



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE, INDIRIZZO IN
MORFOLOGIA E MORFOGENESI UMANA

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Dello Sbarba Persio

- STUDI MORFOLOGICI IN ORGANI VISCERALI DI UOMO E
DI ANIMALE DA ESPERIMENTO:***
- 1. ESPRESSIONE DI DUE SOTTOTIPI DI RECETTORI DELLE
DEGENERINE NELLA VESCICA NEUROLOGICA.***
 - 2. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON OTILONIO
BROMURO NEL COLON DI RATTO.***

Settore Scientifico Disciplinare BIO/17

Dottoranda

Dott.ssa Mazzaferro Katia

Tutore

Prof.ssa Vannucchi Maria Giuliana

Coordinatore

Prof. Dello Sbarba Persio

Anni 2012/2014

INDICE

1. *Espressione di due sottotipi di recettori delle Degenerine nella vescica neurologica*

Introduzione

1.1	Morfologia della vescica umana	1
1.2	Innervazione del tratto urinario e riflesso della minzione	3
1.3	Lesioni midollari e iperattività neurogenica del detrusore	10
1.4	Terapie farmacologiche per il trattamento di NDO	12
1.5	La famiglia delle Degenerine	14
	Scopo	20
	Materiali e Metodi	21
	Risultati	28
	Conclusioni	34

2. *Effetti del trattamento cronico con otilonio bromuro nel colon di ratto*

Introduzione

2.1	Sindrome del colon irritabile	38
2.2	Morfologia del colon	39
2.3	Otilonio Bromuro	42
	Scopo	48
	Materiali e metodi	49
	Risultati	57
	Conclusioni	67
	Bibliografia	73

1 Espressione di due sottotipi di recettori delle Degenerine nella vescica neurologica

INTRODUZIONE

1.1. Morfologia della vescica umana

La vescica è un organo cavo che svolge la funzione di raccolta dell'urina; riceve lo sbocco degli ureteri ed è in comunicazione con l'esterno per mezzo dell'uretra. Nella vescica piena si distingue un corpo, un fondo ed un apice. Sul fondo della vescica si trovano, uno per lato, gli sbocchi degli ureteri; la zona compresa tra questi e l'orifizio dell'uretra è denominata trigono vescicale. Il volume vescicale è estremamente variabile: la capacità massima in un individuo sano è compresa tra 400cc e 600cc.

La parete vescicale, partendo dalla superficie interna verso quella esterna, è composta da una tonaca mucosa, una tonaca sottomucosa, una tonaca muscolare e una tonaca fibrosa (Fig. 1).

La tonaca mucosa è formata da un epitelio di transizione e una lamina propria. Nell'epitelio di transizione, detto urotelio, si riconoscono, partendo dal lume vescicale, cellule a ombrello, cellule a clava e cellule basali. L'urotelio è impermeabile alle sostanze disciolte nell'urina; ma non è solo una barriera passiva della superficie luminale. Infatti, l'urotelio possiede anche proprietà sensoriali e di segnalazione che permettono alle cellule di rispondere alle variazioni del loro ambiente chimico e fisico e

di inviare segnali alle terminazioni nervose presenti nella parete vescicale (1). Ad esempio, durante il riempimento e lo svuotamento della vescica, l'urotelio è in grado di rispondere ad una vasta gamma di stimoli fisici, tra cui cambiamenti nella pressione, estensione geometrica, tensione (della parete o dell'urotelio) e stimoli chimici: variazioni nella composizione dell'urina e tonicità. (2).

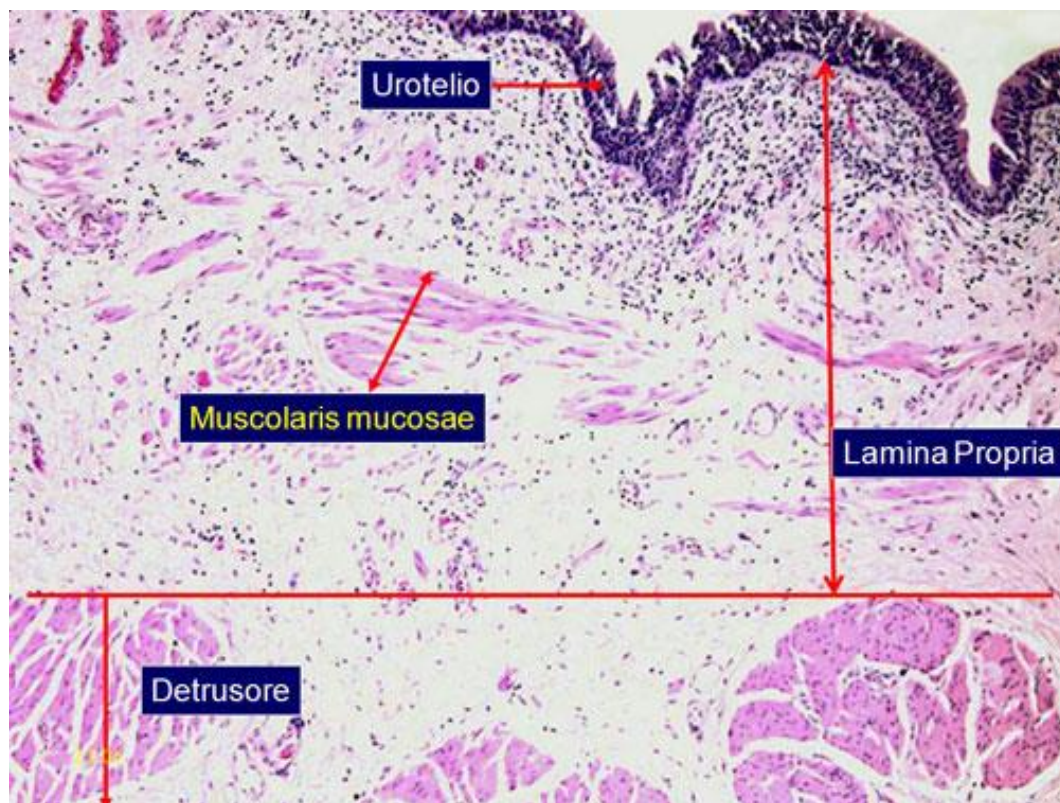


Fig.1 Particolare della parete. Dall'alto verso il basso si distinguono gli strati che la compongono: tonaca mucosa, tonaca sottomucosa e tonaca muscolare.

Colorazione H&E.

La tonaca sottomucosa è composta da un connettivo ricco di cellule, fibre collagene, terminazioni nervose e vasi sanguigni. Nella tonaca muscolare si distinguono tre strati di cellule muscolari lisce: uno strato esterno longitudinale, uno medio

circolare ed uno più interno a fasci intrecciati (plessiforme). La muscolatura della vescica forma un sistema unico definito muscolo detrusore. Alla base della vescica, nel suo interno, si riconosce una struttura chiamata trigono vescicale. Si tratta di un triangolo equilatero compreso tra gli sbocchi dell'uretere e lo sbocco dell'uretra ed è caratterizzato da un maggiore spessore della parete vescicale. In corrispondenza del trigono la mucosa si mantiene liscia o quasi anche a vescica vuota. Nella parte pelvica dell'uretra si trova uno strato di cellule muscolari lisce circolari che formano lo sfintere liscio dell'uretra; all'esterno di esso si trovano fibre muscolari striate che formano lo sfintere striato dell'uretra. La coordinazione tra il rilassamento degli sfinteri e dei muscoli del pavimento pelvico e la contrazione del detrusore consente la minzione. Alla nascita, la vescica si riempie e si svuota spontaneamente senza controllo volontario. La sua capacità è piccola e non c'è coordinazione tra il detrusore e i muscoli degli sfinteri. Imparare a esercitare il controllo volontario sullo svuotamento della vescica è l'obiettivo del toilette training. I neonati spesso mostrano modelli di flusso urinario discontinui e la normalizzazione del flusso si verifica dopo il primo anno di età. A 2 anni, il coordinamento tra la vescica e il muscolo sfintere durante la minzione migliora (3).

1.2 Innervazione del tratto urinario e riflesso della minzione

Le funzioni del tratto urinario, cioè immagazzinare e rilasciare periodicamente l'urina, dipendono da circuiti neuronali situati nel cervello, midollo spinale e gangli periferici (1).

Le vie urinarie

Le vie urinarie fanno seguito al rene e rappresentano le vie escrettrici attraverso le quali l'urina viene eliminata all'esterno. Il sistema delle vie urinarie è costituito da una parte iniziale in rapporto con il rene, calici renali e pelvi renale, i quali costituiscono il complesso calico-pielico; alla pelvi renale segue l'uretere, attraverso il quale l'urina arriva alla vescica; l'uretra infine è il tramite fra la vescica e l'esterno. Tutti i segmenti delle vie urinarie presentano l'organizzazione a tonache sovrapposte tipica della parete degli organi cavi: tonaca mucosa, tonaca sottomucosa, tonaca muscolare e tonaca avventizia. La tonaca mucosa ha le stesse caratteristiche strutturali nell'intero decorso delle vie urinarie essendo formata da un epitelio di rivestimento e una lamina propria. L'epitelio di rivestimento è un epitelio di transizione, dotato di notevole plasticità, così da adattarsi al variabile grado di distensione della parete degli organi che tappezza.

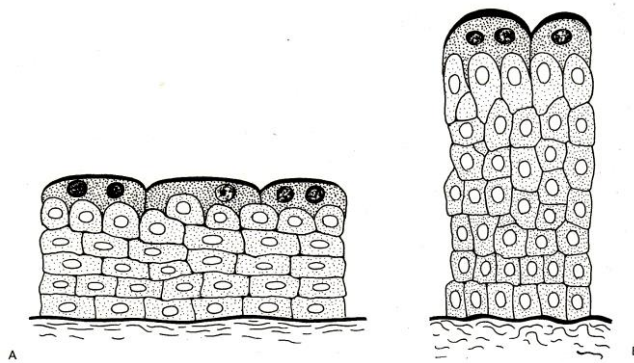


Fig 1

Rappresentazione schematica dell'epitelio di transizione in condizione di distensione (A) e di contrazione (B) della parete.

L'epitelio di transizione è pluristratificato; vi si distingue una fila di cellule basali, un numero variabile di strati intermedi di cellule a clava ed infine uno strato superficiale di cellule a ombrello. Le cellule basali sono piuttosto piccole, ovali e si modificano poco con la distensione della parete.

Il nucleo, che occupa una posizione centrale, presenta la cromatina assai addensata mentre il citoplasma è moderatamente basofilo. Al microscopio elettronico le cellule basali presentano, nel loro citoplasma, un corredo assai ricco di ribosomi e cisterne del reticolo granulare; sono invece relativamente scarsi i tonofilamenti. Le cellule a clava si dispongono a formare uno strato intermedio nel quale i nuclei si trovano a altezza variabile; si tratta di elementi piriformi la cui estremità arrotondata volge superficialmente, mentre quella assottigliata è diretta profondamente, impegnandosi tra le cellule vicine per giungere fino allo strato basale.

I caratteri di plasticità dell'epitelio di transizione dipendono principalmente dalle cellule clavate (Fig. 1) le quali possono modificarsi nella forma e nell'assetto, secondo il grado di distensione dell'epitelio stesso. All'esame ultrastrutturale il citoplasma delle cellule clavate presenta tonofilamenti riuniti in fascetti ed addensati particolarmente alla periferia, gocce lipidiche, corpi densi e granuli di glicogeno.

I rapporti intercellulari si attuano mediante giunzioni piane o interdigitate e desmosomi. Le cellule a ombrello sono disposte superficialmente in una sola fila ed hanno una forma appiattita o globosa, secondo il grado di distensione dell'epitelio. Il loro polo superficiale ha un contorno a cupola mentre il polo profondo presenta fossette o nicchie nelle quali si adattano le estremità superficiali arrotondate delle cellule a clava. Le cellule a ombrello sono frequentemente binucleate, appaiono talvolta in mitosi e, in una certa percentuale, possiedono un corredo poliploide. In corrispondenza della superficie libera, le cellule a ombrello mostrano un ispessimento cuticolare, moderatamente PAS-positivo, che corrisponde ad un particolare assetto del plasmalemma superficiale al quale si sovrappone uno strato glicoproteico che contiene principalmente sialoproteine. Dalle osservazioni ultrastrutturali risulta che il plasmalemma superficiale si presenta ispessito e si invagina ripetutamente nel sottostante citoplasma (Fig. 2) a formare vacuoli i quali, con la distensione dell'epitelio, potrebbero aprirsi consentendo in tal modo un ampliamento della superficie cellulare. Al di sotto del plasmalemma superficiale si trovano addensamenti fibrillari; nel restante citoplasma si trovano fascetti di tonofilamenti, accumuli di glicogeno e numerosi lisosomi, in una matrice ialoplasmatica provvista di discreta opacità elettronica.

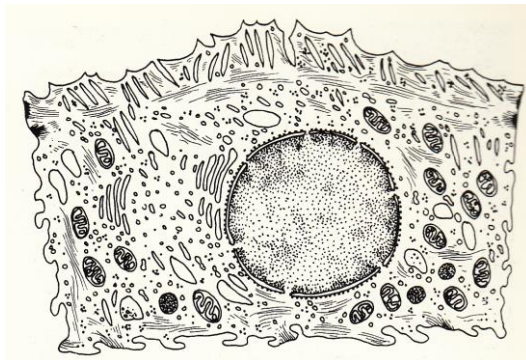


Fig. 2 Rappresentazione schematica dell'ultrastruttura di una cellula a ombrello

Le giunzioni tra le cellule a ombrello sono numerose; fra i plasmalemmi laterali di cellule contigue si reperiscono infatti, dalla superficie in profondità, una zona occludente, un a zona aderente ed un desmosoma. A questo dispositivo giunzionale spetta il compito di impedire il transito intercellulare di liquidi dal sangue verso l'urina che è fortemente ipertonica rispetto al sangue stesso. Inoltre, lo strato glicoproteico che si trova alla superficie delle cellule a ombrello può svolgere una funzione impermeabilizzante, impedendo il passaggio per via diacellulare. L'epitelio di transizione, che presenta altezza variabile nei diversi tratti delle vie urinarie, contrae stretti rapporti con la tonaca propria. Sottili fascetti collageni di quest'ultima, accompagnati da capillari, possono infatti insinuarsi in pieghe dell'epitelio, stabilendo una linea di contatto molto irregolare fra l'epitelio ed il connettivo.

Queste funzioni dipendono dall'attività di due unità funzionali del tratto urinario inferiore: un serbatoio (la vescica) e uno sbocco (collo della vescica, uretra e muscoli striati dello sfintere uretrale esterno). Queste strutture sono regolate a turno da tre set di nervi periferici (Fig.2): nervi parasimpatici sacrali (nervi pelvici), nervi simpatici toracolombari (nervo ipogastrico) e nervi somatici (nervo pudendo) (4).

Il sistema parasimpatico fornisce il maggior input eccitatorio alla vescica. Neuroni pregangliari colinergici, situati nella regione intermedio-laterale del midollo spinale sacrale, inviano assoni attraverso i nervi pelvici alle cellule gangliari nel plesso pelvico e nella parete della vescica. Le cellule gangliari a loro volta eccitano il muscolo detrusore attraverso il rilascio di trasmettitori non-adrenergici, colinergici e non-colinergici e inibiscono la muscolatura liscia uretrale attraverso il rilascio di ossido nitrico (5).

Le vie simpatiche del tratto urinario inferiore originano dai gangli simpatici lombosacrali e dai gangli mesenterici prevertebrali inferiori. Le fibre che partono dai gangli sacrali passano alla vescica per la via dei nervi pelvici, mentre quelle dei gangli mesenterici inferiori e rostrali lombari viaggiano nel nervo ipogastrico. Le vie efferenti nel nervo ipogastrico e nei nervi pelvici svolgono funzioni simili, cioè 1) inibiscono il muscolo detrusore, 2) eccitano la base della vescica e l'uretra e 3) inibiscono e facilitano i gangli del parasimpatico.

L'innervazione efferente della muscolatura striata uretrale proviene dalle cellule situate in una regione circoscritta del corno

ventrale che viene definito nucleo di Onuf. I motoneuroni dello sfintere inviano i loro assoni al nervo pudendo ed eccitano i muscoli attraverso il rilascio di acetilcolina, che stimola i recettori nicotinici postgiunzionali (1).

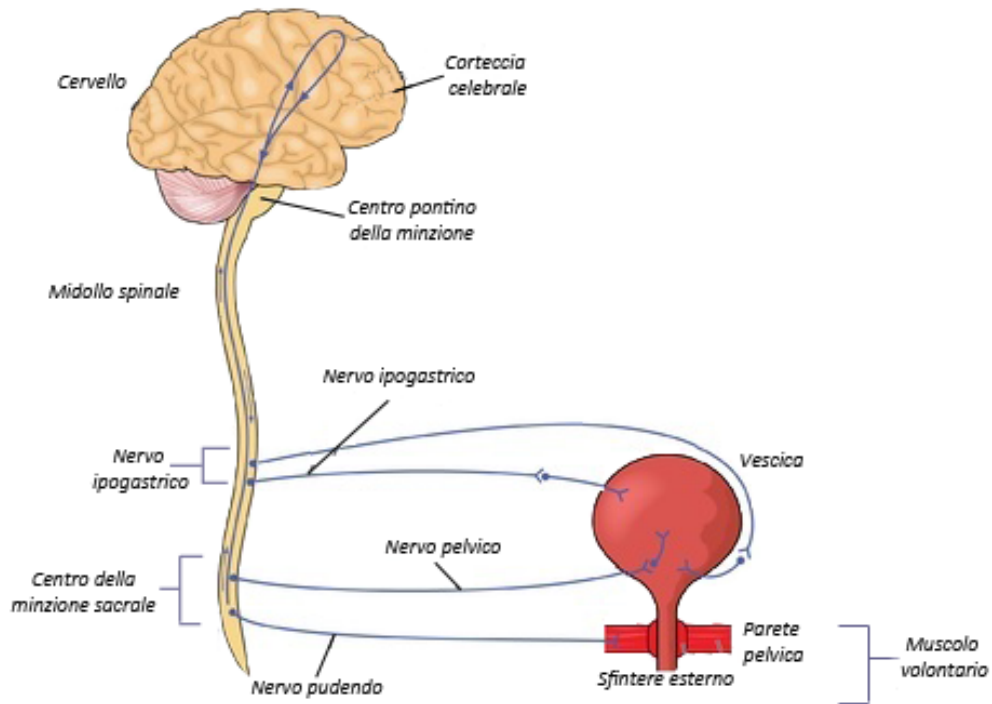


Fig. 2 Rappresentazione schematica dell'innervazione della vescica

Assoni afferenti che innervano il tratto urinario sono presenti nei tre set di nervi.

