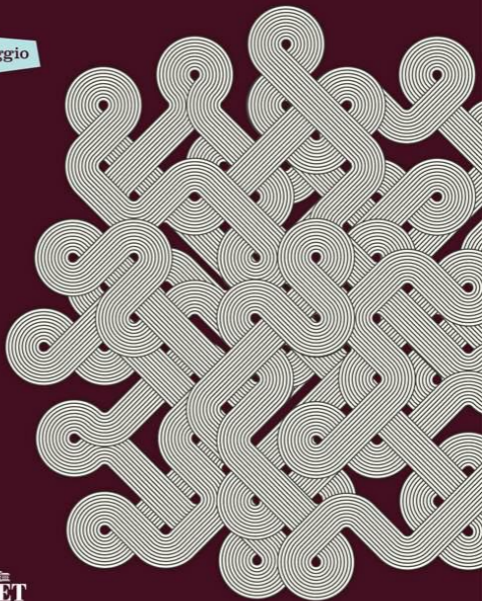


Michael D. Gershon

IL SECONDO CERVELLO

saggio




UTET



Michael D. Gerhson

IL SECONDO CERVELLO

A cura di
Maria Grazia Petruccioli

Presentazione di
Umberto Solimene

Traduzione di
Silvia Currò, Claudio Porcellana,
Antonella Ricagno, Ornella Vecchio



Titolo originale: *The Second Brain: a Groundbreaking New Understanding of Nervous Disorders of the Stomach and Intestine*

© 1998, Michael D. Gershon, M.D.

Tutti i diritti riservati

© 2006, UTET S.p.A.

© 2013, De Agostini Libri S.p.A., Novara

Prima edizione e-book ottobre 2013

ISBN 978-88-418-9999-3

www.utetlibri.it

Nessuna parte di questo volume può essere riprodotta, memorizzata o trasmessa in alcuna forma e con alcun mezzo, elettronico, meccanico o in fotocopia, in disco o in altro modo, compresi cinema, radio, televisione, senza autorizzazione scritta dall'Editore. Le riproduzioni per finalità di carattere professionale, economico o commerciale, o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da CLEARedi, corso di Porta Romana 108, 20122 Milano, e-mail info@clearedi.org e sito web www.clearedi.org.

Indice

Presentazione di Umberto Solimene

Prefazione

PARTE PRIMA

Le conquiste iniziali

1. La scoperta del secondo cervello
2. Il sistema nervoso autonomo e la storia della neurotrasmissione chimica
3. La svolta
4. Il workshop

PARTE SECONDA

Diario di viaggio

5. Dietro i denti: il territorio di caccia della piroisi e dell'ulcera
6. Avanti e in basso
7. La fine non arriva mai
8. Un cattivo intestino

PARTE TERZA

Il secondo cervello: origine e disturbi

9. Il sistema nervoso enterico oggi
10. Gli immigrati e il colon dei quartieri bassi
11. La destinazione è tutto!
12. Lo stato dell'intestino

Nota conclusiva

Ringraziamenti

Secondo cervello, una nuova concezione dell'uomo

Il Prof. Gershon ci presenta una rivoluzione copernicana nella concezione dell'organismo umano: la visione del corpo dominato dalla mente lascia il posto a una visione integrata, dove l'intestino è un secondo cervello. La caduta dell'impero retto dal cervello unico sovrano apre la via a un sistema pluricentrico. La storia di questa scoperta è anche la conferma di alcune conoscenze tradizionali: l'affermazione neurobiologica della stretta connessione tra mente e corpo, in particolare tra cervello e intestino.

Nella storia della medicina moderna, l'intestino per molto tempo è stato considerato una struttura periferica dell'organismo, deputata a svolgere funzioni se non marginali, sicuramente secondarie rispetto a più nobili attività svolte da altri organi quali il cervello e il cuore.

La radice di questo pregiudizio è rintracciabile nell'antica idea platonica del corpo visto come composto dal soma – il corpo inerte del morto – vivificato dalla psiche – l'anima – che conferisce vita e intelligenza al tutto. Più tardi Cartesio si sentirà in obbligo di sottolineare la predominanza di una res cogitans deputata a controllare e dirigere la passiva res extensa, inerte. Nel corso della storia della medicina, in questa visione che assegna al corpo il ruolo di passivo esecutore di ordini impartiti dall'alto, nel ruolo di imperatore si alterneranno differenti organi. I principali coordinatori dell'organismo saranno essenzialmente due: cuore e cervello. L'intestino non sarà mai coinvolto in queste guerre di palazzo e nei secoli resterà relegato nell'oscuro ruolo di cloaca dei palazzi imperiali. Solo la medicina cinese azzarderà una sua promozione a Ministro delle Dimissioni, ma ciò non lo avvicinerà di un passo a quella stanza dei bottoni da cui gli organi imperatori coordinano le attività funzionali dell'intero organismo. È pur vero che in questo lungo periodo le menti più eccelse avevano dovuto constatare come le più nobili passioni o le idee più audaci potessero essere ridotte al nulla da banali mal di pancia. Come afferma Gershon, «Nessuno riesce a pensare seriamente se la sua mente è concentrata sulla toilette». Tuttavia queste insurrezioni coliche non avevano mai dato origine a riflessioni serie sui rapporti intercorrenti tra cuore, mente, cervello e intestino.

La scoperta dell'intestino «sede indipendente di integrazione ed elaborazione neurale» costituisce, quindi, un'importante innovazione, che ha rilevanti implicazioni a livello della

valutazione delle relazioni organismo/intestino, ma anche, e soprattutto, a livello di un mutamento di concezione della struttura dell'uomo, di cui probabilmente siamo solo agli albori. Ma non basta. Le importanti scoperte di Gershon portano a intravedere nell'intestino non un regno oscuro e caotico, contrapposto all'impero chiaro e ordinato del cervello, bensì un altro ordine, un altro tipo di strutturazione, non per questo barbara. Fornisce gli elementi di base per capire come l'attività dell'imperatore, cuore o cervello che sia, venga condizionata dagli influssi di questo regno periferico, non meno di quanto essa condizioni la vita e il funzionamento dell'intestino stesso. In questo senso, uno dei meriti principali dell'autore è proprio la sua capacità di far emergere con chiarezza come l'uomo non possa essere paragonato a una macchina o a un robot perché, in realtà, è una struttura complessa, ove tutte le parti, in costante contatto tra loro, contribuiscono in maniera paritetica allo sviluppo e al mantenimento dell'unità dell'essere, nella salute come nella malattia.

Visioni del mondo e struttura integrata dell'organismo

Per lungo tempo, la funzione di imperatore dell'organismo è stata occupata dal cuore. Il cuore palpitante, trasalente, in gola, in procinto di uscire dalle orbite sotto le varie spinte emotive per le sue strette relazioni con la vita emozionale dell'uomo, è stato, per lungo tempo, considerato il custode e l'ordinatore della vita emotiva, nonché di quella vegetativa, trasmessa a tutto l'organismo attraverso il sangue. In seguito, è stato il cervello che, con le sue strette e infinite connessioni, ha ricoperto il ruolo di monarca, in grado di comandare, coordinare e dirigere tutta la vita emozionale, affettiva, cognitiva e somatica dell'uomo. E il cervello, divenuto la casa del pensiero assoluto, è stato ritenuto in grado non solo di coordinare la vita biologica dell'organismo, ma di produrre tutta la vita interiore tipica dell'uomo dando una solida base biologica alla nozione di anima. In breve, la cartesiana metafora della res cogitans e della res extensa trova nel binomio cervello/corpo la sua espressione più organica e, per così dire, la sua dimostrazione.

Tuttavia, è indubbio che il mondo stia marciando, nella sua globalità, verso ordinamenti democratici, in cui i centri di potere si moltiplicano diventando più d'uno, in costante confronto e cooperazione tra loro. Gli studi e le scoperte scientifiche degli ultimi vent'anni sembrano mostrare un trend analogo per quanto riguarda il corpo umano. È così che l'organismo è visto come composto da più centri integrati tra loro, strutturati per comporre l'unità del corpo umano. Al momento attuale la psico-neuro-immuno-endocrinologia costituisce la disciplina che meglio descrive questa molteplice e integrata rete di comando.

Le intuizioni delle medicine tradizionali

Le ultime ricerche di neuroanatomofisiologia, tra cui importantissime quelle dell'autore, sembrano confermare alcune visioni tradizionali del corpo umano, in cui si parla di «cervello viscerale», a indicare l'importanza del ruolo dell'intestino a livello della vita emozionale e organica.

Come già accennato, è evidente che il potere assoluto del cuore e della mente spesso si arresta alle soglie di un regno oscuro e mal definibile, che è il tubo digerente. Pensare e amare è sempre possibile, ma una colica addominale è in grado di smorzare i pensieri del più grande filosofo o le passioni del più grande amatore. E, a differenza di quanto accade per altri aspetti dell'uomo, è un fenomeno poco o per nulla controllabile. Di fronte a una colica, il più grande dei pensatori avverte la limitatezza dell'impero della ragione e l'impotenza in cui, al di là dei sogni della ragione stessa, l'uomo vive.

Dopo le scoperte di Gershon, si potrà mai più essere del tutto certi che un'alterata funzionalità dell'intestino dipenda da un disturbo delle emozioni o piuttosto non sia proprio l'alterazione della funzionalità intestinale a determinare un'alterazione e un disturbo della vita emozionale? Questa stretta interazione tra intestino e cervello presenta – al di là della modalità con cui viene indagata e dimostrata nel testo – un'impressionante analogia con il sapere di quelle culture tradizionali che, per esempio, collocano il digiuno come pratica salutare specifica, propria di una presupposta interazione cervello/intestino. Troviamo, infatti, il digiuno tradizionalmente sempre connesso a pratiche legate alla spiritualità e al sacro e a tentativi dell'uomo di superare i condizionamenti mentali e le categorie del pensiero ordinario connesse con la sua corporeità.

Può sembrare paradossale ma il digiuno, insieme alla preghiera e alla meditazione, rappresenta uno dei primi tentativi di modificare l'attività del pensiero stesso. Non a caso, tutte le pratiche religiose di asceti, tanto orientali quanto occidentali, presuppongono nel dialogo con il divino la necessità di un'astensione rituale dal cibo, come pratica necessaria al silenzio delle viscere, affinché la mente possa accedere al fuoco della trasformazione dello spirito.

Vi sono almeno altri due fattori che segnano il lungo percorso di questa rivoluzione copernicana, come la definisce Gershon, che è poi la storia dell'abbandono di un paradigma imperiale nella visione della costituzione dell'uomo, per una visione dell'uomo più complessa, di cui la psico-neuro-immuno-endocrinologia rappresenta uno dei filoni di studio più interessanti e stimolanti di questi ultimi anni.

Il primo di questi fattori è l'attività immunologica, il cui coordinamento, da parte delle strutture intestinali deputate, si è dimostrato come uno dei fattori critici per il suo mantenimento e il corretto funzionamento. E il dato della scoperta scientifica incrocia misteriosamente le intuizioni di una medicina tradizionale, da sempre impegnata ad affermare come le disfunzioni intestinali siano responsabili non solo del cattivo umore ma anche di una

sorta di fragilità e suscettibilità nei confronti delle malattie, tanto da derivarne, come atto primario di qualsiasi terapia, un riordino delle funzioni intestinali attraverso una purga, talvolta, o attraverso una dieta, sempre.

Nel caso di una delle patologie intestinali più diffuse, la sindrome dell'intestino irritabile (IBS), la connessione tra cervello e secondo cervello è evidentissima. I sintomi gastrointestinali – dolore, gonfiore, diarrea e stipsi – di questo disturbo che affligge circa il 20% della popolazione, sono dovuti a stress emozionale, ansia e cattiva alimentazione. Sintomi che influiscono sullo stato d'animo e sulla qualità stessa della vita di chi soffre di questa diffusa malattia.

Il secondo fattore, infine, è dato dalla sottolineatura secondo cui l'uomo, attraverso l'intestino, è in contatto con l'Universo non meno di quanto lo sia attraverso il cervello, i sensi e i pensieri.

Forse di più. L'ambiente infatti ci penetra letteralmente attraverso questa lunga superficie espositiva costituita dalle mucose interne. E, attraverso il contatto tra germi simbiotici, mucosa e sistema linfatico associato alle mucose, si realizzano le premesse per un'adeguata risposta immune nei confronti dei possibili elementi ostili. Ancora una volta si verifica una conferma dei saperi della medicina tradizionale, che da sempre identificano nelle alterazioni della flora microbica intestinale una delle principali cause di malattia e nell'alimento una delle principali cure. Come ricordava Ippocrate: «il cibo sia la tua medicina, la tua medicina sia il cibo...».

Un piccolo imperatore, un grande uomo

Infine, vi è un'ultima ma non meno importante novità in questo libro. Gershon, raccontando la storia e la logica di questa scoperta scientifica, racconta la storia di sé, della sua poliedrica personalità di esperto nei campi più disparati, di profondo conoscitore delle diverse metodiche di ricerca. Ma, soprattutto, della sua profonda conoscenza dell'animo umano, che gli ha consentito, senza comandare, di coinvolgere un numero impressionante di entusiasti collaboratori. Si è così prodotta la più straordinaria delle scoperte, cioè che ogni scoperta è il risultato, innanzitutto, di un modo di pensare, prima ancora che di un modo di ricercare.

UMBERTO SOLIMENE

*Direttore del World Health Organization Collaborating Center
for Traditional Medicine, Università degli Studi di Milano*

Prefazione

Gli esseri umani sono un gruppo egocentrico. L'evoluzione – o, da un punto di vista fondamentalista, la creazione – è considerata una storia a lieto fine. Il culmine di tale processo sarebbe la produzione della specie suprema, l'unica a immagine di Dio. Poiché ci consideriamo speciali, qualsiasi cosa limiti la centralità della condizione umana è inevitabilmente guardata con sospetto, se non con vera e propria ostilità. Copernico e Galileo non ricevettero certo il consenso dei loro contemporanei quando avanzarono l'idea che il sole, le stelle e i pianeti avrebbero anche potuto non girare attorno alla Terra. Ciò succedeva perché gli esseri umani vivono sulla Terra. Sembrava completamente irragionevole credere che Dio avesse collocato la specie suprema su un pianeta fuorimano in una galassia di terz'ordine. Negare la centralità della posizione umana equivale a negare Dio, un'impresa che non si intraprende mai senza correre dei rischi.

La scienza interferisce spesso con l'immagine che il genere umano ha di se stesso. Le sue osservazioni non si curano del loro potenziale impatto sui sentimenti umani. La Natura è la Natura. Non sono gli scienziati a produrre o inventare i principi, essi semplicemente li scoprono. Pertanto, si tratta di una professione tediosa. La scienza non è creativa come, per esempio, l'arte. Un artista produce un'opera, uno scienziato osserva semplicemente i fatti e li comunica. Per uno scienziato, la felicità è aver ragione; per un artista, la felicità è essere bello, stravagante e creativo. La natura laboriosa della loro professione spesso è, per gli scienziati, causa di dolore. Seguono i loro sentieri di scoperta a prescindere da dove questi conducano, e a volte la destinazione sono i problemi.

Considerate il modesto intestino e il suo sistema nervoso. I visceri non sono certo il genere di organo che fa battere il cuore. Nessun poeta scriverebbe mai un'ode all'intestino. A esser sinceri, l'opinione generale è che il colon sia una parte ripugnante dell'anatomia. La sua forma è nauseante, il suo contenuto disgustante e ha un cattivo odore. L'intestino è una cosa primitiva, viscida e simile a un serpente. Il suo corpo giace attorcigliato nella pancia e quando si muove striscia. Per farla breve, l'intestino è spregevole e abietto, diversamente dal cervello, dal quale affiorano pensieri saggi. L'intestino è decisamente un organo che soltanto uno scienziato potrebbe amare. E io sono uno di quelli.

In realtà, sono un neurobiologo. La maggior parte dei miei colleghi studia il cervello. Pochi si occupano di fare ricerca sul midollo spinale o sui «modelli», i sistemi nervosi di animali più primitivi; e sperano che ciò li aiuterà a comprendere come funziona il cervello. Sono più che rari quelli di noi i cui percorsi di scoperta hanno condotto all'intestino. Siamo

una po' sul versante comune dell'eccezionale. Ho fatto l'abitudine, ai meeting della Società di Neuroscienze, a essere considerato l'ultima moda della casa. Fino a una recente rivoluzione, che ha portato all'istituzione del nuovo campo della neurogastroenterologia, il sistema nervoso intestinale non era considerato una cosa da prendere sul serio. E io ne soffrivo.

Tuttavia, eccomi qua, un neurobiologo che ha dedicato tutta la sua carriera alla parte del sistema nervoso che comanda i visceri. Il mio percorso verso l'intestino è stato tortuoso. È iniziato anni fa, nel 1958, quando studiavo alla Cornell. Frequentavo un corso sulla neurobiologia del comportamento e iniziai a interessarmi a ciò che era, a quei tempi, una sostanza chimica del corpo appena scoperta, la serotonina. La serotonina aveva suscitato un grande interesse all'epoca, perché si era appena scoperto che l'LSD era in grado di bloccare la capacità della serotonina di contrarre l'utero di un ratto. Ora, prima che iniziate a ridere e liquidiate l'osservazione come il genere di cosa che turberebbe un professore di qualcosa, o altro, ricordate che era l'epoca di Timothy Leary. Gli effetti psicotropi dell'LSD e le allucinazioni che esso provoca erano grandi notizie. Si sapeva che la serotonina era presente nel cervello. Se l'LSD poteva bloccare l'azione della serotonina sull'utero di un ratto, pensava la gente, allora sembrava logico presumere che lo stesso LSD bloccasse anche l'azione della serotonina nel cervello. Se l'azione della serotonina era importante per la funzione cerebrale, il che era probabile, allora l'antagonismo della serotonina da parte dell'LSD poteva essere la base degli effetti allucinogeni di quest'ultimo. Inoltre, lo stato mentale provocato dall'LSD era considerato simile alla schizofrenia. Pertanto, forse si poteva spiegare la schizofrenia come una malattia causata da mancanza di serotonina.

Se pure era vero che volevo apprendere di più sulla serotonina, il cervello mi spaventava. È un organo molto complicato e mi intimoriva troppo. Desideravo un sistema nervoso semplice, uno che fossi in grado di comprendere. Quando appresi che oltre il 95% della serotonina del corpo si produce nell'intestino, decisi che quell'organo faceva ben sperare. Di fatto, ora so che il mio concetto di partenza di un sistema nervoso «semplice» era sbagliato. Un sistema nervoso semplice è un ossimoro, come dire un nanerottolo gigante; tuttavia, il sistema nervoso enterico dell'intestino è più semplice di quello del cervello, e il suo studio mi è servito a stare lontano dalla strada. Nonostante i problemi che il sistema nervoso enterico mi ha a volte causato, esso mi ha offerto una vita meravigliosa, piena di sorprese, esaltazione e un certo grado di interesse che ha persino attirato i media. Sebbene l'intestino possa essere abietto come un rettile, la gente subisce il fascino dei rettili. Allo zoo ci sono lunghe file davanti alle loro gabbie e nessun museo è mai andato in fallimento pubblicizzando la sua mostra di dinosauri. I neurobiologi, come i teologi precopernicani, in passato saranno anche non riusciti a guardare oltre l'universo che potevano vedere, ma le scoperte della scienza, se esatte, sono state alla fine riconosciute, perfino le più scandalose.

L'intestino pensieroso

Sappiamo che, per quanto il concetto possa apparire inadeguato, il sistema gastroenterico è dotato di un cervello. Lo sgradevole intestino è più intellettuale del cuore e potrebbe avere una capacità «emozionale» superiore. È il solo organo a contenere un sistema nervoso intrinseco in grado di mediare i riflessi in completa assenza di input dal cervello o dal midollo spinale. L'evoluzione ci ha giocato uno scherzetto. Quando i nostri avi emersero dal brodo primordiale e acquisirono una spina dorsale, svilupparono anche un cervello nella testa e un intestino con un'intelligenza propria. In tal modo, l'organismo poteva dedicarsi a cose più piacevoli, tipo cercare cibo, sfuggire alla distruzione e fare sesso con altri organismi. Tutto ciò poteva verificarsi mentre l'intestino si occupava della digestione e dell'assorbimento, fuori dalla norma comunemente accettata della cognizione. Non era necessario dedicare dell'energia cerebrale a faccende relative ai visceri, perché questi si occupavano personalmente di se stessi.

Quel sistema nervoso primitivo ci accompagna ancora. Di fatto, man mano che gli animali divenivano sempre più complicati, altrettanto accadeva al sistema nervoso enterico. E questo lo scherzetto giocato dalla natura. Il cervello dell'intestino si è evoluto al passo con quello della testa. Il nostro sistema nervoso enterico non è neppure tanto piccolo. Nell'intestino tenue vi sono più di cento milioni di neuroni, un numero grosso modo uguale al numero di neuroni presenti nel midollo spinale. Aggiungete i neuroni dell'esofago, dello stomaco e dell'intestino crasso e scoprirete che abbiamo più neuroni nell'intestino che nel midollo spinale. Ci sono più neuroni nel sistema intestinale che in tutto il resto del sistema nervoso periferico. Il sistema nervoso enterico è anche un grande deposito di sostanze chimiche, all'interno del quale è rappresentata ciascuna delle classi di neurotrasmettitori che si trova nel cervello. I neurotrasmettitori sono le parole che i neuroni usano per comunicare l'uno con l'altro e con le cellule sotto il loro controllo. La molteplicità di neurotrasmettitori che si trova nell'intestino suggerisce che la lingua parlata dalle cellule del sistema nervoso enterico sia ricca e simile a quella del cervello nella sua complessità. I neurologi, il cui orizzonte termina ai fori nel cranio, continuano a stupirsi nello scoprire che la struttura e le cellule componenti il sistema nervoso enterico sono più simili a quelle del cervello di quelle di qualsiasi altro organo periferico.

Il sistema nervoso enterico è una curiosità, un residuo che abbiamo conservato dal nostro passato evolutivo. Di certo, non suona come qualcosa che possa attirare l'interesse di tutti, anche se dovrebbe. L'evoluzione è un potente revisore. Le parti del corpo futili o non assolutamente necessarie hanno poche possibilità di riuscire a superare le difficoltà della selezione naturale. Tuttavia, un sistema nervoso enterico è stato presente in ciascuno dei nostri predecessori nel corso dei milioni di anni di storia dell'evoluzione che ci separano dal primo animale dotato di spina dorsale. Quindi, il sistema nervoso enterico deve essere più di una reliquia. Di fatto, il sistema nervoso enterico è un centro di elaborazione dati moderno e pieno di vita che ci consente di portare a termine alcuni compiti molto importanti e spiacevoli

senza alcuno sforzo mentale.

Quando l'intestino assurge al livello di percezione cosciente, sotto forma, per esempio, di acidità di stomaco, crampi, diarrea o stitichezza, non si entusiasma certo nessuno. Vogliamo che siano i nostri visceri a occuparsene, in modo efficace e al di fuori della nostra consapevolezza. Poche cose sono più penose di un intestino inefficiente dotato di sensibilità.

Gli studi hanno mostrato che oltre il 40% dei pazienti che ricorrono alle cure di un internista lo fanno a causa di problemi gastrointestinali. Metà di questi presenta disturbi «funzionali». Il loro intestino funziona male, ma nessuno sa perché. Non vi è alcun difetto anatomico o chimico evidente. I medici si irritano. I pazienti che si presentano ai medici con problemi senza soluzione sono percepiti come una minaccia e spesso sono dimessi come affetti da squilibrio mentale, con l'epiteto di «rottami» bisbigliato alle loro spalle. Sono considerati esempi di protoplasma scadente i cui processi di pensiero nevrotico si riflettono sul loro intestino. Così, il loro intestino si mette a fare i capricci in modo tale da sfidare il meglio che la medicina moderna ha da offrire, che in questo caso è l'ignoranza combinata alla mancanza di compassione.

Se è indubbiamente vero che il cervello può influenzare il comportamento dell'intestino, quest'ultimo può anche farcela da solo, senza seguire le istruzioni del cervello. Solo mille o duemila fibre nervose collegano il cervello al centinaio di milioni di neuroni presenti nell'intestino tenue. Quel centinaio di milioni di neuroni riesce abbastanza bene a svolgere il proprio compito, anche quando si interrompe ognuna delle loro connessioni con il cervello; tuttavia, i medici solo recentemente hanno cominciato a credere che potrebbe essere possibile per le malattie intestinali insorgere all'interno dell'intestino.

Dal momento che il sistema nervoso enterico può funzionare in modo autonomo, bisogna considerare possibile che il cervello intestinale abbia le proprie psiconevrosi. Tale nuovo concetto, per quanto possa essere semplicistico, è probabile si riveli altrettanto rivoluzionario e promettente delle scoperte di Copernico. Una volta comprese le malattie, arrivano anche le cure. Il funzionamento anomalo del sistema nervoso enterico potrebbe essere resistente alle terapie mirate alla testa, ma le terapie mirate all'intestino potrebbero invece funzionare.

Il fascino dello sconosciuto

Fino a poco tempo fa, il destino del sistema nervoso dell'intestino è stato crudele. Ignorato, disprezzato e fastidioso, le sue attività interne (normali e anormali) sono sfuggite alla scoperta. Manca ancora una mappa dei suoi microcircuiti, non abbiamo ancora ascoltato la sinfonia chimica suonata dai suoi neurotrasmettitori e ignoriamo persino la portata dei comportamenti da esso controllati. Fino a poco tempo fa, lo stato della nostra conoscenza del sistema nervoso enterico è stato, in pratica, medievale. Tuttavia, anche l'ignoranza medievale ha dovuto un tempo arrendersi di fronte al Rinascimento, e il Rinascimento ha portato alla fine all'Illuminismo. È in corso un rinascimento dell'intestino. È lì che si trova il prodigio di questo sistema. È una frontiera inesplorata. Potrebbe forse resistere qualsiasi persona curiosa, per non parlare di chi si definisce uno scienziato, o meglio ancora, un ricercatore? I ceppi della resistenza scientifica all'ovvio stanno scomparendo. Per parafrasare il Presidente Reagan, è mattino nell'addome.

È ragionevole chiedersi perché tutti noi dovremmo essere interessati al fatto che siamo dotati di un secondo cervello quando, nella migliore delle ipotesi, ci si aspetta di averne uno. La risposta, naturalmente, è che dovremmo avere cura del nostro secondo cervello per le stesse ragioni che ci spingono a occuparci del primo. Cartesio può aver detto «Penso, dunque sono», ma l'ha detto solo perché il suo intestino glielo ha consentito. Il cervello dell'intestino deve lavorare bene, o nessuno potrà permettersi il lusso di pensare affatto. Nessuno pensa bene quando la sua mente è concentrata sulla toilette.

Ecco un nuovo campo, un nuovo orizzonte e una nuova scienza. È allettante. Per me, la presenza nell'intestino di un secondo antico cervello non è semplicemente una questione che riguarda la scienza, è anche la storia di una scoperta intrigante e sorprendente che voglio far conoscere al mondo. Miracolosamente, strada facendo si trovano delle vie d'uscita ed è entusiasmante essere uno di quelli che possono essere portavoce del loro arrivo. La serotonina mi ha preso all'amo e mi ha collocato su un percorso che doveva presto scambussolare molti dei miei predecessori scientifici. Sono rimasto coinvolto in una guerra scientifica che infuriava sul sistema nervoso enterico e il suo contenuto di serotonina. Quel conflitto è stato alla fine risolto da uno straordinario deus ex machina, fra tutti i luoghi possibili, a Cincinnati. La risoluzione di quella piccola guerra molto personale, tuttavia, non ha posto fine alla storia. Di fatto, la storia si sta tuttora rivelando e diventa sempre più interessante mentre lo fa.

Questo libro racconta l'inizio della storia del secondo cervello. Vorrei fosse possibile includere l'epilogo, che, tuttavia, giungerà in futuro. Il principio di questo inizio, la Parte I, fornisce il background di questo narratore particolare e presenta alcuni degli altri scienziati la cui opera ha salvato questo argomento dalle tenebre scientifiche. La Parte prima contiene inoltre le necessarie informazioni su come è costruito e come funziona il sistema nervoso.

La Parte seconda presenta una specie di «diario di viaggio», dalla bocca all'ano, del luogo sacro interno dell'intestino. Questa sezione segue essenzialmente la catena alimentare

dall'ingestione all'egestione e tratta, nel suo corso, i processi cruciali della digestione e dell'assorbimento. Essa si occupa inoltre delle minacce al corpo e descrive la cooperazione tra il secondo cervello e il sistema immunitario nel difenderci da un esercito malvagio di microbi che tenta continuamente di trasformare l'intestino in una rotta di invasione.

La Parte terza si occupa dei risultati della ricerca moderna nello sviluppo e nei disordini del secondo cervello. Alcuni di tali disordini, di fatto, devono essere trattati nel modo più esauriente possibile, perché spesso sfuggono all'attenzione dei medici per la fretta di attribuire i sintomi gastrointestinali alla psiconevrosi del cervello della testa. Considerato nel suo complesso, il libro offre una storia di scoperte scientifiche e qualche intuizione su come esse sono state realizzate. Racconta di un processo operato non dalla magia, né dalla preghiera, ma dal duro lavoro razionale di una moltitudine di persone normali.

Infine, il libro termina con la nota di speranza che le nuove conoscenze sul secondo cervello porteranno a milioni di persone, e in particolare al 20% di americani che soffrono di disturbi funzionali dell'intestino.

Il secondo cervello

*Al Governo degli Stati Uniti e ai suoi politici,
la cui fede nella scienza e l'instancabile sostegno alla ricerca
hanno reso possibili le scoperte descritte in questo libro.*

Parte prima
Le conquiste iniziali

1. La scoperta del secondo cervello

Quelli di noi che si occupano di scienza, anche i più illuminati, hanno una forte e discutibile tendenza all'arroganza. L'arroganza degli scienziati deriva da una conoscenza e da una valutazione insufficienti del passato. In tal modo, si realizzano e rivendicano scoperte che sono in effetti delle riscoperte, non avanzamenti, ma solo lezioni di storia.

Neurogastroenterologia: una riscoperta dona speranza per il futuro

Non molto tempo fa, il «New York Times» pubblicò un articolo sul secondo cervello nella sezione scientifica del giornale. Si citava David Wingate, un gastroenterologo che aveva fatto pratica accademica a Londra, come fonte di un commento che individuava in me il padre del nuovo campo di neurogastroenterologia. Ammetto di essere il padre solo dei miei tre figli. Chiaramente, David non mi ha insultato attribuendomi la paternità di un campo. Di fatto, mi piacerebbe poter semplicemente inviargli un messaggio per dirgli qualcosa di gentile, tipo «Te ne sei accorto, David». Sfortunatamente per il mio ego, tuttavia, io so come sono andate le cose.

Durante la mia carriera scientifica ho fatto delle scoperte, ma i principi di base sui quali si fonda il mio lavoro stanno quasi per festeggiare il loro centesimo anniversario. Quel po' di informazioni sono molto utili per mortificare il mio tipo particolare di arroganza. In realtà, non è che sia deluso, perché devo dare la precedenza alle persone che sono venute prima di me. La riscoperta è positiva tanto quanto la scoperta, se ciò che si riscopre è importante ed era stato dimenticato. È ancora meglio quando le informazioni riscoperte hanno la capacità di migliorare le vite di coloro che ci circondano.

La neurogastroenterologia iniziò quando i primi ricercatori stabilirono che esiste davvero un secondo cervello nell'intestino. La scoperta originaria che ha determinato la sua esistenza è stata la dimostrazione che l'intestino contiene neuroni in grado di essere autonomi: essi, cioè, possono far funzionare l'organo senza ricevere istruzioni dal cervello o dal midollo spinale. Quelli di noi che possono essere definiti padri della neurogastroenterologia secondo David Wingate sono in realtà dei figli. Nessuno di noi ha scoperto l'esistenza del secondo cervello. Tuttavia, quella scoperta è caduta, come l'Impero romano, nell'oblio. Ciò che io ho fatto, con molto aiuto da parte di colleghi di tutto il mondo, è stato ritrovarla e restituirla alla consapevolezza scientifica. Per me, è sufficiente questo risultato, che presto allevierà le sofferenze di milioni di persone che soffrono a causa del comportamento scorretto di un intestino irritabile.

Dayenu.

L'Ecclésiaste aveva ragione: non c'è davvero niente di nuovo sotto il sole

La neurogastroenterologia in realtà è iniziata con Bayliss e Starling, due ricercatori la cui opera nell'Inghilterra del XIX secolo è valse loro l'immortalità nel pantheon della Fisiologia. Mi piace immaginare come sarebbe stata la mia vita nei laboratori inglesi all'inizio del secolo. Vi era un tempo in cui la famigerata nebbia scendeva su Londra e si mescolava al fumo di migliaia di stufe a carbone a intasare i polmoni e nascondere la vista. Era l'epoca di Jack lo squartatore, David Copperfield e Ebenezer Scrooge. Ho sperimentato una versione aggiornata di un laboratorio inglese nel 1965-1966, quando frequentavo il postdottorato a Oxford. Per apprezzare le condizioni in cui lavorano gli scienziati inglesi, bisogna leggere Dickens.

Di solito, gli inverni in Inghilterra non sono molto freddi. Di sicuro, New York è più fredda di Oxford o Londra. Il guaio dell'Inghilterra è che c'è pochissima differenza nella maggior parte del paese tra le temperature interne e quelle esterne. Io lavoravo al mio banco di laboratorio indossando la sciarpa e un paio di guanti ai quali avevo tagliato la punta delle dita in modo da poter sentire ciò che toccavo. Di solito, i banchi erano alti e noi stavamo seduti su sgabelli in legno privi di schienale. Considerando che tali laboratori erano il risultato di mezzo secolo di progresso, le condizioni di lavoro affrontate da Bayliss e Starling dovevano essere state quasi punitive. Laboratori a parte, i risultati ottenuti da Bayliss e Starling furono abbastanza sbalorditivi. Di fatto, fino all'elezione di Margaret Thatcher come primo ministro e alla repressione della scienza britannica da lei operata, i laboratori di fisiologia inglesi erano competitivi con quelli di qualsiasi altra nazione.

La legge dell'intestino

Bayliss e Starling lavorarono sui cani. Isolarono un'ansa di intestino in animali anestetizzati e studiarono gli effetti della stimolazione dell'intestino dall'interno della sua cavità, per poi mimare le conseguenze esercitate dai normali contenuti intestinali sulle pareti del canale. Nei loro importanti esperimenti, aumentarono la pressione all'interno del tratto di intestino. L'intestino rispondeva con un comportamento stereotipo che, nella sua riproducibilità, catturò la loro attenzione. Ogniqualvolta si aumentava a sufficienza la sua pressione interna, l'intestino mostrava movimenti muscolari che avevano come conseguenza la spinta dei contenuti del canale in una direzione sorprendentemente unidirezionale. I movimenti propulsivi consistevano in un'onda discendente coordinata di contrazione a monte e rilassamento a valle che costringeva i contenuti intestinali inesorabilmente e inevitabilmente verso una direzione anale.

Bayliss e Starling definirono questa risposta dell'intestino all'aumento di pressione intestinale come «la legge dell'intestino». Avevano molta familiarità con le «leggi». Il loro retaggio fisiologico comprende una «legge del cuore» e una «legge della circolazione», oltre che la «legge dell'intestino». Probabilmente usavano la parola «legge», che ora sembra pittoresca, per dare l'idea della scoperta di un principio eterno che governa il comportamento di un sistema biologico. Forse tale uso costante di una terminologia orientata in senso legale era dovuto alla notorietà contemporanea del caso di Jarndyce contro Jarndyce nel famoso libro di Dickens *Bleak House*. Comunque, la «legge dell'intestino», malgrado l'orecchiabilità dell'espressione, non perdurò. Non che Bayliss e Starling si fossero sbagliati. In effetti, il loro lavoro ha resistito bene nel tempo e si riproduce con facilità. La «legge dell'intestino» che essi formularono descrive ancora il comportamento dell'intestino, ma è cambiato il nome dell'attività. La «legge dell'intestino» è oggi conosciuta come *riflesso peristaltico*, un termine molto più prosaico ma che meglio descrive l'attività reale dell'intestino, e che di certo è meno evocativo di un potere superiore sconosciuto. Dopotutto, se vi sono delle leggi, di sicuro deve esistere anche la loro applicazione, che come concetto scientifico lascia alquanto a desiderare.

Bayliss e Starling associarono correttamente la natura coordinata della «legge dell'intestino» ai nervi. Tuttavia, quando tagliarono tutti i nervi in entrata e in uscita dalle anse dell'intestino del cane, fecero un'importante scoperta che dava prova di questa legge. Sapevano che se avessero tagliato tutti i nervi agli arti o ad altri organi, sarebbero andati perduti i riflessi. Il comportamento dei riflessi, ovunque tranne che nell'intestino, comporta la partecipazione del cervello o del midollo spinale. Gli altri organi non prendono decisioni autonome; al contrario, seguono immancabilmente le istruzioni ricevute dal sistema nervoso centrale. Tagliando i nervi che collegano questi organi al cervello o al midollo spinale, li si priva delle istruzioni, pertanto gli organi si paralizzano, come un agente di biglietteria aerea il cui computer è andato in crash.

Bayliss e Starling supponevano che, interrompendo tutti i nervi in entrata o in uscita da un'ansa di intestino, si sarebbero interrotte anche tutte le comunicazioni che avvenivano grazie alla mediazione di tali nervi tra l'intestino e il sistema nervoso centrale. Tuttavia, quando lo

fecero, la «legge dell'intestino» continuò ad agire. Gli aumenti di pressione interna continuarono a essere seguiti dalla stessa onda discendente di contrazione a monte e rilassamento a valle che si vedeva prima del taglio dei nervi. Dal momento che in tal modo si poteva dedurre un comportamento riflesso in segmenti di intestino dopo l'eliminazione di qualsiasi input dal cervello o dal midollo spinale, Bayliss e Starling attribuirono alla «legge dell'intestino» ciò che essi definirono il «meccanismo nervoso locale» dell'intestino. In altri termini, se i nervi esterni non erano necessari, allora dovevano essere quelli interni a fare il lavoro.

Esiste un sistema nervoso interno

Bayliss e Starling consideravano ragionevole concludere che i nervi intrinseci fossero i responsabili della «legge dell'intestino» poiché sapevano, anche prima di iniziare i loro studi, che nelle pareti dell'intestino era incapsulato un complicato sistema nervoso. L'esistenza del sistema nervoso enterico era stata scoperta in Germania mentre in America infuriava la Guerra Civile. Lavorando con un microscopio ottico primitivo, uno scienziato tedesco di nome Auerbach aveva scoperto che l'intestino contiene una rete complessa, o *plesso*, di neuroni e fibre nervose. Questo plesso, incuneato tra i due strati di muscolatura che circondano l'intestino, si chiama ancora *plesso di Auerbach*, come se fosse suo. Il plesso di Auerbach è anche noto come plesso mienterico (mio = muscolo; enterico = intestino).

Dopo la scoperta di Auerbach, si trovò un altro plesso di dimensioni minori in uno strato dell'intestino denominato *sottomucosa*. La sottomucosa deve il nome alla sua collocazione, proprio sotto il rivestimento della cavità intestinale interna, dove si verifica la digestione. Il rivestimento interno si chiama *mucosa*, pertanto lo strato sotto di essa, ovviamente, è la sottomucosa. La sottomucosa è una zona di tessuto connettivo denso così forte e resistente alla distensione, che consente letteralmente di usare l'intestino per fare delle suture chirurgiche e delle corde per le racchette da tennis. La seconda rete di neuroni intestinali è definita *plesso di Meissner*, da coloro ai quali piace attribuire agli scopritori le strutture da essi trovate, e *plesso sottomucoso* dagli altri che odiano i nomi propri nella nomenclatura. Dato che Bayliss e Starling sapevano che l'intestino contiene un sistema nervoso di notevoli dimensioni, si presero la libertà di postulare che questo sistema, il «meccanismo nervoso locale» gastrointestinale, poteva fornire all'intestino i mezzi per manifestare attività di azione riflessa, anche in assenza di input nervoso esterno.

Funziona tutto da solo

Diciotto anni dopo la pubblicazione delle proprie osservazioni per opera di Bayliss e Starling, Ulrich Trendelenburg, sul lato tedesco della trincea che divideva l'Europa dal confine svizzero al Canale della Manica, fissò un'ansa isolata di intestino di porcellino d'India su un tubo cavo a forma di J. Questo esperimento, pubblicato nel 1917, si rivelò fondamentale. Trendelenburg sospese l'intestino, sul suo sostegno tubolare, a una provetta da test contenente una soluzione nutriente calda, che egli riforniva di ossigeno. L'intestino sopravvisse bene in tale ambiente artificiale. Il congegno, all'interno del quale organismi viventi sopravvivono per svariate ore, si chiama *bagno per organi termostato*.

Quando Trendelenburg soffiò attraverso il tubo a J nell'intestino, questo rispose al soffio. Questo esperimento sembra estremamente semplice, e infatti lo è. Le conseguenze del fenomeno osservato e riconosciuto da Trendelenburg, tuttavia, sono profonde. Perché potesse restituire il soffio, il segmento di intestino del porcellino d'India isolato in un bagno per organi termostato doveva mostrare lo stesso comportamento riflesso osservato da Bayliss e Starling molti anni prima in un cane intatto. Per fare ciò, il segmento di intestino doveva essere in grado di rilevare l'aumento di pressione all'interno della sua cavità provocato dall'immissione di aria nel tubo. Poi, per poter a sua volta soffiare, l'intestino isolato doveva rispondere con un'onda discendente coordinata di contrazione a monte e rilassamento a valle, mimando la «legge dell'intestino» di Bayliss e Starling. Inoltre, nel laboratorio di Trendelenburg, tale comportamento non si verificava in un animale intatto. Il cervello, il midollo spinale e i gangli sensoriali erano stati messi da parte con il resto del porcellino d'India. Nel bagno per organi termostato non vi era altro se non l'intestino.

L'espressione moderna «riflesso peristaltico» fu introdotta da Trendelenburg per descrivere l'attività propulsiva dell'intestino indotta dalla pressione. Pertanto, l'espressione equivalente «legge dell'intestino» cadde in disuso. L'osservazione che si potesse provocare il riflesso peristaltico in un segmento di intestino isolato in un bagno per organi termostato confermava che Bayliss e Starling avevano avuto ragione nell'attribuire l'onda discendente indotta dalla pressione di contrazione a monte e rilassamento a valle al «meccanismo nervoso locale» dell'intestino. Perché in un sistema che non contiene alcun altro organo se non l'intestino si verifichi il riflesso, occorre che tutti gli elementi necessari siano componenti intrinseci delle sue pareti. Che tutti debbano trovarsi lì è impressionante, perché un simile sistema neurale non esiste in alcun altro organo. Se si tagliano le connessioni tra la vescica, il cuore o i muscoli scheletrici e il sistema nervoso centrale, cessa qualsiasi attività di riflesso. Il semplice esperimento di Trendelenburg, quindi, fu senz'altro rivoluzionario. Trendelenburg ha dimostrato che il sistema nervoso intrinseco dell'intestino ha effettivamente proprietà simili a quelle del cervello e della sua appendice subordinata, il midollo spinale. Per un neurobiologo, è come dire che l'intestino è vicino a Dio.

2. Il sistema nervoso autonomo e la storia della neurotrasmissione chimica

La storia del sistema nervoso enterico riprende dalla pietra miliare successiva, raggiunta nel 1921. Lo scenario si sposta nuovamente in Inghilterra, dove, a Cambridge, J.N. Langley pubblicò il suo famoso libro, *Il sistema nervoso autonomo*. Molti medici, anche alcuni che hanno sentito parlare del sistema nervoso enterico, pensano di conoscere la classificazione delle divisioni del sistema nervoso autonomo di Langley. Spiegare a un medico la definizione di questo sistema sarebbe come raccontare a Michael Jordan la definizione di pallacanestro di James B. Naismith. Comunque, pochissimi medici moderni hanno davvero letto il libro di Langley. Egli pubblicò *Il sistema nervoso autonomo* quasi ottant'anni fa. Ciò che la maggior parte dei medici conosce del libro di Langley si basa perciò su quanto hanno letto *su* di esso nei libri di testo, cosa che è insieme inadeguata ed errata.

Che la gente abbia letto o meno la sua opera, Langley resta l'unico maggiore responsabile della nostra conoscenza attuale del sistema nervoso autonomo. Secondo la definizione di Langley il sistema nervoso autonomo è un sistema di nervi esclusivamente motori che controllano il comportamento della muscolatura viscerale, dei vasi sanguigni, del cuore e delle ghiandole. Un *sistema motorio* è un sistema che trasporta le informazioni dal cervello e/o dal midollo spinale. Nella definizione di Langley non vi era nulla che si riferisse all'esercizio del libero arbitrio o del controllo volitivo sugli effettori (bersagli) dei nervi autonomi. Inoltre, Langley concepiva il suo sistema come una strada a senso unico. Le informazioni del cervello sono trasmesse lungo i nervi di questo sistema, e ciò che torna al cervello è ricevuto attraverso un sistema diverso. Molti libri di testo dicono che le attività sotto il controllo del sistema nervoso autonomo sono involontarie e che vi sono nervi autonomi che rilevano ciò che succede in periferia e quindi informano il cervello. Queste opinioni sono quelle degli autori di tali libri, che andrebbero bene se solo non fossero errate.

È vero che le attività comandate dal sistema nervoso autonomo di solito non sono sotto il controllo volontario cosciente. La natura involontaria della maggior parte del comportamento autonomo è il motivo per cui il sistema è stato denominato «autonomo» in prima battuta. Un altro sistema di nervi motori controlla il comportamento dei muscoli scheletrici, che di solito sono azionati in modo volontario. Tale sistema è definito il *sistema motorio scheletrico*. Tuttavia, la differenza volitiva tra i due sistemi non è assoluta. Da un lato, alcune persone possono essere allenate a modificare le attività autonome, come il ritmo del proprio battito

cardiaco o la pressione sanguigna. Dall'altro lato, nessuno di noi riesce a far contrarre a piacere alcuni muscoli scheletrici, tipo quelli che si trovano nell'orecchio medio. I muscoli dell'orecchio medio si attivano solo come risposta riflessa involontaria al forte rumore.

Sinapsi periferiche: avere o non avere

Esiste una differenza importante tra i nervi che vanno ai muscoli scheletrici e i nervi autonomi. Tutti i nervi destinati ai muscoli scheletrici vanno direttamente dal sistema nervoso centrale ai relativi muscoli scheletrici. I nervi autonomi, invece, non vanno mai direttamente dal sistema nervoso centrale ai rispettivi effettori (muscoli, vasi sanguigni o ghiandole).

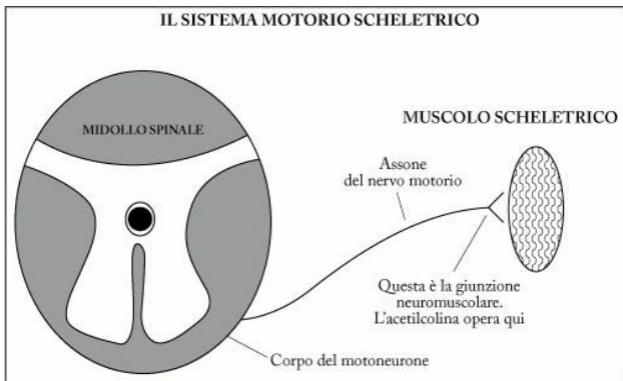
Le vie nervose autonome sono sempre interrotte almeno da una giunzione tra i neuroni, denominata *sinapsi*. Un segnale autonomo che, proveniente dal cervello, va a un effettore, deve perciò essere trasportato da due o più neuroni, mentre un segnale che va dal cervello a un muscolo scheletrico ne richiede solo uno.

Le conseguenze della differenza anatomica tra i nervi sono effettivamente abbastanza importanti. Un segnale che parte dal sistema nervoso centrale diretto verso un muscolo scheletrico vi giunge, intatto e immutato, o non viene ricevuto affatto. Il segnale è un semplice fenomeno «del tutto o nulla». In un certo senso, è in bianco e nero. Senza grigio. Di contro, un segnale equivalente che parte dal sistema nervoso centrale diretto a un vaso sanguigno, al cuore o a una ghiandola può essere amplificato, indebolito, o modulato diversamente dai processi che si verificano presso le sinapsi del sistema autonomo. L'attivazione degli effettori del sistema autonomo è pertanto infinitamente più precisa di quella del muscolo scheletrico. Nel processo di innervazione autonoma sono ammesse anche le tonalità di grigio. Questa precisione del sistema nervoso autonomo raggiunge un crescendo nell'intestino. La precisione è importante quando riguarda i nervi. Non solo è un segnale perfetto, ma permette anche l'adattamento immediato alle circostanze che si stanno modificando.

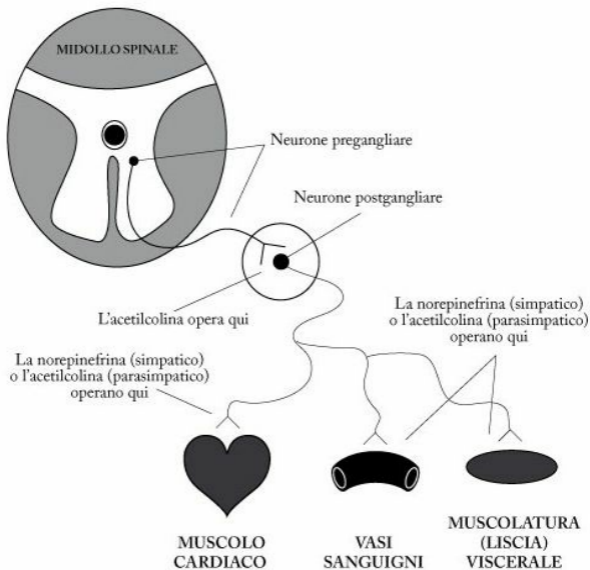
La classificazione di Langley delle divisioni del sistema nervoso autonomo derivava dalla sua presa di coscienza del fatto che l'innervazione autonoma di un effettore implica una catena di neuroni. Il primo neurone della catena, che inizialmente trasporta i comandi dei centri di elaborazione centrale, si trova all'interno del cervello o del midollo spinale. Tale neurone passa le istruzioni attraverso una sinapsi al secondo neurone, che si trova in un *ganglio* (un aggregato locale periferico di corpi neuronici). Il primo neurone trasporta i segnali a questi gangli e pertanto si chiama, abbastanza logicamente, *pregangliare*. Il secondo neurone, che vive nei gangli, si chiama *postgangliare*, perché i suoi processi vanno *dai* gangli agli effettori in attesa nelle zone remote del corpo.

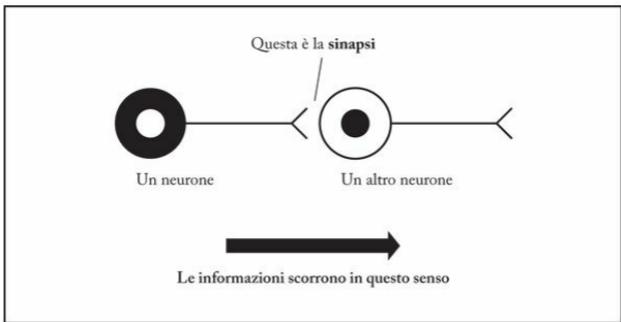
Sistema simpatico e sistema parasimpatico

Langley si rese conto che poteva usare le sedi dei nervi pregangliari, o «emissari» dal sistema nervoso centrale, per definire due sezioni del sistema nervoso autonomo. Tali parti hanno dominato tutti gli studi relativi al sistema per i cinquanta anni successivi alla pubblicazione del suo libro. Egli osservò che era possibile trovare le fibre nervose pregangliari in alcuni dei nervi cranici provenienti dal cervello stesso. I gangli obiettivo di tali fibre nervose tendevano a trovarsi negli organi da essi innervati, o comunque in prossimità di essi. Notò inoltre che non vi erano fibre nervose pregangliari che partissero dal midollo spinale nella regione del collo; tuttavia, più in basso, nei livelli *toracico*, *lombare* e *sacrale*, tali nervi erano nuovamente presenti. Sorprendentemente, le fibre pregangliari delle regioni toracica e lombare erano diverse da quelle poste nei nervi cranici. I gangli obiettivo degli emissari toracico e lombare dei nervi pregangliari non si trovavano negli organi da essi innervati, e neanche in prossimità di essi. Al contrario, tali gangli erano tutti posti in gruppi consistenti vicino alla colonna vertebrale, a una distanza considerevole dai loro effettori. Al livello sacrale, le fibre pregangliari assomigliavano nuovamente a quelle del cervello, in quanto i gangli obiettivo erano ancora una volta posti lontano dal sistema nervoso centrale, vicino agli effettori.



IL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO





Sfortunatamente, la maggior parte delle persone divide ancora il sistema nervoso autonomo in due parti. Langley usò la somiglianza degli emissari cranici e sacrali per definire una di queste parti *sistema parasimpatico*, e quella degli emissari toracico e lombare per definire l'altra *sistema simpatico*. Secondo Langley, la differenza fondamentale tra i due sistemi simpatico e parasimpatico era di tipo anatomico, basata sulla sede d'origine dei nervi pregangliari, e niente di più. Esistono altre differenze, ma non sono assolute, e quindi non aiutano a distinguere un sistema dall'altro.

Nel sistema simpatico, Langley incluse due gruppi di gangli. Ricevono entrambi fibre nervose pregangliari in uscita dal sistema nervoso centrale ai livelli toracico o lombare (che è ciò che li caratterizza come simpatici), ma i due gruppi differiscono alquanto per ciò che concerne la loro posizione. Un gruppo di gangli simpatici è concentrato in due lunghe catene che si allungano su entrambi i lati del midollo spinale, dal collo alla coda (anche se la coda è ridotta, come negli esseri umani, a ossa rudimentali che non è possibile vedere dall'esterno). Dal momento che tali gangli si trovano in prossimità delle vertebre, si definiscono *paravertebrali*. Poiché si collegano l'uno all'altro, si definiscono anche *gangli della catena simpatica*. Un altro gruppo di gangli simpatici si trova di fronte alle vertebre e viene quindi chiamato *prevertebrale*. Questi gangli, che forniscono all'intestino i nervi simpatici, sono composti da gruppi di neuroni che circondano le diramazioni addominali dell'aorta, la grande arteria che trasporta il sangue dal cuore.

A differenza dei ben delineati gangli simpatici, i gangli parasimpatici sono più difficili da trovare, perché sono collocati all'interno, o appena all'esterno, dell'organo che innervano. Di conseguenza, i nervi pregangliari diretti ai gangli parasimpatici sono lunghi, mentre i nervi

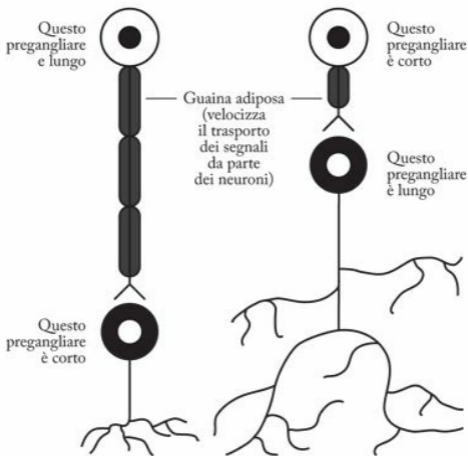
pregangliari sono corti. Si tratta esattamente dell'opposto della parte simpatica, dove i nervi pregangliari sono corti e quelli postgangliari sono lunghi. Tale differenza anatomica ha un significato funzionale. Sia nel sistema simpatico sia in quello parasimpatico, i nervi pregangliari sono ben isolati da una guaina adiposa (denominata *mielina*) e conducono rapidamente, mentre i nervi postgangliari non sono rivestiti da tale guaina e conducono lentamente.

Si può pensare al sistema come a un parente operativo, se non anatomico, dei treni Amtrak sul Northeast Corridor. Le fibre nervose pregangliari a conduzione veloce hanno la loro controparte nei Metroliner, mentre le fibre nervose postgangliari a conduzione lenta sono analoghe ai locali per i pendolari. Se vi capitasse di prendere uno di questi treni per portare un messaggio da New York City a Paoli (un sobborgo di Filadelfia che in questa metafora rappresenta la cellula efferente), partireste dalla Pennsylvania Station su un Metroliner, non importa quale. Comunque, in qualche posto lungo la strada, dovrete cambiare (sinapsi) per prendere un locale per pendolari, perché i Metroliner non vanno a Paoli. Il posto in cui cambiate il treno fa una grossa differenza nella quantità di tempo che occorrerà per raggiungere Paoli. Se scendete dal Metroliner a Newark e prendete dei locali da lì a Paoli, il viaggio sarà più lungo che se viaggiate con il Metroliner fino a Filadelfia e prendeste un locale solo per il breve tratto fino a Paoli.

Nel sistema parasimpatico, i nervi pregangliari a conduzione veloce rivestiti dalla guaina sono lunghi, mentre i nervi postgangliari a conduzione lenta privi della guaina sono corti. In questo sistema, per così dire, il Metroliner si prende a Filadelfia e il locale per pendolari si usa solo per il breve tratto fino a Paoli. Per il sistema simpatico vale il contrario; lì, infatti, i nervi pregangliari a conduzione veloce sono corti e quelli postgangliari a conduzione lenta sono lunghi. Quindi, il sistema simpatico lascia il Metroliner a Newark e prende il locale per pendolari da lì a Paoli. Per tale motivo, le risposte parasimpatiche tendono a essere più rapide e più precise di quelle simpatiche, che di solito sono più lente e più dispersive (i locali per pendolari non solo sono più lenti, ma vagano anche per tutta la periferia). Pertanto, le risposte parasimpatiche hanno più probabilità delle loro controparti simpatiche di essere limitate a un unico organo, provocando, per esempio, il restringimento delle pupille o la contrazione della vescica. Le risposte che riguardano l'intero corpo, tipo il battito cardiaco accelerato e l'innalzamento della pressione sanguigna associati allo stress (dovuti, per esempio, a volo, spavento o lotta), sono la specialità del sistema simpatico.

PARASIMPATICO

SIMPATICO



Queste fibre nervose non hanno guaina di protezione e pertanto convogliano molto lentamente

In ragione della loro anatomia, le risposte parasimpatiche tendono a essere più veloci e precise di quelle simpatiche, che di solito sono più lente e dispersive

Queste differenze funzionali, sebbene siano reali, sono delle tendenze, non delle distinzioni assolute. Le risposte simpatiche non sempre interessano l'intero corpo, o anche la maggior parte di esso, un punto che i libri di testo di fisiologia spesso trascurano. Le risposte simpatiche possono avere una portata tanto limitata quanto quelle parasimpatiche. Per esempio, i nervi simpatichi sono responsabili tanto della dilatazione delle pupille in una stanza buia che

dell'eiaculazione maschile durante l'orgasmo. Fortunatamente, queste risposte si verificano singolarmente, indipendentemente l'una dall'altra. Per cui, non occorre che un maschio eiaculi perché le sue pupille possano regolare la propria dilatazione al buio. Dal momento che le differenze funzionali tra i sistemi nervosi simpatico e parasimpatico non sempre sono valide, i due sistemi non possono differenziarsi sulla base della sola funzione. Pertanto, le definizioni anatomiche di Langley restano ancora oggi i soli mezzi infallibili per distinguere i neuroni simpatici e parasimpatici.

La parte enterica

Data l'importanza che Langley dava alla sede dell'origine dei nervi pregangliari nello stabilire le divisioni del sistema nervoso autonomo, per lui era evidente che il sistema nervoso enterico non potesse essere considerato né simpatico né parasimpatico. Chiaramente, Langley conosceva il lavoro fatto in precedenza da Bayliss e Starling e da Trendelenburg, che dimostrava come l'intestino fosse il solo tra gli organi a manifestare attività riflessa a prescindere dall'input ricevuto dal sistema nervoso centrale. Langley si rendeva inoltre conto del fatto che, in confronto al numero di neuroni presenti nell'intestino, il numero di fibre nervose motorie che collegano il cervello o il midollo spinale all'intestino è incredibilmente ridotto. Negli esseri umani, per esempio, vi sono soltanto circa duemila fibre nervose pregangliari nel nervo vago (il grande nervo cranico che collega il cervello all'apparato gastrointestinale) nel punto in cui questo nervo entra nell'addome. Queste fibre pregangliari sono tutte quelle esistenti. Di contro, vi sono oltre *un centinaio di milioni* di neuroni nell'intestino tenue umano.

Non si è certi se Langley conoscesse il numero esatto di neuroni presenti nell'intestino di ogni specie animale. La prima stima relativamente precisa del numero di neuroni enterici (nell'intestino del porcellino d'India) non comparve se non dieci anni dopo la pubblicazione della sua opera sul sistema nervoso autonomo. In realtà, la questione è tuttora oggetto di dibattito. È difficile contare queste cellule, e molti studiosi stanno ancora cercando di stabilire come ottenere un conteggio preciso. Comunque, a Langley non occorre conoscere il numero esatto. Egli sapeva che c'era una disparità impressionante tra il numero di neuroni presenti nell'intestino e quello di fibre nervose disponibili a fornire loro innervazione pregangliare. Tale disparità indicava a Langley che la maggioranza dei neuroni presenti nell'apparato gastrointestinale probabilmente non riceveva alcun input dal sistema nervoso centrale. Egli non sembrava considerare probabile che tali fibre nervose pregangliari, in numero ridotto, provenienti dal cervello, potessero dividersi in un numero di diramazioni sufficiente a prendere contatto con tutti i neuroni dell'intestino.

Ricerche successive, realizzate molti anni dopo la morte di Langley, hanno confermato che la sua supposizione circa l'innervazione dei neuroni enterici era fondamentalmente esatta. La maggior parte dei neuroni enterici probabilmente non sono collegati direttamente al sistema nervoso centrale. Non che l'opinione di Langley non possa essere criticata dai revisionisti moderni. Terry Powley, un anatomista canadese, mostra, un meeting dopo l'altro, belle immagini di terminazioni del nervo vago nell'intestino dei roditori ed esulta al pensiero di quante sembrano esservene. Di fatto, ve ne sono molte migliaia. Tuttavia, migliaia di terminazioni nervose sono ben poca cosa al confronto dei milioni di neuroni presenti nell'intestino e delle molte centinaia di milioni di fibre nervose intrinseche che questi neuroni producono per comunicare fra di loro. Ciò che rende così belle le immagini di Powley, in realtà, è la relativa rarità di fibre nervose del vago nell'intestino. Dato che in queste immagini sono etichettate, le fibre nervose del vago risaltano per splendore individuale, e sembrano dei serpenti

varicosi che si avviluppano in modo tortuoso lungo i filamenti nervosi che collegano i gangli enterici. Le fibre nervose del vago sono visibili proprio perché le fibre nervose intrinseche non lo sono. Se, nelle stesse immagini, si colorassero le fibre nervose intrinseche del sistema nervoso enterico, le fibre del vago scomparirebbero perché ricoperte da un'ampia area di colore.

Di certo, la voce del cervello viene udita nell'intestino, ma non su una linea diretta a ciascun membro della congrua enterica. Se la maggioranza dei neuroni enterici non riceve alcuna connessione diretta dal cervello o dal midollo spinale, è chiaramente impossibile definirli, secondo le regole di Langley, simpatici o parasimpatici. Per tale motivo, Langley incluse una terza sezione, quella enterica, nella sua definizione di sistema nervoso autonomo. Il sistema nervoso enterico differisce dal simpatico e dal parasimpatico per quanto riguarda la sua indipendenza anatomica e funzionale dal cervello e dal midollo spinale. È questa classificazione del sistema nervoso enterico che lo separa, ma anche lo unisce, che ancora sorprende medici e persino neurologi.

L'opera di Langley si è rivelata di importanza duratura, poiché fornisce le basi per la comprensione dell'indipendenza del sistema nervoso enterico e del perché esso sia effettivamente un secondo cervello. Tutti e tutto devono avere un posto nel grandioso progetto degli avvenimenti, e Langley ne trovò uno per il sistema nervoso enterico nel progetto del grande innervatore.

Nonostante la schiacciante complessità del sistema nervoso dei vertebrati, il suo piano di base è semplice. Vi sono due sistemi principali, un *sistema nervoso centrale*, noto come SNC, e un *sistema nervoso periferico*, definito SNP. Il sistema nervoso centrale è composto dal cervello (inteso ora come quello che si trova nella testa) e dal midollo spinale, mentre il sistema nervoso periferico include tutto il resto. Questi due sistemi sono del tutto interconnessi e lavorano insieme, pertanto la loro separazione potrebbe sembrare alquanto arbitraria; tuttavia, il sistema nervoso centrale è chiaramente superiore a quello periferico, dato che non si discute su quale sia il sistema che impartisce gli ordini e su quale sia invece quello che li esegue. I comandi passano *dal* cervello *e dal* midollo spinale attraverso i nervi del sistema nervoso periferico *ai* muscoli *e alle* ghiandole (gli effettori del corpo). Le informazioni captate dai recettori sensoriali del corpo tornano indietro al cervello e al midollo spinale nuovamente attraverso i nervi del sistema nervoso periferico. Quindi, si stabilisce una gerarchia di funzione e un concatenamento necessario. Il cervello si trova in cima, gli effettori e i recettori sensitivi al fondo. Gli effettori fanno ciò che il sistema nervoso centrale dice loro di fare e le informazioni raccolte dai recettori sensitivi sono inviate al piano superiore perché possano essere apprezzate e ascoltate dal SNC.

La rivolta dell'intestino: il cervello dei piani bassi

Il sistema nervoso enterico, eccezionalmente, può sfuggire a questa gerarchia funzionale. Tecnicamente, il sistema nervoso enterico è un componente del sistema nervoso periferico, ma è tale solo per definizione. Fa parte del sistema nervoso periferico qualsiasi elemento nervoso che non sia il cervello o il midollo spinale. Tuttavia, a differenza del resto del sistema nervoso periferico, il sistema nervoso enterico non esegue necessariamente i comandi che riceve dal cervello o dal midollo spinale; né rimanda loro indietro immancabilmente le informazioni ricevute. Quando lo decide, il sistema nervoso enterico può elaborare i dati prelevati in modo indipendente dai propri recettori sensitivi, e agire sulla base di tali dati al fine di attivare un gruppo di effettori sotto il suo esclusivo controllo. Quindi, il sistema nervoso enterico non è uno schiavo del cervello, ma uno spirito di contraddizione indipendente nell'organizzazione nervosa del corpo. È un ribelle, l'unico elemento del sistema nervoso periferico che può scegliere di non obbedire agli ordini del cervello o del midollo spinale.

L'indipendenza

Dunque, il sistema nervoso enterico è un sito indipendente di integrazione ed elaborazione neurale. Per questo è il secondo cervello. Il sistema nervoso enterico non potrà mai comporre sillogismi, scrivere poesie o dedicarsi a dialoghi socratici, ma nonostante ciò è un cervello. Fa funzionare il suo organo, l'intestino; e se arriva lo stimolo a spingere (come fa nei milioni di persone alle quali sono state interrotte chirurgicamente le fibre nervose del vago), può farlo tutto da solo. Quando il sistema nervoso enterico fa funzionare bene l'intestino, il corpo è felice. Quando il sistema nervoso enterico non funziona e l'intestino si comporta male, i sillogismi, la poesia e i dialoghi socratici sembrano tutti svanire nel nulla.

Naturalmente, tutto ciò è più di quanto sapesse Langley, ma dubito che sia più di quanto non sospettasse. Non sarebbe infatti possibile spiegarsi altrimenti le precoci scoperte di Bayliss e Starling e il lavoro di Trendelenburg. Anche così, molti anni dopo la pubblicazione della grande opera di Langley, un'altra generazione di scienziati, della quale io stesso faccio parte, sarebbe arrivata a scoprire nuovamente tutto ciò e a divulgare le informazioni a un pubblico che avrebbe accolto le riscoperte prima in modo riluttante e infine con un «Oh!» di meraviglia collettivo, come se queste verità fossero state rivelate per la prima volta. Per fortuna, almeno alcune delle esclamazioni non sono provocate solo dalla sorpresa, ma dal potenziale che la riscoperta del secondo cervello detiene per la medicina clinica. Per parafrasare una pubblicità, la conoscenza sostituisce il rimedio.

Nel corso della sua vita, Langley ottenne un notevole prestigio. Non solo era il redattore del rinomato «Journal of Physiology», ma ne era anche il proprietario.

Sfortunatamente, come redattore Langley aveva tutte le simpatie caratteristiche di Saddam Hussein. I ricercatori non si divertono con redattori arroganti che, senza alcun motivo, modificano i loro lavori. Langley non era noto per la sua capacità di critica logica. Tuttavia, l'accettazione delle modifiche editoriali è resa più agevole quando la critica ha basi logiche ed è possibile confutarla e ricorrere in appello. Inoltre, i cambiamenti improvvisi nel manoscritto di qualcuno possono attirare delle antipatie. L'antipatia può covare sotto la cenere, ma sia che continui a ribollire all'interno sia che esploda all'esterno, è improbabile che un redattore che apporti modifiche d'ufficio sia ricordato con affetto.

La sgradevole reputazione di Langley e le chiacchiere che aleggiavano attorno alla sua memoria aiutano a spiegarsi ciò che accadde alla sua concezione del sistema nervoso autonomo come trioka. Quando studiavo medicina, mi insegnarono in modo autoritario, quantunque sbagliando, che esistono soltanto due parti del sistema nervoso autonomo, la simpatica e la parasimpatica. Ho il sospetto che alla maggior parte dei medici si insegnino ancora che le cose stanno così. Dal momento che non è possibile fare alcuna affermazione scientifica in un lavoro accademico senza una citazione, si è usato il libro di Langley, *Il sistema nervoso autonomo*, come riferimento per questa divisione binaria. Pertanto, fui sorpreso quando lessi effettivamente ciò che scrisse Langley. Esistevano *tre* parti, non due.

Povero vecchio Langley. Dopo la sua morte, è stato vittima dell'ironia. In vita, è stato un revisore arrogante, ma in seguito quel revisore arrogante è stato a sua volta sottoposto a revisione. Il suo retaggio aveva subito una modifica che di certo egli non avrebbe condiviso. Inoltre, la revisione si era verificata dopo che Langley non poteva più difendere se stesso o le sue idee. L'eliminazione del sistema nervoso enterico come parte del sistema nervoso autonomo sarebbe avvenuta anche a prescindere dalla sua personalità; tuttavia, è immaginabile che le sue idee avrebbero potuto avere una maggiore presa sul suo gruppo scientifico se lui fosse stato una persona più amabile.

Qualunque sia stato il motivo, il concetto che il sistema nervoso autonomo sia un'entità composta da tre parti scomparve praticamente negli anni successivi a Langley. I risultati di Bayliss e Starling, Trendelenburg e Langley furono messi in ombra dall'illuminante scoperta dei neurotrasmettitori, che potevano spiegare gli effetti dello stimolo dei nervi simpatici e parasimpatici. Il sistema nervoso enterico svanì dalla vista non appena si identificarono prima i neurotrasmettitori parasimpatici e poi quelli simpatici. Queste radiose scoperte sembrarono eclissare i nostri più recenti predecessori.

Il sistema nervoso enterico, se anche veniva in mente a qualcuno, era considerato parasimpatico. Cadde in disuso perfino il suo nome. I neuroni dell'intestino furono liquidati come i collegamenti postgangliari nel percorso nervoso parasimpatico alla muscolatura liscia

gastrointestinale e alle ghiandole. Esisteva una ragione logica, sebbene imperfetta, per questo punto di vista. Il nervo vago, che innerva l'intero apparato intestinale dall'esofago per tutto il percorso fino a metà del colon, è, in fin dei conti, un nervo cranico. Laddove termina il territorio del nervo vago, subentrano i nervi sacrali. La definizione di parasimpatico è appropriata, nel senso che i nervi che collegano l'intestino al sistema nervoso centrale sono cefalici e sacrali. Inoltre, come altri gangli parasimpatici, i gangli enterici sono incorporati all'interno dell'organo innervato. Tutto corrisponde alla perfezione, se uno ignora, o non desidera prendere in considerazione, il fatto che la maggior parte dei neuroni enterici non sono innervati direttamente né dalle fibre del vago, né dai nervi sacrali. La muscolatura liscia e le ghiandole dell'intestino non sono rifornite da una catena di due neuroni, ma da complessi circuiti neurali enterici intrinseci che possono coinvolgere molti neuroni. Di fatto, dato che i riflessi si verificano quando l'apparato intestinale è effettivamente tagliato fuori dal sistema nervoso centrale, le fibre del nervo vago e quelle sacrali possono essere completamente irrilevanti per molti dei comportamenti dell'intestino.

Non è semplice spiegare perché l'interpretazione del sistema nervoso enterico sia caduta in disgrazia. L'ostinata ignoranza della storia e della verità biologica dimostrata non è una pratica comune tra gli scienziati. Non è stato scoperto niente che provi, o anche suggerisca, che Bayliss e Starling, Trendelenburg e Langley si fossero sbagliati. È difficile credere che il Medioevo del sistema nervoso enterico fosse accelerato solo dall'amore dei nostri predecessori per la semplicità e l'ordine, ma quella sembra essere la spiegazione più indulgente. Qualsiasi altra implicherebbe bizzarre teorie di cospirazione, che, anche se fossero vere, mi sono sconosciute e neanche mi affascinano. Quindi, attribuisco la dimenticanza della conoscenza del sistema nervoso enterico alla comparsa in scena di due neurotrasmettitori chimici che arrivarono a dominare tutto il pensiero scientifico sul sistema nervoso autonomo. Una volta che l'esistenza di questi due neurotrasmettitori chimici divenne di dominio pubblico, la tentazione di avere solo due sistemi autonomi, uno per ciascuno di essi, divenne irresistibile. Sfortunatamente, la condiscendenza dei nostri predecessori nei confronti di questa tentazione condusse al Medioevo della neurobiologia enterica. Fortunatamente, l'opera di Langley, come gli scritti del Venerabile Beda, sopravvisse per tenere viva la fiamma della conoscenza enterica e fece da faro per guidare al Rinascimento dell'intestino.

Il funzionamento di qualsiasi parte del sistema nervoso vertebrato implica la comunicazione dei neuroni l'uno con l'altro. Per la maggior parte, i messaggi sono consegnati sotto forma di sostanze chimiche; pertanto, prima che gli scienziati potessero sperare di comprendere come funzioni qualsiasi parte del sistema nervoso, occorreva capire cosa fossero i neurotrasmettitori e perché si comportassero così come fanno. Per il sistema nervoso enterico, la storia della trasmissione chimica è particolarmente intensa, perché la scoperta della neurotrasmissione chimica contribuì inizialmente a celare la conoscenza sul secondo cervello. Di recente, tuttavia, dato che la reale abbondanza di neurotrasmettitori è diventata infine palese, è stato possibile usare le azioni di queste sostanze per svelare i segreti del cervello addominale e usare queste

informazioni per portare sollievo all'intestino inquieto.

I veleni perspicaci

Curiosamente, è possibile pensare alla storia dei neurotrasmettitori chimici come a una serie di episodi, in cui l'improbabile eroe di ciascuno di essi è un orribile veleno. Tossine e veleni, spesso strumenti di morte, ci hanno in effetti insegnato molto sulla vita.

La storia della nostra conoscenza della neurotrasmissione chimica inizia in Francia nel XVIII secolo con le ricerche condotte da Claude Bernard sul curaro, una fitotossina mortale in uso presso i popoli autoctoni dell'America del Sud. Questi popoli sono cacciatori-raccoglitori per i quali la capacità di abbattere la cacciagione in fuga è una faccenda seria. I cacciatori usano il curaro per rivestire la punta delle piccole frecce che scagliano dalle loro cerbottane contro gli animali della foresta. Il curaro paralizza velocemente qualsiasi animale colpito dalla freccia, in modo che i cacciatori possano raccogliere le bestie con comodo e prepararle per uno o più pranzi.

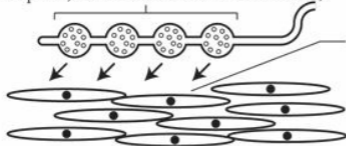
Fortunatamente per tutti gli interessati, tranne naturalmente per gli animali, il curaro non viene assorbito oralmente, pertanto la carne avvelenata può essere tranquillamente consumata senza pericolo.

Bernard non lavorò con il sistema nervoso autonomo, bensì con i nervi che innervano il muscolo scheletrico. Scopri che il curaro bloccava la capacità di risposta di tali muscoli allo stimolo dei loro nervi motori; tuttavia, anche se i muscoli trattati dal curaro se ne stavano seduti in modo flaccido nelle loro stanze davanti a ciò che sarebbe dovuta essere l'irresistibile stimolazione nervosa, essi non erano paralizzati. Bernard osservò, probabilmente con piacere, che, nonostante la presenza del curaro, sia i nervi sia i muscoli funzionavano ancora perfettamente bene se stimolati singolarmente. Questa osservazione dimostrò che esiste una regione specializzata, la *giunzione neuromuscolare*, tra il nervo e il muscolo, che è la sede dell'azione del curaro. La regione equivalente del sistema nervoso autonomo in cui il muscolo liscio, il muscolo cardiaco o le ghiandole sono innervati (la *giunzione neuroeffettore*), non è interessata dal curaro, a riprova che il meccanismo di neurotrasmissione autonoma deve essere diverso da quello che si verifica nella giunzione neuromuscolare scheletrica.

LA GIUNZIONE NEUROEFFETTORE AUTONOMA

Questi rigonfiamenti del nervo sono denominati varicosità. Essi contengono pacchetti del trasmettitore (vescicole sinaptiche) e si trovano dove esso viene secreto

Questo è il nervo autonomo diretto al muscolo liscio



L'acetilcolina (parasimpatico) o la norepinefrina (simpatico) operano qui. In un caso come nell'altro, il curaro non riesce a bloccare la trasmissione (il trasmettitore attraversa un ampio spazio per raggiungere i suoi recettori sul muscolo)

Queste sono cellule del muscolo liscio. Uno strato di muscolo è composto da molte cellule unite

LA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE SCHELETRICA

Questa è la terminazione del nervo motorio. Contiene pacchetti di trasmettitori (vescicole sinaptiche)

Questo è il nervo motorio diretto al muscolo scheletrico

Guaina di protezione

Nucleo (contiene i geni)

Questa è una cellula del muscolo scheletrico. È molto più grossa di una cellula del muscolo liscio e va da tendine a tendine (i tendini collegano la cellula del muscolo all'osso)

L'acetilcolina opera qui.
La sua azione è bloccato dal curaro



I chirurghi moderni usano ancora il curaro per un fine che non è molto diverso da quello dei

cacciatori dell'America del Sud. Naturalmente, i chirurghi non sparano il curaro nei pazienti da cerbottane, ma lo iniettano per fleboclisi nelle vene dei pazienti per il suo scopo originale: paralizzare i muscoli. Ciò consente di usare una quantità di anestetico molto minore durante l'intervento chirurgico. A differenza degli animali avvelenati dal curaro, ai pazienti umani trattati con tale sostanza si fornisce la respirazione artificiale. Questi pazienti hanno bisogno di un respiratore che respiri in vece loro, ma sopravvivono perché il muscolo cardiaco del cuore è diverso dai muscoli scheletrici, che sono responsabili della respirazione. Quando i nervi smettono di comunicare con il muscolo scheletrico, questo diventa flaccido e resta fermo nell'amaca dei propri legami ossei. Comunque, il muscolo cardiaco ha il proprio ritmo intrinseco e batte regolarmente, anche se non riceve alcuna informazione dai nervi che l'innervano. In tutti i casi, il curaro non incide sulla trasmissione dai nervi al muscolo cardiaco e a quello liscio. Fintantoché c'è qualcuno che respira al posto del paziente, come succede durante un intervento chirurgico, la paralisi dei muscoli scheletrici non rappresenta una minaccia per la sua vita. Il cuore continua a battere, il cervello funziona ancora e l'intestino si muove come sempre.

Muscarina: non mangiate i funghi

La storia del sistema nervoso autonomo e la definitiva conferma della neurotrasmissione chimica ricomincia all'inizio del XX secolo in conseguenza dei picnic inglesi, come tutte le cose. Di nuovo, compare pesantemente un veleno negli eventi. I picnic sono molto in voga in Inghilterra, e i funghi selvatici sono considerati da molti l'accompagnamento perfetto, anche se non sempre sicuro. Sir Henry Dale, un docente di Oxford dell'inizio del secolo, notò che una sindrome clinica particolare, che si verificava in incauti amanti di funghi che raccoglievano e mangiavano un fungo chiamato *Amanita muscaria*, presentava effetti simili a quelli che si sarebbero visti se tutti i nervi parasimpatici del paziente fossero stati stimolati contemporaneamente. Gli occhi delle vittime roteavano violentemente e le pupille si riducevano a dei puntini. Il sudore fluiva dai pori di tutto il corpo, la saliva scorreva dalle loro bocche e le feci gocciolavano o addirittura esplodevano in modo incontrollato dai loro ani. I visceri si agitavano e si muovevano così violentemente che il moto intestinale era spesso doloroso per il paziente e visibile al di sotto della pelle dell'addome. La pressione sanguigna scendeva precipitosamente mentre il battito cardiaco dei pazienti rallentava e a volte si arrestava, anche se per poco. Non si era certi che potessero sopravvivere e chiunque avesse vissuto una tale esperienza era da compatire. La sindrome fu denominata «muscarinismo» dal nome del fungo che la provocava.

Si scoprì che le risposte degli effettori (muscoli lisci, ghiandole, cuore e vasi sanguigni) alla muscarina, il veleno estratto dall'*Amagita muscaria*, erano del tutto identiche a quelle ricavate dal neurotrasmettitore parasimpatico, la cui identità non era nota prima dell'opera di Dale. Al contrario del curaro, la muscarina si assorbe se viene ingerita. La muscarina non si trova naturalmente nel corpo, pertanto era ovvio che non fosse in sé il neurotrasmettitore parasimpatico; tuttavia, Dale scoprì che tutti gli effettori che rispondono alla muscarina rispondono in modo identico all'*acetilcolina*, che è presente naturalmente. Inoltre, prima Otto Loewy e poi lo stesso Dale, dimostrarono che nervi parasimpatici stimolati rilasciano acetilcolina. Queste osservazioni suggerirono a Dale e ad altri che l'acetilcolina avrebbe potuto effettivamente essere il neurotrasmettitore dei nervi parasimpatici.

Scopolamina e atropina: caldo, secco e con gli occhi spalancati

Un altro gruppo di veleni vegetali aiutò a confermare l'intuizione di Loewy e Dale che l'acetilcolina sia il neurotrasmettitore parasimpatico. Le risposte degli effettori alla muscarina, all'acetilcolina e ai nervi parasimpatici sono tutte specificamente bloccate da tossine presenti in un estratto della belladonna e di altre piante. Questi composti sono molecole relativamente semplici e possono essere facilmente depurati o sintetizzati commercialmente. Gli *antagonisti* puri delle risposte all'acetilcolina, come gli estratti di belladonna, bloccano anche in modo specifico le risposte parasimpatiche. Uno di tali antagonisti si chiama *ioscina* in Gran Bretagna e *scopolamina* in America. Un altro, ora ampiamente usato dagli oftalmologi per dilatare le pupille per le visite oculistiche, si chiama *atropina*.

La tossicità di scopolamina e atropina deriva dalla loro capacità di bloccare le azioni dell'acetilcolina. Si dice che le vittime diventino cieche come pipistrelli (il cristallino dei loro occhi non riesce ad accomodarsi), calde come l'Inferno (non possono sudare o espettorare), rosse come barbabietole (i vasi sanguigni nella pelle si dilatano) e matte come un cappellaio (le sostanze entrano nel cervello e fanno la stessa cosa che fanno in periferia). Le loro bocche si seccano, le pupille si spalancano e il cuore batte all'impazzata. Sia la scopolamina sia l'atropina, quindi, sopprimono le risposte degli effettori alla stimolazione dei nervi parasimpatici, ma lasciano intatte le risposte simpatiche. A Dale sembrò chiaro che l'acetilcolina dovesse essere il neurotrasmettitore parasimpatico finale e che il neurotrasmettitore simpatico dovesse essere qualcos'altro. I suoi contemporanei erano d'accordo e la sua conclusione non è stata da allora messa in discussione.

Dale vinse il premio Nobel per le sue scoperte. Inoltre, il posto nella storia dell'odioso fungo *Amanita muscaria* e della sua ripugnante tossina, la muscarina, fu anche suggellato dall'*establishment* scientifico. Quel posto è ora commemorato nella nomenclatura ufficiale. Quelle risposte degli effettori all'acetilcolina che mimano la stimolazione dei nervi parasimpatici si chiamano «muscariniche»; i *recettori* (molecole espresse su superfici cellulari che agiscono da interruttori che possono essere attivati da molecole di segnalazione, come i neurotrasmettitori o gli ormoni) sui quali agisce l'acetilcolina sono noti come «recettori muscarinici» e i composti, scopolamina e atropina, che impediscono l'attivazione di tali recettori da parte dell'acetilcolina, o composti come questo, sono denominati «antagonisti muscarinici». Questa nomenclatura non si sviluppò perché gli scienziati desideravano ricordare il fungo per ragioni sentimentali. Essa si sviluppò invece perché l'acetilcolina ha un grado maggiore di versatilità nelle sue azioni di quanto potrebbe suggerire l'imitazione degli effetti della muscarina. Le azioni dell'acetilcolina non sono *tutte* muscariniche ed è stato necessario inventare dei nomi per distinguere quegli effetti dell'acetilcolina che sono muscarinici da quelli che non lo sono.

Nicotina: un altro motivo per non fumare

La giunzione tra il neurone postgangliare e un muscolo liscio, il muscolo cardiaco, il vaso sanguigno o la ghiandola è soltanto il collegamento finale di una catena. Ricorderete che il percorso neurale nel sistema nervoso autonomo implica almeno due neuroni. Il primo deve comunicare con il secondo. La trasmissione dal primo al secondo neurone in un ganglio è pertanto altrettanto importante della giunzione finale (neuroeffettore) nel portare il messaggio del sistema nervoso centrale agli effettori. Sorprendentemente, si scoprì che la muscarina, che mima l'effetto dell'acetilcolina alla fine della catena di neuroni, non aveva alcun effetto sulla trasmissione nella giunzione a metà. Quando è stata applicata ai gangli parasimpatici o simpatici (le ubicazioni della giunzione a metà), la muscarina non ha né mimato né bloccato l'azione del neurotrasmettitore gangliare. Di contro, si è rilevato che entrambi questi gangli rispondevano alla nicotina, la stessa nicotina che altera le sigarette.

La nicotina stimola potentemente sia i neuroni postgangliari simpatici sia quelli parasimpatici. Di fatto, Langley usava la nicotina per delineare il sistema nervoso autonomo. Per fare ciò, semplicemente, spennellava di nicotina i gangli e osservava le risposte parasimpatiche o simpatiche; che la spennellata di nicotina provocasse un effetto parasimpatico o simpatico dipendeva da quale ganglio egli trattasse. La risposta, a sua volta, stabiliva la parte cui il ganglio trattato con nicotina apparteneva.

In contrasto con le sue azioni evidenti sulle cellule gangliari, si scoprì che la nicotina non aveva alcun potere all'estremità della catena di neuroni autonomi. Pertanto, la nicotina teoricamente non sortisce alcun effetto se applicata alle giunzioni dei neuroeffettori parasimpatici o simpatici. Per esempio, quando si spennella di nicotina un ganglio che innerva una ghiandola, i neuroni del ganglio si eccitano per effetto della nicotina. A loro volta, essi eccitano la ghiandola che innervano e la ghiandola secerne. Tuttavia, se si spennella la nicotina direttamente sulla stessa ghiandola, non accade nulla. Con la muscarina, è vero il contrario. Se si dovesse spennellare di muscarina lo stesso ganglio che risponde alla nicotina, non accadrebbe nulla. Al contrario, se si dovesse applicare la muscarina alla ghiandola che ha ignorato l'applicazione diretta della nicotina, la ghiandola secernerebbe.

