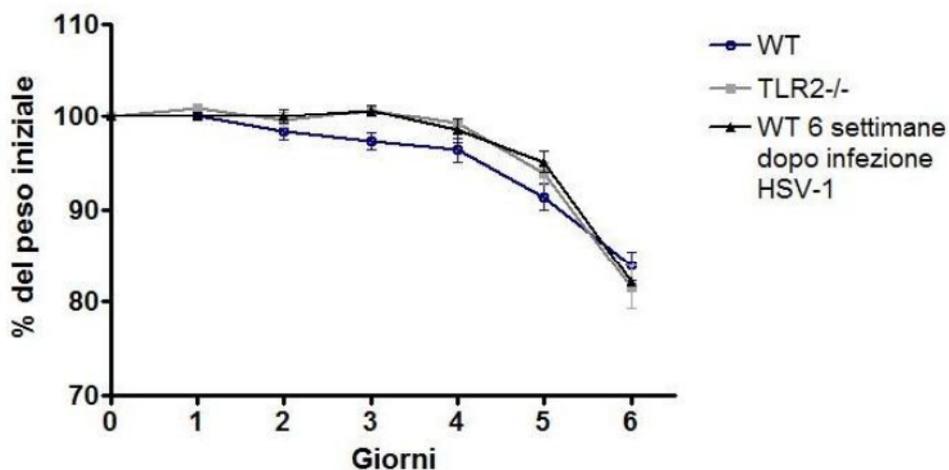


Figura 5.6 Andamento del peso corporeo in corso di colite indotta da DSS. A topi WT o portatori di neuropatia del SNE (TLR2^{-/-} e WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane) è stato somministrato sodio destrano solfato (DSS) al 3% nell'acqua da bere ed il peso corporeo registrato nei sei giorni consecutivi. Nel grafico è riportata la percentuale di variazione giornaliera del peso corporeo. Al termine del trattamento, il peso è diminuito in media del 16,05% nei topi WT, del 18,38% nei topi TLR2^{-/-} e del 18,07% nei topi WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane. Ciascun punto indica la percentuale media di peso perso \pm SE.

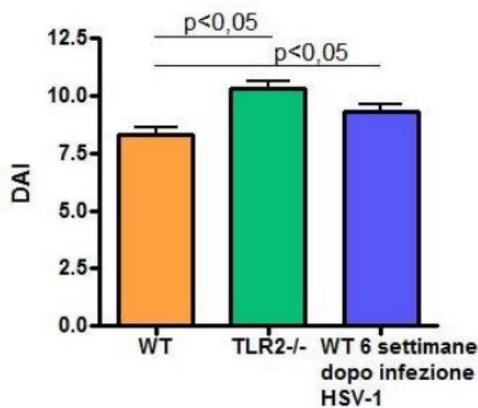


Figura 5.7 Indice di attività di malattia in corso di colite indotta da DSS per 6 giorni. A topi WT o portatori di neuropatia del SNE (TLR2^{-/-} e WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane) è stato somministrato sodio destrano solfato (DSS) al 3% nell'acqua da bere e l'indice di attività della malattia (DAI) è stato calcolato al sesto giorno di trattamento. Il punteggio totale è dato dalla somma dei punteggi nella valutazione di perdita di peso, consistenza delle feci e sanguinamento. I dati sono espressi come media di DAI \pm SE.

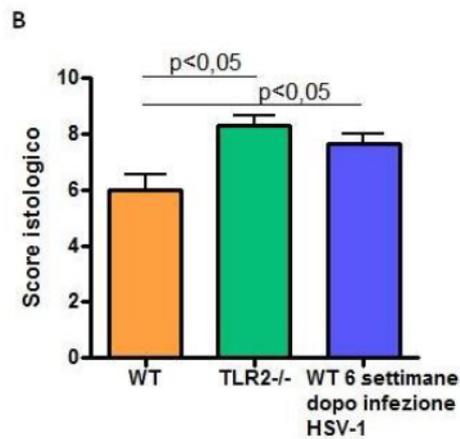
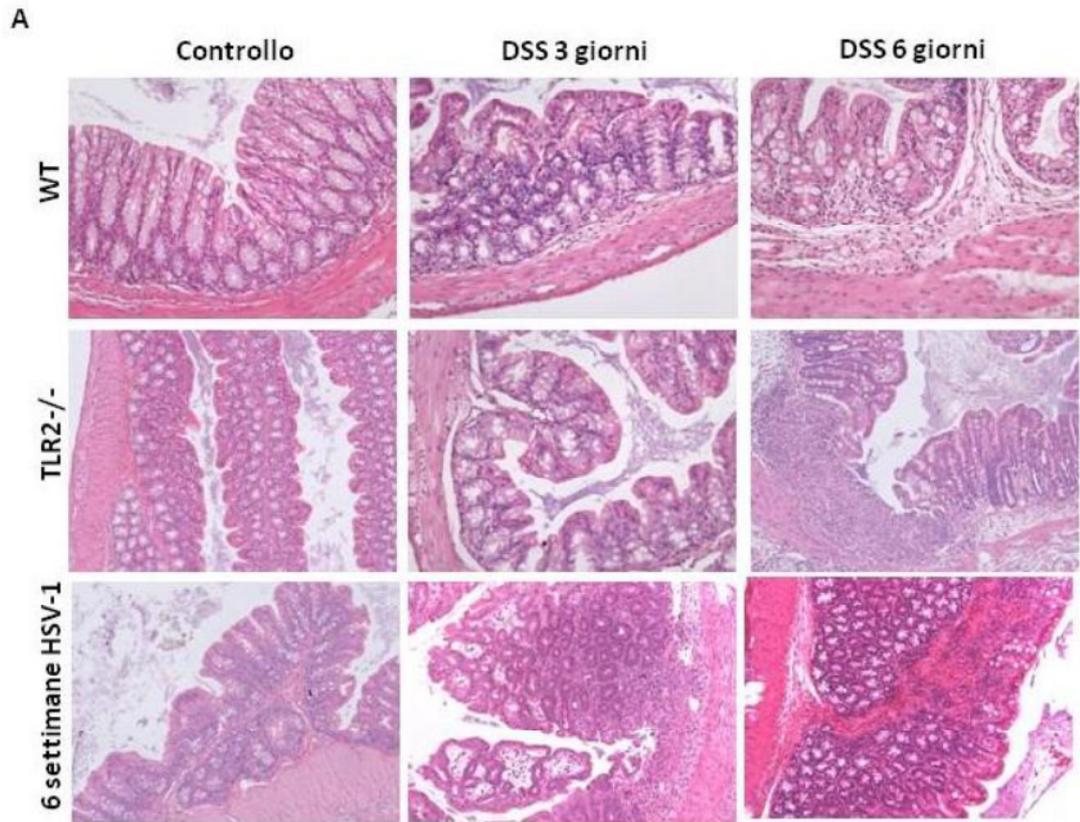


Figura 5.8 Danno istologico nel colon in corso di colite. A topi WT o portatori di neuropatia del SNE (TLR2^{-/-} e WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane) è stato somministrato (DSS al 3% nell'acqua da bere. Dopo tre-sei giorni gli animali sono stati sacrificati e un segmento colico fissato in formalina ed incluso in paraffina. **(A)** Immagini rappresentative di sezioni colorate con ematossilina/eosina ottenute da topi sacrificati dopo 3 e 6 giorni di trattamento con DSS. **(B)** Lo score del danno istologico calcolato valutando infiltrato di cellule infiammatorie, danno tissutale e presenza di edema. I dati sono espressi come media dello score istologico ± SE.