Esistono due importanti categorie di fibre afferenti: le fibre A δ (mieliniche) e le fibre C (amieliniche). Le fibre A δ sono distribuite principalmente all'interno del muscolo detrusore e sono sensibili al suo stiramento che si verifica durante la fase di riempimento, le fibre C sembrano essere più diffuse e sono distribuite nel detrusore, all'interno della lamina propria e in stretta vicinanza all'urotelio. Ci sono almeno due sottoclassi di

fibre C afferenti della vescica, cioè le fibre peptidergiche e quelle che non contengono peptidi (6).

Nel cervello, molte popolazioni neuronali sono coinvolte nel controllo della vescica, dell'uretra e dello sfintere uretrale. Alcune, come i neuroni serotoninergici dei nuclei del Rafe e i neuroni noradrenergici del Locus Coeruleus, sono meccanismi non specifici che diffondono proiezioni nel midollo. Altre sono specifiche per la minzione; queste includono i neuroni del nucleo di Barrington (chiamato anche centro pontino della minzione PMC) e quelli della sostanza grigia periacqueduttale PAG, gruppi di cellule dell'ipotalamo caudale e preottico e diversi neuroni della corteccia cerebrale, in particolare la corteccia frontale mediale. Ci sono interconnessioni tra queste aree cerebrali e tra l'encefalo e il midollo spinale lombosacrale. Gli interneuroni del midollo spinale proiettano al PAG e (nei ratti) al PMC. I neuroni del PMC ricevono input da PAG e dall'ipotalamo. Il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo proietta non specificamente a tutti i motoneuroni pregangliari del midollo spinale.

I percorsi neuronali che controllano le funzioni del tratto urinario inferiore sono organizzati come semplici circuiti del tipo "on-off". I riflessi di stoccaggio sono attivati durante il riempimento della vescica e sono controllati principalmente dal midollo spinale, mentre la minzione è mediata da meccanismi riflessi che vengono organizzati nell'encefalo (7).

Sebbene il sistema simpatico del tratto urinario inferiore non sia essenziale per la minzione, esso contribuisce alla funzione di stoccaggio della vescica. L'attività riflessa simpatica è data da un

intersegmento lombosacrale del riflesso spinale che viene attivato dalla via afferente dei nervi pelvici. Questo riflesso è inibito quando la pressione vescicale raggiunge la soglia che produce la minzione; rappresenta un meccanismo a feedback negativo che permette alla vescica di accogliere grandi quantità di urina durante il riempimento, ma viene spento durante la minzione per consentirne il completo svuotamento (1).

I motoneuroni che innervano i muscoli striati dello sfintere uretrale vengono attivati durante la fase di riempimento della vescica. Questa attività è mediata in parte da un riflesso spinale attivato da input afferenti dalla vescica. La contrazione dei muscoli striati dello sfintere uretrale si trasmette ad assoni afferenti del nervo pudendo, che a loro volta attivano interneuroni inibitori del midollo spinale che sopprimono l'attività del riflesso vescicale inibendo i neuroni parasimpatici pregangliari e gli interneuroni del riflesso della minzione. Questo riflesso rappresenta un secondo feedback negativo presente nel midollo spinale che promuove la continenza urinaria. Durante la minzione l'attività dei motoneuroni e il feedback negativo sono inibiti (5).

Il riflesso della minzione è mediato da una via spinobulbospinale che passa attraverso il PMC nel tronco encefalico rostrale (Fig. 3). L'attivazione del PMC attiva vie discendenti che provocano il rilassamento uretrale e, alcuni secondi dopo, l'attivazione della via parasimpatica sacrale. Ciò provoca la contrazione della vescica e un aumento della pressione intravescicale e il flusso di urina. Il rilassamento della muscolatura liscia uretrale è mediato dall'attivazione della via parasimpatica dell'uretra, che innesca il

rilascio di NO, e dalla rimozione di input eccitatori adrenergici e colinergici somatici. Inoltre i riflessi indotti dal flusso di urina attraverso l'uretra facilitano lo svuotamento della vescica (1).

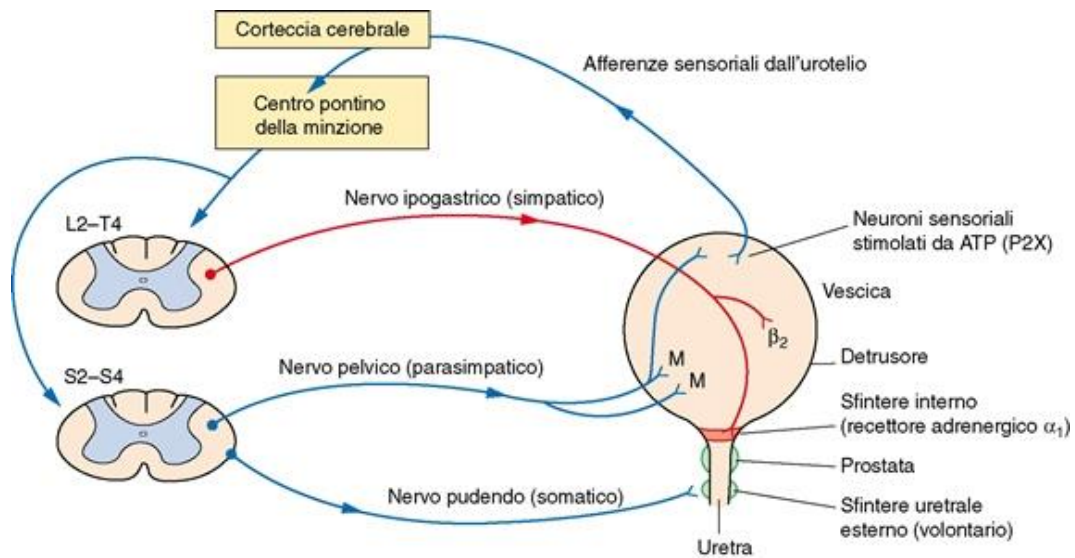


Fig. 3 Schema dei circuiti neurali che controllano la continenza e la minzione. Durante lo stoccaggio dell'urina, la distensione della vescica provoca bassi livelli di firing afferente. Questo a sua volta stimola la via simpatica attraverso il nervo ipogastrico, che raggiunge la base della vescica e l'uretra, e il nervo pudendo, che raggiunge lo sfintere uretrale esterno. Queste risposte avvengono per vie spinali riflesse e rappresentano riflessi di guardia, che promuovono la continenza. Il firing simpatico inibisce anche la contrazione del muscolo detrusore. Durante l'eliminazione dell'urina, l'intenso firing afferente del nervo pelvico attiva una via riflessa spinobulbospinale che passa attraverso il PMC. Questo stimola la via parasimpatica e inibisce la via simpatica e somatica. I crescenti input afferenti dal midollo spinale passano al PAG prima di raggiungere PMC.

1.3 Lesioni midollari e iperattività neurogenica del detrusore

Le lesioni del midollo spinale (SCL, Spinal Cord Lesion) rappresentano un grave problema di salute pubblica in tutto il mondo a causa dell'aumento dei casi di violenza urbani, come

incidenti stradali e aggressioni con armi da fuoco. Tuttavia, SCL possono essere causate da altre condizioni, quali tumori, malattie batteriche e virali che influenzano le vie nervose afferenti ed efferenti che collegano il cervello con le zone periferiche (8). Le persone con SCL hanno limitazioni che portano a grandi cambiamenti nella loro vita quotidiana. Questo si verifica a causa della parziale o totale perdita della funzione motoria e della sensibilità, e anche a causa di insufficienza vasomotoria, respiratoria, intestinale, vescicale e sessuale in seguito alla lesione (9). Pertanto, i pazienti SCL acquisiscono malsane abitudini aumentando così maggiormente il rischio di ulteriori patologie(10).

Lesioni del midollo spinale a livello lombosacrale eliminano il controllo volontario della minzione e il controllo sovraspinale

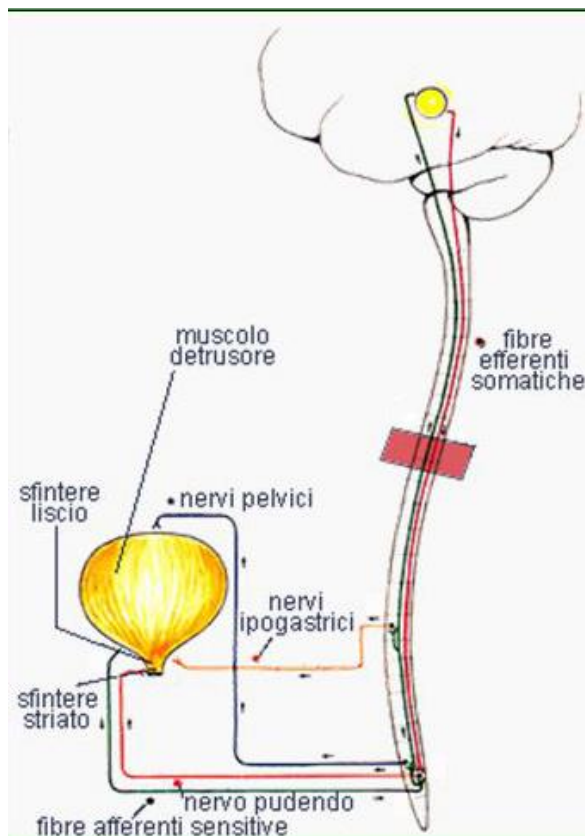


Fig. 4 Una lesione a livello della sede toracolombare fa perdere il controllo volontario della minzione. La via ascendente nella sua risalita verso l'encefalo, raggiunge la lesione e il messaggio si blocca. Non è più possibile avvertire il bisogno di urinare. Anche le fibre efferenti che possono partire dall'encefalo sotto controllo volontario, raggiunta la lesione subiscono un arresto. La componente motoria del nervo pudendo non può più essere sollecitata dalla via discendente; si perde il controllo volontario della minzione.

nella fase di svuotamento (Fig.4), che porta inizialmente ad una completa ritenzione urinaria seguita da un lento sviluppo di minzioni automatiche e iperattività vescicale mediata dalle vie riflesse spinali (11).

Questo porta a contrazioni involontarie della vescica durante la fase di riempimento e questa situazione viene indicata come iperattività neurogenica del detrusore (NDO, Neurogenic Detrusor Overactivity). I sintomi di NDO comprendono urgenza, frequenza urinaria e incontinenza, che possono portare a infezioni del tratto urinario, se gestiti in modo inadeguato (12). Inoltre, l'incontinenza urinaria derivante da NDO si è dimostrata avere un significativo impatto negativo sulla sessualità, causando imbarazzo e diminuendo la qualità della vita del paziente (13).

1.4 Terapie farmacologiche per il trattamento di NDO

Sono state sviluppate diverse strategie per trattare NDO (14). I farmaci antimuscarinici rappresentano il primo trattamento farmacologico per l'incontinenza urinaria da NDO (15). Una funzione importante degli anticolinergici è quello di sopprimere le contrazioni involontarie del detrusore. Dal punto di vista del paziente, questa aiuta a prevenire la frequenza urinaria, l'urgenza e l'incontinenza urinaria. Nonostante la loro efficacia, un grave inconveniente di questi farmaci sono i loro effetti collaterali. Per esempio nei pazienti che assumono l'ossibutinina, si sviluppa secchezza della bocca in almeno il 50% dei pazienti, stipsi in almeno il 15%, sonnolenza in circa il 12% e problemi di visione in circa il 5%. La secchezza della bocca e la costipazione sono

problemi in quei pazienti che stanno cercando di limitare l'assunzione di liquidi a causa del programma di cateterismo intermittente o hanno problemi di costipazione a causa della loro disfunzione intestinale neurogena. Inoltre, i pazienti con NDO spesso hanno bisogno di dosi maggiori di farmaci rispetto ad esempio a soggetti affetti da iperattività detrusoriale idiopatica perché l'obiettivo non è solo quello di ridurre al minimo la frequenza e l'urgenza, ma anche di determinare la ritenzione urinaria al fine di prevenire l'incontinenza tra i cateterismi. Spesso sono necessari grandi dosi o combinazioni di diversi tipi di farmaci anticolinergici. Un altro problema con i farmaci anticolinergici è che devono essere assunti per lunghi periodi. Molti pazienti interrompono il trattamento probabilmente a causa dei costi elevati, della scarsa efficacia della terapia, degli effetti collaterali o perché i pazienti dimenticano di prendere i farmaci (13). Esistono altri tipi di interventi che possono essere eseguiti sui pazienti con NDO come, ad esempio, la cistoplastica di ampliamento, la diversione urinaria, la neurostimolazione con dispositivi come lo stimolatore spinale-sacrale (14). Queste opzioni non sono spesso accettate dai pazienti perché comportano un intervento chirurgico o l'uso di un dispositivo elettrico. Per queste ragioni la tossina botulinica di tipo A (BoNT-A) è emersa come alternativa efficace nei pazienti con NDO che non tollerano o hanno avuto scarsi risultati con i farmaci anticolinergici (13).

La BoNT è prodotta dal batterio anaerobio gram-positivo *Clostridium botulinum* (16). Esistono sette neurotossine,

contrassegnate da A a G, immunologicamente distinte e, ad oggi, solo BoNT-A e BoNT-B sono di uso clinico. Alcune BoNT-A sono in commercio e le più conosciute sono: la onabotulinumtoxin (Allergan, Westport, Irlanda), la abobotulinumtoxin (Ipsen Ltd., Berkshire, UK), e la incobotulinumtoxin (Merck Pharmaceuticals, Frankfurt am Main, Germania). Ci sono numerose somiglianze tra i prodotti, tuttavia, hanno dosaggi differenti e differente efficacia e profili di sicurezza.

La BoNT-A esercita effetti paralizzanti inibendo il rilascio di acetilcolina dal nervo motore nella giunzione neuromuscolare, inibendo la neurotrasmissione del sistema nervoso autonomo e somatico. Dopo iniezione di BoNT-A si ha un temporaneo rilassamento dei muscoli scheletrici e lisci (17). Gli effetti di BoNT-A sulle giunzioni neuromuscolari sono stati ampiamente descritti. BoNT-A favorisce l'inibizione del rilascio di acetilcolina, che si traduce nel rilassamento della muscolatura (18) e inibisce altri neurotrasmettitori, come ATP, neuropeptidi e la sostanza P (19). Il rapporto costi-benefici del trattamento con BoNT-A è risultato superiore rispetto ai farmaci anti-colinergici ed è stato inoltre dimostrato una significativa riduzione dell'uso di farmaci per le infezioni del tratto urinario (17).

1.5 *La famiglia delle Degenerine*

La famiglia dei Canali Epiteliali al Na⁺ (Epithelial Na⁺ Channel, ENaC) /Degenerine rappresenta una nuova classe di proteine scoperta agli inizi degli anni '90. I geni deg-1 e MEC-4 sono stati

i primi ad essere identificati con un'analisi genetica della via meccanosensoriale di *Caenorhabditis elegans*. Il nome Degenerina (DEG) viene dal fenotipo cellulare indotto da mutazione del gene *deg-1* e di altri geni che provocano la degenerazione selettiva dei neuroni sensoriali coinvolti nella sensibilità tattile. Al momento dell'identificazione del gene della famiglia delle DEG in *C. elegans*, il clonaggio funzionale in ovociti di *Xenopus laevis* ha permesso di isolare e sequenziare il cDNA codificante la subunità α di ENaC. Questo canale era già noto per svolgere un ruolo cruciale nell'assorbimento del Na^+ nella parte distale del tubulo convoluto renale ed essere l'obiettivo d'azione dell'aldosterone. ENaC e le Degenerine hanno una sostanziale omologia di sequenza. Altri membri, che formano una sottofamiglia, di questa famiglia di canali ionici emergente sono stati successivamente identificati e caratterizzati funzionalmente. Questi geni sono espressi principalmente nel sistema nervoso sia centrale che periferico e vengono chiamati degenerine dei mammiferi (Mammalian Degenerine, MDEG) o canali al Na^+ del cervello (Brain Na^+ Channel, BNaC). Dopo la scoperta della loro attivazione da parte di protoni extracellulari, questi canali sono stati chiamati Canali Sensibili all'Ambiente Acido (Acid-Sensing Ion Channel, ASIC). I geni di ENaC/DEG sono presenti solo negli animali con organi specializzati per la riproduzione e la digestione. I membri di questa famiglia mostrano un elevato grado di eterogeneità funzionale come dimostra la loro ampia distribuzione tissutale, che comprende epiteli, che svolgono funzioni di assorbimento e secrezione, come

anche tessuti neuronali eccitabili. A seconda della loro funzione nella cellula, questi canali sono o costitutivamente attivi o attivati da stimoli meccanici e/o ligandi, come protoni o peptidi (20).

Le proteine della famiglia DEG/ENaC condividono una struttura comune anche se solo alcune regioni della sequenza proteica mostrano similarità. I membri di questa famiglia hanno in comune le estremità N-terminale e C-terminale brevi e intracellulari, due domini transmembrana (M1 e M2) e un grande loop extracellulare con residui di cisteine altamente conservati. Questo loop è caratteristico di questa famiglia (21).

ENaC è un eteromultimero formato da tre subunità omologhe α , β e γ (22). Esiste una quarta subunità, δ ENaC strutturalmente simile ad α ENaC, ma il suo ruolo fisiologico non è ancora conosciuto (23). Il canale attivo richiede la coespressione delle tre subunità (22). Il rapporto stechiometrico tra queste subunità non è stato ancora definito, sono necessarie dalle 4 alle 9 subunità per formare il canale attivo. Secondo Stewart et al (24) le tre subunità si associano a formare omotrimeri o eterotrimeri, ciascun trimero interagisce a formare dimeri o trimeri di trimeri. I canali sono voltaggio-indipendenti con una permeabilità maggiore al Na^+ rispetto a Ca^{2+} e K^+ (21). Ligandi e stimoli fisici attivano o modulano l'azione del canale, questi includono peptidi, piccoli aumenti della concentrazione extracellulare di protoni, composti sulfidrilici, piccole poliammine e stimoli meccanici. Questi canali partecipano a diverse funzioni fisiologiche, in qualità di recettori ionotropici per diversi stimoli extracellulari. I canali ENaC sono localizzati sulle membrane apicali delle cellule epiteliali dove

giocano un ruolo importante nel regolare il gradiente di Na^+ attraverso le barriere epiteliali in diversi distretti (25), come la parte distale del nefrone, l'urotelio della vescica, le vie aeree polmonari, il colon distale, condotti salivari e ghiandole sudoripare. Nel rene, il Na^+ viene filtrato attraverso i canali ENaC presenti a livello della membrana apicale; lavorando in collaborazione con Na/K-ATPasi basolaterale, questo canale regola il riassorbimento dello ione e svolge un ruolo importante nel controllo della concentrazione totale di Na^+ nel corpo, nell'omeostasi dell'acqua e nel controllo della pressione sanguigna (26). Nella vescica urinaria dei mammiferi, i canali ENaC espressi sull'epitelio sembrano essere meccanosensibili (27). Nella vescica di coniglio, questi canali hanno la capacità di cambiare le loro proprietà di trasporto del Na^+ in seguito a variazioni della pressione idrostatica (28). Nel ratto, è stato osservato che i canali ENaC dell'epitelio della pelvi renale possono partecipare all'attivazione di neuroni afferenti meccanosensibili renali con l'aumento della pressione renale nella pelvi (27). Quindi, i canali nell'epitelio della vescica potrebbero essere coinvolti nella trasduzione meccanosensoriale delle vie afferenti (29). È noto che l'adenosin trifosfato (ATP), rilasciato dalle cellule epiteliali in risposta alla distensione, agisce sui recettori P2X3 situati nel plesso nervoso afferente subepiteliale (30). Sembra che i cambiamenti nel trasporto ionico attraverso la membrana plasmatica potrebbero controllare il rilascio di ATP (30). I canali ENaC sono dei buoni candidati per questo meccanismo di trasduzione (29).

