

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE PEDIATRICHE XVI CICLO**

Coordinatore del Corso Prof. S. Auricchio

**EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA E TERAPIA
DELL'INSUFFICIENZA INTESTINALE IN ETÀ
PEDIATRICA**

CANDIDATO
Dott. Giulio De Marco

TUTORE
Prof. Alfredo Guarino

ANNO ACCADEMICO 2002-2003

INDICE

Capitolo 1. Definizione e introduzione all'insufficienza intestinale.	pag.	3
Capitolo 2. Epidemiologia dell'insufficienza intestinale in età pediatrica in Italia.		
Introduzione	pag.	6
Metodi	pag.	6
Risultati	pag.	7
Discussione	pag.	8
Capitolo 3. Storia naturale dell'insufficienza intestinale in età pediatrica in Italia.		
Introduzione	pag.	10
Metodi	pag.	10
Risultati	pag.	11
Discussione	pag.	13
Capitolo 4. Modelli sperimentali di insufficienza intestinale: l'infezione da Rotavirus.		
Introduzione	pag.	15
Metodi	pag.	16
Risultati	pag.	17
Discussione	pag.	21
Capitolo 5. Ruolo e meccanismo d'azione dell'ossido nitrico sulla regolazione del trasporto di ioni negli enterociti.		
Introduzione	pag.	23
Metodi	pag.	24
Risultati	pag.	25
Discussione	pag.	28
Capitolo 6. Effetti e meccanismi di azione dell'ormone della crescita sulla crescita cellulare e sul trasporto di ioni nell'intestino.		
Introduzione	pag.	29
Metodi	pag.	31
Risultati	pag.	33
Discussione	pag.	37
Capitolo 7. Efficacia dell'ormone della crescita nel trattamento di bambini con insufficienza intestinale.		
Introduzione	pag.	39
Metodi	pag.	40
Risultati	pag.	41
Discussione	pag.	45
Capitolo 8. Considerazioni conclusive.	pag.	48
BIBLIOGRAFIA	pag.	50
Appendice. Pubblicazioni scientifiche prodotte nell'ambito del Dottorato di Ricerca.	pag.	57

1. DEFINIZIONE E INTRODUZIONE ALL' INSUFFICIENZA INTESTINALE

L'insufficienza intestinale (I.I.) è una condizione patologica cronica in cui l'intestino non è in grado di soddisfare i bisogni nutrizionali dell'organismo e la sopravvivenza o la crescita del paziente sono possibili solo con un regime di nutrizione artificiale. Il carattere permanente di tali alterazioni consente di definire la I.I. come generalmente irreversibile. La definizione di I.I. deriva dal riconoscimento della sindrome della "diarrea intrattabile dell'infanzia" che originariamente descriveva una diarrea persistente iniziata entro i 3 mesi di vita, senza evidenza di infezioni intestinali, non responsiva al trattamento e gravata da un alto tasso di mortalità (1).

Negli anni '70 e '80 la maggioranza dei casi di diarrea intrattabile era affetta da celiachia, intolleranza secondaria ai disaccaridi o alle proteine del latte vaccino (2). Successivamente le più frequenti cause di diarrea intrattabile sono state quelle infettive (50% circa dei casi) e le intolleranze alimentari (20%) (3).

Negli anni '80 e '90 la mortalità legata all'I.I. era precoce e altissima (4). Più recentemente, l'individuazione precoce di enteropatie specifiche suscettibili di terapia farmacologica o dietetica ha determinato una riduzione dei casi di I.I. Parallelamente il pattern eziologico della I.I. è notevolmente cambiato e sono state identificate alterazioni strutturali primitive dell'enterocita responsabili di diarrea intrattabile. Un'altra causa recentemente identificata di diarrea intrattabile è l'enteropatia autoimmune, in cui una specifica reazione autoimmunitaria, con la produzione di autoanticorpi anti-enterocita, è responsabile di danno intestinale (5). Allo stato attuale l'I.I. è il risultato di patologie intestinali primitive e generalmente irreversibili. Del tutto recentemente sono state descritte specifiche alterazioni congenite dell'ontogenesi dell'enterocita, come i difetti congeniti di $\alpha_6\beta_4$ integrina e di eparan-solfato, che rendono conto della progressiva riduzione del numero di casi di insufficienza intestinale senza causa nota (6). Queste, insieme alle alterazioni anatomiche e post-chirurgiche (intestino corto), alle forme su base immunologica (allergica, infiammatoria, autoimmune) ed alle alterazioni della motilità (pseudoostruzione intestinale cronica), costituiscono i quattro principali gruppi di eziologie che conducono all'I.I.

A partire dalla fine degli anni '60, la nutrizione parenterale (NP) ha permesso la sopravvivenza a lungo termine di adulti e bambini con I.I.. Le attuali tecnologie permettono che la NP venga effettuata anche a casa del paziente consentendogli una buona qualità di vita ed una sopravvivenza indefinita. Sono stati effettuati trial

preliminari con farmaci in grado di modificare le alterazioni intestinali con particolare riguardo alla immunosoppressione, alla motilità e all'assorbimento di elettroliti. Parallelamente, vengono proposti in numero crescente, nuovi approcci chirurgici e, in particolare, il trapianto di intestino.

L'identificazione della patologia responsabile dell'I.I. è cruciale per definire appropriate strategie di intervento. L'intestino corto, ad esempio, è una delle cause più frequenti di I.I. in età pediatrica e di dipendenza dalla NP. La conoscenza dei meccanismi che regolano il trasporto di elettroliti e nutrienti a livello intestinale e dei meccanismi che stimolano l'adattamento intestinale è fondamentale per lo sviluppo di strategie terapeutiche volte a stimolare il processo fisiologico di adattamento intestinale. È stato dimostrato che una combinazione di dieta ad alto contenuto di carboidrati, la somministrazione di glutamina e di ormone della crescita (GH) determinava, in una popolazione di pazienti adulti con intestino corto post-chirurgico, un miglioramento dell'assorbimento di nutrienti, la riduzione del volume fecale, e la riduzione dei volumi di NP (7).

Data la complessità ed eterogeneità delle cause di I.I., è indispensabile lo sviluppo di strette connessioni tra centri con alta competenza e specializzazione nei campi di clinica, chirurgia e ricerca. Nell'ambito della Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (SIGEP) è stato costituito un network nazionale per l'I.I. in età pediatrica che ha identificato centri di riferimento nazionali per l'approccio diagnostico ed il supporto nutrizionale a questi pazienti (8). Nel periodo 1997-2000 il network ha arruolato 74 bambini con I.I.. In questo gruppo di pazienti l'eziologia più frequente era la Sindrome da intestino corto (28%) seguita da intolleranze alimentari multiple (14%), enteropatia tipo "tufting" (11%), pseudoostruzione intestinale cronica da alterazione neuronale o muscolare (9%), atrofia congenita dei microvilli ed enteropatia autoimmune (8%). Il 22% dei casi non aveva una diagnosi eziologica.

Un ruolo molto importante nell'approccio all'I.I. è svolto dalla chirurgia. In particolare, in bambini con intestino corto, sono stati proposti interventi di "allungamento intestinale" che mirano all'aumento della superficie intestinale totale (9). I primi trapianti di intestino furono tentati nell'uomo negli anni '60, ma non ebbero alcun successo soprattutto per l'inefficacia dei farmaci immunosoppressivi utilizzati. L'introduzione dell'FK 506/Tacrolimus, insieme con rilevanti innovazioni di tecnica chirurgica, hanno significativamente migliorato la sopravvivenza del trapianto e del paziente (10,11). Il trapianto di intestino è attualmente indicato in caso di complicazioni

potenzialmente letali dovute alla sottostante patologia intestinale o alle complicanze correlate alla NPT (insufficienza epatica terminale secondaria a NPT, perdita di accessi vascolari, sepsi ricorrenti da catetere) (12). Con il miglioramento della terapia di controllo del rigetto, che ha condotto ad un aumento della sopravvivenza, il trapianto precoce di intestino potrebbe essere indicato prima dell'instaurarsi delle complicanze correlate alla NPT (13-15).

La conoscenza del pattern eziologico e della fisiopatologia della I.I. consente l'utilizzo di farmaci. Il trattamento con immunosoppressori è spesso efficace nei casi di enteropatia autoimmune. Il controllo della colestasi associata ad NPT di lunga durata, con la somministrazione di Ac. Ursodesossicolico, ha consentito un lungo periodo di NP in molti casi (16). Recentemente è stato proposto il trattamento con farmaci attivi sul trasporto intestinale di ioni e acqua e con fattori trofici. Partendo da dati ottenuti in vitro è stata dimostrata l'efficacia dell'octreotide, un analogo della somatostatina, nel ridurre l'output fecale in bambini con diarrea cronica secretiva (17,18).

Recentemente il GH è stato utilizzato in vitro ed in vivo e si è mostrato efficace nell'indurre aumento della superficie intestinale in pazienti con intestino corto e promuovere l'adattamento intestinale (19,20). Il GH esercita due distinti effetti di importanza cruciale: un effetto proassorbitivo sul trasporto transepiteliale di elettroliti ed acqua ed un effetto trofico su enterociti (21). Entrambi gli effetti sono desiderabili in condizioni di diarrea grave e di lunga durata in cui l'atrofia epiteliale è associata a secrezione di sodio e cloro.

L'obiettivo delle ricerche esposte in questa Tesi è quello di un avanzamento nelle conoscenze nel campo dell'I.I. in età pediatrica. In capitoli specifici sono stati affrontati, con approcci di ricerca differenti, diversi aspetti dell'I.I. dall'epidemiologia alla storia naturale. Attraverso l'utilizzo di modelli sperimentali in vitro sono stati studiati inoltre i meccanismi fisiologici di controllo dell'omeostasi idroelettrolitica intestinale e meccanismi di risposta intestinale alle infezioni. Infine sono stati studiati i meccanismi di azione del GH, proposto come terapia dell'I.I., e parallelamente, lo stesso GH è stato utilizzato per il trattamento farmacologico dell'I.I.

2. EPIDEMIOLOGIA DELL'INSUFFICIENZA INTESTINALE IN ETÀ PEDIATRICA IN ITALIA

Introduzione

L'insufficienza intestinale è l'outcome di un ampio range di malattie primitive dell'intestino o extraintestinali che, secondariamente, conducono a deficit delle funzioni digestivo-assorbitive intestinali (3). Nel momento in cui si viene a creare una condizione di I.I., la durata di questa condizione è critica in termini di prognosi e di gestione, poiché regimi di NP di lunga durata sono associati a complicanze severe e ad un alto tasso di mortalità (4). La presenza di specifiche opzioni terapeutiche sia mediche che chirurgiche, incluso il trapianto di intestino, rendono necessario un approccio specifico per il singolo paziente e, d'altro canto, una pianificazione multicentrica che unisca lo specialista clinico e il chirurgo.

Nella popolazione pediatrica l'I.I. è spesso il risultato di una patologia primariamente intestinale. Etiologie diverse ed eterogenee sono riconosciute attualmente come responsabili di I.I. di lunga durata. Schematicamente le cause di I.I. possono essere classificate in: a) alterazioni anatomiche che includono l'intestino corto congenito o post-chirurgico; b) alterazioni strutturali dell'enterocita che includono l'atrofia congenita dei microvilli e la displasia epiteliale (o tufting enteropathy); c) disordini su base infiammatoria o immunologica, che includono l'enteropatia autoimmune, le intolleranze alimentari multiple e il M. di Crohn; d) i disordini della motilità, principalmente la pseudoostruzione cronica intestinale.

Data l'eterogeneità e la rarità delle condizioni che conducono a I.I., dati sufficientemente ampi sull'epidemiologia di questa condizione clinica non sono riportati in letteratura. La disponibilità di dati epidemiologici sono essenziali per identificare priorità di intervento per bambini con I.I., la disponibilità di. A tale scopo è stato utilizzato un approccio sperimentale combinato per stimare l'incidenza e la prevalenza di I.I. nella popolazione pediatrica italiana.

Metodi

L'I.I. è stata definita come una patologia primariamente intestinale per la quale è stata necessaria la somministrazione di NP di almeno il 75% dell'input calorico totale per almeno 4 settimane, oppure di almeno il 50% dell'input calorico totale per almeno 3 mesi.

I dati sono stati raccolti utilizzando le seguenti fonti: 1) il Network italiano per l'insufficienza intestinale in età pediatrica, che include i maggiori centri nazionali di gastroenterologia pediatrica (22); 2) i registri della ditta Baxter, una società privata che, in convenzione con il Sistema Sanitario Nazionale, fornisce assistenza domiciliare e nutrizione parenterale ai pazienti con I.I., su tutto il territorio nazionale; 3) dati forniti da centri di chirurgia pediatrica dalla Società Italiana di Chirurgia Pediatrica che hanno riportato retrospettivamente il numero di bambini con I.I.; 4) i dati del Sistema Sanitario Nazionale, attraverso la consultazione con i codici di malattia di database disponibili via internet (www.ministerosalute.it)

L'incidenza e la prevalenza di I.I. sono stati calcolati sulla base dei nati vivi per anno e del numero totale di bambini (0-14 anni) in Italia nell'anno 2000 secondo l'ISTAT.

Risultati

Al termine dell'anno 2000, il Network italiano per l'I.I. in età pediatrica seguiva in follow up 47 bambini con I.I.. Nello stesso tempo la Baxter seguiva in terapia domiciliare 29 bambini di cui 9 non erano inclusi nel Network. I centri di chirurgia pediatrica gestivano altri 9 casi. Sulla base di questi dati la prevalenza di I.I. al termine dell'anno 2000 in Italia era di 0.78×10^{-5} bambini (tabella 2.1).

Tabella 2.1. Numero di bambini con insufficienza intestinale, in Italia, alla fine dell'anno 2000.

<i>Fonti</i>	numero di bambini
Network italiano per l'I.I.	47
Baxter S.p.A.	9
Chirurgie pediatriche	9
<i>Totale</i>	65

L'incidenza di I.I. era stimata sulla base del numero di nuovi casi arruolati dal Network e dalla Baxter negli anni 1999 e 2000, divisi per il numero dei nati vivi per anno. L'incidenza così calcolata era di 2.6×10^{-5} , e 2×10^{-5} (nel 1999 e 2000, rispettivamente) (tabella 2.2).

La sindrome da intestino corto (SBS) rappresentava in maniera consistente il 25% circa di tutti i bambini con I.I. seguiti dal Network e dalla Baxter. Utilizzando il codice

sanitario (delle schede di dimissione ospedaliera) per “malassorbimento post-chirurgico”, il codice più aderente alla SBS, questa aveva un’incidenza di 1.5×10^{-5} nel 1999. Su questa base, l’incidenza di I.I. sarebbe di 6×10^{-5} (tabella 2.2).

Tabella 2.2. Incidenza di insufficienza intestinale in età pediatrica in Italia negli anni 1999-2000.

<i>Fonti</i>	1999	2000
Network + Baxter + Chirurgie	2.6×10^{-5}	2×10^{-5}
Codici di malattia per SBS	6×10^{-5}	Non disponibile
Codici di malattia per NEC	$1.2-2 \times 10^{-5}$	Non disponibile

L’enterocolite necrotizzante (NEC) è riconosciuta come la singola causa più frequente di SBS, essendo responsabile di circa il 30-50% di tutte gli SBS (23-25). Circa il 35% di tutti i neonati con NEC ricevono un trattamento chirurgico e una media del 6% sviluppa una SBS (26-31). L’incidenza di NEC in Italia nell’anno 1999 è stata di 6.7×10^{-5} . Questo risulterebbe in $0.3-0.5 \times 10^{-5}$ nuovi casi di SBS per anno e in $1.2-2 \times 10^{-5}$ bambini con I.I. per anno (tabella 2.2).

Discussione

Questo studio rappresenta il primo tentativo di valutare l’epidemiologia dell’I.I. in un intero paese. Poiché in una nazione sono disponibili dati demografici e statistici omogenei, è stato possibile valutare l’incidenza di I.I. I risultati complessivi mostrano che l’incidenza complessiva di I.I. in Italia è compresa tra 1.2×10^{-5} e 6×10^{-5} . La prevalenza è di 0.67×10^{-5} .

Inoltre qui è stato utilizzato un approccio combinato per stimare l’incidenza e la prevalenza di I.I. in età pediatrica in Italia. L’utilizzo di una strategia multipla è stato necessario per l’eterogeneità della condizione ed è stata possibile per la presenza di multiple fonti di dati. L’I.I. è una condizione rara che necessita di un approccio ed una gestione di elevata complessità, così come la cooperazione tra centri con competenze diverse. Il Network italiano per l’I.I. in età pediatrica si è dimostrato uno strumento molto efficace per la copertura dell’intera popolazione italiana di bambini con I.I.,

nonostante una certa sottostima sia possibile per la possibile presa in carico di casi sporadici da parte di centri minori non inclusi nel Network.

L'I.I. è una sfida continua per il pediatra gastroenterologo (32). La sua complessità nasce dall'eterogeneità delle cause, dalla severità clinica, dalla necessità di NP e, infine, dalle terapie specifiche che includono il trapianto di intestino. Nel caso di patologie così rare e complesse come l'I.I. la conoscenza della sua epidemiologia fornisce le basi per l'ottimizzazione delle risorse cliniche.