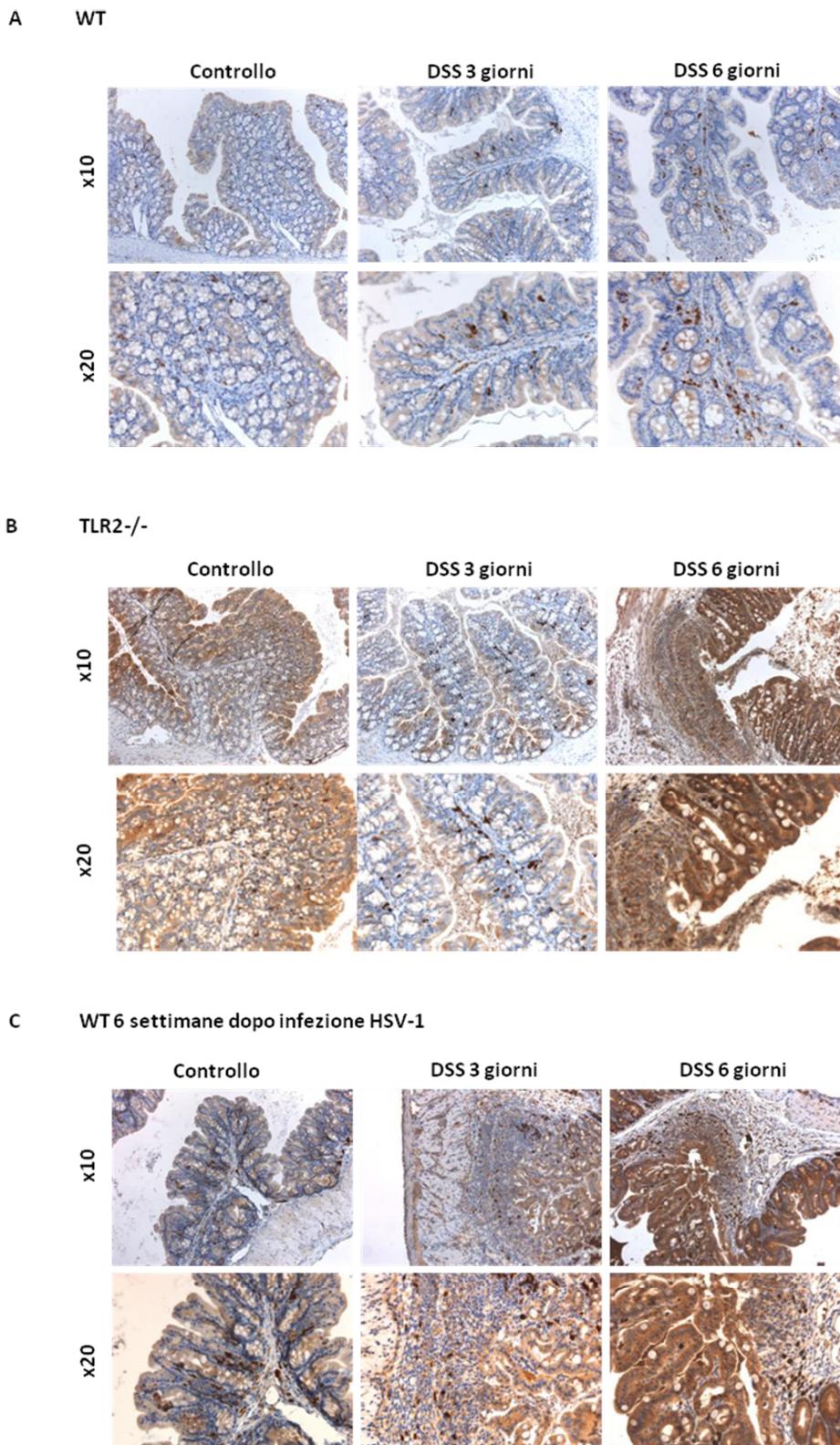


Figura 5.9 *Macrofagi infiltranti nel colon in corso di colite da DSS. A* topi WT o portatori di neuropatia del SNE (TLR2^{-/-} e WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane) è stato somministrato DSS 3%. Dopo tre-sei giorni gli animali sono stati sacrificati, un segmento colico fissato in formalina, incluso in paraffina e fettine sono state sottoposte a marcatura con anticorpo anti-F4/80. In Figura sono riportate immagini rappresentative di topi WT (**A**), TLR2^{-/-} (**B**) e WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane (**C**).

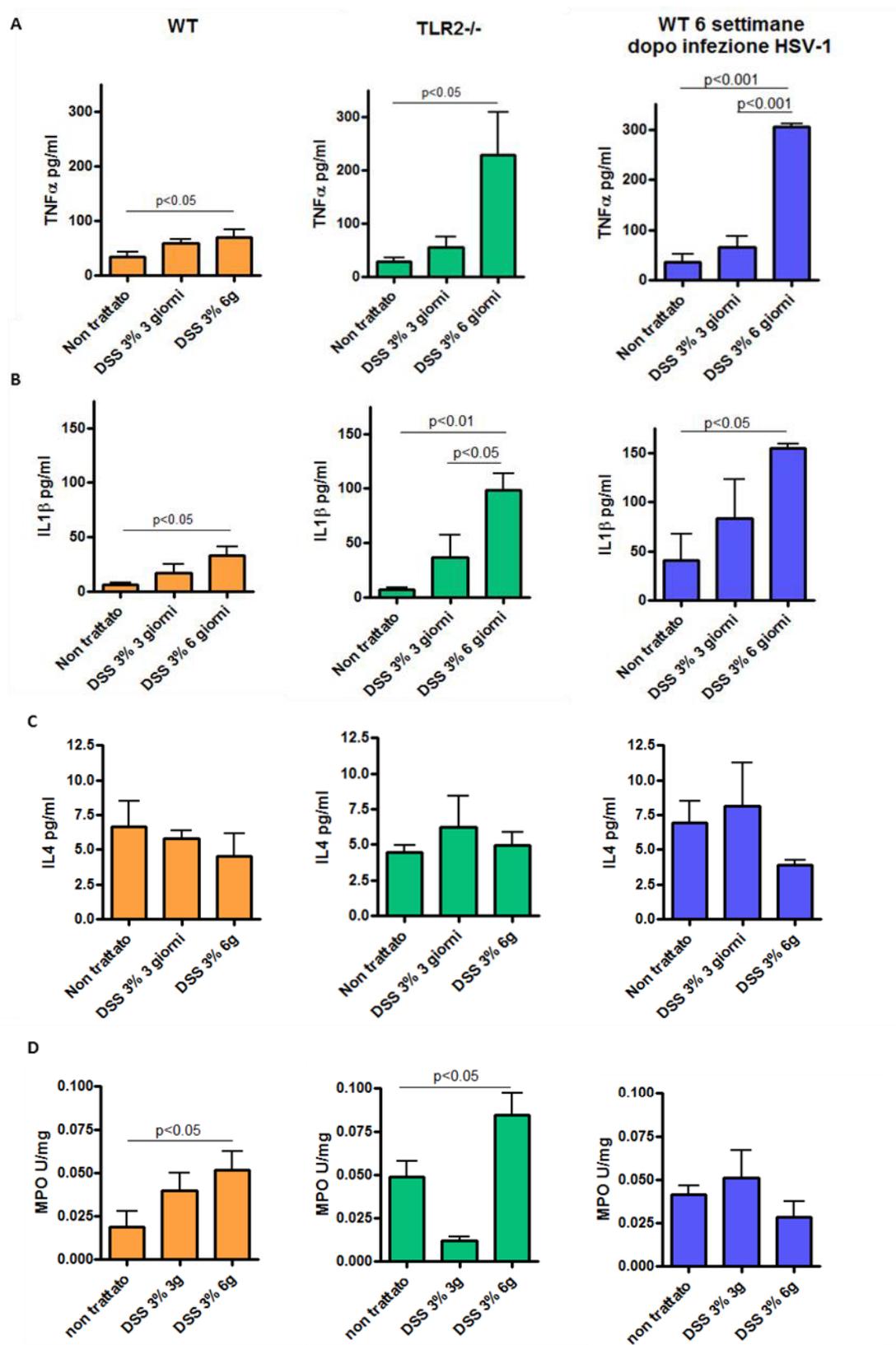


Figura 5.10 *Marcatori d'infiammazione in corso di colite. A* topi WT o portatori di neuropatia del SNE (TLR2 $^{-/-}$ e WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane) è stato somministrato DSS al 3% nell'acqua da bere. Dopo tre-sei giorni gli animali sono stati sacrificati e un segmento colico utilizzato per il dosaggio di TNF α (**A**), IL1 β (**B**) e IL4 (**C**) mediante saggi ELISA, espressi come pg/ml \pm SE, e dell'attività della mieloperoxidasi (MPO) (**D**) mediante saggio enzimatico, espressi come U/mg di peso del tessuto \pm SE.

5.7 Mancata sovra-espressione di $\alpha 7nAChR$ in corso di colite in presenza di neuropatia del SNE

Al fine di verificare se i neuroni della parete intestinale partecipino a regolare l'espressione del recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi della mucosa colica in corso di infiammazione abbiamo quantificato il legame di α -bungarotossina a macrofagi mucosali murini in condizioni normali e nelle fasi iniziali della colite indotta da DSS. Come si evince dalla Figura 5.11, la presenza di una modesta infiammazione tissutale causa un significativo aumento dei livelli di $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi colici dei topi WT. Tuttavia, tale aumento manca del tutto nei topi portatori di neuropatia del SNE. Infatti, sia nei topi TLR2^{-/-} che nei topi WT infettati per via orogastrica con HSV-1, non si osserva l'incremento $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi della mucosa colica dopo 3 giorni di somministrazione di DSS.

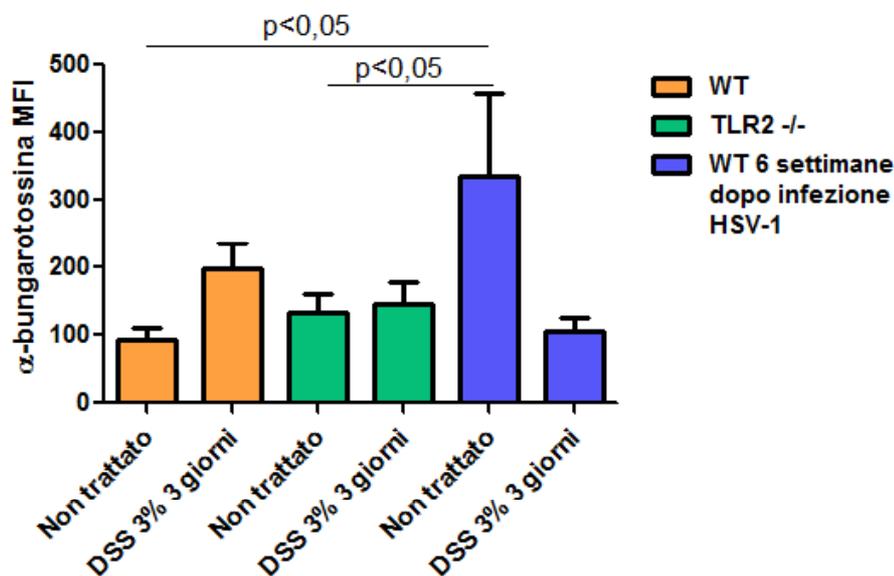


Figura 5.11 Espressione di $\alpha 7nAChR$ in macrofagi colici murini. L'espressione di $\alpha 7nAChR$ è stata determinata quantificando in citofluorimetria a flusso la fluorescenza cellulare da α -bungarotossina-alexa fluor 488 legata a macrofagi isolati dalla mucosa colica di topi WT, TLR2^{-/-} e WT a sei settimane dopo infezione orogastrica con HSV-1. I dati sono riportati come media dell'intensità di fluorescenza media (MFI) \pm SE e provengono da 4-12 esperimenti differenti.

5.8 In presenza di neuropatia del SNE i macrofagi mucosali in corso di colite non sovra-esprimono il marcatore di attivazione F4/80

L'attivazione dei macrofagi mucosali è stata analizzata determinando l'espressione del marcatore di superficie F4/80 mediante analisi citofluorimetrica. Come evidenziato nella Figura 5.12, l'esposizione diretta dei macrofagi mucosali a LPS in presenza o assenza di nicotina non modifica in maniera significativa l'espressione di questo marcatore di attivazione, confermando dati di letteratura che indicano una sostanziale anergia dei macrofagi mucosali intestinali ai PAMPs. Tuttavia, i macrofagi mucosali dei topi WT sovra-esprimono il marcatore F4/80 già nelle fasi iniziali della colite, indicando che segnali presenti nella mucosa attivano *in vivo* queste cellule. Tuttavia, nei macrofagi isolati da topi TLR2^{-/-} e nei topi WT infettati per via orogastrica con HSV-1, portatori di neuropatia del SNE, non si verifica un significativo incremento dell'espressione del F4/80 né a seguito della

esposizione a LPS né in corso di colite, pur presentando questi animali una infiammazione più severa dei topi WT.