A prima vista, questi fenomeni possono sembrare in modo sconcertante incoerenti e persino contraddittori. Dopo tutto, l'acetilcolina è il neurotrasmettitore che eccita i neuroni nei gangli, ed è anche il neurotrasmettitore che eccita le cellule secernenti della ghiandola. Perché, dunque, le azioni gangliari dell'acetilcolina dovrebbero essere mimate dalla nicotina e non dalla muscarina, mentre, presso la giunzione dei neuroeffettori, le azioni della stessa molecola, l'acetilcolina, sono mimate dalla muscarina e non dalla nicotina?

Recettori: le orecchie delle parole chimiche

La risposta a questo paradosso apparente sta nei recettori, le molecole espresse sulle superfici cellulari che consentono alle cellule di rispondere alle sostanze di segnale del loro ambiente. I nervi comunicano usando un linguaggio chimico. Per ascoltare un linguaggio chimico, occorre disporre dell'equivalente molecolare delle orecchie. Le «orecchie» che rispondono alle «parole» chimiche sono i recettori presenti nelle membrane delle cellule che rispondono. Le molecole di segnale, che possono essere abbastanza discriminanti nel loro gusto molecolare, si legano a questi recettori. Dopo essersi legati a una molecola di segnale, i recettori continuano ad avviare il «macchinario di trasduzione» alla Rube Goldberg che converte il legame della molecola segnalante in evento fisiologico. Droghe e tossine, come la nicotina e la muscarina, sono in grado di rimpiazzare gli interruttori molecolari che attivano le cellule mimando le molecole di segnale naturali e legandosi ai recettori.

Molte molecole recettrici, che sono del tutto diverse l'una dall'altra, condividono la capacità di bloccare l'acetilcolina. In conseguenza di tale proprietà condivisa, e nonostante le profonde differenze molecolari, questi recettori provocheranno la risposta all'acetilcolina da parte di tutte le cellule che li esprimono. I neuroni eccitati dall'acetilcolina nei gangli autonomi, pertanto, esprimono le molecole recettrici che bloccano l'acetilcolina, così come fanno gli effettori negli organi che rispondono ai nervi parasimpatici; tuttavia, tali neuroni esprimono un tipo completamente diverso di molecola recettrice dell'acetilcolina. È possibile distinguere queste molecole recettrici l'una dall'altra farmacologicamente mediante le azioni di nicotina, muscarina o altre sostanze. La nicotina si lega soltanto ad alcuni dei recettori che riconoscono l'acetilcolina, mentre la muscarina si lega ad altri e nessuno dei recettori che si lega alla nicotina fa lo stesso con la muscarina. Quindi, possiamo pensare all'acetilcolina come a un ghiottone che si lega allegramente a qualsiasi tipo di recettore acetilcolinico. Di contro, la nicotina e la muscarina sono buongustai, molecole di gran lunga più discriminanti nei loro gusti per i recettori di quanto non lo sia l'acetilcolina.

Il tipo di recettore acetilcolinico che si lega alla nicotina si chiama *nicotinico*. Il tipo di recettore acetilcolinico che si lega alla muscarina si chiama, come abbiamo già detto, *muscarinico*. Dal momento che i neuroni nei gangli esprimono recettori nicotinici, essi rispondono sia alla nicotina sia all'acetilcolina. In modo simile, dato che gli effettori esprimono recettori muscarinici, essi rispondono sia alla muscarina sia all'acetilcolina. La muscarina ignora i recettori nicotinici nei gangli e la nicotina ignora i recettori muscarinici sulla muscolatura liscia, il muscolo cardiaco o le ghiandole. I ricercatori, usando le tecniche della biologia molecolare, hanno recentemente scoperto l'esistenza di una cornucopia insospettata di recettori acetilcolinici; ciononostante, le vecchie tossine, la nicotina e la muscarina, hanno lasciato il loro segno, visto che permisero di distinguere con successo le principali categorie di recettori acetilcolinici e associarono loro i propri nomi.

Il fatto che i neuroni nei gangli autonomi esprimano recettori nicotinici e quindi rispondano

all'acetilcolina non stabilisce di per sé che l'acetilcolina sia il neurotrasmettitore gangliare. Nel mondo delle cellule, le notizie possono essere veicolate da più di un unico messaggero. Peggio ancora, come abbiamo appena visto, i mimi molecolari, che incarnano il messaggero vero, sono numerosi e le cellule potrebbero non essere in grado di fare la differenza tra di loro. T.R. Elliot, molto tempo prima che Dale si preoccupasse dei funghi dei picnic di Oxford, aveva avanzato l'idea che se una sostanza naturale simulava gli effetti di un neurotrasmettitore, allora tale sostanza dovesse *essere* un trasmettitore. Dale non ha mai accettato questa argomentazione, che di fatto screditò con la sua ricerca della muscarina. Comunque, una prova aggiuntiva che l'acetilcolina avesse una doppia funzione, cioè la trasmissione presso i gangli autonomi così come presso la giunzione dei neuroeffettori, seguì subito dopo il lavoro iniziale di Loewy e Dale.

Ancora una volta, il curaro, proprio lo stesso veleno delle frecce sudamericane che Claude Bernard aveva usato per dimostrare la natura speciale della giunzione neuromuscolare scheletrica, svolse un ruolo importante. I recettori acetilcolinici nella giunzione neuromuscolare, come le loro controparti nei gangli parasimpatici e simpatici, possono essere attivati dalla nicotina (sebbene la nicotina si leghi alquanto più facilmente ai recettori acetilcolinici nei gangli che a quelli nella giunzione neuromuscolare). I recettori acetilcolinici della giunzione neuromuscolare, quindi, sono nicotinici. Dato che il curaro blocca gli effetti dell'acetilcolina nella giunzione neuromuscolare, ne consegue che il curaro è un *antagonista* nicotinic. Gli antagonisti, come i neurotrasmettitori e i relativi mimi chimici, si legano ai recettori. A differenza delle molecole che attivano i recettori, denominate *agoniste*, gli antagonisti si collocano semplicemente sui recettori senza attivarli. Collocandosi sui recettori, gli antagonisti bloccano le azioni dei neurotrasmettitori o di altri agonisti semplicemente impedendo agli attivatori di legarsi ai propri recettori scelti.

In quanto antagonista della nicotina, ci si aspetterebbe che il curaro impedisse l'azione dell'acetilcolina e della nicotina sui recettori acetilcolinici gangliari, allo stesso modo in cui impedisce la loro azione nella giunzione neuromuscolare. Per un antagonista, parafrasando le parole di Gertrude Stein, un recettore nicotinic è un recettore nicotinic è un recettore nicotinic. Di fatto, si è scoperto che il curaro fa sui gangli tutto quanto era previsto facesse. Quando si applica il curaro ai gangli autonomi, esso arresta l'acetilcolina e la nicotina nei loro percorsi e interrompe la comunicazione tra i neuroni pregangliari e quelli postgangliari. Anni dopo Dale, il rilascio di acetilcolina da parte di nervi parasimpatici e simpatici stimolati fu confermato da mezzi chimici. Questa conferma, quando alla fine giunse, fu la prova necessaria e definitiva che l'acetilcolina è davvero il neurotrasmettitore in tutti i gangli autonomi. La dimostrazione provocò comunque poca meraviglia, poiché ormai era come mettere i puntini sulle «i».

Ora noi accettiamo, quasi fosse un dogma, che nel sistema parasimpatico del sistema nervoso autonomo l'acetilcolina è il neurotrasmettitore in entrambe le sinapsi del percorso. Funziona nei gangli per collegare il primo neurone al secondo, e inoltre funziona nella giunzione dove il

secondo neurone invia segnali agli effettori sotto il suo controllo.

L'efficacia del curaro come antagonista in entrambe le giunzioni neuromuscolari gangliare e scheletrica dimostra la somiglianza tra i recettori acetilcolinici trovati in queste due sinapsi. Entrambi sono nicotinici; tuttavia, la ricerca moderna, che ha decifrato i geni e i messaggi che codificano i recettori reali, ha ora rivelato che i recettori nicotinici muscolari e gangliari sono complessi di varie molecole individuali simili, ma non identiche, l'una all'altra. Così, è possibile progettare farmaci che traggano vantaggio da tali differenze. A differenza del curaro, questi nuovi composti agiscono da antagonisti la cui efficacia è appositamente calcolata per essere maggiore nei gangli rispetto alla giunzione neuromuscolare, o al contrario. Tale differenza selettiva di efficacia nei due tipi di recettori nicotinici permise di produrre una classe di farmaci nota come *agenti bloccanti gangliari*. I bloccanti gangliari sono stati ora sostituiti da farmaci migliori, ma una volta erano molto utili per il controllo dell'ipertensione arteriosa maligna. A differenza del curaro, i bloccanti gangliari possono arrestare la neurotrasmissione attraverso i gangli autonomi senza indurre una paralisi neuromuscolare.

Dato che l'attività dei nervi simpatici aumenta la pressione arteriosa, i farmaci bloccanti gangliari possono ridurre la pressione alta indotta dai nervi (ipertensione) inattivando questi ultimi. Dobbiamo riconoscerlo, gli effetti degli agenti bloccanti gangliari non si limitano solo a quei neuroni simpatici che controllano la pressione arteriosa, né tali farmaci consentono di regolare la pressione arteriosa una volta somministrati. Una persona trattata può quindi stare in piedi o svenire perché la sua pressione arteriosa crolla, sotto forma di pozze di sangue nelle gambe, ed essa si abbassa troppo per sostenere in modo adeguato il cervello. Tuttavia, mentre li si utilizzava ancora, gli agenti bloccanti gangliari probabilmente salvarono le vite di molti pazienti che soffrivano di ipertensione maligna. La causa della morte di Franklin Delano Roosevelt fu proprio l'ipertensione maligna di cui soffriva e l'ictus che lo colpì. Quando l'estate scorsa visitai la sua tomba a Hyde Park, meditai su come la storia del XX secolo avrebbe potuto essere cambiata se i suoi medici avessero potuto disporre di farmaci bloccanti gangliari.

Tossina botulinica: le meraviglie della cucina casalinga

Un altro veleno ancora aiutò a stabilire che l'acetilcolina serve da trasmettitore nelle tre sinapsi principali: la giunzione del neuroeffettore parasimpatico, la giunzione nervo-nervo nei gangli parasimpatici e simpatici, e la giunzione neuromuscolare scheletrica. Anche a questo veleno, come a quello dell'*Amanita muscaria*, piace frequentare i picnic. A differenza della muscarina, tuttavia, questo veleno non è un costituente intrinseco del cibo consumato per sbaglio. Questo veleno è aggiunto dallo chef. Gli chef, a differenza di Lucrezia Borgia, non avvelenano di proposito le loro vittime. Piuttosto, compiono il loro lavoro mortale senza alcun intento letale. Di fatto, i killer che distribuiscono questo veleno sono spesso le persone più dolci e gentili del mondo.

Il veleno è la tossina botulinica. È costituita da un batterio, il *Clostridium botulinum*, e provoca spesso una sindrome letale nota come *botulismo*. Questi germi non vivono nell'ossigeno. Quindi, sono definiti *anaerobi obbligati*, che significa semplicemente che hanno l'obbligo di vivere in luoghi privi di aria. Dal momento che noi viviamo in ambienti dotati di aria e il nostro sangue distribuisce ossigeno ai tessuti interni, il *Clostridium botulinum* di solito non ci crea problemi. Non c'è pericolo incombente di una qualche epidemia di *Clostridium botulinum*. D'altra parte, il batterio produce delle spore, che gli consentono di persistere anche in condizioni di crescita non ottimali. Le spore sono notevolmente resistenti e durevoli. Quando le spore raggiungono un ambiente favorevole alla crescita, germinano, come i semi di una pianta, e danno origine a un portentoso raccolto di *Clostridium botulinum* vivente. Man mano che i batteri crescono, secernono la loro tossina e producono gas.

Le spore possono contaminare il cibo. Quando si conserva il cibo in scatola o lo si mette via sotto forma di conserva, quindi, si farebbe bene a uccidere le spore mediante il processo di inscatolamento o conservazione. In un barattolo sigillato non vi è ossigeno. Come drammatizzò Giuseppe Verdi nell'ultimo atto dell'*Aida*, quando essenzialmente inscatolò Radames e Aida, l'ossigeno si esaurisce all'interno di un vaso sigillato e non viene ripristinato. Gli organismi intrappolati all'interno che dipendono dall'ossigeno, come Radames e Aida, sono condannati, ma quelli come il *Clostridium botulinum*, che non sopportano l'ossigeno, prosperano.

I frequenti colpevoli sono da ricercarsi nelle conserve inscatolate in casa non sterilizzate a sufficienza dagli inconsapevoli produttori. Sono sigillate e non hanno ossigeno all'interno. Se nelle lattine restano delle spore, le condizioni all'interno sono perfette per il *Clostridium botulinum*. Una volta aperte, dalle conserve infestate da *Clostridium botulinum* sfia un getto di gas, che potrebbe anche non essere notato dal cuoco prima della presentazione alle sue non intenzionali vittime di un misto dal sapore delizioso di tossina botulinica e conserva. Oltre alle conserve, anche il tonno inscatolato in modo non corretto costituisce una minaccia. Una scatoletta rigonfia perché contiene del gas è una scatoletta da non consumare. Quando si esaminano le scatolette, occorre distinguere i rigonfiamenti dalle ammaccature. Un'ammaccatura potrebbe essere semplicemente il segno di un camionista all'opera. Un rigonfiamento, tuttavia, è

probabilmente che sia il segno del *Clostridium botulinum* all'opera.

La tossina botulinica uccide perché, a differenza del curaro, abolisce la trasmissione nelle giunzioni neuromuscolari scheletriche. La persona avvelenata si indebolisce gradualmente ma inesorabilmente, man mano che i nervi perdono la loro capacità di indurre la contrazione muscolare. Cedono prima i muscoli utilizzati più di frequente, e più la vittima si dibatte, più rapida è la sua paralisi. Le palpebre si abbassano, la testa si piega e sul viso scompaiono le rughe, insieme all'attività dei muscoli facciali che le ha provocate. Man mano che la struttura muscolare che separa la cavità nasale da quella della bocca cessa di funzionare, il linguaggio diventa nasale. La debolezza della lingua provoca la pronuncia scorretta delle parole. Le gambe perdono la capacità di sostenere il corpo e le braccia non riescono più a distendersi per cercare aiuto. Tuttavia, ancora peggio è l'arresto della respirazione, che è il motivo per cui il botulismo può uccidere. La salvezza dipende da un respiratore, ma dato che la tossina botulinica non è reversibile come il curaro, la respirazione artificiale potrebbe dover essere somministrata per mesi. Per di più, i respiratori non sono reperibili nella maggior parte dei luoghi da picnic.

La tossina botulinica è la più tossica delle tossine, il veleno più velenoso di tutti. In paragone, quasi niente è così mortale. La tossicità del cianuro è niente rispetto alla tossina botulinica. Il fatto che Saddam Hussein fosse fortemente sospettato di avere serbatoi di tale materiale in Iraq prima della Guerra del Golfo era pertanto abbastanza sconvolgente per le forze armate alleate.

La tossina botulinica è più dannosa del curaro perché ha un meccanismo di azione diverso. Il curaro interferisce con l'azione dell'acetilcolina presso i recettori nicotinici. La tossina botulinica invece non lo fa. Aggiungete acetilcolina a livello locale in una giunzione avvelenata dalla tossina botulinica e vedrete che questa funzionerà come se niente fosse. Stimolate il nervo ed esso continuerà a fare da conduttore. Stimolate i muscoli, le ghiandole o i vasi sanguigni... e vedrete che tutto funziona. I nervi, gli effettori, tutto ha un magnifico aspetto, anche se esaminato a un'altissima risoluzione con un microscopio elettronico. Il problema è che la tossina botulinica giunge alle estremità dei nervi e assimila le proteine vitali che consentono ai piccoli pacchetti interni di neurotrasmettitori di fondersi con la membrana cellulare e rilasciare acetilcolina. Un nervo avvelenato dal botulino, quindi, non è in grado di secernere il proprio neurotrasmettitore. Il segnale nervoso giunge alla terminazione, che resta muta e incapace di rispondere. Tutte le giunzioni alle quali l'acetilcolina fa da neurotrasmettitore smettono così di funzionare.

A differenza del curaro, che blocca soltanto le giunzioni che utilizzano i recettori nicotinici, la tossina botulinica inattiva qualsiasi nervo riesca a raggiungere che utilizzi l'acetilcolina come proprio neurotrasmettitore. Nei pazienti affetti da botulismo, non solo vengono a mancare i muscoli scheletrici, ma cessa la contrazione delle pupille, si azzerano la sudorazione e la salivazione. Pertanto, la tossina botulinica fornisce la prova decisiva che l'acetilcolina è un neurotrasmettitore. Dopo essere state avvelenate dalla tossina botulinica, le giunzioni che devono rilasciare acetilcolina smettono di farlo. Come una lavanderia in cui la regola è niente

biglietto, niente lavaggio, la regola del sistema nervoso è niente trasmettitore, niente funzione.

Sorprendentemente, la tossina botulinica può essere davvero utile. Non tutte le contrazioni muscolari sono piacevoli. A volte, i muscoli si contraggono in maniera molesta, scomoda o persino brutta da vedere. L'uso più banale della tossina botulinica è come cosmetico di ultima generazione. Le rughe del viso sono provocate dalle contrazioni della faccia; pertanto, le rughe possono essere eliminate semplicemente paralizzando la muscolatura facciale. Il taglio dei nervi che vanno ai muscoli è una cattiva idea, perché i fasci di nervi ai quali un chirurgo può accedere e trovare facilmente, se tagliati, provocherebbero la paralisi dei muscoli responsabili del sorriso e della chiusura delle palpebre. È possibile applicare selettivamente ai muscoli che formano le rughe una piccola tossina botulinica, chiamata familiarmente e allegramente «Botox». Parlando seriamente, la tossina botulinica fa meraviglie per i pazienti che soffrono di condizioni mediche gravi che comportano contrazioni muscolari eccessive o spontanee. È stupefacente, per esempio, nella prevenzione del *blefarospasmo*, la contrazione spontanea e incontrollata delle palpebre. Per quanto riguarda l'apparato gastrointestinale, si usa la tossina botulinica per prevenire lo spasmo del muscolo che modula il passaggio tra esofago e stomaco. Se questo muscolo resta chiuso, vi sono naturalmente grossi problemi, perché il cibo resta ingolfato nell'esofago, incapace di scendere lungo il canale. In tutti questi casi, la tossina botulinica è un farmaco meraviglioso; tuttavia, è solo una meraviglia effimera. Alla fine, si produce un nuovo apparato per il rilascio del trasmettitore, la tossina si consuma e occorre somministrarla nuovamente... e così via in un ciclo infinito.

Grandioso: è completamente naturale!

È interessante pensare alla muscarina, alla tossina botulinica e alla nicotina quando si vedono le pubblicità dei prodotti descritti come *completamente naturali*, come se tale proprietà conferisse loro in qualche modo una speciale benedizione. Il presupposto che sta dietro le pubblicità è che le sostanze chimiche aggiunte ai cibi per conservarne la freschezza, ritardarne il deterioramento e impedire la crescita dei batteri debbano essere nocive alle persone. I pubblicitari che promuovono i prodotti «completamente naturali» vogliono che si diffida di quegli invisibili ometti grigi governativi che fanno le leggi su ciò che viene introdotto nel nostro cibo. Un prodotto «completamente naturale», sottintendendo la pubblicità, deve essere privo di quella roba artificiale che questi cospiratori consentono di mettere in ciò che mangiamo. Il semplice fatto che qualcosa sia «completamente naturale», tuttavia, non deve essere percepito come una qualità positiva. Alcune delle tossine più mortali note all'umanità sono «completamente naturali». La muscarina, la tossina botulinica e la nicotina sono «completamente naturali». Non sono certo fabbricate dalla gente, bensì dai funghi, dai batteri e dalle piante di tabacco.

Personalmente, sono felicissimo di comprare i funghi dal droghiere coreano all'angolo. Quando sono in vena di natura, penso a quel negozio come a una foresta magica in cui tutti i funghi sono commestibili e confezionati in pacchetti puliti. La facilità di raccogliere i funghi e la mia certezza di sopravvivere al loro consumo mi ricompensa largamente per l'ingestione di qualsiasi sostanza chimica i fornitori di funghi possano aver aggiunto durante il trattamento. Apprezzo anche la lavorazione industriale e il controllo qualità ai quali sono sottoposti i tonni inscatolati. Dato che il *Clostridium botulinum* è un residente usuale degli intestini di alcuni pesci, è rassicurante sapere che l'inscatolamento non corretto del tonno è disapprovato, non solo per motivi estetici e morali, ma anche per ragioni legali. Quando si pensa alle scatolette di tonno, è bene avere il governo dalla propria parte.

La mia diffidenza nei confronti dei funghi selvatici e delle scatolette di tonno che presentano rigonfiamenti è una risposta riassuntiva. Ho imparato cosa potrebbe trovarsi al loro interno e sono di conseguenza spassionatamente prudente. Il tabacco, tuttavia, è una questione personale. Questo prodotto è qualcosa che evito rigorosamente sotto qualsiasi forma. Quattordici anni fa, il tabacco ha ucciso mio fratello, e proprio quest'anno anche mio suocero. Mia nipote aveva soltanto un anno quando morì suo padre. Mia suocera, che necessita di cure costanti, è rimasta sola dopo la morte di suo marito e ora vive con noi. Il tabacco è nocivo, non solo perché può provocare il cancro, ma anche perché la nicotina in esso contenuta è un grande stimolatore dei recettori nicotinici nei gangli. Ciò significa che quando si accende una sigaretta, si attiva anche il sistema nervoso autonomo. Fortunatamente, la concentrazione di nicotina nel fumo di tabacco non è sufficientemente alta da provocare danni gravi o immediati alla maggior parte delle persone. Tuttavia, i problemi a lungo termine sono un'altra cosa. Le persone ipersensibili sono un'altra cosa ancora. Ricordo distintamente una persona simile. Un'orrenda condizione medica che implica ipersensibilità alla nicotina si chiama *malattia di Berger*. Quando studiavo

medicina, incontrai una persona che soffriva di malattia di Berger in stato avanzato. Era a letto e fumava con un dispositivo meccanico che sosteneva la sigaretta. Aveva bisogno di quell'apparecchiatura perché era senza dita. La nicotina proveniente dalle sigarette, alle quali era assuefatto, aveva stimolato i suoi gangli simpatici a chiudere i vasi sanguigni in modo così grave che le dita delle mani e dei piedi erano andati in cancrena ed era stato necessario amputare tutto. A lui non era certamente di conforto sapere che il tabacco e la nicotina sono «completamente naturali».

È una vergogna terribile che alcune delle cose peggiori della vita, così come alcune di quelle migliori, siano gratuite. Il mondo della natura ci fornisce il bene e in egual misura il male. Quindi, naturale non significa buono, e artificiale non significa cattivo. La diminuzione dei casi di cancro dello stomaco che iniziò negli anni Quaranta, per esempio, potrebbe benissimo essere stata dovuta all'aggiunta di antiossidanti quali l'*idrossitoluene butilato terziario* ai cereali per evitarne il deterioramento. Non c'è niente di naturale nell'*idrossitoluene butilato terziario*. Il nome protesta vigorosamente come se fosse la personificazione del male chimico, tuttavia impedisce la formazione di sostanze cancerogene nel nostro stomaco che si verifica attraverso l'ossidazione dei cibi che ingeriamo. Quindi, ciò che ci occorre sapere è la natura, non la fonte, di quanto consumiamo. Possiamo imparare, e lo abbiamo fatto, moltissimo sul sistema nervoso enterico e su altre parti di esso dallo studio dei veleni, ma naturalmente è meglio non trarre queste informazioni dalla ricerca sulle loro ignare vittime. I soggetti sperimentali sono molto meglio.

Il trasmettitore simpatico: l'inafferrabile partner dell'acetilcolina

Si è scoperto che il sistema nervoso simpatico è più resistente di quello parasimpatico all'analisi scientifica. Alla fine, si è stabilito che l'acetilcolina è il trasmettitore nei gangli simpatici, ma il trasmettitore che attivava gli effettori alla fine della catena di neuroni simpatici chiaramente non era l'acetilcolina e occorreva identificarlo. La difficoltà incontrata nel trovare il neurotrasmettitore simpatico finale, tuttavia, non preoccupò i nostri precursori scientifici, perché non lo notarono. Poco dopo l'inizio del secolo, nel 1904, T.R. Elliott, in Inghilterra, aveva dimostrato come un ormone, chiamato *adrenalina*, estratto dalla ghiandola surrenale, esercitasse effetti molto simili a quelli provocati stimolando i nervi simpatici. Si costituì pertanto l'opinione che l'«adrenalina» fosse il neurotrasmettitore simpatico finale. Questa opinione fu sufficiente, invece della prova definitiva, a dare luogo all'idea nel sistema nervoso autonomo a due trasmettitori/due sistemi. Similmente, l'«adrenalina» fu accettata come il neurotrasmettitore simpatico sulla sponda americana dell'Atlantico, ma noi americani insistevamo nell'usarne il nome meno pittoresco, *epinefrina*, per distinguerlo dall'Adrenalina, il nome commerciale di un farmaco.

La terminologia è idiosincratice. All'epoca in cui si scelse il nome, gli americani, che spesso mostrano una vena puritana, evidentemente preferirono un lessico scientifico politicamente corretto all'eufonia linguistica. Personalmente, penso che la scelta di epinefrina invece che «adrenalina» fu poco fortunata. Una sfida che fa scorrere l'«adrenalina» sembra eccezionale, ma quando la stessa sfida fa scorrere soltanto epinefrina, difficilmente sembra una sfida. Tuttavia, come Shakespeare espose in un contesto diverso, una rosa chiamata con un altro nome avrebbe lo stesso profumo. In qualunque modo lo chiamassero, poche persone su entrambe le sponde dell'Atlantico si strappavano i capelli sull'identificazione del neurotrasmettitore simpatico. Come nel caso della pomografia, pensavano di sapere cosa fosse quando l'avessero visto.

Ai tempi di T.R. Elliott, e per un lungo periodo dopo di lui, gli scherzetti che il sistema nervoso poteva giocare all'imprudente non furono adeguatamente apprezzati. Di conseguenza, nessuno avanzò la richiesta che un neurotrasmettitore candidato soddisfacesse il rigoroso set di criteri che usiamo noi oggi per l'identificazione dei neurotrasmettitori. Di fatto, tali criteri, che occuparono la mia totale attenzione per un decennio, molti anni più tardi, quando li applicai alla serotonina, non erano stati ancora formulati. Fu un peccato, perché l'identità del trasmettitore nelle giunzioni dei neuroeffettori simpatici *non* è l'epinefrina, come tutti sanno, ma il suo precursore biosintetico, la *norepinefrina*.

Il ruolo della norepinefrina come neurotrasmettitore simpatico finale fu alla fine scoperto da uno scienziato svedese, L.S. Von Euler, dopo la seconda guerra mondiale. Il fatto che il neurotrasmettitore reale sia la norepinefrina (e non l'epinefrina) è naturalmente un dettaglio importante. Il dettaglio, comunque, non turbò i predecessori di Von Euler, che erano stati convinti, sebbene erroneamente, che l'epinefrina mimasse gli effetti della stimolazione dei nervi simpatici. Sfortunatamente, l'epinefrina fornisce soltanto un fedele facsimile; in realtà, non mima

la cosa reale. I recettori che rispondono all'epinefrina e alla norepinefrina (denominati sul mercato *adrenorecettori*) rispondono in modo diverso alle due sostanze chimiche. Di conseguenza, gli effetti dell'epinefrina non sono gli stessi di quelli della norepinefrina o, quindi, della stimolazione dei nervi simpatici. Le differenze di risposta degli organi all'epinefrina e alla norepinefrina sfuggono facilmente. Prima che la gente sapesse cosa cercare, e cosa ancora più importante, prima che avesse gli strumenti con cui farlo, gli effetti dell'epinefrina e della norepinefrina non erano facilmente distinguibili.

Il giudizio retrospettivo fornito dalla conoscenza moderna ci rende facile criticare chi ha operato in precedenza, in assenza delle informazioni di cui disponiamo noi ora. Comunque, è indice di alterigia per chiunque sia impegnato nella ricerca scientifica fare una cosa simile. Ogni anno, dico ai miei studenti durante la mia prima lezione che almeno metà di ciò che mi accingo a insegnare loro alla fine si dimostrerà sbagliata. Il guaio è che non so quale sia la metà sbagliata. Il futuro è un rude negriero. Ciononostante, un istinto gregale spesso fa presa sulle fantasie degli scienziati. Come i lemming, siamo pronti a lanciarsi da un precipizio quando un numero abbastanza grande di noi si sposta in tale direzione. L'idea che l'epinefrina fosse il neurotrasmettitore simpatico fu accettata prima di Von Euler, più perché il concetto era diventato un dogma che perché avesse ricevuto un buon patrocinio.

Tuttavia, possiamo facilmente comprendere il perché dell'errore. Le strutture chimiche di epinefrina e norepinefrina sono molto simili e le quantità di neurotrasmettitori rilasciate dalla stimolazione dei nervi sono insignificanti. Prima dello sviluppo delle moderne tecniche analitiche, rese possibili dall'emergenza postbellica dei National Institutes of Health come fonte di finanziamento biomedico, non fu possibile identificare l'epinefrina e la norepinefrina mediante misurazioni chimiche esatte. Furono invece studiate mediante dosaggi biologici, che misurano non gli ormoni stessi ma le risposte provocate da questi ultimi in un sistema vivente. I dosaggi biologici erano sufficientemente sensibili da rilevare e quantificare il contenuto totale di epinefrina più norepinefrina nei fluidi corporei e negli estratti di tessuto, ma i dosaggi biologici allora in uso non rivelavano che l'epinefrina e la norepinefrina esercitavano effetti diversi.

Solo pochi degli osservatori più altamente percettivi e critici, come Walter Cannon in America, notarono differenze nelle risposte di organi all'epinefrina e alla norepinefrina. Sfortunatamente, sebbene Cannon effettivamente stabilì che gli effetti di epinefrina e norepinefrina non fossero identici, egli era restio nel gettare a mare l'idea che l'epinefrina fosse un trasmettitore simpatico. Cannon così propose che ci fossero non uno ma due trasmettitori, che egli chiamò «simpatina I» e «simpatina II». Questa proposta ormai è storia; tuttavia, non esiste alcun secondo trasmettitore simpatico.

Come abbiamo già visto, i veleni furono estremamente importanti nello stabilire gli effetti dell'acetilcolina nel corpo. Con l'eccezione della nicotina, che aiutò a definire e individuare i gangli simpatici, non vi erano equivalenti simpatici dei veleni che rivelassero così tanto sulle funzioni parasimpatiche dell'acetilcolina. I ricercatori che si affannavano alla ricerca del neurotrasmettitore simpatico erano soli. Nessun *deus ex machina* venne fuori da un fungo per

salvarli. Dal momento che i predecessori di Von Euler non disponevano di antagonisti selettivi o metodi chimici di analisi, è sbagliato biasimarli per non aver individuato correttamente il neurotrasmettitore simpatico nella norepinefina. Nonostante questo, la loro accettazione della sostanza sbagliata senza prove sufficienti non è una pratica da emulare. Per fortuna, la scienza si corregge da sola. Qualunque cosa faccia il gregge, la verità alla fine salta fuori e arresta la fuga precipitosa. È successo con la norepinefina, e doveva succedere più tardi a me.

La farfalla

La storia della ricerca sul sistema nervoso enterico è stata caratterizzata da scoperte ed eclissi. All'epoca in cui iniziai a studiarlo, nessun campo poteva essere più perfetto per un giovane scienziato. Quasi tutto ciò che scoprivo era destinato a essere rivoluzionario. Erano così tanti i concetti errati tra quelli prevalenti sul sistema nervoso enterico, che ogni nuova osservazione che facevo sarebbe stata un progresso nel campo e avrebbe dissipato una vecchia credenza. Molte aree della biologia erano allora inesplorate e pronte per la scoperta. Quest'area, tuttavia, era rimasta nell'oblio e così aveva bisogno di maggiore esplorazione. Il sistema nervoso enterico necessitava sia di una presa di coscienza sia di relazioni pubbliche. Occorreva la ricerca, non solo per scoprire la verità, ma anche per dissipare l'accettazione diffusa della falsità.

Per me, la ricerca sul sistema nervoso enterico era come il ciclo di vita di una farfalla. Le uova che dovevano dare origine alla neurobiologia enterica furono piantate da Auerbach e Meissner, che, a metà del XIX secolo, dimostrarono che nell'intestino è presente un complesso sistema di gangli. Tali uova incubarono e poi, all'inizio del XX secolo, emerse dall'opera di Bayliss e Starling un sistema nervoso indipendente, l'equivalente di un secondo cervello; essi dimostrarono che l'intestino può manifestare riflessi anche in assenza dell'input nervoso proveniente dal cervello o dal midollo spinale. Come un bruco vivente, il campo consumava voracemente le informazioni e aumentava con i contributi di Trendelenburg e Langley fino a raggiungere il picco con il libro di Langley nel 1921, *Il sistema nervoso autonomo*. Questo libro fu, per la neurobiologia enterica, un bozzolo, il cui involucro aveva nascosto il campo dalla vista per cinquant'anni, anche se le pagine del libro contenevano una chiara definizione del sistema.

Nel 1981, il bozzolo era pronto ad aprirsi. Stava per compiersi una metamorfosi del campo nascosto e trasformato in crisalide della neurobiologia enterica o, per usare il termine coniato da David Wingate e dato a me come un campo cui far da padre, *neurogastroenterologia*. Il sistema nervoso enterico, dimenticato dal tempo della sua definizione nel libro di Langley, era sul punto non solo di essere riscoperto ma anche riaccettato da parte dell'*establishment* scientifico. Le meraviglie della neurotrasmissione erano state assimilate, potenti e nuovi farmaci per manipolare i neurotrasmettitori erano in via di sviluppo e nuovi metodi di ricerca erano a portata di mano. Quindi, alla farfalla stavano per spuntare le ali, sotto forma di un nuovo campo di ricerca, e quell'evento doveva verificarsi a Cincinnati.

3. La svolta

Il mio personale approccio al secondo cervello arrivò in modo lento e indiretto. Inizii con una relazione amorosa, non con l'intestino o con mia moglie Anne, ma con la serotonina. Nel 1958, quando studiavo alla Cornell, durante un corso chiamato «La fisiologia del comportamento» imparai che era probabile che la serotonina fosse un neurotrasmettitore e che i problemi con la serotonina si potevano collegare al nocciolo della schizofrenia e di altre malattie mentali. Decisi di realizzare qualche lavoro sulla serotonina per conto mio appena possibile.

L'opportunità si presentò da sola alla scuola di Medicina, ora non più molto sopra le acque del Cayuga, ma a poca distanza sopra l'East River. A quei tempi, gli studenti di Medicina erano incoraggiati a fare una pausa per fare ricerca, e fu ciò che feci durante le estati e un anno meravigliosamente produttivo. Quando iniziai, non avrei mai sospettato che un neurotrasmettitore incontrato durante un corso di fisiologia mi avrebbe portato all'intestino, ma fu proprio ciò che avvenne.

Prima, un po' di storia

I miei primi esperimenti avevano lo scopo di identificare i siti del corpo in cui si produceva la serotonina. A tal fine, infatti ai topi una forma di precursore chimico immediato della serotonina marcato radioattivamente. Questa molecola ha un nome chimico che sembra uno scioglilingua, *5-hydroxytryptophan*, ma, come succede per gli abitanti degli Stati del sud che non amano i loro nomi propri, il composto è familiarmente noto attraverso le sue iniziali, 5-HTP. Come previsto, i topi ai quali avevo iniettato il 5-HTP radioattivo convertirono rapidamente le molecole iniettate in serotonina marcata radioattivamente che potevo facilmente rilevare e quantificare. L'individuazione della serotonina marcata, tuttavia, si rivelò alquanto più difficile, perché non restava nei paraggi a lungo. Per cui, avevo bisogno di sviluppare un metodo per far restare sul posto la serotonina radioattiva in modo che potessi trovarla.

La serotonina viene degradata naturalmente nel corpo a una velocità relativamente rapida. Perché la serotonina possa funzionare, questo è il massimo; dentro e fuori a tutta velocità e nessun accumulo. Per me, nei miei sforzi per tentare di scoprire, ed effettivamente visualizzare, i siti in cui si trovava la serotonina radioattiva, la velocità elevata di degradazione era controproducente. Era anche costoso, perché nessuno regala le sostanze chimiche radioattive. Avevo bisogno di conservare intatta la serotonina radioattiva, in modo da poter individuare i siti in cui il 5-HTP marcato radioattivamente che avevo iniettato si convertiva in serotonina marcata. Pensai di poterlo fare iniettando ai topi anche un farmaco che impedisse la degradazione della serotonina.

Fortunatamente per me, era stato di recente presentato un farmaco per il trattamento della depressione clinica che produceva esattamente questa azione. La serotonina viene degradata nel corpo principalmente per opera di un enzima dal lungo nome obbligatorio di *monoaminossidasi*. I farmaci che inibiscono questo enzima, che sono classificati, abbastanza naturalmente, come *inibitori della monoaminossidasi*, tendono a conservare la serotonina e a farla accumulare all'interno delle cellule che la producono. Il primo degli inibitori della *monoaminossidasi* a essere usato a livello clinico, un farmaco chiamato *iproniazide*, fu preso inizialmente in prova come agente per il trattamento della tubercolosi. Sebbene l'iproniazide non fosse così efficace contro la tubercolosi come il suo parente, l'*isoniazide*, i ricercatori clinici che studiavano l'iproniazide osservarono inaspettatamente che molti dei pazienti malati e depressi cui veniva somministrato il farmaco smettevano di essere depressi, anche se l'iproniazide non riusciva a curare la tubercolosi. Sulla base di tali osservazioni, l'iproniazide fu scartato come agente antitubercolare, ma testato per vedere se avrebbe funzionato come antidepressivo. L'iproniazide superò quella prova e sebbene il rischio di somministrarlo (ogni tanto, e senza alcun motivo logico, distruggeva il fegato di pazienti sfortunati) alla fine ne abbia provocato il ritiro dal mercato (per essere sostituito dagli inibitori della monoaminossidasi antidepressivi Marplan, Nardil e Parnate), l'iproniazide si lasciò dietro due grandi eredità. Una era l'idea che i farmaci potevano essere usati davvero in modo efficace per combattere la malattia

mentale, e l'altra era che la serotonina era una sostanza che svolgeva un ruolo fondamentale nella creazione della felicità. Fu lanciata una teoria secondo cui il funzionamento anomalo della serotonina come neurotrasmettitore nel cervello provocava la depressione. Tale teoria è tuttora in voga.

Ma ciò che io trovavo interessante negli inibitori della monoaminossidasi non era la loro capacità di alleviare la depressione. Ciò che mi interessava di questi inibitori era che essi potessero consentirmi di realizzare effettivamente gli esperimenti che desideravo fare. Mi resi conto che gli inibitori della monoaminossidasi avevano la capacità di impedire la distruzione della serotonina radioattiva che avevo prodotto, a caro prezzo, nei topi. Quindi, iniettai iproniazide e contemporaneamente 5-HTP radioattivo. Gli inibitori della monoaminossidasi si comportarono come previsto e la serotonina marcata radioattivamente restò intatta abbastanza perché potessi cercarla.

Mentre l'iproniazide si occupava di uno degli ostacoli biologici che si paravano sulla strada dei miei esperimenti, ce n'erano altri. La radioattività è facile da rilevare, ma non basta semplicemente trovare radioattività in un campione per fornire un indizio di quali sostanze siano radioattive in quel campione. L'analisi di materiale radioattivo è un po' come l'analisi dell'uso di una macchina ATM della banca. È facile guardare la riga finale e stabilire quanto denaro sia stato prelevato in un determinato periodo di tempo, ma per scoprire l'identità delle persone che hanno ottenuto il denaro, occorrerebbe accertarsi del codice PIN di ciascun utente e poi decodificarlo per risalire ai nomi. Avevo iniettato 5-HTP radioattivo nei topi, e avevo scoperto serotonina radioattiva, come pensavo sarebbe accaduto, ma avevo ancora bisogno di sapere quali altri composti radioattivi avessero prodotto i topi e come fare a distinguere la serotonina radioattiva da essi. Era ugualmente necessario distinguere la serotonina radioattiva da eventuale 5-HTP radioattivo residuo ancora non convertito in serotonina. Fondamentalmente, mi occorreva un codice PIN molecolare. Dovevo anche trovare un metodo per rendere stazionaria la serotonina radioattiva mentre ero intento a cercarla. L'inibizione della monoaminossidasi sarebbe stata utile a tal proposito, in quanto avrebbe impedito la formazione di prodotti radioattivi di abbattimento della serotonina. Tuttavia, l'innovazione che rese fattibile il mio esperimento arrivò inaspettata e in modo semplice dai miei studi su come conservare o «fissare» in loco la serotonina radioattiva.

Testavo l'idoneità di una varietà di conservanti o «fissativi» del genere di solito usato per l'esame al microscopio dei tessuti. Sembrava che la formaldeide funzionasse abbastanza. Quando aggiunsi la formaldeide, vi fu un breve attimo durante il quale il deflusso di serotonina radioattiva aumentò, ma poi si arrestò del tutto. Tranne che per il momento di disastro iniziale, questo risultato sarebbe stato perfetto. La formaldeide doveva essere riuscita ad abbinare chimicamente la serotonina radioattiva alla proteina, perché nient'altro che l'incenerimento poteva estrarla. Il breve aumento iniziale di deflusso di serotonina radioattiva, tuttavia, era un inconveniente da impedire. Se si lasciava scorrazzare la serotonina radioattiva in qualsiasi direzione la portasse il movimento molecolare, non ci sarebbe stato motivo di scoprire dove

andasse a fermarsi alla fine. Io volevo sapere dove si produce la serotonina nel corso della vita, non dove il suo moto artefatto la fa arrestare.

Per qualche tempo, fui bloccato dal problema della perdita iniziale di serotonina radioattiva indotta dal fissativo. La soluzione si rivelò essere piacevolmente semplice. Le aldeidi che usavo non erano nella corretta proporzione rispetto ai sali e alle altre molecole dei tessuti e provocavano il rigonfiamento delle cellule. Quando corressi la proporzione dei sali, il deflusso di serotonina radioattiva cessò non appena il tessuto si fissava e, dopo la fissazione, nessun solvente poteva estrarla. Come premio extra, scoprii anche che nessuno degli altri composti radioattivi presenti nei tessuti di animali ai quali era stato iniettato 5-HTP radioattivo erano fissati in modo analogo. Dopo la fissazione, la serotonina era l'unico composto radioattivo rimasto nel tessuto, e avevo le prove che il processo di fissazione non modificava l'ubicazione della serotonina. La formaldeide aveva reso inutile il codice PIN molecolare. Se un'ATM ha solo un utente (in questo caso, la serotonina) non occorre un codice PIN per scoprirne l'identità.

I miei esperimenti successivi, resi possibili dall'iproniazide e dalla fissazione aldeidica, non ebbero complicazioni. In varie fasi dopo l'iniezione di 5-HTP radioattivo (il precursore della serotonina) mi disponevo a stabilire l'ubicazione della serotonina radioattiva nei topi. Il mio obiettivo non era solo di scoprire quale organo o perfino quale strato di un organo contenesse la serotonina marcata, ma di trovare prima le cellule e poi le parti delle cellule (chiamate *organelli*).

Per individuare la serotonina «calda» a questo livello di risoluzione, usavo una tecnica nota come *radioautografia*. Radioautografia è un'altra parola lunga, come molte altre usate dagli scienziati, ma concettualmente la tecnica è molto semplice, e a differenza di molte altre parole lunghe della scienza, la radioautografia è un nome costruito secondo logica. Per identificare l'ubicazione di una sostanza radioattiva mediante radioautografia, occorre ricoprire le sezioni radioattive del tessuto con un'emulsione fotografica e lasciarle al buio per diverse settimane. Nel corso di tale periodo, le particelle subatomiche del decadimento radioattivo bombardano l'emulsione immediatamente sopra le sezioni di tessuto e si forma un'immagine latente. Dopo l'esposizione, si sviluppano le sezioni ricoperte come fossero una pellicola. L'argento viene precipitato nelle regioni dell'immagine latente, proprio come se quest'ultima fosse stata originata dalla luce. Quindi, in pratica, il materiale radioattivo del tessuto si fa una foto. L'immagine è quindi un «autografo radioattivo», abbreviato in radioautografo, e il metodo per realizzare radioautografi si definisce pertanto radioautografia.

Il risultato radioautografico del mio esperimento, che attirò la mia attenzione sull'intestino, fu che ogni volta che iniettavo 5-HTP radioattivo nei topi trovavo serotonina radioattiva nel loro sistema nervoso enterico. Inoltre, cosa altrettanto importante era il fatto che *non* trovavo serotonina radioattiva in alcun altro nervo fuori dal cervello. Ciò dimostrava che i nervi del sistema gastrointestinale hanno un'affinità con la serotonina non condivisa da altri nervi periferici.

Sebbene la mia dimostrazione che i nervi enterici avessero un'affinità esclusiva con la

serotonina non mi desse il diritto di saltare alla conclusione che la serotonina fosse un neurotrasmettitore dell'intestino, sembrava proprio questa la spiegazione più semplice. Memore del detto che recita «quando senti il suono degli zoccoli, non pensare subito alle zebre», realizzai ancora un esperimento per vedere se la serotonina si sarebbe effettivamente comportata come un neurotrasmettitore enterico. Stavolta, stimolai l'attività riflessa dell'intestino per far lavorare i suoi nervi. Il lavoro dei nervi provoca il rilascio dei loro neurotrasmettitori. Com'era prevedibile, quando i nervi dell'intestino dei topi ai quali avevo iniettato 5-HTP radioattivo furono stimolati, rilasciarono serotonina radioattiva.

Gli esperimenti che avevo condotto fino a quel punto mi confortarono e pensai che il mio lavoro potesse sostenere l'esame di chiunque, che presumevo (stupidamente, si scoprì poi) sarebbe stato logico e ragionevole. Pensavo anche che i miei dati sarebbero stati considerati importanti dagli altri neuroscienziati. Preparai un resoconto scritto dei miei risultati in una serie di tre articoli che comparvero in «Science» e sul «Journal of Physiology». La mia ipotesi che la serotonina potesse essere un neurotrasmettitore enterico si basava sulle seguenti informazioni: (a) la serotonina è prodotta e immagazzinata nell'intestino; (b) in seguito alla sua biosintesi dal suo precursore immediato, la serotonina si trova di preferenza nei nervi enterici; (c) tali nervi rilasciano serotonina dietro stimolazione; (d) altri avevano in precedenza dimostrato come la serotonina producesse lo stesso effetto sull'intestino di quello della stimolazione dei nervi enterici. Pertanto, se la serotonina non era un neurotrasmettitore ne era di certo una buona imitazione.

Mia madre non mi ha mai detto che sarebbe stato così

Dal momento che non avevo previsto che la mia ipotesi che la serotonina potesse essere un neurotrasmettitore nell'intestino sarebbe stata vista dal mondo scientifico come oltraggiosa, fui turbato dalla reazione che dovetti in realtà affrontare. Il mio primo impulso fu di solidarietà empatica con quelli fra i miei precursori che si trovarono di fronte all'Inquisizione. Più tardi, quando fece effetto l'anestesia e smisi di sentire dolore, compresi la reazione che avevo involontariamente provocato. Secondo il vangelo scientifico in auge all'epoca, soltanto due trasmettitori, l'acetilcolina e la norepinefrina, si occupavano di tutta la neurotrasmissione che si verificava nel sistema nervoso periferico. Il pensiero che una molecola aggiuntiva potesse essere un neurotrasmettitore periferico era considerato non solo sbagliato ma perverso e immorale. Gli scienziati, più della maggior parte delle persone, ammirano l'ordine e l'ordine che era stato stabilito nel sistema nervoso periferico non ammetteva altri neurotrasmettitori.

Il disordine è così diffuso in natura che quando gli scienziati credono di aver incontrato l'ordine, immediatamente pensano che si sia messa all'opera qualche grande forza per sopraffare gli effetti malvagi della probabilità. Tutti gli scienziati alle prime armi apprendono in Fisica 101, se non è stato loro insegnato prima in Chimica preliminare, che il disordine dell'universo aumenta sempre. Questo disordine in continua escalation si chiama *entropia*. Per superare l'entropia, il Darth Vader della realtà, occorre fare un lavoro serio. Le molecole che si riuniscono per formare il corpo umano non lo farebbero mai così da sole se le si mescolasse semplicemente alla rinfusa. Occorre che si verifichino infinite migliaia di improbabili reazioni chimiche al posto giusto al momento giusto. Chi ha un'inclinazione profondamente religiosa contempla l'assoluta improbabilità di tali eventi e si rivolge a Dio per avere una spiegazione. Tuttavia, gli scienziati hanno rinunciato a tale opzione, anche se, come me, credono in Dio.

Quando noi scienziati vediamo ordine, tendiamo a pensare di aver trovato la realtà biologica. I processi biologici esercitano il genere di lavoro e forniscono l'energia necessari a superare l'entropia. Impongono l'ordine sulle altrimenti riluttanti molecole della vita, facendo in modo che reagiscano l'una all'altra per stabilire la forma che amiamo. Non si poteva accettare alla leggera lo sconvolgimento da parte mia di quell'ordine che la gente pensava fosse stato trovato nel sistema nervoso periferico. La mia idea che la serotonina potesse essere un neurotrasmettitore enterico era incompatibile con il credo ordinato che era stato sostenuto per lungo tempo e perciò era preso molto in considerazione. Nel 1965, l'intero sistema nervoso periferico poteva essere descritto facilmente con un semplice schema:

SISTEMI MOTORI	
Scheletrico (volontario)	Autonomo (involontario)

		<i>Simpatico</i>	<i>Parasimpatico</i>
<i>Trasmettitore finale</i>	Acetilcolina	Norepinefrina	Acetilcolina
<i>Bersagli</i>	Muscoli scheletrici	Ghiandole, vasi sanguigni, cuore e muscoli viscerali	

Bisogna notare che il sistema nervoso autonomo aveva solo due suddivisioni, perché la terza era in ombra. Le due divisioni autonome accettabili, la simpatica e la parasimpatica, erano considerate in continua opposizione reciproca, come il mondo libero e l'impero comunista della storia recente. Esisteva un concetto di magnifico dualismo, due sistemi autonomi, due neurotrasmettitori, sempre in guerra, sempre in opposizione. Per cui, il mio innocente suggerimento che la serotonina fosse un neurotrasmettitore autonomo era sconvolgente. Se avevo ragione io, il dualismo percepito era sbagliato. Ero un eretico, per cui dovevo essere trattato di conseguenza.

Decisi di perseverare. Nel 1965 ero giovane, e anche combattivo e idealista. Confidavo nel fatto che la verità, per come la vedevo io, alla fine avrebbe inevitabilmente vinto. Perfino i più ortodossi dei miei detrattori, credevo, non potevano impedire ai fatti di emergere per demolire il dogma dei fondamentalisti. Inoltre, a quei tempi i National Institutes of Health erano tolleranti per le idee che si opponevano alla saggezza stabilita. I suoi comitati di valutazione dei pari fornivano finanziamenti perfino per esperimenti la cui riuscita non era garantita in anticipo. Per cui, avevo a disposizione i fondi per portare avanti la questione della serotonina quale neurotrasmettitore enterico.

Potevo procedere, e lo feci, a sottoporre la serotonina a una serie di prove (modellate sui «postulati di Koch», che stabiliscono la causa di una malattia infettiva), accettate praticamente da tutti i neuroscienziati come i criteri che ogni sostanza deve rispettare se vuole essere ammessa nel pantheon dei neurotrasmettitori riconosciuti. Per soddisfare questo equivalente biochimico delle fatiche di Ercole per la serotonina enterica, occorreva provare:

1. che la serotonina è realmente presente nelle terminazioni nervose nei siti in cui avevo ipotizzato che la serotonina potesse essere il neurotrasmettitore;
2. che la serotonina mima esattamente gli effetti del neurotrasmettitore naturale;
3. che la serotonina è realmente rilasciata dietro stimolazione dei nervi che la contengono;
4. che il blocco dell'azione della serotonina (o il consumo della serotonina) elimina gli effetti della stimolazione nervosa;
5. che esiste un meccanismo di inattivazione efficace, in grado di inattivare la risposta dei neuroni alla serotonina una volta realizzata la neurotrasmissione.

Per fortuna, avendo prodotto dati sconvolgenti, ebbi l'opportunità di iniziare a studiare alcune delle azioni dei nervi enterici che usano la serotonina come neurotrasmettitore. Avevo ottenuto una borsa di studio postlaurea per lavorare a Oxford nel 1965 e 1966.

In quegli anni, Oxford era un luogo spettacolare per un giovane americano che volesse imparare a essere uno scienziato. Le tradizioni di cultura erano profondamente radicate e l'atmosfera di apprendimento contagiosa. Dopo aver individuato i siti della biosintesi della serotonina nel sistema nervoso enterico, scoprii il lavoro che Edith Bülbring stava portando avanti a Oxford sull'inizio del riflesso peristaltico. Si trattava dello stesso riflesso su cui Bayliss e Starling avevano condotto ricerche sui cani e che Trendelenburg aveva studiato in anse isolate di intestino di porcellino d'India. Edith aveva pubblicato le prove che ipotizzavano che la serotonina venisse rilasciata all'applicazione di una pressione sulle cellule che delimitano l'intestino e che tale serotonina stimolasse i nervi sensoriali enterici intrinseci ad avviare il riflesso peristaltico. Quando le scrissi, descrivendo le mie osservazioni, fui entusiasta che andassi a lavorare con lei per indagare il ruolo della serotonina nel sistema nervoso enterico.

I National Institutes of Health concordarono nel finanziare il mio training nel laboratorio di Edith. Fui fortunato a poter usufruire del training in quel periodo, prima che lo sciovinismo esagerato interferisse con la buona volontà del nostro governo di consentirci di apprendere dall'esperienza degli stranieri e di trarre vantaggio dai servizi offerti dai laboratori di altri paesi. Mia moglie Anne aveva appena terminato un anno di internato al New York Hospital e anche lei fece richiesta di borsa di studio ai National Institutes of Health per lavorare alla Sir William Dunn School of Pathology di Oxford. Dato che lei doveva eseguire il suo training nel laboratorio in cui era stata scoperta la penicillina, pensammo avesse delle buone possibilità di ottenere il finanziamento. Prevedevamo che le finanze sarebbero state scarse fino a quando non avessimo avuto comunicazioni circa la sua borsa di studio, il che non si sarebbe verificato fino all'autunno, ma con la fiducia della gioventù, scommettemmo sulla sua borsa di studio e partimmo per l'Inghilterra con nostro figlio di tre anni e mezzo.

Il laboratorio di Edith Bülbring nel 1965 era un posto all'avanguardia dove fare ricerca sulla muscolatura liscia gastrointestinale. Edith forniva l'atmosfera, la supervisione e i fondi. Gli altri colleghi di postdottorato fornivano il training pratico. Il laboratorio di Edith era gestito in stile germanico. Entrava violentemente in laboratorio ogni giorno alle dieci e tutti noi stavamo sull'attenti per dire «Buongiorno, Dottor Bülbring». Lei era Edith per tutti, tranne che quando le si rivolgeva la parola; allora, diventava la Professoressa Bülbring o il Dottor Bülbring. Praticamente, stavano quasi tutti sull'attenti. Graeme Campbell, un australiano enorme, non stava sull'attenti davanti a nessuno. Stava seduto al suo banco con i piedi sollevati e una sigaretta in bocca. Sono assolutamente certo che facesse coincidere la sua sigaretta mattutina con l'arrivo di Edith. Lei non sopportava che si fumasse nel laboratorio, perché era convinta che la nicotina danneggiasse le preparazioni. Era sicura che il fumo facesse contrarre l'intestino. Le

imprese di Graeme sortivano sempre l'effetto desiderato. Facevano distrarre Edith. Dopo aver visto Graeme, Edith si sedeva nel suo ufficio e teneva il broncio per almeno mezz'ora. Quando Graeme se ne andò a metà anno, l'intera esistenza di Edith sembrò visibilmente più radiosa. Il mio comportamento, tuttavia, subì un calo, perché Graeme era stato il mio insegnante principale.

Nel laboratorio di Edith seguivo varie linee di ricerca, ciascuna delle quali portò a pubblicazioni importanti. Una ricerca identificava il sito di azione dei nervi simpatici nell'ambito del sistema gastrointestinale. Un'altra caratterizzava gli effetti della tetrodotossina, un veleno prodotto dal pesce palla, che si trova nelle acque al largo delle coste del Giappone, sull'intestino e gli altri organi che contengono muscolatura liscia. La carne del pesce palla (*fugu*) è una prelibatezza molto famosa in Giappone. Tuttavia, occorre essere esperti nel preparare il pesce, o una cena a base di pesce palla può trasformarsi nell'ultima cena. Gli organi che contengono la tossina non devono assolutamente andare a contaminare la carne.

La tetrodotossina blocca la conduzione dei segnali da parte dei neuroni e dei muscoli scheletrici, ma non ha effetti sulla muscolatura liscia. Presa internamente, dunque, la tetrodotossina arresterà la respirazione, che dipende da nervi intatti e muscoli scheletrici intatti. Tuttavia, farmacologicamente, quando la si usa per studiare i tessuti conservati all'esterno del corpo in un bagno per organi termostato, la tetrodotossina, come la muscarina, la nicotina e la tossina botulinica, è uno strumento sperimentale potente. Il meccanismo mediante il quale un farmaco determina una risposta visibile in un organo può essere ambiguo. Per esempio, la muscolatura liscia potrebbe contrarsi, perché il farmaco stimola i nervi, che indirettamente richiamano la risposta osservata, o perché il farmaco ha effetti diretti sul muscolo. La tetrodotossina fa distinzione tra queste due possibilità. La tetrodotossina abolisce gli effetti indiretti mediati dai nervi, mentre lascia immutati quelli dovuti alle azioni dirette dei farmaci sulla muscolatura liscia.

Gli ultimi dei miei studi oxfordiani, e quelli che furono per me di capitale importanza nel dirottare la mia attenzione precipua dalla serotonina al secondo cervello in se stesso, suggerivano che la serotonina è un neurotrasmettitore che stimola un gruppo di neuroni intrinseci nelle pareti dello stomaco del porcellino d'India. Queste cellule particolari, che possono essere attivate anche dalla stimolazione del nervo vago, avevano la capacità di provocare il rilassamento dello stomaco. La tetrodotossina aboliva la risposta rilassante alla serotonina, confermando che essa era dovuta a un'azione della serotonina sui neuroni e non a una risposta diretta della muscolatura liscia dello stomaco. Queste osservazioni mi suggerivano che la serotonina potesse funzionare non nella conversazione diretta tra i nervi e la muscolatura liscia, ma nell'importante chiacchierata che si verifica tra i neuroni. I neuroni specializzati in tale tipo di interventi «fuori luogo» sono detti *interneuroni*.

Gli interneuroni sono cellule che aggiungono strati di complessità e sofisticazione che distinguono il sistema nervoso centrale e quello enterico dai banali gangli periferici che si trovano al di fuori dell'intestino. I nervi dell'intestino non passano solo servilmente i segnali

dai recettori sensoriali ai muscoli, alle ghiandole o ai vasi sanguigni. A causa dei suoi interneuroni, il sistema nervoso enterico può modulare ed elaborare le informazioni ricevute. La serotonina, pensai dunque, in qualità di neurotrasmettitore di un interneurone, potrebbe essere una delle molecole che consentono all'intestino di funzionare da centro di informazioni-elaborazione indipendente. Di fatto, ipotizzai, i farmaci designati a modificare le azioni della serotonina potrebbero essere meravigliosi strumenti per trattare i pazienti il cui intestino funziona male. Mi sembrava fosse di gran lunga più vantaggioso, da un punto di vista terapeutico, tentare di influenzare l'attività degli interneuroni, come i neuroni che contengono serotonina del sistema gastrointestinale, piuttosto che tentare di influenzare i neuroni sensoriali che iniziano i riflessi critici o i neuroni motori che attivano la muscolatura o le ghiandole. Il sistema nervoso intestinale deve acquisire informazioni al fine di lavorare, e deve essere pertanto in grado di agire in base alle informazioni che riceve. L'interferenza con la capacità del sistema nervoso enterico di ricevere informazioni o di inviare segnali ai propri effettori avrebbe potuto probabilmente paralizzare l'intestino, un risultato terapeutico che dubitavo sarebbe stato percepito dai pazienti come gradito.

Cincinnati

Dall'epoca in cui tornai da Oxford fino al 1981, mi dedicai a competizioni di letteratura scientifica con una varietà di colleghi che sembravano dediti a provare che avevo torto. I miei saggi erano sempre seguiti, di rimando, dai loro, che interpretavano i miei dati in modi che non avevo mai pensato fossero possibili. Tuttavia, nel 1981 le cose avevano assunto una forma precisa a Cincinnati.

Io sono un neuroscienziato. Come tale, con la maggior parte dei miei colleghi, ero a Cincinnati nel novembre del 1981 per partecipare al meeting della Society for Neuroscience. Oggi a questo meeting partecipano oltre ventimila scienziati, ma anche nel 1981 tale evento attirò una folla di persone. Le persone ci vanno per scoprire le novità nel campo e per far conoscere il proprio lavoro. Il successo nella scienza non deriva solo dal primeggiare, ma dal farlo in modo tale che colleghi importanti sappiano che avete primeggiato. Leonardo da Vinci, per esempio, produsse disegni precisi dell'anatomia umana prima di Andrea Vesalio, ma Vesalio fece conoscere la propria opera anatomica ai suoi contemporanei, mentre Leonardo non lo fece. Di conseguenza, si pensa che l'anatomia moderna inizi con Vesalio, anche se questi era stato battuto sul tempo da Leonardo.

Vesalio ebbe più del solo stile dalla sua. Applicò prescientemente una grande tecnica, ancora in uso. Egli mise in discussione l'opinione generale. Vesalio confutò le parole di Galeno (medico dell'antica Roma), i cui dogmi erano accettati praticamente da tutti. Aver ragione su tutto è meraviglioso, ma è ancor meglio quando così facendo si dimostra che gli altri hanno torto. Prima di Vesalio, l'insegnamento dell'anatomia implicava, per abitudine, la lettura di Galeno e l'indicazione delle strutture discusse da Galeno, che queste fossero o meno effettivamente lì; sfortunatamente, molte non lo erano.

L'approccio di Vesalio all'anatomia fu radicalmente diverso da quello dei suoi contemporanei. Egli sezionò e descrisse soltanto ciò che poteva effettivamente vedere. Sebbene le pubblicazioni di Vesalio scandalizzassero i suoi contemporanei, per provare che aveva torto, questi dovevano mettersi a sezionare loro stessi. Gli antagonisti di Vesalio non potevano sconfiggerlo, perché non è possibile verificare la presenza di ciò che non esiste, o fare scomparire ciò che esiste. Vesalio così realizzò ciò che qualsiasi scienziato sogna di fare. Provò che l'opinione generale era sbagliata, attirò molta attenzione su di sé nel processo e la sua opera fu riprodotta e confermata indipendentemente da altri (l'essenza del progresso scientifico).

Io non sono certo Vesalio, ma in un modo che all'epoca non avrei mai sospettato, saltò fuori che a Cincinnati avrei seguito proprio i suoi passi. Anch'io avevo ragione, la maggioranza degli altri del mio campo aveva torto, e molti di loro reagivano in modo molto sgradevole a ciò che dicevo. Il meeting della Society for Neuroscience del 1981 era destinato a rappresentare, sia per me sia per il mio campo, la svolta. I miei antagonisti capitolarono.

I meeting della Society for Neuroscience sono un luogo in cui vanno a morire i vecchi concetti e la nuova conoscenza ha una possibilità di combattere per trovare il suo posto nel

canone. Sono un'arena darwiniana dove le teorie si scontrano e solo le più adatte sopravvivono. I fatti presentati per la prima volta a questi meeting possono piombare sull'inconsapevole senza preavviso, come i razzi V2 sul cielo di Londra del 1945. Sfortunatamente, quando si abbatte una teoria, il suo autore può seguirla. Quindi, i neuroscienziati presentano il proprio lavoro ai meeting con il sorriso sulle labbra e le mani sudate.

Un secondo motivo per cui questi meeting possono essere sconvolgenti è il problema della priorità. Dal momento che gli scienziati sono degli osservatori, essi si guadagnano il rispetto notando e riferendo per primi qualcosa di interessante. Nelle principali associazioni scientifiche, così come nel baseball, arrivare secondi è un'opzione perdente. Tuttora, nel migliore dei casi, i meeting mi rendono nervoso, una sensazione che percepisco, sfortunatamente, dal basso verso l'alto. La mia ansia inizia nel colon. Al meeting della Society for Neuroscience del 1981 avevo più motivi del solito per esser ansioso. Mi avevano chiesto di organizzare un «workshop» sul sistema nervoso enterico, la rete intrinseca di neuroni e fibre dell'intestino. Avrebbe dovuto farmi piacere. Il sistema nervoso enterico era a quei tempi il centro del mio universo. Solo mia moglie e i miei figli erano (e lo sono ancora) più importanti per me. Visto il modo in cui il campo era stato ignorato, tuttavia, il fatto che il «workshop» fosse addirittura in programma indicava che era arrivata la mia materia. Questo meeting poteva essere un'epifania, la svolta finale del mio tarlo.

Tuttavia, ero diventato polemico. Erano le *mie* teorie che stavano per combattere la lotta darwiniana a quel meeting. Pensavo di aver ragione, ma, come sento di continuo negli spot pubblicitari per la lotteria dello Stato di New York: «Hey, non si sa mai». Gli scienziati, incluso me, non creano i nostri risultati. Dai tempi di Vesalio, quell'approccio è stato fuori moda. «Creativo» non è una parola che noi scienziati vogliamo sia applicata ai nostri dati. Perfino «ingegnoso» è accettabile solo se si riferisce ai nostri metodi. Le nostre osservazioni effettive, i nostri risultati reali, non sono né creativi né ingegnosi. Sono quel che sono, descrizioni fattuali di ciò che è, senza fronzoli e senza abbellimenti.

Sebbene le mie teorie fossero in stato di assedio, avevo deciso, nonostante tutto, di correre dei rischi. Se doveva esserci un'epifania, doveva essere una di quelle buone. Avevo dato il mio assenso a organizzare il workshop e lo avevo pianificato come un duello: due di noi, io e un collega, Jackie Wood, a combattere per ciò che pensavo fosse giusto; e gli altri due, Marcello Costa e Alan North, contro di noi. Idealisticamente, era la cosa giusta da fare. Lasciare che le idee si scontrassero e la verità trionfasse. Nove mesi prima mi era sembrato ovvio. Ora che lo scontro stava per avvenire, tuttavia, avevo molta paura e sarei stato molto felice di essere in un posto diverso da Cincinnati.

Avevo previsto il workshop imminente sul sistema nervoso enterico come un evento da prima apparizione, una sala dei debuttanti neuroscienziati, che presentava un nuovo interessante argomento alla società raffinata. La questione principale che ci apprestavamo a discutere, comunque, non era la natura del sistema ma l'idea che la serotonina fosse un neurotrasmettitore nel sistema gastrointestinale.

Nel 1981, la serotonina aveva conseguito una lunga lista di precedenti, e praticamente tutti davano per scontato che fosse un neurotrasmettitore molto importante del cervello. Di fatto, il mondo neuroscientifico era paralizzato nel pensare alle possibilità che la conoscenza della serotonina avrebbe aperto per la manipolazione dell'umore e il trattamento delle malattie psichiatriche. Allora, e ancora oggi, la serotonina era una sostanza neurochimica «calda». Anche nel 1981, l'intestino era noto come produttore di quasi tutta la serotonina del corpo. Dato che solo circa l'1% della serotonina del corpo è prodotta nel cervello, è possibile pensare alla produzione del cervello come a un supplemento minore. Se la minuscola quantità di serotonina del cervello poteva essere una fonte di enorme interesse, allora mi sembrava ragionevole che la concentrazione massiccia di serotonina nell'intestino potesse suscitare almeno un guizzo di interesse. Per di più, dato che la serotonina era già considerata un neurotrasmettitore del cervello, sembrava non esservi motivo alcuno perché dovesse sorprendere la gente come inconcepibile che la serotonina potesse essere anche un neurotrasmettitore del sistema nervoso enterico. Inoltre, sono sempre stato attento nel far rilevare che i miei esperimenti erano semplicemente dei suggerimenti e che sarebbe stato necessario un ulteriore lavoro per provare se tali ipotesi fossero o meno corrette. Avendo così scommesso pro e contro e affermando contemporaneamente ciò che pensavo fosse ovvio, ero preparato ai guai.

La conferenza

Nel 1981, l'epoca del meeting di Cincinnati, avevo testato la capacità della serotonina di adempiere a ciascuno dei cinque postulati necessari a riconoscerla come un neurotrasmettitore enterico. Esperimento dopo esperimento, alla serotonina è stato dato modo di fallire, ma non l'ha mai fatto. Sono stati soddisfatti tutti i requisiti. Pertanto, pensavo che fosse giunto il momento di dire al mondo non che la serotonina *potesse essere* un neurotrasmettitore enterico, ma che è l'unico. Il vecchio mito che vi fossero soltanto due sistemi e due neurotrasmettitori finali nel sistema nervoso autonomo era sul punto di svanire dal mondo neurobiologico. Credevo fermamente nelle mie idee e nei risultati dei miei esperimenti. Eppure, era ormai arrivato il momento di agire e lo stavo facendo davanti a un pubblico numeroso e critico.

Molte persone chiudono gli occhi o se li coprono quando sono impaurite, per non vedere ciò che temono. Io non devo farlo. Io posso guardare dritto davanti a me quando ho paura e non vedere nulla. Era questo ciò che facevo mentre mi avvicinavo a Cincinnati. Non vedevo nulla mentre la mia mente vagabondava verso la *dramatis personae* del piccolo dramma documentario che mi apprestavo a mettere in scena.

Conoscevo bene Jackie Wood. Jack è il suo vezzeggiativo; il nome che gli hanno dato i suoi genitori in realtà è Jackie. Jack ha la voce dolce, è garbato e di buon umore. Quando parla in pubblico, tutto giunge semplice e sincero. Jack sembra aperto, semplice e assolutamente privo di complicazioni. Sebbene dia l'impressione di trovarsi di gran lunga più a suo agio in uno stadio di football che in un laboratorio, le cose non sono sempre come appaiono. Ha le stesse pulsioni e ambizioni di noi tutti.

Jack si è sempre interessato di biofisica e delle proprietà elettriche dei neuroni enterici, mentre io mi sono concentrato sulla loro anatomia, chimica e farmacologia. Pertanto, fummo in grado di rafforzarsi reciprocamente senza invadere i rispettivi campi. Avevamo un legame comune che ci univa. Perché ciascuno di noi potesse riuscire come scienziato, avremmo dovuto trasformare il sistema nervoso enterico in una parola di casa (o, in questo caso, di laboratorio). La cooperazione e la collaborazione, piuttosto che la competizione, erano nel nostro interesse. Eravamo camerati, arruolati nello stesso piccolo esercito, a combattere una guerra per il riconoscimento di una disciplina che stavamo creando noi stessi. Ci preoccupava il fatto che la maggior parte dei neuroscienziati non sapesse pressoché nulla di ciò che noi studiavamo e, naturalmente, ci preoccupava ancor di più che alla maggior parte di loro ciò non importasse affatto. Per ciò che riguardava la comunità della neuroscienza del tempo, il sistema nervoso enterico non esisteva. Di fatto, a un precedente meeting della Society for Neuroscience, fui inorridito nello scoprire che i miei saggi erano programmati in una sezione sulla neurofisiologia degli invertebrati. Gli invertebrati sono bestioline morbide e scricchiolanti senza spina dorsale (colonna vertebrale) e privi di sistema nervoso enterico. La mia ricerca era stata condotta sui porcellini d'India che, come gli esseri umani, sono dei vertebrati di prestigio riconosciuto. Il comitato di neuroscienziati che aveva pianificato il programma non sapeva neanche cosa fosse il sistema nervoso enterico; pensavano che il plesso mioenterico appartenesse a un organismo esotico senza spina dorsale.

La mia reazione immediata fu di portare con me al meeting un porcellino d'India, ma ci ripensai perché considerai l'idea poco gentile verso l'animale. Era inoltre inappropriato. Posso anche pensare in modo combattivo, ma raramente agisco in quel modo. Mandai giù il rospo e presentai i miei dati. Tuttavia, capivo che, come Mosé nella terra dei Medi, ero uno straniero in una terra sconosciuta quando parlavo ai neuroscienziati del sistema nervoso enterico. Sarebbe stato ovviamente necessario dire ai neuroscienziati non solo cosa fosse il sistema nervoso enterico, ma anche perché dovessero desiderare farne la conoscenza.

I neuroscienziati, come gruppo, spesso tendono a credere che il corpo intero esista in quanto mero sostegno del cervello. È il cervello a pensare, emozionarsi e ricordare. Il cervello è felice o infelice, soddisfatto o ansioso. La filosofia, la poesia, la fede e la ragione sono tutti prodotti del cervello. I neuroscienziati, ammesso che pensassero al sistema nervoso enterico, lo consideravano quindi un attore cui è affidata una partecina, un supporto secondario in un lavoro

teatrale in cui il cervello era, è e sarà sempre l'attore principale. Naturalmente, ora che anche il sistema nervoso enterico ha ottenuto il riconoscimento di secondo cervello, un numero crescente di neuroscienziati sono disposti a concedergli il secondo posto sul cartellone degli spettacoli. Io e Jack Wood sapevamo entrambi che il sistema nervoso enterico non è così diverso dal cervello. Comprendevamo che il secondo cervello è molto simile al primo. In realtà, è possibile perfino pensare al sistema nervoso enterico come al cervello emigrato al sud.

Jack è un pioniere, uno che appartiene a un minuscolo gruppo di lavoratori intrepidi che hanno dimostrato come fosse possibile ottenere dati utili registrando l'attività elettrica di singoli neuroni enterici. Non che qualcuno dubitasse dell'importanza di questo tipo di misurazione. Ci chiedevamo semplicemente se fosse possibile ottenere questo genere di dati in modo abituale dai neuroni dell'intestino. Fino a poco tempo fa, registrare l'attività elettrica di singoli neuroni enterici significava traforare la membrana superficiale di un'unica cellula con una pipetta in vetro appuntita (micropipetta) piena di soluzione di conduzione, in modo da poter misurare la differenza di potenziale elettrico attraverso la membrana della cellula. Potrebbe sembrare semplice, ma i singoli neuroni enterici sono dei bersagli di piccole dimensioni, sprofondati nella parete intestinale, e dato che il muscolo che li circonda si contrae e si rilassa, i neuroni tendono a spostarsi. Non è semplice centrare dei bersagli minuscoli in movimento nascosti in una parte di tessuto. Per conficcare una pipetta in uno di essi, occorre estrarre i neuroni e visualizzarli nel tessuto vivo, arrestare il movimento dell'intestino senza modificare l'attività dei neuroni e chiunque maneggi la pipetta deve avere una buona mira.

Effettivamente, Jack non era il primo scienziato a infilzare un neurone enterico con un microelettrodo e registrarne l'attività elettrica; ciononostante, egli sistematizzò quell'approccio; ne stabilì l'efficacia; insegnò a molti altri, me compreso, come farlo e rese abituale il suo uso. Jack fu per l'elettrofisiologia del sistema nervoso enterico ciò che Picasso fu per la pittura del XX secolo. Inoltre, Jack non si è arreso a nessuno, e lo ha fatto in un modo semplice e gentile. Mi aspettavo che sarebbe stato un formidabile difensore e una fonte principale di sostegno nell'imminente battaglia di Cincinnati.

Jack Wood ha prodotto osservazioni fondamentali sull'elettricità, che hanno dimostrato che la serotonina era misteriosamente precisa nel mimare gli effetti di uno dei trasmettitori rilasciati dai nervi enterici stimolati. Prima di questo lavoro, esisteva un preoccupante paradosso. Io studiavo gli effetti della serotonina su gruppi numerosi di neuroni, mentre Jack e altri esaminavano le azioni sulle singole cellule. Il mio approccio era all'ingrosso, quello di Jack al dettaglio. Avevo visto gli effetti della serotonina sull'intero gruppo che Jack non aveva visto studiando le singole cellule. Non capivamo perché la serotonina potesse attivare gruppi di neuroni nei miei esperimenti se non stimolava le singole cellule nei suoi. Ci doveva essere qualcosa che non andava. I nuovi dati di Jack risolsero il paradosso. Di fatto, era così entusiasta per le sue osservazioni che aveva fatto un viaggio speciale al mio laboratorio a New York per condividerle con me.

Jack risolse il paradosso introducendo un nuovo metodo sperimentale. Come negli

esperimenti precedenti, aveva infilzato i neuroni enterici con microelettrodi in vetro in preparazioni di intestino isolate. Ciò gli consentì di registrare le risposte elettriche delle cellule infilzate alla stimolazione nervosa e alla serotonina; tuttavia, ora, invece di aggiungere semplicemente serotonina al bagno di tessuto, aveva spruzzato serotonina sui neuroni infilzati da una seconda micropipetta. Questa nuova tecnica si avvicinava al modo in cui una cellula attivata rilascia il proprio neurotrasmettitore. La serotonina emessa rapidamente era in grado di raggiungere le superfici cellulari prima di essere inattivata dal tessuto. I recettori potevano «vedere» la serotonina e attivare una risposta prima di essere desensibilizzati e diventare insensibili. Gli spruzzi di Jack funzionavano, e ora era possibile vedere i neuroni che rispondevano alla serotonina così come previsto dal mio lavoro farmacologico.

Molto più interessante di una semplice conferma alle mie aspettative, la ricerca di Jack dimostrava anche che sia il trasmettitore rilasciato dai nervi enterici stimolati sia l'applicazione di serotonina richiama una risposta *eccitatoria lenta* identica in un tipo specifico di neurone enterico. Dato che io postulavo che la serotonina e il neurotrasmettitore rilasciati naturalmente da determinati neuroni enterici erano la stessa cosa, sarebbe stato terribilmente imbarazzante se le osservazioni di Jack fossero state diverse. Visto che era così, Jack rafforzava molto la mia tesi. Dopo aver visto i suoi dati, discutere contro la serotonina quale neurotrasmettitore diventava un po' come la discussione (trovata in un saggio di scuola superiore notoriamente errato) secondo cui «le commedie di Shakespeare non furono scritte da Shakespeare, ma da un altro uomo con lo stesso nome». Di fatto, la risposta eccitatoria lenta che Jack studiò era insolita perché la resistenza elettrica della membrana neuronica aumentava durante l'evento. Ciò significava che i canali della membrana attraverso i quali potevano passare gli ioni salini si chiudevano. Per i canali ionici della membrana è molto più comune aprirsi durante le risposte eccitatorie dei neuroni. Il fatto che sia la serotonina sia il trasmettitore naturale chiudessero gli stessi canali ionici nelle stesse cellule sembrava quindi particolarmente significativo. Non è probabile che il verificarsi di una tale mimica molecolare sia dovuto soltanto al caso. Pertanto, vi sono solide prove che il trasmettitore naturale sia davvero la serotonina. Per apprendere le basi molecolari di tali modifiche ci vollero altri quindici anni. Tuttavia, alla fine siamo stati in grado di identificare il recettore serotoninico responsabile di esse così come gli eventi molecolari messi in moto dalla stimolazione di questo recettore da parte della serotonina per chiudere i canali ionici durante la risposta ai neuroni.

La chiusura di tali canali ionici nel modo in cui li chiude la serotonina rende il sistema nervoso enterico molto più eccitabile. È molto più probabile che gli impulsi nervosi percorrano lunghe distanze attraverso l'intestino. È quindi possibile attenuare l'irritazione di un intestino irritabile interferendo con l'azione della serotonina su questo recettore particolare. L'aspetto interessante nell'identificare il recettore è che è possibile designare i farmaci per interferire soltanto con questa azione e non con altre, che sono mediate da recettori diversi. Una seconda prospettiva per un farmaco che agisca in questo sito è che esso ridurrebbe soltanto l'irritabilità intestinale, non paralizzerebbe l'intero apparato. La trasmissione mediata dall'acetilcolina e da

altri neurotrasmettitori rimarrebbe immutata.

Quindi, i dati di Jack del 1981 fornivano un elegante complemento ai miei. Fino ad allora, avevo dimostrato chimicamente che la serotonina era presente e sintetizzata dai nervi dell'intestino, che tali nervi rilasciavano serotonina quando li si stimolava, che gli effetti sia della serotonina sia della stimolazione nervosa potevano essere bloccati dall'azione degli antagonisti della serotonina o consumando la serotonina stessa, e che i nervi che rilasciavano serotonina successivamente la inattivavano riportandola indietro (un processo definito *ricaptazione*). Tra noi, quindi, io e Jack Wood avevamo soddisfatto tutti i «postulati» dei neurotrasmettitori. Avrei dovuto aver fiducia del risultato del nostro imminente workshop, ma non era così.

Conoscevo Marcello Costa molto meno bene di quanto non conoscessi Jack Wood. Marcello lavorava allora, e ancora oggi, in Australia, il che significa che non ci incontravamo regolarmente. È un essere umano affascinante. Parla con un accento che non ho mai udito in nessun altro. Se non fosse che Marcello lo fa, avrei pensato fosse impossibile parlare contemporaneamente con gli accenti australiano e italiano. È come se si fossero fusi insieme in un unico individuo un uomo comune e un aristocratico. La combinazione è impressionante per un pubblico americano. Nessuno può resistere; Marcello è totalmente credibile. Pertanto, nel dibattito imminente, mi aspettavo che sarebbe stato un avversario formidabile.

Marcello non era disposto ad accettare la mia proposta che la serotonina potesse essere un neurotrasmettitore enterico. Sembrava pensare che stessi proponendo la poligamia scientifica. Due trasmettitori erano sacri; ad aggiungerne un terzo si sarebbe commesso peccato. Sfortunatamente, questa differenza di opinione era molto importante per lui, fino a rasentare, mi sembrava, un'ossessione. Pressoché tutti i suoi saggi sembravano terminare con la conclusione che io dovessi aver torto. Apprezzavo il fatto che dire che *dovessi aver torto* non era proprio così brutto come dire che *avevo torto*; mi lasciava ancora una scappatoia.

Marcello è un farmacologo che iniziò la sua carriera usando efficacemente i farmaci come strumenti per dipanare i complessi contorcimenti del sistema nervoso enterico. Tuttavia, ai tempi del meeting di Cincinnati del 1981, non si occupava molto di farmacologia. Lui e il suo collega australiano di lunga data, John Furness, erano impegnati a utilizzare ciò che all'epoca era una nuova tecnica, chiamata *immunocitochimica*, per classificare i neuroni enterici secondo il proprio neurotrasmettitore. L'immunocitochimica implica l'uso di anticorpi (prodotti naturali del sistema immunitario) come rilevatori chimici per identificare le molecole in sezioni microscopiche di tessuto. Di conseguenza, Marcello non era più un farmacologo ma un linguista neurobiologico. Per lui, l'immunocitochimica trasformava i microscopi in dizionari in cui era possibile leggere la definizione dei neuroni intestinali.

Marcello e John Furness descrissero il loro obiettivo come l'istituzione di un «codice chimico» che avrebbe consentito la denominazione e l'identificazione di ciascuno dei neuroni del sistema nervoso enterico. Marcello e John possono aver pensato a se stessi come a dei tassonomi, ma io penso che il loro scopo fosse molto più importante. Per me, erano dei crittografi contemporanei, la cui opera era ancor più significativa di quella dei geni che si riunirono a Bletchley nel 1941-1943 per decifrare il «Codice Enigma» usato dall'esercito tedesco. Marcello e John stavano iniziando a decifrare il «Codice Enigma» del sistema nervoso enterico, che era l'unico codice che volessi davvero conoscere. Avevo la netta sensazione che probabilmente avevo apprezzato il lavoro di Marcello notevolmente più di quanto lui non avesse fatto con il mio. Di fatto, io ammiravo davvero ciò che Marcello stava facendo. Se non avessi avuto tanta paura di ciò che si apprestava a dire sul mio conto, non avrei visto l'ora di ascoltare il suo discorso.

Alan North era l'ultima persona che avevo invitato a far parte del workshop. Era alto, scuro e molto bello. Se non altro, il suo aspetto avrebbe compensato il fatto che Jack Wood, Marcello Costa e io eravamo tutti dei piccoletti. Ci serviva qualcuno di alto che facesse impressione. Una combriccola di piccoletti che sponsorizzava una parte esotica del sistema nervoso avrebbe avuto dei problemi a persuadere i neuroscienziati a prestare loro attenzione. Alan è diverso. Lo si nota perfino quando non dice nulla, il che capita spesso. Non gli piace sprecare le parole. Sceglie con molta cura ciò che deve dire e lancia le sue parole come un arciere, mirando con precisione mortale ai bersagli che sono invariabilmente trafitti. È un uomo di vero humor, ma lo nasconde bene. Le parole stesse sono irte dei trilli e dei profondi rimbombi della Gran Bretagna settentrionale. Quando Alan fa un'affermazione, questa sembra essere inoppugnabile. Rinforza le sue parole con una capacità esclusiva di espressioni del viso che comunica il consenso o il disaccordo senza emettere suoni. Il consenso è indicato da un debole accenno di sorriso, mentre il disaccordo è trasmesso principalmente con le sopracciglia, che usa come fossero clave. Si potrebbe definire Alan arcigno, ma anche questo è un termine troppo gioviale; austero o lincoliniano sembra più appropriato.

Come Jack Wood, Alan era un elettrofisiologo che si guadagnava lo stipendio infilzando neuroni intestinali con micropipette in vetro. Il suo lavoro era diverso da quello di Jack nell'enfasi posta da Alan sulle misurazioni fisiche esatte. Il suo lavoro era molto elegante, molto completo e incredibilmente attraente per gli studiosi di fisiologia. Poteva anche non essere stato sempre il primo a fare una particolare osservazione, ma una volta fatta, riferiva la scoperta con una precisione talmente decisiva che nei suoi colleghi scienziati era lui a essere al primo posto. Non scopriva semplicemente i fatti della natura, li stabiliva come verità eterne.

Alan è unico in quanto può essere in disaccordo con qualcuno, per esempio, con me, senza lasciare che il disaccordo rovini un buon rapporto. Gli piacciono le persone e le rispetta anche se pensa che abbiano torto. È un patito del buon lavoro. Nel mio caso, aveva chiaramente deciso che la mia ricerca, anche se poteva essergli sembrata temporaneamente fuorviata, andasse bene. D'altra parte, era convinto, al pari di Marcello, che sulla questione centrale dell'imminente workshop, cioè la serotonina quale neurotrasmettitore enterico, io fossi completamente fuori strada.

All'epoca del meeting di Cincinnati, Alan aveva un programma diverso dal mio. Odiava la serotonina, perché aveva in mente come neurotrasmettitore un'altra molecola, chiamata sostanza P. La sostanza P provocava la stessa risposta eccitatoria lenta nei neuroni enterici della serotonina e del trasmettitore naturale. Anche lì, i canali ionici si chiudevano. Sfortunatamente, Alan non prendeva in considerazione la possibilità che vi fosse più di un neurotrasmettitore che potesse provocare la stessa risposta. Per lui era un gioco a somma zero.