I canali ASIC sono canali cationici voltaggio-indipendenti attivati dai protoni extracellulari (31). Queste proteine sono codificate da almeno 3 geni (Accn2, Accn1 e Accn3) e i loro trascritti alternativi (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b e ASIC3) producono subunità, che sono attivate da acidi o modulate da altre subunità ASIC; queste subunità si assemblano a formare complessi omomultimerici e eteromultimerici. Un altro gene che codifica ASIC4, viene espresso nei neuroni. I canali ASIC sono espressi nel sistema nervoso centrale e periferico (32). ASIC1a, ASIC2a e ASIC2b hanno una distribuzione diffusa nel cervello, con espressione massima nell'ippocampo, nel cervelletto, nella regione allocorticale, nel bulbo olfattivo e nei nuclei dell'amigdala basolaterali. In molte aree del cervello, queste subunità coesprimono con ASIC4. ASIC4 è maggiormente espresso nella ghiandola pituitaria (33). Nel sistema nervoso periferico, le subunità di ASIC sono localizzate nei neuroni che innervano la cute, il cuore, l'intestino, la vescica e il muscolo. La localizzazione cellulare è stata caratterizzata più accuratamente nelle fibre nervose. Le diverse subunità sono state rilevate nei neuroni dei gangli dorsali grandi, medi e piccoli, anche se la composizione in subunità varia tra i neuroni di diverse dimensioni (32). Questi canali sono stati proposti come sensori dell'acidosi extracellulare e contribuiscono alla nocicezione in condizioni patologiche diverse come infiammazione, ischemia, lesioni, fratture e stati postoperatori (34). I canali sono costitutivamente chiusi, ma sono attivati o desensitizzati in seguito ad acidosi extracellulare. Quindi, i canali si trovano in tre

stati diversi: uno stato di riposo non conduttivo (chiuso), stato in cui il canale può essere attivato; uno aperto conduttivo e uno stato non conduttivo desensitizzato nel quale i canali sono insensibili ai protoni (35). Nella vescica di topo è stato osservato che ASIC1 è la subunità maggiormente espressa nell' urotelio, mentre sia ASIC1 che ASIC2 sono espressi nel muscolo liscio. ASIC3 è meno espresso, ma è localizzato nella regione subepiteliale (36).

SCOPO

L'urotelio è il rivestimento della vescica urinaria; svolge principalmente la funzione di barriera, ritiene l'urina e previene la perdita di soluti e ioni. L'urotelio non è solo una barriera passiva; le sue cellule esprimono recettori per l'ATP e per alcuni neuropeptidi, e canali ionici che rispondono a diversi stimoli chimici e fisici e inviano segnali alle terminazioni nervose presenti nella parete vescicale, che a loro volta attivano le vie afferenti.

NDO è una delle più comuni disabilità riportata in pazienti con lesioni midollari. È caratterizzata da contrazioni involontarie del detrusore durante la fase di riempimento e i sintomi includono la frequenza urinaria, l'urgenza e l'incontinenza. Tenendo in considerazione l'importanza dell'urotelio nel riflesso della minzione, la possibilità che i cambiamenti nell'espressione dei recettori delle degenerine in questo tessuto possano partecipare alla fisiopatologia di NDO merita attenzione. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare i livelli di espressione di γ ENaC e ASIC1 nell'urotelio umano sano e in quello di pazienti con NDO.

MATERIALI E METODI

Pazienti e raccolta dei campioni

Campioni di vescica provenienti da 4 controlli e 12 pazienti con diagnosi di NDO da almeno 5 anni (Tabella 1) sono stati ottenuti da biopsie durante cistoscopia preceduta da valutazioni cliniche e urodinamiche. I pazienti NDO avevano ricevuto la terapia antimuscarinica e periodiche (media =8 mesi) iniezioni intradetrusorali di 300UI di BoNT/A. Tutte le indagini cliniche e biopsie sono state eseguite quando il trattamento con BoNT/A aveva esaurito la sua efficacia, immediatamente prima del successivo trattamento. Tutti i pazienti avevano fornito il consenso scritto e una commissione etica locale aveva approvato lo studio.

Studi morfologici

Con la cistoscopia non sono state osservate alterazioni macroscopiche. L'esame microscopico (Fig.5) della mucosa della vescica non ha mostrato alterazioni. Nessuna infezione urinaria è stata documentata. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide 4% in tampone fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline) 0.1M pH 7.4, per 4-6 ore a 4°C, crioprotetti in saccarosio 30% a 4°C overnight (ON), lavati in PBS, inclusi in mezzo per criostato killik (Bio-Optica, Milano) e congelati a -80°C. Successivamente, sezioni di 8µm di spessore sono state ottenute con un criostato (Leica CM, Leica Microsystem, Milano) e raccolte su vetrini portaoggetto polilisinati. Alcune sezioni sono state utilizzate per le indagini istologiche mediante colorazione Ematossilina-Eosina

Tabella 1 La tabella riporta i dati clinici dei pazienti.

<i>Soggetti</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>Patologia</i>	<i>Sito</i>	<i>Estensione</i>	<i>NDO</i>	<i>Trattamento</i>
Ctrl 1	63	Donna	-	-	-	-	-
Ctrl 2	73	Donna	-	-	-	-	-
Ctrl 3	78	Uomo	-	-	-	-	-
Ctrl 4	80	Uomo	-	-	-	-	-
Pz 1	44	Uomo	SCL	D6	Completa	Si	BoNT/A
Pz 2	27	Uomo	SCL	D4-D5	Completa	Si	BoNT/A
Pz 3	57	Uomo	SCL	D4-D5	Completa	Si	BoNT/A
Pz 4	40	Uomo	SCL	D4-D5	Completa	Si	BoNT/A
Pz 5	69	Uomo	SCL	D12	Incompleta	Si	BoNT/A
Pz 6	21	Uomo	SCL	C6	Completa	Si	BoNT/A
Pz 7	63	Donna	MS	Sovrapontino Sovrasacrale	EDSS 5	Si	BoNT/A
Pz 8	24	Uomo	SCL	D10-D12	Completa	Si	BoNT/A
Pz 9	53	Uomo	SCL	D2-D3	Completa	Si	BoNT/A
Pz 10	22	Uomo	SCL	C5-C6	Completa	Si	BoNT/A
Pz 11	46	Uomo	SCL	D5-D6	Completa	Si	BoNT/A
Pz 12	26	Uomo	SCL	D12	Completa	Si	BoNT/A



Fig.5 Colorazione Ematossilina-Eosina, urotelio umano. Non si osservano alterazioni della normale struttura della mucosa

(H&E). Le sezioni sono state immerse in Ematossilina per circa 2 minuti. L'eccesso di colorazione è stato eliminato ponendo i vetrini in acqua corrente per 10 minuti. A seguire sono stati fatti dei brevi passaggi in acqua bidistillata, alcool a 50% e 75% e successivamente i vetrini sono stati immersi in Eosina per 30 secondi. Le sezioni, infine, sono state disidratate, chiarificate e montate in resina sintetica. Altre sezioni sono state utilizzate per le indagini immunostochimiche.

Per le analisi di western blotting i campioni sono stati velocemente congelati e conservati a -80°C .

Immunostochimica (IHC) Le sezioni sono state pre-incubate in albumina di siero bovino (BSA, bovine serum albumin, Sigma Aldrich, Milano) 1.5% in PBS con 0.5% Triton X-100 per 20 minuti a temperatura ambiente (RT, room temperature), poi incubate con gli anticorpi primari diluiti in BSA 1.5%, Triton 0.5% in PBS a 4°C ON. Il giorno successivo, le sezioni sono state lavate 3x5 minuti in PBS e incubate per 2 ore RT in presenza degli anticorpi secondari diluiti in BSA 1.5%, Triton 0.5% in PBS. Alla fine dell'incubazione le sezioni sono state lavate e montate con montante acquoso (Fluoremount, Sigma-Aldrich). Gli anticorpi utilizzati sono riportati in Tabella 2. I prodotti di immunoreazione sono stati osservati con microscopio a fluorescenza Zeiss Axioskop (Mannheim, Germania). I controlli negativi sono stati eseguiti omettendo l'anticorpo primario.

Western blot (WB) I campioni di controllo (n=3) e di pazienti NDO (n=3) sono stati omogenati con un omogenizzatore di tessuti (Ing. Terzano, Milano) in buffer di lisi freddo composto da: 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 2 mM

Na₂EDTA, 1% triton X-100 addizionato con una compressa di 1X Sigmafast Protease Inibitor cocktail (Sigma Aldrich). In seguito i campioni sono stati centrifugati a 13000 g per 30 minuti a 4°C, è stato raccolto il surnatante ed è stato misurato il contenuto di proteine spettrofotometricamente usando il micro-BCA™ Protein Assay kit (Pierce IL, USA). I campioni, contenenti ciascuno 70 µg di proteine, e un appropriato marker di peso molecolare (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sono stati fatte correre su un gel elettroforetico SDS-PAGE (200V, 1 ora) utilizzando un gel denaturante 7.6% di poliaccrilammide e trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Amersham Biosciences, Cologno Monzese, Milano; 150 V, 1 ora). Dopo aver lavato con PBS contenete 0.1% Tween (T-PBS, Sigma Aldrich) le membrane sono state trattate con T-PBS contenente 5% di BSA (Sigma Aldrich) per 2 ore a RT e incubate ON a 4°C in agitazione con gli anticorpi primari. I prodotti di immunoreazione sono stati rilevati incubando le membrane gli anticorpi secondari coniugati con la perossidasi (Tabella 1) per 1 ora a RT. L'immunoreazione è stata evidenziata con reagente chemiluminescente ECL (Immuno-Star™ HRP Chemiluminescent Kit, Bio-Rad). Le membrane sono state strippate per 20 minuti a RT con Stripping Buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), incubate con anticorpo anti-gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) assunto come controllo interno delle proteine. Le bande immunoreattive sono state rilevate usando ImageQuant 350 Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Tabella 2 In tabella sono riportati gli anticorpi utilizzati in questo studio

Anticorpo primario	Ospite	Diluizione IHC-WB	Produttore
Anti-ASIC1 (H-70)	rabbit	1:250-1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas,USA
Anti- γ ENaC	goat	1:250-1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas,USA
Anti-GAPDH	rabbit	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas,USA
Anticorpo secondario	Ospite	Diluizione IHC	Produttore
Anti-rabbit	goat	1:333	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Anti-goat	donkey	1:333	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Anticorpo secondario	Ospite	Diluizione WB	Produttore
Anti-rabbit	goat	1:20 000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
Anti-goat	donkey	1:5 000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas,USA

Analisi statistiche La presenza di una correlazione tra i dati morfologici e i dati urodinamici è stata valutata mediante coefficiente di correlazione di Spearman (GraphPad Prism, Version 4.0 San Diego, CA, USA). Al microscopio a fluorescenza è stata eseguita un'analisi semiquantitativa della marcatura di γ ENaC e ASIC1 in doppio cieco. Sono state analizzate 5 sezioni e 10 diversi campi per sezione con obiettivo 40X per controllo (n=4) e per paziente (n=12). L'intensità di marcatura è stata espressa come segue: +--=bassa intensità, ++-=intensità media, +++=intensità alta. È stata fatta una media delle due valutazioni.

L'analisi quantitativa del WB è stata eseguita mediante densitometria, ciascuna banda corrispondente a un singolo campione (n=3 per ogni gruppo), utilizzando QuantityOne analysis software (Bio-Rad). La significatività statistica tra i gruppi sperimentali è stata valutata con il test one-way ANOVA seguito da Newman-Keuls multiple comparison post hoc test (Prism 3.0, GraphPad Software Inc., S diego, CA, USA); $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Risultati clinici e urodinamici

I dati clinici dei controlli e dei pazienti NDO sono riassunti nella Tabella 1. I dati urodinamici sono riassunti nella Tabella 3. In 11 pazienti la media dei volumi che scatenavano il riflesso della minzione (Reflex Volume) era 225ml (range:130-450 ml); la media della pressione detrusoriale massima era 36.9 cm H₂O (range:9-50); la media della capacità cistometrica massima era 375 ml (range:200-460). Un paziente (Pz3), nonostante i sintomi soggettivi riportati, ha mostrato risultati urodinamici simili ai controlli e, in effetti, non è stato ritrattato con BoNT/A.

Immunoistochimica

Immunoreattività di γ ENaC (γ ENaC-IR) (Fig. 6) Nei controlli (A) la marcatura era molto debole e rilevabile solo sulla porzione luminale delle cellule a ombrello. La marcatura è data da piccoli granuli sparsi nel citoplasma o distribuiti lungo la membrana plasmatica. Nei pazienti NDO (B), la marcatura era presente anche nelle cellule a clava più superficiali e in alcuni pazienti (C) appariva più intensa soprattutto nelle cellule a ombrello. Nel paziente con la diagnosi di sclerosi multipla (D), la marcatura era molto più intensa e distribuita nel citoplasma di tutti i tipi cellulari, in particolar modo nelle cellule a ombrello. Alcune fibre nervose γ ENaC-IR marcate sono visibili negli strati profondi dell'urotelio.

Tabella 3 in tabella sono riportati i parametri urodinamici. CC: capacità cistometrica; MPD: pressione detrusoriale massima; N/A: non applicabile.

<i>Soggetti</i>	<i>CC ml</i>	<i>Compliance ml/cm H₂O</i>	<i>Reflex Volume ml</i>	<i>MDP cm H₂O</i>	<i>Intensità ASICI</i>	<i>Intensità γENAC</i>
Ctrl 1	404	101	N/A	4	+++	+++
Ctrl 2	380	47,1	N/A	8	+++	+++
Ctrl 3	450	75	N/A	6	+++	+++
Ctrl 4	400	82	N/A	5	+++	+++
Pz 1	250	12	180	15	+++	+++
Pz 2	500	62,5	N/A	8	+++	+++
Pz 3	370	7,5	300	40	+++	+++
Pz 4	200	2,6	130	50	+++	+++
Pz 5	500	30	450	40	+++	+++
Pz 6	300	5	250	50	+++	+++
Pz 7	250	6,6	200	30	+++	+++
Pz 8	420	5,5	190	35	+++	+++
Pz 9	400	6,25	250	40	+++	+++
Pz 10	250	5	200	40	+++	+++
Pz 11	350	22,2	200	9	+++	+++
Pz 12	460	10	200	20	+++	+++

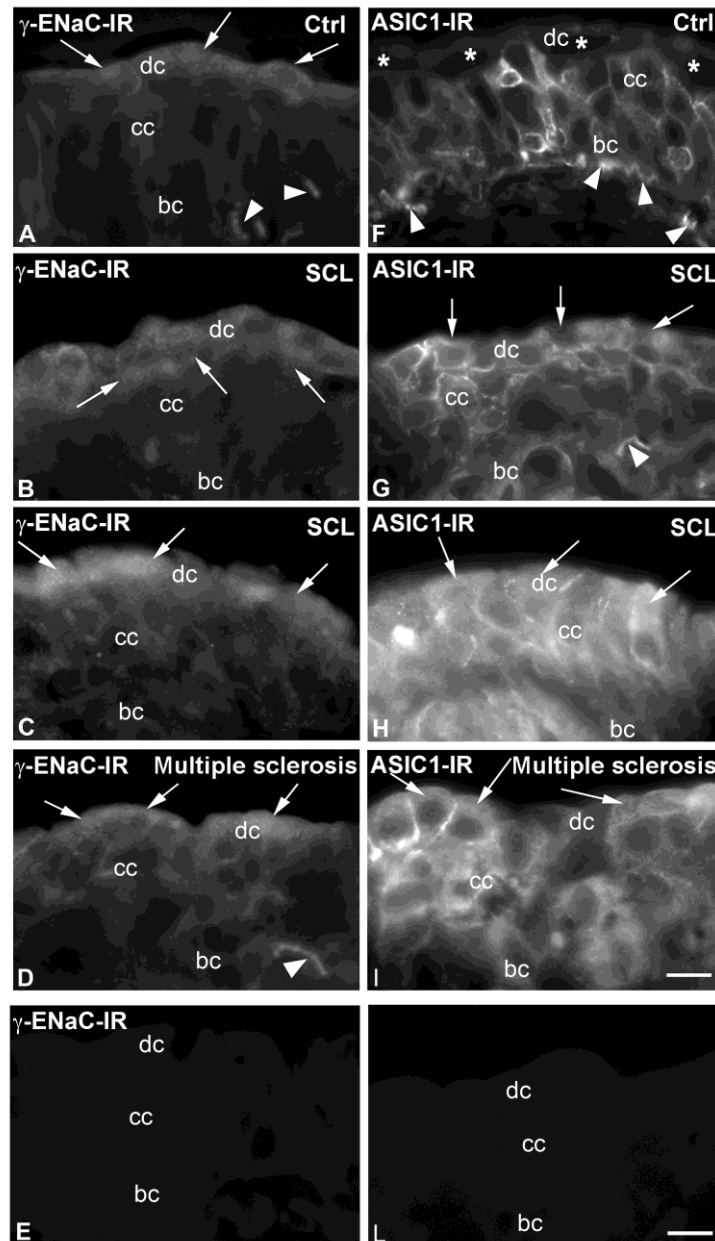


Fig. 6 γ ENaC-IR **A)** nei controlli la marcatura di γ ENaC era debole, limitata alle cellule a ombrello (freccie) con piccoli granuli concentrati maggiormente nella porzione luminale della cellula. **B)** Nei pazienti con NDO la marcatura era aumentata nelle cellule a ombrello (freccie) e si estendeva alle cellule a clava sottostanti. **C, D)** In alcuni pazienti la marcatura era più intensa, soprattutto nelle cellule a ombrello (freccie). **E)** Controllo negativo. **ASIC1-IR** **F)** Nei controlli la marcatura di ASIC1 risultava più intensa nelle cellule basali e nelle cellule a clava, mentre era appena apprezzabile nelle cellule a ombrello (asterischi). **G)** Nei pazienti con NDO la marcatura era più intensa rispetto al controllo ed estesa anche alle cellule a ombrello (freccie). **H, I)** In alcuni pazienti la marcatura risultava molto intensa (freccie). **E)** Controllo negativo. dc: cellule a ombrello; cc: cellule a clava; bc: cellule basali. Le teste di freccia indicano le fibre nervose γ ENaC e ASIC1 positive. Barra: 20 μ m

ASIC1-IR (Fig. 6) Nei controlli (F) la marcatura era presente in tutti i tipi cellulari. Le cellule a clava mostravano una maggiore intensità che appariva come un sottile anello lungo il citoplasma fatto di piccoli granuli brillanti o corte barre. Piccoli granuli erano dispersi nel citoplasma di queste cellule come in quelle basali. Nelle cellule a ombrello la marcatura era appena rilevabile e consisteva in piccoli granuli accumulati nella porzione luminale del citoplasma. Nei pazienti NDO(G), la marcatura aveva una distribuzione simile ai controlli, ma estesa anche alle cellule a ombrello, in alcuni pazienti (H) la marcatura appariva più intensa, soprattutto nelle cellule a ombrello, dove era distribuita sia lungo la membrana plasmatica sia nel citoplasma. Nel paziente con diagnosi di sclerosi multipla (I), la marcatura mostrava intensità e distribuzione simile agli altri pazienti. Alcune fibre nervose ASIC-IR erano riconoscibili sporadicamente negli strati più profondi dell'urotelio.