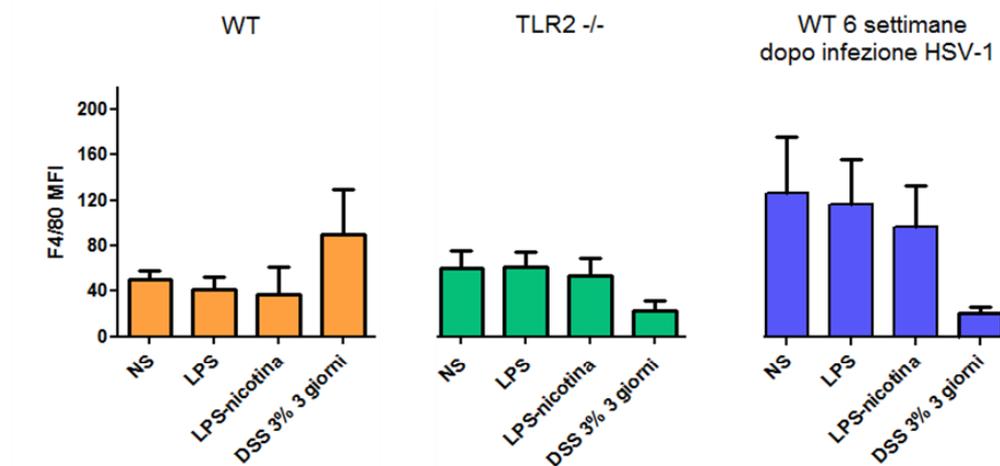


Figura 5.12 Attivazione dei macrofagi mucosali in topi WT e con neuropatia del SNE. Macrofagi della mucosa colica sono stati isolati da topi WT, TLR2^{-/-} o WT a sei settimane dopo infezione intragastrica con HSV-1 ed esposti *in vitro* a LPS +/- nicotina oppure da topi trattati con DSS per tre giorni e il grado di attivazione è stato valutato quantificando l'espressione di F4/80. I dati sono riportati come media dell'intensità di fluorescenza media (MFI) ± SE e provengono da 3-12 esperimenti differenti.

5.9 In presenza di neuropatia del SNE nei macrofagi mucosali in corso di colite non si attiva la caspasi-1

Al fine di valutare l'effettivo coinvolgimento dei macrofagi nell'infiammazione tissutale abbiamo determinato l'attivazione dell'inflamosoma, la piattaforma sovramolecolare che regola la produzione di IL-1 β matura, anche nei macrofagi mucosali colici. A tal fine abbiamo quantificato l'attività della caspasi-1, enzima responsabile della conversione della pre-IL1 β nella sua forma bioattiva, nelle cellule CD11b+ mediante analisi citofluorimetrica in topi controllo e dopo 3 giorni di esposizione al DSS.

Come mostrato nella Figura 5.13, i macrofagi intestinali di tutti i gruppi, in assenza di esposizione *in vivo* al DSS, non dimostrano una significativa risposta a stimoli pro-infiammatori quali LPS e ATP *in vitro*. Al contrario, in presenza di una lieve infiammazione tissutale nel colon di topi WT si evidenzia un aumento di 2,7 volte dell'attivazione della caspasi-1, senza una ulteriore maggiore risposta a stimoli pro-infiammatori *in vitro*.

Sebbene topi TLR2^{-/-} presentino a livello basale una percentuale maggiore di cellule CD11b+/caspasi-1 attiva positive (2,1 volte maggiore rispetto ai WT), i macrofagi non mostrano un aumento dell'attività della caspasi-1 in presenza di un danno alla mucosa per il trattamento con DSS, né in condizioni basali né in risposta a stimoli pro-infiammatori *in vitro*. Anche in presenza di una neuropatia indotta da virus HSV-1, si confermano i dati osservati in topi TLR2^{-/-}: un livello basale di attivazione della caspasi-1 lievemente aumentato rispetto ai topi WT ed una mancata attivazione di quest'ultima in presenza di colite.

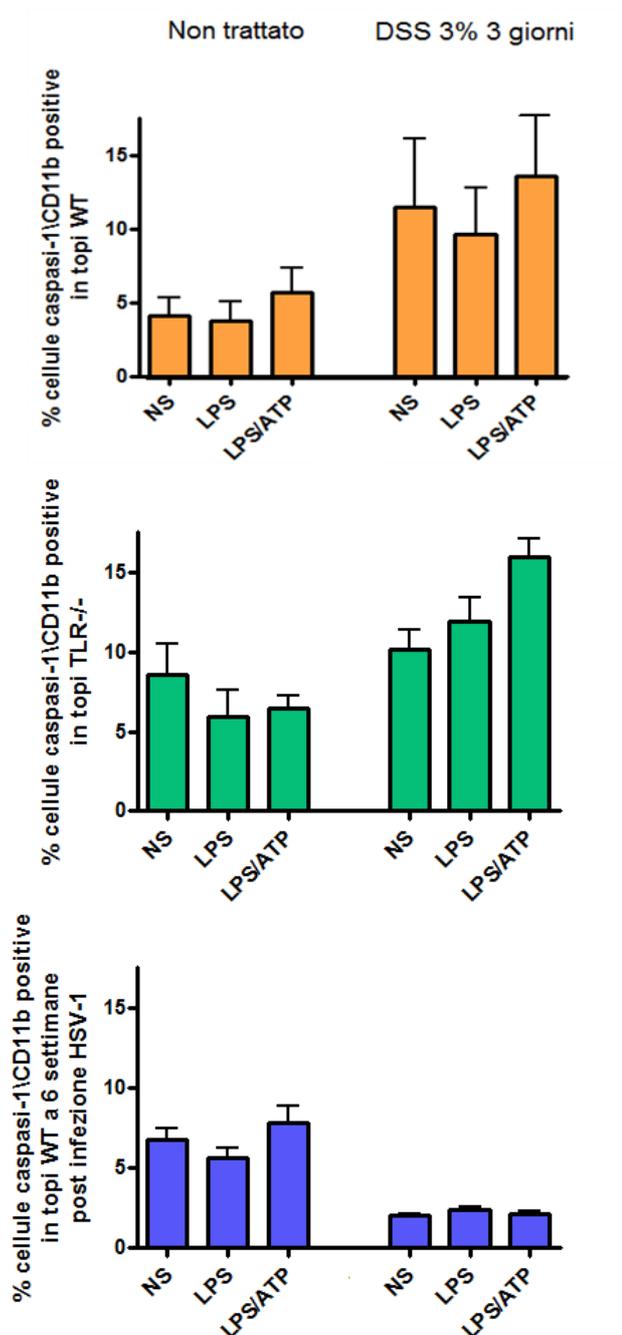


Figura 5.13 Attività della caspasi-1 in macrofagi mucosali di topi WT e con neuropatia del SNE. Macrofagi della mucosa colica sono stati isolati da topi WT, TLR2^{-/-} e WT a sei settimane dopo infezione intragastrica con HSV-1 ed esposti in vitro a LPS +/- ATP e il grado di attivazione della caspasi-1 è stato determinato in citofluorimetria utilizzando una sonda fluorescente in grado di legare specificamente la caspasi-1 attiva. I dati sono riportati come media della percentuale di macrofagi CD11b+/caspasi-1 attivata ± SE e provengono da 3-6 esperimenti diversi.

5.10 La nicotina riduce l'attivazione della caspasi-1 nei macrofagi mucosali WT in corso di colite ma non in presenza di neuropatia

Al fine di caratterizzare lo stato funzionale del recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi della mucosa colica, abbiamo verificato l'abilità della nicotina di inibire l'attivazione della caspasi-1 in queste cellule. A tal fine macrofagi isolati da topi esposti per tre giorni al DSS

sono stati esposti alla nicotina prima di esaminare lo stato di attivazione della caspasi-1. Come si osserva nella Figura 5.14, la nicotina riduce il grado di attivazione della caspasi-1 in topi WT, mentre il trattamento con nicotina risulta completamente inefficace in topi TLR2^{-/-} portatori di neuropatia.

Complessivamente i dati precedenti suggeriscono che il recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ viene sovra-espresso nelle fasi iniziali dell'infiammazione intestinale nei macrofagi colici di topi WT, ma non in animali portatori di neuropatia, rendendoli maggiormente sensibili all'azione anti-infiammatoria della nicotina.

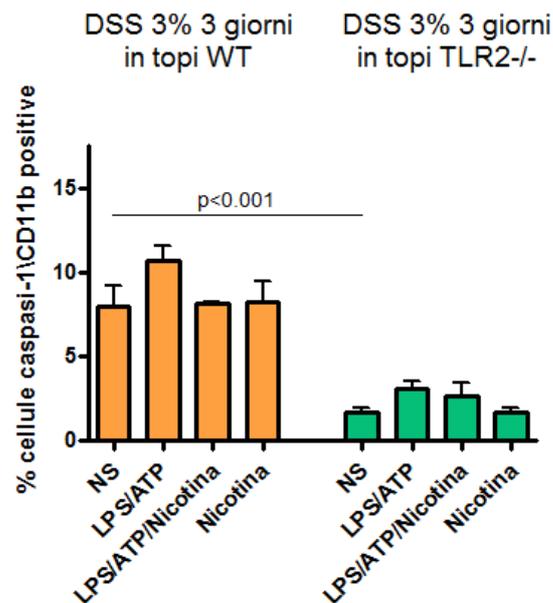


Figura 5.14 Effetto della nicotina sull'attività della caspasi-1 in macrofagi mucosali in corso di colite. Macrofagi della mucosa colica sono stati isolati da topi (WT e TLR2^{-/-}) trattati con DSS per 3 giorni ed esposti *in vitro* a LPS +/- ATP in presenza o assenza di nicotina ed il grado di attivazione della caspasi-1 è stato determinato in citofluorimetria utilizzando una sonda fluorescente in grado di legare specificamente la caspasi-1 attiva. I dati sono riportati come media della percentuale di macrofagi CD11b+/caspasi-1 attivata \pm SE e provengono da 3-6 esperimenti diversi.