Credeva quindi che, se fosse stata la serotonina il neurotrasmettitore che mediava l'eccitazione lenta, allora non avrebbe potuto esserlo il suo candidato, la sostanza P. Credeva

anche l'opposto, che se la sostanza P fosse stata il trasmettitore, allora non avrebbe potuto esserlo la serotonina. Il pensiero che due diversi neuroni potessero ciascuno provocare una risposta eccitatoria lenta, uno rilasciando serotonina e l'altro secernendo la sostanza P, per Alan non era accettabile. A lui piaceva l'ordine. Se ci doveva essere una risposta eccitatoria lenta, allora doveva esserci un solo trasmettitore responsabile di essa. Per quanto ne sapevo, non aveva prove contro la serotonina, semplicemente interpretava quelle fra le sue osservazioni che erano compatibili con la sostanza P come incompatibili con la serotonina. Naturalmente, l'epilogo fu che sia la sostanza P sia la serotonina sono neurotrasmettitori. La serotonina fa le lunghe distanze; la sostanza P lavora a livello locale.

Credevo di poter trattare con la logica di Alan se i miei dati fossero riusciti a tener testa al suo raggelante scrutinio. Tuttavia, mentre mi avvicinavo al mio hotel di Cincinnati, pensai alle sopracciglia minacciose di Alan e rabbrivii. L'indomani avrebbe potuto essere una brutta giornata.

Alla fine, il taxi arrivò al mio hotel. Sfortunatamente, la mia camera non era pronta e non lo sarebbe stata per almeno quattro ore. A questo punto, scoprii ancora una volta il genere di effetto che il cervello della testa poteva avere sul secondo cervello. Avevo bruciore di stomaco, questo iniziò a rispondere e il colon si irrigidì. Un fattorino servizievole suggerì di lasciare in consegna i bagagli e andare allo zoo. In quello zoo c'era una tigre siberiana bianca. Mi immedesimai con quell'animale, perché la sua immagine andava chiaramente controcorrente rispetto allo stile della tigre. Essere bianco se si è una tigre sembrava come proporre la serotonina parlando di neurotrasmettitori periferici. Così, io e la tigre dividevamo un legame. Tutti e due, ciascuno a proprio modo, eravamo separati dai nostri colleghi.

Stavo osservando teneramente la tigre quando udii una voce vigorosa e raffinata chiedere: «Non ti sei ancora svegliato?». Mi girai, ma sapevo chi fosse ancor prima di vederlo. Doveva essere Mike Bennett, un eminente neuroscienziato dell'Albert Einstein College of Medicine del Bronx. Tre anni prima, mi ero addormentato mentre si proiettavano le sue diapositive durante un seminario da lui tenuto nel mio dipartimento alla Columbia. Mike è molto buono, e mi perdonò il sonnellino; comunque, non faceva neanche niente per farmi scordare l'incidente. Una richiesta di informazioni sul mio stato di vigilanza era diventato il suo saluto standard. Era a Cincinnati per la conferenza e stava facendo jogging quando si era perso nello zoo. Mi aveva notato contemplare la tigre e aveva deciso di fare una chiacchierata. Voleva solo farmi sapere che aveva notato il mio workshop sul programma e che non vedeva l'ora di parteciparvi. Come al solito, era gentile, ma nell'esserlo mi fece sentire peggio. Se qualcuno i cui interessi erano lontani dall'intestino quanto quelli di Mike Bennett era lì, allora ci sarebbe stata anche un sacco di altra gente. Il workshop era destinato ad avere un pubblico. Quindi, se fosse stato per me un fallimento, sarebbe stato un fallimento pubblico.

Di nuovo, sentii dei messaggi provenire dalla parte superiore e dalla parte inferiore della pancia. Potevo anche essere stato pronto a dare decisamente tutto me stesso per il secondo cervello, ma il mio sistema nervoso enterico non intendeva fare lo stesso per me. Invece, sembrava fare tutto ciò che poteva a me.

4. Il workshop

La sala della conferenza in cui si tenevano i meeting era grande e priva di attrattiva, come sono di solito questi centri. I dollari risparmiati attraverso l'omissione parsimoniosa dei dettagli strutturalmente inutili ma esteticamente attraenti si notavano benissimo. Nella parte frontale, il vetro faceva bella mostra di sé, rivelando alla strada la vista di un corridoio che sembrava essere stato progettato a esemplificazione della schiacciante depersonalizzazione dell'era industriale. Dietro il corridoio, le desolate stanze del meeting erano prive di finestre, con pochi ornamenti, e facevano abbondante uso di cemento. La stanza assegnata al nostro workshop era particolarmente grande e solo parzialmente occupata da una disposizione di circa duecento sedie pieghevoli. Tra le sedie e le porte restava un ampio spazio vuoto, e le porte si aprivano sulla sinistra del pubblico. Lo spazio vuoto sembrava essere lì apposta per mettere a disagio i ritardatari, poiché non forniva alcun riparo e li metteva al centro dell'attenzione mentre attraversavano la stanza per raggiungere i loro posti. Tutti i ritardatari sembravano farsi piccoli piccoli, tentando di non dare nell'occhio mentre i loro timidi passi risuonavano rumorosamente sul pavimento duro.

Di fronte alle sedie, vi era un grande palco in legno con un podio e un tavolo pieghevole coperto da un telo, dietro il quale erano stati allestiti i posti destinati ai partecipanti. I fili per il sistema di amplificazione si allungavano dai microfoni sul podio e sul tavolo, come i tentacoli di una piovra alimentata dal basso. La stanza mancava di attrattiva, ma man mano che le sedie venivano occupate iniziò ad acquisire l'atmosfera vivace di un'arena. Il pubblico sembrava essere più animato del solito. Immaginai che ci si aspettasse di vedere scorrere il sangue.

Non ricordo come entrai nella sala delle conferenze. Quando tento ora di riportare l'evento alla memoria, mi vengono in mente soltanto la stanza del meeting, lo scenario da Colosseo e la sensazione di assenza di salivazione. È come se la faccenda non avesse inizio, ma fosse stata creata da un vuoto celeste nel bel mezzo di Cincinnati. I ricordi producono effetti curiosi quando sono registrati sotto pressione. Quando tento ora di riportare alla mente il workshop, mi vedo seduto sul palco nell'attesa nervosa che i miei colleghi si radunino e scocchi l'ora di iniziare. Nel mio quadro mentale, si staglia prominente Hirsch Gershenfeld, un eminente fisiologo che avevo incontrato e con cui avevo stretto amicizia, anni prima, durante il mio postdottorato in Inghilterra. Hirsch sedeva in prima fila e sembrava un oracolo. Dal momento che stavamo aspettando l'inizio del workshop, mi fece cenno di scendere a fare due chiacchiere.

Ero molto sorpreso di vedere Hirsch alla nostra sessione e glielo dissi. Lavorava sul sistema nervoso dell'*Aplysia*, un repellente organismo marino altrimenti noto come lumaca di mare. Tuttavia, ciò che manca loro in bellezza, queste bestioline lo guadagnano dal lato della facilità

con cui si accede al loro sistema nervoso. I neuroni dell'*Aplysia* sono talmente grandi, identificabili e riproducibili nella loro collocazione in animali diversi che le singole cellule hanno perfino un nome. A me, il sistema nervoso enterico e i gangli della lumaca di mare sembravano così dissimili che non mi sarei aspettato che la gente che si dedicava all'*Aplysia* partecipasse al nostro workshop. Quando lo comunicai a Hirsch, mi rispose dicendomi che non era sicuro che i due sistemi nervosi fossero così privi di correlazione come io pensavo. Dopotutto, l'apparato intestinale era alquanto primitivo. Egli sospettava che il sistema nervoso enterico potesse essere un residuo dei nostri avi invertebrati non eliminato dall'evoluzione, ma rimasto al nostro interno. Avanzò l'idea che il sistema nervoso enterico fosse un riflesso vertebrato del relativamente semplice sistema nervoso invertebrato. Inoltre, mi ricordò che lui era un «serotoninofilo». Hirsch fu forse la prima persona a dimostrare che non vi era un unico recettore sui neuroni per la serotonina, che era stata l'ipotesi prevalente, ma moli. «In ogni caso» disse con un sogghigno «mi piacciono le belle battaglie». Dopo di ciò, lo salutai con un sorrisino forzato e tornai al palco degli oratori. Hirsch era il benvenuto, ma il suo amore per le buone battaglie non altrettanto.

Mentre aspettavo di iniziare, pensavo ai suoi commenti. Le sue idee erano sofisticate, e se non avessi conosciuto la lunga storia della ricerca sul sistema nervoso enterico, le avrei trovate attraenti. Tuttavia, conoscevo questa storia, e quindi mi resi conto che Hirsch non poteva aver ragione. Il sistema nervoso enterico non era un semplice residuo di un passato invertebrato. Se mai, era un cervello vertebrato spostatosi al sud. Il sistema nervoso enterico aveva molto di più in comune con il cervello della testa che con un ganglio di un'*Aplysia*.

La mia conversazione con Hirsch dimostrava ancora una volta quanto il sistema nervoso enterico fosse alieno perfino ai più preparati neuroscienziati. Questo era ormai il secondo meeting della Society for Neuroscience in cui ciò che dovevo dire sul sistema nervoso enterico era collegato, quantunque ora con un certo grado di intenzionalità, agli invertebrati. Decisi di scartare i commenti che avevo preparato per le mie note introduttive e di raccontare invece la storia della scoperta del sistema nervoso enterico. Tuttavia, scartare un discorso preparato a due minuti dall'inizio era un po' un problema. Per fortuna, avevo scritto in precedenza un capitolo per un libro in onore della mia sponsor di postdottorato Edith Bülbring, che delineava la storia della ricerca sui neurotrasmettitori e il sistema nervoso autonomo ed enterico. Quel capitolo mi forniva le informazioni che mi servivano. Ora, dovevo solo usarlo e comporre un discorso, e rapidamente.

Il workshop iniziò. Dato che ero io a organizzarlo, presentai uno a uno gli oratori. Avevo stabilito uno spazio per una «Introduzione al sistema nervoso enterico», che stavo per dare. Si trattava dell'«Introduzione» che avevo appena deciso di modificare ed era ormai ora di iniziare a parlare. La mia pancia brontolava, il che suppongo fosse ironico, considerando l'argomento del workshop, ma l'intervento intestinale fuori luogo era un brutto segno per il mio morale. Inoltre, avevo i palmi delle mani sudati e riuscivo a percepire il battito del mio cuore. Effettivamente, dubito che ci fosse mai stata un'occasione della mia vita in cui mi sia sentito peggio. Tuttavia,

appena iniziai a parlare, le pagine del mio capitolo del libro per Edith Bülbring mi tornarono davanti agli occhi. In rare occasioni, quando sono sotto uno stress particolare, visualizzo nella testa le immagini delle pagine scritte. Le vedevo davvero e riuscivo letteralmente a leggerle. Il resto fu semplice. Lessi semplicemente le parole, non letteralmente, ma in modo colloquiale, così che non sembrasse innaturale. Il mio discorso fu di gran lunga meglio organizzato del solito e con molta economia di parole. È quello che succede con un testo scritto a disposizione, anche se lo scritto esiste soltanto nella testa.

Man mano che passavano la «legge dell'intestino», il «meccanismo nervoso locale» del sistema intestinale, il riflesso peristaltico in un segmento intestinale isolato, e le definizioni di Langley, potevo vedere che il pubblico era con me. Avevo sperato di colpirli con «vecchie notizie» ed era chiaro che lo stavo facendo. Questo pubblico era chiaramente pronto ad accettare che il sistema nervoso enterico non fosse affatto ciò che essi pensavano che fosse, e ritenni che sarebbero stati anche disposti ad accettare la serotonina, se potevo presentare un caso convincente. Mentre mi voltavo per presentare gli oratori, potevo sentire il mio colon che iniziava a rilassarsi. Dopotutto, forse era possibile superare questa giornata.

Il discorso di Jack

Jack Wood era il nostro primo oratore. Jack parlò nel suo solito stile naturale. Era chiaro, semplice e diretto. Mi ricordava moltissimo un cowboy che cavalcava a ovest per annunciare un rodeo enterico. Le varie cellule del sistema nervoso enterico potevano essere tori dai nomi esotici le cui caratteristiche erano di natura elettrica. Ero un po' preoccupato che il pubblico lo trovasse accondiscendente. La semplicità è bella, ma si può esagerare. Questo non era un gruppo al quale ci si potesse mostrare accondiscendenti e sperare di sopravvivere con le credenziali intatte. Tuttavia, i neuroscienziati presenti nella sala sembravano gradire ciò che Jack diceva e, per di più, il suo modo di farlo. Notai cenni di assenso e sorrisi nel pubblico. I dati erano solidi e le prove convincenti. Inoltre, egli rendeva tutto semplice da comprendere e il pubblico apprezzò il suo sforzo.

Sebbene il pubblico avesse ovviamente una conoscenza approfondita del sistema nervoso nel suo complesso, il sistema nervoso enterico era per loro una novità, così come avevo pensato che sarebbe stato. Quindi, le cellule avevano nomi e proprietà poco familiari. Jack rese garbata l'introduzione. Dato che è di gran lunga più comune per gli scienziati rendere le loro introduzioni complesse e brutali invece che semplici e garbate, la sua presentazione fu percepita come memorabile. Quando ebbe terminato, il pubblico non aveva problemi non solo nel ricordare i nomi delle cellule, ma nell'usare la terminologia. Ciò era evidente dalle domande rivolte a Jack durante la discussione. Persone che non avevano mai prima di allora preso in considerazione che potesse esserci qualcosa di interessante al di fuori del cranio sembravano trovarsi altrettanto a loro agio con i «neuroni AH/tipo II» (il termine usato per uno dei neuroni dell'apparato intestinale) che se fossero stati a un ritrovo con i loro compagni di classe del college.

Jack prima condusse i neuroscienziati attraverso gli arcani dettagli necessari alla comprensione da parte loro delle modalità di funzionamento del sistema nervoso enterico. Per farlo, presentò un «Who's Who» dell'intestino, descrivendo i neuroni e denominandoli. Presto, tuttavia, si spostò dal ritratto passivo dei giocatori ai propri esperimenti sui neuroni in azione. Raccontò al pubblico come avesse dissezionato l'intestino, in modo da poter effettivamente vedere i neuroni e i gangli nel tessuto vivo. Poi spiegò il suo abile uso di minuscoli «piedini di pressione» ricavati da fili in platino piegati, per mantenere il muscolo fermo in modo da potere infilzare i neuroni con micropipette in vetro appuntite. Questo fu lo stratagemma che consentì a Jack di riuscire dove molti altri avevano fallito prima di lui. A loro volta, i microelettrodi registravano gli eventi elettrici che si verificavano quando i neuroni erano perturbati dalla neurotrasmissione.

Quando Jack stimolava un fascio di fibre nervose che entrava nel ganglio contenente il neurone che aveva infilzato, i microelettrodi di solito rivelavano lo stato di eccitazione della cellula. L'inizio e la durata della risposta eccitatoria, tuttavia, variava di molto. Dato che eventi del tipo registrato da Jack sono le modifiche reali del potenziale elettrico provocate dalle

connessioni (o sinapsi) dei nervi stimolati con i neuroni infilzati, le risposte si chiamano *potenziali postsinaptici eccitatori* (o EPSP). Alcuni EPSP, che Jack chiamò «EPSP veloci», iniziavano quasi immediatamente dopo la stimolazione delle fibre nervose, ma erano estremamente fugaci. Un altro tipo di risposta eccitatoria, che Jack chiamò un «EPSP lento», non iniziava affatto se non dopo il termine dell'EPSP veloce. Comunque, l'EPSP lento durava oltre un minuto, che per un neurone è un tempo molto lungo, quasi un'eternità.

I nervi eccitatori nei gangli enterici erano, perciò, sorprendentemente evasivi nel modo in cui diffondevano i messaggi ai loro bersagli postsinaptici. Essi comunicano come i politici che parlano alla stampa. D'altro canto, i neuroni postsinaptici non sono dissimili a reporter in azione. Entrambi registrano e diffondono ciò che si dice loro. Le prime parole che dicono i neuroni eccitatori, cioè gli EPSP lenti, sono come i comunicati ufficiali prodotti solitamente da un politico, succinti e senza informazioni particolarmente importanti. Le parti successive del messaggio, gli EPSP veloci, sono fornite dai politici sotto forma di indiscrezioni. Le informazioni sono rivelate lentamente, continuano a fuoriuscire per un periodo atrocemente lungo e rendono irritabili i destinatari delle informazioni stesse, la stampa. Gli EPSP lenti possono anche non dire ai propri bersagli cosa fare in termini così diretti e inconfondibili come gli EPSP veloci, ma sono tuttavia un mezzo potente per comunicare.

Jack riferì che gli EPSP veloci erano sempre soppressi da uno qualsiasi degli antagonisti, incluso il curaro (e un composto sintetico chiamato *esametonio*), che bloccano l'azione dell'acetilcolina nei recettori nicotinici. L'EPSP veloce era inoltre identico alle risposte delle stesse cellule all'acetilcolina e alla nicotina. I gangli enterici, come quelli di altre parti del sistema nervoso autonomo, contengono pertanto l'onnipresente recettore nicotinico.

A differenza degli EPSP veloci, gli EPSP lenti persistevano immutati, nonostante l'applicazione di curaro o di qualche altro antagonista nicotinico. Gli EPSP lenti erano mimati fedelmente non dagli effetti nicotinici dell'acetilcolina, ma dalla serotonina. Jack definì la risposta alla serotonina molto dettagliatamente, sottolineando quanto esattamente assomigliasse a un EPSP lento. Le sue osservazioni lo condussero a postulare che la trasmissione veloce tra neuroni enterici fosse territorio dell'acetilcolina e dei suoi recettori nicotinici, mentre la trasmissione lenta appartenesse alla serotonina. Come Alan North, Jack giocava un gioco a somma zero. Nel suo caso, tuttavia, il vincitore era la serotonina, non la sostanza P. In modo ironico, come risultò poi, avevano ragione tutti. Era il gioco a somma zero ad aver torto. Tutte queste sostanze svolgevano un ruolo (e il trasmettitore simpatico, la norepinefrina, non era implicata affatto in tali eventi).

Ciò che Jack doveva ancora agganciare alla sua argomentazione era qualcosa che all'epoca non aveva ancora: un buon antagonista che interferisse con le azioni della serotonina sui neuroni enterici. Un tale farmaco avrebbe fornito una prova esplicita dell'ipotesi della serotonina. Ci si aspettava che un farmaco che eliminava la risposta lenta alla serotonina avrebbe fatto lo stesso per gli EPSP lenti. Se lo avesse fatto, l'ipotesi avrebbe trovato conferma. In caso contrario, la si poteva scartare. Sfortunatamente, nessuno degli antagonisti delle azioni della serotonina

all'epoca noti in altri siti (i classici antagonisti della serotonina) funzionavano in questo. Avremmo scoperto in seguito gli antagonisti che servivano a Jack, e di fatto essi avrebbero confermato le sue idee, ma questa è un'altra storia. In questo workshop, Jack concluse che i recettori serotoninici sui neuroni enterici devono essere diversi da qualsiasi altro di cui fosse nota l'esistenza all'epoca. Nonostante la mancanza di un antagonista idoneo, Jack decise che quando le sue informazioni si fossero aggiunte a ciò che avevo pubblicato io in precedenza, il caso della serotonina come neurotrasmettitore che poteva provocare EPSP lenti sarebbe stato convincente.

Il discorso di Jack fu accolto bene. Tutte le domande rivelavano un favorevole interesse. Hirsch Gershenfeld, in particolare, commentò su come le risposte alla serotonina dei neuroni enterici fossero analoghe a quelle dell'*Aplysia*, specialmente rispetto all'apparentemente natura esclusiva dei recettori serotoninici. Hirsch richiamò l'attenzione sul fatto che anche lui aveva scoperto che esistevano forme multiple di recettori serotoninici nell'*Aplysia* e che alcuni di essi erano anche resistenti al blocco da parte degli antagonisti classici della serotonina. Era evidente che i farmaci attuali erano inadeguati a trattare il sistema. La ricerca sulla serotonina, suggerì, doveva rivelarsi molto più complicata di quanto tutti noi sospettassimo. Questo commento fu abbastanza preveggente. Il fatto che vi fossero molti tipi di recettori serotoninici è un'idea moderna che, all'epoca, non fu apprezzata (ma che ora occupa una gran quantità dei miei risvegli). A quei tempi, l'armamentario dei cosiddetti «antagonisti serotoninici» era molto ridotto e limitato principalmente ai composti che bloccavano la contrazione indotta dalla serotonina nell'utero del ratto, che, per quanto esotica, era il dosaggio biologico della serotonina allora preferito. La possibilità che i recettori serotoninici sui neuroni enterici potessero essere diversi da quelli dell'utero del ratto non era ancora balenata nelle menti di molte persone. Chiaramente, il primo passo di qualsiasi scoperta di qualcosa di nuovo consiste nel pensarci.

Il mio turno

Il mio discorso scientifico seguì quello di Jack. Avevo organizzato il workshop in modo che io e lui potessimo presentare il caso della serotonina come neurotrasmettitore del sistema intestinale, dopo di che Marcello e Alan avrebbero avuto la possibilità di tentare di confutare questa affermazione. Negli inebrianti giorni della programmazione della conferenza, avevo l'idea che una volta esposte le nostre prove, in nessun modo qualcuno potesse dubitarne. Avevo la salda convinzione che andare avanti per primi avrebbe reso molto difficile, se non impossibile, attaccare il nostro caso. Jack mi aveva fornito un'occasione grandiosa. Avevo un pubblico ben disposto e, pensavo, pronto a mettere temporaneamente da parte le proprie idee.

Gracchiai un focolo «Grazie» a Jack mentre mi porgeva il microfono portatile e mi aiutava a fissarlo sul risvolto della giacca. Ormai l'ansia mi aveva reso la bocca secca e l'intestino scellerato. Per mia fortuna, Jack era percettivo. Anni di osservazione scientifica avevano avuto un effetto positivo sulla sua vita quotidiana. Notò la voce roca, e mentre iniziavo a parlare, andò con calma nel retro della stanza, riempì un bicchiere d'acqua e me lo portò. Non ricordo cosa dissi prima che arrivasse l'acqua, ma ricordo l'estasi che accompagnò il primo sorso. Ero ora in grado di parlare, ma l'attacco di panico non era diminuito e semplicemente dimenticai ciò che avevo pensato di dire. Ero davvero senza parole. Non sapendo cos'altro fare in un caso simile, chiesi la prima diapositiva. Furono letteralmente le sole parole che fossi in grado di pronunciare. Per fortuna, furono anche sufficienti. Potevo anche aver perso la capacità di pensare, ma almeno sapevo ancora leggere. Le luci si abbassarono e la diapositiva comparve sullo schermo. Deve essere sembrato sciocco leggere ad alta voce, parola per parola, la legenda proiettata sullo schermo. Forse il pubblico pensò che lo stessi facendo per ottenere un effetto teatrale. Comunque, qualsiasi cosa pensassero, le parole furono sufficienti. Gradualmente, man mano che leggevo la legenda, il panico veniva meno e la mente mi si schiariva. Riconquistai la capacità di pensare razionalmente.

Marcello tossì. Era seduto sul podio e mi osservava da dietro, quindi era perfettamente nel mio campo visivo mentre leggevo la diapositiva. Sogghignava. Non riuscivo a crederci. Jack Wood aveva appena finito di insinuare che quello che lui aveva sostenuto nei dieci anni precedenti era sbagliato, e io mi apprestavo a farlo di nuovo. Quindi, cosa aveva da ridere? Guardai verso Alan North. La sua espressione era convenientemente amara. Marcello, comunque, si stava chiaramente divertendo. C'era qualcosa di nuovo. Ero sul punto di andare di nuovo nel panico, quando mi strizzò l'occhio in modo chiaro. Ripensandoci, ora mi rendo conto che Marcello, che è un essere umano molto gentile, aveva riconosciuto il mio turbamento e mi stava inviando un segnale perché mi rilassassi. In quel momento, tuttavia, non capii il significato della strizzatina d'occhi. Invece che interpretarla in modo amichevole, la lessi come segno di disprezzo. Ciò mi fece andare in collera, e la cosa mi fu di aiuto. Da allora in avanti, più che parlare, emisi dei ruggiti. Ero diventato vivo. Se avessi potuto, avrei concluso ciascun punto con: «Beccati questo, dannazione!».

Il piano del mio discorso, che la mia lingua sciolta dall'acqua era ora in grado di presentare, era di elencare i criteri necessari all'identificazione di un neurotrasmettitore e mostrare come la serotonina nel sistema nervoso enterico li rispettasse tutti. Era come se stessi descrivendo un rito di passaggio in cui un'adolescente di nome Serotonina dovesse superare una serie di ostacoli al fine di ottenere l'accettazione nel mondo degli adulti come neurotrasmettitore maturo. La mia prima diapositiva era una lista di criteri, le prove che doveva superare la serotonina. Le diapositive successive mostravano le fatiche della serotonina sotto forma di esperimenti che dimostravano la conclusione riuscita di ciascuna prova. La serotonina era presente nei nervi enterici, veniva rilasciata quando questi ultimi erano stimolati, mimava gli effetti di un trasmettitore naturale e bloccando l'azione della serotonina si contrastavano gli effetti della stimolazione nervosa. Inoltre, la serotonina era sintetizzata nella parete intestinale e i nervi enterici possedevano un mezzo per inattivarla dopo che essa stimolava i propri recettori. Per quanto mi riguardava, QED.

Mia zia Ruth, che era un'insegnante di matematica, mi insegnò a scrivere QED (*quod erat demonstrandum*) dopo ogni teorema di cui dimostravo l'esattezza in geometria alla scuola secondaria. Da allora, mi vengono in mente le iniziali QED ogni volta che concludo ciò che considero un'argomentazione riuscita. Tuttavia, la mia argomentazione per la serotonina non era esattamente la stessa della prova euclidea di un teorema geometrico. La biologia non è mai così precisa. Ci sono molti punti deboli, e in questo caso sapevo quali fossero alcuni di essi. Uno dei più evidenti, che pensavo Marcello avrebbe sfruttato, era l'apparentemente semplice dimostrazione che i neuroni enterici contenessero effettivamente serotonina. Sebbene vi fosse la prova biochimica solida che la serotonina è presente nello strato di parete intestinale che contiene il sistema nervoso enterico, la prova microscopica che tale serotonina si trova realmente nei neuroni era meno definitiva.

Marcello e John Furness in precedenza non avevano accettato la mia visualizzazione radioautografica della serotonina radioattiva nei neuroni enterici come convincente. Al fine di usare la radioautografia per scoprire i siti di produzione e immagazzinaggio della serotonina, dovevo somministrare (come descritto in precedenza) un marcatore radioattivo che veniva convertito nel corpo in serotonina radioattiva. Marcello e John non si fidavano del mio marcatore. Per quanto li riguardava, non vi era alcun modo per sapere di quali cellule quel marcatore sarebbe andato a far parte. Il fatto che il mio marcatore radioattivo, il 5-HTP, fosse il precursore immediato della serotonina non faceva loro impressione. Marcello e John preferivano credere che avessi accidentalmente riempito i nervi simpatici di serotonina radioattiva. A causa del loro scetticismo riguardo la serotonina quale neurotrasmettitore del sistema nervoso periferico, erano disposti ad attribuire moltissimi suoni di zoccoli a questa zebra particolare.

Avevo vari fatti importanti a supporto del mio punto di vista, sebbene Marcello e John sceglieressero di trascurarli. Primo, nessun altro nervo simpatico diventava radioattivo dopo l'iniezione di 5-HTP radioattivo. Secondo, i nervi dell'intestino diventavano ancora marcati radioattivamente anche dopo la distruzione dei nervi simpatici mediante una neurotossina

selettiva (un veleno artificiale chiamato 6-idrossiclopamina, assorbito in modo specifico e suicida dai nervi simpatici). Terzo, i nervi enterici negli animali in sviluppo si marcavano di serotonina radioattiva, anche prima che i nervi simpatici crescessero nell'intestino. Quarto, la serotonina radioattiva stessa era assorbita in modo avido e specifico dai nervi dell'apparato intestinale, ma non dai nervi simpatici di alcun altro organo. Quinto, l'assorbimento di serotonina nei nervi enterici non era bloccato da farmaci che inibivano l'assorbimento di norepinefrina da parte dei nervi simpatici (la serotonina, quindi, non approfittava del sistema del vettore norepinefrina per raggiungere i nervi). Infine, l'assorbimento di serotonina radioattiva da parte dei nervi enterici era bloccato dagli stessi farmaci (Prozac e i suoi parenti – se ne parlerà più diffusamente in seguito) noti per la loro azione bloccante dell'assorbimento della serotonina da parte di note terminazioni nervose contenenti serotonina del cervello.

Perché Marcello e John fossero soddisfatti, occorreva come minimo la dimostrazione diretta che i nervi enterici contengono serotonina endogena prodotta dai nervi autonomamente, senza alcuno stimolo proveniente dall'esterno per opera mia o di un altro ricercatore. Prima del 1980, il solo modo per rilevare la serotonina endogena in sezioni microscopiche di tessuto era di liofilizzare le preparazioni ed esporle ai vapori di formaldeide. La serotonina reagisce con la formaldeide per formare un prodotto fluorescente rilevabile microscopicamente. Il metodo funziona, ma non bene. Al fine di far brillare la fluorescenza tanto da poterla visualizzare, occorre aumentare le riserve di serotonina del tessuto, e anche così facendo la fluorescenza svanisce rapidamente mentre la si osserva. Tuttavia, quando l'intestino è stato liofilizzato ed esposto alla formaldeide, nel sistema nervoso enterico è comparsa una fluorescenza di colore giallo che porta la firma (nella lunghezza d'onda della luce usata per eccitare la fluorescenza e in quella della luce emessa) della serotonina. La fluorescenza, comunque, era temporanea e diffusa. Io *pensavo* che la serotonina endogena fosse presente nei nervi enterici, ma i miei colleghi australiani avevano detto per iscritto che loro erano di avviso contrario.

Un secondo punto debole era lo stato primitivo, nel 1981, della nostra conoscenza dei recettori serotoninici. Allora non valutavamo il numero di sottotipi di recettori serotoninici esistente, né disponevamo di antagonisti idonei. Questa debolezza era evidente anche nella presentazione di Jack Wood. Il meglio che potessimo fare per bloccare l'azione della serotonina era di esporre i neuroni ad alte concentrazioni di serotonina. Tale operazione desensibilizza i recettori serotoninici, e, al contempo, lascia intatti i recettori per altri neurotrasmettitori. In particolare, sia io sia Jack avevamo dimostrato come, quando si desensibilizzavano i recettori serotoninici, le risposte dei neuroni enterici sia alla serotonina da noi applicata sia alla stimolazione nervosa andavano perse. Questo era esattamente l'effetto che ci si sarebbe attesi se la serotonina fosse stata davvero il neurotrasmettitore. Inoltre, la desensibilizzazione dei recettori serotoninici non impediva ai neuroni enterici di rispondere alla nicotina, dimostrando che il trattamento era specifico.

In passato, John Furness e Marcello non avevano tenuto conto degli effetti della desensibilizzazione dei recettori serotoninici, sostenendo che l'alta concentrazione di serotonina

che avevamo usato per desensibilizzare i recettori poteva avere inibito anche la secrezione di neurotrasmettitori. Sottolineavano, giustamente, che se i nervi stimolati non avessero potuto rilasciare il proprio neurotrasmettitore, si sarebbe bloccata la neurotrasmissione. Questo è, per esempio, l'effetto della tossina botulinica. L'associazione della desensibilizzazione dei recettori serotoninici al fallimento della neurotrasmissione enterica, sostenevano, poteva essere solo una coincidenza in cui si verificano contemporaneamente due diversi effetti. A dispetto di un'alta concentrazione di serotonina, i recettori potrebbero desensibilizzarsi e i nervi smettere di secernere.

Prima di questa conferenza, vi era un consenso generale sul fatto che la desensibilizzazione dei recettori serotoninici bloccasse gli EPSP lenti. John e Marcello, tuttavia, non avrebbero accettato questo come prova che la serotonina fosse il neurotrasmettitore mancante. Prima, avremmo dovuto provare, a loro soddisfazione, che il trasmettitore naturale fosse davvero secreto quando noi stimolavamo i nervi sull'intestino. Questo mi sembrava ancora un altro caso in cui si cercavano le zebre quando si sentiva il suono degli zoccoli sulla terra; ciononostante, una sfida è una sfida e io l'accettai.

In conclusione del mio lavoro, discussi degli ovvi punti deboli della mia storia e sottolineai la necessità di un'identificazione più precisa della serotonina nella parete intestinale e di antagonisti migliori. Quando parlai della necessità di strumenti migliori per identificare la serotonina, udii distintamente Marcello sogghignare. Quando guardai verso di lui, vidi soltanto che ora stava sorridendo in modo evidente. Ora, non c'era alcun dubbio. C'era una sorpresa in arrivo che non pensavo avrei gradito. Mi domandai se accidentalmente non mi fossi per caso scavato la fossa con le mie mani. Ciononostante, riassunsi rapidamente la mia tesi e chiesi se vi fossero delle domande.

Le domande resero evidente che a quel tempo molti del pubblico non dubitavano più che la serotonina fosse un neurotrasmettitore enterico. Le domande erano per lo più come palle da softball, facili da mettere in campo. Vari colleghi chiesero ulteriori dettagli sui tipi di riflessi che mettono in azione i nervi che usano la serotonina quale loro neurotrasmettitore. All'epoca del workshop, la mia risposta a tale domanda era alquanto speculativa, ma a questo punto ero in grado di portare a termine gli esperimenti che avevo realizzato a Oxford nel 1965 e 1966, i quali avevano suggerito con chiarezza che la serotonina era importante per la motilità intestinale.

Dopo aver esaminato la mia ricerca di Oxford e le mie speculazioni sulle sue implicazioni terapeutiche nel periodo della discussione, mi voltai per presentare Marcello, che doveva essere l'oratore successivo. Non ricordo cosa dissi su Marcello nella mia presentazione, ma suppongo che fosse qualcosa di positivo, perché sembrava compiaciuto quando salì sul podio.

Sorpresa!

Marcello mi ringraziò e poi iniziò in un modo che non avrei mai dimenticato. Cominciò ricordando al suo pubblico il nostro disaccordo. «Per tutti questi anni» disse «abbiamo pensato che Michael avesse torto sulla serotonina come neurotrasmettitore. Ora sono qui per dirvi che aveva ragione fin dall'inizio, e io sto per illustrarvi la prova definitiva che lo dimostra.»

Mi aspettavo una guerra aperta, ma ciò che ebbi fu un' *Appomattox*. T.S. Eliot aveva sostenuto che il mondo sarebbe finito «non con un colpo, ma con un pigolio», e così fu. Marcello stava benevolmente cedendo! In modo aperto e perfettamente onesto, si stava allegramente rimangiando le sue parole in pubblico. Non credo esistano molte persone in grado di mostrare quel genere di stile e onore. Ricordai la risatina che avevo udito durante il mio discorso e improvvisamente ne compresi il vero significato. Non era la risata di un genio malvagio, ma il divertimento di un amico che stava per farmi una bella sorpresa. La cosa mi piaceva, ma mi vergognavo un po' per la mia rabbia di prima.

Ciò che Marcello aveva fatto era stato usare la tecnica immunocitochimica per riempire e rafforzare l'anello più debole della mia argomentazione. Aveva individuato la serotonina, proprio dove la teoria aveva previsto dovesse essere, all'interno dei neuroni enterici. Non era nelle terminazioni dei nervi simpatici, ma nei neuroni che erano residenti intrinseci della parete intestinale. Per comprendere il risultato di Marcello (e del suo collega John Furness), dovete sapere qualcosa del sistema immunitario e di come è fatta la microscopia.

Marcello usava gli anticorpi come i poliziotti della dogana usano i cani. I cani trovano la droga fiutandola nei posti in cui i contrabbandieri la nascondono. Marcello utilizzava gli anticorpi per trovare molecole interessanti nei siti in cui la natura le ha nascoste. Gli anticorpi erano strumenti chimici davvero fantastici. Tuttavia, non erano spade magiche, delle Excalibur biologiche fornite da un potere soprannaturale. Gli animali le rendevano parte di una risposta immunitaria.

Le proteine e gli zuccheri complessi sono molecole complicate collettivamente denominate macromolecole a causa delle loro grandi dimensioni. Le macromolecole provocano risposte immunitarie quando invadono o sono iniettate in un animale. La risposta immunitaria è fondamentalmente di natura difensiva. Quando macromolecole che di solito non si trovano in un organismo entrano a far parte di esso, esse sono riconosciute come corpi estranei dal sistema immunitario individuale. Il sistema immunitario dispone di un inventario, in modo da poter prontamente distinguere se una qualsiasi data macromolecola sia *propria* (una delle sue) o *non propria* (non delle sue). Tale inventario non è un dizionario o una lista del droghiere, bensì una popolazione incredibilmente variegata di cellule reagenti.

Una macromolecola estranea, quando entra in un animale, si lega a un piccolo numero di cellule del sistema immunitario del destinatario. Tali cellule sono note come *linfociti*. Durante il processo di binding alla superficie di un linfocita, la macromolecola estranea, in effetti, seleziona quella cellula. I linfociti selezionati sono specializzati nel produrre gli anticorpi in

grado di reagire in modo specifico con regioni particolari della macromolecola estranea. Queste regioni della macromolecola estranea si chiamano *determinanti*, perché sono quelle che selezionano i linfociti corrispondenti. Durante la sua vita, qualsiasi animale può imbattersi in miliardi di determinanti esclusivi presenti in un ampio numero di macromolecole estranee. Per far fronte a un tale potenziale, gli animali devono letteralmente contenere miliardi di linfociti esclusivi, che, di fatto, è ciò che fanno.

Qualsiasi sostanza in grado di provocare una risposta immunitaria si chiama *antigene*. Tutti gli antigeni estranei che entrano in un vertebrato entrano in contatto con i corrispondenti linfociti. Tali linfociti sono pronti e in attesa di reagire alle molecole invasive anche prima che l'animale e la sostanza estranea abbiano avuto alcun contatto reciproco. Quindi, le molecole estranee non formano o istruiscono le cellule affinché producano anticorpi; semplicemente scelgono le cellule già dotate della capacità richiesta. La popolazione di linfociti acquisisce questo enorme repertorio attraverso un processo di rimescolamento di geni (in apparenza casuale) durante la vita fetale, che fornisce alla popolazione un grado straordinario di adattabilità.

Durante questo massiccio processo di rimescolamento, alcuni dei determinanti riconosciuti dai linfociti risultanti, alla fine si adattano ai determinanti trovati sulle molecole dello stesso corpo. Questi linfociti autoreattivi devono essere distrutti, o produrranno anticorpi che reagiranno al corpo stesso. Questa autoreattività distruttiva, ora definita *autoimmunità*, fu riconosciuta per la prima volta dal grande microbiologo Paul Ehrlich, che la chiamò «*horror autotoxicus*». L'autoimmunità altera le principali armi di difesa del corpo e converte linfociti altrimenti benigni in larli traditori e autodistruttivi, che corrodono dall'interno.

Per impedire l'autoimmunità, il corpo monitora attentamente i linfociti durante il processo della loro creazione. L'esame dei linfociti è inesorabilmente rigoroso, e qualunque linfocita che non lo superi, e sia passibile di reazione alle automolecole, è eliminato. Gli standard a cui sono soggetti i linfociti giovanili sono pertanto davvero molto severi. Non esiste una cosa chiamata educazione permissiva o progressista. A nessuna cellula si concede una seconda possibilità. Vale una regola: superare la prova o sparire mangiati da un'avidissima cellula monitor, nota come *macrofago*. Tuttavia, i linfociti che superano la prova indossano gli anticorpi da essi prodotti come distintivi d'onore. Gli anticorpi diventano proteine superficiali, componenti delle membrane cellulari, con la loro reattiva superficie di riconoscimento degli antigeni, rivolta verso l'esterno. In questa posizione, gli anticorpi della superficie cellulare possono servire da recettori, che si legano a una macromolecola estranea non appena vi si imbattono. Questo è il processo di *binding*, che consente all'antigene di selezionare un linfocita particolare fra i miliardi presenti nella biblioteca del corpo.

Una volta che un antigene ha scelto un linfocita, esso prolifera e origina molti successori identici. Ne risulta una popolazione di cellule che sono dei cloni del linfocita selezionato. Nell'ambito della popolazione clonale, ciascun singolo linfocita è dedicato alla produzione della molecola dello stesso anticorpo. Alcuni dei linfociti clonali modificano anche la propria forma e si differenziano in un genere diverso di cellula definita *plasmacellula*. Questa cellula specialista

non si limita più a inserire l'anticorpo nella sua membrana superficiale, come il suo predecessore linfocita, ma secerne anche le molecole dell'anticorpo, versandole nel sangue a una velocità di oltre duemila molecole al minuto. Per esempio, le proteine estranee sulla superficie di un batterio che invade un animale immune possono quindi essere rivestite immediatamente dagli anticorpi prodotti in anticipo e tenuti pronti. Gli anticorpi consentono al corpo di rispondere immediatamente a un antigene invasivo. La mobilitazione delle cellule non comporta alcun ritardo con spreco di tempo. Il rivestimento di anticorpi marca i batteri per la distruzione rapida da parte dei globuli bianchi e dei macrofagi. In modo simile, una tossina che entra in un animale immunizzato può essere immediatamente neutralizzata dagli anticorpi che la riconoscono e le impediscono di produrre danni.

Oltre alle plasmacellule, che muoiono una dopo l'altra dopo circa una settimana, membri aggiuntivi della popolazione clonale selezionati dall'antigene diventano duraturi e restano sotto forma di cellule della memoria. Queste cellule sono conservate dopo l'arrivo e la dipartita della risposta immunitaria iniziale. Le cellule della memoria consentono al corpo di reagire più rapidamente e con maggior forza a un secondo incontro con l'antigene originale. Quindi, il corpo apprende dagli incontri con macromolecole estranee e le ricorda. Dovesse esserci un secondo round, è preparato meglio. A differenza dei generali che combattono sempre l'ultima guerra, i linfociti del corpo apprendono dalle loro battaglie e si adattano per fare meglio la volta successiva.

Scienziati come Marcello Costa sanno da tempo che il sistema immunitario può essere controllato e utilizzato come strumento di ricerca. Per le analisi chimiche, la specificità del sistema immunitario non può essere eguagliata da niente di artificiale. Animali come i conigli, le capre o i cavalli possono essere impiegati facilmente come fattorie chimiche per produrre immense quantità di anticorpi. Se si ottiene una piccola quantità di quasi tutte le proteine allo stato puro, quella proteina può essere iniettata in un animale ricevente, che sarà così gentile da produrre i corrispondenti anticorpi. Poi, sarà possibile isolare tali anticorpi dal sangue dell'animale e usarli come sonde per rilevare l'antigene che essi riconoscono fondamentalmente ovunque esso si trovi. I neurotrasmettitori possono non essere macromolecole, ma anche piccole molecole come la serotonina e la norepinefina possono essere abbinati chimicamente alle proteine per generare anticorpi che riconoscano le piccole molecole quali determinanti. Marcello Costa e John Furness non producevano loro stessi gli anticorpi, ma lo straordinario progresso di cui si servirono nel 1981 fu una disponibilità sempre più ampia (da colleghi e fonti commerciali) di anticorpi che riconoscevano i neurotrasmettitori e le molecole associate del sistema nervoso enterico. Tali anticorpi consentirono loro di individuare con esattezza tali neurotrasmettitori a un livello cellulare e perfino sottocellulare.

All'inizio degli anni Ottanta, erano stati generati gli anticorpi per molti dei neurotrasmettitori che si trovano nel sistema nervoso enterico. Marcello Costa e John Furness avevano riunito un grande team di colleghi ed erano assolutamente instancabili nella loro caccia agli anticorpi. Ogni volta che si produceva un anticorpo interessante in qualsiasi luogo della

Terra, potevate essere certi che un campione sarebbe finito in Australia. Una volta lì, sarebbe stato applicato all'intestino del porcellino d'India. Da lungo tempo il porcellino d'India si è affermato come l'animale prescelto per lo studio della motilità intestinale. Ciò è dovuto semplicemente al fatto che, a differenza dell'intestino della maggior parte degli altri animali, un segmento dell'intestino tenue di porcellino d'India mostra pochissima attività spontanea quando lo si toglie dall'animale e lo si sospende in splendido isolamento, in un liquido caldo, nutriente e ossigenato. Di conseguenza, è relativamente semplice studiare gli effetti di farmaci, neurotrasmettitori e altri composti sul suo intestino.

I neuroni, come abbiamo visto, sono specializzati nell'inviare segnali e nel comunicare. Comunicano reciprocamente e con i muscoli, i vasi e le ghiandole mediante un linguaggio chimico. Le parole di tale linguaggio sono i neurotrasmettitori. I neurotrasmettitori possono essere piccole molecole, come l'acetilcolina, la norepinefrina e la serotonina, o molecole più grandi, denominate *peptidi*, che sono assemblate riunendo a catena piccole molecole, denominate *aminoacidi*. Alcuni aminoacidi, come il glutammato e la glicina, possono essere usati essi stessi, non solo come componenti di catene di peptidi, ma come neurotrasmettitori. Alcune molecole, di recente individuate come neurotrasmettitori, sono dei gas, incluso l'ossido nitrico e il monossido di carbonio. Queste molecole naturalmente necessitano di un trattamento speciale e se ne parlerà in seguito.

Un neurone che risponde a un comando ricevuto sotto forma di neurotrasmettitore può anche essere concepito come una cellula seconda perché risponde a un messaggio dall'alto. Le cellule seconde sentono o rilevano il segnale chimico mediante recettori posti sulla loro superficie. Quando un neurotrasmettitore si combina con il proprio recettore, il binding di queste due molecole inizia un'operazione nella cellula recettiva che converte il messaggio trasmesso dal neurotrasmettitore in azione cellulare. Gli eventi intracellulari che seguono il binding di un neurotrasmettitore e convertono il binding in una risposta cellulare sono noti come meccanismi di trasduzione. L'apparato di trasduzione modifica lo stato (aperto o chiuso) dei canali acquosi che passano attraverso la membrana superficiale della cellula seconda o inizia una complessa serie di fasi chimiche che generano seconde molecole messaggere per trasportare il segnale all'interno della cellula o ad altre regioni della superficie cellulare.

Il linguaggio chimico del sistema nervoso è abbastanza complicato, perché neuroni diversi possono parlare con neurotrasmettitori diversi o combinazioni di neurotrasmettitori. Tuttavia, un unico neurotrasmettitore può attivare molti recettori diversi, rendendo possibile a un unico neurotrasmettitore di stimolare una varietà di risposte. Per esempio, esistono più di quindici sottotipi di recettori diversi specializzati nella risposta alla sola serotonina. Ciascuno di questi sottotipi è una molecola unica abbinata alla propria via di trasduzione. La risposta di due neuroni alla serotonina, pertanto, può essere estremamente diversa, a seconda di quale sottotipo di recettore serotoninico le due cellule esprimono. Di fatto, perfino la risposta di un unico neurone alla serotonina può essere complessa se la cellula esprime vari sottotipi di recettore serotoninergico. Chiaramente, per comprendere la funzione di una regione del sistema nervoso,

occorre identificare i neurotrasmettitori e i recettori ivi presenti. Anche allora, non si potrà ancora dire di conoscerne il linguaggio, la grammatica o la sintassi, ma quanto meno si sarà iniziato ad apprendere le parole.

Anticorpi e codifica chimica

Dal momento che era la regola aurea, il sistema nervoso dell'intestino tenue della cavia divenne il primo elemento del sistema nervoso enterico al quale Marcello e John applicarono l'armamentario di anticorpi che avevano a disposizione. Avevano sistematizzato il loro approccio. In una certa misura, i loro metodi erano simili a quelli usati da chiunque altro. Dovevano esserlo. Per parafrasare di nuovo Gertrude Stein, il microscopio è il microscopio è il microscopio. Alcune cose si devono semplicemente seguire, e fa pochissima differenza chi le faccia, o per cosa le si faccia. La maggior parte delle strutture biologiche sono trasparenti o semitrasparenti; pertanto, per dare significato alla struttura del tessuto di quasi tutti gli animali visti attraverso un microscopio, occorre aggiungere il contrasto ai suoi componenti. È possibile farlo usando un microscopio speciale dotato di un'ottica insolita e molto costosa o, più semplicemente, colorando gli elementi del tessuto. L'uso di coloranti biologici, che aggiunge colore ai componenti del tessuto con gradi variabili di selettività chimica, è stato un grande progresso del XIX secolo. È stata l'introduzione dei coloranti a rendere possibile la ricerca della struttura sia del tessuto normale (istologia) sia di quello anormale (patologia). I coloranti, che hanno colori brillanti, sono istruttivi perché danno un significato a ciò che altrimenti sarebbe una massa incoerente di uniformità monocromatica. Sono anche molto gratificanti, perché fanno della microscopia un'esperienza estetica. Ogni vetrino è un Jackson Pollock biologico.

Marcello e John usarono gli anticorpi come coloranti. Anche molte altre persone facevano lo stesso nel resto del mondo. Questa tecnica, definita immunocitochimica (brevemente descritta in una sezione precedente, in cui ho illustrato il genere di ricerca portata avanti da Marcello), è relativamente semplice ed era ben affermata all'epoca in cui Marcello e John ne fecero un uso efficace. È possibile utilizzare gli anticorpi come coloranti quando sono collegati chimicamente a molecole che diventano fluorescenti se eccitate dalla luce con una lunghezza d'onda appropriata. Inoltre, è possibile fissare chimicamente gli anticorpi agli enzimi che, nelle condizioni idonee, provocano la precipitazione dei prodotti di reazione colorati insolubili in siti del tessuto in cui gli anticorpi si fissano. Gli anticorpi fissati chimicamente ad altre molecole fluorescenti o a enzimi sono noti come anticorpi marcati. L'immunocitochimica è meravigliosa perché usa l'estrema specificità degli anticorpi per identificare e ubicare le singole molecole in cellule e tessuti. È possibile che si verifichino degli errori di identificazione, ma la precisione è quella del riconoscimento immunologico, che, specialmente quando si accompagna a controlli standard, è straordinario.

In pratica, pochissime molecole di anticorpi si fissano alle piccole quantità di neurotrasmettitore presenti nelle sezioni di tessuto. Pertanto, di solito occorre aumentare la sensibilità della tecnica. A tal fine, si tenta di provocare il binding del maggior numero possibile di anticorpi marcati alla struttura che si desidera rilevare. L'idea è di creare dei sandwich di anticorpi nel tessuto, per aumentarli impilandoli, letteralmente. L'anticorpo critico, quello che si combina a una molecola del tessuto, si aggiunge per primo e perciò viene

chiamato *anticorpo primario*. Questo tipo di anticorpo viene trattato con i guanti. Si desidera conservarlo intatto in modo che non perda niente della sua avidità naturale per il suo antigene. Quindi, l'anticorpo primario di solito non è abbinato direttamente a un marcatore fluorescente o enzimatico.

Per rilevare gli anticorpi primari, ci si avvantaggia del fatto che gli anticorpi stessi sono macromolecole e quindi buonissimi provocatori di una risposta immunologica quando li si somministra a un'altra specie. Pertanto, in questa situazione, gli anticorpi diventano antigeni. Se si iniettano anticorpi di coniglio in una capra, per esempio, la capra produrrà i propri anticorpi che reagiranno a quelli del coniglio. A questo punto, la lingua è insufficiente, perché parliamo di anticorpi per gli anticorpi, che sembra, se non confusamente ridondante, perlomeno sgraziato. Nonostante la loro deficienza linguistica, comunque, gli anticorpi per gli anticorpi sono strumenti efficaci. Onde evitare possibili confusioni, nessuno parla in realtà di anticorpi per gli anticorpi, ma tali molecole sono definite anticorpi secondari e classificate usando un genere di terminologia da combattimento tra animali. Si parla di anticorpi «capra anticoniglio», «scimmia antipecora» e «topo antiuomo». Comunque siano definiti, gli anticorpi secondari si legano naturalmente agli anticorpi provenienti da altre specie animali. Gli anticorpi secondari capra anticoniglio quindi, se marcati, si legheranno e individueranno eventuali anticorpi di coniglio presenti in un dato lembo di tessuto.

In pratica, gli anticorpi primari di solito si applicano per primi e si concede loro tempo a sufficienza (da ore a giorni) per legarsi agli antigeni dei campioni. Gli anticorpi sciolti, non legati, sono quindi lavati via e si aggiunge un anticorpo secondario, abbinato a un marcatore. Gli anticorpi secondari si legano a molte regioni dell'anticorpo primario, in modo da far fissare molte molecole marcate. In tal modo si amplifica enormemente la sensibilità della tecnica ed è possibile visualizzare la struttura alla quale si sono legati gli anticorpi primari.

Comunque, la colorazione da sola non è sufficiente a far funzionare la microscopia. Per dare significato alla struttura sottostante, anche se colorata, di solito occorre esaminare sottili sezioni di organi, non tutto il campione. Ci si può fare un'idea del problema immaginando un condominio con un tetto e i pavimenti in vetro. Se vi fosse una luce sufficientemente potente, potreste illuminare con essa tutta la casa dal principio alla fine, dalla cantina al tetto. Però, anche così, se foste sul tetto della casa illuminata e guardaste verso il basso, sareste in difficoltà nel riconoscere l'ordine della scena sotto. La luce vi raggiungerebbe e le persone e l'arredamento su ciascun piano acquisirebbero contrasto, quindi sarebbero identificabili. Sfortunatamente, tuttavia, le persone e gli oggetti sui piani superiori sarebbero sovrapposti a quelli sui piani inferiori. Quindi, si metterebbe in ombra l'ordine degli oggetti presenti su ciascun piano.

Un campione da esaminare al microscopio presenta a un osservatore una difficoltà analoga. Di nuovo, come nel caso di un condominio trasparente, è possibile illuminare il tessuto. La luce è inviata attraverso lenti di ingrandimento, ma voi guardate giù lungo il tubo del microscopio e osservate verticalmente attraverso il campione. La moltitudine di piccoli oggetti di cui si compone il tessuto si trovano uno sull'altro secondo il loro ordine naturale. Se tali oggettini

sono stati colorati, si sovrapporranno uno sull'altro e oscureranno la vista. L'ordine delle strutture presenti negli strati del tessuto non sarebbe più evidente di quello delle persone e degli oggetti sui vari piani del condominio. Se poteste ritagliare un singolo piano della casa e guardare solo quello, allora si rivelerebbe l'ordine delle sue persone e dei suoi oggetti. I singoli oggetti non sarebbero più messi in ombra dalle strutture sovrastanti o sottostanti.

Naturalmente, non è possibile ritagliare i condomini, ma è invece questo, esattamente, ciò che si fa con i tessuti biologici. Tagliando il tessuto in sezioni sufficientemente sottili da impedire ai componenti di sovrapporsi uno sull'altro, è possibile riconoscere i profili dei singoli componenti come entità distinte. Tuttavia, il sezionamento rende difficile la ricostruzione dell'architettura tridimensionale del tessuto. La sottigliezza è anche una virtù che può essere esagerata. Man mano che le sezioni si assottigliano, includono sempre meno. Una sezione sottile include solo gli oggetti presenti in quello strato di tessuto. I componenti di tessuto che stanno sopra o sotto la sezione restano quindi esclusi.

Marcello e John riuscirono a ottenere preparazioni dello spessore ideale. Sezionarono la parete intestinale in strati incredibilmente sottili e poi esaminarono facilmente ogni strato della parete dell'intestino come un vetrino intero. Gli strati erano sufficientemente sottili da evitare la messa in ombra degli oggetti sovrapposti, ma non sottili a tal punto da escludere le strutture o avere difficoltà nel ricostruire l'intestino in tre dimensioni. Essi usarono anche anticorpi secondari con marcatori fluorescenti che, se eccitati, si illuminavano di luce propria. Per la microscopia fluorescente, non si guarda direttamente la luce che si irradia attraverso un campione, ma quella che emana dalle strutture marcate con colorante fluorescente all'interno del tessuto stesso. La luce originale si usa per eccitare le molecole colorate e poi si toglie dal percorso ottico, in modo che non possa raggiungere l'occhio dell'osservatore. Se niente emette luce all'interno del campione, il campo è buio. Così, diventano visibili le strutture fluorescenti, che emettono luce, risplendenti di luminosità iridescente su uno sfondo nero. Dato che gli anticorpi stabiliscono ciò che occorre colorare, relativamente poche strutture all'interno di un tessuto diventano fluorescenti. Il problema di stabilire l'ordine in un tessuto spesso diventa pertanto meno grave. Vi sono relativamente poche strutture visibili sovrapposte una sull'altra. Marcello e John stavano facendo rapidi progressi.

Per aumentare ciò che potevano scoprire con l'immunocitochimica, Marcello e John avevano imparato a usare la dissezione dell'intestino di cavia come procedura sperimentale. Togliendo con delicatezza i singoli strati della parete intestinale, furono in grado di tagliare chirurgicamente i nervi enterici in animali anestetizzati, al fine di dedurre la direzione delle loro proiezioni. I neuroni hanno la tendenza a essere straordinariamente direzionali o polarizzati nella loro forma. Un'estremità o polo del neurone, occupata dal corpo cellulare, di solito è recettiva. Il corpo del neurone e i suoi prolungamenti associati, denominati *dendriti*, ricevono l'input da altri neuroni. Un unico prolungamento lungo e sottile, chiamato *assone*, si allunga dal polo recettivo del neurone. L'assone è conduttivo e un segnale elettrico passa rapidamente lungo la sua superficie, allontanandosi dal corpo cellulare. L'assone finisce in una *terminazione*, che spesso ha una

forma rigonfia, perché si espande per contenere molti piccoli pacchetti di neurotrasmettitori. Queste minuscole sacche piene di neurotrasmettitori, o vescicole, si chiamano, abbastanza appropriatamente visto che si trovano nelle sinapsi, *vescicole sinaptiche*.

Se un assone termina in un ingrossamento unico, il rigonfiamento si chiama *bottone terminale*. Gli assoni intestinali terminano spesso non in un unico bottone terminale, ma in una catena di tali rigonfiamenti. I singoli rigonfiamenti sono definiti *varicosità*, come i rigonfiamenti di colore blu nelle vene delle gambe delle persone anziane. Le terminazioni nervose simpatiche e parasimpatiche nel muscolo cardiaco, nella muscolatura liscia, nei vasi sanguigni o nelle ghiandole sono esempi di nervi con lunghe terminazioni nervose varicose. Questi nervi diffondono il loro trasmettitore su ampie aree e non possono essere molto precisi sulla destinazione finale di quest'ultimo. Al contrario, la giunzione neuromuscolare scheletrica, e la maggior parte delle terminazioni nervose che comunicano con altri neuroni, sono del tipo a bottone. Queste terminazioni di solito sono molto precise sul bersaglio a cui mirare il loro trasmettitore. Questa differenza sembra quasi rispecchiarne la funzione. Noi usiamo le mani e le dita per afferrare gli oggetti con una certa destrezza e una notevole precisione. Questo coinvolge le giunzioni neuromuscolari e molte connessioni tra i neuroni del cervello e del midollo spinale. D'altro canto, quando facciamo funzionare la vescica, è meglio se i nostri nervi parasimpatici fanno contrarre l'intero organo. Sarebbe controproducente selezionare solo poche cellule muscolari lisce nella vescica da contrarre. È meglio proprio per forzarla a svuotarsi di tutta l'urina.

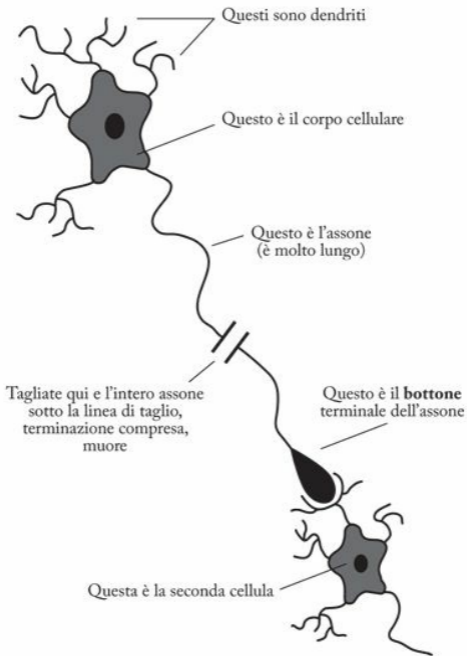
Molti neuroni presentano una polarità estrema assolutamente sproporzionata. Sono privi di qualsiasi senso della simmetria. Il corpo di un neurone e l'albero dendritico che da esso si dirama sono gli elementi della cellula che più colpiscono e di certo quelli più catturano lo sguardo. Di contro, il sottile assone non fa colpo per il suo aspetto e lo si nota appena. Tuttavia, per la maggior parte dei neuroni l'assone è talmente lungo che oltre il 95% della sostanza della cellula si trova non nel corpo cellulare o nei dendriti, ma proprio nell'assone. Nonostante questa schiacciante propensione verso l'assone nella distribuzione del materiale cellulare, esso non può produrre proteine. Tutto il meccanismo di sintesi proteica e i controlli genetici associati di un neurone sono confinati nel corpo cellulare e nei dendriti.

Una delle conseguenze della strana compartimentalizzazione funzionale dei neuroni è che le considerevoli quantità di proteine che si trovano nei loro assoni devono essere trasportate per quella che potremmo definire, in termini relativi, una distanza estremamente lunga. Se uno dei neuroni del cervello che innerva una cellula nervosa motoria nella parte terminale del midollo spinale dovesse essere rappresentato in scala sì da essere delle dimensioni di una stanza di quindici piedi per quindici, il suo assone sarebbe lungo oltre 250 miglia. Ciò significa che se il corpo cellulare fosse a New York, il suo assone terminerebbe oltre Washington ammettendo che potesse viaggiare sulla New Jersey Turnpike.

Il processo di movimento lungo l'assone, definito *trasporto assonale*, è gestito da un elaborato servizio di trasporto, che farebbe invidia persino alla Federal Express. I materiali

destinati al terminale, incluso il neurotrasmettitore, sono efficientemente imballati in piccole vescicole guidate da una molecola motoria lungo piste apcializzate (dette *microtubuli*) fino alle terminazioni. Questo tipo di trasporto è il *trasporto assonale rapido*. I componenti strutturali dell'assone sono spostati con molto più comodo da un meccanismo completamente diverso, il *trasporto assonale lento*, molto meno ben compreso. Vi è perfino un efficiente meccanismo di consegna dei resi, dato che le vescicole sporche e logore sono rimandate indietro al corpo cellulare mediante trasporto rapido (che funziona con un motore diverso) per essere assimilate nel sistema di smaltimento rifiuti della cellula.

UN NEURONE "TIPICO"



Una seconda conseguenza dell'assenza di macchinario per la fabbricazione di proteine negli assoni è che dopo aver tagliato un segmento di un assone, tale segmento, isolato dal corpo cellulare, muore completamente. La parte prossimale, ancora attaccata al corpo cellulare, tende a sopravvivere, perché la membrana superficiale tagliata si sigilla in un processo paragonabile alla fusione che si verifica tra bolle di sapone che collidono. Dal momento che il trasporto assonale continua dopo il taglio dell'assone, il materiale trasportato, comprese le vescicole di neurotrasmettitore, tende ad accumularsi sul lato del taglio del corpo cellulare.

Marcello e John prima tagliarono gli assoni, poi usarono gli anticorpi per identificare e ubicare i neurotrasmettitori. In questo modo, essi furono in grado di stabilire il loro «codice chimico» per la classificazione dei neuroni enterici. I neurotrasmettitori scomparivano dai campi dove gli assoni tagliati terminavano e si accumulavano sopra i tagli. Poterono in tal modo accertare rapidamente se gli assoni di neuroni specifici salissero o scendessero all'interno dell'intestino, o se si proiettassero da uno strato della parete intestinale a un altro.

Marcello e John avevano ottenuto anticorpi per la serotonina da Harry Steinbusch, che li coltivava in Olanda. Harry fu uno dei primi a rendersi conto che per produrre anticorpi che riconoscessero una piccola molecola come la serotonina aveva bisogno di uno stratagemma. Di solito, come abbiamo visto, i linfociti cercano le molecole grandi, non quelle piccole. Il suo stratagemma fu di usare la formaldeide per collegare chimicamente la serotonina a una proteina vettore di grandi dimensioni. Poi, iniettò il complesso così modificato in un animale. La serotonina (o per essere più precisi, il prodotto di reazione formato da serotonina e formaldeide) divenne un determinante riconosciuto da alcuni degli anticorpi contro il complesso. Furono prodotti anticorpi, naturalmente, anche verso altre parti poco interessanti della molecola vettore più grande alla quale era abbinata la serotonina, ma queste furono rimosse facilmente mediante assorbimento, come descritto in precedenza. Quando si fissano i tessuti con la formaldeide, la serotonina presente nel tessuto si lega alle proteine vicine (il meccanismo che avevo usato per trattenere la serotonina radioattiva in modo da poterla trovare mediante radioautografia). La serotonina fissata mediante formaldeide alla proteina era esattamente ciò che gli anticorpi alla serotonina di Harry stavano cercando.

Usando gli anticorpi per la serotonina di Harry (fissati mediante formaldeide alla proteina tissutale), Marcello fu così in grado di confermare che la serotonina è presente nei neuroni enterici. Inoltre, dimostrò che tutti quei neuroni sono presenti nel plesso mienterico (il più grande dei due plessi enterici) e tutti i loro assoni scendono all'interno dell'intestino. Pertanto, direzionando i loro prolungamenti, i neuroni enterici contenenti serotonina hanno un occhio infallibile fisso sull'ano.

Man mano che il discorso di Marcello andava avanti, fui sopraffatto da un senso di liberazione. Ecco qui un uomo che era stato in disaccordo con me per anni, e ora, a sentirlo parlare, non si riusciva a capirne il motivo. Marcello non fece mai cenno alle sue obiezioni precedenti nei confronti delle mie conclusioni, e di fatto, senza dirlo, confermò quasi tutto ciò che avevo suggerito. Ora eravamo d'accordo sul fatto che i neuroni contenenti serotonina sono

presenti nel sistema nervoso enterico e che tali neuroni sono probabilmente interneuroni. Marcello, tuttavia, non poteva ancora spingersi a definire la serotonina un neurotrasmettitore senza un aggettivo qualificativo che lo precedesse, tipo «supposto». Pensai che ci sarebbe voluto più tempo perché Marcello scacciasse l'ultima zebra; ciononostante, potevo convivere con il «supposto», specialmente se veniva da qualcuno il cui lavoro ora si combinava così bene al mio.

Al termine del discorso di Marcello, l'espressione del viso di Alan North era completamente rabbuiata. Immaginai che gli uscisse il fumo dalle orecchie, ma naturalmente non ne vidi. Aveva subito un colpo basso nel peggior modo possibile. Marcello non era mai stato nella squadra di Alan, per cui non aveva alcun obbligo di rivelargli la sua sorpresa. Il suo discorso, tuttavia, fu un tradimento per Alan, che non la prese bene. Non che io pensi, in nessun caso, che io avrei fatto di meglio. In tutti i casi, Alan andò avanti con il suo discorso, ma la sua situazione era insostenibile. Tre persone avevano appena concluso che la sua tesi, che non consentiva alla serotonina di essere un neurotrasmettitore intestinale, era errata. Invece di un dibattito alla pari, tutti facevano fronte comune contro di lui. Il suo messaggio era in una difficile situazione prima di avere possibilità di combattere.

Per colmo dell'ironia, non vi era nulla di sbagliato in ciò che Alan aveva da dire, tranne che per la sua idea fissa che se la serotonina era il trasmettitore responsabile dell'eccitazione lenta, allora non potesse esserlo il suo candidato, la sostanza P. La sostanza P e la serotonina sono probabilmente entrambi neurotrasmettitori che provocano lo stesso genere di risposta. Tuttavia, sono rilasciati da neuroni diversi in situazioni diverse. In ogni caso, Alan continuò il suo discorso e uscì distrutto dalla discussione.

Aveva sperato di trarre vantaggio dal fatto che la sostanza P è un peptide, mentre la serotonina non lo è. I peptidi, come le proteine, sono assimilati dagli enzimi che incontrano nell'apparato intestinale. Essi sono frantumati da tali enzimi, e rilasciano gli aminoacidi di cui sono costituiti. Di contro, la serotonina in se stessa è un derivato di un aminoacido (triptofano) e pertanto non è preda degli enzimi che masticano i peptidi. L'idea di Alan era di applicare gli enzimi digestivi (del pancreas) a gangli enterici isolati e stabilirne l'effetto sugli EPSP lenti. Egli pensava che se la sostanza P era il neurotrasmettitore, allora gli enzimi digestivi l'avrebbero distrutta e gli EPSP lenti non si sarebbero di conseguenza verificati. D'altro canto, egli si aspettava che gli enzimi non avessero alcun effetto sugli EPSP lenti se il neurotrasmettitore era la serotonina. Com'era prevedibile, gli enzimi digestivi inibivano gli EPSP lenti. Pertanto, Alan concluse che la sostanza P, e non la serotonina, fosse il responsabile degli EPSP lenti.

Sfortunatamente per lui, il pubblico non fece una piega davanti ai suoi dati. Hirsch Gershenfeld rilevò immediatamente come gli enzimi digestivi non fossero agenti specifici, come i veleni che avevano rivelato così tanto sulla neurotrasmissione. Non solo essi assimilano la sostanza P e altre molecole di segnale dei peptidi, ma si potrebbe anche pensare che digeriscano anche le superfici dei neuroni dei gangli enterici. Non vi era alcun modo per sapere quante

molecole potenzialmente importanti fossero digerite quando gli enzimi erano a contatto con il tessuto. Gli EPSP lenti potevano essere inibiti dagli enzimi per molte ragioni, alcune delle quali potevano non avere niente a che fare con la digestione del neurotrasmettitore. Peggio ancora, dal punto di vista di Alan, io avevo dimostrato, anni prima, che la serotonina, caricata positivamente, si lega strettamente per opera degli enzimi digestivi del pancreas, che sono caricati negativamente. Pertanto, gli enzimi digestivi potrebbero facilmente avere inibito gli EPSP lenti non solo assimilando la sostanza P, ma legando (e in tal modo inattivando) la serotonina.

Gli esperimenti di Alan erano molto ben presentati, ma aveva un atteggiamento imbronciato e adirato, e non gestì le domande in modo adeguato. Quando il workshop finì, era ovvio che non aveva avuto una buona giornata. Io, invece, non avevo mai fatto meglio. Il sistema nervoso enterico era sulla mappa neurobiologica, e la mia ipotesi che la serotonina fosse un neurotrasmettitore enterico aveva improvvisamente traslocato dal sottosuolo al piano principale. Non ero più un dissidente.

Mentre lascio il palco, con un forte stimolo a occuparmi di ciò che allora pensavo fosse una grave deficienza di alcol nel flusso sanguigno, una giovane donna mi si fece incontro per parlarmi. Si presentò come Theresa Branchek, ma mi disse subito di chiamarla Terri. Mi disse che stava per ottenere il dottorato dall'Università dell'Oregon. Terri aveva un modo di parlare terribilmente diretto. Tutto ciò che aveva in testa, lo esprimeva immediatamente. Cosa più importante, fece delle buone domande e presto rivelò una vasta conoscenza del mio lavoro precedente. Chiaramente, Terri aveva fatto i compiti a casa ed era venuta al workshop preparata per questa discussione. Il nostro incontro non era avvenuto per caso. Decisi di dimenticare, almeno per il momento, il drink di cui pensavo di avere bisogno e mi sedetti a godermi la conversazione.

Saltò fuori che Terri stava cercando un laboratorio in cui svolgere il lavoro di postdottorato. Il workshop non solo l'aveva convinta che la serotonina è un neurotrasmettitore enterico, ma anche a venire a lavorare con me. Fui lieto della prospettiva e glielo dissi. Terri non era il tipo che temporeggiasse, per cui fu subito d'accordo. Dopo qualche minuto ancora di conversazione, ci scambiammo gli indirizzi e i numeri di telefono e ci voltammo per lasciare la sala, che si svuotò rapidamente. Trovai dei colleghi, che erano soddisfatti in modo entusiastico del workshop, e riesumai la mia caccia al drink.

Curiosamente, sebbene tutto fosse andato bene come non avrei mai sperato, non ero così entusiasta come i miei colleghi, o come avrei dovuto essere. Di fatto, mi sentivo un po' giù. Dopotutto, nel portare alla coscienza pubblica il sistema nervoso enterico, avevo in un certo senso scoperto l'acqua calda. Io pensavo che i miei risultati fossero meritori, ma Bayliss e Starling, Trendelenburg e Langley avevano calcato il terreno critico prima di me. Rispetto alla serotonina, mi sentivo soddisfatto, ma le scoperte essenziali le avevo fatte anni prima. Ora, mentre lascio la sala dove si stavano spegnendo le luci, la mia mente andò a quanto restasse da fare. Avevamo stabilito che la serotonina è un attore della commedia dell'intestino, ma

dovevo ancora imparare cosa facesse la serotonina per l'apparato intestinale e come lo facesse. Cosa più importante ancora, se potevo anche aver convinto i neuroscienziati scettici del pubblico del workshop che esiste un secondo cervello, non avevo neanche iniziato ad avere a che fare con la grande domanda del perché occorra un secondo cervello. Dopotutto, il primo cervello è uno strumento che colpisce abbastanza. Si potrebbe pensare che se può gestire cose come la politica e la meccanica quantistica, il cervello della testa dovrebbe essere in grado di gestire qualcosa di semplice come un intestino. Naturalmente, il solo fatto che un secondo cervello si fosse evoluto in contemporanea, suggerisce che far funzionare l'intestino non è un'attività da poco. Per comprendere perché occorra un secondo cervello nell'intestino, è importante considerare prima cosa accade nell'apparato intestinale.

Poco dopo aver lasciato il centro conferenze, stavo seduto con i miei colleghi in un bar buio e dalle pareti rivestite in legno. I miei pensieri tornarono nel mio intimo, e non prestai molta attenzione alla baldoria che mi circondava. La mia attenzione si rivolse alla questione di cosa fare in seguito della mia vita scientifica. Mi venne alla mente un'immagine di Dwight Eisenhower. Eisenhower era, naturalmente, il generale coronato dal successo che era riuscito magistralmente a tenere concentrati sulla sconfitta della Germania nazista durante la seconda guerra mondiale un gran numero di individui indocili con agende personali conflittuali. Venne il giorno, comunque, in cui Hitler fu tolto di tomo, la Germania nazista smantellata e Eisenhower dovette affrontare la questione di cosa fare in seguito. Si cerca sempre di andare avanti verso cose più grandi e migliori, ma vincere la seconda guerra mondiale è una cosa dura da battere. Stabilire che la serotonina è un neurotrasmettitore del sistema nervoso enterico non è un risultato che possa essere confrontato alla vittoria di una guerra mondiale, ma vi era stata una guerra per la serotonina, e io l'avevo vinta. L'improvvisa dichiarazione di pace ora significava che mi serviva una nuova causa.

Chiaramente, Eisenhower trovava maniere produttive di usare il suo tempo. Arrivò a diventare presidente, prima della Columbia University (la mia scuola), e poi degli Stati Uniti. Forse, nel mio piccolo, anch'io potevo continuare ad avere dei successi nel mio periodo postbellico. Terri Branchek mi fornì un buon modo per riorganizzarmi. Non aveva mai pensato prima all'apparato intestinale e le occorreva un orientamento. Decisi di stilare una traccia delle cose che accadono nell'intestino, quali parti dell'apparato intestinale se ne occupino e come tali attività siano influenzate dal sistema nervoso enterico. Questa traccia, una volta portata a termine, migliorò la mia comprensione del perché ci serve un secondo cervello.

Parte seconda
Diario di viaggio

5. Dietro i denti: il territorio di caccia della piroisi e dell'ulcera

Il vantaggio principale di una descrizione sintetica dell'intestino è che diventa evidente il modo armonioso in cui la struttura e la funzione si spiegano a vicenda. L'anatomia dell'intestino è evoluta in modo da consentire all'organo di eseguire il suo compito; è quindi meglio prendere in considerazione ed esaminare allo stesso tempo forma e funzione. Quest'idea può apparire ovvia e persino banale quando lo si dice senza pensarci; ho tuttavia scoperto che, in pratica, il concetto non è frequentemente apprezzato dagli operatori del campo. Alcune persone, dotate di un senso estetico ben sviluppato, restano stupefatte di fronte all'incredibile bellezza delle strutture biologiche e desiderano catturare tale avvenenza trasformandola in parole e disegni. Queste persone odiano essere distratte da quanto ritengono riguarda la «semplice utilità» dei loro soggetti. Altri, che si considerano scienziati «puri», sono razionalisti e ritengono che l'anatomia sia sconvolgentemente complessa e impossibile da condensare in una struttura logica. La struttura degli esseri viventi non può essere facilmente descritta con una formula matematica e deve essere documentata tramite illustrazioni, piuttosto che numeri. Questi soggetti, secondo cui le prove visive sono «tenui» e prive di quella precisione che essi associano ai dati numerici, si rivolgono con sollievo ai fenomeni fisici e chimici che sottostanno all'attività biologica. Questi processi possono essere più facilmente concettualizzati con l'uso di grafici e, nei casi migliori, mediante equazioni. In verità, tutti gli atteggiamenti relativi alla ricerca che tentano di separare la forma dalla funzione sono artificiosi e ne impediscono il progresso.

La struttura dell'intestino non è stata creata dal Padreterno al solo scopo di fornire un piacere visivo a quelli che lo scoprono. Né è stata fornita dal diavolo per tormentare gli scienziati razionali con dettagli illogici. Al contrario, la struttura stessa dell'intestino lo rende capace di svolgere il suo compito. La conoscenza della struttura può quindi essere utilizzata per prevedere e spiegare la funzione, mentre le informazioni sulla funzione possono essere impiegate per prevedere e spiegare la struttura. L'ampio corrugamento della mucosa dell'intestino, per esempio, può essere inteso come modifica strutturale avente uno scopo fondamentale: aumentare l'area di superficie disponibile per il completamento della digestione e l'assorbimento dei nutrienti.

Estrarre e riuscire a far entrare il combustibile e i materiali necessari a mettere in moto e sostenere il corpo, partendo da qualcosa di così complesso come una bistecca, è un compito veramente difficile. Non si può semplicemente frantumare la carne e introdurla per via endovenosa. Prima, deve verificarsi una grande quantità di processi chimici altamente sofisticati

per liberare ciò di cui abbiamo bisogno da quello che mangiamo e quindi trasportare questi nutrienti fondamentali nell'organismo. Per indurre le necessarie reazioni chimiche a proseguire, l'ambiente interno dell'intestino deve essere regolato, il suo contenuto deve essere mescolato e gli enzimi che aggrediscono i cibi devono essere presenti esattamente nelle giuste concentrazioni. Perché ogni cosa vada bene, è necessario disporre di un sistema di sensori in grado di rilevare il progredire della digestione e valutare le condizioni presenti nell'intestino momento per momento. Le informazioni ottenute attraverso questi sensori devono quindi essere coordinate per garantire che l'ambiente interno dell'intestino favorisca la digestione e l'assorbimento. Oltre alla nutrizione vera e propria, l'intestino deve anche difendere se stesso e, per estensione, il resto dell'organismo dall'invasione di un'armata di germi ostili continuamente sul punto di attaccare approfittando dei momenti in cui l'intestino abbassa la guardia. Solo il tipo di controllo militarista che un cervello può esercitare su un sistema di organi può garantire che ogni elemento dell'apparato intestinale deputato alla digestione, all'assorbimento e alla difesa lavori come si deve e sia presente quando è necessario. Per fare funzionare correttamente l'intestino, occorre una potenza nervosa talmente immensa che l'evoluzione ha reputato del tutto sensato mettere il necessario cervello nell'organo stesso. Sono stati coinvolti così tanti neuroni che se tutti questi dovessero essere controllati centralmente nella testa, lo spessore delle vie nervose di collegamento sarebbe intollerabile. Queste vie potrebbero anche costituire un pericolo; reciderle comporterebbe l'interruzione della fondamentale funzione digerente dell'organismo. È quindi più sicuro e conveniente lasciare che l'intestino badi a se stesso. Il cervello nella testa è quindi libero di dedicarsi a compiti molto più interessanti che liquefare una bistecca.

Noi tutti siamo vuoti

La struttura del corpo può essere compresa parafrasando T.S. Eliot. Siamo davvero uomini vuoti e, sebbene Eliot non l'abbia dichiarato (era uno sporco sessista), anche donne vuote. Lo spazio chiuso dalle pareti dell'intestino, il suo lume, fa parte del mondo esterno. Il tubo aperto che inizia con la bocca finisce con l'ano. Paradossalmente, l'intestino è un tunnel che consente a ciò che sta all'esterno di passare proprio attraverso di noi. Qualsiasi cosa si trovi nel lume dell'intestino è in realtà al di fuori dei nostri corpi, anche se ciò sembra irragionevole. Il corpo si ferma in realtà alle pareti dell'intestino. Niente ci appartiene veramente finché non passa questo confine ed è assorbito; tutto ciò che passa attraverso la parete intestinale in direzione inversa, verso il lume, è perso. Se sanguiniamo nel lume dell'intestino, il sangue si perde così come quando gocciola sul pavimento. Quando un alcolizzato perde sangue dalle vene varicose (edematose e sporgenti) nel lume dell'esofago, può facilmente avere un'emorragia mortale. Un'emorragia fatale può quindi verificarsi anche senza che sia visibile una sola goccia di sangue. Anche il passaggio dell'acqua dal corpo verso il lume dell'intestino può essere mortalmente disidratante come un viaggio attraverso il Sahara senza borraccia. La diarrea uccide i bambini disidratandoli proprio in questo modo e il colera è una patologia mortale per la stessa ragione.

Dal momento che siamo vuoti, abbiamo due superfici che separano la nostra parte interna da quella esterna. Uno dei confini, visibile e quindi ovvio, è la pelle. Questa superficie è nettamente impermeabile. L'acqua non vi passa attraverso molto facilmente. Per questa ragione, non possiamo evaporare in un ambiente secco né scioglierci nella vasca da bagno. La cute è anche resistente e protettiva, contrastando l'abrasione nonostante il costante maltrattamento e prevenendo l'invasione da parte dei batteri che, se non fossero tenuti fuori dalla pelle, ci considererebbero un ottimo brodo di coltura in cui vivere. L'altro confine, che ci separa da un ambiente esterno non meno reale di quello opposto alla pelle, è la mucosa dell'intestino. Questa superficie, tuttavia, si modifica per risolvere problemi molto più complicati di quelli affrontati dalla pelle.

La mucosa dell'intestino, come la pelle, deve proteggerci impedendo l'eccessiva perdita d'acqua (nel lume dell'intestino) e l'invasione da parte di microbi ostili. Noi ingeriamo germi con il cibo e, inoltre, alcuni sono ospiti permanenti della bocca e del colon. D'altra parte, a differenza della pelle, la mucosa dell'intestino deve anche partecipare ai processi fondamentali della digestione e dell'assorbimento. *Digestione* è il termine che descrive la varietà di mezzi con cui le molecole complesse e talvolta molto grandi presenti nel cibo sono convertite a formare molecole più semplici e piccole che possono poi essere fatte passare dal lume dell'intestino nell'organismo. *Assorbimento* è il termine che descrive il trasporto dei prodotti della digestione attraverso la mucosa dell'intestino per raggiungere il sangue e i vasi linfatici presenti nella parete intestinale. Questi vasi raccolgono i nutrienti assorbiti e li distribuiscono alle cellule dell'organismo. La digestione e l'assorbimento sono quindi fondamentali per la vita, altrettanto quanto lo sono il battito cardiaco e la respirazione. Quando la digestione o l'assorbimento sono

compromessi, si profila l'inedia. La mucosa dell'intestino, quindi, non può essere costruita come la pelle, cioè come una barriera resistente e impenetrabile. Al contrario, essa deve consentire ai nutrienti di passarle attraverso. Molti di questi nutrienti devono essere in realtà aiutati ad attraversare la mucosa intestinale dalle cellule che rivestono l'intestino e che lavorano molto duramente superando notevoli ostacoli per assolvere a questo compito. L'intestino dimostra quindi, nello svolgere le proprie funzioni di base, un'abilità che la pelle non possiede.

Sebbene la mucosa dell'intestino separi il mondo interno da quello esterno, questa separazione è attuata in modo selettivo. L'acqua e le altre molecole si spostano in entrambe le direzioni attraverso la mucosa intestinale, ma se l'intestino funziona normalmente, ciò che deve stare dentro resta «dentro» e ciò che è meglio rimanga fuori resta «fuori». Da un lato, né l'acqua, né le altre sostanze che ci servono si perdono eccessivamente nelle feci. Dall'altro lato, i batteri che ingeriamo continuamente non ci invadono. È evidente che l'intestino è un organo davvero straordinario ed è probabilmente per questo che ha sviluppato un cervello tutto suo.

La deglutizione

Il cibo raggiunge l'intestino passando attraverso la bocca. Noi mastichiamo il cibo, talvolta in modo non sufficientemente accurato. Dal momento che mastichiamo, il materiale ingerito è inumidito con la saliva. Se non si mastica a sufficienza il cibo, o se esso rimane asciutto, può aderire alla «gola» (esofago) e produrre un penoso senso di disagio. Sebbene la trachea non resti necessariamente bloccata, il fenomeno è tuttavia molto doloroso ed è accompagnato da scialorrea (talvolta ematica), nausea e frustrante incapacità di vomitare. Il classico dito in bocca non è di alcun aiuto e lo stesso vale se si beve dell'acqua. È necessario attendere che il rallentamento dei riflessi, attivato dal secondo cervello, stacchi il cibo e lo spinga giù. Talvolta, un piccolo pezzo di pane può servire a risvegliare i riflessi impigriti. Sebbene ciò possa capitare a tutti e non sia quasi mai fatale, è saggio ricordarsi di masticare prima di deglutire.

La saliva contiene alcuni enzimi digestivi, ma il cibo non si ferma abbastanza nella bocca da essere digerito da queste sostanze che vengono inattivate nello stomaco. Una piccola parte di ciò che mangiamo si dissolve nella bocca e una parte addirittura evapora. I componenti disciolti possono essere rilevati come sapori da speciali recettori sensoriali noti come papille gustative, presenti sulla superficie ruvida della lingua. Le molecole vaporizzate possono raggiungere il naso, dove possono essere annusate, dato che le cavità della bocca e del naso comunicano nella parte posteriore della gola o faringe (dove avviene il cosiddetto gocciolamento retronasale). In realtà, il naso e la bocca sono separati da un tramezzo mobile che ne regola la comunicazione. La sensazione che percepiamo come sapore è in realtà una combinazione di sapore e odore. La verità è che i recettori sensoriali che rilevano l'odore sono molto più discriminanti di quelli che rilevano il sapore e quindi il naso dà un contributo molto superiore al palato del buongustaio di quanto faccia la lingua.