3. STORIA NATURALE DELL'INSUFFICIENZA INTESTINALE IN ETÀ PEDIATRICA IN ITALIA

Introduzione

Un numero crescente di nuove condizioni patologiche sono riconosciute come causa di I.I.. Nonostante negli ultimi anni siano state identificate nuove specifiche cause di I.I. e ne siano stati caratterizzati i meccanismi molecolari, in un numero discreto di casi la causa dell'I.I. resta ancora sconosciuta. Grazie alle migliori conoscenze scientifiche e ai progressi nella nutrizione clinica, l'aspettativa di vita dei bambini con I.I. è progressivamente migliorata (33-35). L'I.I. resta una condizione clinica complessa con una qualità di vita non ottimale e gravata da elevati costi sanitari e sociali. Bambini con I.I. sono di solito seguiti presso centri di riferimento per queste specifiche patologie, ma l'esiguità del numero di casi rende indispensabile la cooperazione tra i centri e lo sviluppo di approcci diagnostico-terapeutici comuni. Nel 1997 è diventato operativo il Network italiano per l'I.I. in età pediatrica, nato nell'ambito della Società Italiana di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica (22). Attraverso la collaborazione tra i centri partecipanti è stata ottenuta, da un lato, la disponibilità per ogni paziente dell'expertise e delle procedure disponibili in ogni centro, dall'altro che ogni centro ricevesse informazioni su bambini con I.I. seguiti in tutta Italia e accrescesse così le proprie competenze.

Attraverso il Network nazionale è stata valutata l'epidemiologia dell'I.I. in Italia ed è stata studiata la sua storia naturale ed il suo outcome in relazione all'etiologia dell'I.I.

Metodi

Sono stati arruolati tutti i bambini con I.I. seguiti da gennaio 1997 a dicembre 2001 nei centri partecipanti al Network nazionale per l'I.I. in età pediatrica. I dati sono stati ottenuti e aggiornati attraverso moduli di arruolamento e follow up trasmessi annualmente via internet al centro di coordinamento. Sono stati valutati i seguenti parametri: età di esordio dei sintomi gastrointestinali; età di inizio della NP; durata della NP; evoluzione del caso. I bambini sono stati raggruppati sulla base della causa primitiva di I.I. in 5 gruppi maggiori: sindrome da intestino corto (SBS), disordini della motilità (MD), difetti strutturali dell'enterocita (SED), intolleranze alimentari multiple (IF), enteropatia autoimmune (AIE). Bambini che non potevano rientrare in nessuno di questi gruppi o la cui etiologia era sconosciuta è stato classificato in un sesto gruppo.

Risultati

Tabella 3.1. Caratteristiche generali dei bambini con insufficienza intestinale (n = 109)

	<i>Media ± SD</i>	<i>Mediana (range)</i>
Età di esordio dei sintomi (mesi)	8.4 ± 27.2	0 (0-192)
Età di inizio della NP (mesi)	16.3 ± 40.7	2 (0-200)
Follow-up (mesi)	50.3 ± 46.3	41 (2-252)
Durata della NP (mesi)	35.1 ± 46.4	18 (1-252)

Tabella 3.2. Etiologia dell'insufficienza intestinale in 109 bambini

<i>Etiologia</i>	<i>numero(%)</i>
Sindrome da intestino corto	48 (44.0)
Disordini della motilità	16 (14.7)
Difetti strutturali dell'enterocita	14 (12.8)
Intolleranze alimentari	10 (9.2)
Enteropatia autoimmune	7 (6.5)
Enterocolite citomegalovirus-indotta	2 (1.8)
Enteropatia protido-disperdente	1 (0.9)
Linfangectasia intestinale	1 (0.9)
Malassorbimento di Glucosio-galattosio	1 (0.9)
Malassorbimento primitivo degli acidi biliari	1 (0.9)
Munchausen per procura	1 (0.9)
Unknown	7 (6.5)

Nei 5 anni dello studio sono stati arruolati 109 bambini con I.I. dai 9 centri aderenti allo studio. Le caratteristiche generali di questi bambini sono riportate in tabella 3.1.

Le cause di I.I. sono riportate in tabella 3.2. Rispetto a serie precedenti si è ottenuto, grazie all'applicazione del modello del Network, una riduzione dei casi senza diagnosi.

Sono state analizzate le caratteristiche dei pazienti appartenenti ai 5 gruppi etiopatogenetici principali ed è stato osservato che, una volta raggruppati per diagnosi, era possibile distinguere in maniera significativa alcune caratteristiche e l'outcome dell'I.I.. Sia l'età di esordio della sintomatologia che l'età di inizio della NP variano in relazione all'etiologia della I.I. (figura 3.1).

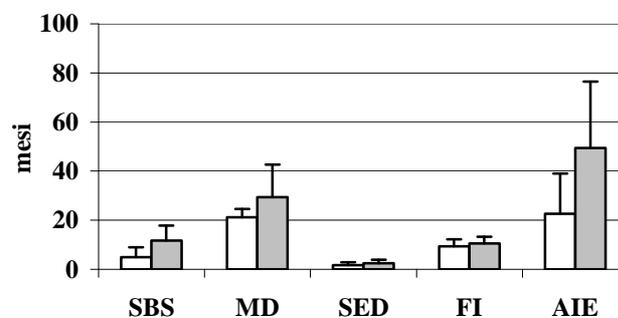


Figura 3.1. Relazione tra età di esordio della sintomatologia (colonne bianche) ed età di inizio della NP (colonne grigie). Sindrome da intestino corto (SBS), disordini della motilità (MD), alterazioni strutturali dell'enterocita (SED), intolleranze alimentari (FI), enteropatia autoimmune(AIE).

Anche la differenza di tempo tra l'esordio dei sintomi e l'inizio della NP, che è un marcatore di gravità della malattia, varia a seconda dell'etiologia primitiva (figura 3.1). Si può infatti assumere che un tempo breve indichi una I.I. ad esordio precoce e generalmente più grave sul piano clinico rispetto a forme ad esordio tardivo. E' stato quindi analizzato l'outcome dei bambini con I.I. in relazione al gruppo etiopatogenetico. I diversi gruppi differiscono per la durata totale della NP, ma soprattutto, differiscono per la probabilità di raggiungere la sufficienza intestinale, di essere cioè svezzati dalla NP. I dati mostrati in figura 3.2 mostrano come i bambini con I.I. secondaria a intolleranze alimentari multiple sono svezzati dalla NP nel 100% dei casi ed in un tempo piuttosto breve. All'opposto, bambini con atrofia congenita dei microvilli o tufting enteropathy (SED) non hanno nessuna possibilità di liberarsi dalla NP. Pattern

intermedi si osservano per l'enteropatia autoimmune (AIE) che, grazie alla terapia immunosoppressiva, è reversibile nella maggior parte dei casi, per la sindrome da intestino corto (SBS) e, seppur con una prognosi peggiore, per i disturbi della motilità (MD).

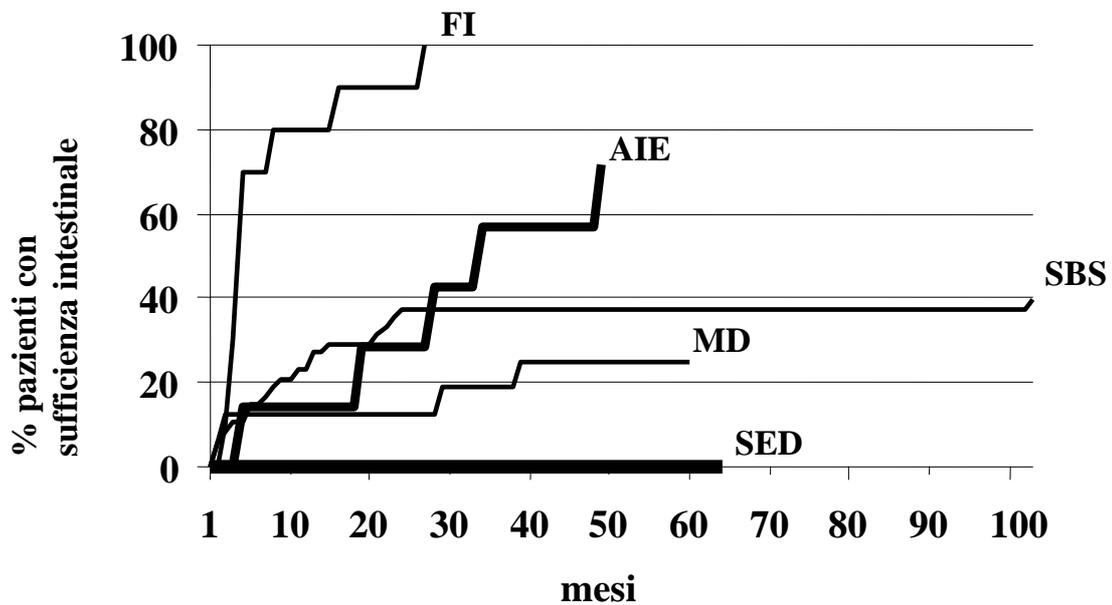


Figura 3.2. Raggiungimento della sufficienza intestinale, corrispondente allo svezzamento dalla nutrizione parenterale, in relazione al tempo e per gruppo etiologico.

Discussione

Attraverso lo sviluppo di un modello assistenziale nazionale di rete e attraverso lo scambio di informazioni cliniche e/o campioni biologici, il Network per l'I.I. ha permesso di migliorare le conoscenze sull'I.I. e sulla sua storia naturale, di migliorare l'approccio clinico sia diagnostico che terapeutico a livello nazionale, e di migliorare l'expertise dei singoli centri partecipanti, portando ad un sostanziale miglioramento della gestione del bambino con I.I.

Attraverso questo lavoro è stata raccolta la casistica più ampia di bambini con I.I. ed in maniera prospettica per 5 anni. I risultati di questo lavoro dimostrano che la causa dell'I.I. è di cruciale importanza per la prognosi del bambino e quindi per programmare la gestione del caso a breve e lungo termine. I risultati di questo lavoro infatti dimostrano come, mentre per alcune patologie come le intolleranze alimentari e l'enteropatia autoimmune l'I.I. è una condizione generalmente benigna e transitoria, per altre come i difetti strutturali dell'enterocita, non vi è alcuna possibilità di svezzamento

dalla NP. Pertanto tali bambini vanno avviati al più presto ad altre terapie quali il trapianto di intestino.

I risultati di questa parte delle ricerche svolte sono oggetto di due pubblicazioni scientifiche riportate in appendice.

4. MODELLI SPERIMENTALI DI INSUFFICIENZA INTESTINALE: L'INFEZIONE DA ROTAVIRUS

Introduzione

La gastroenterite acuta è la causa più frequente di mortalità nei paesi in via di sviluppo e di morbilità nei paesi sviluppati. Il Rotavirus (RV) è l'agente più frequente di gastroenterite acuta in età pediatrica (36). Il RV è comunque responsabile di un numero elevato di casi di diarrea protratta e, seppure molto raramente, è in grado di causare una vera e propria insufficienza intestinale, soprattutto in bambini immunodeficienti (37). Nonostante i costi molto elevati correlati alla patologia da RV, non è disponibile alcuna terapia antivirale specifica e un grosso sforzo è stato posto nello sviluppo di un vaccino sicuro ed efficace.

Il RV infetta gli enterociti maturi dei villi del piccolo intestino. I meccanismi responsabili della diarrea indotta da RV sono molteplici e complessi. Questi includono il danno diretto dell'enterocita con distruzione dei microvilli, dei microfilamenti e delle tight junction, l'inibizione delle disaccaridasi di membrana e del cotrasportatore sodio/glucosio (38,39).

Diversi dati in letteratura suggeriscono che il danno enterocitario e il seguente malassorbimento non possono spiegare completamente la patogenesi dell'infezione da RV (38,40-42). Inoltre una diarrea precoce e acquosa si verifica prima dell'evidenza del danno villare e delle altre modifiche microscopiche indotte dal RV (43-46). Più recentemente, studi su modelli animali di infezione, hanno portato alla scoperta di meccanismi responsabili di secrezione intestinale di acqua ed elettroliti durante l'infezione da RV. Cellule infettate con RV rilasciano una proteina non strutturale del virus, chiamata non structural protein 4 (NSP4), che media molti dei meccanismi patogenetici del RV e stimola nel topo una secrezione di cloro calcio-dipendente (47-50). Lundgren *et al.* hanno dimostrato inoltre che il sistema nervoso enterico è implicato nella diarrea da RV, probabilmente attraverso l'attivazione di riflessi secretori ed il rilascio di neurotrasmettitori prosecretivi (51).

Il RV è in grado di infettare cellule Caco-2 e di indurre lisi cellulare e danno tissutale (52). Le immunoglobuline sieriche umane (Igs) sono in grado di inibire l'infezione da RV in cellule Caco-2, riducendo il danno cellulare attraverso un effetto diretto anti-RV (53).

L'uso clinico delle Igs somministrate per via orale fu inizialmente proposto per la diarrea severa protratta (54). Quindi la loro efficacia fu dimostrata in bambini con gastroenterite acuta (55). E' interessante notare che l'effetto delle Igs era particolarmente evidente nelle primissime fasi della diarrea (55).

In questo capitolo sono riportati i risultati sperimentali dell'effetto del RV sul trasporto transepiteliale di ioni in un modello di infezione in cellule Caco-2. E' stato inoltre testato l'effetto delle Igs in questo modello di infezione in vitro.

Metodi

Colture cellulari

Cellule Caco-2, ottenute dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD), sono state cresciute in DMEM con 10% di siero bovino fetale, 1% aminoacidi non-essenziali, 50 mU/ml penicillina, 50 mg/ml streptomicina (56). L'infezione con RV è stata effettuata come già riportato in cellule differenziate 15-18 giorni dopo aver raggiunto la confluenza, cresciute su filtri di policarbonato.

Ceppo virale e protocollo di infezione

E' stato utilizzato il ceppo di RV SA11 per il quale è stata dimostrata in precedenza la capacità di infettare e riprodursi efficientemente in cellule Caco-2 (57,58). Il virus veniva attivato con 20µg/ml di tripsina per 30 minuti a 37°C (53,59). Cellule Caco-2 venivano lavate 2 volte e incubate per 12 ore con DMEM senza siero prima dell'infezione. La sospensione virale era aggiunta dal lato apicale del monostrato cellulare e, dopo una incubazione di 60 minuti a 37°C, le cellule venivano nuovamente lavate ed incubate in DMEM senza siero per il tempo predefinito. I tempi venivano definiti a partire dal lavaggio e dalla rimozione del virus in eccesso, non internalizzato, dopo l'infezione. La carica virale è stata determinata con un Plaque Forming Units (PFU) test con cellule MA104 (60).

Studio del trasporto di ioni

Abbiamo utilizzato il modello sperimentale delle camere di Ussing (55). Le cellule erano cresciute in monostrati su filtri di policarbonato (Costar Italia, Milano) per 15-18 giorni post-confluenza. L'area del filtro era di 4.9 cm². Ogni filtro era montato in una camera (WPI, Sarasota, FL). Ogni compartimento della camera (mucosale e sierosale)

conteneva 5 ml di Ringer con la seguente composizione (in millimoli / litro): 114 NaCl, 5 KCl, 1.65 Na₂HPO₄, 0.3 NaH₂PO₄, 1.25 CaCl₂, 1.1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 10 glucosio, che era costantemente insufflata con 5%CO₂-95%O₂, e mantenuta a 37° C mediante l'uso di un sistema di circolazione a pompa regolato da un termostato.

L'infezione era effettuata con 5 PFU di RV per cellula. A diversi tempi dall'infezione venivano misurati i seguenti parametri elettrici: differenza di potenziale transepiteliale (*PD*), corrente di corto circuito (*I_{sc}*), e conduttanza ionica (*G*). *I_{sc}* è espresso in microamperes per centimetro quadrato (μA/cm²), *G* in millisiemens per centimetro quadrato (mS/cm²), e *PD* in millivolts (mV).

Per studiare il ruolo del Cl⁻, SO₄²⁻ sostituiva il Cl⁻ a concentrazioni equimolari. E' stato poi utilizzato un inibitore dei canali del Cl⁻, il 5-nitro-2-(3-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) come già dimostrato (62).

Per studiare il ruolo del Ca²⁺, è stata utilizzata una soluzione di Ringer modificata (in millimoli / litro): 1.65 Na₂HPO₄, 0.3 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 53 NaCl, 5 KCl, 30.5 Na₂SO₄, 2.35 MgCl₂, 10 glucosio, 30.5 mannitolo. Inoltre abbiamo utilizzato il chelante del calcio 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid/acetoxymethyl ester (BAPTA/AM) (62).

Misura della resistenza transepiteliale

La resistenza transepiteliale (TER) del monostrato cellulare è stata misurata mediante il Millicel-ERS resistance monitoring apparatus (Millipore, Milano). La resistenza è espressa in ohms/cm².

Reagenti

Tutti i reagenti sono stati ottenuti da Sigma. Le Igs provenivano da un singolo lotto commerciale di Igs umane sieriche per uso parenterale, con i seguenti titoli neutralizzanti specifici per i diversi sierotipi virali: Rotavirus ceppo Wa (sierotipo 1) 1:800; ceppo DS-1 (sierotipo 2) 1:1600; ceppo Price (sierotipo 3) 1:3200; ceppo ST-3 (sierotipo 4) 1:1600. I titoli specifici erano determinati come precedentemente riportato (55).