5.11 La nicotina non riduce la severità della colite in topi portatori di neuropatia.

Ci siamo quindi proposti di verificare l'attività anti-infiammatoria della nicotina in topi portatori di neuropatia, e quindi incapaci di sovra-esprimere il recettore nicotinico $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi colici. A tal fine topi WT e TLR2^{-/-} sono stati trattati con nicotina ed è stata indotta la colite mediante la somministrazione di DSS. Come evidenziato in figura 5.15, la somministrazione della nicotina *in vivo* riduce in maniera significativa la gravità della colite nei topi WT ma risulta inefficace nei topi TLR2^{-/-}. Infatti, si osserva una minore perdita di peso (figura 5.15 A), un ridotto incremento di citochine pro-infiammatorie TNF α e IL1 β e attività della MPO nei topi WT (Figura 5.15 C-F), mentre nei topi TLR2^{-/-} si osservano solo degli effetti parziali su TNF α ed MPO (Figura 5.16 C e F). Le immagini istologiche in figura 5.16 confermano questi dati mostrando un miglioramento del danno alla mucosa dopo somministrazione di nicotina *in vivo*.

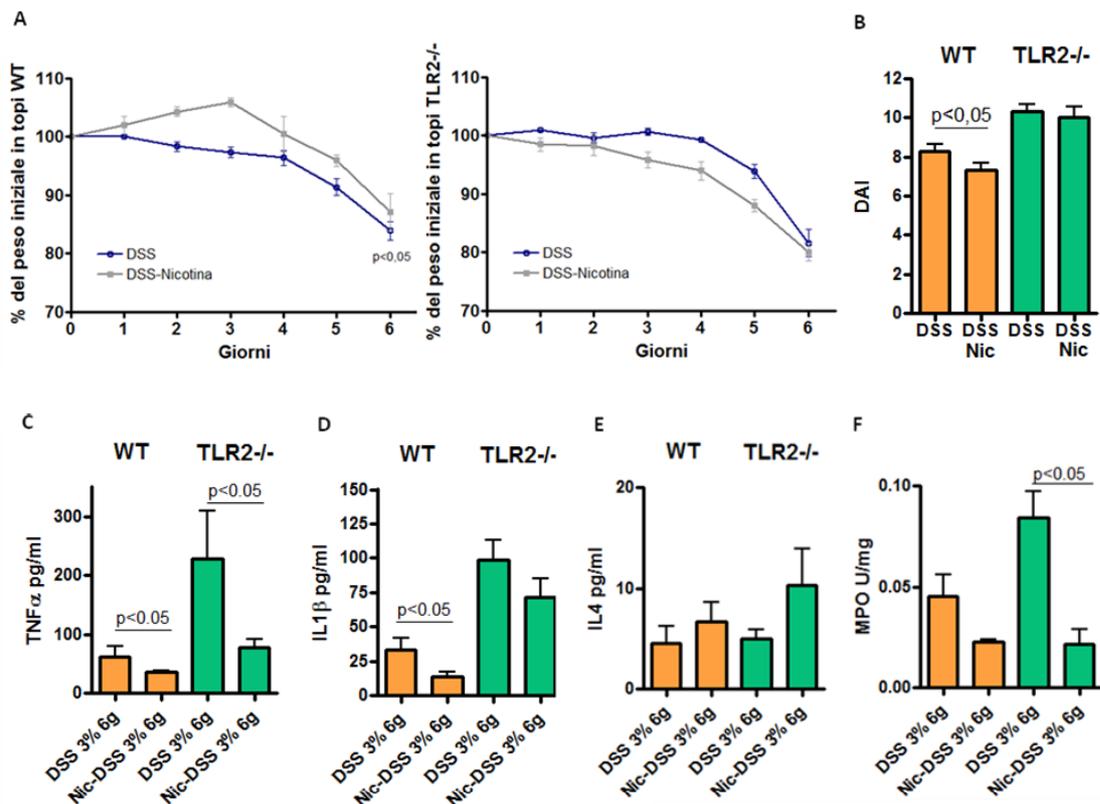


Figura 5.15 Effetto della somministrazione in vivo di nicotina sulla colite sperimentale in topi WT e TLR2^{-/-}. A topi WT o TLR2^{-/-} è stata somministrata nicotina (25 μ g/ml in acqua) durante il trattamento con DSS 3%. **(A)** Il peso corporeo è stato monitorato per sei giorni consecutivi. La somministrazione di nicotina in topi WT determina una minore perdita di peso rispetto a topi non trattati (da 12,91% rispetto a 16,05%), mentre nei topi TLR2^{-/-} non vi è miglioramento della colite (da 18,38% dei topi non trattati al 19,92% di topi trattati con nicotina). Ciascun punto indica la percentuale media di peso perso \pm SE. **(B)** L'indice di attività della malattia (DAI) è stato calcolato al sesto giorno di trattamento in topi in corso di colite trattati o meno in vivo con nicotina. Il punteggio totale è dato dalla somma dei punteggi nella valutazione di perdita di peso, consistenza delle feci e sanguinamento. I dati sono espressi come media di DAI \pm SE. Dopo sei giorni gli animali sono stati sacrificati e un segmento colico utilizzato per il dosaggio dei livelli di TNF α **(C)**, IL1 β **(D)** e IL4 **(E)** mediante saggi ELISA ed espressi come pg/ml \pm SE e dell'attività della mieloperossidasi (MPO) **(F)** mediante saggio enzimatico espressi come U/mg di peso del tessuto \pm SE.

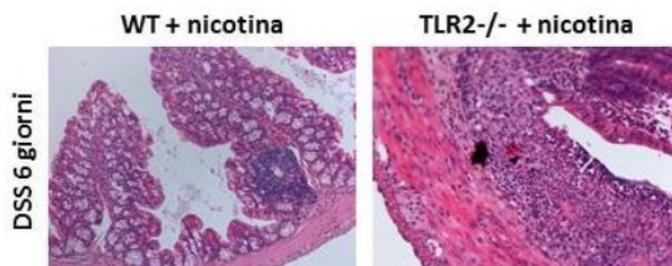


Figura 5.16 Danno istologico nel colon in corso di colite e dopo trattamento con nicotina. A topi WT o TLR2^{-/-} è stato somministrato DSS al 3% nell'acqua da bere previo pre-trattamento per tre giorni e co-trattamento con nicotina. Dopo sei giorni gli animali sono stati sacrificati e un segmento colico fissato in formalina ed incluso in paraffina. Le immagini sono rappresentative di sezioni colorate con ematossilina/eosina ottenute da topi sacrificati dopo 6 giorni di trattamento.

5.12 La correzione della neuropatia ripristina la sensibilità dei macrofagi agli stimoli infiammatori

In un precedente lavoro il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che mediante la somministrazione di GDNF ai topi TLR2^{-/-} è possibile correggere le anomalie del SNE (Brunet et al., 2013). Abbiamo quindi verificato se ripristinando l'integrità del SNE mediante la somministrazione di GDNF *in vivo*, fosse possibile ripristinare una normale risposta dei macrofagi mucosali, come l'attivazione della caspasi-1, in corso di colite. Come evidenziato in figura 5.17 D, i macrofagi mucosali di topi TLR2^{-/-} pre-trattati con GDNF riacquisiscono la capacità di attivare la caspasi-1 in risposta ad ATP+LPS a differenza dei topi TLR2^{-/-} di pari età ma non trattati. Inoltre, appare anche parzialmente ripristinata la risposta all'azione anti-infiammatoria della nicotina, completamente assente in topi TLR2^{-/-}. Infine, i livelli di citochine pro- e anti-infiammatorie descrivono lo sviluppo di una colite più simile alla colite in topi WT e meno severa che in topi TLR2^{-/-}. In particolare, la somministrazione di rmGDNF riduce in maniera statisticamente significativa la produzione di IL1 β e la severità del danno infiammatorio della mucosa (Figure 5.17 A, B, C e 5.18).