Le papille gustative sono concentrate principalmente nella parte posteriore della lingua, dove le cavità orale e nasale comunicano fra loro. Il risultato è che il boccone si apprezza meglio nella parte posteriore della bocca, soprattutto quando è fatto rotolare avanti e indietro e massaggiato in modo da consentire la fuoriuscita delle sostanze volatili. I sommelier conoscono molto bene questi requisiti. Per assaggiare un vino e valutarne la qualità, essi bevono un sorso, tengono il vino fermo nella bocca, succhiano un po' d'aria attraverso i denti e quindi inclinano la testa un poco all'indietro per lasciar fluire il vino nella parte critica in cui lo fanno gorgogliare. Questa procedura porta il vino a contatto con il massimo numero di papille gustative, lasciandolo allo stesso tempo evaporare, stimolando in questo modo i recettori olfattivi nel naso. Al contrario, quando il vino (o il cibo di bassa qualità) è cattivo, la cosa migliore sarebbe di toccarlo solo con la punta della lingua e inghiottirlo il più rapidamente possibile.

Una volta che il bolo di cibo è spinto abbastanza indietro nella gola, se ne perde il controllo. Da questo momento il bolo innesta il pilota automatico. Le fasi della deglutizione non sono pilotate, ma avvengono piuttosto grazie a un riflesso attivato, come il riflesso del ginocchio in risposta alla percussione esercitata con il martelletto del medico. Il bolo agisce come la

percussione e le contrazioni dei muscoli della laringe (corde vocali) e dell'esofago agiscono come il riflesso. Il naso è isolato dalla bocca, l'epiglottide ruota su se stessa chiudendo la trachea e il cibo è «spinto in gola» ovvero, in questo caso, nell'esofago.

Sebbene il riflesso della deglutizione sembri sfuggire al controllo cosciente, si tratta tuttavia di un'attività diretta dal cervello. Il coinvolgimento del controllo periferico dell'attività è minimo o nullo. Le esperienze edoniste e altri tipi di attività cerebrali sono definite «cerebrali» perché sono apprezzate ai livelli più elevati del cervello, ossia nella corteccia cerebrale. Le azioni viscerali automatiche, come la deglutizione e la respirazione, che non possono essere assolutamente controllate a livello conscio, sono sotto la responsabilità del livello inferiore del cervello, cioè il tronco cerebrale (o *midollo*). Quest'ultimo ha ricevuto un mucchio di neuroni per controllare la deglutizione. I nervi cranici trasportano i segnali sensoriali provenienti dai recettori della gola a questi neuroni, che elaborano le informazioni e stimolano i neuroni motori circostanti, presenti anch'essi nel tronco cerebrale, che controllano i muscoli della laringe e dell'esofago. Questi muscoli sono di tipo scheletrico, lavorano in sinergia con il progetto del sistema nervoso periferico (discusso in precedenza) e sono innervati direttamente dai neuroni del tronco cerebrale, senza il vantaggio di una sinapsi fessata.

Senza dubbio, i centri cerebrali più elevati influenzano quelli inferiori. Il risultato è che il tronco cerebrale non può avere la possibilità di dedicarsi liberamente alla deglutizione. Possono dunque intervenire le emozioni. Il senso di soffocamento o di «costrizione» sono sensazioni familiari. Se il cervello agisce, può sempre succedere, in certe circostanze dannose e in alcune persone, che agisca in modo nevrotico. Il cervello può anche seccare la bocca grazie alla sua capacità di agire sul sistema nervoso autonomo. Questo tipo di disavventura cerebrale è fortunatamente riconoscibile dai medici e, contrariamente ai problemi dell'intestino che non coinvolgono il cervello, è sensibile al trattamento psichiatrico o psicofarmacologico.

È importante comprendere che il cibo non cade semplicemente nell'esofago per raggiungere lo stomaco. Anche l'esofago deve partecipare. Il cibo è spinto in direzione oro-ale dai movimenti dei muscoli della parete esofagea. Se un ictus distrugge il piccolo gruppo di cellule del tronco cerebrale che dirige la deglutizione, i muscoli della faringe, l'esofago superiore e medio restano paralizzati e niente potrà ripristinare la capacità di deglutizione del paziente. Un chirurgo dovrà creare un'apertura nella parete addominale in modo da alimentare il paziente inserendo manualmente il cibo nello stomaco. Una volta che il cibo è nello stomaco, comunque, può avvenire il successivo trasporto all'intestino persino nei soggetti in stato di morte cerebrale. Il sistema nervoso centrale è quindi necessario per la deglutizione, ma dal momento in cui il cibo è deglutito, a quello in cui ciò che ne rimane è espulso dall'ano, l'intestino può regolare da solo tutte le fasi. La defecazione, come la deglutizione, richiede la partecipazione del sistema nervoso centrale per potersi svolgere normalmente.

Sebbene al cibo non capiti nulla di sensazionale nel tragitto fra la bocca e lo stomaco, è importante comprendere che questa regione intermedia ha una funzione fondamentale per tutti noi. La faringe e l'esofago sono le condutture del sistema digerente. La loro presenza è

fondamentale. Tagliarli fuori o indebolirli significa morire. I rivestimenti di queste parti dell'intestino sono spessi e impermeabili. Le cellule superficiali sono stratificate, stanno una sull'altra in strati, multipli, molto similmente alla pelle. Fortunatamente, questi rivestimenti sono costruiti in maniera adeguata per prevenire la penetrazione e resistere all'abrasione, un ruolo reso sempre più importante dalla rapidità della vita moderna, in cui un pranzo mal preparato in tutta fretta può essere ingoiato alla velocità della luce. Masticare può essere, per alcune persone, un'opzione.

Il succo gastrico

La digestione inizia fondamentalmente nello stomaco. Per avviare, questo processo, lo stomaco produce i propri enzimi e acidi digestivi. L'enzima digestivo principale sintetizzato dallo stomaco è la pepsina, che catalizza la degradazione delle proteine alimentari in componenti più piccole chiamate peptidi. La pepsina ha bisogno di un ambiente acido in cui agire e lo stomaco le viene incontro producendo acido cloridrico, un prodotto degno di nota per le sue proprietà nocive. Lo stomaco, infatti, non è coinvolto solo in maniera superficiale nella produzione dell'acido. Quando riceve una dose generosa di energia, lo stomaco può produrre acido cloridrico in quantità industriale. Il ferro metallico si dissolve benissimo nel succo gastrico, che può anche creare una bruciatura circolare nella vostra camicia o accecarvi se entra negli occhi. Il contenuto dello stomaco sembra quindi la pozione di una strega, capace di trasformare una bistecca in brodo e uccidere tutti i germi ingurgitati assieme al cibo. L'eliminazione dei germi è ovviamente vantaggiosa, ma la coesistenza di una sostanza antisettica mortale potrebbe costituire un problema per la mucosa dell'organo che la contiene.

La natura caustica del succo gastrico mette in luce le straordinarie proprietà della mucosa dello stomaco. Le cellule della mucosa secernono pepsina e acido cloridrico eppure, a differenza di quanto succede dopo l'ingestione di un hamburger o di limatura di ferro, la pepsina e l'acido cloridrico non dissolvono le cellule che li producono. La resistenza alla digestione da parte dell'acido cloridrico e della pepsina è una caratteristica singolare della mucosa gastrica, non condivisa con la pelle o la mucosa dell'esofago. La capacità della mucosa gastrica di non essere erosa dal suo stesso succo è dovuta a un altro dei suoi prodotti di secrezione, un gel mucoso alcalino che aderisce tenacemente alla superficie delle sue cellule che guarda verso il lume. Questo gel neutralizza l'acido e la pepsina prodotti dallo stomaco impedendo loro di arrivare a contatto con le superfici cellulari, che sono quindi esposte solo a un ambiente che rimane fortunatamente neutro, anche se l'acidità molto alta e gli enzimi digestivi continuano a turbinare nel contenuto del lume gastrico.

Lo stomaco utilizza anche un altro meccanismo per mantenere integro questo strato. Esso non secerne in realtà la pepsina, bensì il suo precursore inattivo, il pepsinogeno. L'ambiente acido avvia il processo di conversione del pepsinogeno in pepsina, ma non appena è prodotta una certa quantità di pepsina, l'acido esercita un feedback positivo sul processo, catalizzando l'ulteriore conversione della parte rimanente di pepsinogeno in pepsina. Questo processo non può avvenire sulla superficie delle cellule che, grazie alla protezione del gel mucoso alcalino, non sono acidificate. La pepsina quindi si presenta nel lume dello stomaco solo quando è previsto l'arrivo del cibo.

Ogni cosa al suo posto, soprattutto il succo gastrico

La mucosa dell'esofago, tanto quanto quella dello stomaco stesso, deve essere protetta dal succo gastrico. Nell'esofago però manca il gel mucoso alcalino. Tra le sue qualità, la mucosa esofagea è dotata di tenacia e resistenza all'abrasione. Dispone anche della salutare capacità di ripararsi da sola dopo una lesione. L'acido gastrico e la pepsina sono però tutta un'altra cosa. Metterli insieme sulla mucosa dell'esofago è come fare il bagno negli scarichi delle batterie d'automobile. Brucia. Quando l'acido gastrico arriva a contatto con l'esofago, sperimentiamo una sensazione chiamata *pirosi* (o *dispepsia*, se si desidera darle un tono medico).

Un bruciore leggero può essere tollerato, ma come dimostrano i profitti delle maggiori industrie farmaceutiche, la nostra capacità di sopportare questa sensazione è molto limitata. La quantità di prodotti venduti per combattere il bruciore è grande ed è in crescita. Questi prodotti neutralizzano l'acidità dello stomaco (calcio carbonato, idrossido di alluminio e magnesio, calcio carbonato + magnesio idrossido) o ne inibiscono la secrezione (cimetidina, ranitidina, famotidina, omeprazolo). Il succo gastrico va bene quando resta nello stomaco, che è costruito per convivervi. Tuttavia, in caso di reflusso, il contenuto gastrico passa nell'esofago e la cosa diventa sia seccante, sia pericolosa. Sfortunatamente, l'esofago non è molto sofisticato per quanto riguarda i segnali di disagio che riesce a inviare. Un geysir d'acido che rifluisce nell'esofago può quindi generare una sensazione definibile banalmente come il «momento dell'antiacido». Si ritiene che un unico breve episodio di pirosi non sia grave. Altrettanto non si può dire per episodi ripetuti che tendono a persistere nel tempo.

La presenza di acido gastrico nell'esofago non mette in pericolo solo la nostra serenità. La mucosa esofagea può risultare erosa e perfino distrutta. Pertanto, la patologia da reflusso cronico (nota in campo medico come *patologia da reflusso gastroesofageo* o MRGE) costituisce spesso un problema molto grave. La MRGE, che ha un'incidenza preoccupante, è trattata nella maggior parte dei casi sacrificando la capacità dello stomaco di produrre l'acido. La produzione può essere azzerata somministrando un potente farmaco moderno, come l'omeprazolo, che inibisce l'azione di una pompa fondamentale per la formazione dell'acido cloridrico. Ciò comporta solitamente il rapido sollievo e la guarigione delle ustioni ed erosioni dell'esofago, ma il paziente trattato deve rinunciare ai benefici apportati dalla presenza dell'acido nello stomaco.

La mancanza dell'acido gastrico è una situazione innaturale e svantaggiosa. Negli studi clinici sperimentali sui ratti, le conseguenze a lungo termine della mancanza di acido nello stomaco sono risultate veramente dannose. Quando si arresta la produzione di acido per lunghi periodi, tendono a comparire in questi animali neoplasie (chiamate carcinoidi) che derivano da uno dei tipi cellulari della mucosa gastrica. L'uomo non è un ratto e non sembra sviluppare questo tipo di neoplasie. I medici sono tuttavia riluttanti a trattare per lunghi periodi questi pazienti con un farmaco che azzerava l'acidità dello stomaco. Il buon senso suggerisce quindi di somministrare l'omeprazolo solo per un periodo di tempo limitato, durante il quale l'esofago ha la possibilità di guarire e quindi interrompere il trattamento e sperare che la MRGE non si

ripresenti. Sfortunatamente però, la MRGE è solitamente recidiva. I pazienti colpiti dalla MRGE che sperimentano il sollievo fornito dall'omeprazolo tendono quindi ad assumere il farmaco per periodi sempre più lunghi.

Non esistono informazioni sui possibili effetti collaterali dell'omeprazolo sull'uomo e tuttavia il fatto di bloccare la produzione di un prodotto naturale, l'acido cloridrico, utile per altri aspetti, sembra essere un modo superficiale, seppure funzionale, di trattare una patologia. Un metodo migliore per trattare la MRGE sarebbe quello di ripristinare i meccanismi naturali che impediscono il reflusso dell'acido gastrico nell'esofago. Le meraviglie dell'omeprazolo non hanno quindi ancora lasciato i ricercatori senza lavoro.

Il reflusso di acido gastrico nell'esofago è solitamente inibito da una struttura che si trova nel punto di giunzione fra i due organi denominata *sfintere esofageo inferiore* (per gli amici LES). Il LES agisce come un diaframma mobile che si apre e si chiude. Come si può immaginare, rimane chiuso la maggior parte del tempo. Quando è chiuso non c'è comunicazione tra il lume dell'esofago e quello dello stomaco. Il contenuto dello stomaco resta quindi nello stomaco anche se la pressione interna di quest'organo sale. Se ci si mette a testa in giù, per esempio, il LES continua a tenere indietro l'acido proteggendo l'esofago. Il LES si apre solo temporaneamente per trasferire il cibo deglutito dall'esofago allo stomaco. Il reflusso dell'acido gastrico tende a non verificarsi nelle occasioni in cui il LES si apre per breve tempo, perché le fasi di apertura sono associate ai movimenti dei muscoli esofagei che spingono il cibo verso lo stomaco. Queste contrazioni dei muscoli esofagei fanno crescere la pressione interna dell'esofago a un livello molto più alto di quello presente nello stomaco, impedendo così il reflusso. Se una piccola quantità di acido riesce a penetrare nell'esofago durante l'apertura del LES, essa è neutralizzata dalle secrezioni alcaline delle ghiandole specializzate presenti in quell'area. La piroisi non è quindi un problema quando il LES, la motilità esofagea e le ghiandole di supporto vanno tutti d'accordo e lavorano assieme. È quindi facilmente comprensibile perché si sia evoluto un complesso controllo nervoso che sincronizza tutti e tre gli elementi. Quando questo controllo viene meno, la vita diventa intollerabile e talvolta più breve. Se l'evoluzione è pilotata dalla sopravvivenza del più forte, certamente la prevenzione della piroisi dev'essere un fattore convincente. I mezzi farmacologici per fronteggiare la piroisi costituiscono uno sviluppo relativamente recente.

Lo stomaco è molto più di un organo digerente. Possiede la straordinaria capacità di espandersi e fungere da serbatoio. Il cibo non è consumato di continuo e non lo è necessariamente in quantità ragionate. Sorprendentemente, lo stomaco può contenere non solo l'ammontare di tre pasti sostanziosi al giorno ma, in caso di necessità, anche i tipi più spropositati di ghiottoneria. La parete dello stomaco è cedevole, il che significa che lo stomaco può facilmente allargarsi senza far aumentare la pressione nel suo lume. Lo stomaco non è un pallone con una parete elastica che si stringe quando il suo contenuto preme contro essa. Dato che la pressione interna non aumenta quando lo stomaco si espande, l'ingestione di una grande quantità di cibo non forza il contenuto gastrico a risalire nell'esofago e neppure a scendere

nell'intestino tenue. La perdita di questa funzione di riserva è una delle conseguenze più disabilitanti della rimozione chirurgica dello stomaco. Non è più possibile fare tre pasti al giorno. I pazienti devono alimentarsi sei o più volte al giorno per restare in vita. Non esiste un serbatoio equivalente in alcun altro punto del sistema digerente.

L'intestino deve sapere esattamente cosa sta facendo

Sembra evidente a questo punto che il processo digestivo non è semplice. Hanno luogo molti eventi e sono utilizzate sostanze pericolose. La regolazione di ciascuna fase è quindi critica e, tuttavia, dev'essere rapida e specifica. Abbiamo scoperto, per esempio, che il LES si apre solo quando deve lasciar passare il cibo, altrimenti resta chiuso. Ciò è facile a dirsi ma difficile da mettere in pratica. La sincronizzazione dei tempi d'apertura è un processo raffinato e va strettamente controllato. Il cibo si avvicina, i muscoli esofagei si contraggono, il LES si apre, il cibo vi passa attraverso e il LES si chiude di colpo. Boom-boom, snap-pop, la coordinazione è tutto e la sincronizzazione dei tempi dev'essere perfetta. Anche le complesse attività dello stomaco devono essere regolate con lo stesso livello di precisione. Lo stomaco non deve produrre, per esempio, acido cloridrico di continuo. L'acido va prodotto solamente quando serve. Lo sforzo di produrre acido (che è di per sé prodigioso) va evitato quando non è necessario. La produzione discontinua di acido annulla anche il rischio di doverci convivere tutto il giorno. Analogamente, anche la secrezione di pepsina e la produzione del gel mucoso alcalino avvengono solo quando servono.

Lo stomaco non si limita semplicemente a immagazzinare il cibo. Esso ne impasta anche i pezzi grandi riducendoli in minuscole particelle, il solo tipo di materiale che può essere tollerato dal segmento successivo dell'apparato gastrointestinale, l'intestino tenue. Nulla riesce a sottrarsi allo stomaco se non passa un rigoroso test dimensionale. Lo stomaco deve decidere quando immagazzinare e quando impastare, quando mescolare e quando spingere fuori. Le attività dell'apparato gastrointestinale cambiano quindi spesso e uno schema d'attività può anche essere opposto a quello che lo precede o lo segue.

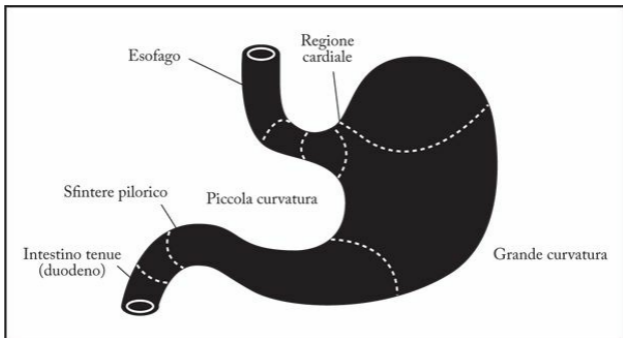
Se un'attività si realizza solo quando è richiesta, allora qualcosa deve percepirla e comunicarla alle cellule effettrici. Regolazione e tempestività sono le specialità del sistema nervoso ed è il sistema nervoso che coordina le complesse attività della digestione. Di fatto, questa regolazione dei nervi dell'intestino è altrettanto necessaria per la digestione quanto gli enzimi che liberano i nutrienti da un pasto complesso. La digestione non è un meccanismo mediante cui il cibo è gettato, senza tante cerimonie, in una soluzione che sta lì ad aspettarlo per scioglierlo. La presenza del cibo nell'apparato gastrointestinale è rilevata dal sistema nervoso enterico che avvia la secrezione dei materiali digestivi e stimola l'intestino a mettere in atto gli schemi di motilità appropriati per l'evento digestivo in atto in quel determinato momento. Il sincronismo finemente regolato di un sistema nervoso enterico perfettamente normale è sicuramente altrettanto meraviglioso della produzione creativa del cervello. Indubbiamente, se questa sincronia non fosse fornita dal secondo cervello, la capacità creativa del primo cervello andrebbe persa.

Come la politica, tutta la digestione è locale

Le numerose attività dello stomaco sono distribuite da quest'ultimo in varie regioni e cellule. Lo stomaco macroscopicamente visibile ([vedi figura](#)) può essere suddiviso in quattro zone denominate regione cardiaca, fundus, corpus e antro pilorico.

La struttura della regione cardiaca si è sviluppata nella maniera più atta a fornire assistenza e soccorso all'esofago. Lo stomaco cardiaco non produce acido né pepsina. Al contrario, la sua mucosa è modificata per formare ghiandole che secernono un muco alcalino con il compito di neutralizzare l'acido gastrico e prevenire il reflusso nell'esofago. La giunzione esofago-gastrica è quindi una zona specializzata libera dall'acido. È un muro tagliafuoco che rende inutile ricorrere a un «sollevio immediato». La regione cardiaca dello stomaco può quindi essere considerata una sorta di erogatore automatico naturale di idrossido di alluminio e magnesio.

Possiamo pensare al corpus e al fundus dello stomaco come a un'unica regione. La loro struttura ghiandolare è praticamente identica e funzionano assieme come una cosa sola. Il fundus è quella parte dello stomaco che sovrasta l'apertura dell'esofago. L'aria ingerita con il cibo tende a salire verso l'alto e accumularsi nel fundus per la sua posizione elevata. L'eruttazione porta quest'aria, evocativa del profumo gastrico, a livello cosciente e spesso anche all'attenzione pubblica. Il gas nel fundus è chiaramente visibile nelle proiezioni radiografiche planari dell'addome e costituisce il punto di riferimento principale che consente ai radiologi di distinguere la posizione e le dimensioni dello stomaco.



La mucosa del fundus e del corpus è costruita in modo tale che le sue ghiandole secernono tutto il pepsinogeno (convertito nel lume in pepsina) e l'acido dello stomaco. Queste due sostanze non sono sintetizzate in nessun'altra zona. Naturalmente, le ghiandole del fundus e del corpus secernono anche il gel mucoso alcalino che consente alla mucosa dello stomaco (comprese le regioni di cui sopra) di sopravvivere.

In un certo senso, lo stomaco è stato balcanizzato dall'evoluzione. Le sue funzioni sono state lottizzate in singole linee cellulari e ogni tipo di cellula occupa il suo appezzamento di terreno. Per ogni funzione c'è una regione. Il controllo del Senato o della Camera dei deputati può passare da un partito all'altro, non a causa di problemi nazionali pressanti su cui il paese prende una decisione con un referendum, ma per gli effetti cumulativi di numerose correnti sulla base di questioni limitate. Allo stomaco succede la stessa cosa. Il destino dell'organo in toto è determinato dal successo o dall'insuccesso di ciascuna delle sue regioni.

Tutto quello che vi serve davvero è il fattore intrinseco

Oltre all'acido, alla pepsina e al gel mucoso alcalino, il fundus e il corpus secernono anche un'altra molecola, il *fattore intrinseco*. Di tutte le sostanze prodotte dallo stomaco, il fattore intrinseco è l'unica assolutamente fondamentale per la vita. Per quanto possa sembrare incredibile, la vita può continuare senza acido e pepsina. L'intestino tenue e le sue ghiandole possono farne a meno. Se si rimuove chirurgicamente lo stomaco, la perdita della sua funzione di deposito è più problematica di quella della sua capacità digestiva. L'intestino tenue non può affrontare un pasto sostanzioso e nemmeno una ghiottoneria. Un paziente che abbia perso lo stomaco dovrà adeguarsi alla perdita e assumere numerosi piccoli pasti al giorno.

La qualità della vita senza lo stomaco peggiora, ma quasi tutto ciò che lo stomaco fa per noi non è indispensabile. «Quasi» è comunque una parola chiave, perché non significa «tutto». In assenza di intervento medico, la vita non può continuare senza il fattore intrinseco. Quest'ultimo si lega alla vitamina B12 che otteniamo dalla dieta. Questa reazione forma nello stomaco il complesso vitamina B12/fattore intrinseco, che non è digerito nell'intestino ma è riconosciuto molto tempo dopo la sua formazione da cellule specializzate presenti nella mucosa dell'ultima parte dell'intestino tenue, l'ileo. Quando queste cellule riconoscono il complesso vitamina B12/fattore intrinseco possono assorbire la componente vitaminica. In assenza del fattore intrinseco, a prescindere da quanta vitamina B12 ingeriamo, il suo assorbimento è impossibile. Considerato che la vitamina B12 è necessaria per il mantenimento di numerosi neuroni del cervello e del midollo spinale, oltre che per la formazione degli eritrociti, la carenza di questa vitamina è debilitante e infine mortale. La patologia risultante dalla carenza di vitamina B12 è chiamata *anemia perniziosa*, il nome più appropriato. L'anemia (insufficiente presenza di eritrociti) priva i tessuti dell'ossigeno lasciando le sue vittime in uno stato di perpetuo esaurimento. Come se non bastasse, la degenerazione dei neuroni, che non possono sopravvivere senza vitamina B12, causa perdita di sensibilità e paralisi.

La cosa interessante è che le stesse cellule (*cellule parietali*) che producono l'acido cloridrico, generano anche il fattore intrinseco. Queste due molecole sono compagne veramente bizzarre ed è curioso che abbiano origine da una sola cellula. Il fattore intrinseco è una proteina. Gli organelli necessari a fabbricare le proteine tendono a invadere l'interno di quasi tutte le cellule analogamente modificate per secernere le proteine. Le proteine devono essere codificate dal DNA, trascritte dall'RNA, sintetizzate sotto forma di catene assemblate di aminoacidi e trasferite in pacchetti racchiusi da membrane pronti per la secrezione. L'acido cloridrico è invece una molecola piccola che, in quantità pari a quelle presenti nello stomaco, è velenosa per tutte le cellule con cui viene a contatto. La cosa peggiore è che l'acido cloridrico è capace di diffondersi proprio attraverso le membrane cellulari. Immagazzinarlo in pacchetti avvolti da membrane fino al momento della secrezione è quindi assolutamente impraticabile. È chiaro che nessuna cellula può immagazzinare acido cloridrico alla sua concentrazione finale e sopravvivere. Le cellule parietali però non muoiono. Esse producono come per magia l'acido cloridrico e sopravvivono

anche se lo fanno tutti i giorni. Come?

La pompa e il pacchetto

Il fattore intrinseco è assemblato dentro le cellule parietali, conservato in piccoli pacchetti avvolti da membrane e secreto, ma l'acido cloridrico si forma all'esterno. La molecola di acido cloridrico contiene uno ione idrogeno e uno ione cloruro. Per produrre l'acido cloridrico del succo gastrico, le cellule parietali pompano gli ioni idrogeno dal sangue spingendoli nel lume dello stomaco. Gli ioni cloruro seguono il movimento dell'idrogeno producendo l'acido cloridrico al di fuori delle cellule in cui i due ioni si sono incontrati.

Il trucco consiste nel riuscire a pompare gli ioni idrogeno. Non si tratta di un compito facile. Gli ioni idrogeno portano una carica positiva. Muovere le particelle cariche è difficile perché s'influenzano l'una con l'altra. Le particelle con la stessa carica si respingono, mentre quelle con cariche opposte si attraggono. La cellula non può quindi semplicemente radunare un gruppo di ioni idrogeno caricati positivamente e spostarli da un posto all'altro. Per trasferire con successo una gran quantità di ioni idrogeno caricati positivamente da un lato all'altro della cellula, qualche altra particella con la stessa carica deve essere spostata dalla parte opposta per sostituire l'idrogeno. Senza questo contro-movimento, si accumulerebbe un eccesso di carica positiva nella sede di arrivo degli ioni idrogeno, mentre resterebbe un deficit di carica positiva nella sede di partenza. Questo tipo di spostamento di cariche non è in realtà possibile, perché le forze di attrazione e di repulsione esercitate dall'accumulo o dal deficit delle particelle cariche sono troppo forti per essere gestite dai sistemi biologici. Si dice che la natura detesti il vuoto, ma si oppone ancora di più allo spostamento di cariche. Ciò è vietato dalle leggi fisiche che governano la biologia.

Le cellule parietali riescono a evitare lo spostamento di cariche rendendo il pompaggio degli ioni idrogeno una semplice operazione di trasferimento. Le cellule scambiano ioni idrogeno con ioni potassio, che sono dotati di una carica positiva simile. Non appena gli ioni idrogeno si spostano dal sangue al lume dello stomaco, un movimento compensatorio di ioni potassio rifluisce in direzione opposta, dal lume dello stomaco al sangue. Di conseguenza, non si verifica alcuno spostamento di cariche. Lo scambio idrogeno-potassio è proprio il processo bloccato dall'omeprazolo. Quando si blocca questo processo, la produzione dell'acido subisce un'interruzione immediata.

Considerato che la concentrazione degli ioni idrogeno nel sangue è molto inferiore a quella richiesta nel lume gastrico, le cellule parietali pompano contro gradienti elettrici e chimici incredibilmente sfavorevoli. In termini di quantità di lavoro coinvolto, il pompaggio degli ioni idrogeno non è dissimile da quello necessario per risalire le cascate del Niagara con un barile. Lo sforzo è immenso, richiede il consumo di grandi quantità d'ossigeno, di megacalorie e la produzione di una quantità considerevole di molecole ad alta energia di ATP. L'ATP è il denaro che le cellule spendono per fare il lavoro.

La magia esercitata dalle cellule parietali è quella di secernere l'acido cloridrico senza doverlo contenere. Ciò che contengono invece è uno straordinario apparato che consente di generare

sufficiente quantità di ATP e una membrana abbastanza sviluppata da contenere le pompe ioniche necessarie. L'ATP proviene da numerosi mitocondri di grandi dimensioni; questi organelli consentono la respirazione, ovvero il processo mediante il quale si utilizza ossigeno per «bruciare» (senza vere fiamme) piccole molecole a base di carbonio per produrre l'ATP. Le pompe ioniche sono in realtà proteine incorporate nella membrana, che funzionano da enzimi (ATPasi) degradando l'ATP e utilizzando l'energia liberata da questa degradazione per trasportare gli ioni idrogeno e potassio in direzioni altrimenti impossibili.

È abbastanza sorprendente che due apparati così diversi, uno per la secrezione delle proteine (per produrre il fattore intrinseco) e l'altro per il trasporto di ioni idrogeno (per sostenere la produzione di acido cloridrico) si trovino nella stessa cellula. Nella maggior parte dei casi, le cellule sono state progettate dall'evoluzione per eseguire un solo compito di questo genere alla volta. Se ricevono un lavoro difficile da svolgere, esse solitamente si concentrano su quel compito. Considerato che le cellule devono anche tenersi in vita e funzionanti mentre sono affaccendate a tenere in ordine la casa, la maggior parte di esse perde la capacità di eseguire tipi molto differenti di compiti impegnativi a beneficio del corpo nel suo insieme. Per esempio, le cellule che producono pepsinogeno (note come cellule principali) e le cellule mucipare producono proteine da esportare e il loro aspetto ne rivela chiaramente la funzione. Né le cellule principali, né le cellule mucipare eseguono un qualsiasi altro compito disinteressato. Le cellule presenti nei dotti delle ghiandole salivari trasportano ioni e la loro struttura interna riflette quel ruolo e soltanto quello. Nel complesso, l'aspetto delle cellule parietali, con la loro grande quantità di mitocondri e la notevole estensione di membrane, è compatibile con la loro capacità di compiere il duro lavoro della cellula e trasportare ioni, ma ciò non indica che queste cellule producano il fattore intrinseco. Sebbene le cellule parietali debbano certamente contenere l'indispensabile macchinario per la biosintesi proteica, questo macchinario non è evidente. Il fatto che le cellule parietali producano il fattore intrinseco è rimasto quindi ignoto per parecchi anni, dato che l'apparato cellulare per la sintesi e la secrezione delle proteine era mascherato dalle modifiche ben più appariscenti della struttura interna della cellula deputate alla produzione dell'acido. Gli scienziati che osservavano la struttura fine delle cellule parietali delle ghiandole gastriche erano comprensibilmente fuorviati. Una funzione, la produzione di acido, era evidente, ma l'altra, la secrezione del fattore intrinseco, era nascosta.

Il pesce ripieno

Una delle prime prove che la stessa cellula è responsabile sia della produzione di acido cloridrico, sia della secrezione del fattore intrinseco, è stata fornita dall'associazione clinica dell'anemia perniciosa e dell'assenza di acido nello stomaco (*acloridria*). Molti pazienti che hanno perso la capacità di produrre acido gastrico sono colpiti dall'anemia perniciosa e molti fra quelli che soffrono di questa patologia non hanno acido nello stomaco. All'inizio, l'associazione fra carenza di vitamina B12 e acloridria era misteriosa. Il mistero è stato finalmente risolto quando si è chiarito che i pazienti con anemia perniciosa e acloridria non possedevano cellule parietali. Per ragioni ancora sconosciute, alcune persone producono auto-anticorpi che attaccano le membrane superficiali delle proprie cellule parietali. Alla fine, le cellule attaccate muoiono causando acloridria e anemia perniciosa. Considerato che le cellule parietali producono sia il fattore intrinseco, sia l'acido cloridrico, quando esse sono messe fuori combattimento cessa totalmente la produzione di entrambe le molecole.

Fortunatamente, questi pazienti sono trattabili. Essi sono in grado di sopravvivere senza acido gastrico ed è possibile somministrare loro la vitamina B12. La vitamina deve però essere iniettata perché, in assenza del fattore intrinseco che i pazienti non secernono, non è possibile ottenerne l'assorbimento. I pazienti imparano quindi a iniettarsi da soli la vitamina B12, proprio come i diabetici fanno con l'insulina.

L'anemia perniciosa mi riporta all'infanzia e a una persona che ho amato teneramente. Mia nonna, che è stata per me un sostituto di mia madre, ha sofferto di anemia perniciosa. Si prendeva cura di me quando la mia mamma lavorava. La politica era la vocazione di mia nonna, ma la cucina era il suo lavoro. Faceva una straordinaria torta al formaggio, produceva un eccezionale pane azzimo e nessuno poteva resistere al suo pesce ripieno. Il pesce fresco era un fattore fondamentale ed erano guai se non era perfetto. Nessuno sapeva quale proprietà dovesse avere il pesce per soddisfare mia nonna perché nessun altro assaggiava il pesce crudo. Mia nonna macinava e impastava il pesce, assaggiando la miscela finché raggiungeva le giuste proporzioni. Ripensandoci, mi rendo conto che proprio questo suo comportamento deve averla fatta ammalare. Il pesce crudo contiene una minaccia invisibile, il *Diphyllobothrium latum*, il cestode (tenia) dei pesci (e delle persone che consumano pesce).

Dopo molti anni passati a distribuire pesce ripieno a familiari e amici, la salute di mia nonna è peggiorata. Ha cominciato a lamentare debolezza e una sensazione sempre maggiore di fatica. Un brutto giorno è stata colpita da un tremendo dolore all'addome. Ha vomitato, è crollata sulla sedia e ha chiesto aiuto con voce flebile. I sintomi e i reperti clinici hanno condotto alla diagnosi di ostruzione intestinale. L'intervento chirurgico era obbligatorio. Per puro caso, l'analisi diagnostica preoperatoria dettagliata rivelò anche che mia nonna soffriva di anemia perniciosa, una condizione mai sospettata prima di allora e che comunque forniva certamente una spiegazione adeguata alla sensazione di stanchezza e debolezza da cui era colpita.

Sfortunatamente, i medici di mia nonna non compresero la relazione fra l'anemia perniciosa e

l'ostruzione intestinale. Erano inoltre troppo impegnati, troppo concentrati o forse troppo preoccupati per trovare il tempo di raccogliere l'anamnesi completa, che avrebbe potuto rivelare l'abitudine di mia nonna a mangiare pesce crudo. Il *Diphyllobothrium latum* era, infatti, la causa dell'ostruzione nell'intestino di mia nonna, che aveva prodotto, col passare degli anni, molte infornate di pesce ripieno.

Non era inoltre infestata da un solo verme, ma da numerosi esemplari. Alcune persone collezionano francobolli, lei purtroppo aveva collezionato *Diphyllobothrium latum*. L'intestino di mia nonna fu rimosso insieme da un chirurgo che era, immagino, abbastanza scontento al momento di ricucire. Il trattamento corretto era medico (pillole antelmintiche) e non chirurgico.

Nessun altro fra i consumatori del pesce ripieno prodotto da mia nonna si è mai ammalato. Noi ovviamente mangiamo pesce cotto. Lei tuttavia, nel compito zelante di mescolare gli ingredienti crudi, assaggiava le uova del cestode assieme al pesce. Il *Diphyllobothrium latum* compete con il suo ospite umano per la vitamina B12 e quando una persona è massicciamente infestata, i vermi possono vincere la gara. Sembra quindi che mia nonna abbia acquisito l'anemia perniziosa a causa di questi cestodi. Questo fenomeno è piuttosto frequente nelle massaie ebraiche che producono pesce ripieno e in quelle norvegesi che creano una leccornia simile chiamata *lütdefisk*. La malattia causata dal cestode del pesce è meno frequente di quanto può sembrare nella società americana moderna, senza dubbio perché il pesce ripieno fuoriesce più spesso da un vasetto comprato al supermarket che da una cucina. I libri di cucina e i ricettari stanno anche prendendo il posto della degustazione del pesce crudo come mezzo per stabilire le giuste porzioni.

Anche se mia nonna fosse stata curata per i suoi cestodi, la mancanza di acido nello stomaco e l'anemia perniziosa sarebbero rimaste. Sembra quindi plausibile che i vermi non abbiano causato alla fine l'anemia perniziosa sottraendole la vitamina B12. È probabile che la patologia autoimmune che uccide le cellule parietali fosse associata alla presenza dei vermi. Mia nonna è morta per una neoplasia gastrica, una patologia che si presenta spesso nelle persone colpite da anemia perniziosa e acloridria. Forse, nel suo caso, il *Diphyllobothrium latum* è stato tirato in ballo ingiustamente.

Le ghiandole

Le cellule parietali non si trovano solo sulla superficie visibile dello stomaco, ma sono anche mescolate alle cellule principali che producono il pepsinogeno, all'interno di profonde depressioni nella mucosa dello stomaco chiamate *ghiandole gastriche*. Sebbene queste ghiandole ([vedi figura](#)) si formino per invaginazione della mucosa dello stomaco, le cellule che si trovano nelle ghiandole stesse non sono uguali a quelle poste sulla superficie dello stomaco.

Le cellule superficiali dello stomaco, in tutte le sue regioni, sono coinvolte nella sopravvivenza e sono cellule mucose, che riversano all'esterno il gel mucoso alcalino. Le cellule responsabili della produzione dell'acido e della pepsina si trovano in profondità fra le ghiandole e solamente nelle ghiandole gastriche del fundus e del corpus. Le cellule parietali e le cellule principali si trovano in varie regioni delle stesse ghiandole. Le cellule parietali si trovano dappertutto nei colletti ghiandolari, mentre le cellule principali sono limitate alla loro base.

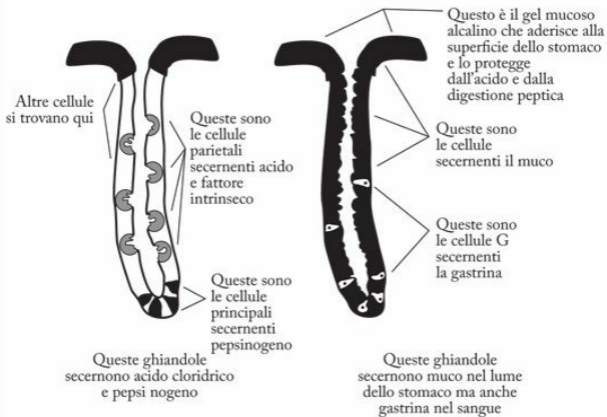
Le cellule principali hanno una struttura più comune di quelle parietali. Il ruolo primario delle cellule principali è quello di secernere una proteina ed è proprio ciò che fanno. Ciò che le cellule parietali posseggono in termini di mitocondri e membrane dotate di pompe ioniche, le cellule principali lo hanno in termini di RNA e membrane che producono i pacchetti proteici. Le cellule principali hanno forma piramidale. La base della piramide è stipata dall'apparato che produce e impacchetta le proteine, mentre l'apice è pieno di pacchetti di pepsinogeno avvolti da membrane. In assenza di cibo, le cellule principali stanno sedute come fucili carichi in attesa del segnale, fornito dai nervi sottostanti, per fare fuoco con le loro pallottole piene di pepsinogeno.

Curiosamente, sebbene il fundus e il corpus producano tutto l'acido cloridrico e la pepsina dello stomaco, in queste regioni avviene una digestione piuttosto limitata. Il fundus e il corpus sono responsabili per la maggior parte della capacità di immagazzinamento dello stomaco e sono molto bravi, in special modo il corpus, a macinare i bocconi di cibo. La maggior parte della digestione gastrica non ha luogo dove avviene la secrezione dei succhi fondamentali, bensì nella regione pilorica che funziona anche come «laboratorio» dove eseguire l'analisi chimica del contenuto gastrico. È qui che si controlla l'acidità del succo gastrico. Quando l'acidità dello stomaco è bassa, le cellule dell'antro secernono un ormone, la *gastrina*, che stimola le cellule parietali a produrre altro acido. Le cellule che producono gastrina sono chiamate, in modo abbastanza semplice, *cellule G*, quasi fossero agenti dell'FBI. Come le cellule parietali e quelle principali, le cellule G si trovano nelle ghiandole gastriche, ma quelle in cui risiedono sono solo le ghiandole della regione pilorica dello stomaco.

LE GHIANDOLE GASTRICHE

QUESTO È IL TIPO DI GHIANDOLE
CHE SI TROVA NEL FUNDUS
E NEL CORPUS DELLO STOMACO

QUESTO È IL TIPO DI
GHIANDOLE CHE SI TROVA
NELL'ANTRO PILORICO



A differenza delle cellule parietali e di quelle principali, le cellule G non secernono il loro prodotto nel lume dello stomaco. Al contrario, esse si affacciano all'altro lato delle cellule e secernono quindi nel circolo ematico. Non appena aumenta l'acidità all'interno dello stomaco, la secrezione di gastrina nel sangue diminuisce. È vero anche il contrario: non appena diminuisce l'acidità all'interno dello stomaco, aumenta la secrezione della gastrina nel sangue. Anche se l'antro pilorico non produce acido, esercita comunque attraverso le cellule G un forte controllo sul livello di acidità del succo gastrico. L'efficacia del sistema di controllo interno dell'acido gastrico è degna di nota. Le cellule G possono essere attivate da fattori diversi dalla presenza di acido nell'antro pilorico, incluso da ciò che mangiamo. Considerata la notevole capacità delle cellule G di attizzare le fiammate dell'acido gastrico, sarebbe forse meglio pensare

a ciò che si mette nel proprio stomaco. Ognuno di noi ha una curva di apprendimento particolare. Meno prove sono necessarie per imparare qualcosa, più ripida ed efficace sarà la curva di apprendimento. La maggior parte delle persone impara molto rapidamente cosa colpisce il proprio stomaco come una tanica di benzina. Questa particolare curva di apprendimento è molto ripida perché il rischio è alto. L'esempio del peperoncino messicano fa al caso nostro. Una fetta di troppo di pizza è sufficiente per mia moglie. Nessuno di noi ha bisogno di ripetere l'esperimento più volte prima di capire cosa evitare. È dannatamente piacevole deglutire certe cose, ma il dolore esofageo non vale proprio la candela.

La capacità dello stomaco di regolare la propria acidità può essere frustrante nelle persone che assumono antiacidi commerciali per neutralizzare la piroisi. Quando i prodotti chimici alcalini di queste preparazioni neutralizzano l'acido gastrico, le cellule G del soggetto possono agire in modo sleale riaccendendo le fiammate della piroisi. Le cellule G voltaggabbana rilevano la diminuzione dell'acido gastrico e secernono gastrina. La secrezione di gastrina aumenta la produzione dell'acido che sconfigge l'antiacido. Si stabilisce così un circolo vizioso. Possiamo assumere un altro antiacido. Ancora una volta, gli antiacidi cominciano a neutralizzare l'acido nello stomaco fornendo un sollievo istantaneo ma transitorio. Le cellule G rilevano la diminuzione d'acidità e secernono gastrina, lo stomaco produce altro acido e così via all'infinito. Ogni ciclo fa uscire altro denaro dalla banca degli amanti del calcio carbonato e dell'idrossido di alluminio e magnesio.

Fortunatamente, l'evoluzione si è dimostrata sorprendentemente piena di risorse nel costruirci. Per la nostra capacità di produrre acido cloridrico è come se fossimo continuamente seduti a cavalcioni di un vulcano. Abbiamo difese che ci proteggono dall'attacco devastante dell'acido e sono difese forti. Il gel mucoso alcalino è una formidabile barriera e il nostro sistema di riserva costituito da ghiandole agisce come una schiera di estintori per neutralizzare l'acido che fuoriesce fino all'esofago. Tuttavia, anche nel migliore dei casi, qualcosa può andare storto e inevitabilmente quindi lo fa. La vita è dura per le cellule che rivestono lo stomaco. Certe volte una di loro deve morire, nonostante tutte le precauzioni che l'organismo ha preso in loro difesa. Deve essere quindi messo in atto un meccanismo di salvataggio per affrontare la morte di questi buoni soldati. Non è che le spoglie abbiano bisogno di una sepoltura appropriata o qualcosa di simile. L'organismo agisce senza alcun sentimento. Le cellule morte cadono semplicemente nel lume dello stomaco e spariscono rapidamente nella piscina d'acido che le aspetta. Ciò che serve è un mezzo per «entrare nella breccia». Ogni cellula morta è una breccia potenziale nella linea di difesa dello stomaco. Da un lato della mucosa gastrica c'è una zuppa infernale di acido e pepsina, mentre dall'altro lato si trova il dolce e nutriente brodo che alimenta le cellule dell'organismo. Non è possibile consentire all'acido di fluire liberamente attraverso lo spazio creato dalla morte di una cellula della mucosa. Questa potenziale calamità non avviene perché le cellule adiacenti la cellula compagna morta riescono a chiudere rapidamente i varchi. Queste cellule recepiscono l'insorgere del problema, crescono rapidamente lanciando i propri corpi nel varco creato dalla perdita della cellula e si diffondono in tutto lo

spazio potenziale garantendo così la tenuta della mucosa gastrica.

La prontezza e la capacità di riempire i varchi delle cellule che rivestono lo stomaco sono stimulate dai segnali d'allarme provenienti dalle cellule sofferenti. Questi segnali appartengono a una classe di molecole chiamate *prostaglandine*. Esistono molte prostaglandine differenti caratterizzate da una grande varietà di compiti in organi diversi. Per esempio, esse fanno contrarre l'utero gravido e possono provocare l'aborto. Le prostaglandine inoltre causano un dolore percepibile in molte sedi diverse, come per esempio la testa e le articolazioni. Nello stomaco, però, le prostaglandine proteggono le cellule e sono quindi chiamate agenti *citoprotettivi* quando impiegati come farmaci. Se s'impedisce la produzione e l'attività delle prostaglandine, si può ottenere il sollievo dal dolore ma solo al prezzo di mettere in pericolo lo stomaco. L'ibuprofene e composti simili, appartenenti al gruppo dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), inibiscono la biosintesi delle prostaglandine e riescono quindi a rendere possibile la devastazione dello stomaco. Soprattutto quando utilizzati per lunghi periodi, possono produrre un'ulcera anche negli stomaci più in salute. Alcune persone, come per esempio i soggetti che soffrono di artrite reumatoide, devono assolutamente assumere FANS per vivere, altrimenti sperimenterebbero un dolore tale da paralizzarli. La somministrazione orale di un agente citoprotettivo può rappresentare la manna per queste persone. Essi possono avere la torta (sollievo dal dolore) e anche mangiarsela (libertà dall'ulcera). Sfortunatamente, le prostaglandine citoprotettive possono anche causare aborto e il tipo di persona che può avere bisogno di un farmaco citoprotettivo, come per esempio una donna artritica giovane che vive grazie ai FANS, è proprio il tipo di persona che può rimanere incinta.

Ricordo perfettamente un congresso dell'Advisory Panel on Gastrointestinal Drugs (Comitato consultivo sui farmaci gastrointestinali) della Food and Drug Administration (FDA), di cui sono stato membro. Ci fu chiesto di esaminare una prostaglandina citoprotettiva da utilizzare nei pazienti già in trattamento con i FANS. Il nostro congresso si aprì con la conferenza di un oratore fanatico dei diritti umani, che ci implorò di mettere al bando il farmaco. Secondo lui, il vantaggio di consentire il trattamento di donne giovani, consentendo loro di vivere e di farlo in assenza di dolori paralizzanti, era superato dal rischio di aborto. Egli prevedeva che il farmaco citoprotettivo sarebbe stato usato impropriamente da migliaia di giovani donne che volevano l'aborto e che migliaia di altre donne avrebbero subito involontariamente l'aborto essendo diventate gravide durante il trattamento con il citoprotettivo. Ho visto pochi sostenitori autodistruggersi tanto a fondo come quell'oratore. Egli si comportò semplicemente come un vero ideologo. Cercò di persuaderci, menti e alla fine ci minacciò. Le sue osservazioni finali furono pronunciate tranquillamente, ma ci colpirono come un tuono. Disse, semplicemente, «Sappiamo dove vivete».

Nonostante quest'avvertimento, con relativa minaccia implicita di lesioni personali, la nostra Commissione decise di non seguire la sua proposta. Consigliammo invece di distribuire il farmaco citoprotettivo, chiedendo però che l'uscita fosse accompagnata da severi controlli e da un'appropriata avvertenza sul foglietto illustrativo. La crudeltà verso le donne e la messa al

bando di farmaci efficaci e sicuri non sono azioni popolari nelle Commissioni della Food and Drug Administration. In effetti, gli agenti citoprotettivi non sono stati utilizzati in modo improprio. La dose che può causare aborto è molto più alta di quella che esplica l'azione citoprotettiva sullo stomaco. Inoltre, esistono modi migliori per indurre l'aborto, se proprio lo si desidera, che assumere una dose enorme di un farmaco citoprotettivo. Per di più, le donne la cui qualità di vita dipende dai FANS e dai citoprotettivi sono molto caute nell'iniziare un'eventuale gravidanza. La scelta di Hobson fra dare sollievo alle donne e proteggere i feti che, non solo non sono ancora nati, ma non sono neanche stati concepiti con certezza, è fortunatamente una scelta che non è necessario fare.

L'istamina

La secrezione di acido da parte delle cellule parietali non è solo il risultato di un dialogo tra le cellule G e l'acido nell'antro pilorico. Le cellule G hanno un ruolo importante nel gioco della regolazione acida, ma non sono le sole. Oltre alle cellule G, possono prendervi parte anche cellule specializzate del tessuto connettivo dello stomaco, denominate cellule simil-enterocromaffini, oltre ad alcuni neuroni.

Il secondo segnale inviato alle cellule parietali proviene dai mastociti. I mastociti inviano il loro segnale alle cellule parietali per mezzo dell'istamina, una molecola che ha raggiunto maggiore notorietà per gli starnuti, la respirazione difficoltosa e per il naso chiuso che causa, piuttosto che per il suo ruolo nella produzione d'acido. I recettori per l'istamina sulle cellule parietali non sono comunque gli stessi responsabili del disagio causato dal rilascio dell'istamina durante un attacco allergico o un raffreddore. Esiste una sola istamina, ma esistono tre tipi di recettori per l'istamina. La sofferenza che accompagna le allergie e il raffreddore è dovuta a un recettore dell'istamina chiamato H1. Le cellule parietali non esprimono H1 e non contribuiscono a scatenare i sintomi del raffreddore. Al contrario, le cellule parietali esprimono un altro recettore per l'istamina chiamato H2, che non ha nulla a che vedere con gli starnuti. Gli antistaminici contenuti nei farmaci per il raffreddore e nelle pillole per l'allergia bloccano i recettori per l'istamina, senza quindi alterare la produzione di acido. Il blocco dei recettori H2 è causato da una classe farmacologica completamente differente. Questi H2-bloccanti sono inutili nel trattamento del raffreddore da fieno, ma sono potentissimi nel ridurre l'acidità del succo gastrico. Esistono anche recettori per l'istamina H3 ma essi non influenzano le allergie, né la secrezione di acido. I recettori H3 si trovano sui neuroni e possono essere importanti nella comunicazione tra i sistemi nervoso e immunitario dell'intestino.

Secernendo l'istamina, i mastociti producono uno stimolo costante che favorisce la produzione di acido. Le cellule parietali reagiscono a questo tipo di stimolazione come gli adolescenti alla musica pop. Gli stimoli devono essere sempre presenti e, sebbene non provochino alcun effetto speciale, le cellule non possono funzionare senza di loro. Le cellule parietali hanno bisogno dell'azione in sottofondo dell'istamina per mantenersi sveglie. Questo requisito indica che gli H2-bloccanti, come per esempio la cimetidina, la ranitidina e la famotidina, hanno la meravigliosa capacità di disattivare le cellule parietali. Inibendo la spinta fornita dall'istamina, gli H2-bloccanti smorzano l'azione dei segnali, come per esempio la gastrina, che indurrebbe altrimenti le cellule parietali a secernere.

Gli H2-bloccanti hanno rivoluzionato il trattamento della patologia ulcerosa fin dalla loro comparsa, poiché hanno fornito un'alternativa all'intervento chirurgico (se ne parlerà più diffusamente più avanti). Gli H2-bloccanti sono farmaci rivoluzionari perché non solo riducono l'acidità del succo gastrico ma, al contrario degli antiacidi, la tengono bassa. Le ulcere hanno quindi la possibilità di guarire e i loro proprietari, per la prima volta, hanno ottenuto un mezzo per evitare il bisturi.

Gli H₂-bloccanti sono recentemente diventati farmaci da banco in USA. Il fatto di poter essere venduti senza prescrizione medica ha reso questi composti un'alternativa comune agli antiacidi. Ovviamente, i produttori di antiacidi non hanno fatto salti di gioia e si sono dati per morti, dal momento che una nuova classe di farmaci poteva sottrarre loro il mercato. Le varie pillole vendute per contrastare la pirosi sono ora impegnate in una feroce guerra commerciale dove ognuno pensa per sé. Entrambi i tipi di farmaco, gli antiacidi e gli antistaminici, sono relativamente sicuri ed efficaci. I sostenitori degli antiacidi spingono sulla rapidità con cui i loro prodotti forniscono sollievo, ma dicono poco o nulla sul sollievo a lungo termine. Gli amici degli antistaminici spingono sulla durata del sollievo procurato dai loro prodotti, ma dimenticano di dire quanto tempo ci vuole prima che il paziente osservi un miglioramento. Guardare la pubblicità alla televisione per ciascun tipo di composto è di per sé una forma di sollievo. È lo stesso tipo di sògo fornito da un bel combattimento di galli. La guerra alla pirosi è uno sport veramente spietato, che sfrutta la sofferenza di milioni di pazienti e che produce miliardi sia per le società vincenti, sia per quelle perdenti.

Il sistema nervoso e la produzione di acido

Il terzo segnale inviato alle cellule parietali è l'acetilcolina, che è rilasciata dal sistema nervoso. Questa consente alle cellule parietali di rispondere rapidamente e prontamente, attivandosi o disattivandosi quasi all'istante non appena cambiano le circostanze. L'istamina mantiene sveglie le cellule parietali, la gastrina fornisce un'azione lenta di tipo termostatico (che tende a mantenere l'acidità del succo gastrico relativamente costante), ma sono solo i nervi a fornire la flessibilità. I nervi innervano anche le cellule mucipare, rendendole capaci di adattarsi altrettanto rapidamente quanto le cellule parietali; quando l'acido si versa all'esterno, quindi, le difese fondamentali della mucosa gastrica possono essere immediatamente attivate. Il gel mucoso alcalino non è quindi come una poderosa linea Maginot.

L'input nervoso diretto alle cellule parietali è fornito in parte dal cervello e in parte dal sistema nervoso enterico. La semplice contemplazione di una bistecca può far diventare acido il lume del proprio stomaco. Si tratta della fase *cefalica* o *fase di testa* della digestione ed è la prova dell'entrata in azione del cervello. La presa di coscienza del pasto o anche solo della sua imminenza è sufficiente a stimolare e mettere in moto le cellule parietali. Pensate a una bistecca di manzo (o al tofu se siete vegetariani) e le vostre cellule parietali cominceranno a secernere. Mettete via il pezzo di carne (e/o tofu) e il vostro stomaco sarà comunque preparato a riceverlo, anche prima di averlo deglutito.

In alternativa, se deglutite qualcosa senza pensarci o se non sapete cosa state ingerendo, il vostro stomaco rileverà la presenza del cibo nella pancia e le cellule parietali produrranno l'acido. È il vostro sistema nervoso enterico al lavoro. La presenza di cibo nello stomaco scatena una risposta anche quando i nervi provenienti dal cervello (il nervo vago) sono stati recisi. La capacità dello stomaco di sapere cosa contiene e rispondere di conseguenza spiega senza dubbio perché i chirurghi potevano sezionare impunemente il nervo vago (per il trattamento delle ulcere) prima che fossero introdotti gli H2-bloccanti.

La resezione del nervo vago non era una follia dei chirurghi. È ovvio che l'ansia e non semplicemente la contemplazione della salsa bearnese può rendere lo stomaco più acido. La fase digestiva di testa può essere assimilata da un cervello nevrotico e far scorrere gli ioni di idrogeno. Ciò può anche sconvolgere enormemente lo stomaco e l'intestino. Le contorsioni e le torsioni dell'intestino eccitato inviano messaggi di ritorno al cervello e questi producono sensazioni che variano dalla presenza di «farfalle» e nausea nell'addome a crampi e dolore addominale esplicito. Una resezione prudente del nervo vago lascia il cervello libero di giocare i suoi giochi nevrotici senza coinvolgere l'intestino. I nervi agiscono direttamente sulle cellule parietali, che esprimono i recettori muscarinici per l'acetilcolina. (Sono proprio gli stessi recettori muscarinici stimolati dalla tossina dei funghi, la muscarina, quelli che hanno aiutato Sir Henry Dale a vincere il suo premio Nobel). Il collegamento fra acidità gastrica e ansia ha portato la gente a credere che la patologia ulcerosa fosse una malattia psicosomatica. Si riteneva che le ulcere fossero aperture praticate nella mucosa dello stomaco o dell'intestino dall'eccessiva

produzione di acido cloridrico e pepsina, prodotti rilasciati a causa di segnali aberranti inviati lungo il nervo vago da un cervello corrotto. In presenza di acido, la pepsina digerisce le proteine, cioè i costituenti della mucosa gastrica e intestinale. Ciò condusse a pensare che le ulcere fossero causate da pensieri nevrotici. La logica era impeccabile, anche se la conclusione era sbagliata.

Molte osservazioni, sia cliniche sia sperimentali, sembravano sostenere l'interpretazione psicosomatica della patologia ulcerosa. Per esempio, i pazienti che si sottopongono a procedure chirurgiche difficili o che soffrono di patologie da stress sviluppano spesso ulcere. Queste «ulcere da stress» sorgono spesso proprio in ospedale e costituiscono una preoccupante complicanza del trattamento. Negli studi sugli animali si è scoperto che i ratti sviluppano ulcere intestinali semplicemente se lasciati legati per una notte. Queste lesioni sono note come «ulcere da contenimento». Uno degli esperimenti più affascinanti sugli animali è quello che diventò noto come lo studio della «scimmia dirigente». Due scimmie furono fatte sedere su sedie sperimentali in cui potevano vedersi e comunicare l'una con l'altra. Un animale aveva accesso a una leva che, spinta nel giusto modo, *impediva* all'altro animale di ricevere scosse elettriche. Queste scosse erano fastidiose, ma non forti abbastanza da causare vero e proprio dolore o sofferenza. In ogni modo, nessuna scossa era fornita alla scimmia tramite la leva, a prescindere da come questa fosse utilizzata. L'esperimento fu progettato per causare ansia e ci riuscì. Le ulcere si formarono nell'intestino di una delle due scimmie ma non, come sembrava verosimile, in quello della scimmia che aveva ricevuto le scosse. Le ulcere si formarono nell'intestino della scimmia che agiva sulla leva. L'animale, caricato della responsabilità non voluta di prevenire la ricezione delle scosse da parte del compagno/a, sviluppò le ulcere.

Gli esperimenti effettuati su animali imprigionati (ratti, scimmie o altre specie) che causano simili sofferenze sono difficili da giustificare. Io non faccio ricerche di questo tipo, in parte perché le domande scientifiche che mi pongo trovano risposta con altri mezzi, ma anche perché non amo provocare dolore. I miei studi sono progettati per non causare sofferenza agli animali o all'uomo, a parte ciò a cui mi sottopongo personalmente per cercare di interpretare i risultati. Non condanno tuttavia sbrigativamente la ricerca condotta da altri ricercatori che provocano questo tipo di sofferenza agli animali, purché questa sia minima, di breve durata e possa essere annullata dagli animali non appena si verifica. La sperimentazione moderna sugli animali soddisfa questi criteri e nessuna rivista dovrebbe pubblicare i risultati se così non fosse. (Le ragioni per cui gli scienziati eseguono esperimenti con gli animali sono illustrate nella nota conclusiva).

È chiaro che sia nell'uomo, sia negli animali, un grave stress manifesto può causare la formazione di ulcere intestinali. Considerato che una violenza mentale grave può causare in modo dimostrabile l'insorgere di un'ulcera, i ricercatori hanno concluso (non correttamente, si scopri in seguito) che il livello minimo di stress associato all'ansia psiconevrotica dovesse ottenere lo stesso effetto. Vacanze, psicoterapia e tranquillanti sono diventati importanti complementi nel trattamento dell'ulcera. In pratica, era facile dimostrare che queste terapie

facevano meraviglie sull'umore, ma non era dimostrabile in modo convincente che guarissero le ulcere. Vacanze, psicoterapia e tranquillanti sono ancora trattamenti di moda, ma sono utilizzati oggi per trattare l'ansia e l'angoscia, non le ulcere.

Un famoso studio su un paziente di nome Tom, condotto parecchi anni fa, sembrò confermare direttamente l'ipotesi che le ulcere avessero un'origine mentale o psicosomatica. Tom aveva inolontariamente deglutito della lisciva e la lesione e la cicatrice che ne derivarono avevano otturato permanentemente il suo esofago. All'epoca della lesione, era impossibile sistemare o sostituire chirurgicamente l'esofago. Se tuttavia non si fosse fatto nulla, Tom sarebbe morto di fame. La soluzione fu di collegare lo stomaco di Tom alla parete addominale creando un'apertura permanente attraverso la quale il paziente potesse inserire del cibo. L'interno permanentemente visibile dello stomaco di Tom fornì inoltre ai ricercatori la possibilità di osservare lo stomaco al lavoro o immediatamente prima di mettersi all'opera. In questo modo si ottennero numerose e importanti informazioni sul processo digestivo.

Quando Tom era soggetto a uno stress psicologico, il suo stomaco diventava più acido ma, cosa ancora più interessante dal punto di vista della teoria della causa psicosomatica delle ulcere, la mucosa del suo stomaco sembrava divenire più fragile. La secrezione mucosa diminuiva e, spingendo una sonda sulla mucosa dello stomaco quando Tom era sotto gli effetti dello stress mentale, c'erano maggiori possibilità di causare un'emorragia. I ricercatori, per ovvie ragioni di decenza, non spinsero mai lo stress psicologico causato a Tom al punto di provocare effettivamente un'ulcera. Infatti, anche se Tom aveva sottoscritto il consenso informato, non credo che questi particolari esperimenti fossero morali. Provocare deliberatamente Tom, fargli subire uno stress e soprattutto compiere azioni ritenute dai ricercatori possibili cause d'ulcera non è sicuramente un'azione contemplata dal giuramento di Ippocrate. I medici non devono nuocere alla salute dei pazienti. Bisogna riconoscere che la terapia comporta sempre un rischio, ma assumersi un rischio mentre si cerca di curare è una cosa, un'altra è correre il rischio solo per ottenere informazioni. In ogni modo, i ricercatori pensarono realmente di aver trovato una prova inoppugnabile. Lo stress provoca le ulcere e perciò pensarono che, il caso fosse chiuso o qualcosa di simile.

Helicobacter pylori: le ulcere di origine infettiva

In base alle prove, alla ragione e alla tradizione, poche persone erano disposte a sfidare l'idea che le ulcere fossero sempre dovute a un'eccessiva produzione di acido gastrico indotta dallo stress. A generazioni di studenti di medicina e migliaia di uomini d'affari infelici fu detto che le ulcere dello stomaco o del duodeno erano i modelli archetipi della patologia psicosomatica. Ciononostante sebbene quasi tutti pensino che le ulcere derivino dall'ansia, la prova incontestabile di questa relazione causa-effetto non è facile da ottenere. Questa particolare patologia «psicosomatica», per esempio, è una di quelle molto resistenti al trattamento psicoterapeutico. I tranquillanti sono risultati più che altro capaci di far addormentare i pazienti piuttosto che di curare le loro ulcere. La conferma epidemiologica che l'ansia causasse l'ulcera era quindi tutt'altro che prossima. Oggi, dopo che ricerche controllate hanno sostituito il racconto aneddotico, l'epidemiologia della patologia ulcerosa ha suggerito l'opposto: l'ansia può essere una conseguenza, piuttosto che la causa, della maggior parte delle ulcere. I pazienti con ulcera erano spesso ansiosi, ma la teoria psicosomatica dell'origine ulcerosa richiedeva che l'ansia precedesse l'ulcera. L'ulcera può ovviamente rendere ansioso il paziente, ma ciò non significa che l'ansia sia la causa dell'ulcera.

Allo stesso tempo, i patologi scoprirono la presenza di batteri nelle lesioni ulcerose dei pazienti, ma tendevano a ignorarli. I batteri, dopotutto, potevano trovare un'apertura erosa nella mucosa dell'intestino e approfittarne per oltrepassarla. La mucosa dell'intestino costituisce di per sé una difesa contro le infezioni e quindi l'ulcera rappresenta un varco nel sistema difensivo dell'organismo. Comunque, dopo un accurato studio dei batteri (compiuto per la prima volta da B.J. Marshall nel 1984), risultò che questi non erano invasori opportunisti temporanei che capitavano per caso nello stomaco quando l'ulcera si formava. Se fosse stato così, si sarebbe dovuta trovare un'ampia varietà di microrganismi. Ogni germe che passasse da quelle parti avrebbe cercato di saltarci dentro. Al contrario, non è stata reperita una grande varietà di microrganismi. I batteri presenti nello stomaco e nell'intestino con ulcere erano quasi sempre appartenenti al genere *Helicobacter pylori*. Una volta compresa la correlazione, non ci volle molto a stabilire che *Helicobacter* non era uno spettatore che traeva vantaggio dalla patologia psicosomatica, bensì il principale colpevole.

Ora sappiamo che moltissime ulcere, probabilmente la maggior parte, non nascono semplicemente perché il cervello ha reso lo stomaco troppo acido. Le ulcere sono il sintomo di una patologia infettiva causata da *Helicobacter pylori*, un microrganismo particolare che riesce a evitare di essere ucciso dall'acido cloridrico dello stomaco. Il trattamento moderno delle ulcere include l'eradicazione di *Helicobacter*. Ciò è possibile associando un antibiotico appropriato a un farmaco che elimina l'acidità del succo gastrico. Per ragioni non ancora completamente chiarite, l'*Helicobacter* ha dimostrato maggiore vulnerabilità agli antibiotici quando lo stomaco è carente di acido. L'antibiotico claritromicina, per esempio, distrugge oltre il 90% di *Helicobacter* quando è associata con l'omeprazolo, che è anche più efficace degli H2-bloccanti

nell'inibire la secrezione acida. Molte sedute infruttuose sui lettini degli psicanalisti sono ora sostituibili con un solo proficuo viaggio in farmacia per acquistare claritromicina e omeprazolo.

Secondo le nostre attuali preoccupazioni sugli alti e crescenti costi dell'assistenza sanitaria, è interessante considerare come tali spese sono influenzate dalla felice applicazione della scienza alla semplice domanda di cosa controlla la secrezione dell'acido da parte delle cellule parietali dello stomaco. La patologia ulcerosa è un problema grave. Le ulcere causano sofferenza e dolore, anche intollerabili. La cosa peggiore è che esse possono sanguinare nell'intestino, causando emorragie gravi ma spesso non rilevate, ed erodere realmente l'intestino fino a perforarlo. La perforazione dell'intestino costituisce un'emergenza medica e, se non è corretta rapidamente ed efficacemente, può anche essere un evento letale. In effetti, a causa dell'infezione, la perforazione può essere fatale anche quando è corretta rapidamente ed efficacemente. Le ulcere non possono quindi essere ignorate e, una volta diagnosticate, vanno trattate. Sono anche assai diffuse, e si verificano in milioni di persone ogni anno. Ciò significa che le ulcere esercitano un'attrazione di risorse e causano un ricorso massiccio all'impiego del sistema sanitario.

I vecchi trattamenti farmacologici per la patologia ulcerosa non avevano un successo considerevole. Dato che si è ritenuto per lungo tempo che l'acido cloridrico e la pepsina fossero coinvolti nella digestione della parete intestinale per produrre l'ulcera, i primi trattamenti efficaci per le ulcere sono stati progettati per cercare di interrompere la secrezione di acido (senza il quale la pepsina non funziona). La capacità del sistema nervoso di indurre la secrezione di acido tramite il rilascio di acetilcolina è stato il primo meccanismo di regolazione scoperto, ma i farmaci che bloccavano l'azione dell'acetilcolina agendo sui recettori muscarinici non erano utili a trattare le ulcere. Questi farmaci non possono essere indirizzati a bloccare solo i recettori muscarinici sulle cellule parietali. Essi agiscono in tutto l'organismo. Quindi, quando sono somministrati in dosi sufficienti a impedire che i nervi stimolino la secrezione dell'acido gastrico, gli antagonisti muscarinici paralizzano praticamente l'intera sezione parasimpatica del sistema nervoso autonomo. Questo tipo di trattamento è peggiore della malattia. Come detto in precedenza, l'acetilcolina non è, senza dubbio, il solo segnale eccitatorio ricevuto dalle cellule parietali; inoltre, è l'istamina e non l'acetilcolina a fornire il tipo di stimolazione cronica che mantiene livelli elevati di produzione d'acido. L'acetilcolina produce per lo più picchi di acidità, piuttosto che livelli costantemente elevati. Considerato che prima dell'avvento degli H₂-bloccanti i farmaci non erano molto efficaci, non restava altro che inviare il paziente al chirurgo.

Furono concepiti numerosi interventi chirurgici per mitigare la patologia ulcerosa. Uno di questi, già menzionato in precedenza, consisteva nel recidere il nervo vago per scollegare l'intestino dal cervello. Una volta reciso il nervo vago, il cervello del paziente e relativo stomaco erano completamente indipendenti fra loro. Quindi, dopo l'intervento chirurgico, il cervello nevrotico avrebbe dovuto, almeno in teoria, essere libero di soddisfare la propria ansia senza obbligare il suo proprietario a pagare un prezzo in termini di acidità di stomaco. Fortunatamente, il sistema nervoso enterico continua a funzionare una volta scollegato il

cervello. È possibile quindi recidere il nervo vago senza uccidere il paziente.

Un altro approccio chirurgico consisteva nella rimozione dell'antro pilorico. Quest'intervento lasciava intatta la porzione dello stomaco che produce l'acido, ma tagliava fuori il laboratorio chimico che analizza l'acidità del succo gastrico, eliminando così la secrezione a feedback della gastrina. Quando tutti questi metodi fallivano, i chirurghi rimuovevano le regioni dello stomaco che producono l'acido (il fundus e il corpus) o l'intero organo. I pazienti sopravvivevano quindi con iniezioni giornaliere di vitamina B12 e molti piccoli pasti.

Nessun intervento chirurgico era piacevole. Tutti lasciavano nei pazienti quanto meno un certo grado di menomazione e tutti comportavano gravi complicanze, come emorragia e infezioni postoperatorie, che si verificavano in alcuni pazienti anche quando la chirurgia era stata eseguita con grande competenza. Inoltre, la chirurgia era sempre molto costosa e non diventava più economica con il passare del tempo. Più si riflette sugli interventi chirurgici e sulle rozze procedure di correzione delle lesioni intestinali che erano pratica comune, più si apprezza l'era moderna.

L'introduzione degli H2-bloccanti ha dato inizio al declino della chirurgia, lo sviluppo degli inibitori di pompa dell'idrogeno, come per esempio l'omeprazolo, hanno favorito questa via e la scoperta del ruolo di *Helicobacter pylori* ha reso rara e quasi obsoleta la chirurgia per la patologia ulcerosa. Indubbiamente, la gente che salda le fratture per i trattamenti sanitari dovrebbe ringraziare il Creatore per questi progressi prima di addormentarsi la sera. L'esborso di piccole quantità di denaro per la ricerca, che ci ha fornito gli H2-bloccanti, gli inibitori di pompa dell'idrogeno e gli antibiotici che sopprimono *Helicobacter pylori*, ha risparmiato alla società miliardi di dollari in termini di costi sanitari e una quantità incalcolabile di dolore e sofferenza. L'impegno a ripristinare l'autostima nei pazienti che scoprivano di non essere in fondo nevrotici e questo progresso nella medicina possono essere definiti semplicemente rivoluzionari.

Mia madre: una storia clinica della rivoluzione nel trattamento dell'ulcera

Sfortunatamente, la mia povera mamma è vissuta e morta prima che la rivoluzione raggiungesse i suoi medici. La piroisi e il dolore dell'addome superiore hanno accompagnato tutta la sua vita. Erano sempre presenti, una parte di lei, come il suo amore per la buona musica, le belle arti e la famiglia. Si lamentò raramente della dispepsia, ma la si sarebbe potuta facilmente intuire dalla frequenza con cui assumeva antiacidi. La mamma non corresse mai alla tipica vittima dell'ulcera. Era tutto fuorché un tenace dirigente e, infatti, fino all'ultima parte della sua vita, i raggi X non rivelarono mai la presenza di un'ulcera tanto da mettere sul chi vive un chirurgo. Ciononostante, lo stomaco della mamma aveva una notevole tendenza al sanguinamento. Fortunatamente, mi trovai vicino a lei la maggior parte delle volte in cui accadde. Diventava pallida e collassava. La prendevo nel migliore dei modi e la portavo al New York Hospital, dove le diagnosticavano un'emorragia trasfondendo poi una quantità di sangue adeguata a ripristinare il suo stato di salute. Dopo l'arresto dell'emorragia, la dimettevano con un trattamento che includeva un H₂-bloccante. Una volta di nuovo a casa, assumeva puntualmente tutte le pillole fino a svuotare il flacone; quindi, dato che si sentiva perfettamente bene, si dimenticava dell'emorragia e delle sue pillole finché, comprensibilmente, cominciava di nuovo a perdere sangue.

L'ultima volta che lo stomaco della mamma iniziò a sanguinare non ero vicino a lei. Stavo tenendo una conferenza a un congresso in Florida. In precedenza, aveva sviluppato la malattia di Alzheimer e non era più al massimo delle sue capacità intellettive. Tuttavia, nonostante il declino della sua vivacità mentale, fronteggiava abbastanza bene la malattia e riusciva ancora a preparare i pasti per se stessa e per mio padre. Mia moglie e io visitavamo frequentemente i miei genitori e i miei figli si assicuravano di includere la nonna nei loro programmi. La qualità di vita della mamma era relativamente ben mantenuta, nonostante la malattia di Alzheimer, quando mio padre la trovò a terra priva di sensi sul pavimento della cucina. Non sapendo cos'altro fare, chiamò un amico di famiglia che fortunatamente era medico. Costui capì cosa stava succedendo e fece la stessa cosa che avevo fatto io in occasioni simili, eccetto che questa volta portò mia madre in un ospedale diverso, il St. Luke's Roosevelt.

Come nelle precedenti occasioni in cui avevo portato mia mamma al New York Hospital, fu fatta anche al St. Luke's Roosevelt la diagnosi di emorragia gastrica, cui seguì la somministrazione di un'adeguata trasfusione di sangue e H₂-bloccanti. Mia mamma riprese i sensi e le sue condizioni si stabilizzarono, sebbene fosse ancora ovviamente confusa e spaventata da quello che era successo. Questa volta, tuttavia, nonostante la somministrazione degli H₂-bloccanti, l'emorragia gastrica non si fermò. Furono necessarie più trasfusioni per mantenerla in vita.

Ritornai a casa il giorno successivo e parlai con un chirurgo che era impaziente di operare. Mia madre tuttavia era stata terrorizzata dalla chirurgia fin dalla morte di mia nonna, morte che

aveva imputato all'intervento chirurgico piuttosto che alla neoplasia gastrica che il chirurgo non era stato in grado di trattare. La sua opposizione all'intervento chirurgico fu tuttavia giudicata irrazionale dai medici e, considerata la sottostante patologia di Alzheimer, si ritenne che non sarebbe stata in grado di fornire il consenso informato, che fu chiesto a mio padre, ma egli decise di non fare nulla finché non avesse potuto parlare con me.

Casualmente, la mia appartenenza all'Advisory Panel on Gastrointestinal Drugs della FDA coincise con la richiesta da parte di Astra-Merck di approvare l'omeprazolo per il trattamento delle ulcere. In particolare, il Comitato mi chiese di esaminare i dati sulla sicurezza dell'omeprazolo. Non c'erano mai stati problemi per quanto riguardava la sua efficacia. Era quindi un piacere esaminare i dati su questo aspetto del farmaco. Spesso esaminavamo i dati di composti che producevano un vantaggio piccolo o nullo rispetto al placebo. Al contrario, l'omeprazolo non solo superava il placebo ma addirittura anche gli H2-bloccanti nei saggi in parallelo. L'omeprazolo non si limita a inibire semplicemente la produzione di acido gastrico; la fa cessare del tutto. Una volta esposta a una concentrazione adeguata di omeprazolo, la cellula parietale non può secernere acido, a prescindere da quanto forte sia lo stimolo che essa riceve. Vennero sollevate perplessità alla FDA per quanto riguarda la sicurezza dell'omeprazolo, ma fu assolutamente chiaro che non s'era mai visto prima qualcosa che bloccasse la secrezione acida come l'omeprazolo. Una volta che il nostro Comitato consultivo decise che era sicuro per l'uso a breve termine, fummo felicissimi di consigliarlo.

Dopo questo lavoro svolto per la FDA, quando andai a parlare, al chirurgo pensavo ovviamente all'omeprazolo. Gli suggerii quindi di prendere in considerazione una sperimentazione clinica terapeutica con l'omeprazolo prima di ricorrere a ciò che ritenevo potesse costituire un rischio e tentare l'intervento su una paziente, che era terrorizzata dalla chirurgia. Non ero preparato alla sua risposta. Egli mi disse che l'omeprazolo era un farmaco nuovo e costoso e che non poteva essere utilizzato senza il parere favorevole del comitato ospedaliero, che era stato formato per contenere i costi. Ovviamente, feci notare che il costo dell'omeprazolo era insignificante quando confrontato a quello dell'intervento chirurgico. Il chirurgo quindi avanzò l'opinione che essendo io uno scienziato di base e non un medico praticante, mostravo insolenza nel contestare il suo giudizio clinico. Egli concluse chiedendomi cosa mai potevo sapere sull'omeprazolo. Così glieli dissi. Considerato che avevo recentemente esaminato l'intera letteratura mondiale sul farmaco, mi ci volle un po' di tempo per farlo. Una volta finito, sembrò meno certo della mia insolenza e promise di ottenere il consenso dal comitato per sperimentare l'omeprazolo. In compenso, promisi di consentire l'intervento chirurgico se la corretta sperimentazione dell'omeprazolo non fosse riuscita a interrompere l'emorragia di mia mamma.

In definitiva, l'omeprazolo non fu mai utilizzato. Quando visitai mia madre quella notte, scoprii che in una vena scorreva la stessa vecchia inutile infusione di H2-bloccanti e nell'altra una trasfusione di sangue. Inoltre, a mio padre era stato detto che suo figlio voleva uccidere sua moglie rifiutando il consenso all'esecuzione del fondamentale intervento chirurgico. Mio padre,

spaventato, e intimorito dall'esibizione del potere medico, aveva firmato il modulo di consenso. Il bestione malefico stava avanzando inesorabilmente e l'intervento chirurgico era stato programmato.

La mamma non si riprese mai dall'anestesia. La sua pressione ematica crollò durante l'intervento e probabilmente subì un ictus sul tavolo operatorio. Visse in casa per altri sei mesi, ma l'esito non fu piacevole. Questo tipo di vita si chiama stato vegetativo. I nipoti e la famiglia andavano ancora a farle visita, ma lei non lo seppe mai. Mio padre la coccolò amorevolmente tutte le notti, ma lei non sembrava provarne piacere. Ogni tanto, urlava come se provasse dolore, ma non disse mai una parola. Morì in casa, più rapidamente di quanto credo avesse desiderato e in circostanze peggiori di quanto avrebbero potuto essere. È veramente un peccato che la mamma abbia perso la rivoluzione nel trattamento dell'ulcera. Oggi, ogni organizzazione che si preoccupi dei costi sanitari sa che l'omeprazolo è meno costoso dell'intervento chirurgico.

6. *Avanti e in basso*

In ogni organismo, il cervello è il Re. Ogni suo ordine è legge. Alla sommità dell'intestino, il ruolo del Sovrano è accettato, ma non appena si scende sempre più nelle profondità di quest'organo, il ruolo del Monarca s'indebolisce. Emerge un nuovo ordine: quello del secondo cervello. Dalla bocca fino a metà dell'esofago, non si muove praticamente nulla che non abbia avuto l'autorizzazione a procedere dal cervello. I segni del primo tentativo di comando della parte inferiore si manifestano nei movimenti peristaltici della parte inferiore dell'esofago, che richiedono la partecipazione del sistema nervoso enterico per essere del tutto normali. L'autorità centrale del Re riprende a livello dello sfintere esofageo inferiore, ma solo temporaneamente.

Nello stomaco l'ordine del sistema nervoso centrale è ancora importante e assume la forma di ordini trasmessi dal nervo vago, che attuano le disposizioni del cervello. Il secondo cervello, tuttavia, è a questo punto un fattore potente e nel caso in cui si perdessero i comandi provenienti dal cervello, il sistema nervoso enterico è pronto e capace di assumere la direzione delle operazioni. Ciò significa che esso può dirigere tutti gli aspetti delle operazioni eccetto la gestione dello sfintere pilorico, che stranamente è lasciata ancora al cervello attraverso il nervo vago. Scendere sotto lo sfintere pilorico (l'uscita dello stomaco) significa tuttavia spostarsi quasi oltre l'area d'influenza del Re. Questo è il territorio del sistema nervoso enterico, dove il cervello può esercitare solo effetti quantitativi senza poter assumere decisioni fondamentali come cosa fare e quando. Si tratta di una regione autonoma che tiene poco conto del cervello ed è felice di fare completamente a meno di lui. L'autorità centrale del cervello toma a essere influente dopo che si arriva, nel colon, a livello del retto e dell'ano.

Lo sfintere pilorico

Una volta che il cibo è stato sufficientemente polverizzato, sterilizzato e parzialmente digerito nello stomaco, è fatto passare nell'intestino tenue in quantità sufficientemente ridotte da poter essere gestite da quell'organo. Lo svuotamento è quindi un atto che lo stomaco esegue con notevole delicatezza. Lo stomaco alimenta il duodeno (la regione dell'intestino tenue contigua allo stomaco) come una madre il suo bambino. Il cibo si trasforma in nutrimento e viene distribuito in minuscoli bocconi per bambini. La sofisticazione dello svuotamento gastrico coinvolge la singolare collaborazione tra il sistema nervoso enterico e il sistema nervoso centrale. Il processo di distribuzione è diretto dal sistema nervoso enterico, ma il cancello attraverso cui tutto passa è controllato del cervello.

L'apertura e la chiusura della porta attraverso cui passa il cibo che va dallo stomaco al duodeno sono governate da cellule muscolari specializzate che circondano l'intestino. La struttura formata da queste cellule, lo sfintere pilorico, fa all'uscita dallo stomaco quello che il LES fa al suo ingresso. Quando lo sfintere pilorico è chiuso, mantiene il contenuto dello stomaco separato dal duodeno. Quest'azione è fondamentale, perché la mucosa del duodeno non è capace di resistere alla digestione dell'acido gastrico e della pepsina quanto la mucosa dell'esofago. In effetti, la mucosa del duodeno è probabilmente anche meno resistente perché più sottile rispetto a quella dell'esofago. La natura corrosiva dell'acido gastrico fa sì che lo sfintere pilorico debba mantenere necessariamente il succo gastrico nello stomaco da cui proviene, eccetto per i momenti brevi e inevitabili in cui lo sfintere deve aprirsi per consentire il passaggio del cibo.

I segnali nervosi che regolano la muscolatura dello sfintere pilorico sono trasportati al cervello e viceversa dal nervo vago. Questi nervi portano le informazioni necessarie affinché il cervello decida quando è ora di aprire lo sfintere nello stomaco. Il cervello decifra i messaggi provenienti dallo stomaco, li elabora e invia il comando appropriato per far aprire lo sfintere. Una volta che il cibo è passato attraverso, il cervello ne è nuovamente informato e ordina allo sfintere di chiudersi. La natura critica del ruolo giocato dal cervello nel regolare l'azione dello sfintere pilorico fa sì che lo stomaco abbia un sacco di problemi quando si recide il nervo vago. Fondamentalmente, lo sfintere rimane paralizzato in posizione chiusa e il povero stomaco non è più in grado di svuotarsi. Ovviamente, uno stomaco che non si svuota non è solo fastidioso per il suo proprietario ma è incompatibile con la vita.

Fortunatamente, il problema della paralisi dello sfintere pilorico associato alla resezione del nervo vago può essere corretto con una procedura chirurgica nota come *piloroplastica*, un eufemismo per indicare la distruzione virtuale dello sfintere pilorico. Ma, miracolosamente, lo stomaco si adatta più che bene a quest'insulto. Una volta assicurato il drenaggio verso l'intestino tenue, il sistema nervoso enterico regola autonomamente la velocità di svuotamento gastrico. Anche se totalmente privo di assistenza da parte del cervello, quindi, lo stomaco continua a mantenere le sue funzioni. La produzione di acido continua secondo il fabbisogno, lo

stomaco continua a immagazzinare il cibo quando si consumano buoni alimenti solidi e le particelle alimentari continuano a essere trasformate in quel tipo di nutrimento che il duodeno può tollerare. Fatto ancora più notevole, anche alla presenza di una via di drenaggio apparentemente aperta, lo stomaco trattiene in parte il proprio contenuto, lasciandolo uscire solo a una velocità ancora tollerabile per l'intestino tenue.

Anche in circostanze normali, quando il sistema nervoso enterico, il cervello e lo sfintere pilorico funzionano alla perfezione, l'acido costituisce un problema per il duodeno. Questo problema è simile a quello che deve affrontare l'esofago, ma è più grave e richiede una soluzione più complessa. Se il LES fa il suo lavoro, la quantità di succo gastrico che rifluisce nell'esofago è molto ridotta. D'altra parte, neppure il rendimento ottimale dello sfintere pilorico può impedire all'acido gastrico di accompagnare il cibo che passa il duodeno. La differenza tra i due sfinteri è semplicemente una questione di direzione. Il cibo si sposta dall'esofago allo stomaco e, quindi, un LES ben disposto deve, per prevenire pirosi e lesioni esofagee, impedire il reflusso del succo gastrico. Il duodeno tuttavia è il collettore naturale in cui drena lo stomaco e deve quindi accettare tutto ciò che quest'ultimo gli invia. Ciò significa che il duodeno deve tenersi il cattivo (acido) e il buono (cibo elaborato dallo stomaco). Il lavoro numero uno per il duodeno è quindi quello di neutralizzare l'acido che lo stomaco gli scarica dentro ed è un compito che deve eseguire rapidamente.

Il nuovo mondo dell'intestino tenue

La soluzione alla presenza dell'acido attuata dallo stomaco, il gel alcalino resistente che riveste la sua mucosa, non è una soluzione applicabile nel caso dell'intestino tenue. La digestione è terminata nell'intestino tenue e qui avviene l'assorbimento. Entrambi questi compiti sono a carico delle cellule che rivestono il lume dell'intestino tenue e richiedono, in effetti, la partecipazione attiva della loro membrana di superficie. La mucosa intestinale non può quindi essere coperta da un rivestimento adesivo mucoso, anche se questo assicurerebbe la necessaria protezione. La superficie dell'intestino tenue costituisce la sua fondamentale area di lavoro e deve essere mantenuta sgombra e pulita. Il gel mucoso alcalino che impedisce la digestione della mucosa gastrica termina quindi a livello dello sfintere pilorico. Una volta attraversata quella porta, si trova un nuovo gruppo di cellule e la struttura dell'intestino cambia di colpo.