Risultati

Modificazione dei parametri elettrici dopo infezione con Rotavirus

Cellule Caco-2 erano infettate con RV e montate in camere di Ussing. I parametri elettrici mostravano un progressivo aumento dell' I_{sc} , compatibile con una secrezione di anioni, in confronto con cellule non infettate (figura 4.1). L'aumento dell' I_{sc} era statisticamente significativo dopo 1 ora dall'infezione (figura 4.1).

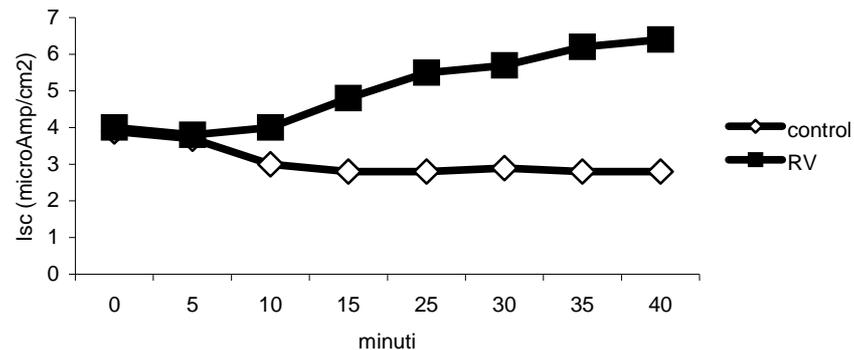


Figura 4.1. Aumento della corrente di corto circuito (I_{sc}) in cellule infettate con RV rispetto a cellule controllo, montate in camere di Ussing 1 ora dopo l'infezione.

Abbiamo quindi valutato l'effetto del RV sul trasporto di ioni, a tempi diversi dopo l'infezione (figura 4.2). L'effetto secretivo indotto da RV era evidente già 1 ora dopo l'infezione, raggiungeva un picco a 2 ore, e quindi si riduceva progressivamente fino a scomparire tra 6 e 12 ore dopo l'infezione (figura 4.2).

In esperimenti paralleli abbiamo comparato l'effetto sulla secrezione di anioni con l'effetto sulla TER che è una misura di integrità tissutale (figura 4.3). I due parametri erano modificati dal RV in maniera differenziale. La secrezione di anioni era indotta nelle fasi precoci dell'infezione, solo successivamente si osservano modificazioni della TER (figura 4.3). Dopo la cessazione della secrezione attiva di ioni, l'effetto citotossico del virus compare come dimostrato dalla caduta della TER (figura 4.3). Queste modifiche dei parametri elettrici studiati rendono conto di un duplice meccanismo di diarrea da RV che si realizza con fasi cronologicamente distinte.

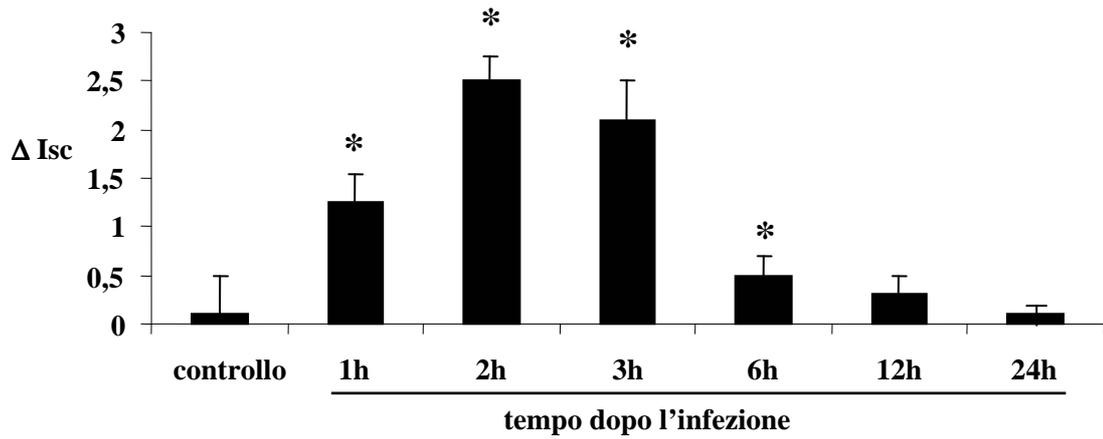


Figura 4.2. Effetto secretivo del Rotavirus su cellule Caco-2 a tempi diversi dopo l'infezione. * $p < 0.05$ vs controllo

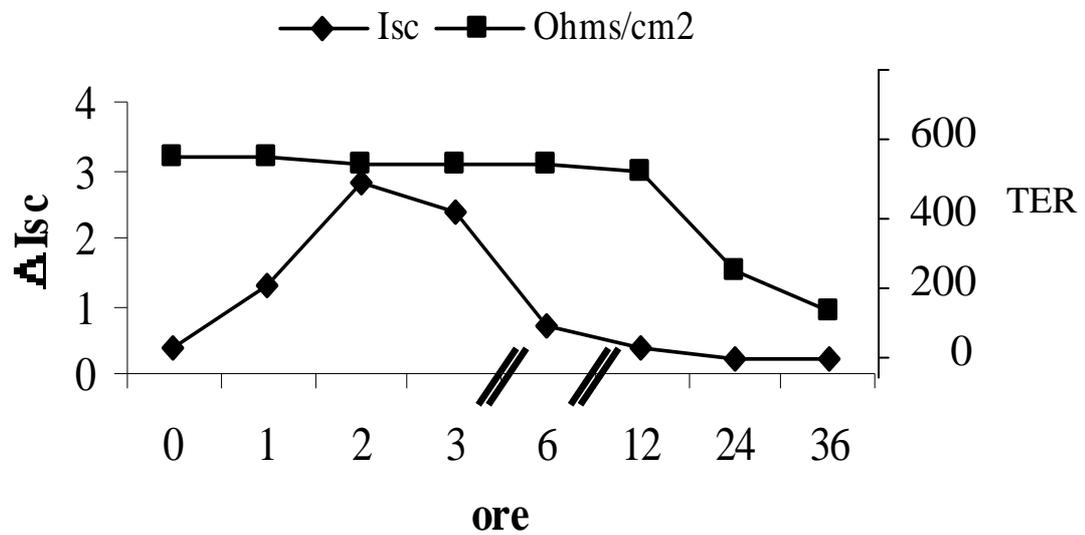


Figura 4.3. Effetto sequenziale del RV in cellule Caco-2 sulla secrezione (Isc) e sull'integrità tessutale (TER, ohms/cm2)

Caratterizzazione della secrezione di ioni indotta dal Rotavirus

Per determinare se l'effetto elettrico causato dal RV dipende da una secrezione di anioni piuttosto che dall'assorbimento di cationi, sono stati effettuati esperimenti in Ringer senza Cl^- . In assenza di Cl^- l'effetto elettrico era virtualmente abolito (figura 4.4). Pertanto l'effetto del RV sull' I_{sc} era completamente dipendente da una secrezione di ioni Cl^- .

Il RV necessita di ioni Ca^{2+} sia per la sua internalizzazione che per l'induzione della secrezione in modelli animali. Per questi motivi è stato studiato il ruolo del Ca^{2+} nella secrezione di Cl^- indotta dal RV. Come per gli esperimenti in assenza di Cl^- sono stati effettuati esperimenti in assenza di Ca^{2+} . Anche in questo caso la secrezione di ioni era completamente abolita (figura 4.4).

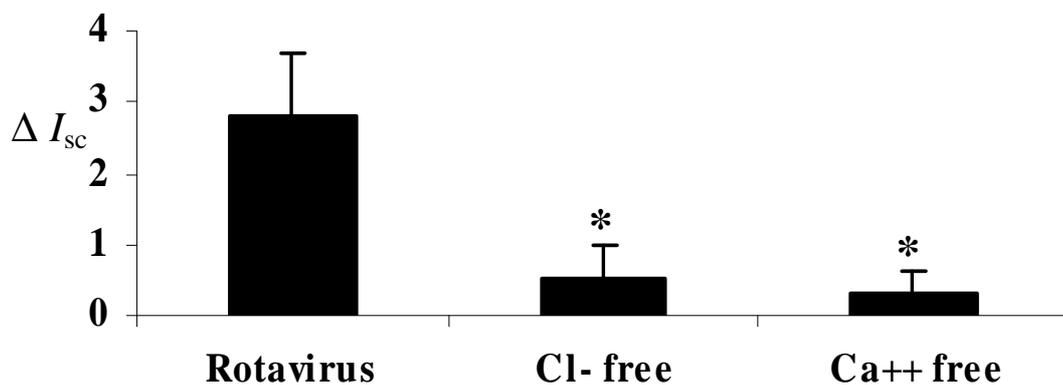


Figura 4.4. Effetto dell'eliminazione degli ioni Cl^- e Ca^{2+} sulla secrezione indotta da Rotavirus. * $p < 0.05$ vs Rotavirus

Effetto delle immunoglobuline sull'infezione da Rotavirus

Le Igs sono efficaci nel prevenire la caduta della TER indotta dal RV (53). In questo studio è stata valutata l'efficacia delle Igs sulla secrezione di Cl^- indotta dal RV. Le Igs sono state aggiunte alle cellule dopo l'infezione; le cellule sono state montate nelle camere di Ussing 2 ore dopo l'infezione. L'incubazione con le Igs inibiva completamente la secrezione indotta da RV (figura 4.5). In esperimenti paralleli le Igs sono risultate efficaci nell'inibizione sia della secrezione di Cl^- che della caduta della TER indotte dal RV.

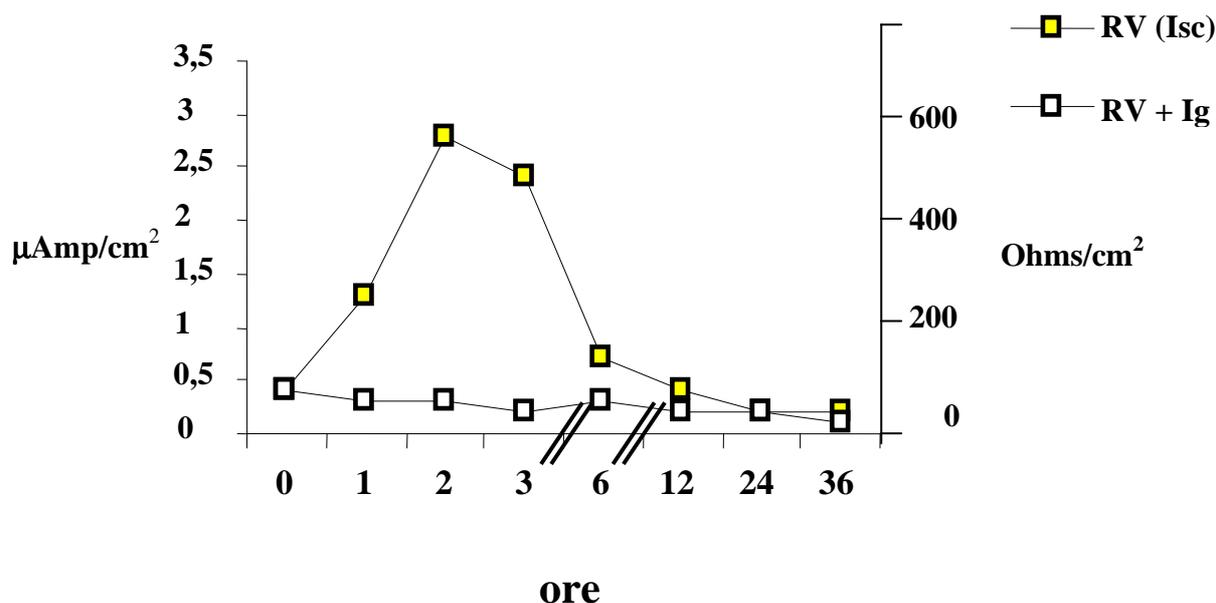


Figura 4.5. Efficacia delle Immunoglobuline sieriche umane nell'inibire la secrezione di cloro indotta dal Rotavirus.

Discussione

Il RV causa diarrea con meccanismi multipli (38,39). Studi in animali hanno dimostrato che il RV riduce il tasso di assorbimento di elettroliti glucosio e aminoacidi. Anche le attività enzimatiche del brush border sono inibite e la permeabilità transepiteliale è aumentata. E' osservazione clinica comune che il RV esordisce con una diarrea acquosa associata ad elevati volumi di feci nelle prime fasi, seguita poi da una fase più lieve e prolungata, caratterizzata spesso da intolleranza ai carboidrati e malassorbimento. Anche in modelli animali la diarrea precede il danno istologico indotto dal RV (40).

E' stato dimostrato che il RV infetta efficientemente le cellule Caco-2 inducendo un danno citotossico inibito dalla somministrazione di Igs (52,53). In questo lavoro abbiamo dimostrato che, prima dell'effetto citotossico, il RV induce un effetto enterotossico. L'effetto consiste in una secrezione di ioni Cl^- con un meccanismo Ca^{2+} -dipendente. Queste caratteristiche dell'effetto suggeriscono che l'enterotossina NSP4 del RV sia implicata in questo processo (47). Dopo la secrezione precoce, che segna la fase iniziale dell'infezione da RV si verifica una lisi cellulare con danno tissutale. Così, in questo modello di infezione in vitro, viene riprodotta una risposta al virus bifasica, che riproduce e spiega quanto si osserva nella pratica clinica in corso di gastroenterite da RV.

E' stata quindi testata l'efficacia delle Igs umane in questo modello di infezione in vitro. La somministrazione orale di Igs è efficace nel trattamento della diarrea da RV (54,55). Nel modello di infezione in vitro le Igs sono efficaci nel prevenire sia il danno cellulare che la secrezione di acqua ed elettroliti che si verifica dopo l'infezione con RV. Questo effetto potrebbe essere spiegato con la presenza di anticorpi anti-NSP4 nelle comuni preparazioni commerciali di Igs umane. L'osservazione dell'efficacia delle Igs sulla secrezione in vitro indotta dal RV è consistente con l'osservazione clinica dell'effetto molto precoce delle Igs, quando somministrate per via orale ad un bambino con gastroenterite acuta (55). Infine, l'importanza potenziale delle Igs nel trattamento della diarrea da RV, è confermata dal ruolo cruciale svolto dall'immunità umorale nella memoria immunologica e nella prevenzione dalle reinfezioni nel bambino che è stato già infettato con il RV.

5. RUOLO E MECCANISMO D'AZIONE DELL'OSSIDO NITRICO SULLA REGOLAZIONE DEL TRASPORTO DI IONI NEGLI ENTEROCITI

Introduzione

Il trasporto di acqua ed elettroliti attraverso l'epitelio intestinale è sotto il controllo di diversi agenti tra cui neurotrasmettitori, ormoni e agenti paracrini (63). È stato dimostrato che l'ossido nitrico (NO) partecipa ai processi di trasporto transepiteliale interagendo con il sistema nervoso enterico, sopprimendo la produzione di prostaglandine, e con un effetto sull'apertura dei canali del potassio (64,65).

NO è un gas con una emivita inferiore ai 5 secondi che viene degradato, in presenza di acqua ed ossigeno, in nitriti e nitrati. L'NO è prodotto da diversi tipi cellulari a partire dall'L-arginina, da una famiglia di enzimi, le ossido nitrico sintetasi (NOS) (66). Due NOS costitutive (cNOS) sono costantemente attive nell'intestino, la NOS neuronale (nNOS o NOS 1) e la NOS endoteliale (eNOS o NOS 3). Entrambe sono dipendenti dal sistema Ca^{2+} -calmodulina, producono piccole quantità di NO e sono principalmente implicate in processi omeostatici. Una terza isoforma di NOS che non è Ca^{2+} -calmodulina dipendente, è attivata da diversi segnali tra cui citochine proinfiammatorie. Quest'ultima forma, chiamata NOS inducibile (NOS 2 o iNOS), necessita di almeno 2 ore per essere attivata, produce NO dopo almeno 3-4 ore dalla sua attivazione, con un picco tra le 24 e le 72 ore (64,67,68). L'NO è prodotto dall'enterocita sia dalle forme costitutive che inducibile di NOS (69,70).

L'NO svolge un duplice ruolo sui processi che regolano il trasporto ionico intestinale. In condizioni fisiologiche, l'attività basale della cNOS è implicata nella regolazione del tono pro-assorbitivo intestinale, ma non è chiaro se questo sia il risultato di un effetto diretto sull'enterocita, o indiretto attraverso il controllo nervoso del flusso ematico intestinale (63,64). Al contrario, in condizioni patologiche come in corso di malattie infiammatorie intestinali, un aumento della produzione di NO da parte dell'iNOS, induce una secrezione attiva di acqua ed elettroliti (63-73).

L'NO svolge anche un ruolo in condizioni di secrezione attiva di ioni. In modelli animali l'NO riduceva la secrezione indotta dalla tossina colerica (CT), anche se questa osservazione non è stata confermata da altri autori (64,74). Recentemente è stato ipotizzato che l'NO possa svolgere un duplice ruolo nella regolazione del trasporto di ioni, stimolando assorbimento o secrezione a seconda della sua concentrazione (75). Queste evidenze, apparentemente contrastanti, sono probabilmente ascrivibili agli effetti

multipli del NO e dalla loro dose-dipendenza. Nella maggior parte degli studi sono stati utilizzati tessuti interi contenenti cellule endoteliali, neuroni, miociti, leucociti, tutte cellule produttrici di NO. Anche cellule Caco-2 di origine intestinale sono state utilizzate per studiarne la risposta a batteri enteropatogeni (76).