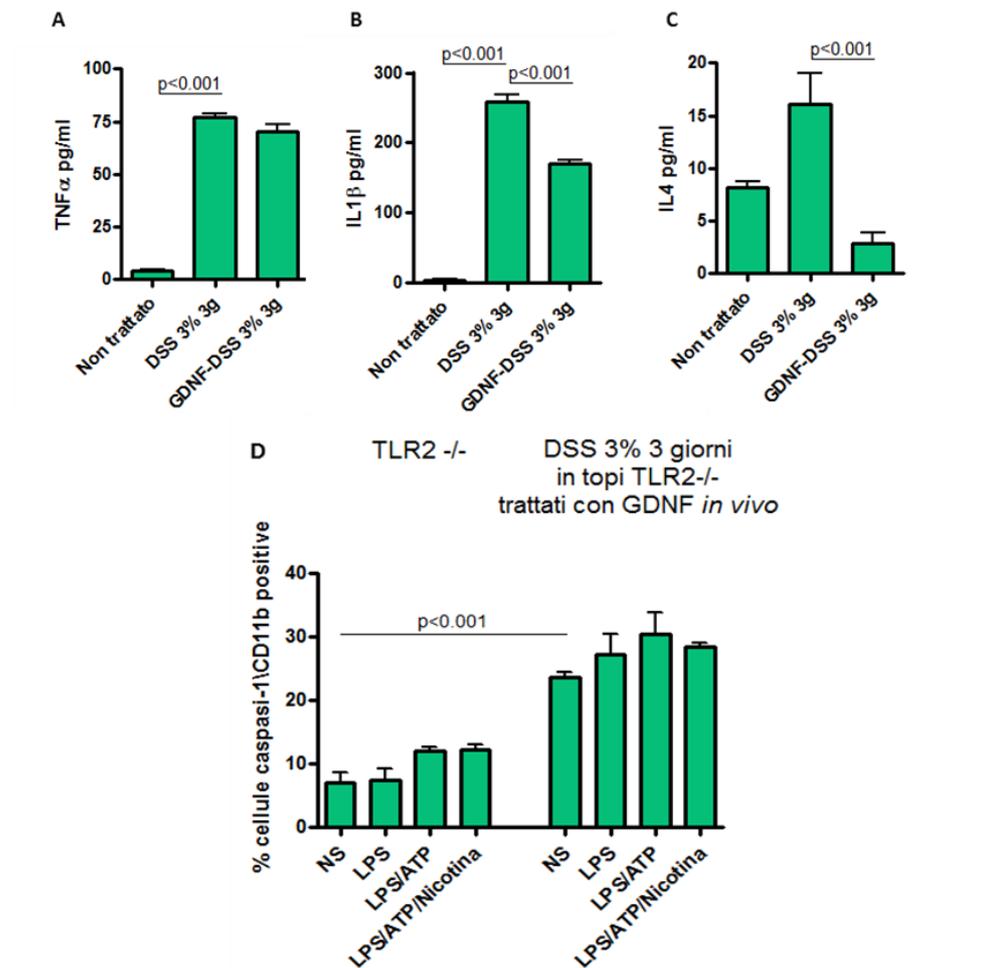


Figura 5.17 Effetto della somministrazione in vivo di GDNF sull'andamento della colite sperimentale in topi TLR2^{-/-}. Topi TLR2^{-/-} sono stati trattati per 5 giorni con rmGDNF o veicolo per via sottocutanea. Al termine del trattamento con GDNF i topi hanno ricevuto DSS 3%. Dopo tre giorni gli animali sono stati sacrificati e un segmento colico utilizzato per il dosaggio dei livelli di TNF α (A), IL1 β (B) e IL4 (C) mediante saggi ELISA ed espressi come media di pg/ml \pm SE (D) Macrofagi della mucosa colica sono stati isolati ed esposti in vitro a LPS +/- ATP in presenza o assenza di nicotina ed il grado di attivazione della caspasi-1 è stato determinato in citofluorimetria utilizzando una sonda fluorescente in grado di legare specificamente la caspasi-1 attiva. I dati sono riportati come media della percentuale di macrofagi CD11b⁺/caspasi-1 attivata \pm SE e provengono da 3-6 esperimenti diversi.

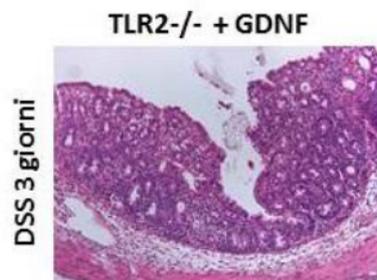


Figura 5.18 Danno istologico in corso di colite in topi TLR2^{-/-} dopo trattamento con GDNF. A topi TLR2^{-/-} è stato somministrato DSS al 3% nell'acqua da bere contemporaneamente al trattamento con GDNF. Dopo tre giorni gli animali sono stati sacrificati e un segmento colico fissato in formalina ed incluso in paraffina. Le immagini sono rappresentative di sezioni colorate con ematossilina/eosina ottenute da topi sacrificati dopo tre giorni di trattamento.

6. DISCUSSIONE

Il fumo di sigaretta è da tempo noto come il principale fattore ambientale che influenza sviluppo e decorso delle malattie infiammatorie croniche intestinali. La relazione tra fumo e CU è stata descritta oltre trent'anni fa notando l'assenza di fumatori tra i pazienti con CU (Bastida e Beltrán; 2011). Da quella prima osservazione sono stati condotti numerosi studi epidemiologici che hanno dimostrato un'associazione dose-risposta tra fumo di sigaretta e diminuzione del rischio di malattia, soprattutto negli uomini. Al contrario, una meta-analisi di 13 studi non ha rilevato nessuna significativa associazione tra sviluppo della malattia e fumo passivo, escludendone un effetto benefico sul decorso della CU (Jones et al.; 2008). Al contrario, tra i pazienti con MC numerosi studi hanno documentato che il fumo è associato a una maggior rischio di insorgenza della malattia con un decorso più severo (Mahid et al.; 2007; Persson et al.; 1990). Questi dati epidemiologici hanno costituito la base razionale per numerosi trial clinici che hanno valutato l'efficacia della nicotina sul decorso delle IBD. In particolare, l'assunzione di nicotina si è dimostrata benefica in ex-fumatori con CU, ma non ha avuto effetti sui pazienti con CU che non avevano mai fumato. (Bastida e Beltrán; 2011; Pullan et al.; 1994; Sandborn et al.; 1997). Inoltre, poiché il fumo di sigaretta è correlato all'aumento del rischio d'intervento chirurgico nei pazienti con MC, la somministrazione di nicotina non è stata testata estensivamente su pazienti con MC (Thomas et al.; 2005). Sebbene gli studi clinici abbiano chiaramente dimostrato l'efficacia dell'azione anti-infiammatoria della nicotina nei pazienti con CU, ma non in quelli con MC, i meccanismi responsabili di questo comportamento apparentemente paradossale non sono ancora noti.

La nicotina è il ligando esogeno del recettore nicotinico dell'acetilcolina. Tra le 16 diverse subunità che possono associarsi a costituire questo recettore, la subunità $\alpha 7$ è essenziale per il sistema colinergico anti-infiammatorio (Tracey; 2007). In questo studio per valutare l'espressione del recettore $\alpha 7nAChR$ abbiamo utilizzato l' α -bungarotossina (α -btx), un tool ampiamente utilizzato in letteratura per studiare i recettori nicotinici (Shytle et al.; 2004; Borovikova et al.; 2000; Wang et al., 2003). L' α -bungarotossina è un potente antagonista dei recettori nicotinici, possedendo alta affinità e bassa dissociazione dal recettore, proprietà che risultano molto utili nei saggi per quantificare gli AChRs (Sine et al.; 2013). L' α -bungarotossina lega diverse subunità che compongono l'AChR, incluse le subunità $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha 9$ del recettore nicotinico (Lee; 1972; Zouridakis et al.; 2014; Niarchos et al.; 2013), oltre alla subunità $\alpha 7$ espresse nelle cellule di mammifero. Tuttavia, Wang e colleghi hanno dimostrato che le subunità $\alpha 4$ e $\alpha 9$ non sono espresse dai macrofagi e da altre cellule immunitarie e che la subunità $\alpha 1$, sebbene espressa nei monociti è fortemente down-regolata durante la differenziazione dei monociti del sangue periferico in macrofagi e nei macrofagi tessutali (Wang et al., 2003). Pertanto, è ampiamente accettato che l' α -bungarotossina legghi in maniera sufficientemente specifica il recettore $\alpha 7nAChR$ sui macrofagi per consentire dei saggi volti a determinare l'espressione di questo recettore.

I macrofagi sono tra i principali protagonisti della risposta immunitaria innata e sono ampiamente coinvolti nel preservare l'omeostasi dell'ambiente intestinale. Queste cellule partecipano alla difesa dell'ospite da patogeni che tentano di invadere l'organismo sia fagocitando che uccidendo i microbi, e quindi orchestrando reazioni infiammatorie attraverso la secrezione di citochine e chemochine essenziali al reclutamento/attivazione di altre cellule infiammatorie (Mowat e Bain; 2011). Recenti ricerche hanno dimostrato la presenza di difetti nell'immunità innata nei pazienti con IBD, in particolare della funzione dei macrofagi nel MC. È stata, infatti, riscontrata un'incapacità dei macrofagi di rilasciare adeguate quantità di citochine in risposta ad agenti patogeni, causata da un prematuro indirizzamento delle proteine nei lisosomi, anziché alla membrana cellulare (Smith et al.; 2009). Questo deficit determina un inadeguato reclutamento di neutrofili e di conseguenza, nel complesso, dell'intera risposta infiammatoria. Pertanto oggi s'ipotizza che il danno del tessuto intestinale non è causato dalla sovra-espressione delle citochine da parte dei macrofagi, ma piuttosto dall'esagerato numero dei macrofagi reclutati (Marks; 2011). I nostri studi hanno evidenziato un ulteriore difetto dei macrofagi mucosali dei pazienti con MC. Infatti, i macrofagi da MC sono risultati incapaci di modulare l'espressione del recettore nicotinic $\alpha 7$ in presenza di un processo infiammatorio nella mucosa, dimostrando livelli di espressione paragonabili ai soggetti senza infiammazione intestinale piuttosto che a pazienti con flogosi come quelli con CU. La sovra-espressione del recettore nicotinic nei macrofagi mucosali nei pazienti con CU potrebbe, almeno in parte, spiegare l'effetto favorevole della nicotina osservato nei pazienti con CU. Infatti, la sovra-espressione del recettore nicotinic nei macrofagi mucosali li renderebbe sensibili all'azione anti-infiammatoria della nicotina, che difatti, solo nelle cellule di CU, inibisce la produzione di TNF α indotta da LPS. Peraltro, nell'equilibrio della risposta infiammatoria sia tessutale che sistemica, riveste un ruolo chiave il sistema colinergico anti-infiammatorio regolato dal nervo vago e dal suo principale neurotrasmettitore acetilcolina che regolano il grado di attivazione di diverse cellule infiammatorie (Pavlov e Tracey; 2005; Borovikova et al.; 2000; Wu et al.; 2014). Pertanto la mancata suscettibilità dei macrofagi mucosali dei pazienti con MC potrebbe contribuire ad esacerbare il danno tissutale per la deregolata produzione di citochine pro-infiammatorie quali TNF α e IL1 β in risposta ad agenti patogeni (Schreiber et al.; 1999).