Western blotting

L'analisi Western blot, sia per i controlli sia per i pazienti, ha evidenziato due singole bande una a 54 kDa per ASIC1 e una a 82kDa corrispondente a γ ENaC (Fig. 7A); entrambi i pesi molecolari corrispondono a quelli trovati in letteratura.

La quantificazione dei risultati ottenuti, misurando la densità ottica per ogni banda/gruppo (3 campioni/ogni gruppo), ha mostrato cambiamenti non significativi tra controllo e pazienti NDO (Fig. 7B).

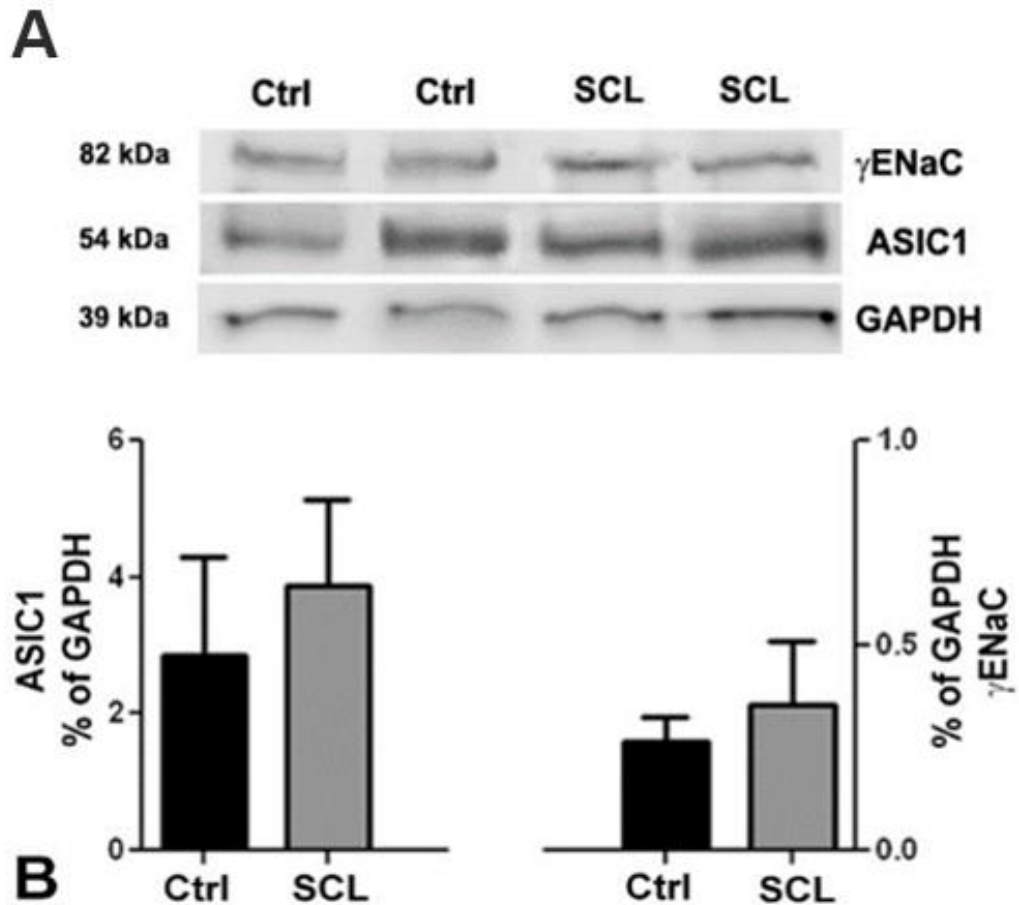


Fig. 7 A) L'analisi di Western blot ha confermato la specificità degli anticorpi. Sia nei controlli che nei pazienti, ASIC1 ha identificato una banda a 54kDa a γ ENaC una a 82 kDa. **B)** La quantificazione dei risultati, eseguita misurando la densità ottica di ogni banda/gruppo ed esprimendo il valore come percentuale della banda di GAPDH, non ha evidenziato cambiamenti significativi tra i controlli e i pazienti.

Espressione di γ ENaC e ASIC1 e dati urodinamici

Il coefficiente di correlazione di Spearman ha evidenziato una correlazione significativa tra l'alta intensità di espressione di γ ENaC nell'urotelio di pazienti NDO e i valori bassi della compliance vescicale ($r=0.75$, $p=0.01$). Al contrario, nessuna correlazione significativa è stata vista quando i cambiamenti di espressione di γ ENaC e ASIC1 erano correlati con gli altri parametri urodinamici.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano la presenza di γ ENaC e ASIC1 nell'urotelio umano sano e, per la prima volta, mostrano cambiamenti nella loro distribuzione cellulare in pazienti con iperattività del detrusore. L'analisi WB dimostra la specificità degli anticorpi.

La marcatura di γ ENaC nei controlli è debole e limitata alle cellule a ombrello dove appare come piccoli granuli citoplasmatici concentrati soprattutto nella parte luminale della cellula. Questo risultato è in accordo con i dati riportati in letteratura su animali da laboratorio. Nell'urotelio di ratto e nell'epitelio di altri organi, la marcatura di γ ENaC è localizzata nella porzione luminale del citoplasma, lungo la membrana apicale, o nel citoplasma subapicale corrispondente a una popolazione di vescicole intracellulari (27). In particolare, nell'epitelio dei dotti collettori del rene di ratto, l'immunoelettromicroscopia ha mostrato la presenza della subunità γ ENaC in queste vescicole (37). Al contrario, Araki et al (29) hanno trovato una marcatura solo per la subunità β nell'urotelio di vescica umana. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alla diversa procedura di preparazione dei campioni e/o diverso anticorpo utilizzato. Nei pazienti NDO la marcatura di γ ENaC aumenta nelle cellule a ombrello e la sua distribuzione è estesa anche alle cellule a clava immediatamente sottostanti. Inoltre, le variazioni nella marcatura di γ ENaC mostrano una correlazione significativa con la compliance vescicale registrata nei pazienti NDO, suggerendo una possibile relazione tra la iper-

espressione di questo canale e la disfunzione. Araki et al hanno registrato un aumento di espressione per tutte le subunità di ENaC nell'urotelio di vescica umana di soggetti affetti da iperattività detrusoriale (DO, detrusor overactivity) dovuta a ostruzione della vescica (29) e hanno interpretato questa sovra-espressione come la causa di DO. Questa possibilità potrebbe essere presa in considerazione anche i nostri risultati ottenuti in pazienti con NDO; tuttavia non è ancora chiaro quale sia il meccanismo implicato. Considerando il ruolo importante svolto da questo canale cationico nel riflesso della minzione, è probabile che la sua iper-espressione possa compromettere questo riflesso abbassando la soglia di stiramento, durante il riempimento (39). Questa ipotesi è in accordo con un ruolo di ENaC come meccanosensore nella vescica urinaria (28). È interessante notare che la sensibilità alla pressione idrostatica coinvolge soprattutto le cellule a ombrello (30), le cellule dove sono stati riportati cambiamenti più significativi nell'espressione di γ ENaC.

Nei controlli, l'espressione di ASIC1 mostra notevoli differenze nella distribuzione e intensità rispetto a γ ENaC, dal momento che la sua marcatura è presente e intensa nelle cellule basali e a clava e appena apprezzabile nelle cellule a ombrello. Studi su roditori (36) e uomo (31) hanno dimostrato che ASIC1 è l'isoforma predominante espressa nell'urotelio e l'espressione di ASIC1 nell'urotelio di vescica di topo è maggiore nei maschi rispetto alle femmine (36). È interessante notare che nei pazienti NDO l'espressione di ASIC1 è costantemente aumentata nelle cellule a ombrello e, in alcuni casi, la marcatura è più intensa rispetto agli

altri tipi cellulari. A differenza dei presenti dati, per altre malattie che colpiscono la sensibilità della vescica, come la sindrome del dolore vescicale (31) e il modello di ratto di cistite CYP-indotta (34), è stato riportato che l'espressione di ASIC1 nell'urotelio rimane invariata. Questa differenza nei risultati suggerisce che l'aumento dell'espressione di ASIC1 osservato in questo studio è caratteristico della disfunzione vescicale di origine neurogena. ASIC1 nell'epitelio della vescica potrebbe essere coinvolto nella trasduzione sensoriale mediando un aumento della soglia delle variazioni locali di pressione idrostatica e/o nell'acidità dell'urina e l'aumento di espressione di ASIC1 nei pazienti NDO potrebbe rappresentare un tentativo di evitare un eccessivo abbassamento di queste soglie. Va sottolineato che tutti i pazienti attualmente esaminati hanno una SCL situata nella regione sovra-sacrale e, quindi sono funzionalmente caratterizzati dall'assenza del "riflesso di guardia" e degli input simpatici, che significa un abbassamento della soglia riempimento e una sensibilità aumentata ai segnali colinergici per il rilassamento dello sfintere uretrale interno.

In conclusione, questo studio rappresenta la prima relazione sull'espressione dei canali delle degenerine nell'urotelio di vescica neurologica e i risultati ottenuti sono in favore dell'ipotesi che l'urotelio ha un ruolo principale nel sistema meccanosensoriale e nel riflesso della minzione. I cambiamenti di intensità e la distribuzione dei due canali in NDO probabilmente interferiscono con la generazione locale di segnali afferenti. Mentre i cambiamenti nell'espressione di γ ENaC potrebbero

causare un abbassamento della soglia dell'urotelio agli stimoli locali (cioè pressione idrostatica, pH), quindi peggiorare la funzione sensoriale, l'aumento di espressione di ASIC1 nelle cellule a ombrello potrebbe rappresentare un tentativo dell'urotelio di compensare l'ipersensibilità locale.

2 Effetti del trattamento cronico con otilonio bromuro nel colon di ratto

INTRODUZIONE

2.1 Sindrome del Colon Irritabile

La sindrome del colon irritabile (IBS, Irritable Bowel Syndrome) è un disturbo funzionale dell'intestino, alcuni sintomi sono frequenza di evacuazione anormale, feci di forma anomala, defecazione forzata, urgenza e sensazione di movimento intestinale incompleto. In tutto il mondo, circa il 10%-20% degli adulti e degli adolescenti hanno sintomi compatibili con IBS, con prevalenza nel sesso femminile (38). Nonostante la sua elevata prevalenza, la fisiopatologia dell'IBS non è ancora completamente nota e sembra essere multifattoriale. Sono state proposte diverse teorie e meccanismi circa la sua eziologia, ma il modello biopsicosociale è il più comunemente accettato (39). Il complesso dei sintomi sarebbero il risultato dell'interazione tra fattori psicologici, comportamentali e ambientali (40). La diagnosi dipende da un'attenta interpretazione delle relazioni temporali tra dolore/disagio, abitudini intestinali e le caratteristiche delle feci. Il dolore/fastidio relativi alla defecazione probabilmente è di origine intestinale, mentre quelli associati a esercizio fisico, movimento, minzione e dolori mestruali di solito hanno una causa diversa. Febbre, sanguinamento gastrointestinale, perdita di peso, anemia e altri

sintomi “allarme” o segni non sono dovuti a IBS, ma la possono accompagnare. Nelle donne, il cosiddetto dolore pelvico, il peggioramento della sindrome dell'intestino irritabile durante le mestruazioni, e dispareunia o altri sintomi ginecologici possono oscurare la diagnosi. (38). La natura multifattoriale dell'IBS e l'eterogeneità del quadro clinico richiedono diverse strategie di trattamento in base alla gravità e alla frequenza del sintomo predominante o a fattori fisiologici identificabili. Poiché IBS è una malattia cronica episodica, dopo la terapia iniziale per controllare i sintomi acuti, la terapia di mantenimento è necessaria in alcuni pazienti per prevenire le recidive. È importante identificare i pazienti ad alto rischio di recidiva in modo che la terapia possa essere adattata alle esigenze del paziente (41). In base ai sintomi possono essere utilizzati farmaci antidiarroici, antidepressivi, antispastici o lassativi (42).

2.2 *Morfologia del colon*

Il colon è il tratto terminale dell'apparato digerente di molti vertebrati. Il colon non assolve un ruolo fondamentale nel riassorbimento dei nutrienti, ma si occupa dell'assorbimento di acqua e sali e di sintetizzare, grazie al microbiota presente, alcune vitamine liposolubili essenziali, a partire dalle sostanze di scarto, prima che siano eliminate dall'organismo. Nei mammiferi, il colon si divide in quattro sezioni: colon ascendente, colon trasverso, colon discendente, sigma. Il colon, insieme al cieco e al retto forma l'intestino crasso.

La parete del colon è costituita, dall'interno verso l'esterno, dalle tonache mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa.

L'epitelio di rivestimento della tonaca mucosa è formato da enterociti fra i quali sono intercalate cellule mucipare caliciformi. La lamina propria accoglie le ghiandole intestinali ed è formata da connettivo lasso, nel quale si trovano fibrociti, granulociti, macrofagi, linfociti e plasmacellule. Le ghiandole intestinali sono tubolari semplici; sono formate maggiormente da cellule mucipare mature o in via di maturazione. Accanto a queste cellule si trovano le cellule staminali destinate a differenziarsi in enterociti. La muscolaris mucosae è formata da uno strato interno di fascetti circolari e uno strato esterno di fascetti longitudinali. Dallo strato interno partono esili tralci muscolari che penetrano la lamina propria della tonaca mucosa.

La tonaca sottomucosa si presenta come uno strato sottile di connettivo lasso con un ricco corredo di fibre elastiche. Accoglie i vasi e i nervi che riforniscono la mucosa intestinale. Neuron e fibre nervose si organizzano nel plesso sottomucoso o plesso del Meissner. Nello spessore della tonaca sottomucosa si approfondano le porzioni più esterne dei noduli linfatici presenti nella lamina propria.

La tonaca muscolare è formata da uno strato interno di cellule muscolari lisce disposte circolarmente e da uno strato esterno, discontinuo, di fascetti longitudinali. La tonaca muscolare accoglie il plesso mienterico o plesso dell'Auerbach.

La tonaca sierosa forma un involucro completo, esternamente alla tonaca muscolare, soltanto in corrispondenza del colon

trasverso. Nei restanti tratti la tonaca sierosa avvolge solo parzialmente alla parete intestinale.

Studi morfologici su strisce di muscolo di colon di uomo, ratto e topo hanno messo in evidenza che lo strato muscolare circolare (CM, circular muscle) può essere suddiviso in due porzioni: uno strato più esterno e spesso fatto di cellule muscolari lisce (SMC, smooth muscle cells) con caratteristiche tipiche, e uno strato più interno composto da pochi fasci di SMC particolarmente ricche in reticolo endoplasmico liscio (SER, smooth endoplasmic reticulum), caveole e giunzioni cellulari con le vicine cellule pacemaker, le cellule interstiziali del Cajal (ICC, interstitial cells of Cajal). Tutte queste caratteristiche potrebbero essere associate ad un ruolo peculiare di questo strato nella contrattilità colica (43).

La motilità gastro-intestinale è generata da una complessa interazione di motoneuroni enterici, SMC e ICC ed è sotto il controllo di diversi ormoni e mediatori infiammatori (44). Nell'intestino tenue e nel colon umano si possono distinguere due tipi principali di contrazioni: contrazioni miogene fasiche ritmiche (RPC, rhythmic phasic contraction), principalmente responsabili del mescolamento del contenuto luminale; e contrazioni mediate da nervi come le contrazioni migranti giganti, che propagano il contenuto luminale lungo il colon. RPC sono facilitate dalle depolarizzazioni spontanee periodiche delle SMC, detta anche onde lente, che sono generate e propagate dalle ICC. Le onde lente causano brevi periodi di alta e bassa eccitabilità delle SMC circolari. In seguito a stimolo eccitatorio,

questi periodi di alta eccitabilità portano alla depolarizzazione delle SMC sopra i livelli di soglia ed evocano contrazioni ritmiche. Al contrario, le contrazioni migranti giganti sono generate indipendentemente dalle onde lente per attività dei nervi enterici e un rilascio prolungato di acetilcolina (45). Il legame dell'acetilcolina ai recettori muscarinici presenti sulle SMC dello strato circolare attiva diverse vie di segnalazione che inducono l'influsso di Ca^{+2} attraverso i canali voltaggio- dipendenti situati nella membrana plasmatica e i canali del Ca^{+2} che si trovano nelle membrane intracellulari degli organuli deputati a depositi di Ca^{+2} intracellulari (46). L'afflusso di Ca^{+2} durante il potenziale d'azione attiva le proteine contrattili di SMC che danno come risultato contrazioni di grande ampiezza (45). Il rilassamento dipende dalla mobilizzazione del Ca^{+2} . Per esempio il rilassamento anale è indotto da neurotrasmettitori inibitori che iperpolarizzano le SMC diminuendo in questo modo la concentrazione citoplasmatica del Ca^{+2} . Il flusso di Ca^{+2} citoplasmatico determina quindi la durata e l'ampiezza delle contrazioni evocate dai nervi e dalle ICC (47).

2.3 Otilonio Bromuro

L' Otilonio Bromuro (OB) è un derivato dell'ammonio quaternario utilizzato per il trattamento dell'IBS (48). OB ha uno scarso assorbimento sistemico e studi di farmacocinetica nell'uomo hanno dimostrato che OB è eliminato principalmente con le feci e in minima parte escreto nelle urine. Negli animali è stato dimostrato l'accumulo di OB nella parete del colon, in

particolare a livello dello CM. Pertanto, OB agisce a livello del tratto gastrointestinale senza assorbimento sistemico (49). Clinicamente, i principali effetti di OB includono un miglioramento globale dei sintomi di IBS, una riduzione della frequenza e della gravità del dolore addominale e un aumento della soglia di dolore alla distensione (50). La maggior parte degli studi sulla farmacodinamica di OB sono stati condotti sui roditori e hanno suggerito diversi meccanismi d'azione dell'inibizione della motilità intestinale spontanea o stimolata. Gli studi sugli animali hanno dimostrato una inibizione delle contrazioni indotte da acetilcolina (ACh) e sostanza P (SP) ed hanno permesso di verificare come OB eserciti la sua azione spasmolitica mediante una combinazione di azioni antagoniste sui recettori muscarinici, bloccando i canali al Ca^{+2} di tipo L, antagonizzando i recettori per le tachichinine NK1 e NK2 e bloccando le risposte mediate da recettori nicotinici (Fig. 8) (51).