Lo scopo di questa parte della Tesi è stato quello di testare l'ipotesi che l'NO prodotto da enterociti agisca come un regolatore intracellulare del trasporto transepiteliale di ioni sia in condizioni basali che in risposta alla secrezione indotta dalla CT

Metodi

Colture cellulari.

Cellule Caco-2, ottenute dall' American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD), sono state cresciute in DMEM con 10% di siero bovino fetale, 1% di aminoacidi non essenziali, 50 mU/ml di penicillina, 50 mg/ml di streptomicina (56).

Studio del trasporto di ioni.

Abbiamo utilizzato il modello delle camere di Ussing (55). Le cellule erano cresciute in monostrati su filtri di policarbonato (Costar, Milano) per 15-18 giorni post-confluenza. L'area del filtro era di 4.9 cm^2 . Ogni filtro era montato in una camera (World Precision Instrument, Sarasota, FL). Ogni compartimento della camera (mucosale e sierosale) conteneva 5 ml di Ringer con la seguente composizione (in mmol/L): NaCl (114), KCl (10), Na_2HPO_4 (1.65), NaH_2PO_4 (0.3), CaCl_2 (1.25), MgCl_2 (1.1), NaHCO_3 (15), glucose (19), che era costantemente insufflata con 95% O_2 - 5% CO_2 , e mantenuta a 37 °C mediante l'uso di un sistema di circolazione a pompa regolato da un termostato.

I seguenti parametri elettrici erano misurati prima e dopo l'aggiunta di CT o dell'inibitore delle NOS N⁰-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): differenza di potenziale transepiteliale (PD), corrente di corto circuito (Isc) e conduttanza ionica (G). Isc è espresso in microampères per cm^2 ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$), G in millisiemens per cm^2 (mS/cm^2), e PD in millivolts (mV).

I monostrati di cellule Caco-2 erano esposti alla massima dose efficace di CT (6×10^{-8} M) aggiunta al lato sierosale delle cellule, in aggiunto ad entrambi i lati del monostrato. Le massime concentrazioni efficaci di CT e di L-NAME sono state determinate in esperimenti precedenti e non riportati.

Misura delle concentrazioni intracellulari di cAMP.

Le concentrazioni di cAMP sono state misurate con un kit commerciale come già descritto (Biotrak cyclic AMP assay system; Amersham International, Amersham,UK), (77).

Misura delle concentrazioni di NO_2^-/NO_3^- .

Le concentrazioni combinate di nitriti e nitrati nel mezzo di coltura, prodotti di degradazione dell'NO, sono state determinate con la reazione di Griess, dopo la riduzione dei nitrati (78). La produzione di nitriti e nitrati è quindi riportata come produzione di NO. Gli esperimenti sono stati condotti anche in soluzioni di Ringer senza calcio come riportato nel capitolo 4 di questa Tesi.

Per valutare il ruolo della iNOS come fonte di NO, sono stati condotti esperimenti in presenza dell'inibitore specifico L-N-iminoethyl-lysine (L-NIL) 0.5 mM (79).

Risultati

Studi sul trasporto transepiteliale di ioni.

L'aggiunta simultanea di L-NAME ad entrambi i lati del monostrato di Caco-2 induce un aumento dell'Isc. La risposta elettrica è lenta nei primi 35 minuti, con un picco a 55 minuti dall'aggiunta dell'inibitore della NOS. L'aumento dell'Isc è totalmente dipendente dall'aumento di PD, giacché non è evidenziabile nessuna modificazione dei valori di G. L'aggiunta della CT al lato luminale delle caco-2 induce un aumento simile di Isc, senza modificare G. La preincubazione delle cellule con L-NAME per 5 minuti determina un ulteriore aumento di Isc indotto dalla CT. Tale aumento è significativamente maggiore della somma dell'effetto di ogni singola molecola (figura 5.1).

Determinazione dei livelli di cAMP.

Le concentrazioni intracellulari di cAMP dopo un ora di incubazione con CT, sono state misurate in assenza o in presenza di L-NAME. La CT induce un aumento di 6 volte rispetto ai valori basali, del cAMP intracellulare. L'inibitore della NOS, L-NAME, induce un aumento significativo nelle concentrazioni basali di cAMP. L'L-NAME, inoltre, provoca un ulteriore aumento significativo nelle concentrazioni di cAMP stimulate dalla CT. Anche in questo caso, così come era stato osservato per l'Isc nelle stesse condizioni sperimentali, l'effetto di CT e L-NAME è sinergico, essendo maggiore

della somma di ogni singolo effetto (figura 5.2).

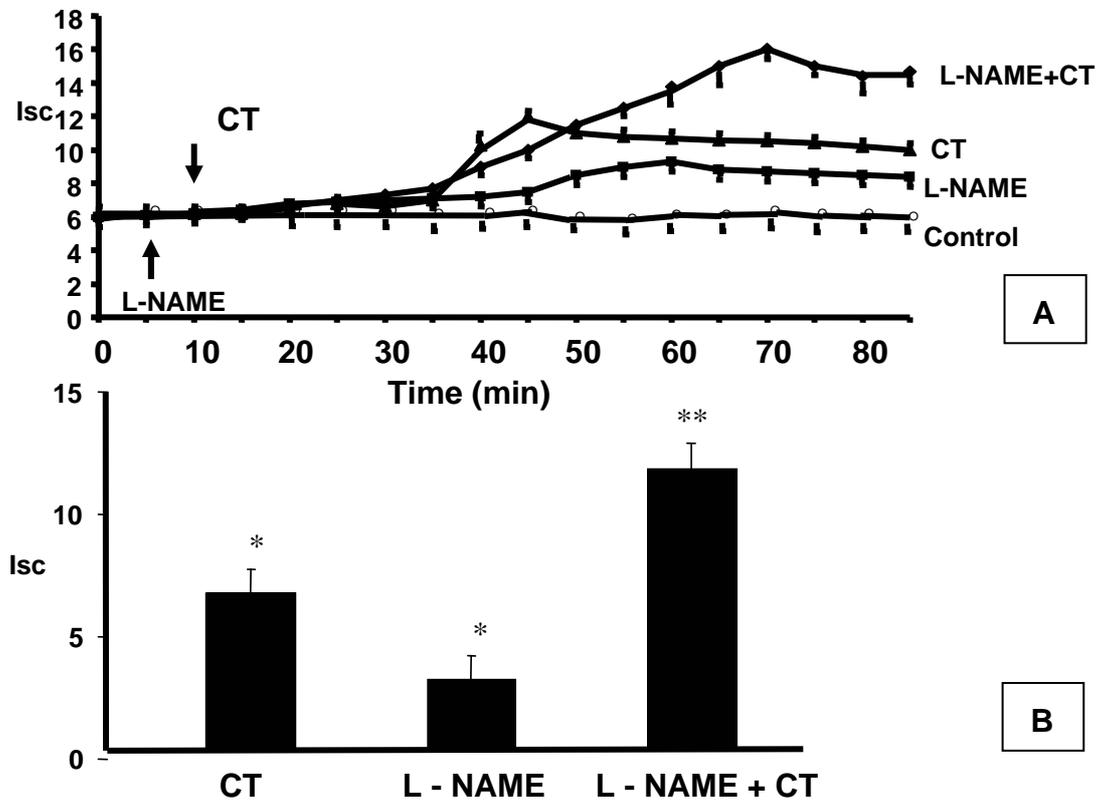


Figura 5.1. Effetto dell'L-NAME e della tossina colerica (CT) sul trasporto transepiteliale di ioni. L'inibizione della produzione di ossido nitrico con l'inibitore L-NAME provoca un aumento della Isc, compatibile con la secrezione di elettroliti. Anche la CT induce una secrezione di ioni. L'effetto di L-NAME e CT insieme è sinergico rispetto all'effetto delle 2 sostanze utilizzate singolarmente. Pannello A; time-course dell'incubazione di cellule Caco-2 con CT ed L-NAME. Pannello B; Effetto massimo sulla secrezione di ioni dopo incubazione di cellule Caco-2 con CT e L-NAME.

Produzione di ossido nitrico.

Dopo 1 ore di incubazione con CT si osserva un aumento nelle concentrazioni di NO di circa 9 volte rispetto ai valori basali. L'effetto è dipendente dal calcio, perché in assenza di calcio, non si osserva produzione di NO.

L'inibitore specifico della iNOS, L-NIL, non previene l'aumento di NO indotto dalla CT. L'incubazione di cellule Caco-2 con l'analogo del cAMP, 8Br-cAMP, induce un

aumento di NO (figura 5.3). L'8Br-cAMP aumenta la produzione di NO da parte dell'enterocita in maniera dipendente dalla dose (figura 5.3).

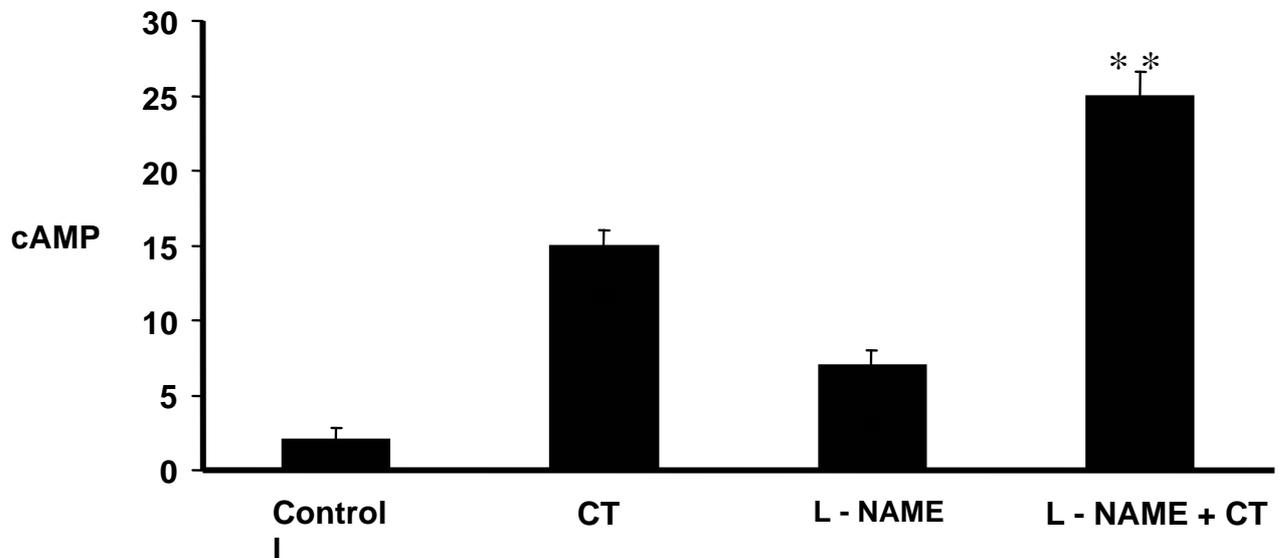


Figura 5.2. Effetto di tossina colerica (CT) e L-NAME sulle concentrazioni intracellulari di cAMP. L'incubazione con CT e con L-NAME induce un aumento della produzione di cAMP in cellule Caco-2. Anche in questo caso L-NAME e CT mostrano un effetto sinergico quando aggiunte insieme.

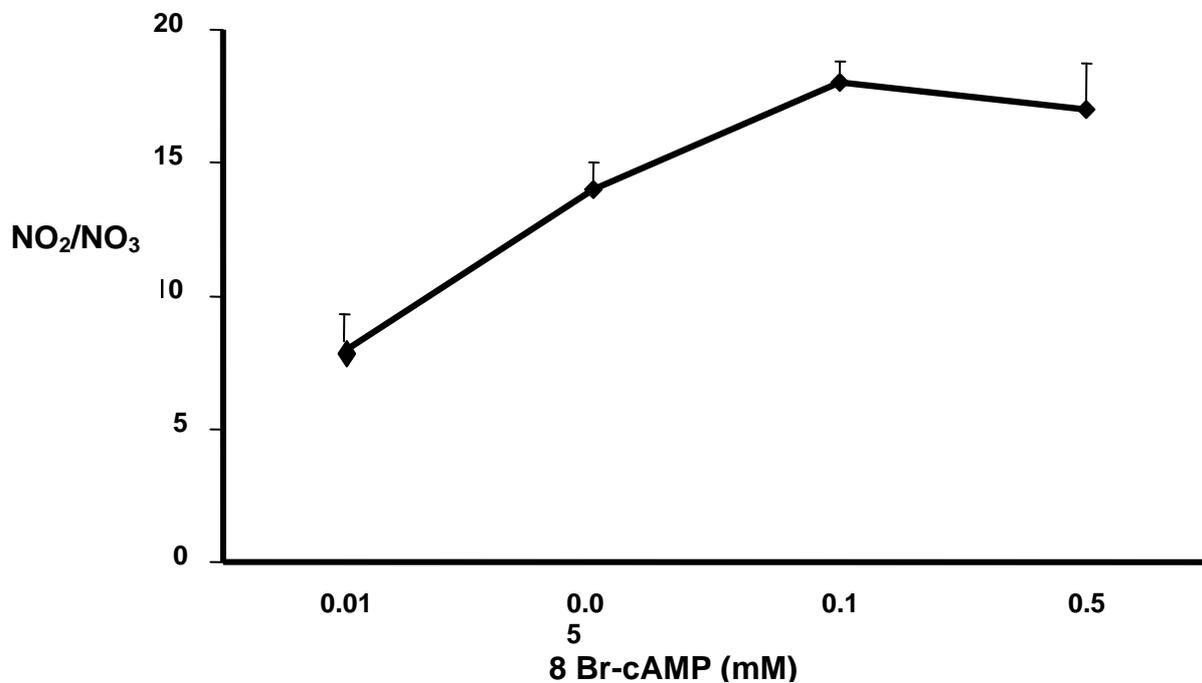


Figura 5.3. Produzione di ossido nitrico dopo stimolazione con cAMP. L'incubazione di cellule Caco-2 con un analogo del cAMP, l'8-Br.cAMP, induce la produzione di ossido nitrico, in maniera dipendente dalla concentrazione.

Discussione

La secrezione di acqua ed elettroliti nel lume intestinale è un processo finalizzato a diverse specifiche funzioni. Promuove l'ottimale digestione di nutrienti ed il loro assorbimento, assieme al muco intestinale protegge la mucosa e libera la superficie intestinale da patogeni e tossine. Per prevenire un'eccessiva perdita di liquidi, i flussi di acqua e ioni devono essere finemente regolati con meccanismi di controllo efficaci (81). In questo studio si dimostra che l'enterocita è capace di limitare la secrezione di ioni attraverso un meccanismo che implica la regolazione dei livelli di NO. L'aumento di Isc indotto dall'inibitore di NOS L-NAME suggerisce che le concentrazioni intracellulari di NO sono essenziali nel regolare il trasporto basale transepiteliale di ioni. L'aggiunta contemporanea di CT e L-NAME provoca un aumento della secrezione di ioni maggiore della somma degli effetti ottenuti con l'aggiunta delle singole molecole. Questo suggerisce un ruolo per l'NO anche nel limitare la secrezione attiva di ioni indotta dalla CT. Gli effetti elettrici sono paralleli alle concentrazioni intracellulari di cAMP. Questo dimostra una stretta correlazione tra i livelli intracellulari di cAMP ed NO, sia in condizioni basali che di attiva secrezione. L'aumento della produzione di NO in risposta a CT o 8-Br-CAMP indica che la sintesi di NO da parte dell'enterocita è stimolata in risposta a condizioni di attiva secrezione di acqua ed elettroliti. La produzione di NO nel nostro sistema dipende dalla stimolazione della isoforma NOS 1. E' stato suggerito che la stimolazione della NOS 1 può far parte della normale risposta cellulare allo stress (82). Questi risultati confermano il concetto di una autoregolazione, da parte dell'enterocita in condizioni basali del trasporto transepiteliale, e di una risposta omeostatica in condizioni di secrezione attiva. Gli effetti dell'NO in risposta alla CT nelle cellule Caco-2 ricordano quelli osservati con altri secretagoghi come la prostaglandina E2, l'enterotossina termostabile di E. coli e la tossina A del Clostridium difficile (83). I risultati di questa ricerca dimostrano che l'enterocita svolge un ruolo diretto nella regolazione omeostatica del trasporto transepiteliale di acqua ed elettroliti, attraverso l'attivazione del sistema cNOS-NO. Questo sistema funziona come un freno della secrezione di ioni, sia in condizioni basali che di stimolazione legata all'aumento del cAMP intracellulare.

I risultati di questo capitolo sono oggetto di una pubblicazione scientifica allegata in appendice.