In questo lavoro di tesi non abbiamo osservato differenze di espressione ed attività del recettore nicotinic $\alpha 7$ nei macrofagi ottenuti da monociti del sangue periferico dei pazienti con CU ed MC. Questo dato è in parziale discordanza con quanto riportato da Smith e collaboratori, che hanno osservato una differente secrezione di citochine e una inadeguata attività fagocitaria dei macrofagi ottenuti dal sangue periferico dei pazienti con MC rispetto ai controlli sani o soggetti con CU. Va però notato che in quello studio sono stati utilizzati monociti lasciati in cultura per soli cinque giorni senza aggiunta di alcun fattore trofico per favorirne la maturazione e/o polarizzazione (Smith et al.; 2009) mentre in questo studio i monociti sono stati coltivati per nove giorni in presenza di fattori noti per indurre la differenziazione in macrofagi. I diversi dati tra macrofagi ottenuti da monociti e isolati da mucosa sono facilmente spiegabili poiché è noto che queste diverse tipologie di macrofagi rispondono agli stimoli pro-infiammatori in maniera diversa, probabilmente

come conseguenza della permanenza dei secondi nel “milieu” intestinale (Kamada et al.; 2005; Smith et al.; 2009; Casanova e Abel; 2009; Netea et al.; 2010)

Pertanto nel loro insieme i dati ottenuti dallo studio dei pazienti con IBD e i dati della letteratura suggeriscono che i macrofagi dei soggetti con CU si comportano in maniera adeguata nel corso di un processo infiammatorio (i.e. i macrofagi producono citochine pro-infiammatorie, sovra-esprimono il recettore nicotino e rispondono alla nicotina). Al contrario, è la mancata modulazione del recettore nicotino, pur in presenza di una flogosi cronica, nei pazienti con MC ad essere patologica. Pertanto nel proseguimento del mio PhD mi sono concentrata a ricercare il possibile meccanismo responsabile della mancata modulazione del recettore nicotino $\alpha 7$ nei macrofagi colici. A tal fine abbiamo deciso di esplorare l'ipotesi che la mancata sovra-espressione del recettore nicotino $\alpha 7$ nei macrofagi dei pazienti con MC fosse la conseguenza della neuropatia del sistema nervoso enterico. E' ben noto, infatti, che nei pazienti con IBD sono presenti alterazioni strutturali dei neuroni e della glia della parete intestinale. In particolare nei pazienti con MC sono riportate severe anomalie ultrastrutturali degli assoni, ipertrofia delle fibre dei plessi mienterico e sottomucoso e alterazioni dei neurotrasmettitori sia in aree infiammate che non, mentre nei pazienti con CU queste alterazioni risultano meno comuni e meno marcate (Geboes e Collins; 1998; Vasina et al.; 2006; Cabarrocas et al.; 2003). Peraltro nella parete intestinale è stata ampiamente descritta una stretta associazione tra terminazioni nervose e cellule immuno-competenti (i.e. mast-cellule, linfociti, macrofagi) supportando l'esistenza di una profonda interazione funzionale tra queste diverse popolazioni cellulari (Cailotto et al.; 2014; Fehér et al.; 2001; Hughes et al.; 2013).

Allo scopo di investigare il ruolo della neuropatia del sistema nervoso enterico nella mancata modulazione del recettore nicotino $\alpha 7$ nei macrofagi della mucosa colica abbiamo utilizzato due modelli murini nei quali in precedenza il nostro gruppo di ricerca aveva dimostrato alterazioni morfo/funzionali del network neuro-gliale a livello dell'ileo (Brun et al.; 2010; Brun et al.; 2013). Mediante analisi immunohistochimica su preparati “whole mount” della mucosa e sottomucosa colica in topi TLR2^{-/-} e in topi WT infettati per via orogastrica con HSV-1 da 6 settimane la presenza di una neuropatia anche a livello della mucosa colica è stata confermata dalla ridotta espressione di β III-tubulina e periferina. L'espressione di queste due proteine che costituiscono diversi tipi di neurofilamenti è, infatti, un indicatore di integrità neuronale, e l'alterata espressione di questi filamenti è descritta in neuropatie del sistema nervoso centrale e periferico (Brun et al.; 2013; Zhang et al.; 2014; Lucena et al.; 2014).

La presenza di una neuropatia è già stata descritta in precedenza come un fattore che aggrava il decorso della colite sperimentale. Difatti sia nei topi TLR2^{-/-}, confermando precedenti risultati (Voltan et al.; 2008; Cario et al.; 2007), che nei topi con l'infezione del SNE ad opera di HSV-1, abbiamo riscontrato una maggiore severità dell'infiammazione colica scatenata dal DSS. Peraltro la correzione della neuropatia in topi TLR2^{-/-} mediante la somministrazione di GDNF ha normalizzato la gravità della risposta infiammatoria (Brun et al.; 2013) confermando che l'integrità strutturale e funzionale del sistema nervoso enterico

è essenziale nel modulare la risposta ad un agente lesivo esterno. Nei topi con neuropatia, così come nei pazienti con MC, non si verifica una normale attivazione dei macrofagi mucosali. Infatti, nei macrofagi di topi con neuropatia abbiamo evidenziato la mancata sovra-espressione di F4/80, un marker di attivazione dei macrofagi descritto anche corso di colite (McKnight et al.; 1996; Mikami et al.; 2014). Inoltre, in corso di colite nei macrofagi da topi con neuropatia l'attivazione della caspasi-1, l'enzima che trasforma in forme biologicamente attive i precursori di IL1 β e IL18 a seguito dell'assemblaggio dell'inflammosoma, appare ridotta (Netea et al.; 2010). Infine, l'anomala funzione dei macrofagi colici nei topi portatori di neuropatia è ulteriormente confermata anche dalla mancata sovra-espressione del recettore nicotinic α 7 anche in presenza di colite, così come osservato nei pazienti affetti da MC. Peraltro la correzione della neuropatia nei topi TLR2^{-/-} porta a ripristinare una normale attivazione della caspasi-1 in corso d'inflammation intestinale, confermando che segnali derivanti dai neuroni colici modulano l'attività dei macrofagi mucosali. Infine, così come nei pazienti con MC, i topi TLR2^{-/-} portatori di neuropatia risultano insensibili agli effetti anti-infiammatori della nicotina (AlSharari et al.; 2013). In conclusione, mentre nei macrofagi colici di topi WT la colite determina la sovra-espressione sia di marcatori di attivazione (i.e. F4/80, attivazione caspasi-1) che del recettore nicotinic α 7 indicando una complessa risposta cellulare che contribuisce sia allo sviluppo dell'inflammation ma anche alla attività anti-infiammatoria dell'acetilcolina endogena (o della nicotina esogena), in presenza di neuropatia del SNE i macrofagi murini, così come quelli dei pazienti con MC, non rispondono in maniera idonea agli stimoli ambientali e pertanto la loro attività risulta non congrua agli stimoli e non modulabile.

I fattori che determinano la regolazione del recettore nicotinic α 7 non sono ancora noti. Nel SNC la neuregulina, una famiglia di peptidi coinvolti nella comunicazione intercellulare e nella plasticità neuronale, che contiene un dominio "epidermal growth factor" like, determina l'aumento della trascrizione dei recettori nicotinici (Britsch; 2007). Recentemente è stato riportato che la neuregulina1 aumenta l'espressione del recettore nicotinic α 7 in cellule della microglia (considerate l'equivalente dei macrofagi tissutali nel SNC) regolando il rilascio di TNF α e la neuroinflammation (Mencel et al.; 2013). Tuttavia un recente lavoro di Bernard e coll. ha riportato che l'mRNA per la neuregulina4, l'unico presente a livello intestinale, è ridotta nella mucosa colica di pazienti con CU o MC (Bernard et al.; 2012). A conferma del mancato coinvolgimento di questa famiglia di peptidi nella MC, in esperimenti preliminari condotti nei nostri modelli murini di colite da DSS non abbiamo evidenziato differenze di espressione di neuregulina4 nei topi WT e nei topi portatori di neuropatia durante l'induzione della colite. Questi dati sembrano quindi escludere un ruolo di questa famiglia di neuropeptidi nella regolazione diretta del recettore nicotinic α 7 nei macrofagi colici.

Un'ipotesi alternativa è che i neuroni producano sostanze in grado di influenzare direttamente la maturazione/attività dei macrofagi. Numerosi studi sperimentali, infatti, dimostrano come i neuroni possiedano recettori dell'immunità innata come TLR e NOD-like receptor (Heiman et al.; 2014; Kigerl et al.; 2014) e siano in grado di secernere svariate citochine in risposta ad opportuni stimoli (Coquenlorge et al.; 2014). In particolare, i neuroni sono in grado di influenzare direttamente l'attività di macrofagi producendo sia

molecole ad attività chemotattica (ad esempio MCP-1) che fattori di crescita/maturazione come IL34 e CSF1 (Wang et al; 2012; Karrer et al.; 2014). Queste due molecole sono fattori di crescita essenziali per la differenziazione e sopravvivenza dei macrofagi anche dopo che il processo infiammatorio si è risolto (Greter et al.; 2012). E' pertanto estremamente stimolante che pazienti con MC siano stati di recente trattati in via sperimentale con fattori di crescita/maturazione dei macrofagi/cellule dendritiche come il GM-CSF, per ripristinarne un corretto funzionamento e limitare la flogosi intestinale cronica (Korzenik et al.; 2005; Kelsen et al.; 2010).

In conclusione, in questo progetto di dottorato, utilizzando macrofagi intestinali di pazienti con IBD e modelli murini, abbiamo dimostrato che un'ottimale azione del sistema colinergico anti-infiammatorio richiede l'aumentata espressione di $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi mucosali in risposta ad un processo flogistico. Tuttavia, in presenza di neuropatia (i.e. virale o trofica) l'espressione di $\alpha 7nAChR$ nei macrofagi mucosali può risultare insufficiente, come nel caso dei pazienti con MC, portando eventualmente ad un danno mucosale amplificato. E' pertanto ipotizzabile lo sviluppo di analoghi della nicotina con minori effetti collaterali per il trattamento dei pazienti con CU mentre nel caso dei pazienti con MC appare centrale la risoluzione della sottostante neuropatia che contribuisce ad amplificare il danno tessutale o la somministrazione di fattori trofici in grado di supportare lo sviluppo/maturazione dei macrofagi mucosali per migliorare il decorso dell'infiammazione.

7. BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2010) Immunologia cellulare e molecolare. *Elsevier srl*.

Abraham C, Medzhitov R. (2011) Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1729-37. Review

Akira S, Takeda K. (2004) Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*.4(7):499-511. Review.

AlSharari SD, Akbarali HI, Abdullah RA, Shahab O, Auttachoat W, Ferreira GA, White KL, Lichtman AH, Cabral GA, Damaj MI. (2013) Novel insights on the effect of nicotine in a murine colitis model. *J Pharmacol Exp Ther*. 344(1):207-17.

Ananthkrishnan AN. (2013) Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (NY)*. 9(6):367-74.

Ardizzone S, Porro GB.(2005) Biologic Therapy for Inflammatory for Inflammatory bowel disease. *Drugs*. 65(16):2253-86. Review.

Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Guilliams M, Malissen B, Agace WW and Mowat AMCl. (2013) Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*.6:498–510.

Bandzar S, Gupta S, Platt MO (2013). Crohn's disease: A review of treatment options and current research. *Cell Immunol*; 286(1-2):45-52. Review.

Basso PJ, Fonseca MT, Bonfá G, Alves VB, Sales-Campos H, Nardini V, Cardoso CR. (2014) **Association** among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Braz J Med Biol Res*. 47(9):727-37.

Bassotti G, Antonelli E, Villanacci V, Baldoni M, Dore MP. (2014) Colonic motility in ulcerative colitis. *United European Gastroenterol J*. 2(6):457-62.

Bastida G, Beltrán B. (2011) Ulcerative colitis in smokers non-smokers and ex-smokers. *World J Gastroenterol*. 17(22):2740-7.

Bernard JK, McCann SP, Bhardwaj V, Washington MK, Frey MR. (2012) Neuregulin-4 is a survival factor for colon epithelial cells both in culture and in vivo. *J Biol Chem*. 287(47):39850-8.

Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. (2014) Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 94(2):329-54.

Bonaz BL, Bernstein CN. (2013) Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 144(1):36-49.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 405(6785):458-62.

Britsch S. (2007) The neuregulin-1/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 190:1-65. Review.

Brun P, Giron MC, Qesari M, Porzionato A, Caputi V, Zoppellaro C, Banzato S, Grillo AR, Spagnol L, De Caro R, Pizzuti D, Barbieri V, Rosato A, Sturniolo GC, Martines D, Zaninotto G, Palù G, Castagliuolo I. (2013) Toll-Like Receptor 2 Regulates Intestinal Inflammation by Controlling Integrity of the Enteric Nervous System. *Gastroenterology.* 145(6):1323-33.

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.* 138(5):1790-801.

Burgio VL, Fais S, Boirivant M, Perrone A, Pallone F. (1995) Peripheral monocyte and naïve T-cell recruitment and activation in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 109(4):1029-38.

Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia.* 41(1):81-93. Review.

Cader MZ, Kaser A. (2013) Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut.* 62(11):1653-64. Review.

Cailotto C, Gomez-Pinilla PJ, Costes LM, van der Vliet J, Di Giovangiulio M, Némethova A, Matteoli G, Boeckxstaens GE. (2014) Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen. *PLoS One.* 9(1):e87785.

Cario E, Gerken G, Podolsky DK. (2007) Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology.* 132(4):1359-74.

Casanova JL, Abel L. (2009) Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages. *J Exp Med.* 206(9):1839-43. Review.

Conte MP, Longhi C, Marazzato M, Conte AL, Aleandri M, Lepanto MS, Zagaglia C, Nicoletti M, Aloï M, Totino V, Palamara AT, Schippa S. (2014) Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes.* 7:748.

Coquenlorge S, Duchalais E, Chevalier J, Cossais F, Rolli-Derkinderen M, Neunlist M. (2014) Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation*. 11(1):202.

Costa M, Brookes SJ, Hennig GW. (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*. 47 Suppl 4:iv15-9

De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, Libioulle C, Jani N, Dassopoulos T, Bromfield GP, Dubois B, Cho JH, Brant SR, Duerr RH, Yang H, Rotter JI, Silverberg MS, Steinhart AH, Daly MJ, Podolsky DK, Louis E, Hafler DA, Rioux JD. (2007) The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*. 8(5):387-97.

Doecke JD, Simms LA, Zhao ZZ, Huang N, Hanigan K, Krishnaprasad K, Roberts RL, Andrews JM, Mahy G, Bampton P, Lewindon P, Florin T, Lawrance IC, Geary RB, Montgomery GW, Radford-Smith GL. (2013) Genetic susceptibility in IBD: overlap between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 19(2):240-5.

Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. (2014) The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 27(4):294-303.

Fairweather D, Cihakova D. (2009) Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun*. 33(3-4):222-30. Review.

Fakhoury M, Negruj R, Mooranian A, Al-Salami H. (2014) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*. 7:113-20.

Fehér E, Altdorfer K, Bagaméri G, Fehér J. (2001) Neuroimmune interactions in experimental colitis. An immunoelectron microscopic study. *Neuroimmunomodulation*. 9(5):247-55.

Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MA, Oliveira FA, Curi R, Martins Fdos S. (2014) The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res*. 2014:689492.

Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P. (2011) Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systemic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 106(4):590-9.

Friswell M, Campbell B, Rhodes J. (2010) The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver*. 4(3):295-306.

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.

Furness JB. (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9:286-294.

Furness JB. (2008) The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil.* 20 Suppl 1:32-8

Galitovskiy V, Qian J, Chernyavsky AI, Marchenko S, Gindi V, Edwards RA, Grando SA. (2011) Cytokine-induced alterations of 7 nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis. *J Immunol.* 187(5):2677-87.

Geboes K, Collins S. (1998) Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil.* 10(3):189-202.

Goldstein AM, Hofstra RM, Burns AJ. (2013) Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet.* 83(4):307-16. Review.

González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. (2014) Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol.* 274(1-2):1-13.

Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kündig TM, Frei K, Ginhoux F, Merad M, Becher B. (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity.* 37(6):1050-60.

Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF.(1995) Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa-implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* 100(2):291-7.

Guo AY, Stevens BW, Wilson RG, Russell CN, Cohen MA, Sturgeon HC, Thornton A, Giallourakis C, Khalili H, Nguyen DD, Sauk J, Yajnik V, Xavier RJ, Ananthakrishnan AN. (2014) Early life environment and natural history of inflammatory bowel diseases. *BMC Gastroenterol.* 14(1):216

Hansen MB. (2003) The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol.* 92(3):105-13

Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. (2004) Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol.* 500(1-3):51-62.

Heiman A, Pallottie A, Heary RF, Elkabes S. (2014) Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: a focus on the spinal cord. *Brain Behav Immun.* 42:232-45.

Hirota SA,Ng J,Lueng A,Khajah M,Parhar K,Li Y,Lam V,Potentier MS,Ng K,Bawa M,McCafferty DM,Rioux KP,Ghosh S,Xavier RJ,Colgan SP,Tschopp J,Muruve D,MacDonald JA,Beck PL. (2011) The NLRP3 inflammasome plays key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis.* 17(6):1359-72.

- Huang S, Li SX, Bren N, Cheng K, Gomoto R, Chen L, Sine SM.** (2013) Complex between α -bungarotoxin and $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimaera. *Biochem J.* 454(2):303-10
- Hughes PA, Zola H, Penttila IA, Blackshaw LA, Andrews JM, Krumbiegel D.** (2013) Immune activation in irritable bowel syndrome: can neuroimmune interactions explain symptoms? *Am J Gastroenterol.* 108(7):1066-74.
- Jones DT, Osterman MT, Bewtra M, Lewis JD.** (2008) Passive smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 103: 2382-2393.
- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, Nakai T, Hasegawa A, Inoue N, Watanabe N, Akagawa KS, Hibi T.** (2005) Abnormally Differentiated Subsets of Intestinal Macrophage Play a Key Role in Th1-Dominant Chronic Colitis through Excess Production of IL-12 and IL-23 in Response to Bacteria. *J Immunol.* 175(10):6900-8.
- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T.** (2008) Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 118:2269–2280.
- Karrer M, Lopez MA, Meier D, Mikhail C, Ogunshola OO, Müller AF, Strauss L, Tafti M, Fontana A.** (2014). Cytokine-induced sleep: Neurons respond to TNF with production of chemokines and increased expression of Homer1a in vitro. *Brain Behav Immun.* pii: S0889-1591(14)00523-6.
- Kelsen JR, Rosh J, Heyman M, Winter HS, Ferry G, Cohen S, Mamula P, Baldassano RN.** (2010) Phase I trial of sargramostim in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 16(7):1203-8.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW.** (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol.* 258:5-16.
- Korzenik JR, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ; Sargramostim in Crohn's Disease Study Group.** (2005) Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med.* 352(21):2193-201.
- Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D.** (2014) The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 146(6):1489-99.
- Kraneveld AD, Rijniere A, Nijkamp FP, Garssen J.** (2008) Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: future therapeutic targets. *Eur J Pharmacol.* 585(2-3):361-74.
- Lakhan SE, Kirchgessner A.** (2011) Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis. *J Transl Med.* 2;9:129.

Lee CY. (1972) Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. *Annu. Rev. Pharmacol.* 12, 265–286.

Leone VA, Cham CM, Chang EB. (2014) Diet, gut microbes, and genetics in immune function: can we leverage our current knowledge to achieve better outcomes in inflammatory bowel diseases? *Curr Opin Immunol.* 31:16-23.

Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, Aldeguer X, Garcia-Gil LJ. (2014) Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int J Med Microbiol.* 304(3-4):464-75.

Lucena EE, Guzen FP, Cavalcanti JR, Marinho MJ, Pereira WO, Barboza CA, Costa MS, do Nascimento Júnior ES, Cavalcante JS. (2014) Plasticity of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow in the presence of conditioned medium of the facial nerve and fibroblast growth factor-2. *ScientificWorldJournal.* 2014:457380.

Lundin A, Bok CM, Aronsson L, Björkholm B, Gustafsson JA, Pott S, Arulampalam V, Hibberd M, Rafter J, Pettersson S. (2008) Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol.* 10(5):1093-103.