Tachichinine

Le tachichinine (tk) sono una famiglia di proteine che condividono la sequenza C-terminale che consente loro di agire come agonisti puri di specifici recettori accoppiati a proteine G chiamati NK1, NK2 e NK3. Sostanza P (SP), neurochinina A (NKA) e neurochinina B (NKB) sono prototipi di agonisti endogeni dei recettori NK1, NK2 e NK3, rispettivamente (52). SP e NKA sono maggiormente espresse nell'intestino rispetto a NKB (53). Le tachichinine sono localizzate nei neuroni e in altre cellule del tratto gastrointestinale (54). SP è espresso in diverse classi di neuroni enterici che differiscono per la morfologia, le

proiezioni e le funzioni. Le fibre afferenti estrinseche che originano dai gangli delle radici dorsali e raggiungono l'intestino attraverso i nervi simpatici e parasimpatici sacrali contribuiscono al contenuto di tachichinine. Le fibre di questi neuroni sensoriali proiettano principalmente alle arteriole della sottomucosa, ma raggiungono anche la mucosa e i plessi nervosi enterici. I recettori NK1, NK2 e NK3 sono espressi nei neuroni enterici, nelle cellule interstiziali del Cajal (ICC), nel muscolo intestinale e nei vasi (53).

Nell'intestino, SP e NKA sono cotrasmettitori dei neuroni enterici e delle fibre nervose afferenti estrinseche. Gli strati muscolari (muscolo longitudinale, muscolo circolare e muscularis mucosae) dell'intestino ricevono molte fibre nervose contenenti tachichinine, la maggior parte delle quali provengono da neuroni enterici intrinseci. La SP e NKA sono presenti nel soma e nei prolungamenti dei neuroni del plesso mienterico e del plesso sottomucoso (55). Le tachichinine possono sia stimolare che inibire la motilità gastrointestinale a seconda del tipo e del sito dei recettori attivati. La facilitazione dell'attività motoria gastrointestinale è causata dai recettori NK3 presenti sulle vie motorie eccitatorie all'interno del sistema nervoso enterico, recettori NK1 sulle ICC e recettori NK1 e NK2 sulle cellule muscolari. I recettori NK1 e NK3 delle vie motorie inibitrici nel sistema nervoso enterico di cavia, ratto e topo permettono alle tachichinine di deprimere l'attività motoria tramite il rilascio di ossido nitrico e ATP (53). OB ha proprietà anti-tachichinergiche,

inibisce la contrazione indotta dalle tachichinine legandosi ai recettori NK (56).

Recettori muscarinici

I recettori muscarinici appartengono alla famiglia di recettori accoppiati a proteine G. Vengono classificati in 5 sottotipi: M1, M2, M3, M4 e M5. Nell'intestino sono espressi in diversi tipi cellulari, tra cui cellule muscolari, ICC e neuroni. Questi recettori sono il bersaglio principale dell'acetilcolina, neurotrasmettitore eccitatorio (47). L'acetilcolina viene rilasciata dai moto-neuroni eccitatori enterici e il legame con il recettore muscarinico determina la contrazione muscolare (46). OB si lega ai recettori muscarinici, antagonizzando l'acetilcolina e bloccando, quindi, la risposta contrattile (47).

Canali al Ca^{2+}

La contrattilità della muscolatura liscia dell'intestino dipende dall'attivazione dei canali del Ca^{2+} , che determinano l'ingresso del Ca^{2+} e l'inizio della contrazione (57). La rimozione del Ca^{2+} libero nel citoplasma determina il rilasciamento della cellula muscolare. Questo è dovuto all'azione di neurotrasmettitori inibitori che iperpolarizzano le cellule muscolari lisce diminuendo così la mobilitazione citoplasmatica del Ca^{2+} (47). I canali al Ca^{2+} di tipo L sono espressi nelle cellule muscolari del tratto gastrointestinale e mediano l'afflusso di Ca^{2+} intracellulare quando le cellule muscolari sono depolarizzate in seguito a stimolazione eccitatoria (tachichinergica e muscarinica) (53). Sebbene i canali al Ca^{2+} di tipo L siano i maggiori responsabili dell'ingresso di calcio nelle cellule muscolari, recenti studi hanno

dimostrato l'importanza dei canali del Ca^{2+} di tipo T nella regolazione della motilità gastrointestinale (58). I canali T sono stati indentificati in diversi tipi cellulari, incluse cellule muscolari e ICC dell'intestino e del colon (47).

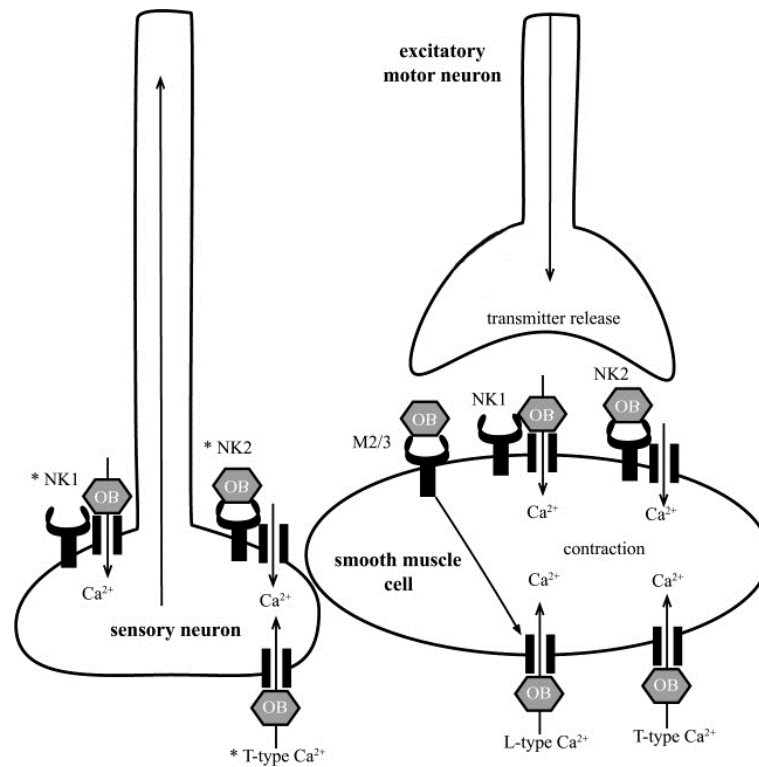


Fig 8 Schema dell'interazione di OB con recettori e canali al Ca^{2+} presenti sulle cellule muscolari lisce e neuroni sensoriali del tratto gastrointestinale. OB inibisce la mobilitazione del Ca^{2+} dalle fonti extracellulari bloccando i recettori e i canali del Ca^{2+} con attenuazione della risposta contrattile della cellula muscolare liscia ed eventualmente (come indicato da asterischi) diminuzione dell'eccitabilità dei neuroni sensoriali.

È stato dimostrato che questi canali sono coinvolti nella propagazione del segnale dalle ICC alle cellule muscolari, modulando la loro eccitabilità (58).

OB ha una azione selettiva sui canali al Ca^{2+} di tipo L bloccandone la funzione e inibendo la risposta contrattile a

diversi stimoli eccitatori e questo spiega l'azione spasmolitica osservata del farmaco (47).

SCOPO

Questa ricerca ha avuto due scopi principali:

1. Identificare le proprietà morfologiche dello strato circolare interno in paragone a quello più esterno;
2. Verificare se il trattamento cronico con OB modificava queste proprietà e/o quelle dello strato più esterno

Gli obiettivi sono stati ottenuti mediante:

- a) Indagini immunoistochimiche focalizzate sullo studio dell'espressione di markers specifici di organuli coinvolti nella disponibilità del Ca^{+2} quali le caveole, il reticolo endoplasmatico liscio (SER), i mitocondri, e sull'espressione di markers del sistema colinergico. Alcuni dei markers investigati nei tessuti sono stati quantificati mediante WB.
- b) Indagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) per verificare cambiamenti nelle caratteristiche di questi organelli.
- c) Esperimenti funzionali sul sistema colinergico.

MATERIALI E METODI

Animali

Ratti maschi Wistar (n=42; Harlan Laboratories, Udine) del peso di 199 ± 2 g sono stati alloggiati due per gabbia in condizioni standard di temperatura e umidità, tenuti a un ciclo di 12h luce/buio con libero accesso a cibo e acqua. Gli animali sono stati divisi casualmente in gruppi: gruppo di controllo e ratti trattati con OB. Nel gruppo dei trattati, il farmaco (2-20 mg/ kg/ die) è stato aggiunto all'acqua potabile per 10 o 30 giorni e la sua concentrazione è stata adeguata ogni due giorni, secondo la variazione di peso corporeo e l'assunzione di acqua. Il gruppo di controllo ha ricevuto solo acqua. Alla fine del trattamento gli animali sono stati sacrificati per inalazione di CO₂, l'addome è stato aperto e il colon prossimale rimosso rapidamente. Da ciascun ratto sono stati prelevati quattro campioni di tessuto dal colon e assegnati a caso alle diverse procedure: immunoistochimica, microscopia elettronica, western blot e studi funzionali. Tutte le procedure eseguite sugli animali sono state condotte secondo le linee guida italiane per Animal Care (DL 116/92) e la direttiva della Comunità Europea (86/609/ CEE).

Immunoistochimica

Campioni a tutto spessore del colon prossimale, 1cm di lunghezza, sono stati presi in modo casuale (10 ratti di controllo, 5 ratti trattati/ ogni dose per ogni set sperimentale) e immediatamente fissati in 4% paraformaldeide in 0.1 M PBS pH

7.4 per 4-6 ore a 4°C. Poi sono stati crioprotetti in 30% saccarosio in PBS a 4°C ON, inclusi in mezzo per criostato killik (Bio-Optica, Milano) e congelati a -80°C. Sezioni trasversali spesse 8 µm sono state tagliate con criostato e raccolte su vetrini polilisinati. Queste sezioni sono state poi pre-incubate con 1,5% BSA in PBS con 0.5% Triton X-100, per 20 minuti RT per minimizzare i legami aspecifici. Le sezioni sono state incubate con anticorpi primari (Tabella 4) diluiti in 1,5% BSA in PBS con 0.5% Triton X-100 a 4°C ON. Il giorno seguente le sezioni sono state lavate con PBS e poi incubate per 2 ore RT con anticorpi secondari (Tabella 5) diluiti 1.333 in 1,5% BSA in PBS con 0.5% Triton X-100. A fine incubazione, le sezioni sono state lavate in PBS e montate con montante acquoso (Fluoremount, Sigma, Milano). La doppia marcatura è stata eseguita come segue: dopo la prima incubazione, come descritto sopra, le sezioni sono state incubate con un altro anticorpo primario e con il suo anticorpo secondario specifico. I controlli negativi sono stati eseguiti contemporaneamente omettendo l'anticorpo primario per escludere la presenza di immunofluorescenza non specifica. I prodotti di immunoreazione sono stati osservati in epifluorescenza con microscopio Zeiss Axioskop (Zeiss, Mannheim, Germania) e acquisiti utilizzando una fotocamera digitale AxioCam, HRM (Zeiss, Mannheim, Germania). Il segnale fluorescente è stato ottenuto utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 o 568 nm per l'immunofluorescenza in verde o rosso, rispettivamente.

Tabella 4 Elenco degli anticorpi primari utilizzati

Anticorpo primario	Ospite	Caratteristiche	Diluizione IHF-WB	Produttore
Anti-Cav-1	Mouse	Anticorpo monoclonale contro la caveolina umana	1:250-1:2000	BD Trasduction Labs, Lexington, KY, USA
Anti-eNOS	Rabbit	Anticorpo policlonale contro la eNOS bovina	1:200-1:1000	Alexis, San Diego, CA, USA
Anti- eNOS	Rabbit	Anticorpo policlonale contro la eNOS bovina	1:200-1:1000	Chemicon, Temecula, CA, USA
Anti-calreticulina	Chicken	Anticorpo policlonale contro la calreticulina	1:200-1:1000	Thermo Scientific, Rucorn, UK
Anti-calsequestrina	Mouse	Anticorpo monoclonale contro il reticolo sarcoplasmatico di coniglio	1:200-1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-c-kit	Rabbit	Anticorpo policlonale contro il c-kit umano	1:300	Dako, Glostrup, Danimarca
Anti- α SMA	Mouse	Anticorpo monoclonale contro la porzione N-terminale di SMA	1:1000	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Anti-ChAT	Goat	Anticorpo monoclonale della ChAT umana	1:200-1:1000	Chemicon, Temecula, CA, USA
Anti-Mr2	Rabbit	Anticorpo policlonale contro M2R umano	1:50	Alomone Labs, Gerusalemme, Israele
Anti- Mr2	Rat	Anticorpo monoclonale contro M2r	1:400	Chemicon, Temecula, CA, USA
Anti- β actina	Rabbit	Anticorpo policlonale contro la porzione C-terminale della β actina	1:20000	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA

Tabella 5 Elenco degli anticorpi secondari utilizzati

Anticorpo secondario	Ospite	Diluizione IHC	Produttore
Anti-Mouse	Goat	1:333	Invitrogen, San Diego,CA,USA
Anti-Rabbit	Goat	1:333	Jackson ImmunoResaerch West Grove, PA, USA
Anti-Chicken	Goat	1:333	Invitrogen, San Diego,CA,USA
Anti-Goat	Donkey	1:333	Invitrogen, San Diego,CA,USA
Anticorpo secondario	Ospite	Diluizione WB	Produttore
Anti-Mouse	Goat	1:15000	Jackson ImmunoResaerch West Grove, PA, USA
Anti-Rabbit	Goat	1:15000	Jackson ImmunoResaerch West Grove, PA, USA
Anti-Chicken	Rabbit	1:15000	Jackson ImmunoResaerch West Grove, PA, USA
Anti-Goat	Rabbit	1:15000	Jackson ImmunoResaerch West Grove, PA, USA
Anti-Rat	Rabbit	1:15000	Jackson ImmunoResaerch West Grove, PA, USA

Microscopia elettronica

Strisce di colon ascendente (1x3 mm) sono state prelevate da 5 animali di ciascun gruppo (controlli e ratti trattati OB/ ogni dose per ogni set sperimentale). Le strisce sono state tagliate immediatamente dopo l'escissione e fissate per 6 ore in una soluzione di 2% glutaraldeide 0.1M in tampone cacodilato pH 7.4. Dopo quattro lavaggi in buffer cacodilato contenente saccarosio 0.22M, le strisce sono state post-fissate per 1 ora in 1% osmio in PBS. La disidratazione è stata condotta in acetone graduato e le strisce sono state incluse in epon in stampi piatti per ottenere sezioni del muscolo circolare tagliato in sezione trasversale. Sezioni semi-fini, ottenute con ultramicrotomo LKB-NOVA (Stoccolma, Svezia), sono state colorate con una soluzione di blu di toluidina in tampone borato 0,1M e quindi osservate al microscopio ottico per selezionare aree lontane dai bordi del nastro e senza segni apparenti di cattiva fissazione o artefatti di processazione. Sezioni ultra-fini di queste aree selezionate sono state ottenute con ultramicrotomo LKB NOVA utilizzando una lama di diamante e colorate con una soluzione satura di acetato di uranile in metanolo (50:50) per 12 minuti a 45°C, seguita da una soluzione acquosa di nitrato di bismuto concentrato per 10 minuti RT. Almeno 10-20 sezioni ultra-fini da tutte le strisce di ciascun animale sono state esaminate al microscopio elettronico JEOL 1010 (Tokyo, Giappone) e fotografate.

Western blot

Campioni a tutto spessore del colon ascendente (10 ratti di controllo, 5 trattati/ ogni dose per ogni set sperimentale) sono

stati rapidamente omogenati con omogenizzatore di tessuti (Ing Terzano, Milano) in tampone di lisi freddo composto da 10mM Tris/HCl pH 7.4; 10 mM NaCl; 1.5 mM MgCl₂; 2mM Na₂EDTA; 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF); 1% Triton X-100 con aggiunta di una compressa di 1X Sigmfast Protease Inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Milano). Dopo centrifugazione a 13000 g per 30 minuti a 4°C, i surnatanti sono stati raccolti ed è stato misurato spettrofotometricamente il contenuto totale di proteine usando un micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, IL, USA). I campioni (70 mg di proteine per pozzetto) e un adeguato marker per i pesi molecolari (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sono stati caricati su un gel SDS-PAGE 7,6% o 10% poliacrilammide e risolti mediante elettroforesi standard. Le proteine sono state poi trasferite (150 V, 1h) su membrane di nitrocellulosa (Amersham Biosciences, Cologno Monzese, Milano). Dopo lavaggi accurati in PBS contenente 0.1% Tween 20 (T-PBS, Sigma-Aldrich), le membrane sono state trattate con tampone di bloccaggio fatto con 5% latte in polvere privo di grassi (Sigma-Aldrich) diluito in T-PBS per 1 ora RT. Poi sono state incubate con l'anticorpo primario ON a 4°C in agitazione (Tabella 4). I prodotti di reazione sono stati rilevati incubando le membrane con appropriato anticorpo secondario coniugato con la perossidasi (Tabella 5) per 1 ora RT. L'immunoreattività è stata rilevata da un reattivo chemiluminescente ECL (Immune-StarTM HRP Chemiluminescent Kit, Bio-Ra, Hercules, CA, USA). Al fine di normalizzare i valori di ciascun anticorpo, le membrane sono state strippate (Stripping buffer, Thermo Scientific, Rockford, IL,

USA) e poi incubate con anticorpo anti- β actin, assumendo l'actina come proteina di controllo interna. Le bande immunoreattive sono state rilevate utilizzando ImageQuant 350 Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Studi funzionali

I segmenti di colon sono stati trasferiti in una soluzione di Krebs ossigenata (95% O₂ e 5% CO₂) composta da (mM): NaCl 119; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.5; KCl 4.7; CaCl 2.5 e glucosio 11. In seguito sono stati aperti lungo il confine mesenterico e appuntati a basi Sylgard con la mucosa rivolta verso l'alto. Lo strato mucoso è stato rimosso raschiando delicatamente e due strisce muscolari (larghe 3mm e lunghe 10 mm) sono state tagliate da ogni segmento in direzione delle cellule muscolari circolari. Le strisce sono state poste in un bagno con soluzione di Krebs ossigenato a 37°C e collegato a trasduttori di forza isometrica (Ugo Basile, VA) sotto una tensione iniziale di mN. L'attività meccanica è stata registrata in modo digitale da un ponte amplificatore collegato a un sistema hardware PowerLab 8sp (Instruments AD, Bella Vista, RSU, Australia). Dopo un periodo di stabilizzazione di 60 minuti, l'attività meccanica spontanea è stata registrata per 15 minuti quindi ciascun preparato è stato esposto ad un'unica concentrazione massima (1pM) dell'agonista metacolina del recettore Mr2(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Analisi quantitative e statistiche

L'analisi quantitativa di Cav-1 e delle strutture eNOS-positive è stata eseguita su sezioni trasverse di controllo e campioni trattati. Immagini digitalizzate della parete muscolare (4 sezioni per animale, 3 animali per gruppo, per un totale di 12 sezioni per ogni anticorpo) sono state acquisite utilizzando un obiettivo X40. Ogni fotografia è stata analizzata utilizzando ImageJ (NIH, Bethesda, USA) per valutare l'intensità di marcatura e quantificare l'area delle strutture IR. Sono stati fissati valori di soglia per le fotografie al fine di analizzare esclusivamente le zone d'interesse. Per l'analisi delle zone, la marcatura è stata convertita in un'immagine binaria, è stato contato il numero di pixel sopra soglia ed è stata calcolata la percentuale della superficie contenente strutture IR. I risultati sono espressi come pixel IR \pm errore standard della media (SEM).