6. EFFETTI E MECCANISMI DI AZIONE DELL'ORMONE DELLA CRESCITA SULLA CRESCITA CELLULARE E SUL TRASPORTO DI IONI NELL'INTESTINO

Introduzione

Abbiamo recentemente dimostrato che il GH prende parte al complesso meccanismo di regolazione del trasporto transepiteliale di ioni nell'intestino (84). Il GH è un polipeptide prodotto dall'adenoipofisi che svolge diversi ruoli nell'ambito della fisiologia intestinale. Il GH stimola la crescita e differenziazione dell'intestino di ratto fetale e adulto (85,86), e del ratto sottoposto ad ampia resezione intestinale (56,87); stimola la sintesi di una proteina legante il calcio e vitamina D-dipendente, stimola l'assorbimento di calcio, la produzione di gastrina e somatostatina a livello gastrico e l'uptake di aminoacidi (88,89). Nel ratto l'ipofisectomia provoca un decremento dell'assorbimento intestinale di acqua ed elettroliti confermando un ruolo del GH nel mantenimento del tono assorbitivo basale intestinale (90).

In sistemi sperimentali, in vivo ed in vitro, abbiamo dimostrato che il GH è in grado di stimolare in condizioni basali l'assorbimento di acqua e di elettroliti nell'ileo di ratto (84). Utilizzando i medesimi modelli sperimentali abbiamo successivamente dimostrato che l'effetto proassorbitivo del GH è presente nell'intero intestino, ma con una maggiore intensità a livello del tratto prossimale del piccolo intestino e con una minore intensità a livello del colon (19). Oltre ad esercitare un effetto proassorbitivo in condizioni basali il GH riduce la secrezione attiva indotta da agonisti dei tre principali meccanismi di trasduzione del segnale di attivazione della secrezione intestinale: il cAMP, il cGMP e il Ca^{2+} (84).

L'ampia espressione di recettori specifici per il GH negli enterociti fetali e dell'adulto fa ipotizzare che i suoi effetti sul trasporto intestinale nell'uomo derivino da una diretta interazione ormone-enterocita. Per verificare questa ipotesi è stato allestito un modello sperimentale in vitro basato su una linea cellulare intestinale umana denominata Caco-2. Le cellule Caco-2, coltivate per 15 giorni dopo la confluenza, acquisiscono caratteristiche morfofunzionali del tutto sovrapponibili a quelle dell'enterocita ileale maturo dell'apice del villo.

Utilizzando tale modello sperimentale abbiamo ottenuto dimostrazioni che gli effetti del GH sul trasporto intestinale di acqua e ioni derivano da una diretta interazione tra

ormone e membrana baso-laterale dell'enterocita (56), ma i meccanismi di tale effetto restano in gran parte da definire (91-93).

Il recettore del GH appartiene alla famiglia dei recettori per i fattori emopoietici e presenta analogie strutturali nei domini extra- ed intracitoplasmatici con i recettori di altri fattori, quali alcune interleuchine e l'eritropoietina (91). Il legame GH-recettore induce l'attivazione sequenziale di diverse attività enzimatiche citoplasmatiche che in ultimo si traduce nell'espressione di fattori trascrizionali specifici. In tal modo l'interazione tra ormone e cellula porta alla produzione di nuove proteine e a diversi effetti biologici (92).

E' stato ipotizzato che il legame GH-recettore determini l'attivazione di una proteino-chinasi definita Jak2. Le Jaks attivano proteine "adattatrici" e, attraverso queste, modulano l'attività delle proteino-chinasi attivate dai mitogeni (MAPK) (94).

Le MAPK comprendono un gruppo di serino- treonino-chinasi che sono attivate in risposta a diversi stimoli extracellulari attraverso la fosforilazione su residui di treonina e tirosina. Attualmente si distinguono tre sottogruppi principali di MAPK che sono attivati da sequenze di fosforilazioni distinte e, in alcuni casi, sovrapposte (94). Nell'ambito delle MAPK sulla cui funzione è stata dimostrata una possibile influenza del GH vi sono:

- 1) p42 che risponde a segnali di fattori di crescita attraverso recettori tirosino-chinasi.
- 2) p38 che è attivata da stimoli di stress cellulare come raggi ultravioletti, shock termico o citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL1).

Le MAPK svolgono funzioni di regolazione dell'espressione genica sia modificando l'attività di fattori trascrizionali che influenzando sul controllo post-trascrizionale. Inoltre le MAPK non solo veicolano informazioni tra la membrana plasmatica della cellula e il nucleo, ma fungono anche da veri punti nodali nell'integrazione ed amplificazione tra i diversi segnali extracellulari alcuni dei quali regolano il controllo dell'espressione dei geni.

Numerose sono le evidenze di un ruolo di p42 e di p38 nella trasduzione del segnale del GH sia in modelli di proliferazione cellulare che di differenziazione.

Scopo di questo lavoro è stato definire i meccanismi dell'interazione GH-enterocita. In particolare è stata testata l'ipotesi che le MAPK p42/44 e p38 siano implicate nella proliferazione cellulare e nell'assorbimento di ioni stimolabili dal GH.

Metodi

Reagenti

Tutti i reagenti sono stati ottenuti da Sigma, se non altrimenti specificato. Gli anticorpi monoclonali anti p42/44 e p38 sono rispettivamente della Santa Cruz Biotechnology e Cell Signalling Technology. Gli anticorpi secondari e il sistema di rilevazione per chemiluminescenza (ECL) sono di Amersham Pharmacia.

Colture cellulari

Cellule Caco-2 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Rockville, USA). Le cellule sono state fatte crescere in un mezzo di coltura costituito da: "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM), glucosio (4.5 g/L), 10% di Fetal Calf Serum (FCS), 1% di aminoacidi non essenziali, streptomicina (50 mg/ml), penicillina (50 mU/ml), e sono state incubate a 37 °C in una atmosfera costituita da 5% CO₂ e 95% O₂, come precedentemente riportato. Tutti gli studi sono stati condotti su cellule tra il 25° e il 40° passaggio.

Western blotting

Le cellule erano cresciute in monostrati per 15-18 giorni dopo aver raggiunto la confluenza. Sono state quindi cresciute per 24 ore prima della stimolazione. Il GH veniva aggiunto ad una concentrazione di 4nM per 15 minuti. Per valutare l'efficacia degli inibitori specifici delle MAPKs, questi sono stati aggiunti 30 minuti prima della stimolazione con GH. Abbiamo utilizzato PD 098059 (40 µM) e SB 203580 (5µM) come inibitori specifici di MAPK p42/44 e p38 rispettivamente. Alla fine della stimolazione le cellule venivano lavate in PBS a freddo e raccolte mediante centrifugazione. Le cellule venivano poi lisate in 1 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 0.9 mM SDS, 12 mM NaN₃, 80 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM Na₂p₂O₇, 0.1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM PMSF, 1% Triton X-100, 1 mg/ml aprotinina, leupeptina e pepstatina. I lisati venivano centrifugati e i supernatanti raccolti. E' stata calcolata la concentrazione di proteine e uguali quantità di proteine sono state caricate su SDS-PAGE al 12% e trasferite su di un filtro di nitrocellulosa. Per la determinazione dell'attività di p42/44, le membrane venivano bloccate con una soluzione all' 1% di latte in TBS-tween 0.1% e incubate per 2 ore con un anticorpo specifico monoclonale di topo che riconosce la forma fosforilata di p42/44. Gli studi dell'attivazione di p38 venivano effettuati dopo aver effettuato il blocking con una soluzione al 5% di latte, con

un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la forma fosforilata di p38. Per la visualizzazione delle proteine abbiamo utilizzato anticorpi secondari specie-specifici coniugati con perossidasi e un sistema di chemiluminescenza.

Studi sul trasporto transepiteliale di acqua e ioni

Cellule Caco-2 erano cresciute su supporti di policarbonato (pori di $0.4\mu\text{m}$, superficie di 4.9 cm^2) per 15-18 giorni postconfluenza. Ogni supporto contenente le cellule, veniva montato in camera di Ussing (World Precision Instruments, Sarasota, Florida) come un monostrato cellulare tra il compartimento luminale e sierosale. Il sistema delle camere di Ussing consente, attraverso la misurazione di determinati parametri elettrici, lo studio del trasporto transepiteliale di acqua ed elettroliti. I parametri elettrici monitorati sono: 1) differenza di potenziale transepiteliale (PD) e corrente di corto circuito (I_{sc}), espressione del passaggio transepiteliale di ioni; 2) resistenza (RT) e conduttanza ionica (G), espressione della integrità del tessuto. Uno stimolo di tipo assorbitivo sul trasporto transepiteliale determina un decremento della I_{sc} , al contrario uno stimolo di tipo secretivo determina un aumento della I_{sc} . L' I_{sc} viene espressa in microampere per centimetro quadrato ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$), la conduttanza in millisiemens per centimetro quadrato (mS/cm^2) e la differenza di potenziale transepiteliale in millivolts (mV). La misurazione e la registrazione di tali parametri elettrici sono rese possibili grazie alla presenza di elettrodi di argento, posti in prossimità di entrambi i lati (sierosale e luminale) del monostrato cellulare, collegati ad un sistema di voltaggio automatico fornito di un software per l'acquisizione e la elaborazione dei dati (DVC 1000, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA), come precedentemente descritto.

Ogni compartimento conteneva 5 ml di soluzione di Ringer con la seguente composizione (in mmol/L): NaCl, 114 ; KCl, 5 ; NaH_2PO_4 , 0.3 ; Na_2HPO_4 , 1.65 ; CaCl_2 , 1.25 ; MgCl_2 , 1.1 ; NaHCO_3 , 25; glucosio, 10. Il liquido di incubazione veniva fatto circolare attraverso le camere mediante un flusso di una miscela gassosa composta da 95% di O_2 e 5% di CO_2 e veniva mantenuto ad una temperatura di 37°C grazie ad un termostato.

Lo studio delle modificazioni dei parametri elettrici, che rispecchiano modificazioni del trasporto transepiteliale di acqua ed elettroliti, veniva effettuato prima e dopo l'esposizione del monostrato cellulare al GH e in presenza o in assenza di specifici inibitori.

Il GH era aggiunto alla concentrazione di 4 nM al lato sierosale del monostrato cellulare.

Il ruolo di p42/44 e p38 è stato studiato preincubando per 30 minuti, prima della stimolazione con GH, le cellule con i loro inibitori specifici: rispettivamente PD 098059 (40 μ M) e SB 203580(5 μ M).

Proliferaazione cellulare

Per lo studio della proliferazione cellulare sono stati effettuati saggi di incorporazione di timidina triziata. Cellule Caco-2 sono state piastrate e dopo 24 ore venivano deprivate di siero per 12 ore. Le cellule venivano quindi stimulate con GH alla concentrazione di 4 nM da solo o in presenza di inibitori specifici delle MAP chinasi. Dopo un'incubazione di 30 ore è stata aggiunta timidina triziata (0.5 μ Ci/pozzetto) per le ultime 18 ore di incubazione. Le cellule venivano infine raccolte (Titertk Cell Harvester, Flow Laboratories, Rickmanswort, UK) e la timidina triziata incorporata misurata con un β counter.

Analisi Statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti per tre volte. I dati numerici sono stati espressi come media \pm errore standard della media. I dati sono stati analizzati usando il test t di student .

Risultati

Il GH attiva le MAP kinasi p42/44 e p38

Le cellule Caco-2 erano cresciute a differenziazione per 15-18 giorni dopo aver raggiunto la confluenza, e venivano quindi stimulate con GH. Come mostrato in figura 6.1, il GH è in grado di stimolare l'espressione della forma attiva di p42/44 rispetto al controllo (figura 6.1 linee 1 e 2).

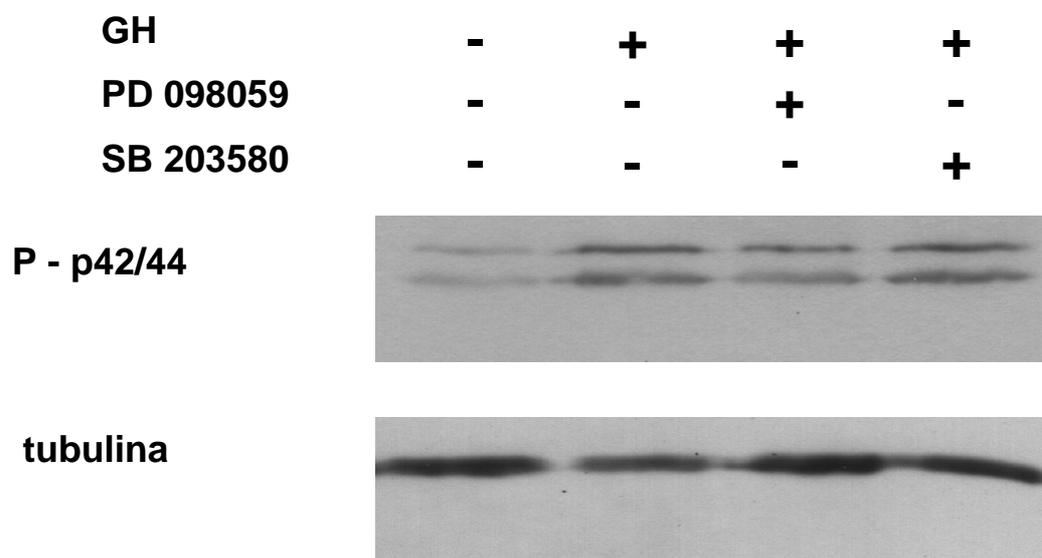


Figura 6.1. Effetto del GH su MAP chinasi p42/44. Il GH induce una attivazione di p42/44 rispetto alle cellule non stimolate. L'aggiunta dell'inibitore specifico di p42/44 (PD 098059) inibisce l'attivazione mediata dal GH, mentre nessun effetto si ottiene con l'inibitore di p38 (SB 203580).

In maniera simile abbiamo osservato l'attivazione di p38 in risposta alla stimolazione con GH (figura 6.2, linee 1 e 2).

Abbiamo testato l'efficacia degli inibitori specifici delle MAP kinasi, PD098059 e SB 203580, rispettivamente per p42/44 e per p38. La preincubazione delle cellule con gli inibitori era in grado di bloccare l'attivazione di MAP kinasi indotta dal GH (figure 6.1 e 6.2). Abbiamo inoltre condotto un controllo crociato dei due inibitori e dimostrato che agivano esclusivamente sull'attivazione delle MAP kinasi specifiche senza alcun effetto sull'altra (figure 6.1 e 6.2, linee 3 e 4).

Gli stessi esperimenti sono stati ripetuti su cellule in rapida crescita, non differenziate, con gli stessi risultati.

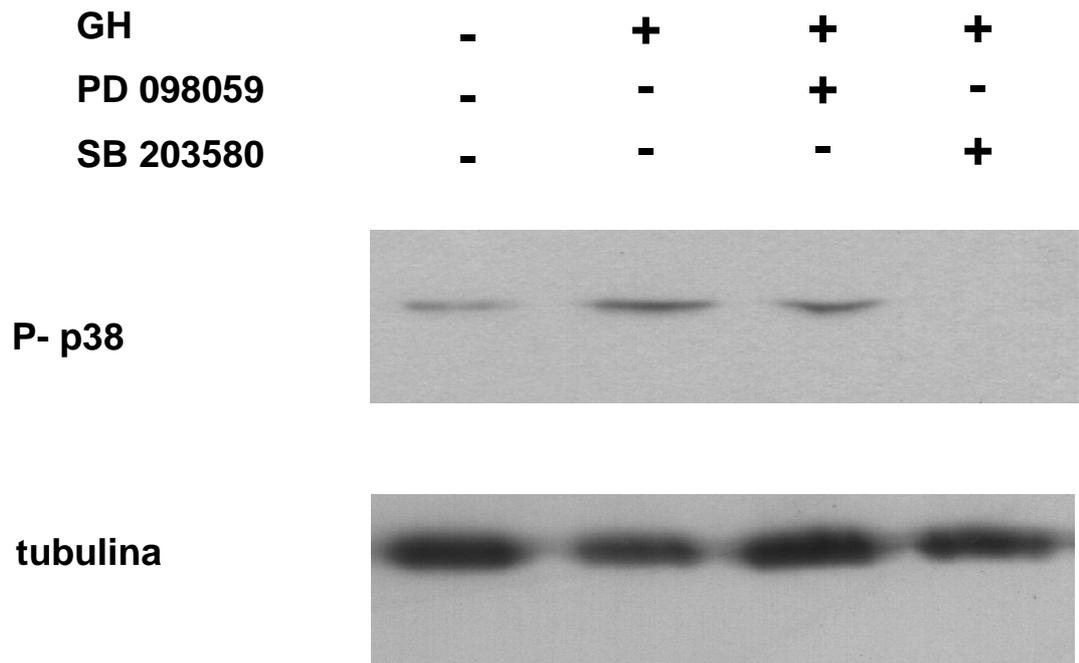
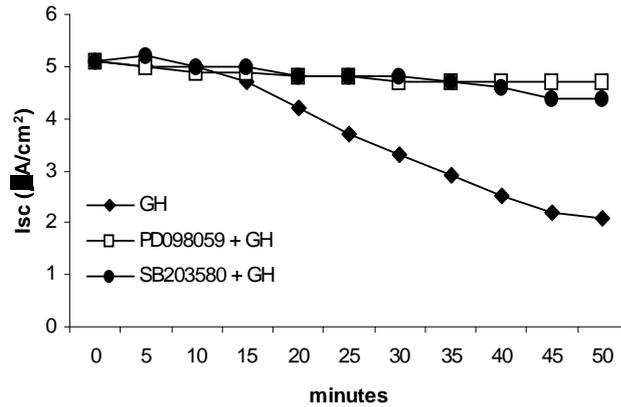


Figura 6.2. Effetto del GH su MAP chinasi p38. Il GH induce l'attivazione di p38 rispetto alle cellule non stimolate. L'aggiunta dell'inibitore specifico di p38 (SB 203580) inibisce l'attivazione mediata dal GH, mentre nessun effetto si ottiene con l'inibitore di p42/44 PD 098059.