La maggior parte delle cellule che rivestono l'intestino tenue è specializzata per affrontare solo la digestione e l'assorbimento ed è quindi indifesa nei confronti dell'acido gastrico. Queste cellule e il duodeno nel suo insieme hanno bisogno d'aiuto. Infatti, sebbene l'intestino tenue sia la sede in cui ha termine il passaggio della maggior parte dei nutrienti, l'organo non può produrre tutto ciò che gli serve per compiere il suo lavoro. L'aiuto necessario a neutralizzare rapidamente l'acido gastrico che giunge dallo stomaco assieme al cibo è fornito da ghiandole accessorie. Queste ghiandole forniscono anche gli enzimi che gestiscono la maggior parte della digestione. Le stesse cellule dell'intestino tenue devono solo applicare i ritocchi finali, piccoli ma necessari. Fornito il giusto ambiente, che è fondamentale, queste cellule sono estremamente abili a compiere questo lavoro.

Il pancreas

Le ghiandole annesse principali sono il pancreas e il fegato. Il pancreas è allo stesso tempo il protettore dell'intestino, il fornitore del tipo di ambiente in cui devono funzionare gli enzimi digestivi e il produttore degli enzimi digestivi. Nel tempo libero il pancreas secreta anche ormoni (*insulina* e *glucagone*) nel circolo ematico. Questi ormoni regolano il livello glicemico. La capacità del pancreas di produrre enzimi è impressionante. Quasi tutto quello che mangiamo può essere digerito da almeno uno degli enzimi prodotti dal pancreas.

Le cellule pancreatiche che producono e secernono gli enzimi digestivi formano piccoli agglomerati a grappolo all'estremità di complesse gallerie, o dotti, molto ramificati. Questi dotti trasportano verso il duodeno gli enzimi pancreatici appena secreti. Gli specialisti definiscono *esocrine* le ghiandole fornite di dotti per distinguerle da quelle che ne sono prive, che sono chiamate *endocrine*. Le ghiandole esocrine secernono sempre sulle superfici corporee, come per esempio quelle dell'intestino, delle vie respiratorie o della pelle. Le ghiandole endocrine secernono sempre nel torrente ematico ed è proprio per questo che non sono fornite di dotti. Il pancreas ha quindi una doppia personalità poiché è capace di seguire entrambe le vie, esocrina ed endocrina. Le ghiandole endocrine del pancreas sono denominate, in modo alquanto pittoresco, *isolotti di Langerhans*. Se si perde il pancreas esocrino, si muore di fame, a meno che non si assumano enzimi pancreatici con il cibo. Se si perdono gli isolotti, si è colpiti dal diabete.

I dotti del pancreas fanno molto più che far semplicemente affluire gli enzimi che le cellule esocrine delle ghiandole scelgono di secernere. I dotti sono essi stessi secernenti; tuttavia, invece di enzimi, le cellule duttali producono un fluido acquoso alcalino in grado di neutralizzare l'acido che accompagna il cibo nel duodeno. Il pancreas divide quindi le proprie funzioni tra le sue varie cellule. Le cellule poste all'estremità dei dotti producono gli enzimi, mentre quelle che rivestono i dotti producono il succo che fornisce l'ambiente in cui questi enzimi possono funzionare. Sia gli enzimi sia il fluido in cui lavorano sono secreti nel lume del duodeno, dove incontrano il cibo parzialmente digerito fornito dallo stomaco.

Per aiutare il pancreas ad affrontare l'acido gastrico la parete del duodeno è dotata in modo esclusivo di un altro gruppo di ghiandole (note come *ghiandole di Brunner*) che producono anch'esse un succo alcalino. Ghiandole simili non si trovano in nessuna regione dell'intestino tenue ma, del resto, in nessun altro luogo esiste una minaccia comparabile. Il sistema intestinale sembra avere incorporato una quantità sovrabbondante di meccanismi di protezione automatici ogni qualvolta i costi di un guasto possano essere considerati intollerabili. Le ghiandole di Brunner illustrano questo principio. L'ingegnosità del progettista dell'intestino è veramente impressionante.

L'organizzazione della difesa duodenale

Per poter eliminare efficacemente l'acido, non basta semplicemente secernere nell'intestino una base (altrimenti detta alcali) che è l'esatto opposto dell'acido. Il duodeno deve agire in modo più ingegnoso. E proprio ciò che avviene e quest'organo affronta il problema procuratogli dallo svuotamento dello stomaco più o meno come Hegel affrontava la filosofia. In primo luogo esiste la tesi (acido) poi l'antitesi (base) e infine la sintesi (neutralità). Ovviamente, per ottenere la neutralità è necessario conoscere quanto acido è presente all'inizio, in modo da poter secernere solo la giusta quantità di base. Una soluzione troppo alcalina è altrettanto corrosiva per i tessuti quanto una troppo acida. L'acido gastrico potrebbe essere eliminato, per esempio, secernendo l'equivalente biologico di uno sturalavandini chimico, ma senza liquefare la parete del duodeno. Il duodeno ha quindi elaborato un sistema di sensori che misura il grado di acidità o alcalinità (una misura chiamata *pH*) del lume intestinale. Questi sensori comunicano sia con le cellule endocrine, sia con i nervi (intrinseci ed estrinseci) i quali, a loro volta, regolano la secrezione dell'acido e degli alcali. Quando l'interno del duodeno è diventato acido, le cellule secernono alcali inibendo allo stesso tempo lo svuotamento dello stomaco. Quando il lume diventa neutro o alcalino, si interrompe la secrezione degli alcali, annullando allo stesso tempo l'inibizione allo svuotamento gastrico. Il duodeno può ora accettare un'altra erogazione dallo stomaco, mentre lo sfintere pilorico si apre di nuovo brevemente per lasciar passare una quantità di succo gastrico leggermente più acido. Il ciclo di svuotamento gastrico avviene quindi con brevi erogazioni ripetute finché lo stomaco non ha più nulla da distribuire.

È fondamentale regolare alla perfezione il pH, non solo per proteggere la parete duodenale, ma anche per mettere a punto l'ambiente in cui operano gli enzimi pancreatici. A differenza della pepsina, che è utilizzata dallo stomaco e richiede un ambiente molto acido in cui funzionare, gli enzimi pancreatici operano solo quando il pH è quasi neutro o leggermente alcalino. Essi sono letteralmente demoliti dall'esposizione agli acidi, senza alcuna possibilità di recupero.

I dettagli su come il duodeno rileva il pH nel suo lume e organizza la secrezione degli alcali non sono del tutto chiari. Il processo coinvolge in parte la secrezione di un ormone, la *secretina*, che fu, per inciso, il primo ormone in assoluto a essere scoperto. La secretina è prodotta dalle cellule della mucosa duodenale le quali, analogamente alla controparte che secerne la gastrina nell'antro pilorico, liberano il loro prodotto nel sangue. Le cellule che secernono la secretina sembrano essere direttamente sensibili all'acido che rilevano nel lume. Le cellule del dotto pancreatico sono i bersagli della secretina tramite il circolo ematico e, quindi, gli alcali fluiscono molto rapidamente nel duodeno dai dotti pancreatici non appena aumenta il livello di secretina nel sangue.

Sebbene il ruolo assunto dalla secretina nella regolazione del pH del lume duodenale sia indubbiamente importante e nonostante la secretina sia giustamente famosa per questa sua attività, quest'ormone non è l'unico musicista di questa particolare orchestra. La complessità di mantenere la coordinazione fra secrezione acida nello stomaco, aprire lo sfintere pilorico, erogare

il contenuto gastrico e controllare il pancreas (e le ghiandole di Brunner) per secernere alcali sufficienti per portare il pH del contenuto duodenale vicino alla neutralità, va molto oltre le possibilità di una singola cellula o ormone. Questo tipo di compito richiede l'intervento del sistema nervoso. È ovvio che il sistema nervoso interviene, ma il suo modo di agire non è altrettanto evidente in questo caso. Il cervello prende parte all'apertura dello sfintere pilorico, ma una volta che quest'ultimo è stato bypassato da un ingegnoso intervento chirurgico, il cervello non è più necessario. La regolazione, anche dopo l'esclusione del cervello, è portata a termine senza difficoltà dal sistema nervoso enterico. L'intestino pensieroso va avanti ma la modalità di funzionamento dei nervi dell'intestino è il soggetto delle ricerche in corso. Inoltre, bisogna capire che il sistema nervoso enterico è un attore che sta cercando di emergere. Solo di recente è divenuto così famoso.

La bile

Il fegato è la seconda ghiandola annessa principale. Quest'organo svolge molti compiti nell'organismo, la maggior parte dei quali non è direttamente correlata alla digestione. Una delle funzioni più evidenti del fegato è tuttavia quella di secernere la *bile*, sostanza che lascia il fegato attraverso un sistema di dotti. La produzione della bile è solo uno dei compiti necessari che il fegato svolge per noi, ma quando comincia non si ferma più. La bile è secreta continuamente dall'organo. La produzione costante della bile è necessaria perché questa è, in parte, un'attività escretoria, ovvero una forma di rimozione dei rifiuti. I materiali di scarto idrosolubili possono essere filtrati dai reni ed eliminati nell'urina. Quelli che non sono idrosolubili non possono essere filtrati dai reni e devono essere eliminati in altro modo. Il fegato trasporta molti di questi prodotti di scarto verso la bile e in questo processo li converte in molecole più o meno solubili. Il caratteristico colore verde della bile, per esempio, deriva dai detriti molecolari risultanti dalla distruzione dei vecchi eritrociti, difettosi e logori (un lavoro che il fegato condivide con la milza). Dato che la bile fluisce nell'intestino, lo sgradevole rifiuto molecolare, se non è riassorbito, è infine evacuato con le feci, il cui colore marrone deriva proprio dalla bile.

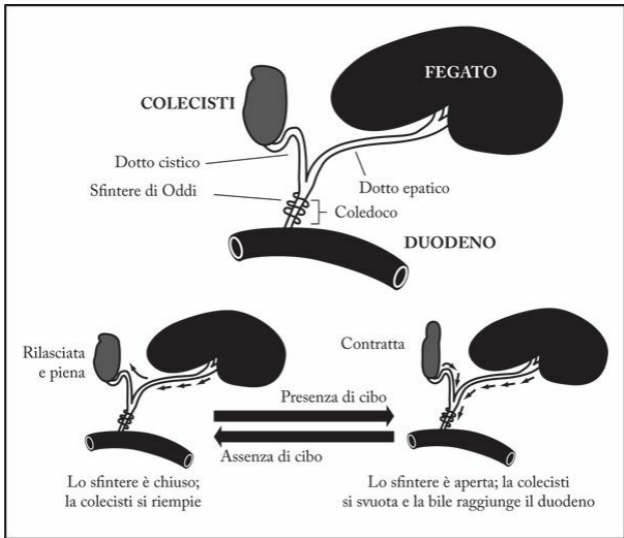
La funzione digestiva del fegato, che porta avanti contemporaneamente il suo ruolo di smaltitore di rifiuti, è quella di fornire all'intestino i detersivi di cui ha bisogno per digerire i grassi. Questi detersivi, o *acidi biliari*, sono prodotti nel fegato e aggiunti alla bile. I sali biliari emulsionano i grassi alimentari in modo tale che un enzima pancreatico chiamato *lipasi*, destinato alla digestione dei grassi vera e propria, possa raggiungere questi ultimi e attaccarli. La digestione dei grassi può quindi essere bloccata sia privando l'intestino della bile, sia inibendo la lipasi pancreatica.

La produzione costante della bile non è molto efficiente dal punto di vista digestivo. L'intestino ha bisogno dei sali biliari solo quando è presente del cibo che contiene grassi. Il pancreas, per esempio, non secerne enzimi di continuo ma solo quando i nervi e gli ormoni lo richiedono. Ci si potrebbe aspettare dunque dal fegato un comportamento secretorio analogo. Sfortunatamente, tuttavia, ciò non è possibile. Dato che la bile contiene anche rifiuti molecolari oltre ai sali biliari, la secrezione intermittente causerebbe, durante i periodi non secretori, l'accumulo nel sangue dei rifiuti normalmente espulsi dal fegato. L'escrezione potrebbe essere collegata alla presenza di grassi nel duodeno, ma forse questo sarebbe controproducente. Si pensi a cosa succede in una comunità quando si interrompe la regolare raccolta dei rifiuti. Non si può pensare che il Creatore o l'evoluzione abbiano potuto favorire un progetto che lascia la rimozione di rifiuti potenzialmente tossici ai capricci della presentazione del cibo, anche perché negli animali può passare molto tempo fra un pasto e l'altro.

La colecisti

L'alternativa, che sembra essersi evoluta perché il fegato si liberi continuamente dai rifiuti senza privarsi dei sali biliari, è quella di immagazzinare la bile nella colecisti fino al momento di utilizzarla. La colecisti (o cistifellea) è un sacco cieco posto all'estremità di uno dei due bracci di un dotto a Y. L'altro braccio della Y è il dotto che fa defluire la bile dal fegato, mentre il tronco comune si svuota nel duodeno.

Il braccio della colecisti è denominato *dotto cistico*. Il braccio del fegato è chiamato *dotto epatico*, mentre il tronco di congiunzione è denominato *dotto biliare comune* (coledoco). Il dotto pancreatico principale si unisce al dotto biliare comune e i due dotti si svuotano nel duodeno utilizzando la stessa apertura. L'apertura di questo passaggio è regolata da muscolatura, lo *sfintere di Oddi* (non lo sfintere odioso, come dicono gli studenti di medicina che hanno problemi con l'anatomia e odiano quindi questo sfintere). La funzione dello sfintere di Oddi nei confronti dei dotti biliari è simile a quella dello sfintere pilorico per lo stomaco.



L'anatomia del sistema biliare è in realtà abbastanza semplice. In poche parole una sacca dilatabile, la colecisti, è collegata a un serbatoio, il fegato, e a un'apertura, il duodeno, per mezzo di una valvola a tre vie costituita dai dotti epatico, cistico e biliare comune. La bile fluisce dal fegato e se ciò non avviene il fegato è in crisi. Dove va la bile dipende da cosa succede a livello dello sfintere di Oddi. Quando questo è chiuso, la bile non può entrare nel duodeno e fluisce solo da un braccio del sistema duttale a Y all'altro, cioè dal dotto epatico al dotto cistico e quindi dentro la colecisti. La colecisti si riempie di bile, si dilata e la trattiene finché questa non è necessaria nell'intestino. Tale necessità è trasmessa dai segnali ormonali e nervosi diretti allo sfintere di Oddi che si apre e alla colecisti che si contrae. Quando lo sfintere di Oddi si apre, la bile può fluire nel dotto biliare comune ed entrare nel duodeno. Anche la colecisti spinge nella stessa direzione, garantendo il completo trasferimento della bile

all'intestino. La colecisti, inoltre, non è solo una sacca passiva, un dispositivo progettato per trattenere la bile finché è necessario. La bile si concentra anche negli intervalli tra un pasto e l'altro, durante l'immagazzinamento nella colecisti. La concentrazione della bile si realizza con il trasporto di acqua e sali attraverso la parete della colecisti e il loro spostamento dalla bile al sangue. La presenza della colecisti rende quindi possibile la produzione costante della bile e, allo stesso tempo, il suo rilascio intermittente, così che essa raggiunga infine l'intestino concentrata e potente.

I calcoli

Le tubazioni che drenano il fegato e la colecisti sono spesso sede di patologie mediche rilevanti. L'elenco delle caratteristiche dei pazienti in cui questi problemi si verificano solitamente è espresso con un'allitterazione quadruplicata che generazioni di studenti di medicina hanno amato per la sua facilità di memorizzazione. I pazienti sono conformi alle «quattro f fair, fat, female, forty» (bianchi, grassi, di sesso femminile e sui quarant'anni). La patologia è quindi sessista, razzista e discriminatoria sulla base dell'età. Non ha il senso della decenza. I pazienti sono afflitti dai problemi biliari quando il processo di concentrazione della bile immagazzinata causa la precipitazione dei costituenti biliari con la formazione di pietruzze (*calcoli biliari*) nella colecisti o nei dotti biliari. Questi calcoli, che sono nel vero senso della parola pietre solide, possono essere oggetti sgradevoli da portarsi appresso, anche quando rimangono nella colecisti. I calcoli sono irritanti per la mucosa della colecisti e possono interferire con lo svuotamento dell'organo. Inoltre, essi producono spesso gravi infezioni della colecisti (*colecistiti* nel linguaggio medico).

La cosa strana è che le rocce grandi provocano meno facilmente problemi rispetto ai sassolini. Questi ultimi hanno molte più probabilità, rispetto ai calcoli grandi, di scendere nel sistema duttale e incastrarsi. Un calcolo nel dotto biliare comune può comportarsi come un tappo. Dato che la bile è secreta di continuo dal fegato, l'ostruzione del dotto biliare comune fa aumentare la pressione in tutto il sistema dei dotti biliari, compresi i dotti fragili e sottili presenti nel fegato stesso. Non esiste alcuna valvola di sicurezza. La pressione danneggia il fegato e i piccoli dotti biliari conducendo principalmente alla fuoriuscita dei componenti biliari nel sangue, conferendo così ai pazienti il tipico colore giallo (*ittero*). Il fatto di essere gialli e itterici non è solo un problema estetico per questi pazienti. Il loro problema d'immagine è risibile in confronto ai sintomi perduranti come nausea, senso di malessere, perdita dell'appetito e prurito incessante. I sintomi generali sorgono perché il fegato non può più adempiere ai suoi compiti che riguardano il metabolismo degli zuccheri, dei grassi e delle proteine. Il prurito è causato da certe molecole biliari che raggiungono la pelle. Quando un calcolo si blocca nel dotto comune, il chirurgo deve intervenire per toglierlo.

I calcoli biliari sono pericolosi. La sequela di disgrazie associata a questo disturbo è simile alle prove di Giobbe che affliggono povere donne inconsapevoli e, meno frequentemente, uomini ignari. I calcoli possono inizialmente stare in agguato, insidiosamente nascosti nella colecisti, per lunghi periodi, senza dare origine ad alcun sintomo. Poi, spuntano fuori in modo catastrofico senza alcuna ragione apparente e ciò avviene spesso in momenti in cui i pazienti sono sottoposti a stress e quindi incapaci di affrontarli.

I sintomi iniziali sono frequentemente insidiosi. I calcoli possono iniziare a interferire con il flusso biliare semplicemente privando l'intestino dei sali biliari di cui ha bisogno per emulsionare adeguatamente i grassi, ma non abbastanza da provocare l'ittero. La digestione dei grassi diventa incompleta. I grassi indigeriti si spostano così lungo l'intestino, dove vanno

incontro a fermentazione mediata dai batteri del colon, con formazione di gas. I pazienti presentano dilatazione addominale e flatulenza manifesta. I soggetti colpiti possono quasi impazzire per l'incapacità di controllare l'emissione di nauseanti flatulenze, nelle circostanze sociali meno adatte, da entrambe le estremità dell'apparato digerente. Amici, colleghi e qualsiasi altra persona si trovi nelle vicinanze possono offendersi e, non comprendendo il problema del paziente, esibire evidenti segni di disapprovazione. L'imbarazzo e il trauma psicologico finiscono quindi per sovrastare il disagio fisico causato dalla patologia della colecisti.

Man mano che il blocco del drenaggio biliare si aggrava e i pigmenti biliari non riescono più a raggiungere l'intestino, le feci cambiano colore diventando pallide e assumendo il colore dell'argilla, invece del solito e rassicurante colore marrone. Le feci ospitano anche milioni di batteri impegnati a far allegramente fermentare gli abbondanti grassi presenti. A causa dei grassi e della massa di batteri presenti, le feci diventano voluminose, untuose, maleodoranti e più chiare dell'acqua. Esse tendono a galleggiare nella tazza del WC ed è difficile rimuoverle. Anche l'atto familiare della defecazione diventa quindi un incubo, aggravando l'inquietudine psicologica sofferta dal paziente. A questo punto, quasi come se la malattia avesse causato tutto ciò per rendere docile la sua vittima, si può avere un ulteriore aggravamento del blocco con la comparsa degli eventi principali.

Il segnale che la colecisti è affetta in modo irrimediabile è dato dal violento dolore al quadrante superiore destro dell'addome, che s'irradia fino alla schiena e alla spalla destra. I nervi provenienti dalla colecisti e dalla spalla destra convergono a livello del sistema nervoso centrale e ciò che dovrebbe essere il dolore della colecisti è recepito erroneamente a livello della spalla destra. I brividi e la febbre annunciano che la colecisti e/o il sistema dei dotti biliari si sono infettati. La comparsa dell'ittero, con il suo corredo di sintomi come nausea, vomito, prurito e senso di malessere, sottolineano la gravità della patologia. A questo punto, dato che i dotti biliari e pancreatici condividono la stessa apertura verso il duodeno, la patologia del sistema biliare passa spesso al pancreas (*pancreatite*).

La pancreatite

Sebbene i problemi della colecisti e del fegato siano gravi, essi impallidiscono di fronte alla potenza della pancreatite. Il pancreas esocrino è progettato per produrre gli enzimi che digeriscono quasi tutto ciò che mangiamo. Il problema è che ciò che mangiamo non è molto differente da ciò che siamo. Una bistecca, per esempio, è semplicemente il muscolo di una mucca. Gli enzimi pancreatici possono convertire molto rapidamente una bistecca in un succo. Le proteine e i grassi di cui è costituita la bistecca sono convertiti in un tipo di piccole molecole solubili che l'intestino può assorbire. Quello che gli enzimi pancreatici fanno alla bistecca può anche essere rivolto contro noi stessi. Quando tutte le cose funzionano bene in un individuo sano, gli enzimi limitano la loro attività distruttiva al cibo che si trova nel lume dell'intestino. Esistono numerosi meccanismi che impediscono agli enzimi di digerire i loro possessori.

In primo luogo, le cellule producono gli enzimi in forma inattiva. Questi precursori degli enzimi (*proenzimi*) non sono di per sé pericolosi ma, anche se lo fossero, essi sono trasferiti come parte integrante del processo che li produce avvolgendoli con lo scudo protettivo della membrana. Gli enzimi digestivi non arrivano quindi mai a contatto con la parte interna della cellula che li produce. Mentre sono immagazzinati nelle cellule esocrine del pancreas, i proenzimi riposano all'interno di sacchi o pacchetti rivestiti da una membrana aspettando che un nervo o un ormone ordinino alla cellula di espellerli. Quando ciò accade e i proenzimi sono secreti, essi sono inviati a un sistema di dotti a tenuta stagna. Le cellule che rivestono i dotti sono unite strettamente le une alle altre da *tight junctions* (giunzioni serrate), che ostruiscono totalmente lo spazio tra le cellule adiacenti della mucosa. I proenzimi non possono quindi far altro che raggiungere il duodeno. Una volta arrivati qui, i proenzimi sono attivati dagli enzimi intestinali (denominati *enterochinasi*), che sono componenti fondamentali delle membrane di superficie delle cellule della mucosa intestinale. Gli enzimi pancreatici potenzialmente letali diventano quindi attivi solo nel lume dell'intestino, dove sono lasciati liberi in uno spazio sigillato dal resto dell'organismo e dotato di una mucosa speciale che essi non possono digerire.

Si pensi alle conseguenze di un calcolo che blocca l'uscita del dotto pancreatico nel momento esatto in cui arriva al pancreas il segnale per secernere. La pressione all'interno dei dotti sale e gli enzimi fuoriescono nei tessuti circostanti. Le *tight junctions* possono cedere o possono succedere altri eventi, ma ciò che conta è che gli enzimi pancreatici vanno a finire dove non dovrebbero andare. Si apre un varco nello scudo protettivo della membrana e del sistema dei dotti. A differenza del lume dei dotti pancreatici e intestinali, il tessuto comune non è più preparato di una bistecca masticata a fungere da contenitore per gli enzimi pancreatici.

Un particolare enzima pancreatico, che non è prodotto come proenzima ma è immediatamente attivo, è quello che digerisce i grassi. Quest'enzima è particolarmente devastante quando si trova in un tessuto cui non appartiene perché è letteralmente in grado di digerire le membrane

delle cellule viventi dell'organismo stesso. Mentre le cellule circostanti i proenzimi pancreatici fuoriusciti muoiono, le cellule che stanno morendo rilasciano prodotti che favoriscono l'attivazione dei proenzimi. Una volta iniziata la conversione dei proenzimi a enzimi attivi, il processo accelera rapidamente perché alcuni enzimi pancreatici sono in grado di attivare gli altri. Ciò che succede normalmente a una porzione di bistecca che è stata mangiata, capita ora al paziente. La pancreatite comporta l'orrore dell'auto-digestione o auto-cannibalismo. Il dolore, che è solitamente acuto e straziante, è recepito nel mezzo della pancia e s'irradia tipicamente alla schiena. Il paziente può entrare rapidamente in stato di shock e la patologia, anche in presenza di un trattamento tempestivo, può divenire rapidamente fatale.

Integrazione e regolazione delle ghiandole annesse

È chiaro, considerato ciò che devono fare, che le ghiandole annesse all'intestino sono vitali e devono quindi essere gestite con cura. Non possiamo vivere senza di esse, ma quando le cose vanno male non possiamo vivere con loro; le ghiandole accessorie ci possono uccidere. Il problema di controllare queste ghiandole e tenerle sotto stretto controllo ha quindi una notevole importanza. Come è ovvio, un lavoro di tale importanza e complessità è stato affidato al sistema nervoso, il solo componente dell'organismo che possiede la necessaria capacità di integrare le informazioni e di usarle per coordinare l'attività delle ghiandole.

Nel 1981, quando Jackie Wood, Marcello Costa, Alan North e io stesso discutevamo sulla serotonina, non si sapeva quasi nulla sulla capacità del sistema nervoso enterico di influenzare le ghiandole annesse. Semplicemente guardavamo al pancreas e alla colecisti con il dovuto timore riverente e ritenevamo che il Padreterno non li avesse creati senza dotarli di quartieri generali adatti a controllare tutta quella potenza di fuoco. Tuttavia, nonostante l'ignoranza regnante, le ghiandole annesse avevano catturato la mia immaginazione. Da quando avevo compreso che vivere con il pancreas e la colecisti era un po' come vivere con un paio di bombe nella pancia, il mio intuito mi suggeriva che quegli organi dovevano nascondere informazioni preziose che un giorno o l'altro sarei riuscito a dissotterrare.

Gary e la colecisti

Quattro anni dopo il congresso della Society for Neuroscience, mi sono trovato a discutere sul comportamento dell'intestino con Gary Mawe, un collega che stava per acquisire una borsa di postdottorato. Gary e io non saremmo potuti essere più differenti uno dall'altro. Quando c' incontrammo, pensai che Gary avrebbe potuto sentirsi più a casa a Galway Bay piuttosto che a Manhattan. Gary è irlandese e, come il mio stereotipo di irlandese, irradiava fascino, trivialità e buonumore. Il mio umorismo deve più al teatro Yiddish e alla zona degli emigranti russi di New York, piuttosto che a Sean O'Casey. Inoltre, sono bastati meno di cinque minuti di conversazione per instaurare un'amicizia che sarebbe durata per anni. Gary accettò la borsa di postdottorato e iniziò a lavorare per me.

Nel corso della nostra conversazione iniziale, accennai alla colecisti, ma solo brevemente. Non ricordo esattamente perché mi venne in mente quest'organo. Forse perché Gary era irlandese e ciò mi fece venire in mente gli oggetti verdi. A quell'epoca comunque la discussione sulla colecisti non approdò a nulla. Ci passai sopra così rapidamente che dubito Gary se ne ricordi ancora. Avevo numerosi progetti in corso che pensavo potessero sollecitare l'interesse di Gary e questi costituirono la maggior parte della nostra conversazione sulla scienza. I National Institutes of Health (NIH) mi avevano assegnato dei fondi per compiere studi sul sistema nervoso enterico e per questo speravo che Gary avrebbe potuto aiutarmi nelle ricerche. Ero libero di riflettere su altre questioni come la colecisti, ma solo nel tempo libero. Fortunatamente, Gary era entusiasta del sistema nervoso enterico e voleva saperne di più. La colecisti fu quindi procrastinata, come i Feniani, per rinascere un altro giorno.

Gary si rivelò un collaboratore eccellente in laboratorio e, quando lavorò con me, la mia produttività divenne la migliore mai vista. Gary possedeva la rara capacità di insegnare mentre imparava. Quando alla fine lasciai il mio gruppo di ricerca, capii di essere diventato più brillante grazie a quella collaborazione. Molti buoni scienziati, compreso Gary, sono insolitamente brillanti. Tuttavia, ciò che rendeva straordinario Gary era la sua capacità di acquisire e utilizzare molte tecniche differenti allo stesso tempo per risolvere i problemi biologici. Nessun problema era tanto scoraggiante da impedire a Gary di affrontarlo e nessun metodo era tanto misterioso da rendergli difficile dominarlo.

Dopo pochi anni di collaborazione fruttuosa e felice, venne il momento in cui Gary fu completamente formato e pronto ad avviare un programma di ricerca personale. Era venuto il momento per lui di andarsene. Pensai di mettere la fascia nera del lutto, ma mi sembrò più utile per entrambi sedersi e pensare a un progetto che Gary avrebbe potuto avviare. Il tipo di progetto giusto doveva essere uno vicino ai miei interessi quanto bastava perché potesse iniziare il lavoro nel mio laboratorio. Gary doveva entrare in azione mentre stava ancora con me perché, per poter imporre il suo progetto, avrebbe dovuto essere in grado di mostrare risultati preliminari validi a un Comitato di revisione di esperti dei National Institutes of Health e convincerlo della propria serietà.

Negli Stati Uniti, i NIH sono la fonte principale di finanziamento per la ricerca biomedica. Anche donatori privati, fondazioni e industrie elargiscono fondi, ma questi sono spiccioli in confronto ai finanziamenti erogati dai NIH. Il denaro dei NIH, tuttavia, è stato difficile da ottenere per molto tempo e la priorità di assegnazione dei Comitati di revisioni di esperti è stata indirizzata solo verso progetti che, a loro insindacabile giudizio, avevano elevate probabilità di successo. Mi piace scherzare sul fatto che per ottenere una borsa di ricerca dai NIH bisogna suggerire di provare qualcosa che tutti credono vero ma che bisogna comunque farlo usando i metodi più validi. Si tratta ovviamente di un'esagerazione, ma non troppo. Giovani e brillanti stelle che presentano grandi idee cadono in fiamme a meno che queste idee non siano accompagnate da informazioni sufficienti a renderle ovvie agli occhi dei revisori, che possono fidarsi di loro e rischiarli con pochi dollari. L'innovazione è una gran cosa, ma non se accompagnata dal rischio del fallimento.

Il finanziamento dei NIH non è solo necessario per produrre qualcosa di significativo, ma lo è anche per mantenere il rispetto della comunità accademica. Uno scienziato non finanziato è una persona priva di potere. O superiamo la valutazione dei nostri esperti o cadiamo nell'oblio. Dato che Gary stava per diventare uno dei miei alunni più promettenti, avevo tutto l'interesse a garantirgli il futuro successo. D'altra parte, qualsiasi ricerca Gary avesse iniziato nel mio laboratorio avrebbe dovuto essere almeno un po' differente dal mio lavoro personale, in modo da non perdere il progetto una volta che Gary se ne fosse andato. Niente può far finire una buona amicizia più efficacemente della rivalità.

Ho pensato così di nuovo alla colecisti e l'ho portata all'attenzione di Gary. Avrei voluto ricordare la nostra conversazione come qualcosa di grande peso perché definiva un percorso che Gary aveva seguito, abbastanza brillantemente, fino da allora. Avrebbe dovuto succedere mentre sorseggiavamo del porto o almeno una birra, vicino al fuoco vivace di un vecchio camino di pietra. Dei violini di sottofondo sarebbero stati carini. La nostra discussione iniziò invece a tavola nel mio laboratorio mentre consumavo il mio solito pasto costituito da formaggio tipo «cottage» (con ananas), una scatoletta di uva passa e una mela. Finimmo la nostra conversazione al computer nel mio ufficio dove trasformammo i nostri pensieri in un progetto di ricerca coerente.

Sapevamo dell'esistenza di nervi e corpi di neuroni nella colecisti, ma non avevamo informazioni sicure sui loro compiti. Compresi che la colecisti, come il fegato e il pancreas, si era sviluppata durante la vita fetale da un'evaginazione dell'intestino primitivo. Potevano allora i nervi e i gangli della colecisti fare parte del sistema nervoso enterico? Perché no? Bayliss, Starling e Trendelenburg avevano dimostrato che il sistema nervoso enterico poteva lavorare autonomamente. Una volta ammesso che il sistema nervoso enterico può pilotare l'intestino senza l'aiuto del sistema nervoso centrale, resta solo un piccolo guizzo di fede alla Kierkegaard per credere che esso possa anche pilotare un organo limitrofo, soprattutto se quell'organo deriva dall'intestino primordiale. Il sistema nervoso enterico del colon, inoltre, aveva già mostrato di inviare assoni fuori dall'intestino. Questa scoperta, sorprendente per quei tempi, era stata fatta da

Joe Szurszewski, il collega in postdottorato che venne dopo di me nel laboratorio di Edith Bülbirg a Oxford e che aveva attualmente in affitto il mio vecchio alloggio (o per meglio dire «l'appartamento», dato che si trovava in Inghilterra). Joe, che lavora attualmente alla Mayo University, aveva dimostrato già nel 1971 che i neuroni presenti nel plesso mienterico del colon innervano il ganglio (mesenterico inferiore) che fornisce l'innervazione simpatica alla parte terminale del colon e del retto. L'osservazione di Joe implicava che l'intestino, attraverso il sistema nervoso enterico, poteva letteralmente buttare giù la cornetta del telefono e cancellare i messaggi provenienti dal cervello che non voleva inviare ai nervi simpatici. Il lavoro iniziale di Joe è stato confermato molte volte sin dalla pubblicazione originale e, a partire dal 1988, quando Gary e io fummo conquistati dalle conversazioni sulla colecisti, era bene accettato. Gary condivise il mio modo di pensare sulla colecisti e decise di controllare questa ipotesi.

Essa consisteva nel ritenere che i neuroni nei gangli del duodeno fossero collegati a quelli presenti nella parete della colecisti. Gary provò ben presto che questo concetto era giusto. Dimostrò che molecole traccianti iniettate nella colecisti di una cavia apparivano subito dopo nei neuroni duodenali. Questo fenomeno, noto come *trasporto assonale retrogrado*, dimostrava che i neuroni presenti nei gangli duodenali inviavano davvero i propri assoni nella colecisti, esattamente come avevamo ipotizzato. Il tracciante aveva viaggiato a ritroso, lungo questi assoni, per raggiungere i corpi dei neuroni nell'intestino.

Gary continuò a studiare le proprietà dei gangli della colecisti. Questa ricerca apparentemente banale ha dimostrato che le proprietà strutturali e chimiche dei gangli della colecisti sono straordinariamente molto *simili* a quelle del sistema nervoso enterico e *diverse* dalle caratteristiche dei gangli reperiti in altre sedi del sistema nervoso periferico. La struttura straordinaria che il sistema nervoso centrale condivide con il sistema nervoso enterico è presente anche nei gangli della colecisti. La natura eccezionale di questo fatto è che questa struttura non si osserva in nessun'altra parte del sistema nervoso periferico al di fuori dell'intestino. Per esempio, il tessuto connettivo che è presente in quasi tutti i tipi di nervi periferici e che ne costituisce il supporto, è assente nei gangli dell'intestino e della colecisti. Analogamente al cervello, i gangli dell'intestino e della colecisti non sono tenuti insieme dal *collagene*, il filo biologico del tessuto connettivo, ma da cellule specializzate denominate *neuroglia* (collante nervoso). Queste scoperte furono quindi di grande supporto alla conclusione da noi delineata, che cioè i gangli della colecisti siano in effetti un'estensione del sistema nervoso enterico.

Gli studi iniziati da Gary nel mio laboratorio gli hanno fornito i dati preliminari di cui aveva bisogno. La sua borsa di ricerca fu finanziata ed egli ottenne un bel lavoro all'University of Vermont, non lontano dalle strade caotiche di New York. Inoltre, sin dal suo studio iniziale, Gary è diventato l'esperto mondiale sull'innervazione della colecisti. Mettete uno specialista di questo campo sul divano dello psicologo, pronunciate la parola «colecisti» e con tutta probabilità farà un'associazione e spontaneamente risponderà dicendo «Gary Mawe». Per me la colecisti è diventata semplicemente una fonte indiretta di soddisfazione e un arricchimento culturale. Ho letto le pubblicazioni sulla colecisti e sono stato orgoglioso delle realizzazioni di

Gary, ma non ho compiuto ricerche personali in questo senso.

Annette e il pancreas

Dopo che Gary e io cominciammo a ottenere informazioni indicanti che i neuroni dell'intestino innervavano i gangli nella colecisti, i miei pensieri si rivolsero al pancreas. Sebbene la regolazione dello svuotamento della colecisti e della concentrazione biliare fossero fenomeni complicati, il controllo della secrezione degli enzimi digestivi e degli ormoni che regolano il glucosio (insulina e glucagone) da parte del pancreas è molto più complesso. Non solo c'è molta più attività nel pancreas che nella colecisti, ma la necessità di coordinare cosa accade nel pancreas con ciò che succede nell'intestino è anche più critica. Una volta capito che i neuroni enterici comunicavano con i gangli della colecisti, fui sicuro che essi cercavano anche di capire cosa succedeva nel pancreas.

Gary Mawe stava partendo per il Vermont, ma io stavo collaborando allora con un altro grande giovane scienziato. Per una fortunata serie di circostanze, Annette Kirchgessner era venuta a lavorare nel mio laboratorio. Annette era stata inizialmente assunta alla Columbia University, non da me ma da un neurologo, Gaj Nilaver. Gaj, tuttavia, era stato assunto a sua volta altrove ed era partito per l'ovest prima che Annette potesse effettivamente fare qualcosa con lui. Dato che Annette non poteva partire con Gaj, quest'ultimo mi chiese se potessi assumermi la responsabilità per la sua formazione postdottorato. Per quanto mi riguarda, Gaj Nilaver è stato come Babbo Natale. Dissi di sì e il risultato fu una costante collaborazione con Annette che ha prodotto finora ventisette pubblicazioni scientifiche. Annette è ancora alla Columbia University, dove ha un proprio laboratorio e dirige un programma di ricerca con molto successo.

Sebbene Annette abbia conseguito il dottorato in psicologia sperimentale, non ha avuto problemi nel comprendere la somiglianza fra i sistemi nervosi enterico e centrale. Per lei, la transizione da un cervello all'altro ha richiesto uno sforzo minimo. Piano superiore o inferiore, la cosa non fa differenza. In ogni caso c'era un sistema nervoso che controllava un comportamento ed era questo su cui desiderava compiere ricerche. Il cervello nell'intestino, inoltre, le fece ottenere i risultati più rapidi. Per quanto sembrasse complicato il comportamento dell'intestino, la sua complessità impallidiva in rapporto all'intero organismo.

Le interessanti informazioni di Gary sulla colecisti spinsero Annette e me a verificare l'idea che il sistema nervoso enterico innervasse il pancreas. A quel tempo, Annette e io avevamo già collaborato a numerosi altri studi e Annette era una ricercatrice esperta. Convenne che il pancreas potesse essere un interessante argomento di ricerca e, inoltre, pensò che ciò poteva procurarle ciò che la colecisti aveva dato a Gary. Se fosse riuscita a ottenere la prova che l'intestino innerva il pancreas, anche lei avrebbe potuto trovarsi in mano dati preliminari validi e si sarebbe trovata a buon punto per ottenere la sua prima borsa di ricerca dei NIH.

Iniziosi a compiere ricerche sul pancreas utilizzando lo stesso approccio che Gary aveva impiegato con successo per osservare l'innervazione intestinale della colecisti. La tecnica sperimentale funzionò con Annette altrettanto bene che con Gary. Iniettò un tracciante retrogrado nel pancreas di cavie e ratti e, com'era prevedibile, il tracciante accese i neuroni nel plesso

mienterico del duodeno e dello stomaco di entrambe le specie. Il tracciante era stato trasportato dal pancreas all'intestino cavalcando gli assoni dei neuroni enterici. Una volta ottenuti i risultati, Annette invertì il corso e iniettò un tracciante anterogrado nei gangli del duodeno. I traccianti anterogradi si spostano dal corpo del neurone lungo gli assoni fino alle terminazioni nervose. Questa volta, scopri che il tracciante anterogrado era trasportato dall'intestino al pancreas, dove marcava gli assoni e i relativi terminali. Annette aveva quindi definito chiaramente, per la prima volta, un sistema di nervi entero-pancreatici. Era chiaro che i neuroni nel plesso mienterico di una regione ristretta e precisa del duodeno e dello stomaco innervavano il pancreas. I bersagli di questi neuroni, inoltre, furono rivelati dagli esperimenti con i traccianti anterogradi ed essi si rivelarono *non* essere ghiandole pancreatiche esocrine o isolotti di Langerhans endocrini, ma gangli pancreatici.

Quando Annette mi mostrò i dati e analizzammo assieme i risultati, rimasi meravigliato del perché nessuno prima di noi avesse descritto l'innervazione entero-pancreatica. In fin dei conti, se i neuroni dell'intestino inviano i loro assoni fuori dall'intestino e nel pancreas, questi dovrebbero essere visibili. Qualcuno doveva avere osservato queste fibre nervose emergere dall'intestino. Potrei capire il motivo per cui non siano stati visti i nervi che vanno dal duodeno alla colecisti. Essi corrono lungo i dotti biliare comune e cistico nel peduncolo della colecisti ed è impossibile dire con la semplice osservazione da dove provengano o dove stiano andando queste fibre nervose. I nervi enterici che vanno alla colecisti non possono essere distinti da altri tipi di nervi a meno che non si utilizzi un tracciante per seguire il loro percorso. Il pancreas, tuttavia, è un organo molto più grande della colecisti. Non penso quindi che si debba avere a che fare con un piccolo numero di assoni indefiniti in un fascio di ridotte dimensioni vicino al dotto pancreatico. Ho anche pensato che la marcatura dei nervi mediante traccianti retrogradi e anterogradi negli esperimenti di Annette sia stata realizzata troppo disinvoltamente. Marcare i nervi è come compiere ricerche per trovare il petrolio. Se ovunque si esegue una perforazione si trova petrolio, deve essercene un mucchio sotto la superficie.

Il numero dei nervi entero-pancreatici non può quindi essere piccolo. Pensai che avremmo fatto meglio a controllare la letteratura e vedere se qualcuno aveva trovato questi nervi prima di noi.

Quando cercammo nelle vecchie pubblicazioni qualcosa che riguardasse il pancreas trovammo ciò che sospettavamo. Qualcuno aveva, infatti, già osservato i nervi entero-pancreatici. Il principio dell'*Ecclesiaste* aveva colpito di nuovo. Ancora una volta non c'era nulla di nuovo sotto il sole. Nel 1977 sull'*«American Journal of Gastroenterology»* era apparso un articolo alquanto oscuro, *The Neural Control of Exocrine and Endocrine Pancreas* di O. Tiscornia un autore di cui non avevo mai sentito parlare. In questo documento, Tiscornia descriveva numerose fibre nervose che viaggiavano tra l'intestino e il pancreas e che aveva potuto osservare con una semplice dissezione grossolana; inoltre egli aveva ragionato correttamente sulla natura di questi nervi. Sono piuttosto dispiaciuto di non aver potuto incontrare Tiscornia. Stiamo tutti sulle spalle di qualcuno che è venuto prima di noi, ma quando sono le nostre spalle a sopportare

il peso, ci piacerebbe che ciò fosse notato. Tiscornia aveva visto giusto sull'innervazione entero-pancreatica, ma ciò era frutto della fortuna piuttosto che dell'abilità. Egli indovinò la funzione dei nervi che aveva osservato viaggiare tra l'intestino e il pancreas, ma non conobbe mai la direzione di spostamento dei segnali tra queste fibre nervose. Per quello che Tiscornia poteva ricavare dalle sue informazioni, le fibre nervose che viaggiavano tra l'intestino e il pancreas potevano altrettanto verosimilmente trasportare informazioni dal pancreas all'intestino o viceversa. È bello essere nel giusto, ma meglio ancora è esserlo per motivi derivanti dal proprio lavoro.

La posizione anatomica del pancreas, dello stomaco e del duodeno rende difficile osservare le fibre nervose che collegano tali organi. Il pancreas e il duodeno non si trovano realmente nella cavità dell'addome (*cavità peritoneale*). Piuttosto, essi sono sepolti assieme nel tessuto connettivo che separa la cavità peritoneale dal dorso. Il risultato è che le fibre nervose entero-pancreatiche non sono facilmente visibili e per questo sono sfuggite all'osservazione dei dissezzatori dall'epoca di Vesalio fino ai tempi di Tiscornia. Quest'ultimo, tuttavia, non poté fare altro che ipotesi sul significato dei nervi che aveva scoperto. Sfortunatamente, nel 1977, non disponeva dei traccianti retrogradi e anterogradi disponibili invece per Annette nel 1989. Non erano ancora stati scoperti questi composti e il loro impiego. Tiscornia non era quindi in grado di dimostrare che i nervi che aveva visto viaggiare tra l'intestino e il pancreas avevano effettivamente una natura entero-pancreatica. Per quanto lo riguardava, essi potevano essere nella stessa misura fibre pancreatico-enteriche o entero-pancreatiche. La pubblicazione di Tiscornia non suscitò lodi sperticate e ricevette un'attenzione relativamente limitata. Per quanto mi riguarda, non la notai quando uscì e la scoprii solo in ritardo, quando divenne pertinente al mio caso, e ne compresi il significato.

I messaggi entero-pancreatici

Scoprire la presenza dei nervi entero-pancreatici è soltanto l'inizio del gioco. Se i nervi esistono, c'è forte motivo di credere che siano funzionali. Quest'ipotesi, tuttavia, è il peccato che ha mandato in rovina numerosi ricercatori. Fare ipotesi costa poco, ma il mondo scientifico si basa sui dati. Dimostrare che i nervi entero-pancreatici sono funzionali era quindi al primo posto nell'elenco delle nostre priorità.

Annette e io decidemmo che non sarebbe stato facile determinare se i neuroni nell'intestino influenzano realmente il pancreas, dovendo esaminare la questione su animali interi. L'analisi di una, piccola parte di un animale è molto complicata quando sono presenti e funzionanti anche tutte le altre parti. Se si disturba l'intestino in un animale intatto, per esempio, esistono molti modi differenti per cui tale perturbazione può manifestarsi nel pancreas. I nervi sensoriali viaggiano dall'intestino al cervello e al midollo spinale che, a sua volta, invia nervi al pancreas. Ciò che accade nell'intestino può quindi influenzare indirettamente il pancreas, tramite il sistema nervoso centrale. I nervi possono quindi essere responsabili per ciò che avviene nel pancreas ma, in questo caso, tali nervi potrebbero non essere quelli entero-pancreatici che desideriamo studiare.

Il circolo ematico rappresenta un altro possibile mezzo d'invio dei segnali dall'intestino al pancreas. Gli ormoni secretina e colecistochinina sono prodotti nel duodeno da cellule endocrine con tenute nella sua mucosa. È noto che questi ormoni stimolano la secrezione pancreatica. Ogni stimolo applicato all'intestino in un animale intatto può quindi causare la secrezione nel sangue di questi o di altri ormoni. Il sangue può quindi distribuire questi ormoni al pancreas, dove essi compiono il proprio lavoro stimolando tutte le cellule pancreatiche sensibili. Alcuni eventi possono quindi avvenire nel pancreas come risultato della stimolazione dell'intestino, ma senza riguardare i nervi che collegano i due organi. Annette e io decidemmo quindi che dovevamo eliminare tutte le variabili, come per esempio il cervello, il circolo ematico e anche la maggior parte dell'animale, che avrebbero potuto confondere la nostra capacità di interpretare i risultati ottenuti. La nostra strategia fu quindi quella di ridurre il sistema ai suoi elementi fondamentali, isolando l'intestino e il pancreas.

Annette sezionò accuratamente il pancreas e il duodeno di una serie di porcellini d'India senza interrompere le fibre nervose che viaggiavano tra i due organi. La preparazione ottenuta, costituita dal duodeno con un segmento di pancreas collegato, fu quindi sistemata in un bagno per organi termostato, dove restava in vita grazie all'immersione in una soluzione nutriente adatta. Nel fluido gorgogliava costantemente dell'ossigeno, mentre la temperatura era mantenuta a 37 °C (98,6 °F) ovvero la temperatura interna normale del corpo. Dopo che Annette si accertò che i tessuti fossero stabili e felici di stare nel loro ambiente appartato, stimolò i nervi nel duodeno e stette a osservare cosa succedeva nel pancreas adiacente. Per sua grande gioia, scoprì che quando si stimolavano i nervi nel duodeno, i neuroni presenti nei gangli del segmento di pancreas collegato si eccitavano.

Annette fu capace di visualizzare le cellule nervose pancreatiche eccitate monitorando l'attività di un gene (*c-fos*) che si attiva quando i neuroni diventano attivi. Ogni gene di cui siamo dotati è presente in tutte le cellule dell'organismo. Abbiamo un solo genoma che si trova, in tutto il suo splendore, nel nucleo di ogni cellula. Le differenze cellulari tra le cellule del sistema immunitario e quelle del sistema nervoso, per esempio, sono quindi determinate non da un diverso corredo di geni presenti in ciascun sistema, ma piuttosto da una diversa dotazione di geni attivati o disattivati. In una determinata cellula, alcuni geni sono sempre accesi (*costituzionalmente attivi*), mentre altri sono irreversibilmente spenti (*inattivati*). In pratica, il genoma contenuto nel nucleo di ciascuna cellula è come un libro di istruzioni, con pagine da leggere e altre da saltare.

Tuttavia, le circostanze cambiano e non appena ciò succede una cellula è guidata verso pagine particolari di questo libro d'istruzioni per cercare qualche informazione. Questo fenomeno si manifesta come attivazione di specifici geni in concomitanza con alcune forme di attività cellulare. I geni sono scritti in basi, il linguaggio del DNA. Le proteine tuttavia, che comprendono il macchinario che esegue i comandi codificati nel DNA, sono scritte nel linguaggio degli aminoacidi. Per lanciare l'azione trovata nel libro d'istruzioni della cellula, quest'ultima trascrive dapprima il messaggio del DNA in messaggio dell'RNA, che è un linguaggio complementare anch'esso scritto in basi ma che, a differenza del DNA, può essere tradotto nel linguaggio degli aminoacidi consentendo così la produzione proteica. Il gene, *c-fos*, che Annette stava seguendo è denominato gene immediato-precoce perché si attiva (è trascritto) non appena una cellula è ricondotta al proprio genoma per ricevere un nuovo corredo di istruzioni. La proteina, Fos, codificata dal gene *c-fos* è una sorta di «apripagina», che consente alla cellula di leggere direttamente i messaggi codificati nel proprio genoma contenenti le istruzioni su come agire.

Quando Annette sezionò i nervi entero-pancreatici, li paralizzò con una tossina o bloccò la trasmissione sinaptica, quindi la stimolazione dei nervi duodenali non comportò alcun effetto per i neuroni pancreatici. È possibile provocare una notevole confusione nervosa nel duodeno circostante e se si blocca la conduzione nervosa o la trasmissione sinaptica, il *c-fos* contenuto nei neuroni pancreatici ci dorme sopra felicemente. Ciò significa che il gene non era stato trascritto o trasferito e che non era stata prodotta alcuna proteina Fos nelle cellule pancreatiche.

Dal momento che nel bagno non c'era cervello, midollo spinale o qualsiasi altro organo assieme al pancreas e al duodeno, i messaggi passati da quest'ultimo al pancreas dovevano per forza aver viaggiato sul collegamento diretto che unisce i due organi. Gli effetti delle tossine e del blocco sinaptico confermarono tuttavia che il collegamento coinvolgeva, in questo caso, i nervi e non gli ormoni. Gli ormoni possono essere stati secreti nell'intestino stimolato, ma non hanno influenzato il pancreas negli esperimenti di Annette. Il risultato è comprensibile perché gli ormoni richiedono una circolazione ematica funzionale per raggiungere gli organi bersaglio. In assenza del cuore o di una pompa meccanica, nessuno dei quali era presente nel bagno assieme al duodeno e al pancreas, il sangue non circola.

Avendo stabilito, per la soddisfazione di tutti, che i nervi entero-pancreatici esistono veramente e funzionano, Annette continuò il lavoro cercando di determinare quale tipo di stimoli attiva solitamente i nervi entero-pancreatici e identificare i neuroni duodenali che inviano gli assoni ai bersagli pancreatici. Questo lavoro è ancora in corso e ora che Annette ha lasciato il mio laboratorio, costituisce una parte significativa dei suoi impegni. Fino a oggi, Annette ha stabilito che mettendo del glucosio nel lume del duodeno o aumentando la pressione all'interno dell'organo, si attivano i neuroni entero-pancreatici. Alcuni, se non tutti, i neuroni sensoriali che rilevano questi stimoli si trovano nel plesso sottomucoso del duodeno, mentre i corpi neuronali che inviano effettivamente i propri assoni nel pancreas si trovano tutti nel plesso mienterico. I bersagli funzionali dei nervi entero-pancreatici, come suggeriscono i dati ottenuti con i traccianti, sono i neuroni presenti nei gangli pancreatici. È per questo che il blocco della trasmissione sinaptica annulla la capacità dell'intestino di influenzare il pancreas. Per esercitare quest'influenza, i nervi entero-pancreatici devono innanzi tutto attivare i neuroni nel pancreas. Questi ultimi, poi, devono stimolare le cellule esocrine del pancreas a secernere gli enzimi digestivi o le cellule degli isolotti a secernere l'insulina. Tutte queste attivazioni possono avvenire in circa un secondo. I nervi lavorano rapidamente.

Gli esperimenti con *c-fos* ci confermarono che l'intestino comunicava realmente con il pancreas, ma non rivelarono nulla su ciò che l'intestino aveva da dire o diceva. In un certo senso, eravamo come coloni del XIX secolo, che localizzavano i segnali di fumo lungo il cammino verso il selvaggio West. I segnali di fumo avrebbero dovuto informare i coloni che gli indigeni delle zone circostanti stavano comunicando fra loro, ma il semplice fatto di percepire i segnali non poteva dire ai coloni ciò che dovevano sapere. I coloni sarebbero stati sicuramente interessati a conoscere quali istruzioni erano codificate negli sbuffi di fumo come, per esempio, «Lasciateli passare» o «Fateli fuori». Per decifrare i messaggi e svelare il mistero, i coloni avrebbero dovuto conoscere il codice dei segnali di fumo. È quindi probabile che le guide che si guadagnavano la vita scortando i coloni attraverso il West avessero speso molte energie per scoprire e imparare il materiale codificato nei segnali di fumo. Anche nel nostro caso, Annette e io dovevamo andare oltre la scoperta della trascrizione del *c-fos* (i nostri segnali di fumo) e conoscere l'identità dei neurotrasmettitori e il risultato della segnalazione entero-pancreatica.

Per decifrare il codice cifrato entero-pancreatico e arrivare al nocciolo della questione, Annette continuò a utilizzare il duodeno isolato con un segmento di pancreas collegato come preparazione sperimentale preferita. Scopri molto presto che quando stimolava il duodeno, non solo si eccitavano i neuroni nell'adiacente pancreas, ma che quest'ultimo secerneva anche gli enzimi digestivi. I segnali provenienti dall'intestino servono quindi a far secernere rapidamente al pancreas gli enzimi di cui l'intestino sente di avere bisogno. Annette scopri che la secrezione di questi enzimi poteva essere monitorata meglio seguendo il rilascio dell'*amilasi*, l'enzima pancreatico che digerisce l'amido. L'attività dell'*amilasi* è facile da misurare. L'analisi della secrezione di *amilasi* come risposta alla stimolazione duodenale rivelò ben presto l'identità chimica dei neuroni responsabili del fenomeno. La scopolamina, la tossina vegetale che avvelena

i recettori muscarinici, e l'esametonio, farmaco sintetico che agisce come il curaro, bloccando i recettori nicotinici, impedivano entrambi la secrezione enterica dell'amilasi di origine nervosa. L'esametonio, ma non la scopolamina, prevenivano anche l'eccitazione del *c-fos* nei neuroni pancreatici in risposta alla stimolazione duodenale. Queste osservazioni dimostrarono che i nervi entero-pancreatici che eccitano i neuroni pancreatici usano l'acetilcolina come neurotrasmettitore e che i recettori eccitati pertinenti sono nicotinici. Anche i neuroni pancreatici utilizzano l'acetilcolina come neurotrasmettitore, ma i recettori che essi eccitano sulle cellule esocrine pancreatiche sono muscarinici.

Annette aveva a quel punto definito i segnali che consentono all'intestino di ricevere ciò che desidera dal pancreas, ma sapeva di aver decifrato solo a metà il codice entero-pancreatico. C'era ancora un segnale di fumo che rimaneva misterioso. Sapeva quali neurotrasmettitori erano «attivi», ma non sapeva ancora se ci fossero anche neurotrasmettitori «inattivi».

Gli studi che Annette aveva compiuto con un tracciante retrogrado immesso nel pancreas avevano rivelato che alcuni dei neuroni intestinali marcati dal tracciante contenevano serotonina. Queste osservazioni indicavano che, oltre ai nervi entero-pancreatici che utilizzano l'acetilcolina per eccitare i neuroni nel pancreas, esistevano anche fibre nervose entero-pancreatiche contenenti serotonina. In un primo tempo, la funzione di questi nervi contenenti serotonina era enigmatica. Quando Annette aggiunse la serotonina al bagno per organi termostato, non si verificò la secrezione di amilasi e, a dire il vero, non successe nulla di evidente nel pancreas. Questo risultato mi portò a suggerirle di stimolare i nervi duodenali e vedere poi cosa succedeva con la serotonina presente nel bagno. La mia idea era che la serotonina potesse modificare la risposta dei neuroni pancreatici all'acetilcolina. Decidemmo quindi di provare a scoprirlo.

È fondamentale conoscere appieno lo scopo del codice cifato entero-pancreatico. Il diabete, patologia caratterizzata da carenza di insulina, è molto frequente e grave. A differenza del diabete giovanile, in cui solitamente un processo auto-immune distrugge le cellule insulari, queste ultime sono presenti nella maggior parte dei diabetici adulti, pur senza secernere insulina sufficiente a far fronte alle numerose cellule adipose accumulate negli anni da questi pazienti. Sapere perfettamente come l'intestino stimola le cellule insulari a secernere l'insulina potrebbe essere utile, usando farmaci adatti nei diabetici adulti, a spingere le cellule insulari recalcitranti, a secernere quantità adeguate di insulina. Questa comprensione aiuterebbe a spiegare perché la risposta delle cellule insulari diabetiche dell'adulto ai carichi di glucosio è insufficiente.

Anche la pancreatite è una questione pressante. Infatti, la pancreatite può essere così letale, così in fretta, da far pensare all'organo come alla bomba P. Quando i suoi enzimi esplodono oltre i confini di membrana, una persona può passare alla storia altrettanto rapidamente quanto Hiroshima nel 1945. La pancreatite può essere una devastante conseguenza della formazione dei calcoli, un'evenienza letale in un alcolizzato o una complicanza catastrofica della chirurgia. La pancreatite può anche colpire senza preavviso e senza una causa apparente in soggetti apparentemente normali. La conoscenza del messaggio inviato dall'intestino al pancreas può aiutarci a comprendere le cause d'insorgenza della pancreatite e fornire anche un nuovo modo per

trattarla. Sicuramente, se l'intestino può «semplicemente dire no» al pancreas, questo messaggio, mimato da un farmaco, può essere molto utile nella terapia della pancreatite.

Come era prevedibile, quando Annette stimolò il duodeno alla presenza della serotonina, la secrezione normale dell'amilasi era inibita. Inoltre, quando stimolò il duodeno alla presenza di un farmaco che impedisce alla serotonina di agire sui suoi recettori (antagonista della serotonina), la secrezione di amilasi era, effettivamente, molto superiore a quella che sarebbe stata in assenza dell'antagonista. L'antagonista della serotonina aveva, in effetti, potenziato la secrezione dell'amilasi. Questi dati suggerivano che i nervi contenenti serotonina fossero di tipo inibitorio. Quando Annette stimolò tutti i nervi duodenali, doveva avere contemporaneamente eccitato alcuni nervi che promuovono la secrezione e altri che la inibiscono. L'effetto netto, in assenza di qualsiasi farmaco, era la secrezione, ma non così alta quanto quella che si sarebbe verificata se i nervi inibitori fossero stati silenti. L'aggiunta di un antagonista della serotonina bloccò gli effetti negativi dei nervi contenenti tale molecola. L'acetilcolina, quindi, era fuori da qualsiasi controllo e si evidenziò interamente la forza della sua capacità di eccitazione. I nervi entero-pancreatici contenenti serotonina esistono quindi non tanto per stimolare le cellule nervose pancreatiche, quanto piuttosto per opporsi alla loro attivazione da parte dell'acetilcolina. Infatti, Annette scoprì che i recettori della serotonina si trovano proprio sulle terminazioni nervose contenenti acetilcolina. Una volta stimolati, i recettori per la serotonina diminuiscono il rilascio dell'acetilcolina diminuendo così l'effetto dei nervi eccitatori. La serotonina, nella cosmologia entero-pancreatica, è yang mentre l'acetilcolina corrisponde allo yin. Il sistema è molto sofisticato.

Controlli multipli sulla bomba P

Quando ho pensato la prima volta alla complessità dell'innervazione entero-pancreatica, l'effetto della serotonina mi sembrava un po' quello di un'arma nucleare. Era facilmente comprensibile perché avesse potuto svilupparsi un sistema eccitatorio di fibre nervose. Sebbene il duodeno possa inviare al pancreas segnali ormonali per attivare gli enzimi e il succo alcalino necessario per far fronte al cibo e all'acido gastrico, l'azione degli ormoni è relativamente lenta. Essi devono trovare il percorso per il circolo ematico e quindi essere pompati al pancreas, dove devono uscire dai vasi sanguigni e raggiungere le cellule da stimolare. Gli ormoni passano lentamente attraverso i fluidi tissutali guidati da nient'altro se non dal gradiente di concentrazione. Al contrario, i nervi agiscono rapidamente. Essi portano il segnale sul bersaglio immediatamente e direttamente. Utilizzando i nervi al posto degli ormoni o coadiuvando l'azione degli ormoni, l'intestino può ottenere ciò che gli serve esattamente quando ne ha bisogno.

Chiunque abbia passato del tempo davanti allo schermo di un computer aspettando il riavvio della macchina, può comprendere facilmente questa logica. Si riaccende il computer, ma tra la pressione del pulsante di accensione e il momento in cui il computer fornisce una risposta sensata sembra passare un'eternità. I nervi garantiscono che non ci sia praticamente alcun tempo morto prima che qualcosa accada. Gli ormoni, viaggiando senza fretta, possono fungere da riserva per i nervi garantendo che la risposta secretoria si verifichi e si mantenga. Avendo a disposizione un sistema nervoso e uno endocrino che collaborano in tempi differenti, è più probabile che gli enzimi digestivi pancreatici lavorino correttamente. Dato che alcuni dei neuroni entero-pancreatici si trovano nello stomaco, è anche possibile che l'intestino possa prevedere i suoi fabbisogni prima ancora che si presentino. Il pancreas può essere attivato dallo stomaco prima dell'arrivo del cibo e dell'acido gastrico al duodeno. Il duodeno può quindi essere preparato e pronto a gestire qualsiasi cosa lo stomaco gli riversi dentro. L'eccitazione da parte dei nervi entero-pancreatici mi sembrò quindi molto ragionevole. L'inibizione da parte della serotonina, tuttavia, era inattesa.

La capacità del sistema nervoso enterico di inibire la secrezione pancreatica acquisì un senso maggiore quando pensai ai numerosi modi con cui avviene il controllo di tale secrezione. L'intestino e il pancreas di un animale o di un uomo vivente non sono isolati come in un bagno per organi termostato. Nell'animale intatto, il cervello, come anche l'intestino, possono eccitare il pancreas. Il nervo vago trasporta gli assoni parasimpatici dal cervello agli stessi neuroni presenti nei gangli pancreatici che ricevono l'input nervoso dall'intestino. Infatti, prima che Annette e io pubblicassimo i nostri lavori che descrivevano l'innervazione entero-pancreatica, si pensava che il nervo vago fosse l'unico nervo in grado di eccitare il pancreas. Anche il cervello è capace di indurre la secrezione pancreatica e lo fa.

Il cervello, in parte, stimola la secrezione pancreatica sulla base delle informazioni che riceve dai nervi sensoriali provenienti dall'intestino, ma dispone anche di un'agenda personale. Essa

contiene l'intero ambiente di un soggetto – l'azione di cattura della preda, la percezione degli odori e dei rumori che provengono dal cibo in arrivo, e del gusto associato con l'assunzione dell'alimento. Questi segnali d'ingresso sono tutti elaborabili dal cervello e utilizzabili per indicare al pancreas cosa fare. L'apprendimento e la memoria possono essere sfruttati dal cervello per facilitare la digestione. La maggior parte delle azioni del cervello è appropriata. Nella testa si verificano tuttavia anche eventi complessi, spesso inconsci e incomprensibili.

Non tutto ciò che fa il cervello è vantaggioso. Alcuni pensieri sarebbe meglio non fossero pensati e una parte dell'output del cervello sarebbe bene non fosse ascoltata dagli altri organi. È quindi comprensibile che l'intestino possa trovare occasioni in cui non può far fronte al succo che il pancreas secerne su ordine del cervello. La componente inibitoria dell'innervazione enteropancreatica fornisce all'intestino i mezzi per affrontare queste situazioni. Il sistema nervoso enterico può utilizzare i propri nervi inibitori contenenti serotonina per disattivare la secrezione pancreatica quando questa sia stimolata dal cervello, dagli ormoni o anche dai propri nervi eccitatori contenenti acetilcolina. Il sistema nervoso enterico non possiede quindi solo un commutatore d'accensione rapido, ma anche un commutatore di spegnimento altrettanto veloce. Ancora una volta, come nel caso dell'innervazione dei gangli simpatici prevertebrali da parte del sistema nervoso enterico, l'intestino ha la possibilità di sbattere giù la cornetta del telefono quando il messaggio in entrata (questa volta inviato dal pancreas per mezzo del nervo vago) proveniente dal cervello non è di suo gusto.

La digestione, come si può vedere, non è un processo semplice. Essa coinvolge una serie molto complicata di reazioni chimiche organiche che si verificherebbero molto difficilmente se non fossero presenti gli enzimi corretti, in quantità assolutamente precise, e se anche le condizioni in cui agiscono questi enzimi non fossero altrettanto esattamente regolari. La messa a punto della secrezione enzimatica e il mantenimento della serie di condizioni corrette per il loro funzionamento coinvolgono quindi una serie molto sofisticata di sensori, nervi, ormoni e ghiandole. Quando scopriamo che i controlli della digestione sono complicati, la vera sorpresa sarebbe proprio quella di stupirsi. Le cose sono sempre più complicate di ciò che ci si aspetta. Quando si parla del sistema nervoso enterico e delle sue interazioni, sono le nostre nozioni preconcepite a essere imperfette. Alla fine, si capirà che ciò che stiamo scoprendo nell'intestino non è mai semplice. Pur sapendo che le cose stanno così, continuo a stupirmi per ogni livello di complessità del sistema nervoso enterico che scopriamo.

Il culmine, l'assorbimento

Ripensando al 1981, l'epoca in cui stavo difendendo il ruolo della serotonina come neurotrasmettitore enterico al congresso della Society for Neuroscience di Cincinnati, non sapevo nulla sui nervi che collegano l'intestino alla colecisti, né sull'innervazione enteropancreatica. A quell'epoca, se anche pensavo al controllo di quegli organi, li liquidavo rispettosamente pensando che un giorno o l'altro qualcuno avrebbe capito come funzionano. Sebbene sia vero che il controllo nervoso enterico delle ghiandole annesse non è ancora del tutto compreso, ciò che sappiamo oggi sulla capacità del sistema nervoso enterico di influenzare gli altri organi rappresenta un balzo gigantesco rispetto allo stato del campo di battaglia che stavo cercando di presentare a Cincinnati. Questa è una delle preoccupazioni della scienza moderna: basta un battito di ciglia e vi ritroverete disperatamente sorpassati.

Fino a questo punto, la maggior parte di ciò che l'intestino ha fatto può essere considerato il preludio. Il cibo consumato è stato macinato, impastato e inzuppato nell'acido, emulsionato e digerito. Ciò imposta la fase dell'evento culminante per cui l'intero processo è progettato sì da rendere possibile l'assorbimento: l'ingresso dei prodotti della digestione nell'organismo stesso. Dopo che i sali biliari e gli enzimi digestivi secreti dalle ghiandole annesse hanno completato i propri compiti, la digestione non è ancora ultimata, ma gli eventi successivi sono rapidi e collegati all'assorbimento. Non esiste finora alcuna evidenza che il sistema nervoso enterico sia direttamente coinvolto sia nelle fasi finali della digestione sia nell'assorbimento, sebbene esista una buona quantità di congetture secondo cui il sistema nervoso enterico può influenzare l'assorbimento. I sali e gli ioni, soprattutto il sodio fornito dai sali, hanno molto a che vedere con l'assorbimento. Il sistema nervoso enterico esercita un'influenza notevole sul trasporto dei sali dai fluidi corporei al lume dell'intestino e, quindi, il sistema nervoso enterico può influenzare indirettamente l'assorbimento alterando la distribuzione dei sali attraverso la mucosa intestinale. Se il sistema nervoso enterico si comporta in questo modo, come agisca e in quali circostanze, sono tutte questioni ancora sconosciute.

Dopo che il cibo è stato digerito dagli enzimi pancreatici, con l'aiuto dei sali biliari che si occupano dei grassi, le molecole grandi e complesse originariamente presenti nel pasto sono per la maggior parte state disgregate in molecole più piccole e, tuttavia, molte di queste molecole sono ancora troppo grandi per essere assorbite dall'intestino tenue. Le grandi molecole semplicemente non passano agevolmente attraverso le membrane cellulari e l'intestino tenue è totalmente rivestito di cellule. Queste cellule separano la nostra parte interna, rappresentata dal fluido contenuto nella parete intestinale, dalla parte esterna, rappresentata dal lume intestinale. Le cellule della mucosa intestinale formano il confine fondamentale che ci impedisce di riversarci nel nostro stesso intestino. Ovviamente, non si può aprire un varco in questa barriera per lasciar entrare le molecole, a prescindere da quanto possiamo averne bisogno. Per entrare nell'organismo, quindi, le molecole presenti nel lume intestinale devono attraversare le membrane *apicali* (che guardano verso il lume) delle cellule della mucosa intestinale,

attraversarne il citoplasma e passare infine oltre le membrane (*baso-laterali*) della parte opposta. Nulla passa tra le cellule adiacenti della mucosa intestinale perché lo spazio fra di esse è chiuso dalle *tight junctions* che bloccano ogni accesso. Le proteine nelle membrane cellulari adiacenti sono allineate e unite le une e alle altre, chiudendo così il varco che altrimenti esisterebbe tra le cellule. Queste proteine formano sponde sigillate, proprio sotto il lume intestinale. L'assorbimento è quindi un meccanismo che serve a includere ciò di cui abbiamo bisogno senza lasciare scappare allo stesso tempo alcun elemento fondamentale. Dato che le *tight junctions* che collegano tra loro tutte le cellule della mucosa intestinale chiudono lo spazio fra una cellula e l'altra, la maggior parte di ciò che è assorbito passa attraverso le stesse cellule. L'assorbimento è quindi un processo che ricade per lo più sotto il controllo cellulare.

Una volta assunte con l'alimento le proteine sono ridotte, dapprima dalla pepsina e poi dagli enzimi pancreatici a formare piccoli peptidi. Gli amidi e gli altri *polisaccaridi* (lunghe catene di molecole di zucchero) sono ridotte a disaccaridi (molecole che contengono soltanto due zuccheri). Per essere assorbiti, i piccoli peptidi e i disaccaridi devono prima essere attaccati e degradati dagli enzimi intestinali, che non si trovano liberi nel lume dell'intestino ma sono componenti integrali delle membrane apicali delle cellule della mucosa intestinale. Queste cellule, chiamate cellule *assorbenti dei villi* o *enterociti*, sono le stesse chiamate infine ad assorbire i prodotti ultimi della digestione.

Ancorare gli enzimi digestivi fondamentali non è l'unico compito assegnato alle membrane apicali delle cellule assorbenti dei villi per compiere la digestione. Queste membrane contengono anche le enterochinasi che convertono i precursori inattivi degli enzimi pancreatici in enzimi attivi che realizzano la maggior parte della digestione. Questa sistemazione spaziale degli enzimi e dell'apparato assorbente posto sulle superfici delle cellule assorbenti è veramente ragionevole. Non appena emergono i prodotti finali della digestione, essi si trovano proprio sulla membrana che li cattura per assorbirli. Le piccole molecole non hanno la possibilità di galleggiare nel lume dell'intestino dove potrebbero perdersi. La mucosa intestinale è quindi la sede in cui sono attivati gli enzimi pancreatici, si completa la digestione e si verifica l'assorbimento. Si tratta di una quantità impressionante di compiti e, come si può immaginare, è necessaria una grande quantità di area di superficie per svolgere tutto questo lavoro. Un'area di superficie estesa facilita anche l'assorbimento delle molecole benefiche, come la vitamina C, che sono piccole, passano attraverso le membrane cellulari e si diffondono facilmente nell'organismo.

La superficie dell'intestino tenue è smisurata. La sua area è amplificata da una struttura la cui superficie si ripiega più e più volte. Il rivestimento superficiale dell'intestino, la mucosa, forma pieghe grossolane sorrette dal tessuto connettivo denso della sottomucosa intestinale. Queste grandi «valvole» formano il primo tipo di piega.

Il secondo tipo di piega si trova dentro la mucosa ed è più fine. La mucosa si ripiega su se stessa a formare proiezioni digitiformi chiamate *villi* che si protendono nel lume intestinale. L'asse dei villi è costituito dal tessuto connettivo lasso della mucosa.

Il terzo tipo di piega è a livello delle membrane luminali delle cellule assorbenti dei villi. Queste membrane si piegano a formare estensioni molto lunghe che si proiettano dagli apici cellulari. Queste estensioni sono chiamate *microvilli* perché sembrano villi in miniatura. Entrambi hanno un aspetto digitiforme, ma i villi sono composti di più cellule, mentre i microvilli sono modificazioni superficiali di singole cellule. L'asse dei microvilli è costituito dal *citoplasma* cellulare. In realtà, questo citoplasma è pieno di fasci di sottili filamenti (*microfilamenti*) che fanno parte dello scheletro cellulare. I microfilamenti presenti all'interno dei microvilli forniscono un certo grado di rigidità strutturale.

L'area di superficie dell'intestino è ingrandita da questa struttura a pieghe in modo tale che la membrana superficiale di un centimetro di intestino umano sarebbe sufficiente a coprire due volte l'area di un campo da tennis. Se si proietta questa superficie sui seicentosettanta centimetri di lunghezza dell'intestino tenue, un uomo medio dispone probabilmente di membrana limite della mucosa intestinale sufficiente a tappezzare un condominio, anche se è improbabile che molti chiedano una tappezzeria di quel particolare materiale.

L'assunzione dei grassi

L'assorbimento dei grassi coinvolge un meccanismo di gran lunga più bizantino di quello responsabile dell'assorbimento dei prodotti digeriti delle proteine e degli zuccheri.

L'enzima pancreatico, la *lipasi*, di cui abbiamo parlato l'ultima volta in qualità di agente letale che dissolve le membrane cellulari quando rilasciato durante un attacco di pancreatite, è l'attore principale nella digestione dei grassi alimentari. In questo caso tuttavia l'enzima è piuttosto salubre perché agisce nella sua sede naturale, cioè nel lume intestinale e non nella cavità peritoneale dove è riversato durante la progressione della pancreatite. In presenza dei sali biliari, la lipasi digerisce i grassi producendo molecole più piccole e semplici in grado di passare attraverso le membrane dei microvilli delle cellule assorbenti. La maggior parte dei grassi che mangiamo sono i cosiddetti *trigliceridi*. Queste sostanze sono costituite da tre acidi grassi (con lunghe, anche enumerate, catene di atomi di carbonio) accoppiati a un nucleo centrale di glicerolo. I trigliceridi non possono passare attraverso le membrane cellulari, ma una volta che la lipasi ha scisso gli *acidi grassi* dal glicerolo, gli acidi grassi liberati si diffondono attraverso la membrana dei microvilli ed entrano nelle cellule assorbenti dei villi. Una volta giunte nelle cellule, tuttavia, le molecole degli acidi grassi sono riattaccate al glicerolo e sono così riconvertite sostanzialmente in altri trigliceridi.

La digestione e l'assorbimento che implicano la risintesi di molecole molto simili, ma non identiche, a quelle assunte con l'alimento e digerite nella prima sede sembrano, a prima vista, un'enorme quantità di lavoro senza alcun vantaggio particolare. I nuovi trigliceridi prodotti dalle cellule assorbenti dei villi sono tuttavia prodotti all'interno di compartimenti cellulari molto particolari chiusi da membrane. Così come il lume del tratto gastrointestinale è esterno all'organismo, anche lo spazio interno di questi compartimenti è equivalente alla parte esterna della cellula. Per comprendere come ciò possa succedere, è necessario ritornare brevemente all'evoluzione delle cellule. All'inizio dei tempi, prima che qualsiasi organismo multicellulare muovesse i suoi passi sulla terra, la membrana superficiale di una cellula primitiva si ripiegò all'interno allontanandosi dalla superficie per formare un piccolo sacco interno galleggiante nel proprio citoplasma. Nel formare questo sacco una goccia di fluido esterno rimase intrappolata dentro di esso. Col procedere dell'evoluzione, il sacco della cellula primordiale venne mantenuto e diventò un'entità permanente presente in quasi tutte le cellule attuali. Il derivato del sacco primitivo è ora non più di un semplice sacchettino. Nella maggior parte delle cellule, è presente una serie molto complessa di sacchi chiusi da membrane, cisterne e tubuli, denominati nel loro insieme spazio vacuolare della cellula. Tra i vari elementi dello *spazio vacuolare* si firmano connessioni temporanee, ma nessuna di queste si apre mai nel citoplasma vero e proprio.

I componenti dello spazio vacuolare funzionano come bolle di sapone. Esse possono fondersi assieme e con la membrana superficiale. La parte interna dello spazio vacuolare, considerata la sua origine, rimane topologicamente equivalente al mondo esterno. Quando una vescicola che fa

parte dello spazio vacuolare si fonde con la membrana di superficie, tutto ciò che è sciolto nel suo lume è distribuito al fluido esterno (secreto).

Sebbene i trigliceridi appena risintetizzati sembrano originare dalle cellule assorbenti dei villi, essi sono in realtà formati nello spazio vacuolare, dato che una parete di membrana li separa sempre dall'interno vero e proprio della cellula stessa. I trigliceridi sono confinati nello spazio vacuolare e, durante la loro permanenza in questa sede, sono anche forniti di un rivestimento proteico che li aiuta a rimanere in sospensione nell'acqua. Mantenere i grassi sospesi in acqua non è una questione priva d'importanza per l'organismo. È importante perché tutti i fluidi tissutali sono acquosi. I grassi odiano l'acqua e, come la brillantina messa in un catino, non si sciolgono. Come dice il proverbio, l'olio e l'acqua non si mescolano. I grassi che escono dalla soluzione possono depositarsi nelle arterie, e causare l'*arterosclerosi* («indurimento delle arterie»), con terribili conseguenze come infarto e ictus.

I trigliceridi appena sintetizzati, con i loro rivestimenti proteici, sono trasportati attraverso le cellule assorbenti dei villi ma rimangono nello spazio vacuolare. Alla fine, i trigliceridi sono impacchettati all'interno di vescicole che si fondono con le membrane della superficie basale delle cellule assorbenti e vengono così secreti con il loro rivestimento proteico. Le particelle risultanti, note come chilomicroni, riempiono il tessuto connettivo sito nell'asse dei villi. Dato che i *chilomicroni* sono troppo grossi per entrare nei vasi ematici, essi devono essere rimossi dal tessuto connettivo dei villi tramite vasi linfatici, le cui pareti presentano aperture attraverso cui i chilomicroni possono passare. I vasi linfatici trasportano i chilomicroni al fegato, che è l'organo capace di trattarli. I grassi sono quindi digeriti, assorbiti, risintetizzati, secreti e finalmente rimossi tramite la linfa, che assume dopo i pasti un colore bianco lattiginoso proprio perché è così piena di chilomicroni. Considerata la complessità della digestione e dell'assorbimento dei grassi, non è sorprendente che quando l'intestino si ammala ed è incapace di funzionare, è solitamente l'assorbimento dei grassi a cedere per primo. La presenza di grassi nelle feci è quindi uno dei segni più precoci e costanti dei problemi della digestione o dell'assorbimento.

I grassi influiscono anche sul sistema nervoso enterico. I prodotti della digestione dei grassi, gli acidi grassi, sono stimolanti molto potenti dei recettori sensoriali che controllano cosa succede nel lume dell'intestino. Questi recettori attivano nervi sensoriali che mantengono informato sia il cervello, sia il sistema nervoso enterico. Gli acidi grassi che si trovano in ogni parte del lume intestinale attivano un interessante riflesso noto come *freno ileale*. Fondamentalmente, quando il freno è attivato, l'avanzamento del contenuto intestinale si ferma nella sua regione terminale, cioè l'ileo. La presenza di acidi grassi nel *chimo* (contenuto intestinale) nella parte distale del duodeno può essere sufficiente a bloccare completamente l'ileo. È come se il sistema nervoso (sia centrale sia enterico, che sono in cooperazione) considerasse le feci grasse così repellenti come lo sono per le persone. Più verosimilmente, il freno ileale si è evoluto per impedire l'allontanamento dall'intestino tenue del materiale alimentare prima che la digestione e l'assorbimento fossero terminati. Il cervello e il sistema

nervoso enterico vogliono semplicemente essere certi che il lavoro commissionato al soprintendente sia eseguito. Quando l'ultimo degli acidi grassi è stato assorbito, il *freno ileale* viene rilasciato e il chimo scorre oltre. Il colon riceve ciò che gli sta arrivando.

Com'è comprensibile, l'indebolimento del *freno ileale* spiega la diarrea talvolta associata all'ingestione di cibi contenenti Olestra (poliestere di saccarosio). Dato che Olestra non può essere digerito, non fornisce acidi grassi capaci di attivare il *freno ileale*. Ciò significa che Olestra, mentre attraversa lo stomaco e l'intestino tenue, resiste alle cose peggiori che il pancreas e la colecisti possono fargli ed emerge a tutto vapore nel colon che non sospetta di nulla.

7. La fine non arriva mai

La digestione e l'assorbimento dei nutrienti sono completati, a tutti gli effetti, nell'intestino tenue. L'intestino crasso, o colon, ha i suoi compiti da svolgere. Di alcuni ci dobbiamo rendere conto ogni giorno, mentre di altri non dobbiamo mai preoccuparci.

L'intestino crasso

L'intestino crasso, o colon, sembra essersi evoluto per aiutare gli animali terrestri a conservare l'acqua. La disidratazione è una minaccia per gli animali che devono vivere in contatto con l'aria. L'evaporazione costituisce un pericolo costante. La pelle, ovviamente, è l'adattamento principale a questo pericolo perché fornisce una barriera impermeabile. La mucosa dell'intestino deve comunque assorbire l'acqua e i nutrienti, consentendo quindi a entrambi di passarle attraverso. Non è perciò sorprendente che l'acqua possa davvero essere persa attraverso la mucosa intestinale. Dato che il lume dell'intestino si trova all'esterno del corpo vero e proprio, esiste il pericolo di perdere l'acqua che attraversa la mucosa per entrare nel lume intestinale. L'evoluzione o il Padreterno hanno quindi capito che era necessario escogitare dei mezzi per trattenerne quest'acqua. Il compito di recuperare l'acqua che andrebbe altrimenti persa nelle feci è gestito dal colon. Minimizzare le perdite d'acqua è una condizione necessaria per vivere in un ambiente secco.

Quando il contenuto intestinale passa dall'intestino tenue all'intestino crasso, è costituito per lo più da liquidi. In effetti, la quantità d'acqua che l'intestino tenue fornisce all'intestino crasso è abbastanza impressionante. Una parte di quest'acqua è stata deglutita con il cibo, ma una quantità molto superiore è riversata nel lume dell'intestino durante il processo digestivo dalle varie ghiandole e dalle cellule della mucosa intestinale che versano il loro secreto nell'intestino. Gli enzimi pancreatici, l'acido, gli alcali, i sali, il muco e la bile sono tutti riversati sotto forma di soluzioni acquose. Nell'uomo, circa nove litri d'acqua entrano nel colon ogni giorno. Nonostante questo notevole carico d'acqua, che arriva all'estremità prossimale dell'intestino crasso, solo circa 100 millilitri (6-7 cucchiaini da tavola) lasciano solitamente l'ano, cioè la parte terminale del colon, contenuti nelle feci. La differenza fra l'immensa quantità d'acqua che entra nell'intestino crasso e la piccola quantità che ne esce (8,9 litri), rappresenta la quota d'acqua che il colon riassorbe. L'intestino crasso può dare un contributo ridotto o nullo alla digestione, ma è anch'esso un organo indaffarato.

Il meccanismo utilizzato dal colon per recuperare l'acqua consiste nel pompare sali dal lume e portarli nell'organismo. Questo processo richiede una certa quantità di energia perché i sali sono trasferiti da una regione in cui la loro concentrazione è relativamente ridotta a una in cui questa è piuttosto alta. L'acqua segue passivamente il movimento del sale. Il materiale che rimane nel lume dell'intestino crasso diventa quindi più concentrato man mano che l'acqua è rimossa e, di conseguenza, diventa progressivamente più compatto.

Spingere questa massa di materiale in via di solidificazione attraverso l'intestino crasso è un problema. Lo sforzo necessario per muovere i densi blocchi di feci verso l'ano è di gran lunga maggiore di quello necessario per indurre il contenuto liquido dell'intestino tenue a fluire lentamente in avanti. La muscolatura circolare dell'intestino crasso è quindi molto più spessa e potente della parte corrispondente dell'intestino tenue. La mucosa del colon, inoltre, si auto-lubrifica secernendo una quantità superiore di muco rispetto all'intestino tenue, di modo che il

risultante strato viscido possa lubrificare i blocchi induriti di materiale fecale che passano.

Gli inquinanti batterici

Le feci contengono molto di più del semplice residuo alimentare indigerito e non assorbito che è riuscito a passare attraverso l'intestino tenue. L'intestino crasso fornisce anche l'abitazione a numerosi batteri dei quali solo alcuni, per usare il linguaggio dell'aviazione militare degli Stati Uniti, sono alleati. Gli altri sono autentici nemici o subdoli farabutti che se ne stanno buoni solo fintanto che il sistema immunitario dell'individuo che li ospita è forte. Non appena si verifica un cedimento nelle difese del colon, questi batteri codardi rivelano la loro vera natura dando origine a una pericolosa infezione che è spesso resistente agli antibiotici comunemente utilizzati. I batteri solitamente presenti nel colon sono così numerosi che rappresentano la principale componente delle feci che sono infine evacuate.