L'analisi quantitativa delle bande WB è stata eseguita mediante densitometria (ogni banda corrispondente a un singolo campione) utilizzando un software di analisi QuantityOne (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'attività contrattile indotta dalla metacolina è stata valutata mediante software Grafico 4.2 (ADInstruments). Tutti i risultati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego; CA, USA). Le differenze tra i valori di più gruppi sono stati esaminati mediante test One-way ANOVA, seguito dal test di confronto multiplo Newman-Keuls o T-test di Student, a seconda dei casi. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Microscopia elettronica di trasmissione (TEM)

Controlli Al confine con la sottomucosa del muscolo circolare (CL, circular layer) (Fig. 9A) le ICC formano uno stato quasi continuo strettamente collegate alle cellule muscolari lisce della porzione interna di CL (ICL, inner circular layer). Le cellule di ICL hanno un profilo estremamente irregolare e possiedono molti processi (Fig. 9A, B) sottili (Fig. 9C) e più ricche in caveole e cisterne di REL (Fig. 9B, 10A) di quelli della porzione esterna del CL (OCL, outer circular layer). Il loro citoplasma è pieno di filamenti sottili e i mitocondri sono distribuiti sia in prossimità del nucleo sia alla periferia della cellula. Molte terminazioni nervose, alcune contenenti vescicole sinaptiche agranulate e altre vescicole sinaptiche granulate, sono vicine alle cellule ICL e mescolate con le ICC.

Ratti trattati con OB A 10 giorni di trattamento con OB, con 2mg/kg o 20mg/kg le caveole e le cisterne del REL sono più numerose rispetto ai controlli (Fig. 10A), in particolare nelle cellule ICL (Fig. 10B). A 30 giorni di trattamento con entrambe le dosi di OB, le caveole sono ancora numerose e le cisterne del REL sono lunghe e vicine al plasmalemma, soprattutto nelle cellule di ICL (Fig.10C). A 30 giorni, le cellule OCL mostrano numerosi contatti specializzati cellula-cellula (Fig. 11A), e sia le cellule di ICL che OCL possiedono numerosi cluster di mitocondri allineati lungo la periferia cellulare (Fig. 11B). Negli animali trattati, nessun cambiamento significativo in caveole e

ricchezza di SER è stato rilevato nelle ICC, e nel contenuto di vescicole sinaptiche e tipologie delle terminazioni nervose.

Immunoistochimica e western blot

Controlli Le due porzioni del CL sono chiaramente distinguibili per forma e dimensioni delle cellule e per alcune differenze di IR. Infatti, markers quali α smooth muscles actin (α SMA, Fig. 9D), caveolina 1 (Cav-1, Fig. 9E, 12A) e recettore muscarinico 2 (M2r, Fig. 9E, 14A) sono più intensi nelle cellule ICL rispetto a quelle della OCL. Al contrario la sintasi endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS, Fig.12D), la calreticulina (Fig. 13A) e la calsequestrina (Fig. 13B) mostrano la stessa intensità sia nel ICL che nel OCL. La marcatura di α SMA, eNOS e calsequestrina si trova nel citoplasma (Fig. 9D, F, 12D, 13B) mentre quella della calreticulina e Cav-1 (Fig. 13A, 14A) si trova lungo il plasmalemma (Fig. 9E, 12A). Le ICC sono c-Kit, Cav-1, calsequestrina, calreticulina (Fig. 9D,E, 13A,B) e eNOS positive, ma sono α SMA (Fig. 9D) e M2r negative. Inoltre, calsequestrina e calreticulina sono presenti anche nei neuroni dei plessi enterici.

Ratti trattati con OB L'immunoreattività di alcune molecole testate nelle cellule ICL e OCL mostrano cambiamenti nella loro intensità secondo il tempo e la dose di esposizione a OB. Le analisi quantitative dell'intensità e i dati WB supportano le osservazioni morfologiche.

Molecole coinvolte nella gestione e stoccaggio del Ca^{2+} A 10 giorni di trattamento con OB, l'intensità della marcatura di Cav-1

ed eNOS è aumentata (Fig. 12B,E) rispetto ai controlli (Fig. 14A,D) in entrambi gli strati del muscolo circolare e l'analisi quantitativa di tale intensità rivela che l'aumento è significativo. L'analisi WB per Cav-1 non presenta alcuna differenza nell'espressione della proteina (Fig.12C), mentre l'analisi WB per eNOS dimostra un aumento che è significativo solo per 2 mg/kg (Fig.12F). A 30 giorni di trattamento con OB, l'immunoistochimica e le analisi WB (Fig. 12C,F) non mostrano alcun cambiamento di espressione per Cav-1 ed eNOS tra controlli e trattati. Calreticulina e calsequestrina, sia mediante immunoistochimica sia WB (Fig. 13C,D), non mostrano alcun cambiamento significativo dopo trattamento con OB.

Molecole coinvolte nella neurotrasmissione eccitatoria A 10 giorni di trattamento, non viene rilevato nessun cambiamento significativo nella marcatura di M2r e ChAT sia per immunoistochimica che WB (Fig. 14D,E). A 30 giorni di trattamento, viene evidenziato un aumento significativo della marcatura di M2r, mediante immunoistochimica (Fig. 14B) o WB (Fig. 14D). A 30 giorni è stata osservata una piccola diminuzione di ChAT (Fig. 14E).

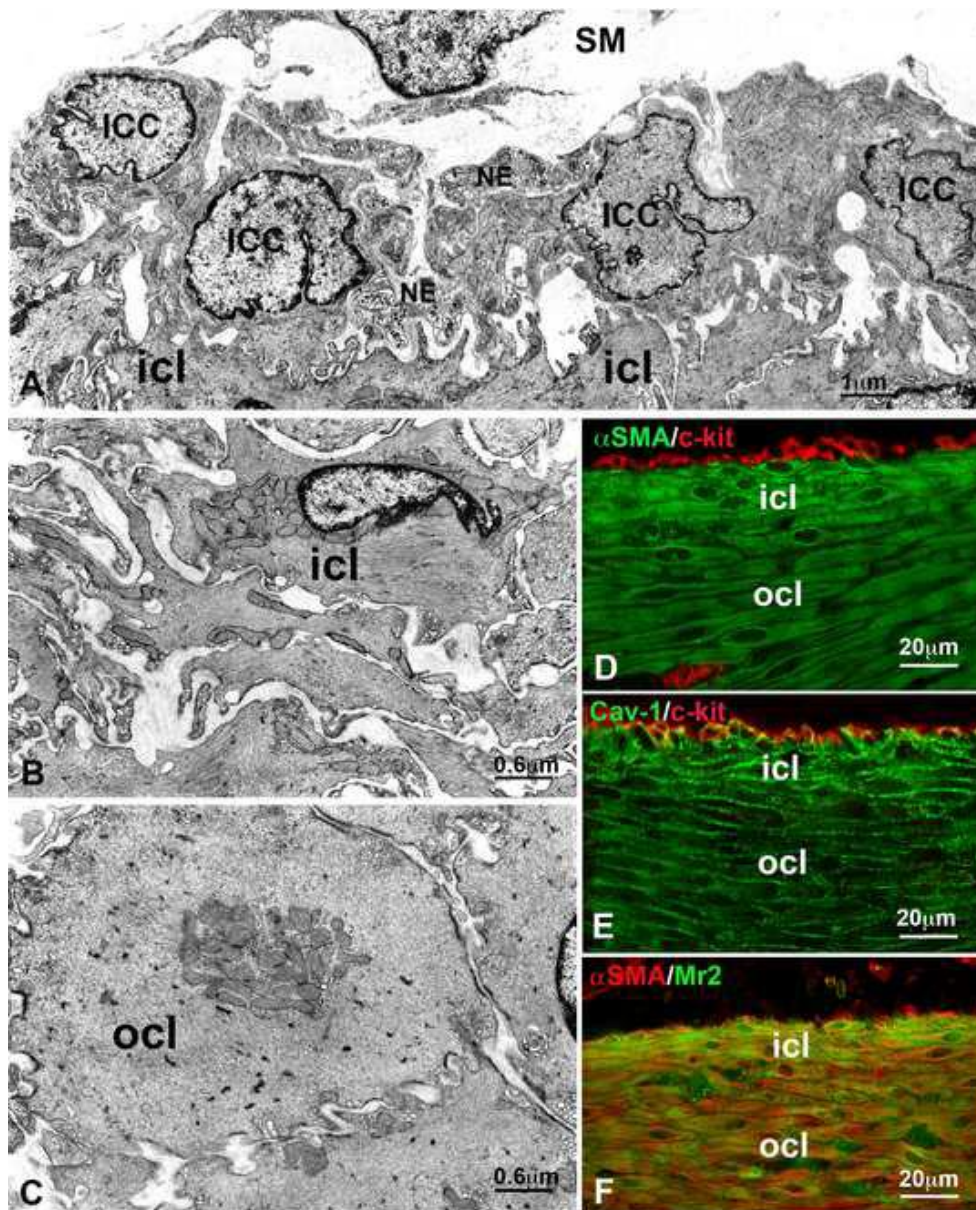


Fig. 9 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e immunoistochimica (IHF) dello strato muscolare circolare nei controlli. **TEM A)** Un monostrato quasi continuo di ICC coprono la parte più interna (ICL) del muscolo circolare. Sulla parte superiore c'è la sottomucosa (SM). Diverse terminazioni nervose (NE) sono vicine sia alle ICC sia alle cellule muscolari lisce ICL. Barra=1 μm. **B)** Particolare della morfologia delle cellule muscolari lisce ICL. Barra=0.6 μm. **C)** particolare della morfologia tipica delle cellule muscolari lisce della porzione esterna dello strato muscolare circolare (OCL). Barra=0.6 μm. **IHF D)** Doppia marcatura con αSMA (verde) e c-kit (rosso). ICL è marcato più intensamente rispetto OCL. Le ICC sono c-kit-positive (rosso) e αSMA-negative. **E)** Doppia marcatura con Cav-1(verde) e c-kit (rosso). La marcatura con Cav-1 è molto più intensa nelle ICL rispetto a OCL. Le ICC sono c-kit o Cav-1-positive. **F)** Doppia marcatura con αSMA (rosso) e Mr2 (verde). La marcatura di M2r è più intensa nelle ICL rispetto a OCL; entrambi gli strati sono αSMA-positivi. Barra=20 μm.

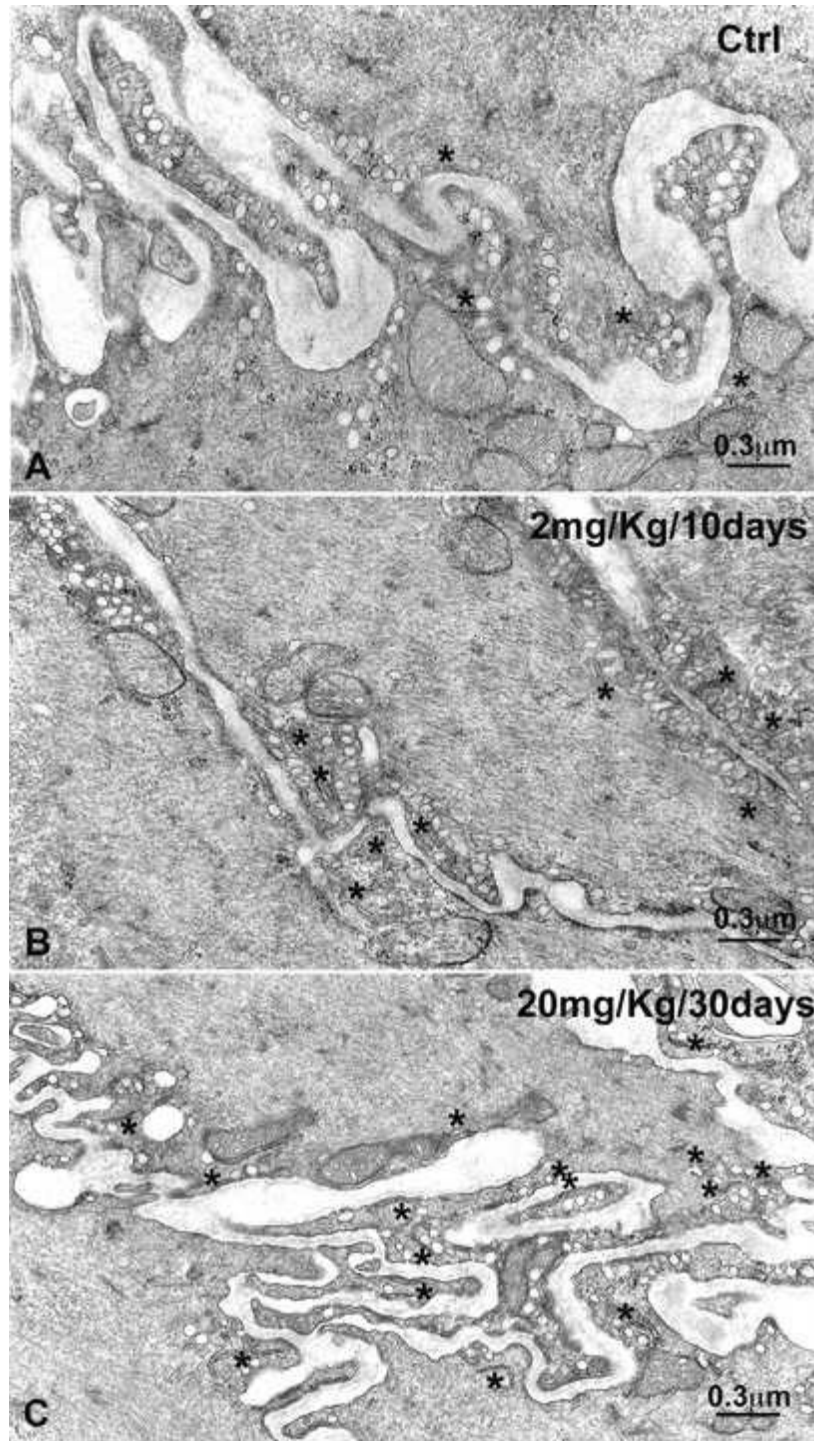


Fig. 10 Microscopia elettronica a trasmissione dello strato circolare interno (ICL) A) Controlli. Il profilo delle cellule ICL è molto irregolare, con ramificazioni sottili e interconnesse, e il plasmalemma è ricco di caveole (asterischi). Diverse cisterne di reticolo endoplasmico liscio sono identificabili vicino alle caveole. B) Ratti trattati con OB 2mg/kg per 10 giorni. Le caveole sono particolarmente numerose (asterischi), così come le cisterne del reticolo endoplasmico liscio. C) Ratti trattati con OB a 20mg/kg per 30 giorni. Le caveole sono ancora più numerose rispetto ai controlli e le cisterne del reticolo endoplasmico liscio (asterischi) sono lunghe e apposte al plasmalemma. Barra=0.3µm.

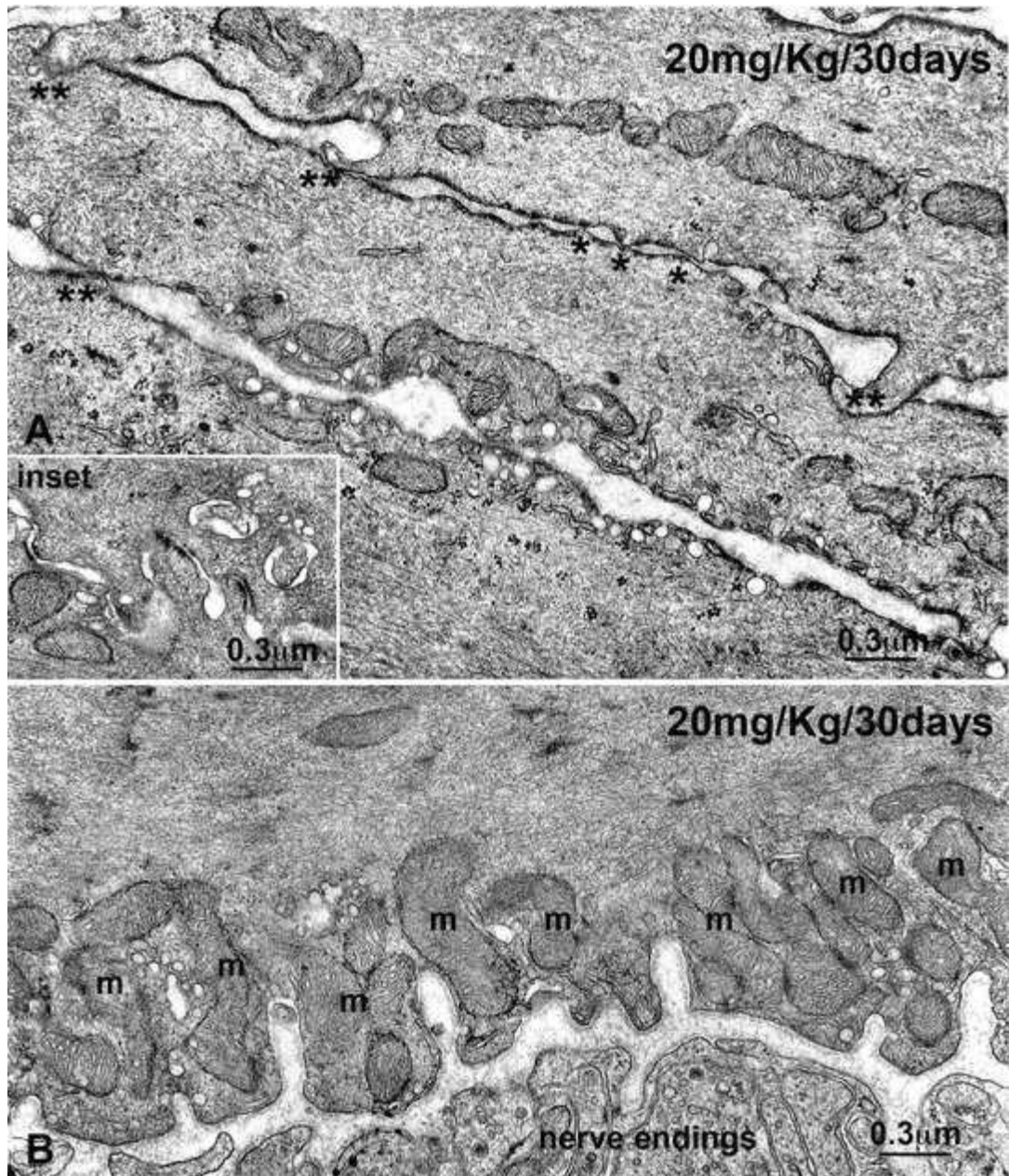


Fig. 11 Microspia elettronica di trasmissione dello strato circolare esterno (OCL) Ratti trattati per 30 giorni con 20mg/kg di OB. **A)** e **insetto** Numerose giunzioni cellula-cellula (asterischi) collegano tra loro le cellule muscolari lisce di OCL. **B)** Gruppi di mitocondri (m) sono allineati lungo la periferia delle cellule. Sul lato inferiore, si trova un nervo con numerose terminazioni nervose piene di vescicole sinaptiche. Barra=0.3μm

Esperimenti funzionali

Al termine del periodo di stabilizzazione, le strisce di colon dei controlli e dei trattati mostrano una tensione di riposo simile. L'agonista metacolina di M2r induce una contrazione tonica del muscolo circolare del colon prossimale nei controlli e nei ratti trattati con OB. Nei ratti trattati con 20mg/kg per 30 giorni, la contrazione indotta da metacolina è aumentata significativamente ($p < 0.05$) rispetto ai controlli (Fig. 14F).