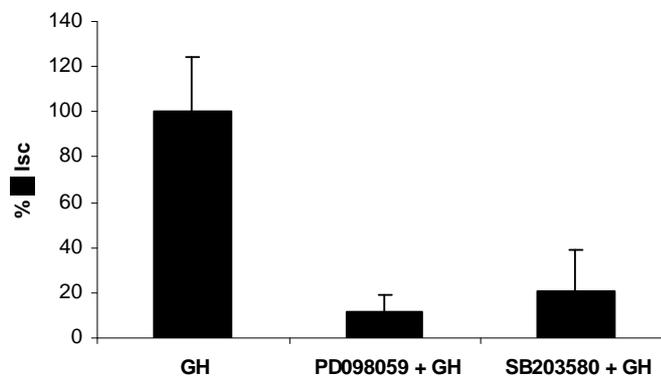
Le MAP kinasi mediano l'assorbimento di ioni indotto da GH

Come precedentemente dimostrato, la stimolazione delle cellule Caco-2 con GH induce un aumento della Isc, che rappresenta un assorbimento transepiteliale netto di ioni (figura 6.3). Abbiamo studiato il ruolo delle MAP kinasi p42/44 e p38 in questo processo preincubando le cellule con gli inibitori specifici PD 098059 e SB 203580 per 30 minuti prima della stimolazione con GH. I risultati di questi esperimenti hanno mostrato che quando p42/44 o p38 venivano inibite, la risposta elettrica all'aggiunta del GH era completamente abolita (figura 6.3). Il grado di inibizione era maggiore quando veniva bloccata p42/44 rispetto a p38, ma la differenza non era statisticamente significativa.

Questi esperimenti hanno dimostrato che sia p42/44 che p38 sono implicate direttamente negli effetti sul trasporto di ioni indotto dal GH.



A



B

Figura 6.3. Effetto delle MAP chinasi sul trasporto di ioni mediato dal GH.

Il GH induce una diminuzione della corrente di corto circuito compatibile con un'assorbimento di ioni. L'inibizione dell'attività delle MAP chinasi con gli inibitori specifici blocca questo effetto. Pannello A. Time-course dell'effetto del GH e degli inibitori. Pannello B. Percentuale di efficacia degli inibitori di MAP chinasi rispetto al GH nell'inibire l'effetto sulla corrente di corto circuito.

MAP kinasi p42/44 ma non p38 controlla la proliferazione cellulare indotta dal GH

Abbiamo precedentemente dimostrato che il GH stimola la proliferazione cellulare in cellule Caco-2 (figura 6.4). In questo lavoro abbiamo studiato il ruolo di p42/44 e di p38 nei meccanismi di proliferazione cellulare indotta dal GH utilizzando gli inibitori specifici delle MAP kinasi. L'inibizione di p42/44 attraverso la preincubazione con PD 098059 blocca completamente la proliferazione indotta dal GH. Al contrario, la preincubazione con SB203580 non aveva nessun effetto significativo. I risultati

dimostrano che, a differenza di quanto osservato per gli studi sul trasporto di ioni, l'attivazione di p38 da parte del GH non regola la proliferazione cellulare (figura 6.4).

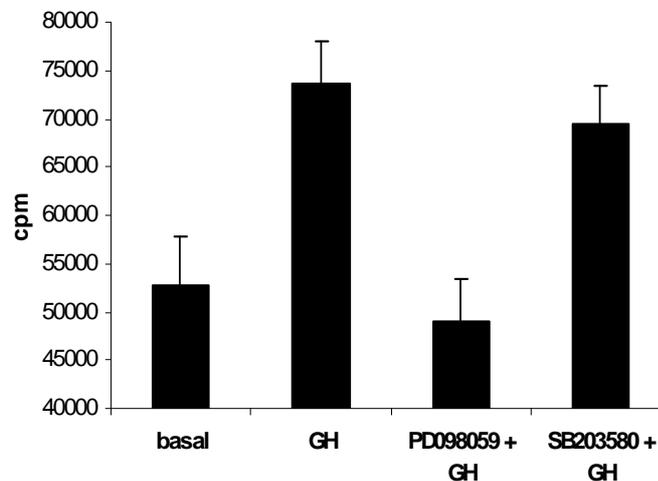


Figura 6.4. Effetto degli inibitori di MAP chinasi sulla proliferazione cellulare indotta da GH. Il GH stimola la proliferazione cellulare. L'inibitore di p42/44 (PD 098059) inibisce completamente questo effetto, mentre l'inibizione di p38 (con SB 203580) non modifica significativamente l'effetto del GH

Discussione

Abbiamo affrontato lo studio dei meccanismi di azione del GH a livello intestinale, utilizzando un modello cellulare di epitelio intestinale. In particolare sono stati investigati i meccanismi molecolari che regolano la proliferazione cellulare e il trasporto di ioni. In precedenza abbiamo dimostrato che il legame GH-recettore è in grado di stimolare un'attività tirosino-chinasica responsabile degli effetti del GH in enterociti umani (21). Oggetto di questo studio è stato il ruolo delle MAP chinasi p42/44 e p38. Queste proteine giocano un ruolo centrale nella regolazione della fisiologia cellulare e nella trasduzione del segnale. E' stato dimostrato che, in sistemi sperimentali diversi dall'intestino, sono implicate negli effetti del GH (94). Abbiamo dimostrato che MAP chinasi p42/44 e p38 sono attivate dal GH in enterociti. Abbiamo anche dimostrato che entrambe sono implicate nella regolazione del trasporto di ioni mentre il controllo della proliferazione cellulare indotta da GH dipende da p42/44 e non da p38.

Questi dati contribuiscono alla ulteriore comprensione della fisiologia dell'enterocita e dei meccanismi che regolano il trasporto transepiteliale di ioni.

In conclusione i risultati di questa parte della Tesi supportano l'utilizzo del GH nella terapia dell'insufficienza intestinale in età pediatrica e dimostrano come la conoscenza dei meccanismi fini di regolazione del trasporto di acqua ed elettroliti attraverso l'epitelio intestinale potrebbe permettere l'individuazione di modulatori specifici da impiegare in alternativa al GH nella terapia di tutte le patologie caratterizzate da alterazioni del trasporto di acqua ed elettroliti.

I risultati di questo capitolo della Tesi sono oggetto di un lavoro scientifico allegato in appendice e attualmente sottomesso per la pubblicazione.

7. EFFICACIA DELL'ORMONE DELLA CRESCITA NEL TRATTAMENTO DI BAMBINI CON INSUFFICIENZA INTESTINALE

Introduzione

Evidenze sperimentali dimostrano come il GH agisca sul trasporto transepiteliale di ioni e di acqua nell'intestino di ratto, promuovendo l'assorbimento di acqua e di elettroliti e riducendo la secrezione indotta da diverse sostanze secretagoghe quali la teofillina e la tossina termostabile di E. coli (84).

Dati contrastanti si sono ottenuti invece sulla capacità del GH di promuovere l'adattamento intestinale in pazienti con sindrome dell'intestino corto. Con il termine di adattamento intestinale si intende un insieme di modificazioni morfologiche e funzionali cui va incontro l'intestino che residua dopo un intervento di massiva resezione (95). La risposta alla resezione è immediata e il *primum movens* è rappresentato dalla perdita di tessuto intestinale; più estesa è la resezione più intensa è la risposta di tipo adattativo. Differenti fattori regolano il processo di adattamento intestinale e tra questi vanno ricordati la presenza di nutrienti a livello del lume intestinale e molti fattori di crescita tra cui l'IGF1, la glutamina, il GH. Il processo di adattamento intestinale ha lo scopo di aumentare le capacità assorbitive dell'intestino e questo si verifica sia inducendo un iperplasia dell'epitelio intestinale che aumentando la capacità funzionale degli enterociti residui. A livello enterocitario in risposta alla resezione intestinale si verifica un aumento della trascrizione del sistema di cotrasporto Na^+ /glucosio e dell'attività degli enzimi digestivi (96,97).

L'intestino corto chirurgico è una delle cause più frequenti di insufficienza intestinale e di dipendenza dalla nutrizione parenterale totale, con tutti i rischi che questa comporta. La conoscenza dei meccanismi con cui si verifica l'adattamento intestinale e l'identificazione di fattori che possano accelerare tale processo, rappresentano il punto di partenza per poter stabilire nuove strategie terapeutiche. Nel 1995 Byrne e collaboratori hanno dimostrato che una combinazione di dieta ad alto contenuto di carboidrati, glutamina ed ormone della crescita determinava, in 47 pazienti adulti con intestino corto chirurgico, un miglioramento dell'assorbimento di nutrienti, una riduzione del volume fecale ed una riduzione degli apporti per via parenterale (98). Studi clinici randomizzati controllati più recenti non hanno confermato questo effetto (99,100). Nella maggioranza dei pazienti trattati con GH si verifica però una riduzione del volume fecale ed un aumento dell'assorbimento di elettroliti. Da queste evidenze è

nata l'idea di utilizzare il GH nei pazienti con diarrea intrattabile in nutrizione parenterale.

In questo capitolo della Tesi sono riportati i risultati di uno studio clinico nel quale è stata testata l'efficacia della somministrazione del GH in una popolazione di bambini con insufficienza intestinale.

Metodi

Disegno dello studio

Per la valutazione dell'efficacia del GH nel paziente con diarrea intrattabile è stato condotto uno studio aperto non randomizzato.

Pazienti

Sono stati arruolati tutti i bambini ricoverati presso il nostro reparto per insufficienza intestinale. L'insufficienza intestinale è stata definita come una condizione clinica per la quale la nutrizione parenterale rappresentava l'unica possibilità di garantire un adeguato apporto calorico e consentire una crescita staturale-ponderale soddisfacente.

In particolare sono stati arruolati tutti i bambini con insufficienza intestinale di lunga durata che ricevano nutrizione parenterale esclusiva da almeno 1 mese.

Trattamento

I pazienti sono stati trattati con ormone della crescita (0.1 U/kg/die pari a 0.1mg/kg/die rhGH-Saizen Serono Laboratories Norwell, MA) somministrato per via sottocutanea 1 volta al giorno per 15 giorni. Sono stati arruolati per il trattamento tutti i bambini in condizioni stabili, dal punto di vista metabolico (durata media della nutrizione parenterale precedente il GH 120 ± 30 giorni) e con variazioni del volume fecale e del contenuto fecale in elettroliti inferiore al 10% negli ultimi 10 giorni. Tutti i pazienti erano in nutrizione parenterale esclusiva in quanto ogni tentativo di ridurre la nutrizione parenterale e di introdurre alimenti per via enterale era fallito.

Parametri di efficacia

Sono stati scelti come parametri di efficacia della terapia le modificazioni del volume fecale, del contenuto in elettroliti e del gap ionico fecale e della concentrazione sierica di elettroliti .

Il volume fecale è stato valutato pesando le feci delle 24 ore. Il dosaggio degli elettroliti fecali e la valutazione dell'osmolarità fecale sono stati effettuati il giorno prima di iniziare la terapia ed al termine di questa; un gap ionico fecale inferiore a 70 è stato considerato indice di diarrea secretiva mentre un gap superiore a 70 indice di diarrea osmotica. Il peso corporeo è stato misurato quotidianamente. I risultati in termini di peso sono stati espressi come Δ di incremento medio in % in un periodo di 15 giorni. In particolare è stato calcolato l'incremento medio di peso nei 15 giorni prima, nei 15 giorni di terapia e nei 15 giorni dopo la terapia con GH.

Nessun altro farmaco è stato utilizzato contemporaneamente.

Il protocollo è stato approvato dal comitato Etico del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Napoli "Federico II" e il consenso informato è stato richiesto ai genitori del bambino prima di iniziare lo studio.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm DS.

Il test T di student è stato utilizzato per paragonare il numero di evacuazioni, il volume fecale, l'apporto di liquidi giornaliero le concentrazioni medie di elettroliti nel siero e nelle feci dei pazienti prima e dopo terapia e le modificazioni del peso.

Risultati

In un periodo di 4 anni sono stati arruolati 7 bambini con insufficienza intestinale (età media $6,5 \pm 1,5$ mesi, range 3-20 mesi; 6 maschi), ricoverati presso il Dipartimento Clinico di Pediatria dell'Università di Napoli Federico II. Tra questi, 5 avevano all'inizio del trattamento una diarrea secretiva, mentre 2 avevano una sindrome da intestino corto ed avevano una diarrea osmotica. Tutti i pazienti hanno completato i 15 giorni previsti di terapia con GH. Durante la terapia con GH tutti i parametri di efficacia mostravano un significativo miglioramento. Il numero medio di evacuazioni si è ridotto in maniera significativa ($11,8 \pm 5,1$ vs $4,1 \pm 1,5$ $p < 0.01$). La riduzione è stata particolarmente evidente e significativa nei 5 bambini con diarrea secretiva (da 13.8 ± 4.7 a 3.6 ± 1.5 $p < 0.01$) laddove entrambi i bambini con diarrea osmotica non hanno mostrato alcuna variazione nel numero di evacuazioni (figura 7.1). L'effetto è stato rapido e progressivo come dimostrato da una riduzione significativa del numero di evacuazioni già in settima giornata di terapia (figura 7.1). Alla sospensione del trattamento il numero medio di evacuazioni è progressivamente aumentato anche se a

distanza di 15 giorni dal termine della terapia risultava ancora inferiore rispetto al valore basale ($p=NS$) (figura 7.1).

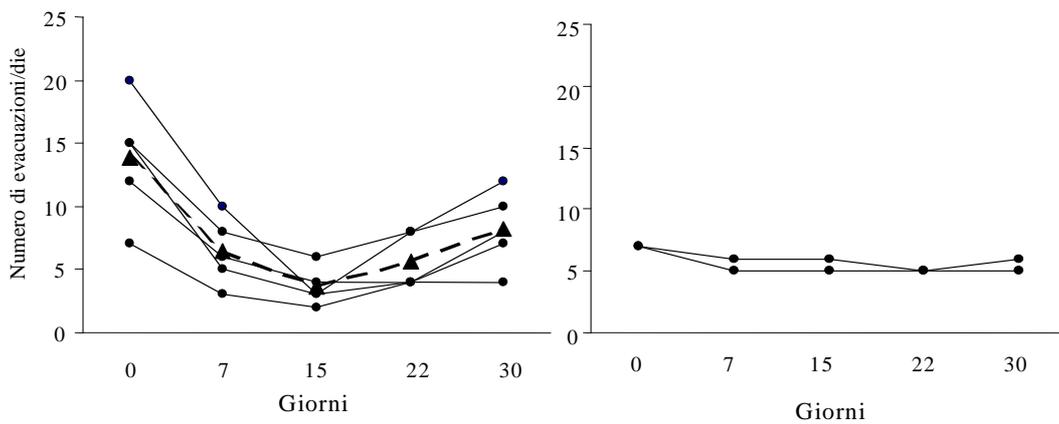


Figura 7.1. Modificazione del numero di evacuazioni nei bambini trattati con GH. I bambini con diarrea secretiva (pannello A) mostravano una significativa riduzione del numero di evacuazioni a differenza dei bambini con diarrea osmotica (pannello B) durante la somministrazione del GH. La riduzione era significativa dopo 7 giorni di trattamento e persisteva tale 7 giorni dopo la sospensione. ($p<0.01$)

In seguito alla somministrazione di GH il volume fecale totale si è ridotto (da 47 ± 25 ml/kg/die a 25 ± 9 ml/kg/die; $p < 0.05$) consentendo una parallela riduzione dell'apporto di liquidi con la nutrizione parenterale (da 172 ± 36 ml/kg/die a 125 ± 36 ml/kg/die; $p < 0.05$) (figura 7.2).

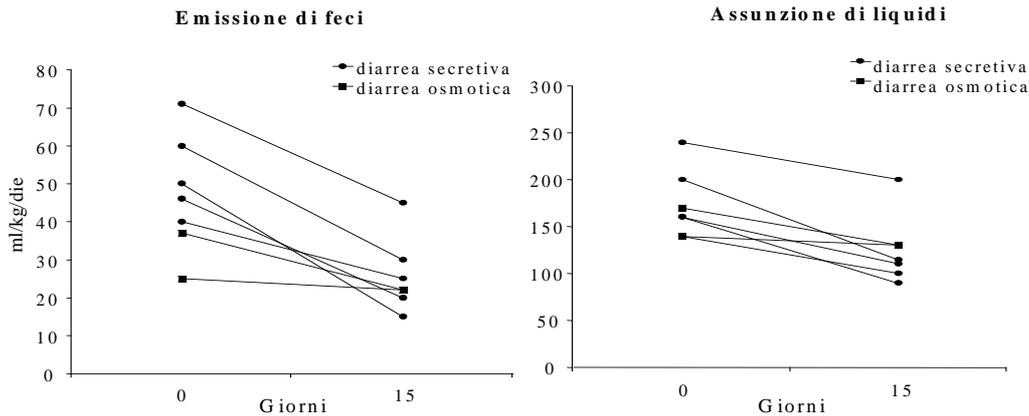


Figura 7.2. La terapia con GH determina una riduzione del volume fecale (pannello A) in tutti i pazienti trattati anche se in maniera più significativa nei bambini con diarrea secretiva (●) rispetto a quelli con diarrea osmotica (■). Nel pannello B è mostrata la parallela riduzione dell'apporto di liquidi con la nutrizione parenterale.