Il tipo di batterio più frequente del colon è *Escherichia coli*, noto quasi a tutti come *E. coli* perché quasi nessuno osa pronunciare il suo nome di battesimo. *E. coli* ha messo così tanto le radici nel colon normale dell'uomo che si può accuratamente giudicare se un qualsiasi giacimento d'acqua è contaminato dalle acque di scarico umane semplicemente prelevando poche gocce, osservando i batteri che vi galleggiano e determinando il numero di microrganismi che hanno l'aspetto di *E. coli* (coliformi). Non è necessaria alcuna attrezzatura sofisticata o il lavoro di un ricercatore, bensì semplicemente un recipiente per raccogliere l'acqua, un vetrino per alloggiare una goccia e un semplice microscopio per scorgere i coliformi.

In circostanze normali, *E. coli* non è un microrganismo pericoloso. Ma, ovviamente, le circostanze non sono sempre normali. Il più delle volte, l'organismo che alla fine si porta via le vittime debilitate dal cancro o da altre malattie che devastano il sistema immunitario, è *E. coli*. Quest'ultimo appartiene quindi alla categoria dei subdoli farabutti fra i microrganismi del colon. Considerato che *E. coli* invade il colon di quasi tutti gli individui, è chiaro che la nostra specie non avrebbe potuto evolversi se *E. coli* fosse sempre nocivo.

L'evoluzione dell'uomo ha richiesto un'eternità di tempo. L'evoluzione dei batteri segue tuttavia il percorso più breve e si spinge avanti a velocità sconcertante. Il nostro periodo di duplicazione (il tempo necessario per un nostro gruppo, per esempio una famiglia, di raddoppiare il numero dei componenti) si misura in decenni. Al contrario, *E. coli* raddoppia ogni venti minuti. Non esiste quindi un solo tipo di *E. coli*, ma molti tipi diversi. Alcuni *E. coli* sono molto utili. Essi sono utilizzati dai biologi molecolari, per esempio, come fattorie virtuali in cui far crescere e coltivare geni geneticamente modificati. Gli scienziati inoculano i geni d'interesse in ceppi coltivati di *E. coli*, sfruttando la capacità del microrganismo di moltiplicarsi, per aumentare la produzione del materiale genetico o per produrre grandi quantità delle proteine codificate dai geni impiantati nel microrganismo.

Un altro tipo di *E. coli*, come il ceppo 0157-H7, che è in realtà un profugo del colon bovino, aderisce alle nostre cellule cedendo una sgradevole tossina che causa un'infinità di guai. Questa tossina può danneggiare il cervello, i reni e le cellule del sangue. Il ceppo 0157-H7 contamina la carne e causa una tossinfezione alimentare così grave da essere talvolta mortale. Anche un solo

piccolo batterio 0157-H7 può essere sufficiente a provocare una grave malattia. Un *E. coli* del ceppo 0157-H7 è stato recentemente scoperto responsabile di epidemie di cui si è molto parlato. Questi microrganismi aggrediscono il più delle volte gli anziani e i giovani, ma basteranno poche altre epidemie di 0157-H7 per mettere fine alla passione americana per l'ottimo hamburger.

E. coli è, per la maggior parte dei nostri ospiti del colon, la punta putrefacente dell'iceberg. Numerosi altri batteri, troppo numerosi da ricordare, dividono il colon con *E. coli*. Alcuni ci rendono un buon servizio, per esempio producendo la vitamina K, ma la maggior parte di essi sono tanto detestabili quanto indecorosi. La miscela presente nel colon costituita da germi fecali, dal muco e dalla fermentazione, è quindi altrettanto pericolosa quanto priva di attrattiva. Ci viene insegnato, per una buona ragione e molto precocemente, di stame alla larga. Il contenuto dell'intestino crasso va quindi manipolato con cautela dall'organismo. Esso deve essere spinto in avanti ma anche confinato.

Quando tutto va bene, l'ano è la sola uscita del colon. A eccezione di quanto se ne va attraverso questo passaggio, tutto ciò che si trova nell'intestino crasso rimane in questa sede. La propulsione è sempre diretta in senso anale e non esiste alcun movimento contrario. Nulla è quindi spinto a ritroso nell'intestino tenue. I sali e l'acqua sono trasportati attraverso la mucosa del colon, ma nulla di pericoloso s'infiltra tra le cellule della mucosa per entrare nell'organismo. Il materiale infettivo presente nel lume del colon resta dov'è. Il punto di giunzione tra l'intestino tenue e l'intestino crasso, la *valvola ileocecale*, costituisce quindi un punto di riferimento importante. Sopra questa giunzione, il lume dell'intestino è solitamente sterile, mentre al di sotto il lume è il paradiso dei batteri.

Una ragione per cui i batteri nel lume del colon non evadono infettando l'organismo è che sono in guerra l'uno contro l'altro. Nessun tipo di germe prende il comando e il possesso incontrastato dell'apezzamento di colon. La costante competizione tra germi altrimenti pericolosi aiuta a mantenere sotto controllo la popolazione batterica. È il caso di dire che «il nemico del mio nemico è mio amico». I nostri amici batteri nel colon possono essere disgustosi, ma dobbiamo avere sempre cura di loro. L'assunzione di un antibiotico, quindi, non è priva di rischi. Uccidere alcuni germi nel colon può essere un'impresa avventata. Gli antibiotici che distruggono i nostri amici del colon possono causarci molto rapidamente un sacco di guai.

Molti tipi di batteri sono uccisi dagli antibiotici, ma non tutti. Quelli che non sono eliminati diventeranno più resistenti. Come Charles Darwin ha fatto notare, la selezione naturale è una forza potente. Quando applicata a organismi che raddoppiano di numero nel giro di pochi minuti, la selezione naturale non è solo potente, ma anche rapida. La selezione che avviene grazie agli antibiotici non è quindi una bella mossa per la medicina moderna. Il valore terapeutico, farmaco dopo farmaco, si è perso poiché i batteri si adattano eludendo i loro effetti.

L'antibioticoresistenza è un dato di fatto per la vita dei batteri ed è un problema che l'uso indiscriminato degli antibiotici ha fatto diventare molto più grave di quanto avrebbe potuto

essere. Dato che gli antibiotici sono aggiunti abitualmente agli alimenti per il pollame e ad altri prodotti agricoli, la quota di microrganismi resistenti aumenta di anno in anno. Questo problema è amplificato dalla gran quantità di medici che prescrivono un antibiotico senza prima stabilire se la malattia che desiderano trattare è dovuta a un microrganismo sensibile. Sopprimendo alcuni batteri e non altri, la somministrazione di un antibiotico può eliminare la competizione tra i germi nel colon e così succede che un solo ceppo diventi resistente ottenendo il dominio su tutti gli altri. In poche parole, il farmaco seleziona una calamità. Il ceppo resistente è quindi pericoloso per due ragioni. Una perché è stato liberato dal limite imposto dagli altri batteri che normalmente competono con i microrganismi antibioticoresistenti. L'altra perché è difficile eliminare i batteri resistenti perché è difficile trovare un farmaco non tossico in grado di sopprimerli. È quindi facile che i microrganismi resistenti causino una violenta e travolgente *colite* (infezione del colon). Essi possono anche fuoriuscire dal colon e invadere l'organismo. Alcuni fra i ceppi batterici antibioticoresistenti, come per esempio il *Clostridium difficile*, producono tossine che scorticano la mucosa del colon causando una forma di diarrea esplosiva, debilitante e frequentemente letale.

Il sistema immunitario e l'intestino

L'esistenza di vita nel lume dell'intestino crasso richiede che quest'ultimo mantenga una linea di difesa efficace. Il fatto che i batteri competano gli uni con gli altri aiuta a mantenerli distratti, ma è necessaria comunque una quantità di difensori bene armati per fare la guardia e pattugliare i confini. La prima e più ovvia forma di protezione è fornita da un formidabile schieramento di cellule difensive che risiedono nel tessuto connettivo lasso sottostante la mucosa del colon. Queste cellule tengono l'inventario della cosiddetta *flora normale*, cioè dei batteri che ospitiamo abitualmente. Questo inventario è costituito da grandi quantità di cellule immunocompetenti che hanno collegialmente imparato l'identità di tutti i potenziali farabutti e sono in grado di ricordare chi sono. Un benvenuto letale è quindi preparato ed è pronto ad accogliere uno dei soliti sospetti sorpresi a vagabondare oltre i confini del lume dell'intestino crasso (il solo spazio che gli sia concesso). Le cellule immunocompetenti imparano anche a riconoscere le tossine prodotte dai batteri del colon e un sottogruppo di queste cellule memorizza l'informazione. Queste tossine sono quindi neutralizzate prima di poter causare danni.

Dato che le cellule immunocompetenti imparano e ricordano, riescono in modo eccezionale a mantenere lo *status quo*. Finché l'inventario della flora del colon rimane invariato, il *modus vivendi* stabilito con i nostri germi persiste e trascorriamo le nostre vite senza sofferenze. Ci occupiamo dei nostri affari quotidiani, felicemente inconsapevoli delle imponenti armate di germi guerrieri che si trovano nel nostro intestino crasso e che percorrono il cammino della vita assieme a noi. In questo caso, è sicuramente vero il detto «beata ignoranza». La vita è vissuta al meglio quando il colon rimane, come dicono i politici, in ombra. Desideriamo avere notizie dall'intestino crasso solo in quelle occasioni in cui è pronto a svuotare se stesso o il proprio contenuto; sebbene molti di noi pretendano che queste occasioni abbiano luogo regolarmente, esistono limiti precisi sui livelli di frequenza e urgenza considerati tollerabili. Anche notizie trascurabili provenienti dal colon sconvolgono il nostro equilibrio. Si tratta chiaramente di un organo i cui rapporti su cosa sta facendo sono considerati non solo inutili ma anche sgraditi.

Il nostro equilibrio tende a essere sconvolto quando interviene un evento qualsiasi che modifica la composizione della nostra flora normale. Gli antibiotici sono degli evidenti perturbatori, ma anche qualcosa di piacevole come una vacanza in Messico (o in altri, paesi dove i microrganismi locali sono diversi da quelli di casa nostra) può essere sconvolgente. Una semplice modifica nei ceppi di batteri apparentemente inoffensivi presenti nell'intestino crasso può alterare negativamente il comportamento del colon. Il sistema immunitario ha bisogno di tempo per far fronte ai nuovi batteri. Sebbene sia pronto ad affrontare immediatamente i vecchi colpevoli e le relative tossine, esso deve imparare a identificare i nuovi criminali e attrezzarsi a preparare una risposta efficace. Il sistema immunitario ricorderà l'insulto e sarà preparato la volta successiva, ma mentre sta per mettere in atto entrambe le azioni, può compiersi la cosiddetta «vendetta di Montezuma», «tourist two-step», «turista», o comunque si voglia chiamare la

diarrea del viaggiatore. A seconda delle tossine prodotte dai batteri interessati, il problema può causare molto più di una diarrea. Ci si può ammalare abbastanza seriamente.

La diarrea associata al turismo, che manda in rovina vacanze altrimenti meravigliose con eventi spesso irritanti, costosi e sgradevoli appare piuttosto un'attività corporale che si vorrebbe interrompere a ogni costo. In realtà, i tentativi di bloccare questo tipo di diarrea non sono sempre salutari. I nuovi organismi stanno lottando per guadagnare un posto nell'intestino e stanno producendo tossine distruttive. La diarrea, soprattutto quella di tipo acquoso, è quindi una risposta logica e anche utile alla loro presenza. In parole povere, il colon si è sporcato e sta letteralmente cercando di lavarsi. Fortunatamente, il sistema nervoso enterico collabora con le cellule immunitarie per compiere questo lavoro. Come risposta all'infezione nel colon, sono attivati i riflessi nervosi intrinseci che producono una secrezione. I neuroni secretomotori presenti nei gangli sottomucosali si attivano e obbligano le cellule della mucosa del colon a trasportare gli ioni cloruro dal fluido tissutale della parete intestinale al lume del colon. Il sodio segue il cloruro e l'acqua segue il sale. La normale funzione dell'intestino crasso di conservare l'acqua è trascurata non appena il colon si trasforma in una macchina secretoria. L'inondazione risultante ha proprietà detergenti. Tutti i germi privi di un appiglio sufficientemente adesivo alla superficie intestinale sono spazzati via. Anche la pozza putrefacente di tossine è rimossa.

Bloccare la motilità del colon somministrando un oppioide, come per esempio il pargorico (tintura canforata di oppio) o il loperamide, riesce a fermare la diarrea, ma anche altrettanto bene l'operazione di pulizia. Quello che sarebbe un episodio fastidioso ma relativamente breve può prolungarsi ed essere anche aggravato da questi farmaci. È meglio lasciare che la natura segua il suo corso e si liberi di ciò che deve essere espulso. Una medicina che può essere d'aiuto è il bismuto salicilato il quale, in dosi adeguate (è necessario leggere bene il foglietto illustrativo), assorbe le tossine senza influenzare il sistema nervoso enterico, né la secrezione intestinale. Il bismuto salicilato può quindi antagonizzare gli effetti delle tossine batteriche nel colon senza intralciare i meccanismi terapeutici naturali. Alla fine, quasi con noncuranza, il sistema immunitario si attiverà mettendo sotto controllo la diarrea del turista. Finché il disturbo è semplicemente dovuto a una variazione della flora del colon, le cellule immunitarie catturano i nuovi germi e li trattano allo stesso modo di quelli vecchi.

Il sistema nervoso enterico e le cellule immunitarie dell'intestino sono entrambi molto efficaci nel tenere a bada la popolazione microbiologica del colon. L'evoluzione ci ha dotati dei mezzi per superare i peggiori attacchi della stragrande maggioranza di batteri e virus che possiamo incontrare. Anche i batteri, tuttavia, si sono evoluti. Ci siamo adattati alla loro presenza acquisendo la capacità di eliminarli, ma alcuni batteri hanno imparato ad affrontare i nostri contrattacchi o anche a usare i nostri meccanismi difensivi contro di noi. Tutti i microbi sono straordinari biologi cellulari. Essi hanno imparato cosa ci rende nervosi. Quando la nostra evoluzione distribuisce a questi germi un limone, essi producono una limonata.

Buon appetito: i rischi del cibo e dell'acqua

Si consideri per esempio il colera, una malattia che ha accompagnato l'umanità fin dai tempi antichi e ha lavorato, nel corso di numerosi secoli, per contrastare la sovrappopolazione del globo terrestre da parte degli uomini. *Vibrio cholera* è un microrganismo che ha chiaramente avuto la meglio sulla nostra specie, ma non la nostra simpatia. Dovunque appaia il colera, le persone stanno in guardia.

Per quale motivo, si potrebbe pensare, è necessario prendere in considerazione il colera? Sarà pure un microrganismo letale, ma sicuramente non è, tutto sommato, un problema dei nostri tempi. Sfortunatamente, lo è. È una di quelle patologie mitiche, come la peste, che è comparsa periodicamente lungo tutta la storia dell'uomo e sta ancora ripetendosi, lasciando dietro una lunga scia di morti e sofferenze. Si tratta chiaramente di un microrganismo che non va preso alla leggera.

Il colera e le altre tossinfezioni alimentari sono un problema molto attuale e, con il passare del tempo, stanno diventando un problema sempre maggiore. Il colera è il *Re* del gruppo solo perché le sue epidemie comportano milioni di morti, mentre gli altri microrganismi producono epidemie di proporzioni più modeste. Esistono spiacevoli analogie nel modo con cui un intero gruppo di patologie si diffonde e la predisposizione a esse, nelle società moderne, sta aumentando drammaticamente. Il sottoprodotto della globalizzazione è che nessuna malattia appartiene a una sola società. I microbi viaggiano con il commercio mondiale e non sono bloccati da alcun ispettore doganale.

Il secondo cervello e il sistema immunitario sono potenti difensori della frontiera enterica dell'organismo. Tutti noi ospitiamo nel nostro colon qualcosa come cinquecento specie di microrganismi potenzialmente letali. Siamo in grado di farlo grazie all'efficienza delle truppe nervose e immunitarie che mantengono la posizione ai confini del colon. Un numero limitato di specie microbiche, tuttavia, ci ha preso le misure e quando consentiamo loro di introdursi nel cibo o nell'acqua che beviamo, siamo in grossi guai.

Il problema è che, per una serie di ragioni, la vita moderna ha fatto emergere nuove malattie da serbatoi di infezione imprevisi e fornito a quelle vecchie nuovi modi per diffondersi e venire nuovamente a galla. Chiunque viaggi verso destinazioni nei paesi in via di sviluppo, soprattutto quelli delle regioni tropicali, è abituato ad ascoltare i consigli dei medici e degli agenti di viaggio come per esempio: «Bollire, sbucciare o piuttosto non mangiare». In altre parole, evitare di arrivare a contatto con i pericolosi germi che si suppone appostati in quei luoghi per introdursi nel nostro tratto gastrointestinale. Sebbene noi americani seguiamo questi consigli, talvolta quasi religiosamente, quando viaggiamo nei paesi in via di sviluppo, attualmente importiamo però grandi quantità di cibo proprio da questi luoghi. Il Messico e l'America centrale e meridionale, per esempio, sono diventati i principali esportatori di alimenti verso gli Stati Uniti. Alcune fra le persone che manipolano il cibo in questi paesi non sono abituati a utilizzare la carta igienica.

La ciclosporiosi è una malattia che illustra perfettamente il potere della globalizzazione nella disseminazione di microrganismi che, come il colera, sono in grado di infettare l'intestino dell'uomo. Prima del 1996, l'infezione da *Cyclospora* (l'agente causale) era infrequente e limitata per lo più a persone che avevano viaggiato nei paesi in via di sviluppo. Nella primavera del 1996 si verificò tuttavia un'imponente epidemia negli Stati Uniti e nel Canada. Questa provocò un notevole panico finché alcune raffinate ricerche cliniche stabilirono che *Cyclospora* provocava una tossinfezione alimentare diarroica che si stava diffondendo grazie ai lamponi del Guatemala. Interrompendo l'importazione di lamponi dal Guatemala si bloccò l'epidemia, che però riemerse nella primavera del 1997 con un nuovo focolaio. I lamponi non sono più importati verso gli Stati Uniti dal Guatemala, ma anche così si sono verificati nuovi focolai epidemici di *Cyclospora*. Uno si è diffuso tramite la lattuga mesclun e l'altro tramite basilico fresco presente in una salsa al pesto. La natura dei cibi che diffondono la *Cyclospora* permette di capire perché le tossinfezioni alimentari costituiscono un problema per chiunque. In primo luogo esse attraversano ogni confine e, in secondo luogo, trovano la via per colpire anche il cibo dei soggetti più benestanti.

Il fatto che molto del cibo che otteniamo dai paesi in via di sviluppo sia costituito da vegetali amplifica il rischio. Come risultato delle sue osservazioni, Michael Osterholm, capo della Sezione di epidemiologia delle patologie acute del Minnesota Department of Health ed eminente autorità mondiale sulle tossinfezioni alimentari, ha messo in evidenza che le diete salva-cuore che stiamo consumando sempre di più hanno costituito il paradiso per i nostri cuori ma l'inferno dei nostri intestini. C'è stato un forte aumento nel consumo di vegetali negli Stati Uniti. Questi alimenti, che sono facilmente contaminati, costituiscono veicoli straordinariamente efficaci per trasmettere la piccola ma intrepida banda di microbi che ha imparato a penetrare le difese dell'intestino.

Come la nostra dieta è cambiata, così è aumentata anche la tendenza a mangiare fuori casa. Mangiare al ristorante o comprare cibi pronti da mangiare a casa sta prendendo sempre più il posto della cucina casalinga. Il risultato è la presenza di oltre nove milioni di persone impiegate come manipolatori di prodotti alimentari negli Stati Uniti. Queste persone ricevono tendenzialmente bassi salari, scarse indennità e poche (o nulle) opportunità per fare carriera. Tutto sommato, l'educazione dei manipolatori di prodotti alimentari è minima e molti non parlano inglese (il che complica le campagne educative che mirano a modificare le loro pratiche igieniche). La prossima volta che si contemplerà l'eleganza del banco delle insalate, sarà bene rivolgere un pensiero a chi l'ha preparato.

Secondo Osterholm, i crampi allo stomaco, il dolore addominale e la diarrea sono diventati la causa principale delle visite effettuate presso i centri di pronto soccorso ospedalieri negli Stati Uniti, oltrepassando il dolore toracico, che mantiene la posizione numero due. Le tossinfezioni da acqua e da cibo sono diventate così diffuse che non è possibile conoscerne del tutto l'estensione. Le autorità per la salute pubblica hanno problemi a definirle e anche a identificarle. I controlli sono discutibili, in parte perché i laboratori clinici non controllano abitualmente

alcuni dei microbi che sono noti causare patologie alimentari e, in parte, perché non conosciamo ancora tutti i microrganismi responsabili. I casi stimati, per anno, negli Stati Uniti variano da sei a ottantuno milioni. Osterholm è certo che questi valori sottostimano il problema. Nel suo stato, il Minnesota, che non è un caso atipico, ci sono sei milioni di casi di diarrea l'anno, che producono circa mezzo milione di visite mediche. Un nuovo programma di monitoraggio chiamato Food-Net è stato avviato con lo sforzo congiunto del Centers for Disease Control, la Food and Drug Administration e il Ministero dell'agricoltura degli Stati Uniti (USDA) per determinare incidenza e prevalenza di varie tossinfezioni alimentari. I risultati sono stati scoraggianti. Nonostante le migliori intenzioni e i miglioramenti nei controlli e nella trasformazione degli alimenti, la sicurezza alimentare in America non è decisamente migliorata rispetto agli anni Cinquanta.

Le patologie gastrointestinali, in America, stanno aumentando. Non tutta questa nuova massa di patologie, ovviamente, è dovuta alle tossinfezioni alimentari; tuttavia, le nostre variazioni dietetiche, le nuove fonti e chi manipola i nostri alimenti hanno contribuito alla diffusione di queste malattie. Inoltre, le difficoltà degli Stati Uniti non possono essere solo attribuite ai paesi in via di sviluppo. Anche la gestione industriale degli allevamenti in America ha dato il suo contributo. Il pollame e i suini, per esempio, sono stipati in gran numero in spazi limitati e questo rende facile la diffusione delle epidemie. Il risultato è che l'80% del pollame americano arriva attualmente nei supermercati già contaminato con il *Campylobacter*, un agente che può causare diarrea, vomito e un'infezione letale del sangue nelle persone con sistema immunitario compromesso. Le uova contengono spesso *Salmonella enteritidis* (che causa una patologia simile a quella provocata dal *Campylobacter*) e questo microrganismo, molto difficile da eliminare, è stato trovato vivo nell'1% dei prodotti a base di uova pastorizzate controllate dall'USDA. Oltre metà degli allevamenti di suini negli Stati Uniti è attualmente portatore di *Toxoplasma gondii* e gli studi dimostrano che più del 40% degli adulti americani possiede anticorpi per questo microrganismo, il che significa che l'ha già incontrato. Mentre la nostra paura della trichinosi è diminuita, il nostro consumo di carne di maiale cruda o poco cotta è aumentato. *Toxoplasma gondii* provoca la toxoplasmosi, una malattia solitamente lieve e simile alla mononucleosi. La toxoplasmosi, tuttavia, può colpire mortalmente il cervello nelle vittime dell'AIDS e causare gravi difetti di nascita quando infetta le donne gestanti.

Lo spettacolare agente veicolato dal cibo, *E. coli* ceppo 0157-H7, che causa una combinazione talvolta letale d'insufficienza renale e patologia ematica, è solo una delle forme patologiche causate da *E. coli* che abita per natura il colon dei bovini da carne americani. Questi *E. coli* bovini sono molto diversi dai microrganismi relativamente innocui che trasportiamo con noi. Quando *E. coli* 0157-H7 contamina la carne presso gli impianti di confezionamento, costituisce un problema grave. *E. coli* 0157-H7 presente negli eccezionali hamburger venduti dalla catena di ristoranti Jack in the Box nella zona di Seattle fece ammalare 732 persone, causando 195 ricoveri ospedalieri e quattro morti. *E. coli* 0157-H7 non si trova solo negli hamburger. È stato anche scoperto nei banchi delle insalate e in sidro non pastorizzato preparato

con mele cadute in terreni destinati a pascolo per bovini. In effetti, il microrganismo si è diffuso dai bovini ai volatili selvatici, che lo disseminano ampiamente in natura.

Per quanto queste descrizioni possano sembrare spaventose, rappresentano solo la punta di un iceberg molto grande. Siamo chiaramente vulnerabili alle tossinfezioni alimentari e lo siamo sempre di più. L'approvvigionamento alimentare costituisce anche un invito per un bioterorista. Sarebbe sicuramente utile sottoporre le riserve alimentari nazionali agli effetti sterilizzanti delle radiazioni gamma, come avviene per il cibo fornito agli astronauti. Ma la nostra paura delle radiazioni è così forte che supera i limiti della ragione ed è quindi poco probabile che l'irradiazione degli alimenti sia introdotta tanto presto.

Nessuno dei comuni microbi che affronta le difese dei sistemi nervoso enterico e immunitario è capace di contendere al colera la capacità di generare puro terrore. Considerata la nostra attuale vulnerabilità, il colera è una calamità americana annunciata. Nel 1991, appena un momento fa nella lunga relazione dell'uomo con il colera, la malattia è riapparsa in proporzioni epidemiche in Perù. È noto che circa quattrocentomila persone hanno contratto il colera nel primo anno di quell'epidemia e che dal 1994, dopo che il colera si è diffuso in tutto il Perù dal nord al sud, ha devastato circa un milione di persone. Undici casi di colera collegati al focolaio sudamericano sono stati osservati a New York e nel New Jersey, dove il problema è arrivato tramite carne di granchio portata dall'Ecuador e consumata in America. Nel mondo del Boeing 747, nessuno è totalmente al sicuro dal colera, in qualsiasi parte del mondo si trovi.

Il tasso di mortalità da colera nell'America del Sud è risultato superiore al 30% nel 1991 perché i medici non hanno riconosciuto la malattia per quello che era. I medici riescono molto meglio a diagnosticare le malattie che prevedono di incontrare. Il colera è una di quelle patologie che i medici pensano di incontrare solo sulla carta stampata, ma non nella realtà. Si tratta, allo stesso tempo, di un peccato e di una potenziale tragedia americana, perché il colera arriva negli Stati Uniti nelle pance dei viaggiatori e con notevole regolarità. Un importante studio ha inoltre dimostrato che il colera è frequentemente mal diagnosticato dai medici americani e comunque, una volta avvenuta la diagnosi, la patologia è trattata in modo inadeguato. Questa situazione è spiacevole e, allo stesso tempo, agghiacciante, perché il colera può essere trattato e, se lo è, il paziente guarisce piuttosto bene. Per esempio, dopo che l'epidemia iniziata in Perù fu pubblicizzata, cosicché i medici si aspettavano di osservare casi di colera, il tasso di mortalità scese sotto l'1%. Dato che la diagnosi precede il trattamento, il colera è sempre più letale all'inizio dell'epidemia quando la sua presenza è insospettata. Dato che il colera non è mai ritenuto verosimile in America e nell'Europa del Nord, il trattamento in queste circostanze sarà sempre quello peggiore.

L'epidemia peruviana di colera ha colpito in modo più duro i soggetti che solitamente sono già colpiti da qualsiasi problema sociale o politico che si stia diffondendo in un determinato momento: i poveri. In passato, il colera era molto più egualitario. Quando l'ignoranza attanagliava la maggior parte dell'umanità, il colera era altrettanto felice di infettare l'intestino delle persone facoltose, quanto quello dei poveri. Non è che *Vibrio cholera* sia ora impegnato in

una guerra per rovesciare il marxismo. In effetti, il microrganismo è un batterio che tiene alle eguali opportunità. È felice di infettare qualsiasi intestino che può raggiungere. Il particolare problema che i poveri hanno con il colera è che il batterio lavora nelle fogne come i politici lavorano sulle folle. Il colera recita fino in fondo un gioco ciclico mortale, passando dal colon delle sue sfortunate vittime a tutti i luoghi dove serpeggiano le loro feci non sterilizzate, alle bocche delle sue vittime seguenti. I ricchi non traggono alcun conforto da questo ciclo, perché oggi il povero manipola il cibo del ricco.

La gestione efficace della raccolta e del trattamento delle acque di scarico è un mezzo formidabile per prevenire un'epidemia di colera. La gestione delle fogne è tuttavia banale ma, al contempo, dispendiosa. Nessun politico potrà mai vincere un'elezione sponsorizzando un buon sistema di trattamento delle acque di scolo. La semplice menzione della parola «fogna» offenderebbe alcuni votanti facendo addormentare dalla noia gli altri. Per i leader democratici spendere energia e influenza politica per il trattamento degli effluvi umani, quindi, è come realizzare un atto assolutamente altruistico. Dato che i poveri sono trascurati e qualche volta tendono a non votare, sono messi in pericolo dalle acque di scolo più della popolazione in genere.

Anche la guerra e il caos sono amici del colera e flagello dei poveri. Decine di migliaia di persone sono morte di colera nei campi per rifugiati del Rwanda nel 1994 e nel 1995 si sono verificati centinaia di casi in Romania e negli Stati del Mar Nero dell'ex Unione Sovietica. Quando i sistemi per la salute pubblica vanno a rotoli, come tendono a fare quando un ordine stabilito collassa, è probabile che scoppi un focolaio di colera.

Ovviamente, una buona epidemia di colera cambia ogni cosa. Nulla come un'epidemia con numerosi morti è in grado di focalizzare l'attenzione di un elettorato, di un'oligarchia o di un dittatore, su quanto avrebbe dovuto essere fatto anni prima. Anche se un'epidemia di colera in una nazione non è sufficiente a spaventare tanto da condurre quel paese a entrare in azione, il colera possiede quel tipo di campanello che attrae l'attenzione degli stati limitrofi. Esso quindi va e viene, seguendo uno schema abbastanza regolare. La prima volta attacca uccidendo i soggetti sensibili. Ci sono comunque dei sopravvissuti, spiriti forti che incontrano questo nemico e vivono abbastanza da poterne parlare. Questi sopravvissuti, dopo la loro esperienza, possiedono sistemi immunitari che hanno imparato chi è il colera e cosa fanno le sue tossine. Questi soggetti sono quindi preparati quando il colera si presenta nuovamente e non si ammalano. Se la popolazione colpita dal colera sopravvive, quindi, la successiva epidemia di colera è praticamente auto-limitante. La quota di popolazione disponibile a ospitare l'organismo si riduce. I soggetti sensibili muoiono o diventano immuni. Nell'uno o nell'altro modo, il colera resta senza persone da infettare e l'epidemia finisce. Così come gli agricoltori non possono coltivare i campi non più fertili, il colera non può diffondersi dopo che non trova più persone da infettare. A quel punto, il colera diventa essenzialmente una patologia pediatrica. I bambini nati dove il colera è endemico sono i soli a potersi infettare per la prima volta.

L'epidemia di colera del 1991 che colpì la prima volta in Perù terminò quando le autorità

sanitarie mondiali fecero causa comune con i funzionari locali terrorizzati per bloccarla. L'epidemia arrivò dal mare, come sembrano fare sempre più spesso oggi i focolai epidemici di colera. Le acque di scarico derivanti dalle attività umane sono gettate negli oceani, che sono spesso considerati dalla gente come pozzi neri senza fine forniti dal Padreterno per i loro comodi. Gli animali marini sono quindi immersi in un'acqua che contiene un materiale derivato da una gran quantità di intestini crassi umani. Quelle che sembrano apparentemente acque limpide e azzurre di un mare incontaminato appaiono a livello microscopico come una massa mulinante di parassiti umani. Alcuni animali marini, come le vongole, le ostriche e le cozze sono come filtri. Queste creature rimuovono la sporcizia dall'acqua concentrando i germi dentro il proprio corpo, trasformandosi sostanzialmente in confezioni di escrementi umani compattati. Esse diventano trappole esplosive, agguati mortali, pronti ad avvelenare chiunque le mangi. Altrettanto negativamente, altri animali marini possono cibarsi di questi molluschi infetti. Il risultato è che se le acque di scolo umane sono fuori controllo, nessuno può dire cosa i frutti di mare portino dentro di sé. Dato che l'epidemia di colera si è spostata dalla parte settentrionale del Perù verso gli Stati Uniti e da quella meridionale verso il Cile, le nazioni con significative popolazioni di ceto medio che non sopportano questo tipo di eventi sono state minacciate. Le risorse e la volontà di mettere fine all'epidemia sudamericana sono state trovate e, ancora una volta, il colera è sparito alla vista, almeno a quella dell'America del Nord.

Il colera e le patologie analoghe non sono mai abbastanza eradicato. Siamo in grado di bloccare le epidemie di colera quando e soprattutto dove ci va di farlo, ma la malattia riemerge negli angoli più dimenticati della terra. In queste zone sfortunate, il colera rimane nascosto, senza poter causare epidemie grazie all'immunità generale della popolazione locale. Per diventare vecchi in queste zone bisogna essere resistenti al colera. La patologia quindi resta sotto il livello di attenzione dei leader che hanno i mezzi e la conoscenza per eliminarla. I soggetti sufficientemente predisposti, di solito i bambini, sono presenti in numero sufficiente da mantenere la presenza del microrganismo nell'ambiente, ma non tanto da sostenere un'epidemia. Noi chiamiamo questo tipo di colera che cova sotto la cenere *endemia* (opposta all'epidemia) e lo consideriamo un fatto inevitabile nella vita per quelle povere popolazioni che non hanno avuto il buon senso di nascere altrove. Quando questo è il problema di regioni sfortunate del mondo che non sentiamo rappresentare una minaccia immediata al nostro benessere, tendiamo a praticare una forma di calvinismo globale. Le affezioni di queste altre persone sono considerate il risultato del destino e perciò non ce ne curiamo.

Se pensiamo un poco a chi prepara i banchi delle insalate dei quali ci nutriamo, la maggior parte di noi pensa sicuramente meno a chi lavora sulle navi che solcano i mari e ancora meno a cosa è passato nel colon di quelle persone. Gli abitanti di New Orleans, quindi, sarebbero probabilmente del tutto scioccati e anche un po' offesi se qualcuno dicesse loro che i vibrioni che causano il colera (e molti altri germi che si diffondono nello stesso modo) sono visitatori regolari delle loro città. La diarrea è un sintomo ed è una sciagura, soprattutto se dovuta al colera. Il colera non è certamente una malattia che qualsiasi camera di commercio possa

tollerare. New Orleans quindi potrebbe essere una sede impensabile per un'epidemia di colera tanto quanto Zermatt per un'epidemia di febbre tifoide. Inoltre, la camera di commercio non è in grado di controllare il fluire degli eventi. Il colera si è presentato a New Orleans e la febbre tifoide si è verificata a Zermatt. A New Orleans, il problema del colera è causato dalla relazione amorosa che la città e la regione circostante hanno con le ostriche provenienti dal Golfo del Messico. La minaccia del colera è quindi una presenza costante a New Orleans, perché consumare ostriche crude del Golfo fa parte dello stile di vita. Dato che i fritti di mare crudi del Golfo non possono essere sterilizzati e non è possibile controllare adeguatamente le abitudini igieniche delle persone che navigano sul Golfo, il colera è e rimane una presenza quanto meno occasionale a New Orleans e in ogni altro luogo lungo le coste del Golfo della Louisiana e del Texas.

Nel dicembre 1996, un pescatore malato defecò nelle acque internazionali del Golfo del Messico. Le persone che navigano su barche e navi pensano spesso che i propri rifiuti abbiano un volume così trascurabile in confronto a quello del mare che sicuramente un piccolo scarico, per quanto possa essere illegale, non è pericoloso. In questo caso, però, la defecazione avvenne su un letto di ostriche raccolte per essere vendute a New Orleans. Quella volta, per fortuna, l'agente filtrato e concentrato dalle ostriche era solo il *Calicivirus* e non il colera. Le ostriche fecero il loro effetto. La devastazione, sotto forma di febbre, vomito, crampi addominali tremendi e diarrea, si diffuse dai banchetti di ostriche crude a New Orleans. L'epidemia venne quindi rapidamente all'attenzione di quelle persone la cui professione consiste nel preoccuparsi delle patologie trasmissibili e che sanno come affrontarle. L'ufficio della Sanità pubblica della Louisiana fu informato su un gruppo di sei persone che si erano ammalate consumando ostriche crude il 25 dicembre. Dal 30 dicembre 1996 al 3 gennaio 1997, arrivarono comunicazioni riguardanti altri tre gruppi simili. Dal 9 gennaio furono colpiti sessanta gruppi comprendenti 493 persone. Il *Calicivirus* responsabile fu rapidamente isolato, tipizzato e tracciato. La tipizzazione molecolare del microrganismo creò una traccia che condusse gli investigatori alle ostriche contaminate, ai mercati in cui erano state acquistate, al peschereccio che aveva raccolto le ostriche e, infine, al pescatore la cui azione avventata aveva causato il problema primario. L'epidemia era iniziata a causa di una sola persona che aveva fatto ciò che non doveva fare in un punto strategico. Il *Calicivirus* è cattivo ma, parafrasando Lloyd Bentsen, non è il colera. C'era un'epidemia, ma non era di colera... questa volta. Un colpo di avvertimento è stato sparato verso la nostra prua: lo ignoriamo a nostro rischio e pericolo.

Il colera è un esempio, più evidente di altri, di un organismo che ha imparato i segreti del sistema nervoso enterico. Esso adotta in modo perverso il nostro meccanismo di difesa e lo rivolge contro di noi. Il colera uccide le sue vittime utilizzando le loro stesse armi antibatteriche. Come un esperto di judo, fa leva sull'attacco del sistema nervoso enterico e dell'intestino, trasformandolo in una spinta suicida che può uccidere una persona prima che il sistema immunitario abbia avuto anche solo la possibilità di venire in suo soccorso.

L'azione del colera sugli esseri umani

Il *Vibrio cholera* non viene completamente ucciso dall'acido gastrico e i germi che passano attraverso lo stomaco non vengono digeriti durante il passaggio nell'intestino tenue. L'acido gastrico, tuttavia, fornisce una difesa. Durante l'epidemia di colera in Europa nel 1971, è stato evidenziato che l'uso di antiacidi e di antistaminici per il trattamento del bruciore di stomaco e dell'ulcera facilitava la diffusione del colera. Quando i vibrioni raggiungono l'intestino tenue, perforano il muco, trovando recettori congeniali nelle cellule della mucosa, alle quali aderiscono. Essi utilizzano questi recettori come se si trattasse di ganci ai quali aderire strettamente. Trasformano le cellule epiteliali dell'intestino tenue nel loro domicilio per tutta la loro esistenza. In questa posizione i vibrioni restano fuori dal tessuto connettivo, che con il suo apparato di cellule difensive è situato al di sotto dell'epitelio intestinale, e non debbono così competere con gli altri organismi presenti nel colon. Nella loro nuova «casa» i vibrioni sono semiprotetti e riescono a fermarsi per un tempo sufficiente a creare una tossina in grado di esercitare un danno notevole.

La tossina del colera è in grado di convertire uno dei meccanismi di difesa naturale dell'organismo in una forma bizzarra di auto-immolazione. Il processo di secrezione, scatenato dal secondo cervello, che normalmente dilava via gli organismi meno adattati e le tossine dal colon, viene convertito dalla tossina del colera in un flusso letale. Le feci non hanno più consistenza e colore, in quanto il contenuto del colon viene quasi completamente perso. Le feci si trasformano in un liquido incolore leggermente torbido, chiamato in modo eufemistico «feci tipo acqua di riso», in quanto assomigliano all'acqua utilizzata per lavare la carta di riso. Le feci non contengono nulla di solido e sono inodori, pertanto l'odore caratteristico non è sgradevole. Tuttavia, sono cariche di organismi contagiosi. La diarrea che accompagna il colera causa una grave disidratazione. L'organismo perde l'acqua in modo talmente rapido da non poter essere rimpiazzata con le bevande.

Nei luoghi dove il colera è frequente e dove esistono centri per il trattamento, i pazienti vengono sdraiati su letti speciali, chiamati «letti da colera», appositamente studiati allo scopo. Questi letti al centro hanno un foro. Il paziente viene posizionato in modo che l'ano si trovi in prossimità del foro. Un cilindro graduato viene posto al di sotto del foro in modo da raccogliere il flusso diarroico del paziente, che è pressoché costante. In questo modo può essere ottenuta un'attenta misurazione del quantitativo d'acqua persa dal paziente. Il trattamento consiste nella sostituzione dei fluidi con una quantità adeguata di soluzione somministrata per via endovenosa. Se si riesce a stare al passo con la perdita dei fluidi non è necessaria terapia antibiotica (anche se può ridurre la durata della malattia) e il paziente probabilmente si ristabilisce. L'immunità naturale si innesca, neutralizzando la tossina del colera e curando la malattia. La cura del colera consiste semplicemente nel prevenire la disidratazione in ogni modo possibile. Durante un'epidemia, quando chiunque presenti diarrea è presumibilmente infetto dal colera non sono neppure necessari medici per trattare la malattia. Sono invece necessarie infermiere assistenti

volenterose alle quali può essere rapidamente insegnato ciò che devono fare, oltre a una fornitura di aghi sterili e sufficiente soluzione da somministrare per via endovenosa. Pertanto è possibile istituire facilmente una terapia efficace del colera, cosa molto positiva, in quanto il basso costo del trattamento consente di utilizzarlo anche nei paesi poveri.

Per comprendere in che modo il colera ci mette contro il nostro colon è necessario considerare il processo che il colera sconvolge. Questo processo è la secrezione che conseguentemente a stimolazione nervosa aiuta il sistema immunitario destinato a «dilavare gli invasori sporchi e in decomposizione» dal colon. Si tratta di un meccanismo complicato, ma se un organismo «ottuso» come quello del colera è in grado di comprenderlo e di snatarlo, certamente un organismo superiore, come l'uomo, è in grado di comprendere i suoi principi di base.

La secrezione nel colon viene stimolata attraverso molecole di segnalazione che «accendono gli interruttori» rappresentati dai recettori sulla superficie di cellule specializzate dell'epitelio dell'intestino crasso. Le cellule responsabili della secrezione, che normalmente dilava gli organismi indesiderati, si trovano all'interno di pieghe dell'epitelio del colon e vengono chiamate *cellule della cripta*. Ironicamente, le nuove cellule epiteliali nascono nelle cripte, mentre la morte cellulare avviene altrove (sulla superficie dei villi nell'intestino tenue e sulla superficie del lume del colon). Le cripte sono semplicemente le pieghe dell'epitelio dell'intestino tenue e di quello crasso. Le molecole che avviano la secrezione sono neurotrasmettitori o ormoni. Le molecole note per essere rilasciate dai nervi che stimolano la secrezione comprendono l'acetilcolina e i *peptidi intestinali vasoattivi*, chiamati VIP (sicuramente il più bel soprannome fra tutti i neurotrasmettitori). Di qualsiasi tipo siano le molecole di segnale, l'evento scatenante è sempre lo stesso. La molecola di segnale si lega ai suoi recettori sulla superficie cellulare. L'avvenimento causa fenomeni interessanti, perché innesca l'arcano apparato di trasduzione delle cellule, simile al segnale alla Rube Goldberg. L'elemento critico nella trasduzione del segnale è la generazione di un secondo messaggero (il primo è il neurotrasmettitore o l'ormone) che informa «l'essenza» della cellula dell'attivazione dei propri recettori. Le cellule quindi diventano consapevoli che per loro è arrivato il momento di agire. Il secondo messaggero è responsabile della messa in moto di una cascata complicata di eventi che eventualmente porteranno alla secrezione. Vengono attivate pompe, modificate molecole, trasportati ioni dalla parete dell'intestino al lume intestinale e infine l'acqua segue gli ioni.

Uno dei secondi messaggeri utilizzati dalle cellule secernenti della cripta del colon è una molecola dal nome *3',5''-adenosinmonofosfato ciclico*, nome talmente ostico che gli scienziati preferiscono chiamarlo con le sole iniziali *cAMP*. Per formare un *cAMP*, un recettore attivato (il pulsante della membrana su «on») inizia una reazione a catena. Il primo passo di questa catena fa sì che il recettore stimolato causi l'inattivazione di una tripletta di proteine vicine. Queste proteine sono chiamate *proteine G* e i loro componenti sono contraddistinti con lettere greche, α (alfa), β (beta) e γ (gamma). La *G* nella nomenclatura delle proteine *G* deriva dalla capacità del componente delle proteine *G* di legare due molecole altamente energetiche, *GDP* (guanosina

difosfato) e GTP (guanosina trifosfato). GDP ha due fosfati, mentre GTP ne ha tre. Quando il complesso della proteina G è a riposo (non è stimolato dal recettore), GDP aderisce strettamente ad α , che a sua volta resta aggrappata a β e questa a γ . Un recettore attivo si muove verso α e causa la perdita dell'affinità di α per GDP. Non appena ciò accade GDP si stacca da α e viene immediatamente sostituito da GTP.

Il semplice atto di legare GTP anziché GDP trasforma α . Quando GDP aderisce a essa, α è un rispettabile Dr. Jekyll, è una proteina che sporge tranquillamente dalla membrana e lega i suoi partner β e γ , che sembrano esercitare un'influenza frenante su di essa. Il legame di GTP colpisce α con la forza di una dose di cocaina, convertendola in un violento Mr. Hyde: α , che prima era tranquilla, diventa un «violento predatore». Caricata con GTP, α , staccandosi da β e γ , si muove furtivamente lungo la membrana per trovare e per attivare l'enzima *adenilciclasi* che genera cAMP.

Fino a che GTP resta aderente ad α , α sarà insaziabile e non si lascerà scappare l'adenilciclasi dalla sua stretta stimolante. L'adenilciclasi diventa un enzima posseduto e non sarà in grado di auto-fermarsi. Guidata da α impazzita a causa di GTP elargirà costantemente cAMP. La presenza costante del secondo messaggero blocca le cellule nella fase secretoria. Naturalmente, normalmente ciò non avviene. Alle cellule secernenti non è consentito essere sempre «on». In un caso simile l'evoluzione dell'organismo che possiede queste cellule verrebbe fermata repentinamente. Quindi le cellule possiedono interruttori «off» e interruttori «on». In questo caso esistono molteplici interruttori «off». Uno degli interruttori «off» è una proprietà intrinseca di α , che si duplica come enzima che provoca la perdita da parte di GTP (che non è comunque molto stabile) di uno dei suoi gruppi di fosfati trasformandolo in GDP. Dato che GTP, che ha perso i fosfati, è legato ad α nel momento della rimozione del fosfato, l'intervento di α su GTP lascia dietro ad α una molecola residua di GDP che resta aggrappata ad α . La ricomparsa di GDP su α , «tranquillizza» α , facendo in modo che lasci andar via adenilciclasi e che ritorni così al suo ruolo di Dr. Jekyll in un'unione tranquilla con β e γ . La produzione di cAMP si ferma e la rimanenza di cAMP viene distrutta da un enzima destinato a questo scopo (un altro interruttore «off» dal nome impronunciabile di *fosfodiesterasi*). Pertanto, l'attività secernente della cellula finisce. In circostanze normali, quindi, la reazione a catena guidata dalla proteina G inizia la secrezione, ma si tratta di un fenomeno auto-limitantesi che non dura di più dell'attivazione del recettore da parte del neurotrasmettitore o ormone che aveva dato alla cellula il segnale di entrare in azione.

Il colera comprende e utilizza il ruolo delle proteine G nei segnali cellulari.

La tossina del colera è stata abilmente progettata dall'evoluzione per penetrare nelle cellule e interagire con una particolare proteina G. Questa proteina G, chiamata *Gs*, è quella collegata all'attivazione dell'adenilciclasi e alla produzione di cAMP. È stata la complessità della tossina del colera ad aiutare il premio Nobel Alfre Gilman a scoprire che *Gs* è solo una delle molte proteine G. Altre proteine G attivano altri percorsi di trasduzione del segnale o arrestano la stimolazione di adenilciclasi attraverso *Gs*.

La tossina del colera, il veleno che il vibrione del colera sintetizza per portare a termine il suo scopo mortale, è formata da due proteine separate, dette *sottounità*, collegate fra loro attraverso un legame chimico, in modo da poter funzionare in coppia. Una sottounità della tossina del colera agisce come chaperon molecolare che abilita se stessa e i suoi partner ad attraversare le membrane cellulari. L'altra sottounità, portata dentro le cellule dai suoi «complici», è un enzima destinato a svolgere il «lavoro sporco» della tossina. Questa catena della tossina del colera fa in modo che la cellula faccia aderire una molecola, l'ADP-ribosio, al componente α di Gs. L'adesione dell'ADP-ribosio ad α blocca la capacità di α di riconvertire GTP in GDP. Come risultato, non appena un neurotrasmettitore attiva i suoi recettori e il componente α di Gs si attiva, non si disattiverà più. Ciò significa che la tossina del colera induce le cellule a creare uno spessore molecolare che bloccherà l'interruttore cellulare, mantenendolo in posizione «on». Il risultato è un flusso virtualmente interminabile di secrezione che persiste fino alla morte del paziente o fino a che il sistema immunitario imparerà come comportarsi con il colera e con la sua tossina, scatenando un contrattacco «salvavita».

Mentre la vittima designata attende questo contrattacco, può essere ridotta in un mucchietto di argilla rinsecchita. Il flusso di diarrea indotto dal colera agisce sull'organismo anche in un altro modo. Garantisce che il colera abbia una scarsa competizione batterica. I germi nel lume del colon tendono a essere lavati via. E talmente bene da spiegare come mai nelle feci tipo «acqua di riso» dei pazienti affetti da colera sono assenti gli abituali prodotti della fermentazione batterica. Tuttavia, il colera non vive nel lume del colon insieme agli abituali organismi che compongono gran parte della normale flora batterica. Essendo il vibrione del colera saldamente adeso alle cellule epiteliali dell'intestino tenue, evita gli effetti del flusso che egli ha causato. Pertanto, può restare tranquillamente al suo posto mentre gli altri germi vengono trascinati via. Il colera forza il corpo, contro il suo interesse, a mantenere al sicuro i vibrioni invadenti dall'essere trascinati via dai fluidi che avanzano impetuosamente, o per meglio dire in questo caso, che escono impetuosamente.

La tossina del colera va ancora oltre. È come se fosse stata progettata da un genio malvagio per essere al sicuro da tutto e non lasciare alcuna possibilità al caso. La tossina non può causare le sue ignobili morti senza l'attivazione di un componente α di Gs.

Attraverso l'adesione di una molecola di ADP-ribosio ad α , la tossina previene l'attivazione ad α di ogni «spengimento»; GTP legato ad α non può essere ridotto e riconvertito in GDP. Ma cosa accadrebbe se GDP non dovesse legarsi ad α all'inizio? In effetti, non accadrebbe nulla di male. Chiaramente, se una cellula non è mai su «on» la tossina del colera non è in grado di bloccare il meccanismo di segnalazione in posizione «on». In una cellula stimolata, un α -GTP «avvelenato» con ADP-ribosio viene spinto a rapire l'adenilciclasi e a sfomare continuamente cAMP, in quanto α non è in grado di staccare GTP dalla sua parte posteriore. Contrariamente, in una cellula non stimolata un α -GDP non avvelenato con ADP-ribosio resterà tranquillamente nella morsa di β e γ , in quanto non esiste GTP da allontanare dalla parte posteriore di α . La tossina del colera quindi ha bisogno che un ormone o un neurotrasmettitore stimolino un

recettore sulla cellula per avvelenare questa cellula. La stimolazione di un recettore fa sì che il complesso Gs si dissocia e induca GTP a sostituire GDP legato al componente α che rimane. Quando ciò accade in presenza della tossina del colera la cascata del segnale di trasduzione viene attivata e il resto è noto.

Se nulla stimola una cellula avvelenata, è plausibile che questa sfugga alla stretta della tossina del colera. Il colera, tuttavia, provvede anche a questo. La sua tossina non avvelena solo le cellule secernenti. Il colera coinvolge anche i nervi intestinali, per garantire che sia disponibile un adeguato neurotrasmettitore che stimoli la secrezione. Causando l'attivazione dei recettori sulle cellule della secrezione da parte dei nervi secretori, l'evoluzione del vibrione del colera accerta che la sua tossina non avvelenerà queste cellule invano.

La serotonina è uno dei fattori maggiori nel dare inizio ai riflessi della secrezione. Questo ruolo è molto facile da dimostrare in una parte normale di intestino. Se si irrita mediante sfregamento la mucosa che riveste la superficie luminale di un segmento isolato di colon, il livello di cAMP aumenterà all'interno delle cellule della cripta, le cellule secerneranno ioni cloruro e l'acqua seguirà il cloruro nel lume intestinale. L'effetto dell'irritazione è dovuto alla stimolazione nervosa; pertanto se i nervi della parete intestinale vengono anestetizzati sperimentalmente con tetrodotossina contenuta nel veleno del pesce palla, la mucosa può essere irritata senza provocare la secrezione delle cellule della cripta. Bloccando l'azione della serotonina si ottiene lo stesso effetto e, pur irritando l'intestino, la secrezione non avviene in presenza di un adeguato antagonista della serotonina. Lo sfregamento della mucosa provoca la secrezione di serotonina da parte di determinate cellule epiteliali, note come *enterocromaffini* o cellule EC. Queste sono le cellule che congiuntamente producono e contengono oltre il 95% della serotonina dell'organismo. Un aumento di pressione all'interno del lume intestinale, che attiva la secrezione intestinale, è lo stimolo naturale che viene imitato sperimentalmente irritando la superficie della parte di colon isolata.

Le cellule EC sembrano essere effettivamente recettori sensoriali. Questa è una scoperta relativamente recente e interessante. La stimolazione meccanica, come lo sfregamento o la deformazione da pressione, attiva la secrezione di serotonina da parte delle cellule EC. In questo momento passo molte ore in laboratorio tentando di scoprire il meccanismo molecolare responsabile del collegamento tra la stimolazione meccanica delle cellule EC e la conseguente loro secrezione di serotonina. Attualmente, la tossina del colera sa come funzionano le cellule EC, mentre io non lo so. In ogni caso, le cellule EC sono cellule endocrine, simili alle cellule G che secernono gastrina nello stomaco, cui somigliano le cellule EC. Non secernono serotonina nel lume intestinale, ma nella parete. Pertanto, la serotonina viene inviata allo spazio connettivale sottostante l'epitelio intestinale. In questo spazio si trovano numerose fibre nervose e vasi sanguigni.

Una parte della serotonina nel tessuto connettivo, come la gastrina, entra nel flusso sanguigno. La serotonina viene rapidamente inattivata dalle cellule ematiche o dal fegato (verso il quale il sangue fluisce dall'intestino). La serotonina del tessuto connettivo dell'intestino,

tuttavia, viene anche a contatto con le fibre nervose che lo attraversano. Alcuni di questi nervi che passano di qui per raggiungere e stimolare le cellule delle cripte, naturalmente, sono stimolatori della secrezione. Altri nervi, tuttavia, non sono motori ma ho trovato che sono sensitivi. Un tipo di nervi sensitivi è intrinseco, collegato a vie nervose site interamente nel sistema nervoso enterico. Altri nervi sensitivi sono estrinseci, collegati al sistema nervoso centrale. Entrambi i tipi di nervi sensitivi possiedono recettori sulla superficie, che rispondono alla serotonina. Quando la serotonina rilasciata dalle cellule EC agisce su questi recettori, i nervi sensitivi vengono stimolati. I nervi sensitivi intrinseci avviano i riflessi della secrezione e i movimenti peristaltici. I nervi sensitivi estrinseci sono responsabili della nausea e se la stimolazione è sufficientemente forte anche di vomito e crampi.

La tossina del colera penetra sia nelle cellule EC sia in quelle della cripta. La stimolazione della secrezione di cloruro da parte delle cellule della cripta non è quindi l'unica azione che la tossina del colera svolge nell'intestino. Causa anche la secrezione di serotonina da parte delle cellule EC. La secrezione di serotonina offre al colera quel meccanismo necessario per garantire che i recettori delle cellule della cripta siano attivi. Essa, rilasciata per via della tossina del colera dalle cellule EC, non agisce però direttamente sulle cellule della cripta. Non è necessario. La serotonina rilasciata innesta vie nervose che terminano nei nervi secretomotori. I nervi secretomotori spruzzano i loro neurotrasmettitori sui recettori delle cellule della cripta. Come evidenziato in precedenza, i neurotrasmettitori utilizzati dai nervi secretomotori sono sia l'acetilcolina, che stimola i recettori muscarinici sulle cellule della cripta, sia VIP, che possiede recettori propri. La somministrazione di farmaci che bloccano i recettori della serotonina, perciò, riduce la quantità di secrezione che consegue all'avvelenamento dell'intestino a causa della tossina del colera. L'eliminazione dell'azione della serotonina priva la tossina del suo backup nervoso. La tossina del colera deve corrompere il «secondo cervello» per non perdere parte del suo potere.

In un certo senso, la tossina del colera utilizza per i suoi nefasti scopi meccanismi che si sono evoluti nei secoli per la difesa del nostro organismo. La secrezione è un processo che in genere ha un valore protettivo. Il colon è un luogo sporco e pertanto ha bisogno di meccanismi di pulizia. La funzione principale del colon è quella di assorbire acqua, ma la secrezione di una piccola quantità di acqua al momento giusto è una cosa positiva. Ma la parola chiave in questo contesto è «piccola». Ovviamente, la secrezione provocata dal colera capovolge la funzione del colon. Il colera, per fortuna, è una malattia poco comune. Sfortunatamente anche la «normale» attivazione dei meccanismi di secrezione del colon a volte può essere devastante tanto quanto il colera. Quando il colon di turisti altrimenti sani, attraverso la secrezione, si auto-pulisce dalle tossine prodotte da organismi nuovi, sconosciuti, le persone cui appartiene questo tipo di colon sono momentaneamente indisposte, ma protette da problemi più seri e durevoli. La secrezione è benefica e in ultima analisi innocua. Quando il colon dei neonati attiva la secrezione, in circostanze simili, la secrezione è tutt'altro che innocua. Anche un grado modesto di stimolazione della secrezione, nel colon infantile, può sfociare in malattia che assomiglia al

colera molto di più del fastidio provato dai turisti.

Neonati, bambini piccoli e persone anziane hanno un volume di riserva molto esiguo. Non sono in grado di perdere grandi volumi di liquidi. Già una piccola quantità di liquidi persi può disidratarli, causando shock. La diarrea nei bambini rappresenta un problema molto più pericoloso che negli adulti. Se inoltre si instaura anche il vomito, il pericolo diventa molto grande. In una società evoluta, i bambini che soffrono di una grave perdita di fluidi a causa di diarrea e di vomito possono essere facilmente trattati mediante reidratazione orale o endovenosa con soluzioni appropriate. Tuttavia, in società meno evolute, quali io definisco quelle che non sono in grado di fornire cure adeguate ai bambini senza difese, la diarrea infantile con o senza vomito può facilmente essere causa di morte.

Le società meno evolute, purtroppo, abbondano sul nostro pianeta. In effetti sono talmente abbondanti che la semplice diarrea è la seconda causa di morte infantile nel mondo. Circa tre milioni di bambini vengono uccisi ogni anno dalla diarrea, solo la polmonite ne uccide di più. Le società nelle quali i bambini muoiono in questo modo per lo più si trovano nel terzo mondo, dove ignoranza e mancanza di risorse non consentono le cure necessarie. Ma si trovano anche in alcune zone rurali e nei bassifondi delle città degli Stati Uniti, dove un diverso tipo di ignoranza e la stessa mancanza di risorse priva i bambini delle cure necessarie. In entrambi i casi, terzo mondo o America emarginata, la morte inutile di bambini a causa di diarrea può essere prevenuta e la persistenza di queste morti può essere spiegata solo dalla meschinità di persone che hanno i mezzi per fermarle, ma che non li usano.

Il gioco finale

Tutte le cose positive arrivano alla fine. La stessa cosa si può dire in riferimento al transito del contenuto intestinale. Qualunque cosa di indigeribile e/o non assorbibile sia stato ingerito passa attraverso l'intestino e arriva al retto per essere espulso attraverso la defecazione. La maggior parte di questo materiale è composto dalla cellulosa delle cellule vegetali che mangiamo e che troviamo nella frutta, nei cereali e nella verdura. Questa viene chiamata fibra e spesso i nutrizionisti ne esaltano il valore. Diversamente da topi, ratti e mucche che hanno lo stomaco con compartimenti speciali in cui vivono i microrganismi che digeriscono la cellulosa, noi non disponiamo di nessun microrganismo che digerisca la cellulosa per noi. Pertanto, essa ci passa attraverso e quella che esce dallo sfintere è praticamente identica a quella che abbiamo ingerito, anche se è stata leggermente triturata dai denti e successivamente macerata. L'insalata, quando lascia il nostro organismo, può non avere lo stesso aspetto invitante di quando l'abbiamo ingerita, ma tutta la fibra che contiene viene conservata.

La fibra ci dà la sensazione di mangiare molto, ma non ci fornisce calorie. In una società come la nostra, in cui l'obesità è la malattia nutrizionale dominante, il cibo con poche calorie viene tenuto in grande considerazione. Inoltre, la fibra offre al colon qualcosa da spremere, cosa che contribuisce a mantenere attivo l'organo. Un colon sottoposto a scarso esercizio può diventare flaccido e debole. Dopo diversi anni di «buon vecchio cibo a base di carne e di patate» una dieta a basso contenuto di fibra può rendere il colon «flaccido» come l'essere umano che lo ospita. Un colon con le pareti deboli tende a sviluppare delle piccole sacche, chiamate *diverticoli*.

Essenzialmente, questi diverticoli rappresentano punti vulnerabili, dove, a causa dell'indebolimento, la parete del colon inizia a «cedere», come un copertone di gomma con pareti difettose. La malattia associata alla presenza di diverticoli è nota come *diverticolosi*. I diverticoli sono sacche cieche nelle quali il contenuto *intestinale* può ristagnare. L'interazione normale del sistema nervoso enterico e del sistema immunitario viene compromessa all'interno dei diverticoli, in quanto la capacità del colon di «lavarli» è limitata. La muscolatura del colon tende a dirigere il contenuto del lume verso lo sfintere ma non è in grado di svuotare il contenuto dalle sacche. Quando essa si contrae, può agire come valvola sull'imbocco dei diverticoli, mantenendo la sostanza all'interno di essi, anziché svuotarli.

Essendo così difficile pulire i diverticoli, essi frequentemente si infettano, causando dolore, febbre e ostruzione intestinale. Quando ciò avviene, il nome della malattia cambia da diverticolosi in *diverticolite*. Inoltre, frequentemente i diverticoli si perforano. Quando un diverticolo si perfora, il lume dell'intestino non è più completamente separato dalla cavità addominale. I diverticoli perforati creano un'apertura attraverso la quale una massa tossica di batteri colonizzatori può passare nella cavità addominale. Quando si è fortunati, si forma un ascesso nelle pareti, dove l'infezione rimane localizzata. In alternativa, i batteri che fuggono dal colon possono dare origine a infezioni di gravissima portata della cavità peritoneale e,

penetrando nel sangue, riuscire a infettare tutto l'organismo. Il trattamento di queste condizioni, conosciute rispettivamente come *peritonite* (infezione della cavità peritoneale) e *setticemia* (infezione del sangue) deve essere immediato e aggressivo. Gli antibiotici sono essenziali e devono essere scelti con grande cura per poter essere sicuri che mirino esattamente a colpire i batteri che causano il disturbo. Il tempo è essenziale. Di fronte a una peritonite, conseguente a un diverticolo perforato, un medico non ha molte possibilità di scegliere il farmaco giusto. La scelta di un antibiotico a cui gli organismi sono resistenti potrebbe condannare il paziente a morte prematura.

I diverticoli sono comuni nelle persone in età avanzata (e si presentano in circa metà della popolazione verso gli 80 anni), ma non sono benigni. I diverticoli devono essere considerati come una minaccia alla vita. La prevenzione, prima che i diverticoli si formino, è essenziale. Quindi includere le fibre come normale componente della dieta è un po' come fare jogging. Ciò che la corsa fa per il nostro corpo, le fibre fanno per il nostro colon.

Regolarità

Le fibre sono in grado di assorbire l'acqua e di espandersi in volume, aumentando quindi la pressione all'interno del lume intestinale. Dal momento che l'aumento di pressione all'interno del lume intestinale è lo stimolo che provoca il riflesso peristaltico, un colon pieno di fibre quasi sicuramente spingerà il proprio contenuto verso lo sfintere con velocità anomala. La capacità della cellulosa di stimolare la spinta nel colon è una proprietà che le persone hanno imparato a conoscere e di cui hanno fatto tesoro da secoli. Le prugne sono diventate addirittura una leggenda in questo senso e le fibre idrosolubili sono un best-seller negli USA. Se la regolarità viene vista come il nirvana – e il commercio redditizio di lassativi suggerisce che lo sia – allora le fibre sono un mezzo naturale per giungere alla «grazia».

Le fibre idrosolubili tengono in allenamento il colon. Il loro uso per mantenere la regolarità non ha pressoché controindicazioni, a parte per coloro che presentano diverticoli sottili come una cialda. Un colon pieno di fibre idrosolubili, che va a «tutto gas», spingendo una massa espansa, rappresenta un invito alla perforazione.

Altri prodotti utilizzati come lassativi possono rivelarsi meno sicuri delle fibre. L'olio minerale non è poi così male. Il principio dell'azione dell'olio minerale è quello di rivestire le feci con così tanta sostanza vischiosa che neppure il colon più pigro è in grado di trattenerla.

Se si riesce a trasformare le pallottoline fecali presenti in un intestino costipato nell'equivalente di «maiali unti», si osserverà che riusciranno a farsi strada verso la luce del giorno: non importa che il colon spinga o no.

Tuttavia gli oli minerali creano una certa intolleranza «sociale» a causa delle feci scivolose che passano attraverso lo sfintere senza controllo. L'olio minerale può anche sciogliere e trasportare via vitamine liposolubili come la vitamina K.

Le donne che assumono l'olio minerale per alleviare quel tipo di costipazione meccanica che si verifica durante la gravidanza corrono il rischio di mettere al mondo bambini affetti da una sindrome conosciuta come malattia emorragica del neonato. Questi bambini che difettano di vitamina K presentano emorragie perché non sono in grado di costituire una quantità sufficiente di proteine coagulanti. Negli ospedali statunitensi è prassi comune fare sia un'iniezione di vitamina K ai neonati sia la pacca sul sederino.

Un altro tipo di approccio è quello di fornire all'intestino una quantità di sale tale che sarà incapace di assorbirlo. I lassativi che funzionano in questo modo sono chiamati *catartici salini*. Il latte di magnesio (solfato di magnesio) è un esempio ampiamente conosciuto. Il sale che si trova nel lume intestinale attira l'acqua per osmosi. Il risultato è quello di aumentare la pressione all'interno del lume intestinale, stimolando il riflesso peristaltico, proprio come Bayliss e Starling fecero con l'intestino dei cani nel 1899. Il contenuto dell'intestino viene quindi guidato dal sistema nervoso enterico attivatosi per svuotarlo.

I catartici salini sono affidabili e non troppo stressanti, ma non possono essere utilizzati di continuo senza rischi. L'intestino sembra adattarsi ai lassativi, richiedendone quindi una

quantità sempre maggiore per poter portare a termine il suo compito. Chiunque abusi dei lassativi potrebbe diventarne dipendente e non riuscire più a far muovere il proprio intestino senza di essi. In casi estremi, l'intestino potrebbe manifestare tutti i sintomi di un'ostruzione anche quando il percorso attraverso il lume intestinale è perfettamente libero. Questo fenomeno si chiama *pseudo-ostruzione*, anche se non c'è nulla di «pseudo» nel dolore che provoca. Per trattare questo disturbo si può anche arrivare a ricorrere alla chirurgia e togliere il colon. Durante un'autopsia, il sistema nervoso enterico di chi abusa di lassativi potrebbe assomigliare ai campi di Agincourt dopo che Enrico V aveva finito di «trattare» le truppe francesi: zolle erbose cosparse dei resti in putrefazione dei soldati morti. I «soldati» presenti nell'intestino sarebbero naturalmente le cellule nervose enteriche cadute, sacrificate alla causa della «regolarità».

Non ci è dato sapere con esattezza perché le cellule nervose enteriche scompaiono nelle persone che fanno abuso di lassativi; sicuramente sono soggette a sovr eccitazione e muoiono a causa di questa. Il neurotrasmettitore glutammato è famoso per eccitare fino alla morte le cellule nervose del cervello. Quest'azione viene chiamata *eccitotossicità*. Annette Kirchgessner e io abbiamo recentemente scoperto che il glutammato è un neurotrasmettitore presente sia nel sistema nervoso enterico, sia nel cervello e nel midollo spinale. Inoltre, Annette ha dimostrato che il glutammato è in grado di causare la morte delle cellule nervose enteriche in seguito all'eccitotossicità. Se la morte dovuta a eccitotossicità è ciò che accade a un intestino sovrastimolato cronicamente dai lassativi, deve essere ancora dimostrato.

Qualunque sia la causa della morte delle cellule nervose associate ai lassativi, un catartico salino, come un buon vino di Borgogna, deve essere assunto con moderazione.

Alcune situazioni causano uno svuotamento dell'intestino maggiore rispetto all'assunzione di fibre, olio minerale o catartici salini. Per esempio, durante l'esame con le fibre ottiche del lume intestinale (*endoscopia*) non deve essere presente nulla che possa ostruire la vista. Il colon che deve essere sottoposto a una colonscopia deve essere vuoto. Un approccio per «preparare» l'intestino è quello di somministrare un farmaco che stimola direttamente quei circuiti del sistema nervoso enterico che provocano la spinta. L'olio di ricino è un esempio di «medicina» naturale di questo tipo e il bisacodile è uno di quei farmaci che agiscono in questo modo, ma è prodotto dall'uomo. La stimolazione dei circuiti propulsivi crea onde migratorie gigantesche dell'attività contrattile dell'intestino. Queste onde marciano inesorabilmente in avanti, portando con sé qualsiasi cosa sia presente nel lume intestinale. Le forti contrazioni dell'intestino indotte dal farmaco sono pericolose in presenza di diverticoli perché potrebbero causare la perforazione del colon. Anche in caso di assenza di diverticoli, le contrazioni esagerate e l'alta pressione che si crea nell'intestino sono molto dolorose. Il dolore è così intenso da aver spinto anche la Gestapo a somministrare l'olio di ricino come strumento di tortura. Farmaci di questo tipo non sono certo accettati favorevolmente dai pazienti.

Il metodo più moderno per «preparare» l'intestino è quello di far bere ai pazienti grandi quantità di liquido «scivoloso», non assorbibile. La massa di liquido ingerito stimola il riflesso peristaltico mentre agisce anche da lubrificante. Questa sostanza, lontana parente

dell'antigelo che si mette nei radiatori delle autovetture, si trova in una preparazione a base di macrogol, che ricorda ai medici che lo prescrivono le asprezze delle contrazioni intestinali prodotte dall'olio di ricino o dal bisacodile. Tutto ciò che un paziente deve fare è bere quasi un litro e mezzo di macrogol e tutto scorre via. La sfida più grande è quella di bere quel preparato. Una volta ingerito, la massa viene mossa senza dolore.

Alcuni dei farmaci utilizzati come lassativi e che funzionano «pizzicando» le cellule nervose enteriche sono riconosciuti come minaccia per il sistema enterico nervoso. Questi composti riportano alla mente l'eccitotossicità, anche se il meccanismo con il quale danneggiano l'intestino non è ancora noto. Uno di essi, la *fenolfaleina*, è stato recentemente ritirato dal commercio con l'approvazione del suo produttore. La senna, un prodotto naturale, viene pubblicizzata come un modo naturale per promuovere la regolarità. La senna stimola anche le cellule nervose enteriche. Ho già fatto notare che «naturale» non sempre è sinonimo di buono o di sicuro. Esistono piante in grado di creare una serie di sostanze perfettamente naturali che si rivelano tossiche per gli esseri umani e per gli animali. Queste tossine possono essere una forma di difesa che le piante hanno sviluppato per impedire di essere mangiate. Sono certo che le vittime dell'olio di ricino somministrato dalla Gestapo non hanno tratto alcun beneficio dal fatto che lo strumento con cui venivano torturati fosse naturale. La senna ha tuttavia un seguito e presenta un profilo medico relativamente basso. Non sono stati effettuati molti studi su di essa; in uno che ricordo bene, presentato durante un congresso di gastroenterologia in Inghilterra, venivano mostrate diapositive dopo diapositive cellule nervose enteriche contorte o morenti, prelevate durante biopsie dal colon di pazienti che avevano sviluppato pseudo-ostruzioni dopo aver assunto la senna. Sicuramente non esiste alcuna prova conclusiva che provi che la senna sia dannosa. E ancora, quando si parla di «regolarità», penso che un intestino pieno di verdure o, ancor peggio, di prugne, sia da raccomandare.

La conclusione

Durante il periodo in cui il contenuto dell'intestino si dirige verso il retto, il riassorbimento dell'acqua che si è verificato nel colon dovrebbe averlo lasciato in condizioni solide soddisfacenti. Oltre alle fibre e ad altre materie più esotiche che mangiamo ma che non possono essere assorbite, le feci contengono i batteri espulsi dal colon, il muco che l'intestino ha secreto e pigmenti di bile che danno alle feci il loro colore. In un individuo sano le feci dovrebbero contenere una quantità minima di grassi, non contenere sangue né uova di parassiti di qualsiasi tipo. La comparsa di uno di questi elementi è sicuramente un segno che è presente un disturbo da qualche parte dell'intestino. Un intestino in perfette condizioni digerisce praticamente quasi tutto il grasso ingerito, non sanguina e non contiene parassiti. Se il sistema nervoso enterico non ha funzionato in modo ottimale e la spinta nel colon è stata troppo lenta, il contenuto delle feci può diventare eccessivamente secco, assumendo la consistenza e la forma di quelle dei conigli. Comunque tutto questo è una condizione anomala e significa che un individuo è costipato. La costipazione quindi si verifica quando il sistema nervoso enterico non funziona correttamente, ma il malfunzionamento del sistema nervoso enterico non è necessariamente l'unica causa. La costipazione può essere anche la conseguenza di un input anomalo da parte del sistema nervoso centrale o di un'interazione anomala fra il sistema nervoso centrale e quello enterico. In ogni caso il materiale fecale che entra nel retto, normale o a forma di pallottolina, ha un peso considerevole.

Dopo che il cibo lascia la bocca e inizia la sua discesa verso l'intestino, ne perdiamo le tracce. In circostanze normali, la magia creata dal sistema nervoso enterico in coordinamento con le cellule nervose del cervello e del midollo spinale, è ben al di fuori della nostra conoscenza. Gli onofili gustano il vino, i carnivori le bistecche e i vegetariani le melanzane, ma solo con la parte iniziale del tubo digerente. Il cibo può lasciare un retrogusto che permane sulla lingua ma, di norma, non risale. Una risalita di ciò che è stato ingerito non è mai piacevole e non è mai una condizione normale. Il viaggio attraverso l'intestino normalmente è a senso unico ed è silenzioso. Tranne il caso in cui la pressione nell'intestino è anormalmente alta, quanto basta per divenire nociva e dolorosa, non c'è modo di sapere quello che accade nel nostro intestino. Il contenuto intestinale, comunque, riprende coscienza di sé, quando lascia l'intestino attraverso lo sfintere.

Quando le feci entrano nel retto, la percezione ritorna con un senso di urgenza. Quando il retto si riempie, si ha lo «stimolo a evacuare». Solitamente tale sensazione non è dolorosa, sebbene lo possa diventare, poiché aumenta come in un crescendo; tuttavia lo «stimolo a evacuare» non è una sensazione facile da ignorare. Quando percepita, tende a portare ad agire piuttosto prima che dopo. Un fattore che contribuisce all'urgenza è la curva che il retto fa in basso quando arriva verso lo sfintere. Anche la gravità collabora ai movimenti della muscolatura del retto per promuovere l'evacuazione della massa fecale.

Anche se contribuisce all'espulsione, la gravità non rappresenta però alcuna minaccia al

nostro benessere sociale. Il retto è sufficientemente dotato anatomicamente per riuscire a gestire il peso e la massa delle feci che contiene. È possibile mantenere le feci nel retto solo per un periodo limitato di tempo. Possiamo affermare che tale periodo serve solo per mantenere una maschera di civiltà. La parete del retto presenta tre pieghe disposte orizzontalmente così che il peso della massa fecale presente non deve essere sopportato unicamente dagli sfinteri che chiudono l'ano quando non è in fase di evacuazione. Gli sfinteri inoltre non si comportano come uno schiavo che si apre appena c'è lo «stimolo a evacuare». Trattengono le feci e si aprono solo quando è il momento giusto. Infatti, uno dei principi guida su cui si basa il funzionamento armonioso della nostra società è che lo sfintere anale di ogni individuo che non sia un neonato trattienga le feci fino al momento opportuno.

Per aiutare a garantire un buon controllo dello sfintere, l'evoluzione ci ha provvisti non di uno, bensì di due sfinteri anali. Il primo di essi, lo *sfintere anale interno*, è composto da muscolatura liscia ed è comandato solo dal sistema nervoso enterico e autonomo. Lo sfintere interno è quindi autopilotato e non è sotto alcun controllo della volontà. Porta a termine solo ciò che i nervi, tramite un riflesso, gli dicono di fare. Lo sfintere anale interno è quindi solo un ispessimento dello strato circolare della muscolatura liscia che si trova nella maggior parte dell'intestino.

A supporto dello sfintere interno, c'è lo *sfintere anale esterno* che è composto da muscolatura striata ed è sotto il controllo della nostra volontà. Per essere precisi, anche lo sfintere anale risponde ai riflessi, ma il nostro cervello impara a non tener conto dei riflessi e a controllarlo. Victor Marshall, il mio professore di urologia alla facoltà di Medicina, espresse in modo molto pittoresco l'ammirazione che i chirurghi hanno nei confronti dello sfintere anale quando disse: «Le poesie sono fatte da pazzi come me, ma solo Dio può creare uno sfintere.»

L'eleganza e la sofisticatezza del controllo che può essere esercitato sullo sfintere anale esterno trascende la credulità. Si è tentati di considerare lo sfintere come i cordoni di una borsa che possono essere allentati o stretti. Ma non esiste cordone che, una volta rilasciato, possa lasciar passare del gas sotto pressione, e riesca contemporaneamente a impedire la fuoriuscita di masse di liquidi e di solidi che tentano di farsi strada. Inoltre, questo strumento attendibile, eminentemente affidabile e fondamentalmente essenziale fallisce solo in caso di estrema costrizione. Un'infezione violenta del colon, a monte dello sfintere, può causare i movimenti propulsivi dell'intestino che possono prendere il comando della situazione. Il transito accelerato è un sottoprodotto dell'interazione difensiva del sistema nervoso enterico e delle cellule immunologicamente interessate dell'intestino. La secrezione indotta dai nervi produce il suo flusso di pulizia mentre i segnali chimici rilasciati dalle immunocellule irritano i nervi e aumentano la frequenza dei rush peristaltici. Il contenuto dell'intestino può trasformarsi in una forza irrefrenabile, proprio come il branco di tori che ogni anno corrono precipitosi per le strade di Pamplona. Si giunge però a un momento dove non c'è sfintere che riesca a tenere oltre.

La spinta eccessiva da parte del sistema nervoso enterico come conseguenza di infezione non è l'unica situazione che può portare a disturbi sfinterici. Un'altra situazione è un forte spavento.

Lo spavento può distrarre il cervello e interrompere la sua concentrazione sullo sfintere anale esterno. Le truppe di artiglieria che si avvicinano a trincee occupate conoscono bene questa situazione. Infatti, i soldati spesso si scambiano gli auguri sul campo di battaglia dicendo: «Tieni stretto lo sfintere!» L'indebolimento dello sfintere anale esterno in seguito a interventi chirurgici, incidenti, dilatazioni e contrazioni per gravidanze multiple e l'età avanzata può portare a fuoriuscite fecali. Il controllo «centralizzato» dello sfintere anale comporta la perdita del controllo sullo stesso quando si verificano danni degenerativi del cervello. Il morbo di Alzheimer e altre forme di demenza senile richiedono spesso l'uso di pannolini.

Alla nascita non sappiamo controllare i nostri sfinteri anali esterni. La gestione di questa muscolatura deve essere appresa ed è universalmente risaputo che l'esperienza si acquisisce lentamente. Di fatto, il riuscire a insegnare a un bambino il controllo sul proprio sfintere anale è uno dei compiti più delicati dei genitori. La defecazione è, prima di tutto, un riflesso. Il riflesso avviene senza apprendimento: è «incluso» nel sistema nervoso. Il riflesso della defecazione comporta inizialmente la spinta delle feci nel retto, un processo che interessa principalmente il sistema nervoso enterico e la muscolatura del colon. L'arrivo delle feci nel retto è rilevato da nervi sensitivi estrinseci che trasmettono l'informazione al midollo spinale sacrale (inferiore) dove viene coordinato il riflesso della defecazione.

In parte, il lato motorio del riflesso interessa i nervi sacrali parasimpatici che accelerano verso il basso la propulsione delle feci nel retto e rilassano (aprendolo quindi) lo sfintere anale interno. In parte, e in coordinazione con l'attività autonoma, il riflesso coinvolge l'azione dei nervi motori volontari che rilassano e aprono lo sfintere anale esterno. Nel contempo, i muscoli del pavimento pelvico si contraggono posizionando correttamente il retto per l'espulsione di ciò che contiene. Tutto questo *Sturm und Drang* avviene senza l'intervento del pensiero ed è gestito dal midollo spinale sacrale. Lo stimolo interno a spingere il contenuto dell'intestino verso il basso può essere aiutato dalle contrazioni dei muscoli addominali e del diaframma per aumentare la pressione all'interno dell'addome. Questa è un'attività familiare detta comunemente «sforzo defecatorio».

Il cervello ha il potere di inibire i riflessi sacrali parasimpatici. Quando un bambino impara a utilizzare le fibre discendenti che il cervello invia al midollo spinale, impara a controllare la defecazione o, nel caso della vescica, la minzione. In assenza di tale inibizione da parte dei centri cerebrali superiori, il retto e la vescica sono totalmente soggetti al midollo spinale e agiscono seguendo i riflessi. La presenza di feci nel retto genera un riflesso e avviene la defecazione. Accade l'inevitabile e i pannolini si sporcano. Prima che il cervello riesca a esercitare un controllo anche sul midollo spinale sacrale, le vie nervose che scendono dal cervello al midollo spinale devono maturare. Le vie nervose discendenti del midollo spinale inferiore non maturano fino al secondo anno di età, quando una guaina adiposa (mielina) le avvolgerà. Finché ciò non accade, la conduzione del segnale nervoso dal cervello al midollo spinale è inadeguata per addestrare al corretto uso del vasino. Il bambino educato prima di un anno, ha in realtà educato i suoi genitori.

Sono loro che hanno imparato la frequenza di emissione delle feci dal retto del bambino e riescono così ad anticiparne i riflessi defecatori. Un adulto esperto riesce a mettere il bambino sul vasino nel momento giusto del giorno, ma è lui, e non il bambino, a dimostrare il buon risultato dell'«addestramento al vasino».

Negli adulti che soffrono, per qualsivoglia motivo, di una lesione al midollo spinale, l'influsso discendente che il cervello esercita sulla defecazione e sulla minzione viene perso. Si ricrea la situazione dell'infante e i riflessi spinali predominano. Si rende quindi necessario l'utilizzo di pannolini (o altri sistemi equiparabili). In questi pazienti il centro del midollo spinale, che normalmente esegue i comandi dal cervello, ora opera in collaborazione con il colon. Il colon rileva la presenza di feci e trasmette questa informazione al midollo spinale sacrale, che quindi attiva il riflesso defecatorio, in modo indipendente dalla volontà del paziente. Di contro, se sussiste una lesione al midollo spinale o ai nervi che collegano il midollo spinale all'intestino e ai muscoli del perineo, il riflesso della defecazione viene perso completamente. In assenza di tale riflesso, la funzione di espulsione delle feci è lasciata completamente al sistema nervoso enterico. Quando si verifica ciò, le feci fluiscono costantemente passando da un ano flaccido che non è più controllato dallo sfintere anale esterno paralizzato oppure si formano i *fecalomi*. I fecalomi sono masse conglomerate di feci secche bloccate nel retto e/o nel canale anale. Essi agiscono come un tappo, trattenendo il contenuto intestinale a monte. Un fecaloma ristagnante può essere talmente solido e bloccato in loco da non poter essere evacuato solo grazie alla forza generata dalla muscolatura intestinale, senza nessun altro aiuto. La pressione esercitata sull'intestino da un fecaloma rigido può arrivare a livelli tali da provocare dolori lancinanti che persistono fino alla rimozione meccanica delle feci da parte di una seconda persona.

Non mi dimenticherò mai di un paziente che vidi nell'estate del 1957 mentre lavoravo come inserviente in ospedale prima di frequentare la facoltà di Medicina. Il paziente era affetto da morbo di Parkinson da molti anni ed era totalmente inabile. Non esisteva ancora il miracoloso L-dopa (Levodopa), il farmaco che ha ridato la capacità motoria a molte vittime del morbo di Parkinson. In quel periodo venivano somministrate terapie che erano però inefficaci. Inoltre, le cellule cerebrali del paziente erano in uno stato degenerativo molto avanzato e gliene erano rimaste poche sane. Era rigido come un'asse e affetto da grave demenza. Non lasciava mai il letto e riusciva a muoversi pochissimo. Mi faceva capire il bisogno di svuotargli l'intestino intensificando i suoi lamenti. Svuotargli l'intestino significava indossare un guanto di gomma, lubrificare un dito e rimuovere manualmente le feci indurite. Nei giorni «buoni», dopo la rimozione delle feci indurite, un flusso di materiale fecale riempiva la padella.

Guardandomi indietro, dopo aver imparato di più sul morbo di Parkinson, ero sconcertato dal costante ristagno fecale del Sig. X. Il morbo di Parkinson colpisce le cellule nervose del cervello che partecipano alla coordinazione dei movimenti dei muscoli scheletrici. La perdita di queste cellule cerebrali porta alle manifestazioni e ai sintomi del morbo di Parkinson: tremori (movimenti involontari), un'andatura strascicata, espressione facciale rigida e rigidità generale.

Dopo diverso tempo, la continua degenerazione delle cellule cerebrali porta alla demenza. Potevo capire le interferenze della malattia con le vie nervose che scendono dal cervello e che controllano i riflessi spinali, ma non riuscivo a capire perché fossero compromessi gli stessi riflessi spinali del paziente. Il morbo di Parkinson non interessa il midollo spinale o i nervi periferici. Pensavo che poteva essersi verificato un irrigidimento dello sfintere anale esterno simile a quello degli arti, ma sembrava che il Sig. X avesse perso anche i riflessi spinali che regolano la defecazione.

Recentemente è stato scoperto che in alcuni pazienti affetti da morbo di Parkinson è compromesso anche il sistema nervoso enterico. Lo stesso tipo di *lesione* (danno tissutale) che si rileva nel cervello degli ammalati di morbo di Parkinson si ritrova nel loro sistema nervoso enterico. Quindi la degenerazione indotta dal morbo di Parkinson nelle cellule nervose dell'intestino influisce sulla propulsione del contenuto fecale proprio come compromette le più alte funzioni integrative del cervello. Il morbo di Parkinson può così alla fine causare una demenza enterica oltre che cerebrale.

Non avrei dovuto essere sorpreso di apprendere che il morbo di Parkinson è una malattia del sistema nervoso enterico come del cervello. Come molti fatti che sembravano «sorprendenti» in passato e che in retrospettiva, se non proprio per il fatto che sono passati, non lo sono più, anche questo, ripensandoci, avrebbe potuto essere previsto. Il sistema nervoso enterico è, prima di tutto, un parente stretto del cervello. Come ho spiegato alla Society for Neuroscience al congresso di Cincinnati, il sistema nervoso enterico ha più elementi in comune col cervello, dal punto di vista sia chimico sia strutturale, di tutto il resto del sistema nervoso periferico. Il sistema nervoso enterico appare come un secondo cervello spostato a sud. Ne consegue che si può anticipare che diversi tipi di malattie che colpiscono il cervello coinvolgeranno anche il sistema nervoso enterico.