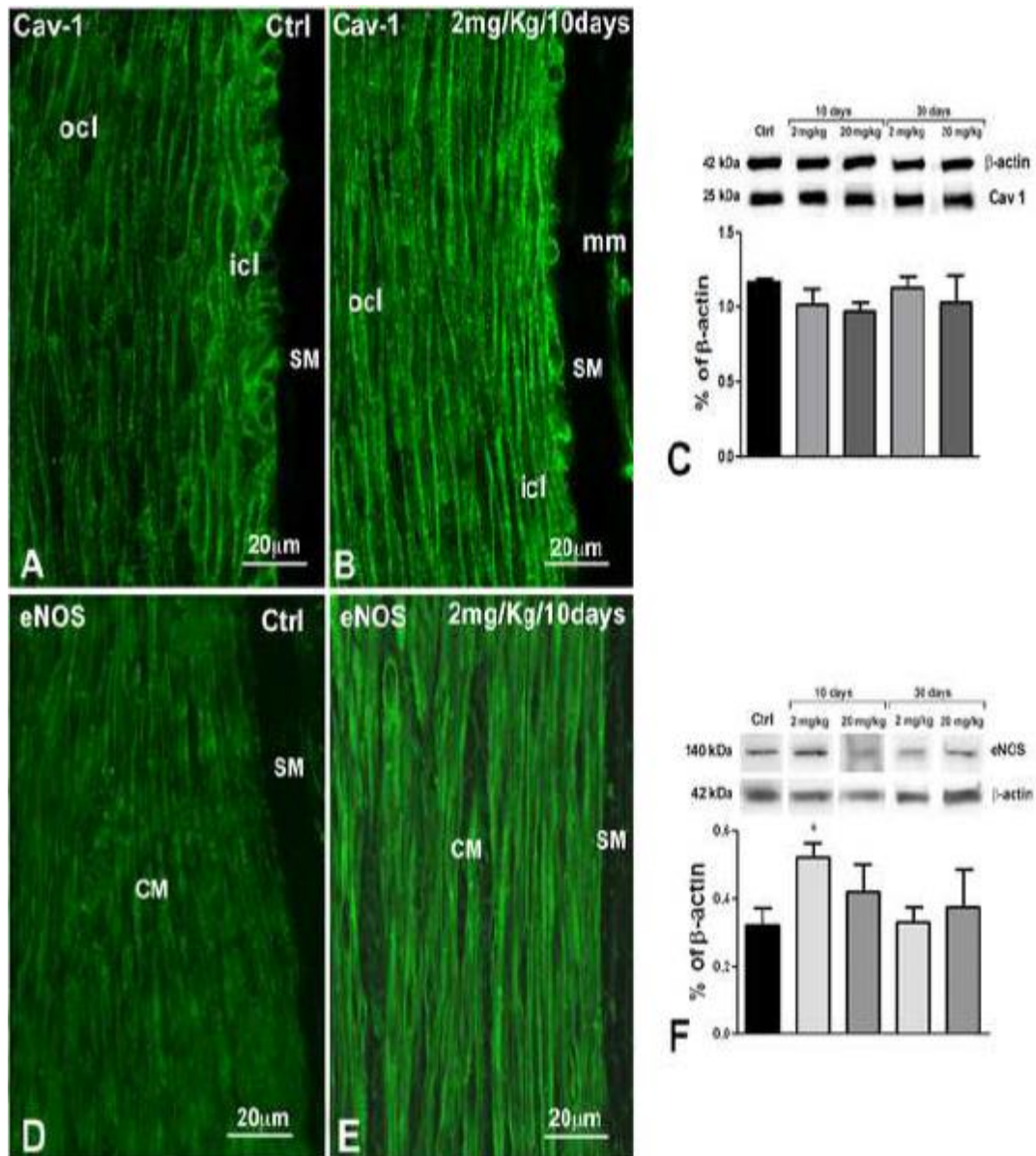


Fig. 12 Immunoistochimica (IHC) e western blot (WB) di Cav-1 e eNOS
A,B) IHC La marcatura di Cav-1 appare come piccole barre situate lungo il plasmalemma delle cellule sia nel gruppo di controllo (A) sia nei ratti trattati per 10 giorni (B). Cav-1 IR nei controlli è più intensa nel ICL rispetto alle cellule OCL. Nei ratti trattati, l'intensità di Cav-1 IR è aumentata in entrambi gli strati. **C) WB** bande rappresentative di Cav-1 e la loro quantificazione nei controlli e nei trattati. Non è stato osservato nessun cambiamento significativo. **D,E) IHC** Nei controlli (D) la marcatura di eNOS appare come granuli che si trovano principalmente alla periferia delle cellule muscolari lisce, senza differenze tra ICL e OCL. Nei ratti trattati per 10 giorni (E) l'intensità della marcatura è aumentata in tutte le cellule del muscolo circolare. SM: sottomucosa. **F) WB** bande rappresentative di eNOS e loro quantificazione nei controlli e nei ratti trattati. L'aumento a 10 giorni di trattamento con OB è significativa ($p < 0.05$) rispetto ai controlli. Barra=20 μ m.

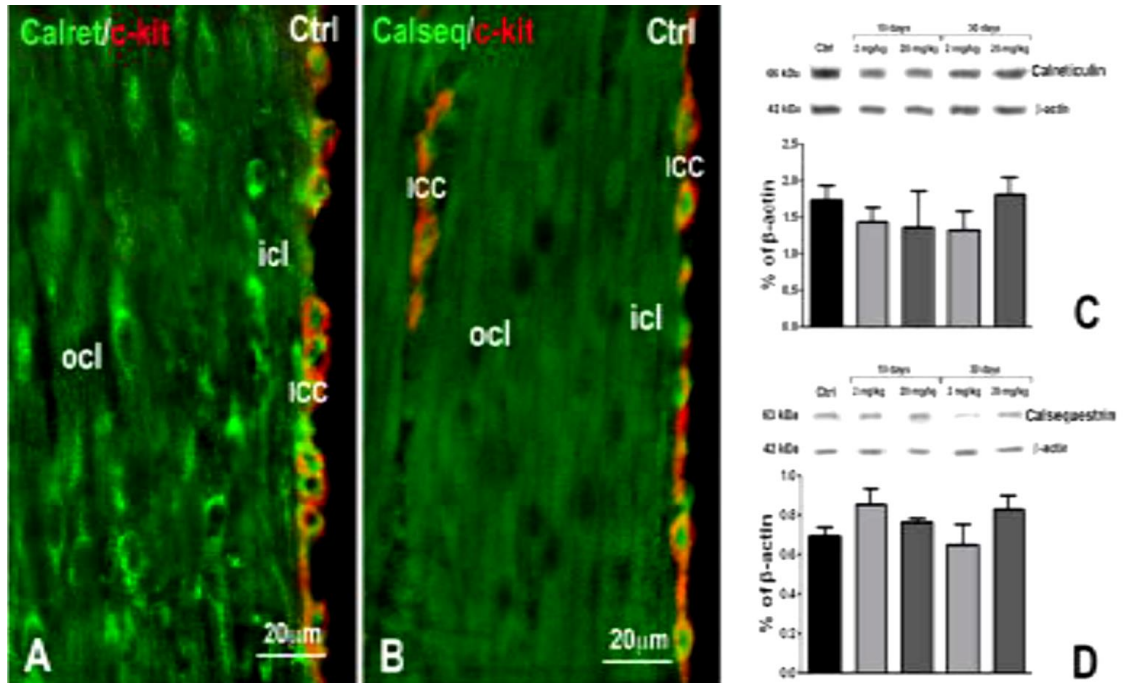


Fig. 13 Immunoistochimica (IHF) e Western blot (WB) per calret e calseq IHF Controlli. **A)** doppia marcatura per Calret (verde) e c-kit (rosso), **B)** doppia marcatura per Calseq (verde) e c-kit (rosso). Le cellule muscolari lisce sia di OCL sia di ICL sono positive, ma nessuna differenza di intensità sono presenti tra i due strati. Le ICC sono doppiamente marcate verde e rosso). La marcatura di Calret appare come granuli distribuiti principalmente alla periferia cellulare, mentre la marcatura di Calseq è intracitoplasmatica. A,B . Barra=20 μ m. **WB.** Bande rappresentative di Calret (**C**) e Calseq (**D**) e la loro quantificazione nei controlli e nei ratti trattati. Nessun cambiamento significativo è stato osservato in qualsiasi momento della durata del trattamento con OB per entrambi i marcatori.

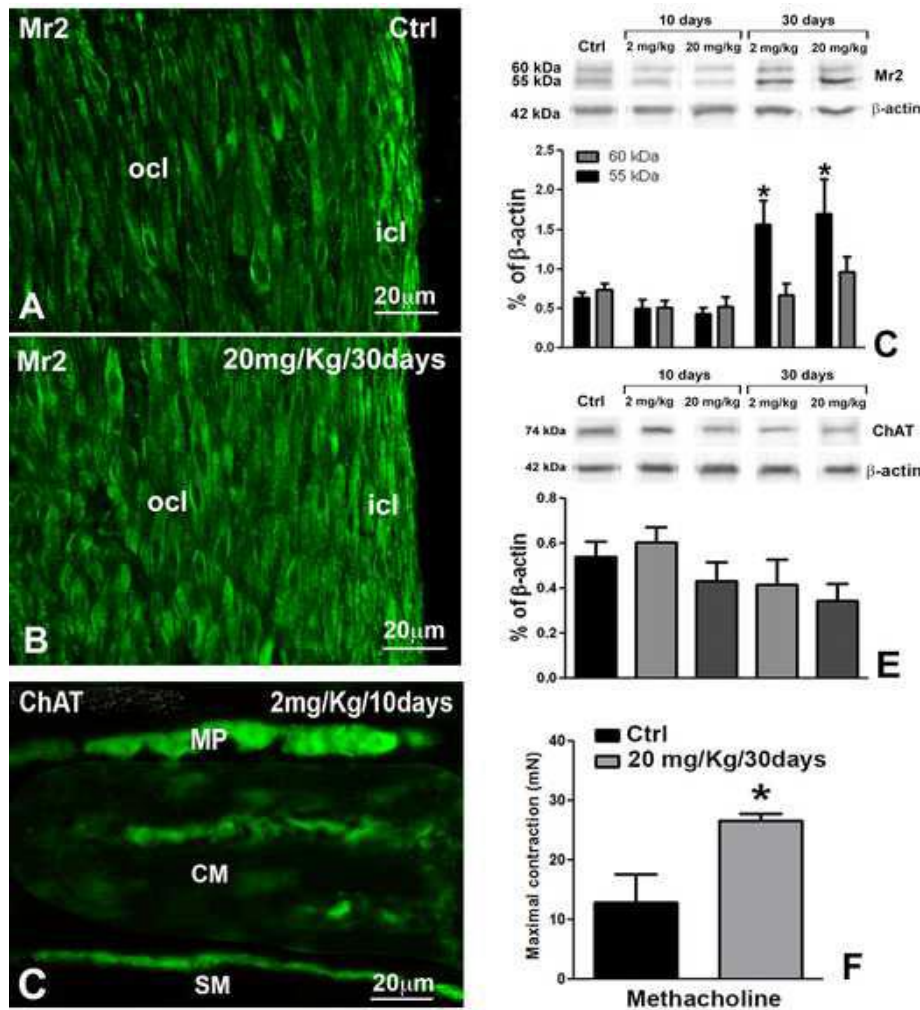


Fig. 14 Immunoistochimica (IHF) e Western blot (WB) per M2r e ChAT ed effetti sulla contrattilità dell'agonista muscarinico. IHF. **A)** Nei controlli, la marcatura di M2r è granulare, distribuita maggiormente alla periferia della cellula e più intensa nel ICL che in OCL. **B)** Negli animali trattati per 30 giorni, l'intensità della marcatura è aumentata nelle cellule muscolari lisce sia ICL e OCL. **C)** Come nei controlli, negli animali trattati per 10 giorni, ci sono neuroni ChAT-positivi nel plesso mienterico (MP) e fibre nervose nello strato muscolare circolare (CM), molti dei quali si trovano al confine sottomucoso. SM: sottomucosa. A-C: Barra= 20 μm. **D)** L'analisi WB per M2r individua due bande distinte con diversi pesi molecolari. A 30 giorni di trattamento, con entrambe le dosi si osserva un aumento significativo dell'intensità di marcatura di M2r si trova principalmente dovuta alla banda con peso molecolare più basso. * $p < 0.01$ rispetto ai controlli e animali trattati per 10 giorni. **E)** L'analisi WB di ChAT dimostra che dopo 10 giorni di trattamento si ha un aumento e dopo 30 giorni una diminuzione. Tuttavia, nessuna di queste modifiche è significativa. **F)** Effetto contrattile indotto da una concentrazione massima (1 μM) dell'agonista selettivo di M2r metacolina su strisce di muscolo circolare di colon prossimale di controllo (nero) e ratti trattati con OB (20 mg/kg/30 giorni, grigio). Ogni colonna è la media \pm s.e.m di 6 esperimenti

CONCLUSIONI

I presenti risultati indicano che la porzione interna del muscolo circolare mostra una più alta espressione di diversi marcatori rispetto alla porzione esterna, ed è più ricca in organelli coinvolti nella mobilizzazione e stoccaggio del Ca^{2+} . Dopo il trattamento cronico con OB, entrambe le porzioni del muscolo circolare subiscono cambiamenti ultrastrutturali e immunoistochimici simili, con tempi diversi. Un aumento degli organelli legati al Ca^{2+} e del contenuto di Cav-1 ed eNOS viene osservata dopo 10 giorni di trattamento. Un aumento significativo dell'espressione di M2r e della contrattilità del muscolo circolare viene rilevato dopo esposizione ad un agonista muscarinico a 30 giorni di trattamento.

Strato circolare interno (ICL) Studi ultrastrutturali hanno già dimostrato che il muscolo circolare del colon prossimale di ratto è suddiviso in una porzione interna e una esterna (OCL) che differiscono sia per morfologia sia per dimensioni delle cellule muscolari lisce. Tuttavia ad oggi non erano disponibili informazioni su eventuali differenze nell'espressione di marcatori specifici tra le due porzioni. I presenti dati hanno mostrato che le cellule muscolari lisce della ICL sono particolarmente sottili, possiedono diversi processi che mettono in comunicazione tra loro le cellule formando una fitta rete, e sono più ricche di REL, caveole, Cav-1, αSMA e M2r rispetto alle cellule muscolari lisce di OCL. L'intensa marcatura di Cav-1 è probabilmente legata alla ricchezza in caveole. L'intensa marcatura di αSMA potrebbe dipendere dall'elevato contenuto di filamenti contrattili che

riempiono il citoplasma delle cellule di ICL. L'intensa marcatura di M2r indica che le cellule di ICL sono un obiettivo privilegiato delle terminazioni nervose vicine, molte delle quali potrebbero essere di tipo colinergico (piccole vescicole trasparenti agli elettroni). Al contrario, l'espressione di calreticulina, calsequestrina ed eNOS è simile tra ICL e OCL. Ragionevolmente, tutte queste caratteristiche dovrebbero riflettere il ruolo peculiare delle ICL nella contrattilità del colon. Attualmente, non ci sono dati sufficienti per identificare questo ruolo, ma si possono solo fare alcune ipotesi. I contatti con le ICC della sottomucosa, vale a dire le cellule pacemaker del colon, e la ricchezza in M2r rendono le cellule ICL il primo bersaglio dell'attività elettrica delle ICC e degli input eccitatori. Quando uno o entrambi questi segnali innescano le cellule muscolari di ICL, questo strato si contrae formando un anello in grado, da un lato di favorire il riassorbimento dell'acqua e degli elettroliti e dall'altro, in collaborazione con OCL, la progressione del contenuto semisolido presente nel colon prossimale.