Mahid SS, Minor KS, Stevens PL, Galandiuk S. (2007) The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables. *Dig Dis Sci.* 52(11):2897-903. Review.

Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki A, Tiaka EK, Oikonomou KA, Lotis V, Vamvakopoulou D, Davidi I, Vamvakopoulos N, Potamianos SP. (2013) Readdressing the role of Toll-like receptor-4 alleles in inflammatory bowel disease: colitis, smoking, and seroreactivity. *Dig Dis Sci.* 58(2):371-80.

Marks DJ. (2011) Defective innate immunity in inflammatory bowel disease: a Crohn's disease exclusivity? *Curr Opin Gastroenterol.* 27(4):328-34. Review.

Martin TD, Chan SS, Hart AR. (2014) Environmental factors in the relapse and recurrence of Inflammatory Bowel Disease: A review of the literature. *Dig Dis Sci.* DOI 10.1007/s10620-014-3437-3

Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A. (2009) Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 15(6):872-82.

Matteoli G, Boeckstaens GE. (2013) The vagal innervation of the gut and immune homeostasis. *Gut.* 62(8):1214-22.

McKnight AJ, Macfarlane AJ, Dri P, Turley L, Willis AC, Gordon S. (1996) Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J Biol Chem.* 271(1):486-9.

Mencel M, Nash M, Jacobson C. (2013) Neuregulin upregulates microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression in immortalized cell lines: implications for regulating neuroinflammation. *PLoS One*. 8(7):e70338.

Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. (2014) Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One*. 9(1):e84619.

Mowat AM, Bain CC. (2011). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun*. 3(6):350-64. Review.

Moynes DM, Lucas GH, Beyak MJ, Lomax AE. (2014) Effects of inflammation on the innervation of the colon. *Toxicol Pathol*. 42(1):111-7.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Murray PJ, Wynn TA*. Review.

Nakata K, Yamamoto M, Inagawa H, Soma G.(2013) Effects of Interactions Between Intestinal Microbiota and Intestinal Macrophages on Health. *Anticancer Res*.33(7):2849-53. Review.

Netea MG, Simon A, Van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. (2010) IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathog*. 6(2):e1000661.

Nezami BG, Srinivasan S. (2010) Enteric Nervous System in the Small Intestine: Pathophysiology and Clinical Implications. *Curr Gastroenterol Rep*. 12(5):358-65

Ng SC, Tsoi KK, Kamm MA, Xia B, Wu J, Chan FK, Sung JJ. (2012) Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 18(6):1164-76.

Niarchos A, Zouridakis M, Douris V, Georgostathi A, Kalamida D, Sotiriadis A, Poulas K, Iatrou K, Tzartos SJ. (2013) Expression of a highly antigenic and native-like folded extracellular domain of the human $\alpha 1$ subunit of muscle nicotinic acetylcholine receptor, suitable for use in antigen specific therapies for Myasthenia Gravis. *PLoS One*. 8(12):e84791

O'Mahony C, Van der Kleij H, Bienenstock J, Shanahan F, O'Mahony L. (2009) Loss of vagal anti-inflammatory effect: in vivo visualization and adoptive transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297(4):R1118-26.

Pavlov VA, Tracey KJ. (2005) The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 19(6):493-9. Review.

Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. (2003) The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*. 9(5-8):125-34. Review.

Persson PG, Ahlbom A, Hellers G (1990) Inflammatory bowel disease and tobacco smoke- a case-control study. *Gut* 31(12):1377–1381.

Platt AM, Mowat AM. (2008) Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett.* 119(1-2):22-31. Review.

Ponder A, Long MD. (2013) A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol.* 5:237-47

Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell M, Feyerabend C, Thomas G, Sawe U. (1994) Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 330:811–815.

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. (2009) Principles and clinical implication of the brain-gut-enteic microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 6(5):306-14.

Rodrigues DM, Li AY, Nair DG, Blennerhassett MG. (2011) Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 23(2):e44-56.

Rogler G. (2014): Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 345(2):235-41 Review.

Rumessen JJ, Vanderwinden JM, Horn T. (2011) Crohn's disease: ultrastructure of interstitial cells in colonic myenteric plexus. *Cell Tissue Res.* 344(3):471-9.

Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VB, Fonseca MT, Bonfá G, Nardini V, Cardoso CR. (2014) Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res.* <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20143774>.

Sandborn WJ, Tremaine W, Offord KP, Lawson GM, Petersen BT, Batts KP, Croghan IT, Dale LC, Schroeder DR, Hurt RD. (1997) Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis, a randomised, doubleblind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 126:364–371.

Scaldaferri F, Gerardi V, Lopetuso LR, Del Zompo F, Mangiola F, Boškoski I, Bruno G, Petito V, Laterza L, Cammarota G, Gaetani E, Sgambato A, Gasbarrini A. (2013) Gut microbial flora, prebiotic and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res Int.* 2013:435268.

Schoultz L, Verma D, Halfvarsson J, Törkvist L, Fredrikson M, Sjöqvist U, Lördal M, Tysk C, Lerm M, Söderkvist P, Söderholm JD. (2009) Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men. *Am J Gastroenterol.* 104(5):1180-8.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hämling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A. (1999) Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet.* 6:353(9151):459-61.

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(6):G1469-73.

Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J. (2004) Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem.* 89(2):337-43.

Sine SM, Huang S, Li SX, DaCosta CJ, Chen L. (2013) Inter-residue coupling contributes to high-affinity subtype-selective binding of α -bungarotoxin to nicotinic receptors. *Biochem J.* 454(2):311-21.

Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJ, Sewell GW, Palmer CD, Wilde J, Foxwell BM, Gloger IS, Sweeting T, Marsh M, Walker AP, Bloom SL, Segal AW. (2009) Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med.* 206(9):1883-97

Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. (2011) Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol.* 4(1):31-42. Review.

Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, Wesołowska E, Wierzbicka P, Wlazłowski M, Wójcikowska M, Zatorski H, Zwolińska M, Fichna J. (2014) Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep.* 66(5):766-75.

Speight RA, Mansfield JC. (2013) Drug advances in inflammatory bowel disease. *Clin Med.* 13(4):378-82.

Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ, Egan LJ. (2005) Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther.* 312(2):537-45.

Thomas GA, Rhodes J, Ingram JR. (2005) Mechanisms of disease: nicotine- a review of its context of gastrointestinal disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2(11):536-44.

Thomas S, Baumgart DC. (2012) Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology.* 20(1):1-18.

Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Göke B, Folwaczny C, Müller-Myhsok B, Brand S. (2009) Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 104(7):1723-33.

Tracey KJ. (2007) Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 117(2):289-96. Review.

Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. (2013) GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J Neurosci.*33(41):16372-82.

Van der Heide F, Dijkstra A, Albersnagel FA, Kleibeuker JH, Dijkstra G. (2010) Active and passive smoking behaviour and cessation plans of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Crohns Colitis.* 4(2):125-31.

Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. (2006) Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci.* 126–127:264 – 272. Review.

Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, Macchi V, D'Inca R, Scarpa M, Palù G, Sturniolo GC, Morelli L, Castagliuolo I. (2008) Lactobacillus crispatus M247-derived H2O2 acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 135(4):1216-27.

Von Boyen GB, Schulte N, Pflüger C, Spaniol U, Hartmann C, Steinkamp M. (2011) Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 11:3.

Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 421(6921):384-8.

Wang W, Wang X, Chun J, Vilaysane A, Clark S, French G, Bracey NA, Trpkov K, Bonni S, Duff HJ, Beck PL, Muruve DA. (2013) Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- β signaling in kidney epithelium. *J Immunol.* 190(3):1239-49.

Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M. (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol.* 13(8):753-60.

Wouters MM, Boeckxstaens GE. (2011) Neuroimmune mechanisms in functional bowel disorders. *Neth J Med.*69(2):55-61. Review.

Wu H, Li L, Su X. (2014) Vagus nerve through $\alpha 7$ nAChR modulates lung infection and inflammation: models, cells, and signals. *Biomed Res Int.* 2014:283525.

Zenlea T, Peppercorn MA. (2014) Immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 20(12):3146-52.

Zhang Y, Bitner D, Pontes Filho AA, Li F, Liu S, Wang H, Yang F, Adhikari S, Gordon J, Srinivasan S, Hu W. (2014) Expression and function of NIK- and IKK2-binding protein (NIBP) in mouse enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 26(1):77-97.

Zheng B, Morgan ME, Van de Kant HJ, Garssen J, Folkerts G, Kraneveld AD. (2013) Transcriptional modulation of pattern recognition receptors in acute colitis in mice. *Biochim Biophys Acta.* 1832(12):2162-72.

Zoheir N, Lappin DF, Nile CJ. (2012) Acetylcholine and the alpha 7 nicotinic receptor: a potential therapeutic target for the treatment of periodontal disease? *Inflamm Res.* 61(9):915-26.

Zouridakis M, Giastas P, Zarkadas E, Chroni-Tzartou D, Bregestovski P, Tzartos SJ. (2014) Crystal structures of free and antagonist-bound states of human $\alpha 9$ nicotinic receptor extracellular domain. *Nat Struct Mol Biol.* 21(11):976-80.

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare con sincera gratitudine tutte le persone che hanno contribuito a questa tesi in un modo o nell'altro.

Ringrazio il Prof. Giacomo Carlo Sturniolo e l'Associazione Roberto Farini per avermi dato la possibilità di svolgere il mio lavoro di dottorato.

Ringrazio il Prof. Giorgio Palù, per avermi dato l'opportunità di svolgere questo lavoro di tesi presso i laboratori del dipartimento di Medicina Molecolare.

Un sincero grazie al Prof. Ignazio Castagliuolo per il suo costante supporto, la disponibilità e l'aiuto.

Grazie alla Dott.ssa Francesca Galeazzi e alla specializzanda Giulia Girardin per la collaborazione a questo progetto e per l'aiuto offertomi nello studio sui pazienti.

Grazie a Paola, Melania, Alessia, Matteo, Giulia e Vera per i loro preziosi consigli nel lavoro di laboratorio.

Un sincero ringraziamento alla mia famiglia per la sua costante e premurosa presenza.