Il morbo di Alzheimer, ancora più di quello di Parkinson, dimostra la validità di questa tesi. L'Alzheimer colpisce il sistema nervoso enterico allo stesso modo in cui colpisce il cervello. Inoltre, proprio come avviene nel morbo di Parkinson, le caratteristiche lesioni che i neuropatologi utilizzano per diagnosticare il morbo di Alzheimer sono riscontrabili sia nel sistema nervoso enterico sia nel cervello. Poiché queste lesioni colpiscono l'intestino, è plausibile che venga compromessa anche la funzionalità del sistema nervoso enterico in alcuni pazienti affetti da morbo di Alzheimer; tuttavia non sono a conoscenza di studi sistematici sui problemi intestinali degli ammalati di Alzheimer. Suppongo che rispetto alla gravità della demenza, la costipazione e anche i fecalomi vengano considerati problemi medici molto meno seri. Quando la mente di un paziente sta degenerando, sembra perverso focalizzarsi sul suo intestino. Tuttavia, un giorno o l'altro, continuo a ripetermi, io intendo proprio fare ciò. Delle tracce per conoscere il morbo di Alzheimer, mezzi per ottenere una diagnosi definitiva e il monitoraggio dell'efficacia di una terapia, potrebbero avere giovamento dalle ricerche sul sistema nervoso enterico. Le biopsie sul sistema nervoso enterico, per esempio, sono molto più semplici da eseguire rispetto a quelle sul cervello. Chi sa? Forse un giorno la facilità di fare

biopsie rettali potrà far definire il retto come la «finestra sul cervello».

8. Un cattivo intestino

Le parti terminali (alta e bassa) del sistema digestivo sono le regioni in cui il cervello sito nella testa svolge un ruolo fondamentale nel determinare l'attività dell'intestino. Gli input e gli output sono fenomeni determinati a livello centrale. Queste sono anche le attività che catalizzano l'attenzione e che, di conseguenza, dominano una buona parte della vita di una persona normale. Vi sono persone che vivono per mangiare mentre altre che, sebbene lo ammettano raramente, traggono interesse dalla defecazione. Tra l'ingestione e l'egestione, tuttavia, nell'intestino avvengono molti processi importanti ignorati dal cervello e gestiti dal sistema nervoso enterico. Poiché il secondo cervello lavora in modo inconscio spesso non viene considerato fonte di disturbo.

L'intestino non è immune dai disturbi mentali

I comportamenti che l'evoluzione ha imputato al cervello possono ovviamente essere influenzati dalle patologie psichiche. Diventa quindi logico concludere che le funzioni enteriche maggiormente influenzate dal sistema nervoso centrale sono anche quelle che vengono forzate dal cervello a partecipare a forme particolari di malattia mentale. Il fatto che vi siano sintomi enterici indicatori di malattia mentale non dovrebbe più sorprendere nessuno. I disordini alimentari quali l'*anoressia nervosa* e la *bulimia* sono esempi di condizioni riconosciutamente di origine neurotica o psicotica. In modo simile, alcuni disturbi della personalità sono stati per molti anni associati allo sforzo di dover imparare a sottomettere lo sfintere anale a un controllo socialmente accettabile. La personalità ritentivo-anale o ossessiva è passata, ormai da diversi anni, dai testi medici alla letteratura popolare e all'uso comune. Le persone si sono abituate al concetto che i pensieri, consci o meno, possano influenzare i comportamenti che essi associano all'intestino. Il concetto che i pensieri possano alterare ciò che succede nell'intestino porta direttamente al concetto che i pensieri neurotici o psicotici del cervello possano promuovere la distruzione enterica. Il disturbo psicosomatico dell'intestino è quindi un'idea che non ha mai faticato a farsi accettare.

L'esperienza personale è un altro elemento che ha rafforzato l'idea che il sistema nervoso centrale possa essere l'origine di un cattivo funzionamento intestinale.

I crampi addominali e la diarrea, per esempio, accompagnano spesso situazioni di ansietà. Molte persone sono così attente ai rumori del proprio intestino che se questi non si verificassero, non saprebbero neanche di essere in uno stato di ansia. Le conseguenze enteriche di forti emozioni non sono comunque concetti esoterici o teorici, ma problemi reali della vita di tutti i giorni. Il cervello appare così un ovvio perpetratore del disagio intestinale. L'origine psicosomatica della malattia enterica è, come usava dire uno dei miei primi insegnanti di matematica dopo aver riempito la lavagna di misteriose equazioni, «intuitivamente ovvia anche all'osservatore più distratto». Sfortunatamente, l'essere intuitivamente ovvio non significa necessariamente essere giusto. Quando i comportamenti dell'intestino dovuti principalmente al controllo enterico vengono disturbati, non significa assolutamente che l'ordine dato dal sistema nervoso enterico sia errato *perché è stato il cervello a condizionarlo*. Poiché il cervello della testa influenza il secondo cervello, è concepibile che una mente disturbata possa trasmettere i propri problemi al sistema nervoso enterico, disturbando anche le funzioni di competenza del secondo cervello. Tuttavia, non esiste nulla che possa impedire al sistema nervoso enterico in sé di dare origine a disturbi enterici, indipendentemente da qualsiasi «ordine» che il secondo cervello riceva dal primo. La teoria che il cervello debba essere responsabile di praticamente tutti i disturbi dell'intestino che non riescono a essere spiegati con lesioni anatomiche dello stesso, ha sempre avuto molto seguito. La possibilità alternativa che un'anomalia del sistema nervoso dell'intestino in sé possa essere la causa di disturbi intestinali, fino a poco tempo fa non è mai stata presa in seria considerazione. La riluttanza della comunità medica ad accettare che il

sistema nervoso enterico stesso sia la causa di un disturbo intestinale, è in parte dovuta al fatto che il sistema nervoso enterico svolge la sua attività come un'eminenza grigia. Un sistema nervoso enterico che funziona correttamente non raggiunge mai la soglia della percezione. Fino a quando svolge correttamente le proprie funzioni, la vita scorre liscia; tutto va bene e noi non sappiamo, né ci preoccupiamo del perché. Molti medici hanno considerato non ragionevole ritenere responsabile dei disturbi enterici che non riescono a diagnosticare il sistema nervoso enterico, «invisibile e occulto», anche se la sua posizione, rispetto alle difficoltà intestinali, lo farebbe pensare. Contrariamente al sistema nervoso enterico, il cervello è tutto fuorché occulto. Può non essere ubicato accanto al punto in cui si verificano i disordini enterici, ma è un'eminenza, non un'eminenza grigia. Ne consegue che a molti il cervello, piuttosto che il sistema nervoso enterico, è parso essere il colpevole più logico dei disturbi intestinali che non hanno una spiegazione logica evidente. Mentre i popoli primitivi utilizzano una vasta gamma di divinità per spiegare l'inspiegabile, i popoli moderni utilizzano la malattia psichica. E in ultima analisi, si appellano alla psiconevrosi.

Poiché le ipotesi che considerano l'origine psicosomatica delle malattie sono difficili da provare, è facile attribuire funzioni enteriche non sane a processi mentali inconsci. La rabbia repressa, per esempio, è spesso considerata una delle cause di cattivo funzionamento dell'intestino. Secondo questa teoria, i sentimenti negativi o i pensieri consci che non possono essere espressi vengono interiorizzati e si esprimono nella distruzione enterica. I medici stanno iniziando solo adesso, con riluttanza, a considerare seriamente la possibilità che al cervello negli anni, siano state attribuite molte più colpe di quelle che si sia realmente meritato. Quando un'attività che il cervello ha delegato al sistema nervoso enterico non viene espletata correttamente, la colpa potrebbe essere a carico del sistema nervoso enterico e non del cervello.

Il dolore e/o il fastidio che un paziente afferma provenire dall'addome può corrispondere a un dolore o fastidio reale provocato da anomalie fisiche o chimiche presenti nell'intestino del paziente. Questo è un concetto che a me non sembra assolutamente rivoluzionario ma ho scoperto che per altri è rivoluzionario. Recentemente, discutevo sul secondo cervello con un medico che ho incontrato in vacanza. Si trattava di uno specialista canadese in malattie infettive che mi stava spiegando perché avesse deciso di non diventare gastroenterologo. Mentre frequentava un corso di gastroenterologia alla facoltà di medicina, era stato chiamato a visitare diversi pazienti che soffrivano di disturbi funzionali dell'intestino. Mi ha raccontato che ha «odiato» questi pazienti per la loro fissazione sul proprio intestino. Qualunque piccolo dolore all'intestino, mi ha raccontato il medico, era esagerato a dismisura da queste persone ammalate di vittimismo cronico. La gastroenterologia, postulò, è un settore che senza dubbio attrae la maggior parte delle persone psiconevrotiche. Quando gli ho chiesto come facesse a sapere che il dolore riportato dai suoi pazienti fosse «esagerato», non è riuscito a rispondermi. Sul suo volto è apparsa un'espressione stupita. Ritenere, in assenza di prove del contrario, che il dolore di un paziente è inferiore a quello riportato e quindi, di origine psicogena, è sia ingiustificato sia sterile.

Quando si occupano di organi come il cuore, i medici credono ai pazienti che riferiscono il loro dolore. Non capisco perché l'intestino debba essere considerato diversamente. Se una lesione dell'intestino è ovvia, i medici assumono un atteggiamento comprensivo, concedono al paziente il diritto di denunciare un dolore e cercano di alleviare il problema. Se non viene rilevata nessuna lesione, il dolore enterico tende a essere sminuito e si dà la colpa a processi mentali neurotici. Molti medici non conoscono ancora la lezione che Ippocrate scrisse sull'epilessia nel suo libro *La malattia sacra*. Ippocrate non aveva idea del perché i pazienti epilettici avessero degli attacchi, ma ciò non gli sembrava rilevante. La causa, ne era certo, sarebbe sicuramente stata scoperta. In quel periodo si era soliti attribuire la malattia a cause soprannaturali. Proprio come per i dolori intestinali. Il fatto che i medici non sappiano sempre ciò che accade non è un motivo per sminuire la gravità del fatto o per attribuire il dolore a ciò che attualmente sostituisce le cause soprannaturali, vale a dire la psiconevrosi. È abbastanza probabile che il sistema nervoso enterico non funzioni sempre alla perfezione. Non lo fa nessun sistema del corpo umano. Esercitando la professione di medico ho presto imparato che le parti del corpo, dato che esistono, sono soggette ad ammalarsi. In alcune persone, in qualche momento, in determinate circostanze l'apparato non funzionerà correttamente.

Quando il sistema nervoso enterico non agisce su un tratto dell'intestino, sia per motivi congeniti sia in seguito a malattia, la funzione intestinale si arresta. La motilità viene compromessa in modo critico. La regola per il funzionamento dell'intestino è: assenza di nervi, nessun transito. Un tratto intestinale che perde i gangli del sistema nervoso enterico si trasforma in una barriera. L'assenza di gangli blocca la propulsione del contenuto intestinale tanto quanto un laccio legato attorno all'intestino. Quando i gangli mancano per cause congenite o per morte dei neuroni enterici non vi è dubbio che sia presente una lesione al sistema nervoso enterico. Non è certo necessaria la sapienza di Salomone per fare una diagnosi: sopravvengono invece difficoltà diagnostiche quando l'intestino non funziona correttamente in presenza di gangli enterici, muscoli e mucose apparentemente normali. Chiaramente, quando si verifica questa situazione, l'eminenza grigia non sta agendo o, se agisce, è stata danneggiata o ha perso il controllo sui propri sottoposti, muscoli e ghiandole

Disturbi funzionali dell'intestino

Circa il 20% della popolazione americana è parzialmente indisposta, o almeno disturbata, da una condizione nota come patologia funzionale dell'intestino. È un problema medico disturbante e intrattabile che i medici non riescono a definire chiaramente e quindi non curato. La varianti più comuni di questa condizione sono *dispepsia non ulcerosa* e, soprattutto, *sindrome da intestino irritabile*, a volte definita con le sue iniziali, IBS, o con il suo nome popolare, *colon irritabile* (o *spastico*).

La maggior parte dei primi studi condotti sull'IBS ha evidenziato che si tratta di un disturbo che colpisce prevalentemente il ceto medio bianco. Questi risultati potrebbero tuttavia essere falsati dal fatto che i soggetti dei primi studi sulla prevalenza di IBS non fossero stati scelti a caso tra l'intera popolazione ma principalmente tra individui bianchi del ceto medio che sembravano essere le persone che richiedevano maggiori cure per questo disturbo. Studi più recenti su ispanoamericani e afroamericani, nonché su popolazioni del Giappone e della Cina, evidenziano un'incidenza di circa il 20%, molto simile a quella trovata nel ceto medio bianco americano. La prevalenza di IBS sembra essere indipendente dalla razza mentre vi sono prove che possa essere influenzata da condizioni socioeconomiche, dalla classe sociale e dal sesso. Una clinica iraniana che cura nomadi e operai ha rilevato che la prevalenza di IBS in queste persone (3,5%) è molto inferiore a quella riportata nelle persone appartenenti al ceto medio. Nelle società occidentali, le donne sono più inclini a soffrire di IBS rispetto agli uomini, con un rapporto di 2:1. È interessante il fatto che questo rapporto risulta inverso in India, dove gli uomini si recano più spesso dal medico e quindi riportano in misura maggiore di soffrire di IBS. L'incidenza di IBS diminuisce con l'età e, secondo uno studio condotto nella contea di Omstead, Minnesota, la prevalenza del disturbo nelle persone che superano il sessantesimo anno d'età era dimezzata rispetto alle persone dai trenta ai sessant'anni. Una prima diagnosi di IBS è molto rara nelle persone che hanno superato i 60 anni. Ciò non significa che non vi siano persone anziane che soffrono di IBS ma queste hanno iniziato a soffrire del disturbo in età giovane e lo portano avanti negli anni fino alla terza età.

Stranamente, solo circa il 10% delle persone che soffre di IBS si reca dal medico per essere curato. Il resto soffre in silenzio, spesso perché prova un senso di imbarazzo a parlare del proprio disturbo o perché non si fida dei medici. Altri soffrono da talmente tanto tempo di questo disturbo che non pensano che si possa vivere senza di esso o che esistono persone che non ne soffrono. Anche se il 90% dei pazienti che soffre di IBS non ne parla al proprio medico, l'IBS è la causa di tre milioni e mezzo di visite al medico ogni anno negli USA. Questo numero lo classifica tra i primi sette disturbi diagnosticati e come la diagnosi più comune emessa da gastroenterologi. Di fatto, l'IBS colpisce circa il 25% dei pazienti che si reca dal gastroenterologo. Se si stima un costo medio di circa 100 USD per visita moltiplicato per il numero di visite ogni anno, si arriva a circa 350 milioni di dollari. Questo importo è riferito solo alla prima visita. Il costo sociale della malattia funzionale dell'intestino è molto più

elevato. Innanzi tutto, i 350 milioni di dollari si riferiscono solo a visite per IBS e non per altri disturbi intestinali funzionali. Secondo, poiché non vi sono test diagnostici che specificano l'IBS o altri disturbi funzionali dell'intestino, è necessario escludere le altre condizioni prima di arrivare a una diagnosi di IBS. Altre condizioni, spesso pericolose per la vita, presentano sintomi in comune con l'IBS. Ciò significa che è necessario condurre molti costosi esami di laboratorio. Terzo, una volta diagnosticato, un caso di IBS abbastanza grave da essere riportato al medico deve essere curato e, poiché le terapie hanno un'efficacia solo marginale e non risolutiva, la terapia continuerà per molti anni. A questi punti occorre aggiungere che i pazienti che soffrono di IBS si assentano dal lavoro più frequentemente degli altri, offrendo lo spunto per applicare a tale malattia la frase detta da Everett McKinley Dirksen a proposito del budget federale: «Un milione di dollari di qua, un milione di là, e diventano soldi veri».

La definizione data da Winston Churchill dell'Unione Sovietica nel 1939 si adatta perfettamente a quella attribuibile alle alterazioni funzionali dell'intestino: un indovinello racchiuso in un mistero che fa parte di un enigma. Gli strati di enigma medico che avvolgono questa condizione sono talmente spessi che è necessario organizzare conferenze internazionali che stabiliscano i criteri che la possano definire. Questi criteri vengono nominati sia con il nome del ricercatore che li ha proposti sia con il nome della conferenza in cui sono stati definiti. Attualmente si utilizzano i «criteri di Manning» e i «criteri di Roma». Appena i vari criteri vengono pubblicati, sono subito esaminati dagli «esperti» del campo e sono loro, anziché la malattia, a diventare oggetto di ricerche e controversie. Ciò che ben evidenzia la mancanza di chiarezza nella definizione è il fatto che anche oggi, mentre vengono scritte queste parole, nessuno sa esattamente cosa sia la malattia funzionale dell'intestino. Di fatto, non è ancora stato determinato se l'alterazione funzionale dell'intestino corrisponda a una malattia o a diverse malattie.

L'alterazione funzionale dell'intestino viene diagnosticata in presenza di un gruppo di sintomi che sono a volte contraddittori e non si presentano sempre contemporaneamente. Poiché, come ho affermato prima, i sintomi dell'alterazione funzionale dell'intestino sono uguali a quelli che accompagnano altre condizioni, si rende necessario escludere queste ultime per poterlo diagnosticare. Queste altre condizioni includono il carcinoma del colon, la malattia di Crohn, la colite ulcerativa (le ultime due condizioni possono essere classificate come malattie infiammatorie dell'intestino, o IBD, in contrapposizione all'IBS), l'intolleranza al lattosio, la diverticolite e una vasta gamma di parassitosi intestinali. I criteri definiti da Adrian Manning per la diagnosi della malattia funzionale dell'intestino riguardano le feci, che si presentano con scariche più frequenti e sciolte all'inizio degli episodi di dolore addominale, comportano diminuzione del dolore dopo la defecazione, un senso di evacuazione rettale incompleta, presenza di muco nelle feci e una sensazione di gonfiore addominale. I criteri di Roma hanno preso in considerazione la questione della presenza costante del dolore addominale e dell'alterazione del ritmo intestinale come sempre presenti, nonché la presenza degli altri sintomi citati nei criteri di Manning per almeno il 25% del tempo.

I medici che esercitano praticamente e che incontrano quindi persone in carne e ossa anziché rappresentazioni teoriche, visitano molti pazienti che non presentano i sintomi descritti nei criteri di Roma ma che non si può non considerare affetti da malattia funzionale dell'intestino. Per esempio, i pazienti che soffrono di diarrea cronica non dolorosa senza una causa identificabile non presentano i sintomi descritti nei criteri di Roma ma devono essere considerati affetti da malattia funzionale dell'intestino. Attendiamo che Roma II definisca ulteriormente i criteri diagnostici pubblicati in seguito a Roma I.

Anche se regna ancora molta confusione sulle definizioni, i criteri sono comunque valutabili. La loro validità facilita i test multicentrici sull'efficacia di nuovi farmaci nonché la comunicazione tra ricercatori. Qualunque sarà alla fine la definizione di disturbo funzionale dell'intestino, questa sarà meglio conosciuta, se tutti parlano lo stesso linguaggio.

Una delle difficoltà maggiori che ha ostacolato una ricerca efficace sulla causa o sulle cause dell'insieme dei sintomi che si presentano nell'alterazione funzionale dell'intestino è l'inadeguatezza delle tecniche comunemente usate per esaminare il sistema nervoso enterico dell'uomo. Le malattie vengono considerate come vere entità distinte quando i sintomi sono comparati con riscontri anatomici, e, più recentemente, chimici, derivanti dall'esame dei tessuti malati. L'idea è quella di identificare la lesione che dà origine a un determinato gruppo di deficit funzionali e di conseguenza a un complesso sintomatico. I patologi si occupano di questo tipo di ricerche su un essere vivente, i neuropatologi si concentrano invece sul sistema nervoso. I neuropatologi sono molto competenti quando lavorano con il cervello, il midollo spinale o gli usuali nervi periferici. La maggior parte di essi, tuttavia, non ha idea di come esaminare il sistema nervoso enterico. L'esame macroscopico dell'intestino non rileva niente: per questo, per rilevare eventuali difetti, è necessario esaminare il sistema nervoso enterico al microscopio. L'esame microscopico, come accennato prima, necessita del sezionamento dei tessuti in fette molto sottili e della colorazione delle sezioni per aumentare il contrasto. Il difetto essenziale nella ricerca sull'intestino da parte dei neuropatologi è che questi generalmente sezionano l'intestino con una tecnica che evidenzia in modo minimo la struttura del sistema nervoso enterico e usano coloranti che non forniscono informazioni sulla forma o l'identità delle cellule nervose enteriche. In breve, i grandi passi che sono stati fatti nella comprensione della composizione del sistema nervoso enterico da parte degli scienziati delle materie di base devono ora produrre un impatto sulla ricerca neuropatologia dell'intestino.

Un lato ancora più negativo è che anche se i patologi lavorano con cognizione di causa, solo raramente riescono a prelevare il tessuto che serve per la ricerca sul sistema nervoso enterico nelle alterazioni funzionali dell'intestino. I pazienti sono riluttanti a separarsi da campioni del loro sistema nervoso enterico. Anche se è vero che è molto facile sottoporre a biopsia la mucosa dell'intestino mediante una cannula di fibre ottiche illuminata, le biopsie della mucosa non includono l'intero spessore della parete intestinale. Una biopsia sufficientemente profonda da includere i gangli del plesso mienterico rischia di perforare l'intestino. A volte, è possibile effettuare biopsie rettali per vedere se sono presenti gangli mienterici oppure per determinare loro

anomalie, tuttavia la giustificazione per prelevare questo tessuto deve essere molto forte. L'alterazione funzionale dell'intestino non è una motivazione sufficiente.

I disturbi funzionali dell'intestino causano affezioni e molti disturbi, ma non sono quasi mai mortali. Le autopsie sui pazienti che decedono per gli spasmi dovuti alle alterazioni funzionali dell'intestino sono rarissimi. Attualmente un paziente che ha sofferto di questo disturbo decede per altre cause, per esempio l'intestino di tale persona può essere vecchio e stravolto in seguito a una vasta gamma di disturbi non collegati. Quindi, per buoni motivi, l'ipotesi che il sistema nervoso enterico presenti imperfezioni nelle persone che soffrono di disturbo funzionale dell'intestino non è mai stata testata adeguatamente da ricerche mirate a scoprire eventuali e correlate imperfezioni delle cellule nervose enteriche.

Alcuni anni fa, Michael Schuffler, un giovane neuropatologo dell'Università di Washington a Seattle, ha riconosciuto l'inadeguatezza del livello di conoscenza attuale della neuropatologia enterica e si è impegnato per fare qualcosa in tal senso. Mentre la maggior parte dei patologi ha seguito una procedura convenzionale tagliando sezioni perpendicolari alla lunghezza dell'intestino (sezioni trasversali), Schuffler ha cercato di fare sezioni a livello del piano dove è situato il plesso mienterico o di sezionare l'intestino strato per strato per esaminare nel loro insieme i gangli siti nei sottilissimi strati sovrapposti di tessuto. Infatti il problema con le sezioni trasversali dell'intestino è che queste non rivelano il comportamento dei gangli enterici, una fittissima e intricata rete di fibre e cellule nervose poste tra i suoi strati muscolari. Le sezioni trasversali tagliano le maglie della rete, quindi in ciascuna sezione sono presenti solo poche cellule nervose e fibre. Le cellule nervose, inoltre, appaiono solo di profilo. Le sezioni trasversali quindi non contengono cellule nervose intere e non rivelano quasi niente della loro reale forma. Immaginate una rete da pesca aperta sulla spiaggia e un bimbo che la tagliuzzo con un pezzo di vetro appuntito. Se il bambino taglia la rete esercitando una pressione verticale sul vetro fino ad arrivare alla sabbia sottostante, eseguirà una sezione trasversale. Se il bambino scruta attraverso il vetro la superficie tagliata della rete, tutto ciò che potrà vedere è una serie di punti nelle posizioni in cui il pezzo di vetro ha tagliato i filamenti della rete. L'immagine che ne risulta non fornirà al bambino l'idea di come appariva realmente la rete o l'idea di come i filamenti erano uniti nei punti in cui si intrecciavano. Il problema della rete e del pezzo di vetro è analogo alle difficoltà cui devono far fronte i neuropatologi che tentano di esaminare i plessi enterici in sezioni trasversali. Questo compito è praticamente impossibile. L'approccio di Schuffler ha quindi evitato le limitazioni inerenti a ciò che gli altri facevano.

Oltre a preparare l'intestino in modo differente a come faceva la maggior parte degli altri colleghi, Schuffler ha colorato i tessuti non solo con gli usuali coloranti che aggiungono contrasto alle strutture viste attraverso il microscopio ma con soluzioni che depositavano argento metallico sui costituenti delle cellule nervose. La colorazione argentea, come è stata usata da Schuffler, è un metodo antico, di poco raffinato rispetto ai primi anni del XX secolo, quando è stato utilizzato dal grande neuroanatomista Ramón y Cajal per stabilire che il sistema nervoso è composto da cellule nervose separate e distinte e non, come affermato dalla dottrina di

Camillo Golgi, da un reticolo di cellule in continuità l'una con l'altra. Ora sappiamo che la colorazione argentea fa depositare l'argento metallico sullo scheletro filamentoso delle cellule nervose. La resistenza di questo scheletro deriva dalle fibre note come *neurofilamenti*, che formano un insieme interno di cavi che supportano le cellule. Mediante la colorazione argentea dello scheletro neurofilamentoso delle cellule nervose è possibile visualizzare la forma delle cellule nervose enteriche e seguire i loro processi per lunghe distanze attraverso il dedalo del plesso mienterico.

Con un approccio che, per il sistema nervoso in genere, appariva primitivo ma che per il sistema nervoso enterico era rivoluzionario, Schuffler iniziava a portare un po' d'ordine nel caos delle malattie nervose enteriche. Sfortunatamente, riuscì solo a iniziare questa ricerca. Non è mai riuscito a completarla o a portare la classificazione delle malattie delle cellule nervose enteriche a un punto tale per cui altri potessero facilmente ripetere i suoi risultati. I fondi stanziati per la ricerca di Schuffler si esaurirono e la conseguente carenza di denaro provocò l'interruzione della ricerca. Non è totalmente chiaro il perché di questo taglio a Schuffler, ma sembra che il motivo sia stato lo scarso supporto ricevuto da una comunità scientifica ostile. Molti scienziati, a quell'epoca, guardavano con disprezzo a ciò che Schuffler stava facendo, perché ritenevano che i suoi metodi fossero troppo poco «molecolari». Molti biologi hanno la tendenza a valutare il valore delle scoperte scientifiche in modo direttamente proporzionale all'attinenza delle stesse con i geni. Queste persone considerano quindi più valido il lavoro che identifica i geni responsabili di una determinata malattia rispetto al lavoro che semplicemente descrive ciò che vi era di errato in termini anatomici, chimici o funzionali.

Schuffler aveva un altro problema. Il suo lavoro non solo era insufficientemente molecolare, era anche descrittivo. Egli non elaborava ipotesi e le testava mediante esperimenti funzionali, l'approccio che piace ai revisori delle borse di studio. Semplicemente prendeva dei tessuti malati e li descriveva, sperando che sarebbero emerse modalità per definire patologie specifiche. Questo tipo di ricerca, per quanto necessaria potesse essere, non possedeva né elementi elettrizzanti di biologia molecolare né la suspense di un test su un'ipotesi rivoluzionaria. Di fatto, per molti circoli scientifici, particolarmente quelli dei revisori che controllano la distribuzione di fondi dei National Institutes of Health il termine «descrittivo» è, se applicato alla critica di una borsa di studio, una condanna a morte. I progetti scientifici possono essere annientati affermando che non sono validi, poco controllati, troppo ambiziosi o descrittivi. Oggi, il giudizio di «descrittivo» su un lavoro, ai fini del finanziamento del progetto, ha lo stesso effetto che aveva il pollice verso dato dalla folla del Colosseo nell'antica Roma per la vita del gladiatore che aveva lottato.

Alla fine Schuffler smise, dopo il mancato rinnovo della borsa di studio. Sinceramente non so cosa stia facendo ora Michael Schuffler. Probabilmente è sparito nelle nebbie della pratica clinica. Mi piace pensare che si sia ritirato dalla ricerca e sia diventato ricco esercitando come medico fornitore di ottime cure a pazienti facoltosi. Spero almeno che un destino argenteo abbia preso il posto delle colorazioni argenteiche. In ogni caso, a prescindere dal fatto che la vita di

Michael Schuffler sia poi proseguita in modo felice o doloroso, rimane il fatto che il suo addio al mondo della ricerca neuropatologica ha lasciato quest'ultimo vuoto e privo di un'attività che era assolutamente necessaria. Il vuoto creato dalla caduta prematura della promessa Schuffler ha provocato una mancanza che esiste tuttora e il «trattamento» che gli è stato riservato ha scoraggiato altri a intraprendere questa strada. Al momento non esiste quindi una catalogazione chiara della malattia del sistema nervoso enterico e, per quanto ne sappia, non vi è nessuno che stia adesso tentando di fornirne una.

Più so e più so di non sapere

Il sistema nervoso enterico ha attratto una schiera di ricercatori docenti di materie di base, che lo studiano in modo molto moderno. L'anatomia, la chimica e la funzione del sistema nervoso enterico sono sperimentate in modo egregio ed è emersa una gratificante comprensione «molecolare» dei suoi componenti. Sia medici gastroenterologi sia chirurghi gastroenterologici stanno compiendo reali progressi nel mappare e riconoscere entità patologiche. È stato riconosciuto un nuovo ramo, la «neurogastroenterologia», ma questo nuovo settore continuerà ad avere un andamento zoppicante nella sua conoscenza di base, fino a quando qualcuno non riprenderà gli standard di neuropatologia che Michael Schuffler venne costretto ad abbandonare.

Gli «avrebbe potuto essere» in termini di opportunità perse si sono accumulati e stanno diventando più evidenti. Nei tempi in cui Michael Schuffler tentava di costruire una classificazione logica delle malattie del sistema nervoso enterico, le informazioni disponibili erano limitate e incomplete. Si può affermare che Schuffler era avanti per quei tempi e che non disponeva dei mezzi di cui avrebbe avuto bisogno per completare quanto proponeva. Tornando al 1981, quando Jackie Wood, Marcello Costa, Alan North e io affermammo che la serotonina è un neurotrasmettitore al workshop di Cincinnati, siamo stati considerati gli scienziati del settore. La serotonina, accettata in occasione di tale congresso, è stata solo il primo di una vasta gamma di nuovi trasmettitori presenti nell'intestino. Oggi non riesco certo a elencare tutti i ricercatori che hanno contribuito al progresso della neurogastroenterologia, perché la memoria non me lo consente. Se ora osservo i miei colleghi del settore, mi vedo come lo scienziato «vecchio» circondato dai visi radiosi e pieni d'energia di giovani. I pregiudizi e la mancanza di spirito critico nei confronti delle informazioni che non hanno consentito alla mia generazione e a quella precedente di avanzare non esisteranno ancora a lungo. Lo sforzo che devo fare semplicemente per stare al passo con la ridondanza della nuova conoscenza prodotta dal lavoro delle nuove giovani stelle della neurogastroenterologia mi lascia con la lingua a terra. Se Michael Schuffler riprendesse ora il suo lavoro dove l'ha lasciato, avrebbe gli strumenti molecolari che i suoi critici gli hanno rimproverato di non usare.

Per poter riconoscere una malattia del sistema nervoso enterico, nel caso fosse presente, è necessario riuscire a paragonare le cellule nervose che si rilevano nell'intestino disturbato con quelle di un intestino che funziona correttamente. Inoltre è necessario paragonare l'aspetto delle varie cellule nervose in un intestino potenzialmente anormale con l'aspetto delle rispettive cellule sane. Se dovesse essere presente un numero o troppo alto o troppo basso di un determinato tipo di cellule nervose, o se la loro forma apparisse distorta o strana, allora avremmo le prove di malattia. Questa è l'essenza della neuropatologia. Noi (e qui intendo l'intero settore della neurogastroenterologia, non solo il mio laboratorio) abbiamo prodotto ciò che sembra un inventario completo dei tipi di cellule nervose che normalmente sono presenti nel sistema nervoso enterico dell'intestino del porcellino d'India. Queste cellule sono classificate da un'unica combinazione di molecole, neurotrasmettitori o enzimi, che contengono. Il nostro lavoro ha inoltre evidenziato le forme delle cellule non solo grazie alla colorazione argentea ma mediante eleganti esperimenti in cui le singole cellule nervose sono state impalate e riempite con marker fluorescenti o opachi. Questi marker consentono di visualizzare l'intera cellula trattata e tutti i suoi processi. Le ricerche su specie diverse dal porcellino d'India hanno evidenziato che, nonostante vi siano differenze tra vari animali, l'organizzazione di base del sistema nervoso enterico di tutti i mammiferi è molto simile.

Naturalmente le informazioni desunte dalle ricerche sul porcellino d'India non possono essere applicate all'intestino umano senza apportare le dovute modifiche: tuttavia, i fondamenti generali dell'organizzazione delle cellule nervose enteriche emersi dagli studi sugli animali hanno permesso di arrivare più velocemente e più facilmente a creare un inventario completo dei tipi di cellule nervose presenti nel sistema nervoso enterico umano, rispetto al lavoro di ricerca che si era reso necessario all'inizio per raccogliere dati equivalenti sul porcellino d'India. Una volta che si conoscono le cellule nervose che appartengono al sistema nervoso enterico umano normale e come appaiono, un adeguato esame dell'intestino ammalato fornirà la classificazione neuropatologica delle malattie del sistema nervoso enterico umano che Schuffler stava tentando di ottenere. L'identificazione delle malattie specifiche è il primo passo che porterà inevitabilmente a terapie efficaci. L'idea di produrre un inventario completo delle cellule nervose dell'intestino umano e un elenco delle malattie a cui sono soggette, sembra oggi molto più fattibile rispetto ai progressi ottenuti in questo campo sin dalle prime volte in cui ci si interessò a esso, al congresso della Society for Neuroscience del 1981.

Oggi, l'alterazione funzionale dell'intestino è un complesso di sintomi che non ha un collegamento con la patologia. Un domani, sono sicuro che l'elenco lascerà il posto a varie entità patogene riconosciute. La malattia di Crohn era considerata una forma di disturbo funzionale dell'intestino ma è stata riclassificata dopo la scoperta della sua patologia. Allo stesso modo, alcune specifiche malattie verranno fuori da quello che io ritengo sia un grande gruppo di problemi che semplicemente provoca sintomi simili.

Parte terza

Il secondo cervello: origine e disturbi

9. Il sistema nervoso enterico oggi

Nel 1981 la dinamica coppia australiana composta da John Furness e Marcello Costa si separò. Mi sentii particolarmente rattristato quando venni a sapere della loro separazione, così come lo sono sempre quando so di una coppia sposata che divorzia. Non avrei mai immaginato che questo sarebbe potuto succedere, per lo meno non più di un duello fra Batman e Robin. Inoltre, da quando si sono separati, sia John sia Marcello hanno trovato un collega più giovane con cui lavorare. La conseguenza è che ora, invece di un solo duo australiano dinamico, ne esistono due. Un team a Melbourne, capeggiato da John, e uno ad Adelaide, con a capo Marcello, si confrontano reciprocamente in modo più o meno amichevole. Questi due laboratori australiani, insieme al loro gruppo di compagni di viaggio, possono ben vantarsi di aver creato il catalogo completo delle cellule nervose enteriche dell'intestino dei porcellini d'India.

John Furness collabora con Joel Bornstein, un giovane e acuto scienziato, raffinato fisiologo. Sia John sia Joel sono riusciti a riunire un gruppo di scienziati aggressivi che continuano a riversare nuove scoperte a una velocità che trascende facilmente quella della maggior parte degli altri gruppi del settore. Marcello Costa ha stabilito invece una collaborazione stabile con Simon Brookes, un brillante espatriato inglese, la cui conversazione ordinaria giunge all'orecchio come un «divertimento mozartiano», cioè elegante e a volte un po' arcaica.

Al momento, John Furness, Joel Bornstein e il loro gruppo sono concentrati sulla definizione dell'insieme delle proprietà delle cellule nervose sensitive intrinseche che vivono nel plesso mienterico e sull'elaborazione della natura delle reciproche connessioni che le cellule nervose identificate presentano. Marcello Costa e Simon Brookes hanno invece concentrato i loro sforzi più sulle cellule motrici eccitatrici e inibitrici, che agiscono direttamente sulla muscolatura liscia. Di fatto, è la muscolatura il reale effetto che miscela il contenuto dell'intestino e lo muove verso l'ano. Per poter identificare quali fra le tante cellule nervose del mélange presente nei gangli siano quelle motrici, Simon ha adottato con successo una tecnica denominata marcatura retrograda (un metodo che trae vantaggio dal fenomeno naturale di trasporto assonico retrogrado, o invio del materiale dalla parte terminale dell'assone indietro fino al corpo della cellula nervosa) che Gary Mawe, Annette Kirchgessner e io abbiamo introdotto per primi nello studio del sistema nervoso enterico.

Nella mia vita di sperimentatore ho trattato anche l'anatomia, come illustra la mia collaborazione con Gary Mawe e Annette Kirchgessner. Con il passare degli anni, ho fatto indagini su altri argomenti, quali lo sviluppo del sistema nervoso enterico e, come progetto familiare insieme a mia moglie, ho trattato la biologia cellulare del virus che causa la varicella e l'herpes zoster; comunque, il mio interesse originale per la serotonina non si è mai affievolito. In effetti, il nostro livello di conoscenza attuale del ruolo giocato dalla serotonina nei riflessi gastrointestinali è aumentato in modo vertiginoso, dacché a Cincinnati si è giunti a concordare che la serotonina è un neurotrasmettitore enterico. Anche in questo caso, però, non siamo ancora a conoscenza di tutto quello che la serotonina fa o causa all'intestino.

Maggiori sono le nostre conoscenze sul ruolo giocato da questa sostanza nel sistema nervoso enterico, meglio riusciremo a organizzare applicazioni cliniche derivate da tale conoscenza. La manipolazione tramite farmaci dell'azione esercitata dalla serotonina sembra essere un mezzo molto promettente in grado di dare sollievo ai disastri compiuti dai disturbi intestinali funzionali. Sono molte le aziende farmaceutiche che, oltre a fare ricerche su farmaci in grado di influenzare la serotonina in questo senso, effettuano anche trial clinici con gli stessi. Risultato di ciò è quindi che le pubblicazioni che descrivono l'azione della serotonina e dei farmaci in grado di influenzarla sono diventate estremamente numerose.

Tornando indietro all'anno 1982, Marcello Costa e John Furness pubblicarono i loro articoli dove confermavano la mia intuizione che la serotonina è un neurotrasmettitore enterico. All'incirca nello stesso periodo, Terri Branchek è arrivata nel mio laboratorio per dedicarsi allo stesso tema.

Da allora ho determinato, insieme ad altri, che la serotonina non solo è un neurotrasmettitore ma anche una molecola di segnale, secreta da cellule specializzate (non nervose) del rivestimento intestinale che operano nell'ambito della mucosa per stimolare i nervi sensitivi intrinseci che comandano i riflessi peristaltici e secretori. La serotonina agisce inoltre da fattore di crescita

durante la vita del feto.

Si è scoperto che l'intestino contiene almeno sette recettori differenti che rispondono alla serotonina. Purtroppo non era possibile prevedere questa abbondanza di molecole e dal momento che ciascuno di tali recettori è una molecola unica con azione specifica propria, la molteplicità dei recettori enterici alla serotonina permette a quest'ultima di scatenare una varietà sconcertante di risposte. Mi piace poter affermare che nessun farmacologo è andato in rovina per avere messo serotonina all'intestino. Ogniqualevolta si applica della serotonina in qualche parte dell'intestino, qualcosa accade. La «musica intestinale» creata dalla serotonina potrebbe essere definita «wagneriana», colma di leitmotiv, di contrappesi e di una profondità inattesa.

Insieme a Terri Branchek, mi sono impegnato a identificare i recettori che la serotonina utilizza per agire sulle cellule nervose dell'intestino. All'incirca nello stesso periodo, ho avviato un progetto con uno studente laureato, Steven Erde, per visualizzare le cellule nervose che rispondono alle applicazioni di serotonina, al fine di determinare se queste cellule sono effettivamente innervate da fibre contenenti tale sostanza. In effetti, Steve e io volevamo porre un punto esclamativo sulla mia recente vittoria sul fronte della serotonina a Cincinnati, osservando direttamente l'unità di neurotrasmissione della serotonina. I due progetti, recettori neurotrasmissione, erano naturalmente correlati.

Le sinapsi rivisitate

Steve Erde era un giovane uomo, piacevole e fiducioso. La registrazione delle cellule nervose dell'intestino per mezzo di microelettrodi appuntiti a quel tempo era una tecnica relativamente nuova, la cui padronanza era nelle mani di un ristretto numero di ricercatori. Che uno studente come Steve dicesse: «Ok. Non c'è problema. Facciamolo.», mi colpì in modo straordinario. Il coraggio, la volontà e la fiducia che Steve riponeva in se stesso potevano però risolvere solo parzialmente il problema di riuscire a trafiggere le cellule nervose dell'intestino nel mio laboratorio. Dovevo trovare anche un modo per cui Steve ricevesse il necessario addestramento.

Jack Wood riuscì a «intercedere» per me. Dal momento che io stesso non sapevo come portare a termine tale lavoro, pensai di mandare Steve in un laboratorio, per vedere come si effettuavano le registrazioni a livello intestinale, da un vero esperto del campo. Fra tutte le persone disponibili, Jack Wood era la più vicina, anche se il laboratorio di Reno, la città dove lui era il direttore del Dipartimento di Fisiologia della facoltà medica dell'Università del Nevada, non poteva essere definito esattamente «a due passi», e Steve era il tipo di persona che raramente si avventurava a ovest del fiume Hudson. Tuttavia, Steve risultò adattarsi all'Ovest con una facilità impressionante. E, ancor meglio, imparò la tecnica. Prima che Steve facesse rientro a casa, Jack mi chiese di mandargli più persone come lui e Steve stava impalando cellule nervose intestinali con facilità.

Una volta giunto a casa, Steve creò le apparecchiature di cui aveva bisogno e mi introdusse a una nuova serie di metodologie sulle quali riponevo da sempre la mia fiducia. Il suo progetto continuò quindi molto bene. Scopri prontamente cellule nervose che si comportavano come se fossero guidate da input nervosi che utilizzavano la serotonina quale neurotrasmettitore. Dopo essere riuscito a definire le risposte delle cellule che aveva raggiunto con gli elettrodi, Jack le iniettò con perossidasi di rafano, un enzima derivato dal contorno del roast beef che gli scienziati utilizzano per ottenere un prodotto di reazione opaco, facilmente riconoscibile al microscopio elettronico.

I contatti, o sinapsi, che le cellule nervose creano tra di loro sono molto stretti. Il gap sinaptico fra queste cellule è così piccolo da non poter essere distinto in un microscopio ottico. I sottili processi nervosi e le cellule che li originano vanno oltre il livello di risoluzione di tale apparecchio. È facile comunque sbagliarsi se ci si affida al microscopio ottico; molti contatti ravvicinati che sembrano essere sinapsi, invece non lo sono, e molti scienziati hanno fallito traendo conclusioni basate su ciò che pensavano di aver visto con il microscopio ottico. Per poter essere certi che ciò che sembra essere una sinapsi lo sia realmente, occorre un microscopio elettronico.

Sfortunatamente, il microscopio elettronico comporta anche un certo bagaglio di difficoltà a chi lo utilizza negli esperimenti. Sebbene questo apparecchio fornisca una visuale molto ravvicinata di ciò che è nel suo obiettivo, il campo visivo è molto limitato. Un singolo ganglio, per esempio, assume le dimensioni di un campo di calcio. Le sezioni di cui ci si serve

devono inoltre essere molto sottili, poiché il raggio elettronico non penetra così in profondità come la luce. Migliaia di tali sezioni in serie sono necessarie per sezionare una singola cellula nervosa; quindi, lo spessore delle sezioni deve essere misurato in miliardesimi di metro. Dopo aver quindi provveduto a iniettare una cellula nervosa, Steve doveva sezionarla tutta in modo da poter esaminare ciascuna delle migliaia di sinapsi presenti sulla sua superficie.

Inoltre, mentre Steve osservava le terminazioni nervose nelle cellule in cui aveva iniettato perossidasi di rafano, doveva anche determinare se qualcuna delle sinapsi che incontrava conteneva serotonina. Decidemmo quindi di usare l'autoradiografia per identificare le sinapsi che facevano uso della serotonina quale neurotrasmettitore. Dal momento che dopo aver avuto efficacia, la serotonina viene inattivata dal suo riassorbimento specifico nella stessa fibra nervosa che l'ha rilasciata, è possibile utilizzare della serotonina radioattiva per contrassegnare i nervi che la contengono. La serotonina radioattiva viene aggiunta in piccole quantità che si mischiano con il trasmettitore naturale. Dopo che le cellule nervose hanno assunto la serotonina radioattiva, diventano esse stesse radioattive e fanno una fotografia di se stesse (l'esame autoradiografico) quando un'emulsione fotografica viene posta sopra il tessuto. Questo metodo è simile a quello che ho utilizzato originariamente per scoprire le cellule nervose dell'intestino contenenti serotonina (vedi capitolo 1), a eccezione del fatto che ho «alimentato» i nervi con un precursore radioattivo della serotonina (invece della serotonina stessa) e ho lasciato che producessero da sole tale sostanza radioattiva.

Il progetto di Steve, quindi, era di registrare le cellule nervose, identificare quelle che lui riteneva fossero guidate dai nervi contenenti serotonina e, quindi, iniettare tali cellule con perossidasi di rafano. In seguito, il tessuto veniva messo in incubazione con la serotonina radioattiva, veniva fissato e, quindi, preparato per il microscopio elettronico. Dalla perossidasi di rafano si otteneva un prodotto di reazione elettrondenso, si tagliava un numero appropriatamente elevato di sezioni ultrasottili e ognuna di esse veniva ricoperta con l'emulsione fotografica. Le sezioni rivestite venivano quindi esposte per settimane o mesi, sviluppate e quindi esaminate con un microscopio elettronico.

Per portare a termine tutto questo lavoro sarebbero occorsi anni, se non fosse che Steve venne aiutato da Diane Sherman, una tecnica che Dio mi aveva inviato diversi anni prima quale premio per qualche buona azione che neppure io sapevo di aver compiuto. Grazie all'aiuto di Diane, Steve scoprì che ogni cellula che si comportava come se avesse ricevuto l'input di serotonina, era stata effettivamente ricoperta con sinapsi contenenti tale sostanza.

Steve iniziò a scrivere la sua tesi, ma venne colpito da una crisi inaspettata durante il cammino. Una mia regola generale è che i libri in cui vengono registrati i dati non devono mai abbandonare il laboratorio. Per quanto riguarda i dati registrati sono effettivamente un po' paranoico e li valuto e stimo molto più delle pietre preziose, dell'oro o del denaro. Steve ha molte virtù, ma quando si tratta di rispettare le regole, purtroppo viene meno. Stava scrivendo la sua tesi a casa e voleva i libri contenenti i dati disponibili quale riferimento. Li mise quindi nel bagagliaio della sua macchina e si diresse a casa senza peraltro sapere che quest'azione si

sarebbe rivelata disastrosa. I libri vennero rubati insieme alla gomma di scorta, al cric e ad altri attrezzi.

Il furto di questi dati fu pressoché una catastrofe di dimensioni epiche. Fortunatamente fu solo un normale disastro. Tutte le registrazioni di tipo elettrofisiologico di Steve erano su nastro e tutte le sue preparazioni anatomiche erano state fotografate. Ma dal momento che aveva perso il suo indice, Steve dovette rifare e rilevare nuovamente tutti i suoi esperimenti. Fortunatamente lo fece e i risultati vennero pubblicati.

I recettori serotoninergici dell'intestino

Mentre Steve Erde era impegnato a dimostrare che la serotonina è presente nelle sinapsi dove noi presumevamo lavorasse, Terri Branchek stava riuscendo nell'intento di identificare i recettori sui quali agisce la serotonina. Terri sviluppò una tecnica che, per la prima volta, ci rese possibile contraddistinguere direttamente i tipi di recettori serotoninergici presenti nell'intestino. Prima di tutto questo, i recettori dei neurotrasmettitori dell'intestino venivano studiati allo stesso modo in cui Sir Arthur Conan Doyle usava Sherlock Holmes nei suoi libri per indagare sui criminali. L'intercalare («mio caro Watson») era tutto. Furono utilizzati dei farmaci per alterare le risposte dell'intestino al neurotrasmettitore e furono tratte conclusioni sui recettori che erano responsabili degli effetti del neurotrasmettitore. Tali conclusioni si basavano sull'azione conosciuta (o presunta) dei farmaci. Era possibile fare progressi tramite deduzione, ma tutta questa conoscenza doveva essere governata da un principio di incertezza, come quello della meccanica quantistica. L'azione presunta dei farmaci potrebbe non essere corretta e, come Sir Henry Dale ha sottolineato, nessun farmaco svolge una sola azione. L'effetto di cui si è a conoscenza per ogni farmaco può non essere l'unico che esso esplica. Naturalmente, sono gli effetti sconosciuti dei farmaci che potrebbero essere letali alle interpretazioni dei dati.

I recettori alla serotonina forniscono una buona panoramica dei limiti della deduzione. Nel 1957, J.H. Gaddum e Z.P. Picarelli annunciarono che, nell'intestino, sono presenti due recettori per la serotonina. Chiamarono questi recettori «M» e «D». Le lettere stanno per morfina e dibenzilina, sulle quali si basavano le loro deduzioni. Gaddum e Picarelli definirono con «M» i recettori responsabili di mediare le risposte dell'intestino alla serotonina che venivano bloccati dalla morfina, e con «D» quelli in cui l'agente bloccante era la dibenzilina. Si scoprì però che né la morfina né la dibenzilina avevano effetti specifici sui recettori serotoninergici. Quindi, nel contesto dei loro documenti sul tema, Gaddum e Picarelli erano completamente fuori strada per quanto concerne la loro visione dei recettori serotoninergici.

I dati di Gaddum e Picarelli erano eccellenti. Le loro osservazioni accurate e ben descritte. Tuttavia il sistema era molto più complesso di quanto immaginassero, così che le deduzioni che poterono trarre erano basate su presupposti erronei. Stavano misurando la contrazione dell'intestino. Quando applicarono la serotonina, che stimola i nervi intestinali, questi ultimi provocarono la contrazione dell'intestino spruzzando acetilcolina sulle cellule della muscolatura liscia. La morfina interferisce con la secrezione di acetilcolina in quei nervi enterici; tuttavia, dopo l'applicazione della morfina, la contrazione dell'intestino quale risposta alla serotonina è diminuita d'ampiezza. Dopo averli esposti alla morfina, i nervi che vengono stimolati dalla serotonina semplicemente non lavorano più bene. Così la morfina non influenza la contrazione dell'intestino provocata dalla serotonina perché va a interessare i recettori serotoninergici. La morfina, invece, previene la manifestazione della stimolazione dei recettori che Gaddum e Picarelli stavano studiando. Essa rendeva non evidente l'attivazione dei nervi enterici che la serotonina continuava a stimolare, nonostante la presenza di morfina. La morfina, quindi, non

distingueva uno specifico sottotipo di recettore serotoninergico, come Gaddum e Picarelli pensavano. Piuttosto, faceva distinzione fra gli effetti della serotonina mediati dai nervi e quelli esercitati direttamente sulle cellule stesse della muscolatura liscia.

Molti anni dopo la pubblicazione del lavoro di Gaddum e Picarelli, introdussi l'uso della tetrodotossina per produrre deliberatamente gli stessi risultati a cui erano arrivati senza peraltro volerlo. Al pari della morfina, la tetrodotossina inibisce la contrazione dell'intestino dei porcellini d'India in risposta alla serotonina. Essa blocca la conduzione nervosa e condivide quindi con la morfina (ma seguendo un meccanismo differente) l'abilità di diminuire il rilascio di acetilcolina da parte dei nervi enterici stimolati. Nel senso che la morfina è un antagonista dei recettori «M» così come lo è la tetrodotossina. Tuttavia non stavo utilizzando la tetrodotossina quale antagonista serotoninico (che non lo è) ma come un agente affidabile per poter distinguere le azioni dei farmaci mediate indirettamente dai nervi in preparati di muscolatura liscia innervata da quegli effetti diretti del farmaco sul muscolo stesso. La morfina non era allora un antagonista specifico dell'azione mediata dal recettore della serotonina più di quanto lo fosse la tetrodotossina. Similmente, la dibenzilina, che è un composto altamente reattivo correlato all'iprite utilizzata durante la Prima Guerra Mondiale, rendeva inattivi quasi tutti i recettori sulla muscolatura liscia. Quando le cellule del muscolo vengono esposte alla dibenzilina, la serotonina si comporta esattamente come molti composti ai quali le cellule muscolari non rispondono più. Quasi tutti i recettori delle cellule del muscolo sono stati «uccisi» dalla dibenzilina.

Gaddum e Picarelli perciò interpretarono male i propri dati; tuttavia i loro scritti sono diventati un classico nel settore poiché, anche se erano nel torto, furono effettivamente i primi autori a dimostrare che l'intestino contiene più di un singolo recettore alla serotonina. Questo stralcio di storia mostra non solo i rischi della deduzione, ma anche l'importanza della fortuna. Una dichiarazione esatta, anche per motivi errati, può essere la chiave di un successo che durerà in eterno.

Invece della deduzione, Terri Branchek usò serotonina altamente radioattiva per testare i recettori. I neurotrasmettitori si legano letteralmente ai loro recettori per poterli attivare. I composti che si legano ai recettori sono chiamati *leganti*; tali leganti, che attivano i relativi recettori, sono chiamati agonisti, come abbiamo osservato in precedenza. Similmente, gli antagonisti sono anche leganti che si uniscono ai recettori; tuttavia gli antagonisti si legano ai recettori senza provocare cambiamenti della configurazione chimica del recettore stesso, necessaria ad attivarlo. Il legame di un antagonista con un recettore avviene quindi silenziosamente; ma legandosi al recettore, l'antagonista interferisce con il legame di un agonista.

Esistono due tipi di antagonisti: quelli *competitivi* e quelli *non competitivi*. Gli *antagonisti competitivi* si legano reversibilmente ai recettori e possono quindi essere rimossi da loro da un agonista a patto che la concentrazione di quest'ultimo sia sufficientemente alta. Se l'antagonista è presente in una concentrazione maggiore di quella dell'agonista, ha la supremazia; nel caso

opposto è l'agonista che ha la meglio. L'antagonismo competitivo è superabile. Un *antagonista non competitivo* non può essere rimosso. Non importa quanta percentuale di agonista si applichi: i suoi effetti sono irreversibili. Quando il recettore viene investito da un antagonista irreversibile, può considerarsi finito; se tutti i recettori presenti su una cellula sono sottoposti a tale farmaco, quest'ultima non sarà più in grado di rispondere a un agonista finché non avrà creato nuovi recettori.

Le quantità di leganti (agonisti o antagonisti) che si uniscono ai recettori sono molto piccole e solitamente è impossibile determinarle utilizzando strumenti puramente chimici. Quando però un legante altamente radioattivo si unisce a un recettore, la radioattività rende possibile l'osservazione e la misurazione del legame. Utilizzando un legante molto «pesante» è quindi possibile studiare non solo il numero dei leganti che si uniscono a un recettore, bensì anche quanto tempo impiega questo a unirsi e quanto a staccarsi. È possibile anche scoprire direttamente gli effetti degli agonisti e degli antagonisti sul legame del legante e, ancor più importante, indagare le proprietà chimiche del legante che determinano se si unirà o meno ai suoi recettori. I test di legame con leganti radioattivi permettono quindi di caratterizzare i recettori senza peraltro dover trarre deduzioni che dipendono puramente da ciò che uno sa in merito all'azione del farmaco. Unitamente all'indagine autoradiografica, il legame di un legante radioattivo ai suoi recettori può essere utilizzato anche per visualizzare i recettori nei siti in cui si trovano.

Terri eseguì dei test con serotonina radioattiva per confermare che le membrane isolate dalle cellule nervose enteriche contenevano veramente recettori serotoninergici. Ciò significa che le membrane contenevano un numero limitato di siti in grado di legarsi alla serotonina. Una volta saturati questi siti con serotonina radioattiva legata, non si verificava più alcun legame. La concentrazione con cui la serotonina saturava i siti di legame e la velocità con cui si univa e si staccava indicavano che i recettori a cui si era unita erano particolarmente favorevoli alla sua presenza e presentavano un'alta affinità con essa. Il recettore, tuttavia, sembrava essere unico, per il fatto che la serotonina non poteva essere indotta ad abbandonare la sua presa da nessun farmaco conosciuto quale agonista o antagonista per altri recettori serotoninergici. In altre parole, i «classici» antagonisti serotoninergici non riuscirono a competere con la serotonina nel legarsi a questo recettore.

Inizialmente, il fatto che gli antagonisti serotoninergici conosciuti non riuscissero a bloccare il processo di legame della serotonina radioattiva si rivelò scoraggiante. Quando Terri ottenne questi risultati non sospettavamo minimamente che esistesse un numero incredibilmente vasto di recettori serotoninergici. Se perciò un farmaco era antagonista, mi aspettavo fosse in grado di competere con la serotonina radioattiva nel legarsi ai recettori effettivi. Il fatto che non si comportassero in tal modo mi portò a chiedermi se il legame della serotonina radioattiva che Terri aveva osservato fosse un artefatto. Fortunatamente, il mio sconforto fu prematuro e derivava dallo stesso tipo di errore che Gaddum e Picarelli avevano fatto in precedenza. Trassi deduzioni errate in base a quanto sapevo sui farmaci. Imparai in seguito che i «classici»

antagonisti della serotonina che sono efficaci nel bloccare gli effetti della serotonina ovunque nel corpo (ricordate l'LSD e l'utero dei ratti?) sono impotenti quando devono bloccare le azioni fisiologiche della serotonina nelle cellule nervose enteriche. Per quanto concerne i recettori enterici della serotonina, quindi, gli antagonisti «classici» non si comportano affatto come tali. La natura stava giocando con noi. Si stava dimostrando ritrosa. Le osservazioni ricavate dagli studi sui legami dei recettori e dalla fisiologia coincidevano e ci stavano dicendo che la serotonina agiva su un nuovo recettore che era presente nell'intestino, ma non negli altri siti in cui erano stati precedentemente rinvenuti i recettori serotoninergici e dove erano stati definiti i «classici» antagonisti alla serotonina. Non possiamo infatti affermare che visto un recettore serotoninergico lì si sono visti tutti.

Ciò di cui avevamo bisogno a quel punto era un nuovo antagonista che sarebbe stato il nostro «asso nella manica», un composto in grado di vedere il nostro recettore serotoninergico e ignorare gli altri. La prospettiva di trovarne uno era comunque scoraggiante. Le industrie farmaceutiche utilizzano legioni di chimici organici per produrre nuovi composti su misura per far fronte alle richieste dei farmacologi con cui lavorano. Poter disporre di tale esercito di chimici a proprio piacimento significa poter agire come un designer (sulla base della relazione struttura-attività che si sta indagando), riuscire a sintetizzare un pugno di farmaci nuovi e avere la possibilità di trovare un nuovo antagonista. Se però siete come me e non avete chimici al vostro comando, creare un antagonista nuovo può rivelarsi un problema serio. Ho risolto questo problema nel vecchio modo: sono stato fortunato.

Gli studi effettuati da Terri sui legami ci avevano indicato alcune delle proprietà strutturali di cui un chimico necessita per poter legare il recettore serotoninergico enterico nuovo che avevamo appena scoperto. Mentre cercavo di immaginarmi una serie di modi con cui avvicinarmi alle aziende farmaceutiche, che sognavo rimanessero impressionate e producessero per me una serie di composti nuovi da testare, la mia collega Hadassah Tamir mi chiamò per avere qualche delucidazione sugli studi che stava svolgendo con un farmaco particolare su cui lei stava indagando per conto di un amico israeliano che lo aveva prodotto. Naturalmente, quando mi chiamò, io ero occupato e distratto; tuttavia so che quando chiama Hadassah dimentico tutto quello che ho in testa e faccio ciò che mi chiede. Hadassah ha combattuto nella guerra d'indipendenza israeliana e, da persona che eludeva i soldati inglesi con granate nascoste sotto la gonna, non si turbava per nulla. Come capitò, il farmaco su cui stava lavorando quale antidolorifico per non so più quale scopo, sembrava possedere tutte le caratteristiche chimiche che stavo cercando.

Il succo di Gerusalemme

Viste le sue origini, ho inizialmente chiamato il composto di Hadassah «succo di Gerusalemme»; ma quando iniziò ad avere efficacia decisi di abbandonare il lato profano e gli diedi un nome appropriato. Il farmaco naturalmente era già conosciuto con un termine chimico, per lo meno ai suoi produttori; questo termine era però troppo colmo di lettere per essere un nome accettabile che tutti avrebbero potuto utilizzare.

A parte per giochi di parole, nessuno avrebbe preso seriamente qualsiasi cosa si fosse chiamata *N-acetil-5-idrossitriptofil-5-idrossitriptofano ammidato*. Decidemmo quindi di utilizzare le iniziali che si basavano sulla struttura chimica del composto. La molecola attiva del farmaco è essenzialmente formata dall'unione di due molecole, naso a naso, del precursore della serotonina, in una configurazione detta *dipeptide*. Le iniziali del precursore della serotonina (5-idrossitriptofano) sono 5-HTP, per cui chiamammo il farmaco 5-HTP-DP, che la maggior parte delle persone riesce a tenere a mente. Quando si dimenticano, lo chiamano semplicemente «il dipeptide», un uso che, ogni volta che lo sento, mi ricorda tanto i giornalisti che, riferendosi a Donald Trump, lo chiamano «il Donald».

Il primo indizio che mi portò a pensare che il 5-HTP-DP sarebbe divenuto interessante fu un'osservazione di Terri che notò che esso competeva molto bene con la serotonina radioattiva nel legarsi al nuovo recettore serotoninergico enterico. Il successivo indizio fu trovato da Miyako Takagi, un «ciclone» giapponese in visita che stava trascorrendo un anno nel mio laboratorio e che si dedicava ai microelettrodi di Steve Erde. Miyako scoprì che il 5-HTP-DP bloccava l'azione della serotonina sulle cellule nervose enteriche (questo era l'antagonista serotoninergico di cui Jack Wood necessitava nel 1981). E poi, la notizia più eclatante: il 5-HTP-DP bloccava anche la risposta delle cellule nervose enteriche alla stimolazione da parte dei nervi che noi pensavamo fosse mediata dalla serotonina. Scoprimmo così che il 5-HTP-DP era un antagonista serotoninergico ma, più che altro, era l'unico antagonista che aveva la capacità di legarsi al nuovo sottotipo di recettore serotoninergico 5-HT_{1P} che avevamo scoperto nell'intestino. Ulteriori studi condotti nel mio laboratorio e in quelli di altri ricercatori rivelarono che il 5-HTP-DP era abbastanza specifico, in quanto i suoi effetti erano limitati al recettore 5-HT_{1P}, senza arrecare alcun disturbo a quelli di altri neurotrasmettitori o anche ad altri recettori serotoninergici localizzati esternamente al sistema nervoso enterico.

Sebbene fosse specifico, il 5-HTP-DP era efficace solo se applicato in alte concentrazioni. Inoltre, era difficile da produrre ed era disponibile solo in piccole quantità; per cui il 5-HTP-DP non avrebbe curato alcuna epidemia e nessuna azienda farmaceutica se ne interessò. Sono poche le aziende che lo sintetizzano a scopo di ricerca e Hadassah tenta di fornirlo a scienziati che ne hanno bisogno, così che il nostro lavoro può essere duplicato. Tuttavia, nonostante i limiti che presentava, il 5-HTP-DP è ancora l'unico antagonista specifico al 5-HT_{1P} disponibile; il suo uso ha permesso di definire operativamente i recettori.

La loro sconfitta fu la nostra vittoria

In seguito, riuscimmo a ottenere un'altra serie di medicinali che scoprimmo essere attivi sul recettore 5-HT_{1P}. Essi provenivano da un test fallito in Europa di un medicinale concepito per essere un antidepressivo. Questo composto, denominato *indalpina*, fa parte di una classe di medicinali che comprendono il Prozac, in grado di inibire il riassorbimento della serotonina da parte delle fibre nervose che la rilasciano. Questi composti lavorano chiaramente nel cervello al fine di lenire la depressione; a parte coloro che si impegnano a scoprire gli «effetti collaterali» dei medicinali, nessuno ha mai riflettuto tanto in merito all'azione degli antidepressivi al di fuori del cervello.

Secondo tutti i test preclinici condotti, l'*indalpina* sembrava essere proprio un ottimo e specifico tipo di antidepressivo. Infatti, aveva superato trionfalmente i test condotti in animali e non venne rilevata alcuna tossicità particolare. Inoltre, i ratti a cui era stata somministrata l'*indalpina* si erano comportati esattamente nel modo in cui fanno tali animali da laboratorio sotto l'effetto di un potente antidepressivo. Nessuno è in grado di chiedere a un topo da laboratorio se è felice, ma esistono comportamenti che si possono ben correlare all'efficacia degli antidepressivi; queste cavie li esibivano tutti. Tuttavia, i primi pazienti ai quali venne somministrata l'*indalpina* svilupparono una diarrea acuta che mise termine allo studio sulla sua efficacia nel trattamento della depressione.

Questo fallimento clinico avrebbe dovuto sicuramente chiudere il caso, tranne per il fatto che io trovai interessante la struttura di questo farmaco. L'*indalpina* in sé mancava infatti di ciò che io supponevo che un composto necessitasse per legarsi al recettore 5-HT_{1P}; tuttavia, con l'aggiunta di un gruppo chimico singolo che l'avrebbe resa 5-idrossi-*indalpina*, invece di *indalpina*, pensavo si potesse unire bene al recettore. Decisi di scrivere alla fabbrica, Pharmuka (acquisita poi da Rhône-Poulenc), che produceva l'*indalpina*, e di chiedere se, per il bene della scienza, avrebbero voluto produrre un po' di 5-idrossi-*indalpina*. Si scoprì che lo avevano già fatto per dei test metabolici e che disponevano anche della 6-idrossi-*indalpina*. Infatti, gli scienziati di Pharmuka erano pressoché sicuri che il problema della diarrea verificatosi durante i test clinici derivava dalla conversione dell'*indalpina*, nei corpi dei pazienti a cui era stata somministrata, in 5-idrossi-*indalpina*. Il colpevole di tutta questa storia, per quanto riguarda Pharmuka, era proprio il composto in sé stesso, che io volevo investigare. La Pharmuka fu felice di inviarmi le sue scorte, che al momento sembravano esserle inutili, e noi acquisimmo due nuovi farmaci da testare. Applicammo le sigle 5-OHIP alla 5-idrossi-*indalpina* e 6-OHIP alla 6-idrossi-*indalpina* e ci mettemmo all'opera.

La fortuna era ancora dalla nostra parte. Terri Branchek scoprì che sia la 5- sia la 6-OHIP competevano con la serotonina radioattiva nel legarsi al recettore 5-HT_{1P}. Pharmuka si rivolse allora alla Commissione Europea per l'Energia Atomica per poter produrre la 5-OHIP per noi. La 5-OHIP radioattiva si legò al recettore 5-HT_{1P}, e poté esser rimossa dal recettore, dalla serotonina e dal 5-HTP-DP. Queste osservazioni confermarono che tutti e tre questi composti

competevano l'uno con l'altro, per legarsi al medesimo recettore. La 5-OHIP, comunque, risultò essere molto differente dal 5-HTP-DP.

A quel tempo Gary Mawe si era unito allo staff del mio laboratorio, dedicandosi ai microelettrodi di Miyako Takagi. Gary scopri presto che, in contrasto con il 5-HTP-DP, che era un antagonista silenzioso che non provocava nessuna reazione alle cellule nervose intestinali quando veniva applicato da solo su di esse, la 5- e la 6-OHIP imitavano l'azione della serotonina sulle cellule nervose sulle quali venivano applicate. Questi composti si legavano quindi al recettore 5-HT_{1P} perché erano agonisti, non antagonisti. I dati di Gary spiegavano anche perché il test clinico dell'indalpina fosse fallito. La 5-OHIP, ricavata dall'indalpina dei pazienti a cui era stato somministrato il farmaco, aveva colpito il loro intestino come un treno merci sfuggito al controllo. Inavvertitamente, mentre producevano la 5-OHIP, avevano lasciato libero un agonista puro del 5-HT_{1P} che, finché non riuscirono a espellerlo, aveva eccitato le cellule nervose enteriche senza rispetto di alcuna parte del loro intestino.

Mentre riflettevo sulla sindrome associata all'ingestione di indalpina e al suo metabolismo rispetto alla 5-OHIP, mi venne in mente un disgustoso cancro gastrointestinale che secerne serotonina. Questo tumore viene denominato *carcinoma maligno*. Deriva dalle cellule enterocromaffini, o EC, della mucosa intestinale. Queste cellule sono le stesse che producono serotonina in risposta allo stimolo della tossina del colera e che, solitamente, vengono tenute recettori sensitivi in grado di scoprire pressione o distorsione della mucosa. Le cellule EC si trovano nello stomaco e anche nell'intestino tenue e crasso e ciascuna di esse impacchetta una grande quantità di serotonina. Nell'insieme, la serotonina presente nelle cellule EC fa impallidire qualsiasi altra sorgente di tale stanza nel corpo umano. Infatti, tali cellule formano circa il 95% della serotonina del corpo.

Quando divengono cancerogene, le cellule EC secernono serotonina senza controllo e spesso senza motivo apparente. Se questa secrezione anomala è limitata all'intestino, solitamente non accade nulla di terribile. La serotonina che invece entra nel flusso sanguigno viene portata al fegato che la elimina. Le pareti intestinali impediscono alla serotonina della mucosa di raggiungere direttamente le cellule nervose nel plesso mienterico. D'altra parte, quando un tumore si diffonde (metastasi) al fegato e mette su bottega in quest'organo, il tumore secerne la serotonina nel sangue da un «piedistallo» dove il fegato non è più in grado di rimuoverla. Attraverso il sangue, il tumore metastatizzatosi espone così l'intero corpo a un eccesso di serotonina, comprese le cellule nervose dell'intestino. I risultati di tale azione sono vari e pressoché tutti negativi. La parte destra del cuore (per motivi ancora sconosciuti) viene danneggiata e i pazienti presentano vampate e respiro affannoso. E, ancor peggio, gli intestini sembra stiano partecipando alla 500 miglia di Indianapolis. La motilità diventa così rapida che le onde peristaltiche divengono visibili attraverso la pelle dell'addome del paziente. Il paziente diviene emaciato in seguito al cattivo assorbimento. L'intestino non ha semplicemente il tempo di digerire e assorbire ciò che il paziente mangia. Se il tumore o la serotonina non vengono arrestati, il paziente muore inevitabilmente di fame. La serotonina, liberata sui recettori 5-HT_{1P}

della vittima delle metastasi del carcinoma, ha la sua controparte nella 5-OHIP liberata sugli inconsapevoli soggetti di un fallito test di un farmaco. A volte, in un test clinico, è decisamente meglio assumere il placebo.

Terri usò la 5-OHIP radioattiva proveniente dall'Europa per localizzare i recettori 5-HT_{1P} tramite indagine autoradiografica. Li scoprì nelle cellule nervose, specialmente in quelle del plesso mienterico dell'intestino, confermando quindi i nostri dati fisiologici nonché i risultati degli studi da lei condotti in merito. Tuttavia, i recettori 5-HT_{1P} erano stati localizzati anche in quelle che sembravano le fibre nervose della mucosa site subito al di sotto dell'epitelio dell'intestino. La posizione dei recettori 5-HT_{1P} nella mucosa mi ha fatto pensare che tale recettore possa essere coinvolto nella recezione sensoriale enterica così come nella neurotrasmissione. Alcuni anni più tardi sarei ritornato su questo tema.

Mentre stava indagando sulla 5- e 6-OHIP, Gary Mawe osservò che l'azione della serotonina era più complicata di quanto supposto in precedenza. Erano almeno due i componenti che potevano essere riconosciuti nell'ambito di una risposta eccitativa alla serotonina. Il primo si era manifestato immediatamente, ma era fugace fino al punto di sparire. Questo componente di risposta alla serotonina era pressoché scomparso prima ancora che il secondo iniziasse a operare. Jack Wood fece un'osservazione simile, e (come potrete ricordare) chiamò i due componenti rispettivamente risposta «rapida» e risposta «lenta» per tentare di dar loro un certo ordine. Le proprietà elettriche della risposta rapida e di quella lenta alla serotonina, nonché il loro momento di attuazione, differivano parecchio l'una dall'altra. Durante la risposta rapida, la conduttività elettrica della membrana delle cellule nervose che rispondevano aumentò, suggerendo in tal modo che i canali ionici si stavano aprendo e che gli ioni stessi, trasportatori di corrente, si stavano muovendo attraverso i canali. Per contro, durante la fase della risposta lenta, la conduttività della membrana cellulare di nervi diminuì effettivamente, suggerendo quindi che i canali ionici si stavano chiudendo e che la corrente era stata interrotta. A quel tempo non sapevamo cosa muoveva gli ioni o quali canali erano coinvolti nelle risposte; tuttavia era chiaro che un singolo recettore non poteva evocare due risposte così disparate. Sia il tempo impiegato dai due componenti a rispondere alla serotonina sia la loro natura molto differente spingevano alla conclusione che si dovesse trattare di due recettori differenti della serotonina.

Gary scoprì presto che era in grado di distinguere la risposta rapida e lenta con i farmaci che avevamo scoperto essere attivi sui recettori 5-HT_{1P}. La risposta lenta alla serotonina era per noi la più interessante, poiché veniva imitata precisamente dalla 6-OHIP e inibita dal 5-HTP-DP. Ciò significava che i recettori 5-HT_{1P} sono responsabili della risposta lenta alla serotonina. Al contrario, la risposta rapida era completamente resistente all'inibizione da parte di 5-HTP-DP e non era provocata dalla 6-OHIP. Quindi, la risposta rapida non ha nulla a che vedere con i recettori 5-HT_{1P}.

Possiamo quindi affermare che nelle cellule nervose intestinali esistono due recettori completamente differenti che rispondono entrambi all'azione della serotonina. Uno di essi, il recettore 5-HT_{1P}, lega anche 6-OHIP, che lo attiva, e il 5-HTP-DP, che lo tiene inattivo. La risposta rapida è mediata da un recettore completamente differente che lega anche la serotonina ma che non presenta affinità né per 6-OHIP né per 5-HTP-DP (5-OHIP differiva da 6-OHIP per il fatto che era più simile alla serotonina stessa e stimolava sia la risposta lenta sia quella rapida). Dal momento che avevamo già un 5-HT_{1P}, decidemmo di chiamare il recettore per le risposte rapide 5-HT_{2P}, seguendo le regole di allora per denominare i recettori della serotonina. Usavamo anche una «P» nella nomenclatura, per indicare che il recettore era presente nel sistema nervoso periferico piuttosto che in quello centrale. Sfortunatamente il nome 5-HT_{2p} era sbagliato. Quando lo scoprimmo, non ci eravamo accorti che il recettore 5-HT_{2p} doveva ancora essere scoperto, in seguito, indipendentemente, da un altro gruppo di scienziati, che gli avrebbe

assegnato un nome nuovo, forse più corretto, che avrebbe poi mantenuto.

Due anni dopo che Gary, Terri e io avevamo pubblicato il nostro lavoro, fu introdotta una nuova serie di composti che bloccavano le contrazioni intestinali indotte dalla serotonina, che erano mediate dai nervi. Scoprimmo presto che uno di questi nuovi farmaci, ora conosciuto come *tropisetrone*, era anch'esso antagonista del recettore che avevamo denominato 5-HT_{2p}. Dal momento che il numero di recettori alla serotonina stava subendo un'escalation senza precedenti dinnanzi a un pubblico scientifico stupito, un gruppo di farmacologi, ivi compreso chi aveva aiutato a introdurre il tropisetrone, si riunì autonomamente per pubblicare uno schema ordinato per classificare i recettori alla serotonina. Decisero di chiamare il recettore che veniva bloccato dal tropisetrone e il correlato antagonista 5-HT₃. Quel nome ora è ufficiale e 5-HT_{2p} è solo storia passata e dimenticata.

A prima vista può sembrare strano che la serotonina necessiti di due diverse molecole recettoriali che agiscono in modi completamente diversi per eccitare le cellule nervose enteriche. Inoltre, dal momento che il recettore 5-HT₃ è primariamente responsabile della contrazione indotta dai nervi che è evocata aggiungendo serotonina in un segmento intestinale isolato, cosa resta da fare al recettore 5-HT_{1p}? Riflettendo su questo tema, occorre fare mente locale sul fatto che i nervi non agiscono affatto come le ghiandole endocrine. Non buttano fuori un neurotrasmettitore che deve andare poi a lavorare su tutti i recettori che sono alla sua portata. I nervi, invece, forniscono molto precisamente il loro neurotrasmettitore a sinapsi particolari in punti specifici della superficie delle cellule nervose, dove si trovano raggruppati recettori idonei.

Aggiungere serotonina a un bagno per organi termostato che contiene un segmento di intestino non può certo essere paragonato alla stimolazione dei nervi contenenti tale sostanza. Gli effetti non sono affatto gli stessi. La serotonina in un bagno per organi è una condizione artificiale in cui il neurotrasmettitore si mette a lavorare come se fosse un ormone endocrino. La serotonina può infatti sciabordare intorno e legarsi a qualsiasi recettore incontri. In queste condizioni, è molto probabile che essa vada a stimolare recettori che, in vita, nell'animale, non ne riceverebbero mai da un nervo che la contiene. Per esempio, le cellule nervose motrici il cui compito è far contrarre la muscolatura intestinale, hanno recettori 5-HT₃; quindi, l'aggiunta di serotonina in un bagno per organi eccita tali cellule, che siano realmente innervate da nervi contenenti serotonina o no. La contrazione muscolare che ne deriva è mediata interamente dal 5-HT₃ e viene bloccata totalmente dall'antagonista del 5-HT₃. Dal momento che, in questo esempio, i nervi correlati ai muscoli sono stati stimolati direttamente, non c'è modo di sapere cos'altro sarebbe potuto accadere alle altre cellule nervose disposte a monte delle cellule nervose motrici. La stimolazione delle cellule che inviano il segnale manda in cortocircuito il sistema nervoso enterico e maschera ciò che sta accadendo dentro i gangli intestinali.

Nel corso della vita, la serotonina non sciaborda nell'intestino di un essere umano o di un animale. Per sapere esattamente cosa fa la serotonina per l'intestino, occorre sapere cosa succede quando viene specificamente immessa nei siti che, normalmente, ricevono questa sostanza dai nervi oppure da altre cellule che la contengono. Le registrazioni di singole cellule raggiunte con

un microelettrodo si avvicinano molto di più a questo ideale che non i rilevamenti «grossolani» delle contrazioni muscolari. Il nostro lavoro e quello dei colleghi australiani hanno dimostrato che le cellule nervose contenenti serotonina sono interneuroni, il che significa che la loro funzione è sia quella di «ascoltare» sia quella di «parlare» solo ad altre cellule nervose. Mettere serotonina in un bagno per organi significa non considerare e quindi ignorare gli interneuroni.

Il più importante recettore serotoninergico enterico

Quando si stimolano le cellule nervose contenenti serotonina, si può osservare (tramite registrazioni con microelettrodi) che la risposta eccitatrice che provocano è identica alla risposta lenta evocata quando si applica la serotonina. Per la maggior parte del tempo la serotonina rilasciata dai nervi contenenti tale sostanza non provoca, come la serotonina applicata dallo sperimentatore, una risposta rapida. Ricorderete che la risposta rapida viene mediata dai recettori 5-HT₃, mentre i recettori 5-HT_{1P} sono responsabili della risposta lenta. Inoltre, gli effetti dei messaggi provenienti dai nervi contenenti serotonina vengo bloccati dal 5-HTP-DP (antagonista del 5-HT_{1P}). Un'ulteriore prova, quindi, che il recettore primario responsabile della capacità della serotonina di agire da neurotrasmettitore enterico non è il 5-HT₃ bensì il 5-HT_{1P}. L'importanza che il ricettore 5-HT₃ ha per l'intestino è a dir poco ingegnosa, ma di questo parleremo più avanti. La neurotrasmissione mediata dai ricettori 5-HT₃, ammesso che avvenga, risulta essere un evento molto difficile da rilevare. Nella migliore delle ipotesi, è rara. Ne consegue pertanto che il recettore 5-HT_{1P} è il più importante sottotipo di recettore della serotonina del sistema nervoso enterico.

Sfortunatamente però, il recettore 5-HT_{1P} è anche uno dei pochi recettori serotoninergici la cui sequenza del codice genetico è tuttora sconosciuta. Ho provato a determinarla, ma le mie conoscenze di biologia molecolare non si sono ancora dimostrate all'altezza del compito. Cinque anni fa, Richard Axel, un mio collega della Columbia, che sta alla biologia molecolare come Beethoven sta alla musica, mi disse di poter donare il DNA che codifica il recettore 5-HT_{1P} in un mese circa. Poi disse anche che a me ci sarebbero voluti circa quattro mesi. Inserii la proposta di donare il recettore in una domanda per assegnazione di fondi presentata ai National Institutes of Health. Alla sezione di studio piacque il resto della mia richiesta in quanto fondata, ma mi fu detto di lasciar perdere la parte relativa alla proposta di determinare la sequenza genetica che codifica il recettore 5-HT_{1P}. Pur avendo completato con successo il corso «donazione dei geni neurali» presso i laboratori di biologia di Cold Spring Harbor (al quale mi iscrissi per evitare di passare come un dinosauro nell'oblio della scienza), la sezione studio non prese in seria considerazione le mie credenziali in biologia molecolare. Non mi lamento di ciò, ma è una vergogna che non sia ancora stato trovato il codice genetico di questo importante recettore.

L'anticorpo dell'anticorpo che scova i recettori della serotonina

Più recentemente, Hadassah Tamir ha prodotto un insolito tipo di anticorpo in grado di riconoscere i recettori della serotonina. Per arrivare a tale anticorpo, Hadassah non poteva limitarsi a utilizzare un approccio diretto, rendendo immune un animale con recettori purificati. Poiché fino a ora sono stati donati e messi in sequenza a livello molecolare più di quindici diversi recettori serotoninergici, purificarli tutti e poi cercare di provare più di quindici anticorpi differenti avrebbe comportato un lavoro immenso da parte di Hadassah. Decise invece di creare un solo anticorpo capace di legarsi praticamente a ogni tipo di recettore di serotonina.

Per creare questa «super-sonda», prima Hadassah immunizzò un coniglio contro la serotonina stessa. (Il processo utilizzato, che prevede che la serotonina venga legata a un vettore proteico, è già stato descritto in un capitolo precedente). Come previsto, il coniglio reagì producendo ottimi anticorpi capaci di scovare la serotonina nei tessuti, ovunque fosse nascosta. Questi anticorpi rappresentavano però solo una fase intermedia del lavoro svolto da Hadassah per ottenere la sonda che effettivamente stava cercando. Prese gli anticorpi della serotonina che il suo coniglio aveva appena prodotto e li utilizzò come antigene per immunizzare un secondo gruppo di conigli. Lo scopo era quello di far sì che il secondo gruppo di conigli producesse anticorpi contro il primo anticorpo. In particolare, voleva un anti-anticorpo che fosse in grado di riconoscere il punto particolare sull'anticorpo della serotonina, che legava serotonina.

In senso molto realistico, il sito in cui l'anticorpo si combina con una molecola come la serotonina funziona come il sito dove si lega il legante di un recettore di serotonina, poiché la serotonina si attacca in modo specifico a ciascuno di essi. Quindi, sia la molecola del recettore serotoninergico sia quella dell'anticorpo contro la serotonina hanno domini che si legano alla serotonina. Solo un numero limitato di strutture molecolari rende possibile il legame con la serotonina. Un anticorpo contro il dominio che si lega alla serotonina è quindi in grado di riconoscere i domini che si legano alla serotonina in molecole molto differenti, incluse quelle dei recettori serotoninergici. Riconoscendo un simile dominio con il giusto anticorpo, è possibile individuarne molti altri. Se create in maniera corretta, tali sonde capaci di riconoscere i recettori vengono dette anticorpi *anti-idiotipici*.

Produrre anticorpi anti-idiotipici è un po' come cercare di trovare a Washington persone che conoscano davvero le ultime notizie. Prima inventi una storia e la pubblichi su Internet. Questo corrisponde grosso modo a creare il primo anticorpo. La storia su Internet viene quindi ripresa e riportata come una notizia trapelata o una voce da parte della cosiddetta stampa ufficiale o responsabile (se non è un ossimoro). E questo corrisponde a creare gli anticorpi anti-idiotipici. La diffusione della voce tra i media fa sì che tutti quelli che al governo sanno realmente come stanno le cose parlino e diffondano la notizia reale. Possiamo paragonarli ai recettori, che si attaccano come la colla alla stampa ufficiale. Hadassah aveva creato un anticorpo anti-idiotipico utilizzando come materiale di partenza gli anticorpi della serotonina, dandoci la possibilità di testare il suo nuovo reagente per dare un primo sguardo ai recettori serotoninergici

dell'intestino.

Quando mi diede il suo anticorpo anti-idiotipico da esaminare, Gary Mawe aveva lasciato il mio laboratorio per trasferirsi nel Vermont e studiare da solo la cistifellea. Anche Terri Branchek se ne era andata, ed era a capo di un gruppo presso una società biotecnica che stava cercando (con notevole successo) di decifrare i codici genetici di tutte le numerose varietà dei recettori serotoninergici. Prima di partire, Gary aveva passato a Paul Wade i microelettrodi del laboratorio. E Paul li utilizzò per inseguire gli anticorpi anti-idiotipici di Hadassah. Paul era un giovanotto dall'aspetto fragile che però si fece subito conoscere come la persona alla quale rivolgersi quando un'apparecchiatura smetteva di funzionare come avrebbe dovuto. Non solo aggiustò ogni cosa, ma configurò anche i computer di tutti. Poco tempo dopo l'arrivo di Paul, mi ritrovai ad appoggiarmi a lui per far sì che il laboratorio funzionasse senza problemi. Lavorava in modo lento e cauto. Era anche molto distratto da una folla di gente che cercava il suo aiuto. Però, quando finalmente emergevano, i suoi dati erano sempre eccellenti. Quando parlava la gente gli dava ascolto.

Paul scoprì che gli anticorpi anti-idiotipici di Hadassah potevano fare cose sorprendenti. Quando ne iniettò alcuni su una cellula nervosa enterica, restò di stucco osservando che l'effetto iniziale degli anticorpi anti-idiotipici era quello di produrre una risposta esattamente identica a quella evocata dalla serotonina. Paul, scettico per natura, in realtà si aspettava che gli anticorpi non facessero nulla o che tutt'al più, se avevano un effetto, producessero una risposta antagonista alla serotonina. Invece scoprì che gli anticorpi anti-idiotipici provocavano una risposta eccitatrice con componenti rapidi e lenti, esattamente come avveniva con la serotonina. Gli altri anticorpi, creati contro molecole irrilevanti, non producevano alcun effetto. Il componente rapido della risposta agli anticorpi anti-idiotipici, così come la risposta rapida alla serotonina, era inibito dal tropisetrone ed era quindi dovuto all'attivazione dei recettori 5-HT₃. Il componente lento era inibito da 5-HTP-DP e quindi era determinato dalla stimolazione dei recettori 5-HT_{1P}.