Strutture e molecole coinvolte nello stoccaggio e mobilizzazione del Ca^{2+} Nei ratti trattati cronicamente con OB si è visto un aumento consistente di caveole e SER nello strato muscolare. Questo aumento è già apprezzabile a 10 giorni, soprattutto nel ICL. Inoltre, è presente un aumento della distribuzione periferica dei mitocondri e un aumento dei contatti specializzati cellula-cellula nel OCL a 30 giorni di trattamento con OB. Immunoistochimica e/o WB hanno mostrato un significativo cambiamento dell'espressione di eNOS e Cav-1, mentre gli altri

marcatori sono rimasti invariati. A 10 giorni la marcatura di eNOS è notevolmente aumentata. L'apparente discrepanza tra la ridotta disponibilità del Ca^{2+} e l'aumento della eNOS, enzima Ca^{2+} -dipendente, può essere spiegata. È stato riportato che bassi livelli di NO rappresentano uno stimolo per la trascrizione e la sintesi della NOS costitutiva (59) e che le cellule muscolari lisce rispondono a stimoli di questo tipo molto rapidamente (60). Pertanto, questo primo aumento di eNOS potrebbe rappresentare il tentativo delle cellule muscolari lisce di contrastare la ridotta disponibilità di Ca^{2+} intracellulare dovuto al blocco dell'ingresso di Ca^{2+} da parte di OB (56, 57, 61). Dopo 30 giorni di trattamento, il ritorno del livello di eNOS simile ai controlli potrebbe essere la conseguenza di una sorta di adattamento della cellula alla concentrazione inferiore di Ca^{2+} intracellulare. Un modesto, anche se significativo, aumento dell'intensità della marcatura di Cav-1 è presente a 10 giorni di trattamento con OB, in accordo con quanto visto al TEM. Cav-1 è una proteina strutturale legata alla membrana delle caveole e associata al canale del Ca^{2+} di tipo L (62), uno dei principali bersagli di OB (56,57,61). Il trattamento cronico con OB provoca una redistribuzione del canale del Ca^{2+} di tipo L nel citoplasma. Questa redistribuzione probabilmente pregiudica la possibilità di associazione tra Cav-1 e il canale L e, di conseguenza, nel tentativo di favorire questa associazione la cellula aumenta il numero di caveole. Tale incremento probabilmente è presente fin dai primi giorni di trattamento con OB e rimane almeno fino a 30 giorni. La discrepanza tra i dati di immunistoichimica e WB, che

non hanno mostrato alcun aumento del contenuto di Cav-1, potrebbe essere dovuta al fatto che il WB è stato eseguito su campioni a tutto spessore di colon che comprende tutto lo strato muscolare e anche la mucosa e la sottomucosa. Nessun cambiamento nell'espressione di calsequestrina e calreticulina è stato osservato per qualsiasi dose o in qualsiasi momento del trattamento con OB nonostante la maggior estensione del SER osservata al TEM a 10 e a 30 giorni. Secondo la letteratura, la distribuzione cellulare di calreticulina e calsequestrina non è limitata al SER ma è estesa ad altri organelli (63). Infatti, i due anticorpi non marcano solo le cellule muscolari lisce e le ICC ma anche i neuroni, cellule povere di SER. Pertanto, l'assenza di associazione tra marcatura di calreticulina e calsequestrina ed estensione del SER non è sorprendente. Inoltre, non si può escludere che piccole variazioni di espressione di questi due marcatori siano presenti nei ratti trattati con OB, ma potrebbero essere sotto la soglia sistema di rilevazione usato.

Sistema colinergico Negli animali trattati, la marcatura di M2r è significativamente aumentata dopo 30 giorni. Le proprietà di OB di bloccare i recettori M2 sono ben note (56,64). Pertanto, è ragionevole ipotizzare che la persistenza del farmaco induca la cellula a contrastare il blocco di OB aumentando l'espressione del recettore. A questo proposito, i risultati funzionali mostrano un significativo aumento della contrattilità muscolare per l'agonista metacolina rispetto ai controlli e sembrano indicare la presenza di iperattività colinergica.

I dati ottenuti a 30 giorni, come i numerosi mitocondri allineati vicino al plasmalemma, molte caveole, SER esteso, possono essere interpretati come segni di adattamento della cellule muscolari lisce alla presenza del farmaco per mantenere l'attività contrattile.

Cellule interstiziali del Cajal (ICC) Nessun cambiamento ultrastrutturale o immunoistochimico è stato osservato nelle ICC dopo trattamento con OB, anche se queste cellule come le cellule muscolari lisce sono ricche di caveole, SER e mitocondri ed esprimono marcatori delle cellule muscolari lisce come Cav-1 (62,65), eNOS (66), calreticulina e calsequestrina (62). Una possibile spiegazione di questi risultati nelle ICC si basa sulla mancanza di canali Ca^{2+} di tipo L e M2r.

In conclusione, i presenti risultati forniscono nuove informazioni sulle caratteristiche immunoistochimiche delle ICL, e conferiscono un ruolo specifico a questa porzione nella motilità del colon, ruolo che merita di essere chiarito con ulteriori studi. Dopo il trattamento cronico con OB, sia la porzione esterna sia quella interna del muscolo circolare subiscono significativi cambiamenti ultrastrutturali e immunoistochimici, confermando il muscolo circolare come bersaglio preferenziale di OB. Diversi studi hanno portato alla conclusione che il blocco da parte di OB dei canali Ca^{2+} di tipo L costituisce una parte significativa dei suoi effetti terapeutici (48, 57, 61). Tuttavia, è importante anche l'inibizione della trasmissione eccitatoria (51), a causa dell'antagonismo di OB sui recettori per la neurochinina e i recettori muscarinici (56, 64). Per quanto riguarda la trasmissione

tachichinergica, è stato recentemente dimostrato che il trattamento cronico con OB modifica l'espressione e la funzione dei recettori NK1, ma non quella dei recettori NK2. Tuttavia, questo effetto è ritenuto indiretto e dovuto al blocco prolungato dei canali L indotto dal farmaco. Pertanto, sulla base dei risultati precedenti, si può ipotizzare che OB somministrato cronicamente interagisce con due bersagli: i canali L del Ca^{2+} e i recettori muscarinici. Curiosamente, l'individuazione di significativi cambiamenti ultrastrutturali delle cellule muscolari lisce di ratti trattati con OB permettono di ipotizzare che gli effetti del farmaco potrebbero essere di lunga durata, anche dopo la sua interruzione. In queste condizioni sperimentali non si può valutare se queste modifiche siano utili o no, si può ragionevolmente ipotizzare che le cellule muscolari lisce si adattano bene ai livelli più bassi di Ca^{2+} intracellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. de Groat WC. *Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective*. British Journal of Pharmacology (2006) 147.
2. Birder L, Wyndaele JJ. *From urothelial signalling to experiencing a sensation related to the urinary bladder*. Acta Physiol (Oxf). 2013 January; 207(1): 34–39.
3. Ellsworth P, Marschall-Kehrel D, King S, Lukacz E. *Bladder health across the life course*. Int J Clin Pract. 2013 May;67(5):397-406.
4. de Groat WC., Yoshimura N. *Plasticity in reflex pathways to the lower urinary tract following spinal cord injury*. Exp Neurol. 2012 May; 235(1): 123–132.
5. de Groat WC, Wickens C. *Organization of the neural switching circuitry underlying reflex micturition*. Acta Physiol (Oxf). 2013 January; 207(1): 66–84.
6. Birder LA. *Nervous network for lower urinary tract function*. Int J Urol. 2013 January; 20(1): 4–12.
7. . Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. *The neural control of micturition*. Nat Rev Neurosci. 2008 June; 9(6): 453–466.
8. Xavier de França IS, Cruz Enders B, Silva Coura A, Pereira Cruz GK, da Silva Aragão J, Carvalho de Oliveira DR. *Lifestyle and health conditions of adults with spinal cord injury*. Invest Educ Enferm. 2014;32(2):244-51.
9. Galvin LR, Godfrey HPD. *The impact of coping on emotional adjustment to spinal cord injury (SCI): review of*

- the literature and application of a stress appraisal and coping formulation.* Spinal Cord (2001) 39, 615-627
10. Krause JS, McArdle JJ., Pickelsimer E, Reed KS. *A latent variable structural path model of health behaviors after spinal cord injury.* J Spinal Cord Med. 2009;32(2):162-74.
 11. de Groat WC, Yoshimura N. *Changes in Afferent Activity After Spinal Cord Injury.* NeuroUrol Urodyn. 2010; 29(1): 63–76.
 12. Tapia CI, Khalaf K, Berenson K, Globe D, Chancellor M, Carr LK. *Health-related quality of life and economic impact of urinary incontinence due to detrusor overactivity associated with a neurologic condition: a systematic review.* Health Qual Life Outcomes. 2013 Jan 31;11:13.
 13. Linsenmeyer TA. *Use of botulinum toxin in individuals with neurogenic detrusor overactivity: state of the art review.* J Spinal Cord Med. 2013 Sep;36(5):402-19.
 14. Consortium for Spinal Cord Medicine. *Bladder management for adults with spinal cord injury: a clinical practice guideline for health-care providers.* J Spinal Cord Med. 2006;29(5):527-73.
 15. Abrams P, Andersson KE. *Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder.* BJU Int. 2007 Nov;100(5):987-1006.
 16. Mehta S, Hill D, McIntyre A, Foley N, Hsieh J, Ethans K., Teasell RW, Loh E, Welk B, Wolfe D. *Meta-analysis of botulinum toxin A detrusor injections in the treatment of*

- neurogenic detrusor overactivity after spinal cord injury.*
Arch Phys Med Rehabil. 2013 Aug;94(8):1473-81.
17. D'Ancona CA, Ferreira RS, Rassi MC. *Botulinum toxin in neurogenic detrusor overactivity.* Int Neurourol J. 2012 Sep;16(3):139-43.
 18. Abdel-Meguid TA. *Botulinum toxin-A injections into neurogenic overactive bladder--to include or exclude the trigone? A prospective, randomized, controlled trial.* J Urol. 2010 Dec;184(6):2423-8.
 19. Schurch B, de Sèze M, Denys P, Chartier-Kastler E, Haab F, Everaert K, Plante P, Perrouin-Verbe B, Kumar C, Fraczek S, Brin MF; Botox Detrusor Hyperreflexia Study Team. *Botulinum toxin type a is a safe and effective treatment for neurogenic urinary incontinence: results of a single treatment, randomized, placebo controlled 6-month study.* J Urol. 2005 Jul;174(1):196-200.
 20. Kellenberger S, Schild L. *Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure.* Physiol Rev. 2002 Jul;82(3):735-67.
 21. Welsh MJ, Price MP, Xie J. *Biochemical basis of touch perception: mechanosensory function of degenerin/epithelial Na⁺ channels.* J Biol Chem. 2002 Jan 25;277(4):2369-72.
 22. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. *Amiloride-sensitive epithelial*

- Na⁺ channel is made of three homologous subunits.*
Nature. 1994 Feb 3;367(6462):463-7
23. Haerteis S, Krueger B, Korbmacher C, Rauh R. *The δ -Subunit of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) Enhances Channel Activity and Alters Proteolytic ENaC Activation.* J Biol Chem. Oct 16, 2009; 284(42): 29024–29040
 24. Stewart AP, Haerteis S, Diakov A, Korbmacher C, Edwardson JM. *Atomic Force Microscopy Reveals the Architecture of the Epithelial Sodium Channel (ENaC).* J Biol Chem. Sep 16, 2011; 286(37): 31944–31952.
 25. Ben-Shahar Y. *Sensory Functions for Degenerin/Epithelial Sodium Channels (DEG/ENaC).* Adv Genet. 2011 ; 76: 1–26.
 26. Bhalla V, Hallows KR. *Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications.* J Am Soc Nephrol. 2008 Oct;19(10):1845-54.
 27. Smith PR, Mackler SA, Weiser PC, Brooker DR, Ahn YJ, Harte BJ, McNulty KA, Kleyman TR. *Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder.* Am J Physiol. 1998 Jan.
 28. Ferguson DR. *Urothelial function.* BJU International (1999), 84, 235–242
 29. Araki I, Du S, Kamiyama M, Mikami Y, Matsushita K, Komuro M, Furuya Y, Takeda M. *Overexpression of epithelial sodium channels in epithelium of human urinary*

- bladder with outlet obstruction.* Urology. 2004 Dec;64(6):1255-60.
30. Ferguson DR , Kennedy I, Burton TJ. *ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes a possible sensory mechanism?* Journal of Physiology (1997), 505.2, pp.503-511.
 31. Sánchez-Freire V, Blanchard MG, Burkhard FC, Kessler TM, Kellenberger S, Monastyrskaya K. *Acid-sensing channels in human bladder: expression, function and alterations during bladder pain syndrome.* J Urol. 2011 Oct;186(4):1509-16.
 32. Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. *Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities.* Trends Neurosci. 2006 Oct;29(10):578-86.
 33. Gründer S, Geissler HS, Bässler EL, Ruppertsberg JP. *A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland.* Neuroreport. 2000 Jun 5;11(8):1607-11.
 34. Corrow K, Girard BM, Vizzard MA. *Expression and response of acid-sensing ion channels in urinary bladder to cyclophosphamide-induced cystitis.* Am J Physiol Renal Physiol. 2010 May;298(5):F1130-9.
 35. Carattino MD. *Structural mechanisms underlying the function of epithelial sodium channel/acid-sensing ion channel.* Curr Opin Nephrol Hypertens. 2011 September ; 20(5): 555–560.
 36. Kobayashi H, Yoshiyama M, Zakoji H, Takeda M, Araki I. *Sex differences in the expression profile of acid-sensing*

- ion channels in the mouse urinary bladder: a possible involvement in irritative bladder symptoms.* BJU Int. 2009 Dec;104(11):1746-51.
37. Hager H, Kwon TH, Vannikova AK, et al. *Immunocytochemical and immunoelectron microscopic localization of α -, β - and γ -ENaC in rat kidney.* Am J Physiol Ren Physiol 2001; 280:F1093-106.
38. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. *Functional bowel disorders.* Gastroenterology. 2006 Apr;130(5):1480-91.
39. Chang JY, Talley NJ. *An update on irritable bowel syndrome: from diagnosis to emerging therapies.* Curr Opin Gastroenterol. 2011 Jan;27(1):72-8.
40. Soares RL. *Irritable bowel syndrome: a clinical review.* World J Gastroenterol. 2014 Sep 14;20(34):12144-60.
41. Boeckxstaens G, Corazzari ES, Mearin F, Tack J. *IBS and the role of otilonium bromide.* Int J Colorectal Dis. 2013 Mar;28(3):295-304.
42. Wall GC, Bryant GA, Bottenberg MM, Maki ED, Miesner AR. *Irritable bowel syndrome: a concise review of current treatment concepts.* World J Gastroenterol. 2014 Jul 21;20(27):8796-806.
43. Traini C, Fausson-Pellegrini MS, Evangelista S, Mazzaferro K, Cipriani G, Santicioli P, Vannucchi MG. *Inner and outer portions of colonic circular muscle: ultrastructural and immunohistochemical changes in rat*

- chronically treated with otilonium bromide.* PLoS One. 2014 Aug 14;9(8):e103237.
44. Sanders KM. *Regulation of smooth muscle excitation and contraction.* Neurogastroenterol Motil. 2008 May;20 Suppl 1:39-53.
 45. Sarna SK. *Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Oct;291(4):G545-55.
 46. Tobin G, Giglio D, Lundgren O. *Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract.* J Physiol Pharmacol. 2009 Mar;60(1):3-21.
 47. Rychter J, Espín F, Gallego D, Vergara P, Jiménez M, Clavé P. *Colonic smooth muscle cells and colonic motility patterns as a target for irritable bowel syndrome therapy: mechanisms of action of otilonium bromide.* Therap Adv Gastroenterol. 2014 Jul;7(4):156-66.
 48. Traini C, Cipriani G, Evangelista S, Santicioli P, Fausone-Pellegrini MS, Vannucchi MG. *Chronic treatment with otilonium bromide induces changes in L-type Ca²⁺ channel, tachykinins, and nitric oxide synthase expression in rat colon muscle coat.* Neurogastroenterol Motil. 2013 Nov;25(11):e728-39.
 49. Clavé P, Acalovschi M, Triantafillidis JK, Uspensky YP, Kalayci C, Shee V, Tack J; OBIS Study Investigators. *Randomised clinical trial: otilonium bromide improves frequency of abdominal pain, severity of distention and*

- time to relapse in patients with irritable bowel syndrome.* Aliment Pharmacol Ther. 2011 Aug;34(4):432-42.
50. Tack J, Fried M, Houghton LA, Spicak J, Fisher G. *Systematic review: the efficacy of treatments for irritable bowel syndrome--a European perspective.* Aliment Pharmacol Ther. 2006 Jul 15;24(2):183-205.
51. Gallego D, Aulí M, Aleu J, Martínez E, Rofes L, Martí-Ragué J, Jiménez M, Clavé P. *Effect of otilonium bromide on contractile patterns in the human sigmoid colon.* Neurogastroenterol Motil. 2010 Jun;22(6):e180-91.
52. Candenas L, Lecci A, Pinto FM, Patak E, Maggi CA, Pennefather JN. *Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract.* Life Sci. 2005 Jan 7;76(8):835-62.
53. Holzer P, Holzer-Petsche U. *Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications.* Curr Opin Pharmacol. 2001 Dec;1(6):583-90.
54. Lecci A, Capriati A, Altamura M, Maggi CA. *Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human.* Auton Neurosci. 2006 Jun 30;126-127:232-49.
55. Holzer P, Holzer-Petsche U. *Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function.* Pharmacol Ther. 1997;73(3):173-217.
56. Martínez-Cutillas M, Gil V, Gallego D, Mañé N, Martín MT, Jiménez M. *Mechanisms of action of otilonium bromide (OB) in human cultured smooth muscle cells and*

- rat colonic strips*. Neurogastroenterol Motil. 2013 Dec;25(12):e803-12.
57. Strege PR, Evangelista S, Lyford GL, Sarr MG, Farrugia G. *Otilonium bromide inhibits calcium entry through L-type calcium channels in human intestinal smooth muscle*. Neurogastroenterol Motil. 2004 Apr;16(2):167-73.
58. Lee HT, Hennig GW, Fleming NW, Keef KD, Spencer NJ, Ward SM, Sanders KM, Smith TK. *The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine*. Gastroenterology. 2007 May;132(5):1852-65.
59. Teng B, Murthy KS, Kuemmerle JF, Grider JR, Sase K, Michel T, Makhlouf GM. *Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells*. Am J Physiol. 1998 Aug;275(2 Pt 1):G342-51.
60. Huber A, Saur D, Kurjak M, Schusdziarra V, Allescher HD. *Characterization and splice variants of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine*. Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 1):G1146-56.
61. Martin MT, Hove-Madsen L, Jimenez M. *Otilonium bromide inhibits muscle contractions via L-type calcium channels in the rat colon*. Neurogastroenterol Motil. 2004 Apr;16(2):175-83.
62. Cho WJ, Daniel EE. *Proteins of interstitial cells of Cajal and intestinal smooth muscle, colocalized with caveolin-1*.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005 Mar;288(3):G571-85.
63. Copray JC, Liem RS, Kernell D. *Calreticulin expression in spinal motoneurons of the rat*. J Chem Neuroanat. 1996 Jul;11(1):57-65.
64. Santicioli P, Zagorodnyuk V, Renzetti AR, Maggi CA. *Antimuscarinic, calcium channel blocker and tachykinin NK2 receptor antagonist actions of otilonium bromide in the circular muscle of guinea-pig colon*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1999 May;359(5):420-7.
65. Cipriani G, Serboiu CS, Gherghiceanu M, Fausone-Pellegrini MS, Vannucchi MG. *NK receptors, Substance P, Ano1 expression and ultrastructural features of the muscle coat in Cav-1(-/-) mouse ileum*. J Cell Mol Med. 2011 Nov;15(11):2411-20.
66. Vannucchi MG, Corsani L, Bani D, Fausone-Pellegrini MS. *Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms*. Neurosci Lett. 2002 Jul 5;326(3):191-5.