La somministrazione di GH ha inoltre determinato una significativa riduzione delle concentrazioni fecali di ioni Na^+ e di ioni K^+ (rispettivamente da 98 ± 26 mEq/l a 43 ± 42 mEq/l; $p < 0.05$ e da 57 ± 41 mEq/l a 13 ± 11 mEq/l; $p < 0.05$) (figure 7.3 e 7.4). Ancora una volta l'effetto è stato più evidente nei 5 bambini con diarrea secretiva; nel bambino con intestino ultracorto le concentrazioni fecali di Na^+ sono rimaste invariate laddove nell'altro bambino con intestino corto si è osservata una sostanziale riduzione del contenuto di sodio nelle feci. L'effetto del GH sulle concentrazioni fecali di Na^+ e K^+ ha mostrato un andamento simile negli stessi pazienti; la riduzione massima del Na^+ si è infatti verificata negli stessi pazienti che hanno presentato le maggiori variazioni del K^+ .

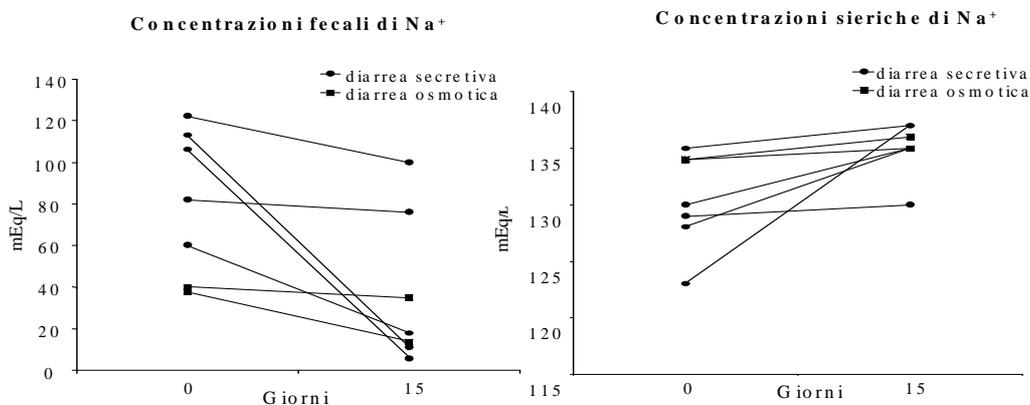


Figura 7.3. La terapia con GH determina una riduzione delle perdite fecali di Na^+ (pannello A) in tutti i pazienti trattati anche se in maniera più significativa nei bambini con diarrea secretiva (●) rispetto a quelli con diarrea osmotica (■). Nel pannello B è mostrata il parallelo incremento delle concentrazioni sieriche del Na^+ .

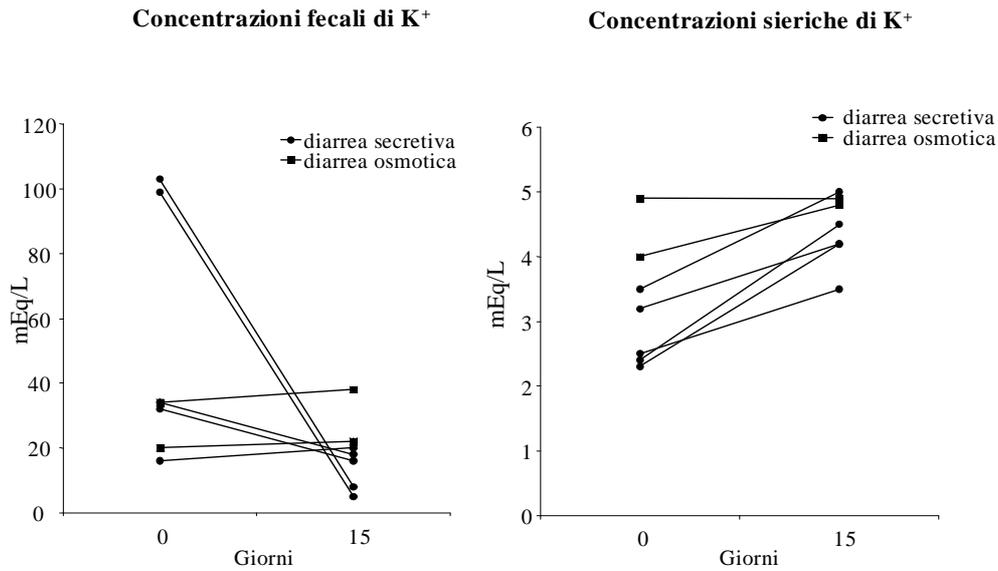


Figura.7.4. La terapia con GH determina una riduzione delle perdite fecali di Na⁺ (pannello A) in tutti i pazienti trattati anche se in maniera più significativa nei bambini con diarrea secretiva (●) rispetto a quelli con diarrea osmotica (■). Nel pannello B è mostrata il parallelo incremento delle concentrazioni sieriche del Na⁺.

Parallelamente ad una riduzione della concentrazione fecale è stato osservato un aumento delle concentrazioni sieriche degli elettroliti che ha consentito una successiva riduzione dell'apporto rispetto a quello precedente alla terapia e necessario per compensare le perdite fecali (figure 7.3 e 7.4).

Infine come conseguenza delle variazioni del contenuto in elettroliti delle feci il gap ionico è aumentato fino a raggiungere valori fisiologici (da 32 +/- 39 a 142 +/- 56; p < 0.01) (figura 7.5).

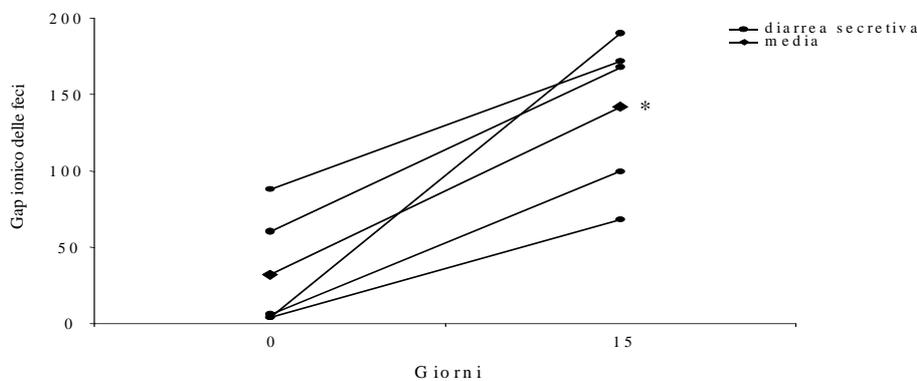


Figura 7.5. Aumento del gap ionico nei pazienti con diarrea secretiva dopo il trattamento con GH

Durante la terapia con GH l'incremento medio in % del peso è risultato significativamente superiore rispetto a quello dei 15 giorni precedenti l'inizio della terapia (8,5% vs 2,8%; $p < 0.05$); dopo 15 giorni di sospensione l'incremento medio sebbene più basso risultava ancora superiore anche se non significativamente rispetto ai valori basali (figura 7.6).

Nessun caso di edema periferico è stato osservato nei nostri pazienti; 2 pazienti hanno lamentato dolore articolare all'anca sinistra e al gomito destro rispettivamente, che è regredito spontaneamente dopo alcuni giorni, senza sospensione del trattamento.

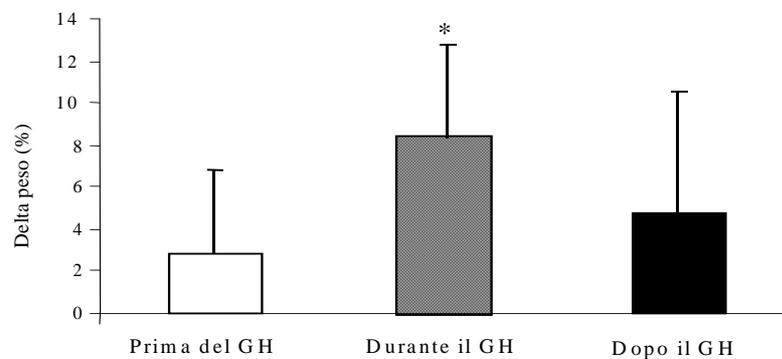


Figura 7.6. La somministrazione di GH si associa ad un significativo incremento di peso. Tale effetto si riduce nei 15 giorni successivi anche se non si osserva un ritorno ai valori basali. * $p < 0.05$ vs prima del GH.

Discussione

Negli ultimi anni sono stati compiuti numerosi sforzi per identificare nuove terapie efficaci per bambini con diarrea intrattabile e insufficienza intestinale. Attualmente, grazie all'ampia disponibilità dell'ormone sintetico e alla vasta esperienza clinica del suo uso nell'uomo, sono sempre più numerose le esperienze cliniche e sperimentali sui possibili usi alternativi del GH in diverse condizioni patologiche quali l'osteoporosi, i trapianti d'organo o dopo le ustioni, le fratture, i grossi traumatismi e le anastomosi chirurgiche del tratto gastrointestinale. Recentemente l'ormone della crescita ricombinante è stato utilizzato in pazienti in alimentazione parenterale totale. In questi pazienti il trattamento con GH è stato ben tollerato e si è dimostrato utile nel migliorare l'efficacia metabolica dell'alimentazione parenterale totale. Anche in pazienti affetti da

infezione da HIV il trattamento con GH ricombinante determina un incremento della fase anabolica del metabolismo proteico e lipidico, contrastando in maniera significativa il dimagrimento tipico dei pazienti affetti da questa infezione cronica. Di recente è stato inoltre dimostrato, in un modello animale, che la somministrazione dell'ormone della crescita ricombinante induce un significativo recupero del peso corporeo e un allungamento del tratto residuo in ratti sottoposti ad ampia resezione intestinale (101,102).

L'ormone della crescita possiede a livello intestinale un duplice effetto: proassorbitivo sul trasporto di ioni e trofico sull'enterocita. L'effetto proassorbitivo è espresso dalla riduzione della corrente di corto circuito registrata attraverso il sistema delle camere di Ussing, che rappresenta l'equivalente elettrico di un aumentato flusso di anioni dal compartimento mucosale a quello sierosale. L'effetto trofico, espresso da un aumento dell'incorporazione di timidina triziata rappresenta un'altra dimostrazione di una diretta interazione tra GH ed intestino.

La dimostrazione che l'ormone della crescita possiede a livello intestinale due effetti così importanti rappresenta il razionale per un suo utilizzo in condizioni cliniche, quali la diarrea intrattabile e l'insufficienza intestinale, in cui vengono ad essere alterate sia la funzione assorbitiva-digestiva che la funzione di trasporto transepiteliale di elettroliti. I risultati dello studio clinico riportato nella presente Tesi, sebbene ottenuti in un campione limitato di pazienti, sono incoraggianti. Tutti i bambini con diarrea secretiva hanno mostrato una riduzione delle perdite intestinali di acqua, e di elettroliti. Il ruolo diretto e specifico del GH nell'effetto proassorbitivo è indicato da un peggioramento della diarrea e del peso osservato alla sospensione del trattamento.

Un effetto simile è stato descritto in pazienti adulti con sindrome dell'intestino corto che ricevevano GH e glutamina in associazione ad una dieta ricca in carboidrati e povera di lipidi (7,20). In questo studio non era chiaro se l'effetto fosse direttamente correlato al GH perché una simile risposta si aveva anche con la dieta da sola o con la dieta associata a GH o glutamina.

Esistono quindi dati in favore di una efficacia del GH in soggetti malati ma non in volontari sani; questo suggerisce che il GH potrebbe agire in condizioni di alterata omeostasi (massiva perdita di intestino in seguito a interventi di resezione) e che quindi potrebbe promuovere e facilitare il processo di adattamento. È noto che numerosi fattori come ad esempio la glutamina e l'alimentazione stessa possano svolgere funzioni importanti. Nessuno dei nostri pazienti era alimentato per via orale al momento della

terapia, ciò nonostante l'effetto positivo del GH si è mantenuto per 15 giorni dopo la sospensione; questo potrebbe essere spiegato dall'attivazione di una cascata di segnali intracellulari che attiverrebbero specifici geni regolatori della crescita (46). In conclusione i risultati di questa Tesi dimostrano l'efficacia del GH nella terapia dell'insufficienza intestinale in età pediatrica e come la conoscenza dei meccanismi fini di regolazione del trasporto di acqua ed elettroliti attraverso l'epitelio intestinale potrebbe permettere l'individuazione di modulatori specifici da impiegare in alternativa al GH nella terapia di tutte le patologie caratterizzate da alterazioni del trasporto di acqua ed elettroliti.

I risultati presentati in questo capitolo della Tesi sono oggetto di una pubblicazione scientifica attualmente in fase di preparazione.

8. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'insieme delle ricerche presentate in questa Tesi di Dottorato delinea un approccio combinato ed integrato alla problematica della insufficienza intestinale in età pediatrica. Utilizzando modelli diversi, di ricerca clinica e sperimentale di base, è stato possibile giungere ad un miglioramento delle conoscenze in questo campo, con ricadute importanti per la gestione del bambino con insufficienza intestinale.

Nella prima parte della Tesi è stato utilizzato un approccio epidemiologico che ha permesso la valutazione dell'incidenza di insufficienza intestinale in Italia. Per la prima volta sono state definite in modo sistematico le dimensioni del problema ad un livello nazionale. Proprio partendo dal concetto di malattia rara e dalla oggettiva considerazione che sono necessarie competenze mediche e chirurgiche combinate, è stato proposto e validato un modello assistenziale per la gestione dei bambini con insufficienza intestinale. Il modello, basato su una rete integrata di centri, ha permesso di studiare la storia naturale dell'insufficienza intestinale e di migliorare, a livello nazionale, l'approccio e la gestione del bambino con insufficienza intestinale. Nella seconda parte della Tesi sono stati presentati i risultati degli studi condotti sui meccanismi cellulari di diarrea intrattabile e insufficienza intestinale. In particolare, è stato chiarito il ruolo dell'ossido nitrico nel controllo del trasporto di ioni da parte dell'enterocita ed è stato caratterizzato un modello sperimentale in vitro di diarrea da Rotavirus. Il modello in vitro ha offerto la base per studi di fisiologia della riproduzione del danno cellulare.

Infine è stato affrontato il problema della terapia dell'insufficienza intestinale. L'ormone della crescita (GH) è stato proposto con questa indicazione, con risultati promettenti, nell'adulto. È stato studiato il meccanismo d'azione del GH in cellule enterocitarie umane. Questi studi hanno permesso anche di chiarire il ruolo di proteine importanti nella trasduzione del segnale intracellulare, le MAP chinasi, nel controllo del trasporto transepiteliale di ioni. Sulla base di questi risultati ottenuti in vitro, è stato proposto ed effettuato uno studio in vivo, in bambini con insufficienza intestinale, sull'efficacia del GH. I risultati di quest'ultima parte della Tesi dimostrano come il GH sia efficace nel migliorare le perdite fecali e la crescita ponderale in bambini con insufficienza intestinale.

Tutte le ricerche riportate in questa Tesi rappresentano quindi il risultato di un unico filo conduttore attraverso il quale una patologia complessa è stata studiata con

molteplici approcci e modelli clinici, assistenziali e sperimentali con il risultato di un miglioramento delle conoscenze nel campo dell'insufficienza intestinale e della gestione del bambino con questa patologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Avery GB, Villavicencio O, Lilly JR, Randolph JG. Intractable diarrhea in early infancy. *Pediatrics* 1968;41:712-722.
2. Larcher VF, Shepherd R, Francis DE, Harris JT. Protracted diarrhoea in infancy. Analysis of 82 cases with particular reference to diagnosis and management. *Arch Dis Child* 1977;52:597-605.
3. Guarino A, Spagnuolo MI, Russo S, Albano F, Guandalini S, Capa G, Vairano P, Liguori R, Casola A et al. Etiology and risk factor of severe and protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*1995;20:173-178.
4. Ventura A, Dragovich D. Intractable diarrhoea in infancy in the 1990s: a survey in Italy. *Eur J Pediatr* 1995;154:522-525.
5. Walker-Smith JA, Unsworth DJ, Hurchins P, Phillips AD, Holborow EJ. Autoantibodies against gut epithelium in child with small intestinal enteropathy. *Lancet* 1982;319:566-567.
6. Murch SH. The molecular basis of intractable diarrhoea in infancy. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 1997; vol. 11 No.3: 413-440.
7. Scolapio JS, Camilleri M, Fleming CR, Oenning LV, Burton DD, Sebo TJ, Batts KP, Kelly DG. Effect of growth hormone, glutamine and diet on adaptation in short bowel syndrome: a randomised, controlled study. *Gastroenterology* 1997;113:1074-1081.
8. Catassi C, Fabiani E, Spagnuolo MI, Barera G, Guarino A. Severe and protracted diarrhea: results of the 3-year SIGEP multicenter survey. Working Group of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*1999; 29: 63-68.
9. Georgeson K and Brown P. Short Bowel Syndrome 1998 in *Pediatric Surgery and Urology: Long term outcomes*. WB Saunders Company Ltd (London).
10. Yan D, Michel JL, Goulet O, et al. Up to date evolution of small bowel transplantation in children with intestinal failure. *J Pediatr Surg* 1999;34:841-844.
11. Nishida S, Levi D, Kato T, et al. Ninety-five cases of intestinal transplantation at the University of Miami. *J Gastrointest Surg* 2002;6:233-9.
12. Kaufman SS, Atkinson JB, Bianchi A, et al. Indications for pediatric intestinal transplantation: a position paper of the American Society of Transplantation. *Pediatr Transplant* 2001;5:80-7.
13. Pinna AD, Tzakis AG. Experience on intestinal and multivisceral transplantation at University of Miami.1998 Eighth Congress of the International Gastro-surgical Club, Strasburg, France 15-18 April.
14. Niv Y, Mor E, Tzakis A. Small bowel Transplantation, a clinical review. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3126-3130.
15. Misiakos EP, Weppler D, Bakonyi A, Nery JR, Pinna AD, Kato T, Rodriguez M, Ruiz P, Thompson J, Ricardi C, Tzakis AG. Clinical outcome of intestinal transplantation at the University of Miami. *Transplant Proc* 1999;31:569-571.

16. Spagnuolo MI, Iorio R, Vegnente A, Guarino A. Ursodeoxycholic Acid for treatment of cholestasis in children on long-term parenteral nutrition: a pilot study. *Gastroenterology* 1996;111:716-719.
17. Harris AG, O'Dorisio TM, Woltering EA, Anthony LB, Burton FR, Geller RB, Grendell JH, Levin B, Redfern JS. Consensus statement: Octreotide dose titration in secretory diarrhea. Diarrhea management consensus development panel. *Dig Dis Sci* 1995;40:1464-1473.
18. Guarino A, Berni Canani R, Spagnuolo MI, Bisceglia M, Boccia MC, Rubino A. In vivo and in vitro efficacy of Octreotide for treatment of enteric Cryptosporidiosis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 436-441.
19. Berni Canani R, Iafusco M, Russo R, Bisceglia M, Polito G, Guarino A. Comparative effects of Growth Hormone on water and ion transport in rat jejunum, ileum, and colon. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1076-1081.
20. Szkudlarek J, Jeppesen PB, Martensen PB. Effect of high dose growth hormone with glutamine and no change in diet on intestinal absorption in short bowel patients : a randomised, double blind, crossover, placebo controlled study. *Gut* 2000;47:199-205.
21. Berni Canani R, Bisceglia M, Bruzzese E, Mallardo G, Guarino A. Growth Hormone stimulates, through tyrosine kinase, ion transport and proliferation in human intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 315-320.
22. Guarino A et al. The National Network model for children with intestinal failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 357.
23. Georgeson KE and Breaux CW Jr. Outcome and intestinal adaptation in neonatal short-bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 344-348.
24. Sigalet DL. Short bowel syndrome in infants and children: an overview. *Semin Pediatr Surg* 2001; 10: 49-55.
25. Pokorny WJ et al. Necrotizing enterocolitis: incidence, operative care, and outcome. *J Pediatr Surg* 1986;21:1149-54.
26. Freeman RB et al. Surgical treatment of necrotizing enterocolitis: a population based study in the Grampian region, Scotland. *J Pediatr Surg* 1988; 23: 942-44.
27. Jackman S et al. Results of surgical treatment of neonatal necrotizing enterocolitis. *Br J Surg* 1990;77:146-48.
28. Grosfeld JL et al. Changing trends in necrotizing enterocolitis. Experience with 302 cases in two decades. *Ann Surg* 1991;214:300-6.
29. Lemelle JL et al. Neonatal necrotizing enterocolitis : a retrospective and multicentric review of 331 cases. *Acta Paediatr Suppl* 1994;396:70-3.
30. Kurscheid T and Holscheineider AM. Necrotizing enterocolitis (NEC)—mortality and long-term results. *Eur J Pediatr Surg* 1993;3:139-143.
31. Patel JC et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: the long-term perspective. *Am Surg* 1998;64:575-79.
32. Walker-Smith JA. Intractable diarrhoea of infancy: a continuing challenge for the paediatric gastroenterologist. *Acta Paediatr* 1994;83:6-9.

33. Dorney SF, Ament ME, Berquist WE, et al. Improved survival in very short small bowel of infancy with the use of long-term parenteral nutrition. *J Pediatr* 1985;107:521-5.
34. Zlotkin SH, Stallings VA, Pencharz PB. Total parenteral nutrition in children. *Pediatr Clin North Am* 1985;32:381-400.
35. Burnes JU, O'Keefe SJ, Fleming CR, et al. Home parenteral nutrition- a 3-year analysis of clinical and laboratory monitoring. *J Parenter Enteral Nutr* 1992;16:327-32.
36. Glass RI, Kilgore P, Holman R, Jin S, Smith J, Woods P, Clarke M, Ho MS, Gentsch J. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimate of the disease burden. *J Infect Dis* 1996;176:S5-S11.
37. Guarino *Lancet* 2002.
38. Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection* 2001;3:1145-1156.
39. Estes MK, Kang G, Zeng CQY, Crawford SE, Ciarlet M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Gastroenteritis virus. Novartis Foundation Symposium* 2001;238:82-100.
40. Reynolds D, Hall G, Debney T, Parsons K. Pathology of natural rotavirus infection in clinically normal calves. *Res Vet Sci* 1985;38:827-835.
41. Halls IH, Ruck B, Bishop R, Davidson G. Infantile enteritis; morphogenesis and morphology. 1975 *J Virol*;16:937-943.
42. Davidson GP, Barnes GL. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. 1979 *Acta Paediatr Scand*;68:181-186.
43. Collins JE, Benfield DA, Duimstra JR. Comparative virulence of two porcine group-A rotavirus isolates in gnotobiotic pigs. 1989 *Am J Vet Res*;50:827-835.
44. Theil KW, Bohl EH, Cross RF, Kohler EM, Agnes AG. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. 1979 *Am J Vet Res*;39:213-220.
45. McAdaragh JP, Bergeland ME, Meyer RC et al. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: a microscopic study. 1980 *Am J Vet Res*;41:1572-81.
46. Ward LA, Rosen BI, Yuan L, Saif L. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. 1996 *J Gen Virol*;77:1431-1441.
47. Ball JM, Tian P, Zeng CQ-Y, Morris A, Estes MK. Age-dependent diarrhoea is induced by a viral nonstructural glycoprotein. 1996 *Science*;272:101-104.
48. Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. 1994 *J Virol*;68:251-257.
49. Tian P, Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CG-Y, Schilling WP. The rotavirus non-structural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. 1995 *J Virol*;69:5763-5772.

50. Dong Y, Zeg CQ-Y, Ball JM, Estes MK, Morris AP. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. 1997 Proc Natl Acad Sci;94:3960-3965.
51. Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnoo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. 2000 Science;287:491-495.
52. Svensson L, Finlay BB, Buss D, von Bonsdorff CH, Greenberg HB. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. 1991 J Virol;65:4190-97.
53. Guarino A, Casola A, Bruzzese E, Saini M, Nitsch L, Rubino A. Human serum immunoglobulin counteracts rotaviral infection in Caco-2 cells. 1996 Pediatr Res;40:881-887.
54. Guarino A, Guandalini S, Albano F, Mascia A, de Ritis G, Rubino A. Enteral immunoglobulins for treatment of protracted rotaviral diarrhea. 1991 Pediatr Infect Dis J;10:612-614.
55. Guarino A, Berni Canani R, Russo S, Albano F, Berni Canani M, Ruggieri FM, Donelli G, Rubino A. Oral immunoglobulins for treatment of acute rotaviral gastroenteritis. 1994 Pediatrics;93:12-16.
56. Guarino A, Berni Canani R, Casola A, *et al.* Human intestinal Cryptosporidiosis: Secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J Infect Dis* 1995;171:976-83
57. Estes MK, Graham DY, Gerba CP, Smith EM. Simian rotavirus SA11 replication in cell culture. 1979 J Virol;31:810-815.
58. Kitamoto N, Ramig RF, Matson DO, Estes MK. Comparative growth of different rotavirus strains in different cells (MA 104, Hep G2, Caco-2). 1991 Virology;184:729-737.
59. Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. Infectious Rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. 1988 J Virol;62:1136-1144.
60. Wyatt RG, Greenberg HB, James WD, Pittman AL, Kalica AP, Flores J, Chanock RM, Kapikian A. Definition of human Rotavirus by plaque reduction assay. 1982 Infect Immun;37:110-115.
61. Field M, Fromm D, Mc Coll I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na⁺ and Cl⁻ fluxes and short.circuit current. *Am J Physiol* 1971;220:1388-98.
62. Guarino A, Bisceglia M, Berni Canani R, Boccia MC, Mallardo G, Bruzzese E, Massari P, Rappuoli R, Telford J. Enterotoxic effect of the vacuolating toxin produced by *Helicobacter pylori* in Caco-2 cells. 1998 J Infect Dis;178:1373-1378.
63. Hansen MB, Skadhauge E 1995 New aspects of the pathophysiology and treatment of secretory diarrhoea. *Physiol Res* 44:61-78
64. Izzo A, Mascolo N, Capasso F 1998 Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. *Dig Dis Sci* 43:1605-1620
65. Mourad FH, Turvill JL, Farthing MJG 1999 Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut* 44:143-147.

66. Ignarro LS 1991 Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 41:485-490
67. Kubes P 2000 Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 47:6-9
68. Stefano GB, Salzet M, Magazine HI, Bilfinger TB 1998 Antagonism of LPS and interferon gamma induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by nitric oxide inhibition of adenylate cyclase. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:813-820
69. Lowenstein C, Dinerman J, Snyder S 1994 Nitric oxide, a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120:227-237
70. Blachier F, Darcy-Vrillon B, Sener A 1991 Arginine metabolism in rat enterocytes. *Biochim Biophys Acta* 1092:304-310
71. Schirgi-Degen A, Beubler E 1996 Involvement of K⁺ channel modulation in the proabsorptive effect of nitric oxide in the rat jejunum in vivo. *Eur J Pharm* 316:257-262
72. Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJR 1993 Nitric oxide synthase induction and intestinal cell viability in rats. *Am J Physiol* 265:G214-G218
73. Whittle BJR 1994 Nitric oxide in gastrointestinal physiology and pathology. In: Johnson LR (eds) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Volume 1. 3rd ed Raven New York, pp 267-294
74. Bosheng Q, Pothoulakis C, Castagliuolo I, Nikulasson Z, Lamont JT 1996 Nitric oxide inhibits rat intestinal secretion by *Clostridium difficile* Toxin A but not *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Gastroenterology* 111:409-418
75. Turvill JL, Mourad FH, Farthing MJG 1999 Proabsorptive and prosecretory roles for nitric oxide in cholera toxin induced secretion. *Gut* 44:33-39
76. Salzman AL, Eaves-Pyles T, Linn S, Denenberg AG, Szabò C 1998 Bacterial induction of nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 114: 93-102
77. Guarino A, Bisceglia M, Berni Canani R, Boccia MC, Mallardo G. Enterotoxic effect of the vacuolating toxin produced by *Helicobacter pylori* in Caco-2 cells. *J Infect Dis* 1998;178:1373-1378.
78. Moore PK, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG 1994 L-N-iminoethyl-lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37 :3886-3888
79. Salzman AL, Denenberg AG, Ueta I, O'Connor M, Linn S, Szabò C 1995 Induction and activity of nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* 270:G565-G573.
80. Vignoli AL, Srivastava RC, Stamatii A, Turco L, Tanori M, Zucco F 2001 Nitric oxide production in Caco-2 cells exposed to different inducers, inhibitors and natural toxins. *Toxicology in vitro* 15:289-295.
81. Carey HV. 1997. Putting a brake on secretion. *Gastroenterology*;113:689-690.
82. Forstermann U, Boisesel JP, Kleinert H 1998 Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III) *FASEB J* 12:773-790.

83. Beubler E, Schirgi-Degen A 1997 Nitric oxide counteracts 5-hydroxytryptamine and cholera toxin-induced fluid secretion and enhances the effect of oral rehydration solution *Eur J Pharmacol* 326:223-228.
84. Guarino A, Berni Canani R, Iafusco M, *et al.* In vivo and in vivo effects of human growth hormone on rat intestinal ion transport. *Pediatr Res* 1995;**37**:576-80.
85. Tilly BC, Gaestel M, Engel K, *et al.* Hypo-osmotic cell swelling activates the p38 MAP kinase signalling cascade. *FEBS Lett* 1996;395:133-136.
86. Baudouin-Legros M, Brouillard F, Cougnon M, *et al.* Modulation of CFTR gene expression in HT-29 cells by extracellular hyperosmolarity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;**278**:C49-C56.
87. Field M, Fromm D, Mc Coll I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na⁺ and Cl⁻ fluxes and short.circuit current. *Am J Physiol* 1971;**220**:1388-98.
88. Narkar V, Hussain T, Lokhandwala W. Role of tyrosine kinase and p42/44 MAPK in D(2)-like receptor-mediated stimulation of Na(+), K(+)-ATPase in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;**282**:F697-702.
89. Niisato N, Ito Y, Marunaka Y. Activation of Cl⁻ channel and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in renal epithelial A6 cells by flavonoids: genistein, daidzein, and apigenin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**254**:368-71.
90. Aimond F, Rauzier JM, Bony C, *et al.* Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current I_{TREK} in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2000;**275**:39110-16.
91. Martin JL, Weenink SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 potentiates epidermal growth factor action in MCF-10A mammary epithelial cells. Involvement of p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2003;**278**:2969-76.
92. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 2003;**52**:144-51.
93. Sebolt-Leopold JS, Dudley TH, Herrera R, *et al.* Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999; **5**:810-6.
94. Zhu T, Goh ELK, Graichen R, *et al.* Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 2001;**13**:599-616.
95. Williamson RCN. Intestinal adaptation : structural, functional and cytogenic changes. 1978. *N Engl J Med*;298:1393-1402.
96. Hines OJ, Bilchik AJ, Zinner MJ, Skotzko MJ, Moser JA, McFadden DW, Ashley SW. Adaptation of the Na/glucose cotransporte following intestinal resection. 1994. *J Surg Res*;57:22-27.
97. Chaves M, Smith M, Williamson RCN. Increased activity of digestive enzymes in ileal enterocytes adapting to proximal small bowel resection. 1987. *Gut*;28:981-87.
98. Byrne TA, Persinger RL, Young LS, Ziegler TR, Wilmore DW. A new treatment for patients with short bowel syndrome. Growth hormone, glutamine and a modified diet. 1995. *Ann Surg*;222:243-55.

99. Vanderhoof JA, Kollmann KA, Griffin S, Thomas EA. Growth hormone and glutamine do not stimulate intestinal adaptation following massive small bowel resection in rat. 1997. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;25:327-31
100. Szkudlarek J, Jeppesen PB, Mortensen BP. Effect of high dose growth hormone with glutamine and no change in diet on intestinal absorption in short bowel patients: a randomised, double-blind, crossover, placebo controlled study. 2000. *Gut*;47:199-205.
101. Cooke PS, Yonemura CU, Russel SM, Nicoll CS. Growth and differentiation of the fetal rat intestine transplants: dependence on insulin and growth hormone. 1986. *Biol Neonate*;49:211-218.
102. Shulman DI, Hu CS, Ducklett G, Lavalley-Gray M. Effects of short term growth hormone therapy in rats undergoing 75% small intestinal resection. 1994. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;18:446-452.

APPENDICE

Pubblicazioni scientifiche prodotte durante il corso di Dottorato di Ricerca

1. Primary intestinal failure in children: development of the network model.
Guarino A, **De Marco G**. 2002. Rivista Italiana di Nutrizione Parenterale ed Enterale;20:S24-7.
2. Nitric oxide produced by the enterocyte is involved in the cellular regulation of ion transport.
Berni Canani R, Cirillo P, Buccigrossi V, **De Marco G**, Mallardo G, Bruzzese E, Polito G, Guarino A. 2003. *Pediatr Res*;54:1-5.
3. Natural history of intestinal failure, investigated through a network-based approach.
Guarino A, **De Marco G** for the Italian National Network for Pediatric Intestinal Failure. 2003. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37:136-141.
4. Management of gastrointestinal disorders in children with HIV infection.
Guarino A, Bruzzese E, **De Marco G**, Buccigrossi V. 2003. *Paediatric drugs* (in stampa).
5. Persistent Diarrhea.
Guarino A, **De Marco G**. In *Pediatric Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management – 4th Edition*. Edited by W. Allan Walker, Olivier-Jean Goulet, Ronald E. Kleinman, Ian R. Sanderson, Philip M. Sherman, Benjamin L. Shneider. BC Decker Inc. Publisher. 2003 (in stampa).
6. MAP kinases p42/44 and p38 are involved with distinct roles in growth hormone-induced proliferation and ion absorption in human enterocytes.
De Marco G, Berni Canani R, Mallardo G, Passariello A, Cirillo P, Polito G, Esposito F, Guarino A. 2003 manoscritto sottomesso per la pubblicazione.