Pensandoci, non avremmo dovuto restare sorpresi dall'azione degli anticorpi anti-idiotipici. Poiché, esattamente come la serotonina, gli anticorpi anti-idiotipici si attaccano ai domini di legame alla serotonina dei recettori serotoninergici, non esiste motivo in base al quale il legame iniziale degli anticorpi debba colpire i recettori diversamente da come fa la serotonina. Il tropisetrone e il 5-HTP-DP erano capaci di proteggere rispettivamente i recettori 5-HT₃ e 5-HT_{1P} dagli anticorpi anti-idiotipici, perché tali antagonisti occupavano i domini di legame alla serotonina dei recettori impedendo l'accesso agli anticorpi.

L'azione agonista degli anticorpi anti-idiotipici non durò a lungo. L'eccitazione iniziale causata si esaurì molto in fretta, dopo di che morirono per il mondo per ore. Gli anticorpi anti-idiotipici si comportavano nei recettori come gli scarafaggi nei motel: una volta entrati, non lo abbandonano più. Gli anticorpi anti-idiotipici si attaccavano ai recettori della serotonina e non si muovevano più. Non appena i recettori si erano desensibilizzati, l'effetto degli anticorpi anti-idiotipici legati era cambiato da agonista ad antagonista. Inoltre, l'effetto antagonista era essenzialmente irreversibile. Dopo che i recettori avevano legato gli anticorpi anti-idiotipici e si

erano desensibilizzati, le cellule nervose enteriche non solo non rispondevano alla serotonina che Paul gli aveva iniettato, ma non rispondevano neppure stimolando i nervi contenenti serotonina. Quindi, gli anticorpi anti-idiotipici avevano ordinato la squisita specificità del sistema immunitario, a conferma del fatto che la serotonina è sicuramente un neurotrasmettitore enterico.

Avendo dimostrato che gli anticorpi anti-idiotipici si legavano ai recettori serotoninergici del tessuto, Paul si preparò a utilizzarli per localizzare i recettori in preparati esaminabili al microscopio. Trovare gli anticorpi legati non fu un problema. Le tecniche di immunocitochimica erano state studiate proprio per questo tipo di problemi e furono facilmente adattate alla ricerca dei siti cui gli anticorpi anti-idiotipici erano attaccati. Il problema era rappresentato dal fatto che gli anticorpi si legavano a numerosi diversi tipi di recettori serotoninergici. E poi, Paul aveva avuto già troppa fortuna. Se la sua sonda avesse stimolato ogni recettore serotoninergico visibile, in fondo chi era lui per riuscire a identificarli tutti?

La soluzione venne dagli esperimenti fisiologici di Paul. Gli antagonisti avevano protetto sottotipi specifici di recettori serotoninergici dagli anticorpi anti-idiotipici. Paul fu così in grado di usare il tropisetrone e il 5-HTP-DP per trovare i recettori 5-HT₃ e 5-HT_{1p}. I siti che legavano gli anticorpi anti-idiotipici in assenza, ma non in presenza, del tropisetrone erano i recettori 5-HT₃, mentre quelli che legavano gli anticorpi anti-idiotipici in assenza, ma non in presenza, di 5-HTP-DP erano i recettori 5-HT_{1p}. Fu possibile osservare entrambi i recettori solo su nervi e cellule nervose, e quasi tutte le localizzazioni apparvero essere nello stesso posto. La posizione dei recettori 5-HT_{1p} risultò inoltre identica a quella che Terri Branchek aveva già scoperto con l'indagine autoradiografica sui siti che legano la serotonina radioattiva con alta affinità. Eravamo nuovamente di fronte a una localizzazione dei siti di legame dei nervi della mucosa estremamente affascinante.

Un sovraccarico di recettori

I recettori serotoninergici dell'intestino sembravano formiche a un picnic. Prima ne arriva una e poi, prima che tu te ne accorga, ne sei sommerso. Dopo aver imparato ad accettare l'esistenza di due recettori serotoninergici nelle cellule nervose enteriche e di uno sui muscoli, apriamo gli occhi ed erano diventati sette. Il recettore successivo che troviamo fu il 5-HT_{1A}. Anche il 5-HT_{1A}, come i recettori 5-HT_{1P} e 5-HT₃, si trova sui nervi, ma diversamente dagli altri due, questo recettore è inibitore. Poiché alcune cellule nervose enteriche esprimono tutti e tre i recettori, il tracciato elettrico che si ottiene da tali cellule nervose dopo che sono state stimulate con serotonina assomiglia al vecchio «Cyclone», le montagne russe di Coney Island. Prima c'è un picco eccitatorio (il 5-HT₃) poi una discesa inibitoria (il 5-HT_{1A}) e infine una lunga, lenta salita e una discesa ancora più lenta verso l'arrivo (il 5-HT_{1P}).

Dopo il 5-HT_{1A} si unì al gruppo il recettore 5-HT₄. Agli occhi di chi infilava con gli elettrodi le cellule nervose, questo recettore apparve dapprima misterioso e perverso. Erano coscienti della sua presenza, ma per quanti sforzi facessero, era impossibile piantare il microelettrodo nella cellula nervosa e trovarne una che rispondesse alla serotonina in un modo che rendesse plausibile l'azione mediata dal recettore 5-HT₄. Al contrario, quelli che versavano crudelmente serotonina e altri farmaci su segmenti dell'intestino tenue in un bagno termostato, non avevano alcun problema nel trovare i recettori 5-HT₄. Quando stimolarono elettricamente i nervi enterici dell'intestino, scoprirono che l'aggiunta della serotonina causava l'aumento dell'ampiezza di contrazione del muscolo. Studi farmacologici hanno dimostrato che il recettore 5-HT₄ è il responsabile di tale risposta.

I primi farmaci che Joel Bockaert, lo scopritore del recettore 5-HT₄, utilizzò per definirlo erano relativamente non specifici. Per esempio, il farmaco che si dimostrò fondamentale e che rese possibile la prima identificazione del recettore 5-HT₄ fu il tropisetrone, l'antagonista del 5-HT₃, che venne impiegato in una concentrazione almeno dieci volte superiore a quella necessaria per bloccare i recettori 5-HT₃. Oggi il recettore 5-HT₄ è diventato conosciuto. Oggigiorno sono stati sviluppati sia l'agonista sia l'antagonista e il suo codice genetico è stato decifrato. Inoltre, si conosce qual è il comportamento del recettore nell'intestino.

I nervi fanno contrarre il muscolo intestinale rilasciando acetilcolina. Quindi, per potenziare la contrazione del muscolo liscio, i recettori 5-HT₄ aumentano la quantità di acetilcolina che fuoriesce dalle fibre nervose motorie stimulate. Di recente è stato inoltre scoperto che il recettore 5-HT₄ è in grado di aumentare la quantità di acetilcolina che fuoriesce dai nervi che la contengono e che eccitano le cellule nei gangli enterici. Quindi il recettore 5-HT₄ sembra essere confinato alle estremità dei nervi, il che spiega perché non partecipa alla mediazione degli effetti della serotonina sul corpo delle cellule nervose.

Gli altri recettori serotoninergici scoperti nell'intestino vengono detti 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT₇. Un tempo si pensava che i due membri enterici della famiglia 5-HT₂ fossero posizionati solo sul muscolo, ma più di recente si è scoperto che vengono espressi anche dalle cellule

nervose. L'azione del 5-HT₇ è simile a quella del 5-HT_{3A}. Al momento, i recettori serotoninergici noti dell'intestino superano per valore numerico le funzioni conosciute della serotonina. Ovviamente, non abbiamo ancora idea di quale sia la funzione della maggior parte di tali recettori serotoninergici. Una situazione accattivante per uno scienziato come me. C'è ancora molto da imparare, ed è questo il primo motivo che ci ha indotti ad accettare il lavoro.

Edith Bülbring e il riflesso peristaltico

La posizione dei recettori serotoninergici nella mucosa attirava la mia attenzione ogni volta che riuscivamo a individuarla. Un giorno in cui Paul la scovò nuovamente, decisi di cercare di scoprire cosa i recettori serotoninergici stessero facendo nella mucosa. In realtà, pensavo di aver avuto una buona intuizione sul perché nella mucosa ci fossero dei recettori serotoninergici. Anni fa, tra il 1957 e il 1959, Edith Bülbring, la mia sponsor di allora a Oxford, aveva pubblicato una serie di lavori nei quali si suggeriva che la serotonina fosse responsabile dell'avvio del riflesso peristaltico. Forse ricorderete che sono stati questi lavori ad attirarmi a Oxford, per lavorare con Edith. Quando li pubblicò, furono in molti a restare impressionati dai suoi esperimenti, ma poi, come spesso accade, i revisionisti si impossessarono della sua ipotesi e il lavoro di Edith fu in gran parte dimenticato. Ma non da me, ed ecco che improvvisamente fu di nuovo «au courant».

Edith fu la prima a proporre il concetto che le cellule EC della mucosa intestinale potessero funzionare come recettori di pressione. La sua idea era che se si fa pressione su di esse, emettono serotonina. Edith credeva che la serotonina secreta dalle cellule EC fosse responsabile della stimolazione dei neuroni sensitivi intrinseci dell'intestino, che danno il via al riflesso peristaltico. Nel 1965, quando giunsi a Oxford, pensavo che la prova fornita da Edith a sostegno della sua ipotesi fosse schiacciante e assolutamente convincente. Ora posso guardare indietro avvantaggiato da una prospettiva moderna, ma non ho cambiato opinione.

Lavorando con una porzione isolata dell'intestino tenue di un porcellino d'India conservato in un bagno termostato, Edith dimostrò che asfissando o anestetizzando la mucosa, era impossibile evocare il movimento peristaltico. Queste semplici osservazioni dimostrarono quanto l'importanza della mucosa fosse fondamentale per la manifestazione della risposta peristaltica indotta dalla pressione. Edith dimostrò quindi che immettendo la serotonina nel lume del tratto intestinale isolato, essa stimolava il movimento peristaltico, e che la risposta alla serotonina del lume poteva essere bloccata asfissando o anestetizzando la mucosa.

Contrariamente all'effetto prodotto sulla mucosa, Edith scoprì che applicando la serotonina all'esterno dell'intestino, il riflesso peristaltico veniva inibito. Quegli esperimenti stabilirono che la serotonina, che agisce dall'interno, ma non dall'esterno, doveva stimolare qualcosa nella mucosa che scatenava il riflesso peristaltico e che la serotonina aggiunta nel lume non raggiunge gli stessi siti intestinali di quella applicata dall'esterno. Edith andò avanti, dimostrando che la pressione sulla mucosa rilascia serotonina mucosale e che la desensibilizzazione dei recettori serotoninergici dell'intestino, causata da un eccesso di serotonina, aveva un effetto antagonista sul riflesso peristaltico. Infine, le osservazioni anatomiche effettuate con Graeme Schofield, un microscopista australiano, suggerirono che il plesso della sottomucosa contiene neuroni sensitivi intrinseci. Edith suggerì che la serotonina mucosale potesse stimolare queste cellule nervose sensitive e che i nervi sensitivi inviassero il messaggio al plesso mienterico, dal quale derivava il controllo della muscolatura.

Quasi nessuna teoria scientifica valida può essere accettata se non viene sottoposta agli attacchi dei revisionisti che cercano di smentirla. Le idee di Edith furono contestate con esperimenti compiuti su animali sottoposti a una dieta carente di triptofano per periodi relativamente lunghi. Ricordo che quando lessi di questi esperimenti, rimasi inorridito per la crudeltà. Il triptofano è un aminoacido essenziale. Una dieta carente impedisce all'animale di produrre adeguatamente le proteine. Ne consegue che una dieta carente di triptofano ha sull'animale numerosi effetti, tutti negativi. Pensai che gli animali sottoposti alla fine avrebbero sofferto molto, e non c'è nulla che possa giustificarlo. La motivazione logica degli esperimenti era quella di sfruttare il fatto che il triptofano presente nella dieta è l'ultimo precursore della serotonina. La mancanza di triptofano impedisce all'animale di produrre serotonina. Quindi la scorta di serotonina dell'intestino degli animali carenti di triptofano si sarebbe prima o poi esaurita, in quanto essi non erano in grado di rimpiazzarla. I revisionisti pensarono che l'ipotesi di Edith potesse essere testata dalla dieta carente di triptofano, perché nella loro visione semplicistica tale ipotesi implicava che un animale privo di serotonina nell'intestino fosse incapace di manifestare un riflesso peristaltico.

Quando i revisionisti dimostrarono di essere in grado di provocare un riflesso peristaltico nell'intestino di animali carenti di triptofano, Edith rinunciò con grazia. Abbandonò l'ipotesi che la serotonina potesse attivare il riflesso peristaltico enunciando invece che la serotonina poteva essere un «modulatore» non essenziale del riflesso, qualunque cosa ciò volesse significare. Infatti, Edith si arrese quando non avrebbe dovuto farlo e, in realtà, non avrebbe assolutamente dovuto rinunciare. Molte erano le ragioni che potevano motivare l'erroneità dell'attacco dei revisionisti al lavoro di Edith e la crudeltà gratuita sugli animali era sicuramente una di esse.

La dieta carente di triptofano aveva ridotto la concentrazione di serotonina nell'intestino ma non aveva azzerato il livello di serotonina enterica. La serotonina era sempre presente, seppure quantità considerevolmente ridotte. Quando un animale (o un essere umano) non è in grado di produrre proteine degli aminoacidi assunti con il cibo, essi degradano quelle presenti nell'organismo. In pratica gli animali si nutrono di pezzi disponibili per conservare ciò di cui non possono fare a meno. La capacità di riciclare è un concetto scoperto dall'evoluzione e applicato agli animali molto tempo prima che diventasse popolare tra i conservazionisti. La degradazione delle proteine quindi potrebbe avere fornito agli animali la quantità di triptofano appena sufficiente a mantenere un livello minimo di serotonina enterica. Fino a quando nell'intestino vi è una presenza seppur minima di serotonina, essa è in grado di adempiere alla propria funzione. Nessuno sa quanta serotonina sia necessaria per dare inizio ai riflessi peristaltici né se la grande quantità normalmente presente nell'intestino includa una riserva. La carenza di triptofano è un problema molto diffuso nell'America Centrale e in quella del Sud a causa del mais (granoturco), che è la base della dieta delle popolazioni povere di queste zone e che ha un contenuto di triptofano estremamente basso. Le diete povere di triptofano, quindi, hanno quasi sicuramente afflitto non solo i nostri antenati ma anche gli altri mammiferi. In

conseguenza di ciò, l'evoluzione potrebbe avere preparato l'intestino a far fronte a una carenza di triptofano e quindi essere dotato per natura della capacità di frustrare questo tipo di esperimento.

Inoltre, l'ipotesi che la serotonina sia una sostanza che fa scattare il riflesso peristaltico non significa necessariamente che sia l'unica in grado di farlo. Eliminando la possibilità che la serotonina potesse essere una delle molte sostanze reclutate per avviare il riflesso, i revisionisti avevano creato un fantoccio facile da distruggere. Però l'annullamento di una versione semplicistica di un concetto sofisticato non lo invalida. Gli studi con gli animali carenti di triptofano in realtà non furono quantitativi. Furono interpretati partendo dal principio del tutto o niente. Perché la serotonina potesse essere considerata importante, il riflesso avrebbe dovuto scomparire completamente dagli intestini degli animali carenti di triptofano. Dal momento che il riflesso poté essere evocato, sebbene con difficoltà e non in tutti gli animali con carenza in triptofano, fu concluso che la serotonina non era importante. I revisionisti non presero mai in considerazione che la serotonina potesse essere l'inziatore abituale del riflesso peristaltico e che nel caso in cui non potesse svolgere la sua azione, sarebbe intervenuta un'altra sostanza a svolgere il suo compito. Per esempio, in assenza di serotonina, per far scattare il riflesso peristaltico potrebbero essere necessari stimoli più potenti, perché il rilascio della molecola di riserva necessita di un'intensità più elevata. Il corpo umano dispone di numerosissimi meccanismi di sicurezza di questo genere. In effetti, sembrerebbe molto improbabile che l'evoluzione abbia lasciato in eredità un unico mezzo per avviare qualcosa di così fondamentale come il riflesso peristaltico.

Le cellule EC e il riflesso peristaltico rivisitato (ovvero il ritorno dell'Ecclesiaste)

Molti anni dopo la mia partenza da Oxford, mi misi all'opera per provare ancora una volta l'ipotesi di Edith, usando però metodi moderni. Le prime sperimentazioni furono eseguite con la collaborazione di Annette Kirchgessner. Per identificare i neuroni nell'intestino, resi attivi stimolando il campione in numerosi modi, utilizzammo sonde istologiche di nuova generazione. Uno dei metodi applicati fu quello di stabilire il livello di un enzima, la *citocromo-ossidasi*, coinvolto nel soddisfare le necessità energetiche dei neuroni attivi. L'altro, già descritto prima, fu quello di rilevare la trascrizione e la trasduzione del gene *c-fos*, che si attiva con l'attivazione dei neuroni. Applicammo alla mucosa intestinale uno stimolo sufficiente a provocare il riflesso peristaltico. Invece di esaminare il riflesso in sé, osservammo quantitativamente i neuroni che il nostro stimolo aveva attivato.

Ovviamente, come ci aspettavamo, la stimolazione della mucosa determinò l'attivazione dei neuroni sia nel plesso della sottomucosa sia in quello mienterico, esattamente come Edith Bülbring, in base alle proprie conclusioni, aveva previsto che accadesse. Inoltre, quando Annette bloccò la trasmissione sinaptica tra i neuroni nei gangli, ridusse il numero di cellule nervose attivate a un piccolo gruppo del plesso della sottomucosa, molto vicino al sito di applicazione dello stimolo. Una volta bloccata la diffusione da cellula a cellula, lo stimolo venne rilevato solo dalle cellule sensitive intrinseche. Annette aveva così identificato i neuroni sensitivi intrinseci dell'intestino, che si trovavano esattamente nel punto in cui Edith aveva previsto che fossero e cioè nel plesso della sottomucosa. Per la prima volta, avevamo visualizzato i neuroni sensitivi intrinseci dell'intestino.

Annette proseguì applicando uno strumento di cui Edith Bülbring non disponeva: il 5-HTP-DP. Nel fare ciò, sfruttava uno dei numerosi passi avanti nella conoscenza sui recettori serotoninergici che erano stati fatti da quando Edith aveva svolto il suo lavoro. Questa conoscenza fornì a Annette una moltitudine di antagonisti della serotonina di cui Edith non aveva potuto disporre. In particolare, il 5-HTP-DP era stato un regalo di Hadassah Tamir e il suo uso era stato reso interpretabile dalle osservazioni sui recettori del 5-HT_{1P} fatte da Terri Branchek, Miyako Takagi, Gary Mawe e da me. Annette scoprì che applicando lo stimolo alla mucosa, il 5-HTP-DP bloccava completamente l'attivazione dei neuroni enterici. Alcuni anni più tardi, Annette ripeté gli esperimenti, ma questa volta utilizzando sonde fluorescenti ancor più nuove, che le permisero di identificare i neuroni attivati in preparazioni *in vivo*. Poté così confermare ancora una volta che il 5-HTP-DP era un inibitore dell'attivazione dei neuroni sensitivi intrinseci, ma scoprì anche che una stimolazione più intensa attivava i neuroni sensitivi sia nel plesso mienterico sia in quello della sottomucosa. Annette e io concludemmo che la stimolazione della mucosa sicuramente rilasciava serotonina e che questa era responsabile dell'attivazione dei neuroni sensitivi intrinseci. Ancora una volta valeva il principio dell'*Ecclesiaste*. Eppure, ancora una volta, non avevamo scoperto niente di nuovo.

Dopo che io e Annette descrivemmo le sue osservazioni, altri scienziati le confermarono e le ampliarono. Oggigiorno l'esistenza dei neuroni sensitivi intrinseci nel sistema nervoso enterico è un concetto accettato da tutti. John Furness, Joel Bornstein, e Wolf Kunze, un giovane collega che collabora con loro in Australia, hanno scoperto un altro gruppo di neuroni sensitivi intrinseci nel plesso mienterico e stanno dedicando la maggior parte delle loro giornate a studiarli. Wolf Kunze è stato effettivamente in grado di catturare in flagrante dei neuroni sensitivi intrinseci, impalandoli con microelettrodi e registrandone le risposte elettriche a vari stimoli.

Anche Jack Grider, un giovane ricercatore della Virginia (da non confondere con Jack Wood), ha studiato i neuroni sensitivi intrinseci ma lo ha fatto indirettamente, per lo più misurando il rilascio del loro neurotrasmettitore e traendo deduzioni dagli effetti dei farmaci. Gli esperimenti di Jack Grider sono immensamente brillanti. Effettua studi complicati ma i suoi dati sono sempre perfetti e supporta le sue idee con grande precisione. Non trascurava nessuna eventualità e riesce a ridurre al minimo lo scostamento casuale dei valori sperimentali che tormentano il resto di noi. Egli ha confermato che la serotonina viene rilasciata attraverso la stimolazione meccanica della mucosa intestinale, che sicuramente avvia il riflesso peristaltico e che essa lavora stimolando i processi, siti nella mucosa, dei neuroni sensitivi intrinseci della sottomucosa. Tutti quindi sono d'accordo con il principio di base, il che restituisce importanza al lavoro di Edith Bülbiring. Tuttavia sarebbe impossibile immaginare un mondo popolato da ricercatori che non sappiano trovare qualcosa con cui non sono d'accordo. Sfortunatamente questa è un'altra regola della scienza, seguita da tutti quelli di noi che lavorano sull'intestino.

Jack Grider si è trovato in disaccordo con alcune conclusioni alle quali sono giunti John Furness e i suoi colleghi. Jack crede che i neuroni sensitivi intrinseci dell'intestino rispondano solo agli stimoli leggeri sulla mucosa quali quelli usati da Annette e da me, e non alla distensione della parete intestinale, stimolo frequentemente utilizzato dal gruppo di Furness. Egli ha dimostrato che la risposta dell'intestino alla sua distensione scompare tagliando i nervi estrinseci. L'osservazione suggerisce che i nervi sensitivi estrinseci possano mediare le risposte alla distensione, piuttosto che i neuroni sensitivi intrinseci del sistema nervoso enterico (come supposto dagli australiani). Jack quindi postula che l'intestino risponda in due modi agli stimoli sensitivi. La stimolazione della mucosa viene percepita in modo diverso dalla distensione dell'intestino. Potrebbe avere davvero ragione, ma la risposta dell'intestino alla distensione mi sembra un po' accademica. Mi viene da pensare che un simile stimolo accada raramente, se non addirittura mai, nella vita di un essere umano o di un animale che gode di buona salute. Solo un intestino ostruito o infiammato potrebbe distendersi al punto da imitare gli stimoli applicati dai numerosi ricercatori.

Anche io e Jack Grider ci siamo trovati ad avere opinioni differenti. Ovviamente, io sono convinto che lui abbia torto e che i miei dati lo dimostrino. Fondamentalmente, Jack conviene con Annette e con me che la serotonina stimola i neuroni sensitivi ad avviare il riflesso peristaltico. Però non ci troviamo d'accordo con l'identificazione del recettore responsabile. Le

osservazioni di base sono le stesse, ma Jack, che non impala i neuroni, crede che i recettori 5-HT_{1P} e 5-HT₄ siano identici e che siano semplicemente due nomi diversi dati alla stessa molecola.

Jack Grider ha costruito le proprie impressioni sui recettori 5-HT₄ dagli studi che ha fatto sui recettori che egli scoprì su una singola cellula isolata di muscolatura liscia, piuttosto che sui recettori espressi dai nervi. Ha scoperto che il 5-HTP-DP, così come gli antagonisti specifici di 5-HT₄, può inibire le contrazioni delle cellule muscolari stimulate dal recettore 5-HT₄. Poiché Jack non ha direttamente studiato i neuroni, non è rimasto impressionato dalle osservazioni di molti ricercatori, e cioè che è possibile avvolgere letteralmente un neurone enterico nei cristalli di uno qualsiasi degli antagonisti del 5-HT₄ senza che ciò abbia conseguenze sulla risposta lenta (mediata dal 5-HT_{1P}) della serotonina. In effetti, gli antagonisti di 5-HT₄ non influenzano nessuno dei componenti della risposta alla serotonina di nessun neurone enterico. Inoltre, è impossibile mimare la risposta lenta alla serotonina con un antagonista 5-HT₄ o influenzare la grande affinità di legame della serotonina radioattiva con un agonista o un antagonista 5-HT₄. Queste sono tutte caratteristiche del recettore 5-HT_{1P}. Personalmente, ritengo che queste informazioni siano conclusive e che provino che i recettori 5-HT_{1P} e 5-HT₄ sono diversi. E poi, come potrei essere rispettato se non credessi ai miei dati?

I segnali della mucosa

Tutti i consensi circa il ruolo attivatore della serotonina nei confronti dei riflessi peristaltici sono stati molto gratificanti. Mi piacciono molto di più dell'ilarità suscitata dalla mia precedente proposta, e cioè che la serotonina potesse essere un neurotrasmettitore enterico. Inoltre, di recente, la capacità della serotonina di dare inizio ai riflessi peristaltici è un modello che i ricercatori hanno scoperto essere applicabile anche ad altri riflessi. Per esempio, Helen Cooke, presso l'Ohio State, ha scoperto che strofinando la mucosa intestinale si stimola la secrezione della mucosa e che questo fenomeno è un riflesso nervoso che coinvolge la stimolazione dei neuroni sensitivi intrinseci nel plesso della sottomucosa. I neuroni sensitivi inviano il segnale ai neuroni secretomotori e questi a loro volta fanno sì che le cellule delle cripte del rivestimento intestinale secernano cloruro e acqua nel lume intestinale.

Inoltre, Helen scoprì che il riflesso intestinale, esattamente come quello peristaltico, viene bloccato da 5-HTP-DP, e quindi utilizza i recettori di 5-HT_{1P}. Il trasmettitore dei nervi secretomotori è l'acetilcolina o il VIP (ricordate il peptide intestinale vasoattivo?), ma non la serotonina e quindi il 5-HTP-DP non condiziona la capacità dei nervi secretomotori di conversare con le cellule della cripta. Inoltre, il 5-HTP-DP non ha effetti sulla trasmissione sinaptica dei gangli enterici. Ne consegue che il riflesso secretorio viene abolito da 5-HTP-DP perché lo sfregamento della mucosa rilascia serotonina che stimola i recettori 5-HT_{1P} che si trovano sui neuroni sensitivi intrinseci.

Recentemente sono state pubblicate informazioni relative a un gruppo molto importante di esperimenti che integra notevolmente l'importanza dell'azione sulla mucosa della serotonina. L'autore principale del lavoro è David Grundy, un taciturno laureato di Brighton che lavora nelle fuliginose Midlands inglesi. David è una persona insolita, la cui espressione cupa e afflitta cela un raffinato senso umoristico e una passione per il divertimento chiassoso. Ha lavorato per anni presso l'Università di Sheffield, una città conosciuta più per l'arte della coltelleria che per la scienza o l'avanzamento dell'apprendimento. Sfortunatamente, il modo in cui David Grundy è stato valutato dalla propria università fa pensare che Sheffield continuerà a essere nota per la posateria che produce. Attualmente David si sta spostando in Germania, dove la ricerca e il progresso scientifico sono tenuti in grande considerazione. Questa è una direzione dell'immigrazione che non avrei mai ritenuto possibile, ma è una strada che è stata aperta dai tempi della Thatcher e dal suo mancato supporto alla scienza biomedica nel Regno Unito. Una tendenza che comunque neppure Blair ha saputo invertire. Ritengo che l'emigrazione delle menti britanniche verso la Germania sia la dimostrazione che la seconda guerra mondiale è davvero finita.

I nuovi studi di David dimostrano che il rilascio mucosale di serotonina è importante non solo per il segnale che invia all'intestino di iniziare i riflessi peristaltici e secretori ma anche nell'inviare messaggi dall'intestino al cervello. David effettua le registrazioni nelle fibre dei nervi sensitivi dei nervi vaghi, che identifica come vettori del traffico di segnali provenienti

dall'intestino. È in grado di rilevare i messaggi che arrivano dall'intestino, che hanno disturbi elettrici minori, mentre vengono trasportati dai nervi vicino agli elettrodi di rilevamento. Con l'ausilio di sofisticati computer, è in grado di distinguere i segnali emanati dai singoli assoni all'interno di un fascio di nervi. Il lavoro di David indica con chiarezza che la secrezione della serotonina nell'intestino attiva le fibre dei nervi sensitivi dei nervi vaghi e che la serotonina compie tale azione stimolando i recettori 5-HT₃.

Un unico stimolo che determina la secrezione di serotonina da parte delle cellule EC è quindi in grado di inviare due messaggi molto diversi a due destinatari molto diversi, agendo sui nervi che trasportano recettori distinti. I messaggi destinati al consumo enterico interno vengono rilevati dai recettori 5-HT_{1P} mentre quelli indirizzati al cervello sono correlati ai recettori 5-HT₃.

Il paradosso e il beneficio terapeutico del recettore 5-HT₃

Il contenuto di informazioni dei messaggi che l'intestino invia al cervello non è del tutto noto. Tuttavia esso potrebbe includere quel tipo di input che percepiamo inizialmente con un senso di fastidio, quindi di nausea e infine di completo malessere. Questo tipo di segnale probabilmente un tempo aveva una valenza di sopravvivenza e in alcuni casi probabilmente ce l'ha ancora. Un intestino danneggiato dall'infiammazione va sicuramente mantenuto libero dal cibo. Gli animali o gli esseri umani con disturbi intestinali sicuramente non hanno tendenza a mangiare molto. D'altro canto, la medicina moderna ha sviluppato una serie tale di sistemi controproducenti che fanno sì che la serotonina intestinale stimoli i nervi sensoriali estrinseci, da far stare malissimo molti pazienti. La chemioterapia e l'irradiazione utilizzate per curare il cancro sono due esempi. La nausea e il vomito indotti da questi tipi di cura possono essere così gravi da rendere intollerabile il proseguimento della terapia. Durante una riunione della FDA, sentii parlare di una paziente che era stata così male a causa di uno di questi farmaci che quando andava in ospedale per sottoporsi alla terapia cominciava a vomitare non appena entrata nel parcheggio. Naturalmente aveva bisogno che la sua terapia contro il cancro venisse migliorata.

Fortunatamente, è possibile interferire con la capacità dell'intestino di restituire al cervello messaggi di malessere senza interferire con i riflessi secretori o peristaltici. Questo è il bello dell'avere diversi recettori per la serotonina su nervi diversi e, naturalmente, di conoscerli e saperli riconoscere. La somministrazione di un antagonista dei recettori 5-HT₃ a un paziente sottoposto a chemioterapia o irradiazione può bloccare la nausea e permettere di proseguire la cura. Molti di questi farmaci, come l'*ondansetron* e il *granisetron*, hanno superato con successo la sperimentazione clinica e il loro uso è stato approvato dalla FDA. Gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ sono sicuri, perché i recettori 5-HT₃ non fanno nulla di fondamentale nel regolare la normale motilità o l'attività secretoria dell'intestino.

Di recente sono stati sviluppati antagonisti dei recettori 5-HT₃ nuovi e più potenti, come l'*alosetron*, ed è in corso la sperimentazione clinica per il trattamento delle alterazioni funzionali dell'intestino, in particolar modo nella sua forma più comune, la sindrome dell'intestino irritabile (IBS). In un animale o in un essere umano, gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ non sembrano esercitare effetti importanti sulla normale motilità intestinale. Come abbiamo appena visto, alcuni pazienti affetti da cancro li hanno assunti per diversi anni, per combattere la nausea di cui avrebbero sofferto durante la cura, senza subire effetti collaterali gastrointestinali limitanti. Gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ sono abbastanza sicuri. Al contrario, i recettori 5-HT₃ possono avere un ruolo in forme sofisticate o abnormi di motilità gastrointestinale non ben capite, e possono facilitare la percezione del dolore intestinale. Se ciò avviene, allora gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ possono esercitare azioni difficili da documentare quando tutto è normale, ma che possono ciononostante essere di beneficio quando è palese l'anomalia dell'intestino, per esempio nei pazienti affetti da IBS. Da alcuni lavori svolti sugli animali, è possibile giustificare l'opinione secondo cui i recettori 5-HT₃ partecipano

alla motilità intestinale, anche se il loro ruolo esatto non è facile da definire.

La mia esperienza personale con gli antagonisti dei recettori 5-HT₃ illustra la complessità di questi farmaci. Ovviamente, avevo scoperto che bloccano la risposta rapida alla serotonina esogena quando la serotonina è spruzzata in un neurone enterico. Però non avevo mai visto un nervo enterico contenente serotonina provocare una risposta rapida, né che tale effetto venisse modificato da un antagonista del recettore 5-HT₃. Come abbiamo già visto, si tratta in un certo senso di un paradosso, spiegabile presupponendo che non vi siano recettori 5-HT₃ sotto i terminali dei nervi contenenti serotonina che stimoliamo. Questo spiega le nostre osservazioni ma solleva l'interessante questione del perché l'intestino avrebbe dovuto preoccuparsi di sviluppare i recettori 5-HT₃ solo per metterli dove la serotonina non è in grado di raggiungerli. L'evoluzione (o il Padreterno, se preferite) è un tipo pratico. Penso che possiamo scartare la possibilità che i recettori 5-HT₃ presenti sui neuroni enterici siano lì per sport o per bellezza. La mia ipotesi di lavoro è quindi che vi siano nervi contenenti serotonina che non abbiamo ancora stimolato ed effetti mediati dalla serotonina che non abbiamo ancora incontrato.

Jim Galligan, uno scienziato che lavora alla Michigan State University, ha scoperto alcune risposte alla stimolazione dei nervi che probabilmente sono effetti del recettore 5-HT₃ ma non ne ha trovato un numero sufficiente, che gli permettesse di effettuare uno studio adeguato. Il lavoro di David Grundy ha stabilito che i recettori 5-HT₃ hanno un ruolo fondamentale nell'inviare segnali al cervello, magari di dolore enterico, ma quei recettori 5-HT₃ sono situati sulle fibre nervose sensitive estrinseche. La questione inspiegabile è cosa facciano i recettori 5-HT₃ sulle cellule nervose intrinseche e se disattivarle sia la cosa giusta da fare in una persona affetta da malattie intestinali funzionali.

Per indagare gli effetti potenziali dei recettori che non ero in grado di trovare utilizzando i metodi elettrofisiologici, inizialmente ripetei il tipo di ricerca che le case farmaceutiche svolgono per caratterizzare i propri composti.

Applicai cioè la serotonina e la bloccai con un antagonista del recettore 5-HT₃. Non che dubitassi di quanto letto nella letteratura ma volevo vedere con i miei occhi quello che gran parte del mondo farmacologico osservava. Questo tipo di esperimento mi lasciò con la stessa impressione che gli scienziati delle case farmaceutiche hanno sugli antagonisti del recettore 5-HT₃; sono agenti potenti che spazzano letteralmente via gli effetti enterici della serotonina esogena. Al contrario, quando smisi di guardare la serotonina *esogena* versata da una bottiglia su un segmento di intestino appeso in un bagno per organi e passai a osservare la serotonina *endogena* mentre era al lavoro, innescando i riflessi e agendo come neurotrasmettitore, mi sembrò che gli antagonisti del recettore 5-HT₃ non facessero nulla. Ed eccomi di nuovo di fronte al paradosso. Mi resi conto che dovevamo analizzare più in dettaglio il riflesso peristaltico.

Un «colon meccanico»

Alcuni anni fa, Paul Wade e io ideammo una piccola e semplice preparazione ottenuta dalla parte terminale del colon di un porcellino d'India che ci avrebbe permesso di valutare il riflesso peristaltico in questa regione dell'intestino. Quando, come noi a quel tempo, ci si interessa di colon irritabile, questa sembrerebbe la parte giusta dell'intestino da usare per effettuare degli studi. Quando le feci della cavia raggiungono la parte terminale del colon, il materiale fecale si è concentrato in pallottoline sferiche molto dure, non diverse dalle feci di una persona affetta da grave costipazione. Paul isolò la parte terminale del colon del porcellino d'India conservandolo in bagno per organi e lasciandogli il tempo necessario per liberarsi dalle pallottoline fecali in qualunque modo volesse. Inserì quindi una pallottolina fecale artificiale, ottenuta con della plastica (e, tocco da maestro, di color marrone) nell'estremità aperta del colon. La pallottolina venne trasportata dall'attività della muscolatura intestinale allo sfintere anale, dove venne espulsa. Paul recuperò quindi la pallottolina e la riciclò, infilandola nuovamente dall'estremità iniziale della porzione di intestino. Non appena l'intestino percepì il reinserimento della pallottolina, la trasportò nuovamente verso lo sfintere anale dove venne nuovamente espulsa. Quello che lasciava stupefatti del trasporto della pallottolina fecale lungo il tratto intestinale isolato era la sua assoluta affidabilità. Le pallottoline si muovevano a una velocità assolutamente costante, che restò la stessa durante prove successive, ripetute per ore e ore. La preparazione mi fece venire in mente una piccola macchina in un dipinto di Fernand Léger, un equivalente biologico dell'industrializzazione, il «colon meccanico».

Nel caratterizzare la modalità di funzionamento del colon isolato, Paul scopri che il trasporto di pallottoline lungo l'intestino era mediato dai nervi; tale trasporto quindi si arrestò immediatamente quando paralizzò con la tetrodotossina i nervi nell'intestino. Paul fu anche in grado di fermare il movimento della pallottolina, aggiungendo 5-HTP-DP, specialmente quando inserì nel lume l'antagonista del recettore 5-HT_{1P}. Sulla base di questi e di altri esperimenti, arrivò alla conclusione che una pallottolina artificiale si sposta lungo l'intestino perché esercita una pressione sul suo rivestimento; la pressione che la pallottolina esercitava sulle cellule EC provocava il rilascio di serotonina, la serotonina secreta dalle cellule EC stimolava i recettori 5-HT_{1P} sui nervi sensitivi intrinseci, e tali nervi evocavano il riflesso peristaltico che trasportava le pallottoline fecali artificiali. In pratica ci eravamo creati il nostro piccolo riflesso peristaltico. Astenendoci dall'utilizzare una nomenclatura eccessivamente scientifica, chiamammo la preparazione IVD o in *vitro dump*, ovvero, scarica in provetta.

Dopo aver preparato l'IVD, fummo raggiunti da Makoto Kadowaki, uno scienziato della Fujisawa, una società farmaceutica giapponese. Makoto venne per imparare a impalare e registrare i neuroni enterici usando i microelettrodi, ma non poté resistere alla tentazione di fare esperimenti utilizzando la preparazione IVD. È stupefacente osservare la pallottolina che viene trasportata lungo il colon terminale. La casa farmaceutica Fujisawa aveva prodotto un farmaco dal quale conoscevamo solo un codice numerico, che si riteneva un antagonista combinato dei

recettori 5-HT₃ e 5-HT₄. La società pensava che il farmaco avrebbe dato risultati fenomenali nella cura dell'IBS e si diceva che a tale proposito in Giappone fosse in corso la sperimentazione clinica. Per saperne di più sul farmaco, la Fujisawa mi assunse per studiarlo.

Makoto applicò tre diversi antagonisti specifici del 5-HT₃ al colon isolato della cavia e scopri con stupore che nessuno di essi influenzava in alcun modo il trasporto della pallottolina fecale artificiale. La pallottolina non rallentava né andava più veloce. Non succedeva proprio nulla. Allora Makoto fece lo stesso con tre diversi antagonisti del 5-HT₄, ottenendo esattamente lo stesso risultato. Nulla modificò la velocità del movimento della pallottolina. Infine, quando Makoto aggiunse il composto della Fujisawa e somministrò insieme un antagonista del 5-HT₃ e del 5-HT₄, la pallottolina rimase lì, stecchita lungo il suo percorso. Lavando via i farmaci, la pallottolina riprese la sua strada lungo il tratto intestinale.

Il lavoro di Makoto suggerì che i recettori sia 5-HT₃ sia 5-HT₄ partecipano alla motilità intestinale, ma che uno può sofferire alla perdita dell'altro. Pensammo che i recettori intestinali potessero essere disposti nello stesso modo in cui le lampadine sono collegate in un'abitazione. Usando una definizione tecnica, le lampadine sono collegate in parallelo anziché in serie. Questo significa che la corrente non deve attraversare una lampadina per raggiungere quella successiva. Se le lampadine invece fossero collegate in serie, l'intero circuito sarebbe interrotto e ogni lampadina della casa si spegnerebbe non appena ne svitiamo una. Ugualmente, se i recettori 5-HT₃ e 5-HT₄ dell'intestino fossero inseriti in serie nel circuito che media il riflesso peristaltico, allora questo verrebbe bloccato opponendo indifferentemente un antagonista al recettore 5-HT₃ o al 5-HT₄. Poiché non accadde nulla fino a quando inibimmo contemporaneamente entrambi i recettori, i circuiti dovevano essere in parallelo, uno con un recettore 5-HT₃ critico e un altro con un recettore 5-HT₄ critico. Mettete fuori gioco un circuito e vedrete che l'altro basta. Per abolire il riflesso peristaltico, è necessario eliminare contemporaneamente entrambi i circuiti.

Makoto aveva così dimostrato che sia i recettori 5-HT₃ sia quelli 5-HT₄ partecipano sicuramente alla motilità intestinale riflessa, ma doveva fare ancora qualche passo prima di renderlo noto. Il potenziale per uso terapeutico di questo tipo di effetto è che bloccando sia il recettore 5-HT₃ sia il 5-HT₄ si potrebbe ridurre l'irritabilità intestinale in quei pazienti dove è eccessiva. Concettualmente, l'aumento di motilità (o, in alcuni pazienti, la spasticità intestinale) avviene a causa dell'attività che viaggia in uno dei circuiti ridondanti. Eliminare ciò potrebbe avere effetti molto benefici. Poiché i recettori 5-HT₃ e 5-HT₄ sono coinvolti in circuiti paralleli, nulla di devastante potrà accadere inibendone uno. Al contrario, isolandoli entrambi o somministrando una dose bloccante di antagonista del 5-HT_{1P} si eliminerebbe sicuramente in modo completo il riflesso peristaltico. Una simile forma terapeutica sarebbe un controproducente trattamento eccessivo, anche nel caso dell'IBS in cui la diarrea è predominante.

Alla base dell'interesse che le case farmaceutiche stanno avendo nei confronti degli antagonisti del 5-HT₃ e, più recentemente, del 5-HT₄, c'è un principio morale. Chi ha la possibilità di fare qualcosa per le malattie funzionali dell'intestino ha iniziato a considerare seriamente la possibilità che i problemi che alcuni pazienti hanno con l'intestino non sono altro

che problemi *nell'intestino*. L'opinione semplicistica secondo la quale queste persone non dovrebbero fare altro che imparare a pensare normalmente per far sparire le proprie difficoltà intestinali, si sta trasformando nel desiderio di trovare una cura che funzioni davvero. Le società farmaceutiche hanno una tolleranza limitata nei confronti di teorie che non producono farmaci sicuri ed efficaci. Il mercato potenziale, rappresentato da milioni di persone con disturbi funzionali dell'intestino che necessitano di cure è una realtà che vedono con grande chiarezza. Vedono anche i continui insuccessi del «miglioramento psicologico» e dei tranquillanti che agiscono sul corso della malattia intestinale funzionale. Quindi stanno facendo ciò che è logico fare. Poiché cercare di aggiustare il cervello nella testa non ha funzionato, adesso stanno pensando di aggiustare quello nell'intestino. Inoltre, mentre assistiamo a nuovi sviluppi nella comprensione del sistema nervoso enterico, le case farmaceutiche ne stanno traendo vantaggio, svolgendo un ruolo dominante grazie alla capacità di creare nuovi composti inediti e interessanti.

Probabilmente gli antagonisti del 5-HT₃ e del 5-HT₄ sono la punta dell'iceberg. Sono i farmaci visibili del presente. Al di sotto abbiamo un gruppo molto più ampio di composti, rappresentato dai farmaci sviluppati per modificare l'umore. Poiché al momento dello sviluppo di questi farmaci nessuno ha preso in considerazione il sistema nervoso enterico, le azioni gastrointestinali che essi provocano sono sempre state una brutta sorpresa. Ma adesso che l'industria farmaceutica ha scoperto che esiste un secondo cervello, possono osservare nuovamente l'elenco di sorprese gastrointestinali e cercare di riconvertirne qualcuna da brutta a buona (ovvero, che sia efficace contro le alterazioni funzionali dell'intestino). Dopo tutto, se è possibile trarre profitto dall'alterare l'umore del cervello nella testa con i farmaci, forse vale la pena fare lo stesso per il cervello nell'intestino.

Spegniamo le luci

Se la serotonina, come ormai i dati di tutti sembrano indicare, è un'importante molecola di segnale della mucosa intestinale che avvia i riflessi enterici intrinseci e invia messaggi al cervello, il corpo deve avere un modo per spegnere la serotonina che ha fatto il lavoro. Come abbiamo già visto, la serotonina nel sistema nervoso enterico e centrale viene neutralizzata dalla ricaptazione da parte dei nervi che la contengono e che la rilasciano. Questo meccanismo è il sogno di tutti i conservazionisti. Non smaltimento frenetico, ma riciclaggio. Il meccanismo funziona molto bene nei gangli del sistema nervoso enterico che ha molte fibre nervose contenenti serotonina. E infatti è il processo che consente ai nervi che contengono serotonina di essere identificati con la radioautografia, in tessuti incubati con serotonina radioattiva. Nella mucosa intestinale però non vi sono fibre nervose che contengano serotonina. I nervi sensitivi, intrinseci ed estrinseci, sono condizionati dalla serotonina perché contengono recettori serotoninergici, ma non la assorbono. Cominciai pertanto a preoccuparmi per aver abbracciato le ipotesi di Edith Bülbring e mi misi all'opera per cercare di trovare un meccanismo in grado di inattivare la serotonina rilasciata nella mucosa.

Mentre mi preoccupavo di inibire la serotonina nella mucosa, Beth Hoffman, presso i National Institutes of Health e Randy Blakely, allora presso l'Università di Emory a Atlanta (oggi è a Vanderbilt), indipendentemente fra loro, donarono e definirono la sequenza genetica del trasportatore di serotonina, la molecola nella membrana plasmatica delle cellule nervose contenenti serotonina, che è l'effettiva responsabile della ricaptazione della serotonina. Il trasportatore di serotonina è una molecola estremamente importante perché è il cardine nell'inibizione della serotonina. È anche l'obiettivo dei più efficaci composti antidepressivi mai ideati, che la rende il numero uno tra le molte molecole del cervello che subiscono un attacco farmacologico. La sostanza più famosa tra i farmaci che inibiscono il trasportatore di serotonina è il Prozac (fluoxetina) il primo di una serie di *inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina*, o SSRI, approvato dalla FDA per uso terapeutico.

Poiché la ricaptazione è il meccanismo per mezzo del quale i nervi inibiscono l'azione della serotonina, ne consegue che questi nervi, una volta bloccata la ricaptazione, non saranno in grado di inibire molto bene la serotonina. L'effetto iniziale del mancato blocco dell'inibizione della serotonina è il potenziamento dell'azione del neurotrasmettitore. Le risposte alla stimolazione di neuroni contenenti serotonina assumono maggior ampiezza e durano più a lungo.

All'inizio, gli effetti compensatori derivanti che seguono l'azione degli SSRI sono molto complicati. Una cura prolungata con SSRI porta alla desensibilizzazione di alcuni recettori serotoninergici che non rispondono più, mentre altri diventano semplicemente meno sensibili alla stimolazione con serotonina. Inoltre, i neuroni nei soggetti trattati con SSRI possono arrivare a produrre meno serotonina. A causa di tutte queste complicanze, che possiamo ritenere nel complesso come diversi tipi di deregolazione, nessuno sa ancora esattamente perché gli

SSRI, incluso il Prozac, abbiano un effetto antidepressivo. Probabilmente la loro azione aumenta l'efficacia della serotonina del cervello ma possono comunque agire anche diminuendo la sua efficacia (con la deregolazione). Tuttavia resta molto difficile ed estremamente confuso definire come gli SSRI riescano ad avere un effetto antidepressivo. In ogni caso, la loro efficacia nel procurare sollievo resta imbattuta.

Se da un lato gli effetti degli SSRI tirano su il morale e procurano sensazioni meravigliose, dall'altro la loro azione sull'intestino può essere veramente negativa. Quando una persona inizia ad assumerli, quasi sicuramente gli SSRI causano nausea e persino vomito. Il disturbo intestinale che provocano può arrivare fino alla diarrea e infine alla costipazione. Sembra che gli SSRI facciano dapprima contorcere, poi ribollire e infine congelare il povero intestino. Con un po' di fortuna, se un paziente resiste, può aspettare che passi la tempesta intestinale causata dagli SSRI per poi continuare e osservare la depressione che se ne va. Altri hanno difficoltà a superare gli «effetti collaterali» gastrointestinali degli SSRI che in effetti sono un «risvolto deprimente» che l'assunzione di antidepressivi comporta. Molta attenzione è stata però data dai chimici, senza particolare successo, nel provare a separare gli «effetti collaterali» gastrointestinali da quelli «diretti» antidepressivi degli SSRI.

Gli infelici «effetti collaterali» gastrointestinali degli SSRI non sono rari e possono interrompere, limitare o ritardare la cura di circa il 25% dei pazienti che li assumono. Il frequente manifestarsi di tali «effetti collaterali» mi ha suggerito che il trasportatore di serotonina possa fare «qualcosa» di molto importante per l'intestino e che gli «effetti collaterali» gastrointestinali del Prozac e degli altri SSRI possono essere dovuti alla loro interferenza con qualunque cosa quel «qualcosa» sia. In altre parole, «effetti collaterali» potrebbe essere una designazione erronea. Forse negli effetti gastrointestinali degli SSRI non vi è nulla di «collaterale». Le brutte cose che avvengono nell'intestino di una persona che assume questi composti potrebbero tranquillamente essere dovute a effetti diretti (l'inibizione della captazione della serotonina gastrointestinale). Se così fosse, sarebbe allarmante per i fabbricanti di SSRI, che preferirebbero dire addio agli effetti gastrointestinali. Però la consapevolezza dell'inutilità dei tentativi di disfarsi dell'azione gastrointestinale degli SSRI almeno farebbe risparmiare al settore molto denaro, perché lo sforzo di separare l'antidepressivo dagli effetti gastrointestinali verrebbe abbandonato. Fare ipotesi è divertente, ma ovviamente dovevo fare un po' di ricerca per scoprire quale fosse l'azione del trasportatore di serotonina nei confronti dell'intestino. Sospettivo che facendo ciò avrei potuto imparare qualcosa di interessante sul modo in cui la serotonina viene inibita nella mucosa.

Randy Blakely e Beth Hoffman furono entrambi abbastanza gentili da inviarmi le sonde molecolari da utilizzare per cercare il trasportatore di serotonina nell'intestino. Il nostro primo interesse era quello di capire se la stessa molecola viene espressa nel cervello e nell'intestino. Le sonde, che ci permisero di rilevare l'RNA messaggero che codificava il trasportatore di serotonina, rivelarono che questo messaggio è presente nell'apparato gastrointestinale e che tale messaggio è assolutamente identico a quello nel cervello. Il problema successivo fu quello di

scoprire quali cellule dell'intestino esprimono il trasportatore di serotonina. Ci aspettavamo di trovarle nei neuroni contenenti serotonina del plesso mienterico, ma se era tutto ciò che avremmo scoperto, le informazioni non ci avrebbero detto nulla su come il segnale della serotonina viene «spento» nella mucosa intestinale.

Per trovare le cellule contenenti l'RNA messaggero per sintetizzare il trasportatore di serotonina, utilizzammo una tecnica chiamata *ibridazione in situ*. Per utilizzare questa tecnica, dapprima si preparano sezioni o porzioni intere di tessuto come se dovessero essere colorate o esaminate con un anticorpo marcato. Anziché applicare al tessuto una colorazione o un anticorpo, si applica una sonda DNA o RNA marcata con isotopi radioattivi, complementari dell'RNA messaggero nelle cellule. Ognuna delle quattro basi che formano il codice genetico ha una base complementare alla quale si lega. Il risultato è che i filamenti complementari di DNA e/o di RNA di attaccano tra di loro. Quest'azione viene chiamata *ibridazione*. Per esempio, la trascrizione del DNA implica la produzione di un filamento complementare di RNA. L'RNA complementare si legherà (ibriderà con) il DNA corrispondente.

La sonda marcata con DNA o RNA può ibridare sia l'RNA sia il DNA estratto dalle cellule che si fisserà in modo irreversibile andando a formare sul materiale di supporto quello che viene detto *blot* (macchia). Un blot contenente DNA viene detto *Southern blot*, mentre quello contenente RNA viene detto *Northern blot*. I *Western blot* sono analoghi alle controparti *Southern* e *Northern* ma al posto del DNA o dell'RNA contengono proteine e vengono sondati con anticorpi.

L'ibridazione *in situ* è una procedura basata su un principio simile a quello dei Northern o Southern blot. La differenza sta nel fatto che le sonde vengono applicate direttamente alle cellule o a parti di cellule, anziché ai blot sul materiale di supporto. Avevamo utilizzato i Northern blot per scoprire che le trascrizioni dell'RNA che codifica il trasportatore della serotonina sono presenti nell'intestino. A questo punto avremmo utilizzato l'ibridazione *in situ* per vedere dove venivano fabbricate le trascrizioni.

Paul Wade stava lavorando con me al progetto, ma aveva bisogno di aiuto. Era un istologo acuto e un campione nell'impalare le cellule, ma era del tutto nuovo per la biologia molecolare. Mi ricordava una storia attribuita a David Tucker, il figlio del grande tenore Richard Tucker. David era uno studente di medicina. Si dice che Richard Tucker, quando gli fu chiesto di dire quali fossero le potenzialità di David come vocalista, consigliò al figlio di concentrarsi sugli studi di medicina. Se Paul non fosse stato in grado di ottenere aiuto da un vero biologo molecolare, gli avrei consigliato di limitarsi a usare i microelettrodi. Ma, come successe, la vita non è poi così male, e l'aiuto era lì a portata di mano.

L'aiuto fu il risultato di un'amicizia che avevo stretto con un Elvin Kabat, un collega della Columbia. Elvin era stato una delle figure veramente importanti dell'immunologia e adesso si stava preparando ad andare in pensione. Per un colpo di fortuna, stavo cercando una persona preparata in immunologia e biologia molecolare esattamente nel momento in cui Elvin stava cercando di trovare un laboratorio adatto per Jingxian Chen, uno scienziato che aveva studiato

con lui e che adesso aveva bisogno di fare un passo avanti. Elvin mi chiamò, dicendo che Jingxian era bravo e mi raccomandò di assumerlo. Poiché mi fido di Elvin come del mio rabbino, lo feci immediatamente. Elvin aveva ragione. Jingxian è un uomo di grande talento e oggi è diventato un grande amico e un collaboratore di importanza vitale. Paul e Jingxian cominciarono a collaborare e quest'ultimo portò nel laboratorio quell'esperienza in biologia molecolare che mancava a Paul.

Paul e Jingxian lavorarono con i ratti perché le sonde ricevute da Randy Blakely e Beth Hoffman erano sonde da ratti che non ibridavano bene con l'RNA dei porcellini d'India. Restarono sorpresi quando utilizzarono l'ibridazione *in situ* per cercare le cellule intestinali responsabili della produzione della serotonina. L'RNA che codificava il trasportatore della serotonina era indubbiamente presente, non solo nei neuroni mienterici, dove ci si aspettava di trovarlo, ma anche nelle cellule che rivestivano le cripte intestinali.

Randy Blakely ci aveva mandato un anticorpo per il trasportatore della serotonina di ratto che aveva preparato lui stesso. L'anticorpo era importante perché avevamo bisogno di sapere se le cellule del rivestimento, che non producono serotonina, traducono effettivamente il messaggio che contengono, provvedendo così alla produzione del trasportatore di serotonina. Gli studi immunocitochimici sugli anticorpi rivelarono presto che le cellule che rivestono le cripte sicuramente traducono il messaggio ed esprimono la proteina. Sorprendentemente, furono anche in grado di dimostrare che le particolari cellule del rivestimento che esprimono il trasportatore di serotonina non sono le cellule EC, che producono serotonina, ma le loro vicine.

Gli esperimenti con la serotonina radioattiva dimostrarono che il trasportatore di serotonina è in tutto e per tutto funzionale nelle cellule che rivestono le cripte intestinali così come lo è nei neuroni del cervello e dell'intestino. Come era prevedibile, l'espressione del trasportatore di serotonina dota le cellule del rivestimento intestinale della capacità di assorbire la serotonina. Inoltre, quando Paul e Jingxian passarono a esaminare in dettaglio la captazione di serotonina da parte delle cellule di rivestimento, scoprirono che le loro proprietà sono identiche in tutto e per tutto a quelle manifestate dai neuroni. La caratteristica più importante di questa identità è che la captazione di serotonina da parte delle cellule che rivestono le cripte intestinali viene bloccata dall'azione del Prozac e dagli altri SSRI.

La capacità degli SSRI di bloccare la captazione di serotonina da parte delle cellule del rivestimento intestinale mi suggerì due ipotesi veramente interessanti. Una era che la captazione di serotonina da parte delle cellule che rivestono le cripte intestinali potesse davvero essere il meccanismo tramite il quale la serotonina della mucosa è inattivata. L'altra era che gli effetti gastrointestinali indesiderati degli SSRI potessero avvenire perché questi farmaci interferiscono con il modo in cui la mucosa inibisce la serotonina. Potevamo verificare entrambe le ipotesi. Tuttavia, un piccolo problema per effettuare tali esami era rappresentato dal fatto che tutte le informazioni fisiologiche sulla serotonina e sul suo ruolo di molecola di segnale della mucosa erano state ottenute studiando i porcellini d'India, mentre le sonde per il trasportatore di serotonina di cui disponevamo riconoscevano solo le molecole nei ratti. Potevamo scegliere tra

ri fare un paio di decenni di fisiologia dei ratti oppure riuscire a ottenere una sonda che potesse essere utile sulle cavie, il che implicava donare e determinare la sequenza del trasportatore di serotonina delle cavie. Secondo Jingxian la scelta era una sola.

Gli ci vollero solo alcuni mesi per riuscire a donare e determinare la sequenza del trasportatore di serotonina dei porcellini d'India. Il suo lavoro rivelò che la differenza molecolare tra il trasportatore di serotonina delle cavie e quello di ratti, topi ed esseri umani è minima. L'evoluzione è stata abbastanza conservatrice nel conformare tale molecola. E, cosa ancor più importante dal nostro punto di vista, Jingxian adesso aveva una sonda che poteva essere utilizzata per trovare il trasportatore di serotonina dei porcellini d'India. La questione principale era se lo avremmo ritrovato nelle cellule che rivestono l'intestino. In effetti, era lì. A questo proposito, il rivestimento intestinale delle cavie superava addirittura quello del ratto. Il trasportatore di serotonina dei porcellini d'India non è confinato nelle cellule delle cripte così come avviene nei ratti. Nel porcellino d'India, il trasportatore di serotonina viene espresso dalle cellule del rivestimento intestinale, dal fondo delle cripte fino alla punta dei villi. Poiché avevamo visto che il trasportatore di serotonina era presente nel rivestimento dell'intestino del porcellino d'India, potevamo iniziare a indagare il suo ruolo di segnale con la serotonina.

Somministrare Prozac all'intestino

Portammo avanti due tipi di esperimenti. Nel primo, Paul Wade studiò gli effetti del Prozac sul riflesso peristaltico nella parte terminale del colon. Utilizzammo la preparazione isolata (IVD) da lui ideata per questo scopo. All'inizio, il Prozac aumentava la velocità di trasporto della pallottolina fecale lungo il tratto isolato di colon. Nessun altro farmaco provato da Paul fu in grado di produrre questo effetto. Tuttavia, aumentando la concentrazione di Prozac, la pallottolina rallentava fino a fermarsi. Quando la pallottolina era ferma, l'intestino rispondeva ancora all'acetilcolina e alla stimolazione elettrica. Aveva perso solo la capacità di rispondere alla serotonina. Ciò che evidentemente era successo era che bloccando l'inattivazione della serotonina (che di norma avviene tramite l'assorbimento della serotonina nelle cellule del rivestimento intestinale) il Prozac aveva dapprima potenziato l'azione della serotonina. L'intestino non riusciva a impedire che la serotonina fosse secreta e quindi l'effetto stimolatorio della mucosa da parte della pallottolina era superiore rispetto all'effetto presente prima della somministrazione del Prozac. I recettori serotoninergici però alla fine si erano trovati immersi in più serotonina di quella che potevano gestire. Questo li aveva desensibilizzati, ponendo fine alla responsività dell'intestino alla serotonina, ma solo a essa. Altri stimoli potevano comunque far sì che l'intestino si muovesse. L'intestino non era paralizzato, ma in assenza della sua capacità di reagire alla serotonina, non era possibile provocare il riflesso peristaltico. Desensibilizzando i recettori serotoninergici, il Prozac aveva avuto lo stesso effetto di un antagonista della serotonina.

Il secondo tipo di esperimento è stato eseguito di recente da Jingxian e Hui Pan, che si è unita al mio laboratorio alcuni anni fa, come ricercatrice postdottorato. Hui è un medico cinese, costretta dalle circostanze a diventare scienziato. La sua laurea in medicina non ha alcun valore negli Stati Uniti e quindi Hui ha imparato a infilare con gli elettrodi i neuroni enterici alla Michigan State University con Jim Galligan. Fortunatamente è dotata di buona volontà e le cellule sono state gentili con lei.

Hui si occupò di impalare i neuroni della sottomucosa con un microelettrodo e a registrare elettricamente le risposte alla stimolazione della mucosa. Applicando pressione alla mucosa, i neuroni della sottomucosa avevano risposto.

Però la loro risposta fu bloccata dal 5-HTP-DP. Il sito di azione del 5-HTP-DP fu trovato nella mucosa e non nei neuroni della sottomucosa. Quindi, la risposta della sottomucosa che Hui studiava doveva dipendere dalla stimolazione dei nervi nella mucosa da parte della serotonina endogena. Inoltre, quando Hui aggiunse il Prozac, scopri che l'ampiezza del segnale che passava dalla mucosa alle cellule che trafiggeva, era aumentata. L'osservazione dimostrò che il trasportatore di serotonina della mucosa è effettivamente importante nell'attivazione della serotonina. La risposta potenziata rilevata da Hui avveniva perché un numero superiore di fibre nervose sensitive veniva attivato quando la mucosa era stimolata dalla presenza del Prozac.

Hui continuò per confermare i dati che aveva ottenuto da un singolo neurone utilizzando un

sonda fluorescente che viene captata dai neuroni quando diventano attivi. Strofinò delicatamente la mucosa su un lato di una preparazione aperta di intestino e confrontò il numero di neuroni della sottomucosa che si attivavano sul lato strofinato con quello dei neuroni che erano diventati attivi sul lato opposto. Il confronto ovviamente dimostrò che il lato sfregato aveva vinto. Sul lato di controllo quasi nessun neurone era stato attivato, mentre sul lato sfregato ve ne erano molti. Le osservazioni veramente interessanti avvennero quando Hui ripeté l'esperimento in presenza del Prozac. Ancora una volta, sul lato di controllo il numero di neuroni attivati era pressoché nullo mentre quello che si era attivato sul lato sfregato era da *otto a dieci volte superiore* rispetto al numero di neuroni attivati in assenza di Prozac. Quindi il Prozac non eccita i neuroni da solo (il lato di controllo lo ha dimostrato), ma potenzia enormemente i segnali inviati dalla serotonina della mucosa.

Tutti i dati ottenuti da Paul, Jingxian e Hui suggeriscono indubbiamente che l'espressione del trasportatore di serotonina da parte delle cellule che rivestono l'intestino è il mezzo di inibizione della serotonina nella mucosa. Sulla base di questo lavoro e di precedenti studi riconducibili a quelli effettuati da Edith Bülbring, la nostra attuale ipotesi è la seguente: le cellule EC secernono la serotonina quando sono stimulate dalla pressione o da altre perturbazioni. La serotonina stimola i neuroni sensitivi intrinseci a iniziare il riflesso. Dopo che la serotonina ha svolto il suo lavoro, le cellule vicine del rivestimento intestinale esprimono il trasportatore di serotonina, captano la serotonina e quindi abbassano la concentrazione di serotonina intorno ai recettori serotoninergici. Questo offre loro il tempo di respirare, parlare e recuperare. Quindi i recettori non si desensibilizzano e sono in grado di rispondere alla serotonina quando essa viene nuovamente rilasciata.

Quando il Prozac o un altro SSRI entra in scena, la pressione o gli altri stimoli si interrompono e rilasciano serotonina, che quindi continua a stimolare i recettori sui nervi sensitivi. Ora, però il trasportatore di serotonina viene inibito e le cellule del rivestimento intestinale non sono in grado di assorbire serotonina. Il risultato è che la serotonina resta in contatto con i recettori per periodi più lunghi e si allontana ancor di più dalla sua fonte. Quindi un maggior numero di nervi sensitivi rispondono ampliando così l'effetto della stimolazione della mucosa. La serotonina però non dà tregua ai recettori. Infatti la serotonina che entra in contatto con loro non viene rimossa abbastanza velocemente. I recettori quindi vengono desensibilizzati. Quando questo avviene l'intestino perde la sua capacità di rispondere alla serotonina e con questa anche la capacità di rispondere agli stimoli percepiti dal meccanismo dipendente dalla serotonina.

La nostra ipotesi attuale può spiegare gli effetti dannosi che gli SSRI hanno a livello gastrointestinale. Potremmo spiegare la nausea inizialmente provocata dalla somministrazione di questi farmaci come il risultato del potenziamento dell'azione della serotonina sui recettori 5-HT₃ espressi dai nervi sensitivi estrinseci. Questo primo effetto degli SSRI scompare poi, nonostante il farmaco continui a essere somministrato, perché i recettori 5-HT₃ si desensibilizzano con relativa velocità. La diarrea può essere spiegata dal potenziamento

dell'inizio del riflesso peristaltico mediato dal 5-HT_{1P} (e possibilmente anche dal 5-HT₄). La velocità della motilità aumenta. Potenziare l'azione della serotonina come neurotrasmettitore eccitatorio nell'ambito del sistema nervoso enterico può inoltre contribuire a tale effetto. Infine, quando tutti i recettori serotoninergici sono stati desensibilizzati, sopravviene la stipsi. In conclusione, i problemi degli SSRI possono essere superati quando subentrano meccanismi compensatori, che comunque restano ancora sconosciuti. Questa spiegazione deve ancora essere confermata ma è una buona ipotesi di lavoro.

Un nuovo giocatore entra in campo

Molti anni fa, quando i cavalli tiravano ancora il carretto del latte in giro per le città per soddisfare le esigenze di una generazione del passato di neonati e di chi prendeva il caffè macchiato, il grande scienziato spagnolo Ramón y Cajal, lo stesso neuroanatomista che, come detto prima, utilizzava le colorazioni argentiche, si prese una vacanza dal ruolo di padre della neuroscienza e passò all'intestino. Naturalmente, nel fare ciò, utilizzò tecniche simili a quelle precedentemente applicate con successo all'esplorazione del cervello. (Non aggiustarlo se non si è rotto). Le sue colorazioni argentiche, oggi antiche e vetuste, ma allora assolutamente innovative, funzionavano per motivi che Cajal non comprese mai e che a tutt'oggi non sono ancora stati adeguatamente spiegati. Molte delle colorazioni di Cajal in realtà erano state ideate dal suo arcirivale, Camillo Golgi, ma Cajal non si vergognava di utilizzare tutto ciò che era di pubblico dominio.

Applicate al cervello, le colorazioni di Cajal avevano rivelato i singoli neuroni in tutta la loro gloria e completezza. Però, se applicate all'intestino, tali colorazioni rivelavano una fantastica rete di cellule dalla forma strana che non assomigliavano a nessun'altra cellula di quelle viste da lui o da altri ricercatori. I disegni di Cajal che riproducevano ciò che aveva visto, all'occhio dell'osservatore moderno sembrano un giardino di corallo visto dalla maschera di un subacqueo. Dai lati di ogni cellula fiorivano aculei e orli spigolosi. Non si vede nulla dell'interno della cellula perché le sue colorazioni facevano precipitare il metallo sulla superficie delle cellule, rivelando solo la forma del profilo. Nei suoi disegni non fece altro che colorare di nero l'interno delle cellule. Nei disegni, sembra che ogni cellula tocchi l'altra alle estremità con una delicatezza tale da far sembrare che osassero solo entrare in contatto con l'esitante estremità di un'altra cellula. Sembra che queste cellule dalla forma così strana circondino i gangli del plesso mienterico e riempiano i vuoti che altrimenti ci sarebbero tra nervi e muscolatura. A causa della loro posizione, Cajal ipotizzò che le cellule rivelate dalle colorazioni potessero essere intermediari che inviavano istruzioni dai nervi alla muscolatura dell'intestino. Dopo i suoi studi, la posizione delle cellule scoperte negli interstizi dell'intestino, e Cajal stesso, vennero ricordati nel loro nome, le *cellule interstiziali di Cajal*.

Ritengo che l'attribuzione di tali cellule a Cajal, che non fu mai dimenticato ogni volta che qualcuno faceva riferimento alle cellule interstiziali, possa essere stata un po' ironica. Per molti anni i successori di Cajal non presero queste cellule in seria considerazione. Se fossero state scoperte da qualcuno di meno illustre di Cajal, sarebbero sicuramente finite nella pattumiera della storia, come l'hula-hoop o le camicie inamidate. Però chi cercava di attaccare le osservazioni di Cajal non aveva molto futuro. Quelli che ci provarono se ne pentirono amaramente. Cajal aveva avuto modo di vedere quello che avrebbe dovuto essere impossibile vedere con le tecniche che aveva usato e per interpretare correttamente ciò che aveva osservato.

Fino al 1982, il numero di persone che era convinto che le cellule interstiziali di Cajal fossero una realtà era molto esiguo. La maggior parte delle persone riteneva che questa volta lo

scienziato avesse finalmente fatto fiasco. Essi credevano che le sue colorazioni non fossero mai state progettate per funzionare con un organo come l'intestino, che è pieno di tessuto connettivo. Inoltre, nessuno aveva mai sentito parlare di un'altra cellula in grado di separare un nervo dal suo effettore. Quindi le cellule interstiziali non erano necessarie. I miei insegnanti mi dissero che probabilmente le cellule interstiziali erano un'invenzione, immagini colorate di tessuto connettivo o di cellule muscolari create dalla cattiva applicazione di una tecnica a un organo in cui non poteva essere utilizzata in modo corretto. Però, si trattava di Cajal e le cellule continuarono a essere ricordate, ma la nomenclatura le attribuiva a Cajal, come se nessun altro le volesse. Le cellule interstiziali non ispiravano fiducia e quindi erano le sue, come in un altro contesto l'acquisto dell'Alaska era stata una follia di Seward. La similitudine è appropriata. La follia di Cajal di aver identificato le cellule interstiziali era dello stesso ordine di grandezza dell'acquisto dell'Alaska da parte di Seward.

Nel 1982, Lars Thuneberg, un anatomista scandinavo, pubblicò un riesame delle cellule interstiziali di Cajal che divenne un classico. Thuneberg aveva il vantaggio della microscopia elettronica, che rivelò che le cellule che Cajal aveva visto erano in effetti abbastanza reali e posizionate esattamente dove Cajal le aveva viste. Thuneberg è un astuto osservatore, e per lui era ovvio che nell'intestino siano presenti cellule il cui aspetto è molto diverso da quelle del tessuto connettivo, della muscolatura o dei nervi. Quindi non c'era alcun dubbio nella mente di Thuneberg (né nel suo manoscritto) che Cajal avesse riconosciuto un nuovo tipo di cellula, presente solo nell'intestino. Inoltre, egli osservò che le cellule interstiziali di Cajal formano particolari giunzioni con le normali cellule muscolari lisce vicine. Azzardò l'ipotesi, motivata da tali giunzioni, che le cellule interstiziali di Cajal agissero come un pacemaker che stabilisce il ritmo elettrico lento, che caratterizza gli strati del muscolo liscio dell'intestino.

Dopo che il lavoro di Thuneberg divenne noto, le cellule interstiziali di Cajal acquistarono rispettabilità presso la comunità scientifica. Non si pensò più di rinnegarle e furono restituite a Cajal. La lunga denominazione fu ridotta alle iniziali ICC. Divenne familiare, oscurando Cajal, ma chi la utilizzava poteva così dimostrare di essere un conoscitore aggiornato. Thuneberg continuò a dimostrare l'esistenza delle ICC con metodi diversi, accumulando conferme su un lavoro che era ormai ben accettato. Però un altro ricercatore aveva messo insieme un gruppo che stava facendo studi estremamente originali, che alla fine dimostrarono che le ipotesi di Thuneberg, e prima di lui di Cajal, erano corrette.

Quando Kenton Sanders si presenta alla conferenza scientifica togliendosi vistosamente i guanti da golf per farsi notare, chiunque non lo conosca potrebbe sospettare come si guadagna da vivere. Kent è il direttore del Dipartimento di Fisiologia dell'Università del Nevada a Reno. Pur essendo uno scienziato, un educatore e un amministratore, Kent sembra il Rhett Butler di Reno che recita senza Scarlett O'Hara. Ha un aspetto da divo del cinema, con quei capelli sempre così incredibilmente a posto. Non come i miei, che sembrano sempre una zazzera cha ha bisogno di vedere il parrucchiere. I capelli di Kent invece sembrano dei soldati teutonici, non un solo filo che rompa le righe e vada fuori posto.

Ma l'apparenza spesso inganna. Non c'è nulla di istrionico in Kent Sanders quando tratta affari, e i suoi affari hanno a che fare con le ICC. Questo settore è stato reso perverso dalle continue dichiarazioni e rivendicazioni di gente che cerca di stabilire una priorità. Partendo dal punto che le ICC sono state scoperte da Cajal (e portano per l'appunto il nome del suo scopritore), non ho mai capito i sentimenti di odio che i loro studiosi nutrono l'uno verso l'altro. Nessuno di loro ha una priorità. Tutti litigano sulle briciole lasciate da Cajal e ciononostante continuano a combattere. Gli appellativi con i quali si apostrofano sono veramente meravigliosi e vanno da termini irripetibili a espressioni quali il «Principe delle tenebre».

Kent non è un attore, non si abbassa davanti a nessuno e i suoi dati sono davvero reali.

Ha studiato le onde elettriche lente che vengono prodotte nella muscolatura intestinale, nel tentativo di localizzare le cellule pacemaker. Per la sua ricerca ha messo insieme un potente gruppo di ricercatori, tra cui Sean Ward, uno scienziato irlandese con i piedi per terra, che parla con un accento così marcato che solitamente capisco una parola su tre di quelle che dice. Fortunatamente Sean parla anche con le mani e con gli occhi e cerca di non vedere il mio sguardo smarrito di incomprendimento durante le nostre conversazioni. L'approccio utilizzato da Sean e da Kent fu di tagliare via progressivamente gli strati di muscolatura, fino a lasciare solo le cellule pacemaker da sole. Più si avvicinavano allo strato di intestino che contiene le ICC, più il segnale del ritmo diventava forte e quando fu raggiunto lo strato specifico, questo era composto principalmente da ICC. Tagliando via le ICC, le cellule muscolari restanti persero le onde lente. Sean e Kent avevano così prodotto una prova, consistente ma non conclusiva, che le ICC svolgono la funzione di segnare il ritmo (pacemaker).

Dopo aver fatto queste osservazioni, la fortuna di Kent aumentò. Gli capitò di fare un viaggio in Giappone, dove senti parlare del lavoro di un folto gruppo di ricercatori giapponesi (H. Maeda, A. Yamagata, S. Nishikawa, K. Yoshinaga, S. Kobayashi, K. Nishi, K. e S.-I. Nishikawa) che avevano provato degli anticorpi su un recettore che nessuno fino ad allora aveva ancora associato all'intestino. Il recettore, detto Kit (e codificato dal gene detto *c-kit*) era noto per la sua importanza fondamentale nello sviluppo delle cellule pigmentate (*melanociti*), delle *cellule germinali* (nelle gonadi) e delle *cellule staminali* che danno origine a varie cellule sanguigne. Di recente è stato dimostrato che il Kit viene espresso nell'intestino, intorno ai gangli, ma ciò che di nuovo era stato fatto dai ricercatori in Giappone era iniettare gli anticorpi del Kit nei topi. Gli anticorpi si dimostrarono letali per gli animali. I loro intestini si riempirono e si dilatarono, come se la motilità dell'intestino fosse stata fermata. Sottoponendo i topi ad autopsia, era evidente che le loro ICC erano state distrutte dagli anticorpi.

Kent fu fortunato a trovarsi in Giappone in quel momento e il gruppo giapponese fu altrettanto fortunato ad averlo lì. Egli fu in grado di fornire quei consigli determinanti di cui avevano bisogno gli scienziati giapponesi, instaurando così una collaborazione internazionale di lunga durata. Kent, Sean e i giapponesi stabilirono presto che il Kit è il marker delle ICC e che è fondamentale per lo sviluppo di queste cellule. Inoltre, gli anticorpi del Kit posso essere

utilizzati per caratterizzare, con un dettaglio istologico straordinario, la rete delle ICC. Le fotografie delle preparazioni colorate immunocitochimicamente con gli anticorpi fluorescenti del Kit assomigliano a brillanti versioni in technicolor dei disegni di Ramón y Cajal.

I topi proliferano velocemente e spesso così velocemente che i loro geni mutano con una certa frequenza. Tali mutazioni alterano i geni, formando così espressioni naturali altrimenti difficili da duplicare in modo artificiale. Il Jackson Laboratory di Bar Harbor colleziona topi mutanti e ne conserva un archivio. Esiste un catalogo molto esauriente. Sfolgiando le pagine di questo catalogo, si possono trovare esperimenti favolosi. La banca dei topi è una grande risorsa. Nel catalogo del Jackson Laboratory sono disponibili topi sia con mutazioni del *c-kit* sia con mutazioni del gene che codifica il fattore Steel, la molecola che stimola il recettore Kit.

Quando la mutazione lascia i topi privi di Kit, gli effetti sono così letali che è impossibile effettuare uno studio dell'intestino. I topi devono sopravvivere abbastanza a lungo da sviluppare motilità intestinale prima di poter dire se la motilità viene influenzata dal gene mutato. Pertanto i topi privi di Kit non rivelano nulla di interessante sul ruolo del Kit o delle ICC nello sviluppo delle cellule pacemaker dell'intestino. Il catalogo Jackson contiene anche mutazioni più deboli del *c-kit*, che sono state molto utili. I topi con tali mutazioni più deboli producono una forma difettosa di Kit che non segnala in modo normale, ma che permette agli animali di sopravvivere. I topi mutanti sono sterili, anemici, ricoperti di macchie e presentano difetti nelle cellule germinali, staminali e pigmentate. Ward, Sanders e i loro collaboratori giapponesi furono il primo gruppo che scoprì che gli intestini dei topi con mutazioni del *c-kit* relativamente deboli contengono anche una rete frammentata di ICC e un intestino carente di onde intestinali lente. Più tardi, l'effetto di tali mutazioni fu riportato da Thuneberg e da un suo collaboratore canadese, Jan Huizinga. Effetti simili sono visibili nei topi con mutazioni del gene che codifica il fattore Steel. Queste osservazioni confermano che le ICC non solo esprimono il Kit, ma che, per svilupparsi normalmente, hanno bisogno che il Kit che esprimono venga stimolato dal fattore Steel. Se la mutazione mette fuori gioco il Kit o i suoi leganti, allora la rete delle ICC diventa carente. In assenza di tale rete, le cellule della muscolatura lasciano perdere le onde lente. Quindi le ICC sono sicuramente i pacemaker.

Non molto tempo fa, i dati ottenuti da Sean Ward hanno suggerito che le ICC siano molto di più che dei semplici pacemaker per la muscolatura. Sembra che ricevano anche messaggi dai nervi e che li trasmettano alla muscolatura, esattamente come aveva proposto Cajal. Infatti, quando si tratta del neurotrasmettitore inibitore che determina il rilassamento del muscolo, le ICC sembrano agire da amplificatori e non solo trasmettono il messaggio dai nervi, ma lo rendono anche più forte.

In effetti, una delle molecole più importanti che i nervi utilizzano per determinare il rilassamento della muscolatura intestinale è un gas, l'ossido nitrico. Utilizzare un gas per questo scopo è molto difficile perché i neuroni non sono in grado di immagazzinarlo e trattenerlo per utilizzarlo quando è necessario. I nervi non sono palloncini o serbatoi che possono essere riempiti con gas in pressione. Inoltre, le cellule della muscolatura non se ne

stanno ferme, come un paziente sulla sedia del dentista, alle quali il nervo possa mettere una maschera per somministrare il gas. I nervi devono pertanto produrre l'ossido nitrico fresco ogni volta che questo deve essere inviato. E quando ciò avviene, l'ossido nitrico si diffonde segnalando alle ICC di imitarli e di produrne di più. Anche altri neurotrasmettitori come il VIP possono stimolare le ICC affinché formino e rilascino ossido nitrico. Tutto questo gas rilasciato intorno alla muscolatura liscia, come i segnali elettrici delle ICC, passa sulle cellule della muscolatura e aiuta a portare la massa muscolare sotto il controllo inibitorio. Quando i neuroni decidono che è ora che la muscolatura si rilassi, allora i nervi e le loro assistenti, le ICC, si assicurano che ciò accada.

Un buon modello che aiuta a comprendere come avviene il controllo della muscolatura liscia dell'intestino è un gregge di pecore. Come le pecore, gli strati del muscolo liscio restano uniti ma possono comunque muoversi per proprio conto. Però, per il bene del gregge, i movimenti vengono indirizzati meglio da una gentile forza di controllo che prende per loro le decisioni. Per la pecora, la forza di controllo è rappresentata dal pastore, che decide i movimenti del gregge e indirizza il gruppo. Se il gregge è grande, per tenere in ordine le pecore il pastore ha bisogno di aiuto. A questo scopo si potrebbero usare più pastori, ma dal punto di vista economico è più vantaggioso ridurre il personale al minimo e usare i cani da pastore. Il pastore emette gli ordini ai cani che passano il messaggio alle pecore e le tengono insieme. L'effetto del messaggio proveniente dal pastore viene sia trasmesso alle pecore sia amplificato, man mano che i cani passano parola. Nell'intestino, le cellule della muscolatura liscia sono come il gregge, i neuroni sono il pastore e le ICC sono i cani da pastore. I neuroni prendono le grandi decisioni che determinano le azioni finali degli strati della muscolatura intestinale, le ICC ricevono il messaggio e lo amplificano aiutando a mantenere sotto controllo la massa muscolare. Per l'evoluzione, è stato probabilmente più economico ideare una cellula intermedia (che può moltiplicarsi ed essere sostituita) che avesse il ruolo di cane da pastore enterico anziché aumentare il numero dei neuroni che sono insostituibili.

L'apprezzamento dell'importanza delle ICC per l'intestino risale al 1992, quando fu pubblicato l'effetto degli anticorpi del Kit. Gli studi sugli effetti delle mutazioni del Kit comparvero nel 1995 mentre i dati che suggeriscono che fungano da intermediari nel trasmettere i messaggi dal nervo alla muscolatura sono appena emersi. Tuttavia si sa poco a proposito delle malattie causate dai difetti della rete ICC, ma presto ne sapremo di più. Il ruolo delle ICC nella patogenesi di molti tipi di malattie intestinali è un argomento oggetto di molti studi presso numerosi laboratori. Tra le possibili condizioni collegate ad anomalie delle ICC vi sono sicuramente le varie forme di pseudo-ostruzione, dove l'intestino si comporta come quello dei topi ai quali vengono iniettati gli anticorpi del Kit. A volte l'intestino smette di funzionare anche quando i neuroni sono presenti e la muscolatura liscia appare normale. Una situazione ovvia, nella quale esaminare le ICC. Ma non c'è nessuna ragione per credere che non ci saranno altri problemi più sofisticati in cui intervengano anche le ICC.

Trovare malattie che insorgono a causa di difetti delle ICC non le renderà curabili solo perché

la loro eziologia è nota. D'altro canto, le ICC non sono neuroni che, se distrutti, sono persi per sempre. È giusto pensare che possa essere trovato un mezzo per ripristinare le ICC danneggiate o perse durante una malattia, magari attraverso la stimolazione del Kit. Come sempre accade in medicina, l'avanzamento del progresso porta con sé nuovi approcci alle malattie e nuove speranze di cura.

Vedere il futuro vuol dire invidiare i giovani

Il progresso derivante dalla recente concentrazione di un gran numero di «primi cervelli» sul secondo cervello è stato davvero entusiasmante. Ho visto il sistema risorgere come la fenice dalle sue ceneri. Ho lavorato al secondo cervello quando farlo significava addentrarsi in un campo solitario tanto quanto una scena di un dipinto di Edward Hopper. Ci stavo ancora lavorando quando all'improvviso ci furono abbastanza lettori da poter pubblicare un «Journal of Neurogastroenterology». Ho visto nascere una nuova scienza, perché un vecchio e arcaico sistema è stato riscoperto nell'era moderna. Adesso è un momento eccezionale per lavorare al sistema nervoso enterico.

Abbiamo appena cominciato a capire come funziona il sistema nervoso enterico per controllare il comportamento dell'intestino e degli organi annessi.

La semplicità di ciò che mi fece iniziare era affascinante, tuttavia sono cosciente della complessità del materiale che resta da scoprire. È un piacere avere la possibilità di insegnare a dei «neofiti» come studiare il secondo cervello. So che i problemi scientifici che attendono la loro attenzione e che andranno a investigare arricchiranno le loro vite almeno tanto quanto il sistema nervoso enterico ha arricchito la mia. Stiamo per fare grandi passi avanti. Stiamo per imparare come fa l'intestino a sapere quando miscelare e quando muoversi, come il cervello e il sistema nervoso enterico coordinano le rispettive azioni e qual è il significato di tutti i messaggi che entrambi i sistemi si scambiano in continuazione. Saremo in grado di fornire ai medici farmaci sicuri ed efficaci, capaci di calmare un colon irritabile, di ridare regolarità a quelli che l'hanno persa o di lenire un esofago che causa bruciori. Impareremo come indurre il secondo cervello a cooperare con il grande sistema immunitario dell'intestino per migliorare la resistenza alle infezioni e persino a controllare una malattia intestinale infiammatoria. Ma la cosa migliore è che ridaremo il sorriso e la sicurezza a tutti quei milioni di persone vittime delle alterazioni intestinali funzionali. Tutte queste cose, che vorrei così tanto vedere, stanno per succedere. Me lo sento nella pancia.

10. Gli immigrati e il colon dei quartieri bassi

Quando ero molto piccolo, ero solito annoiare mia madre chiedendole continuamente da dove ero arrivato. Il problema che mi tormentava da bambino non era cosa facesse la gente per iniziare la formazione di un nuovo essere umano, bensì come avvenisse la produzione di un essere umano (in particolare io) una volta avviato il processo. Le espressioni primitive che utilizzavo a quei tempi non riuscivano a trasmettere a mia madre il vero significato delle mie domande. Quello che volevo non era una semplice lezione sul sesso, i cui dettagli mi avrebbero colpito come una storia bizzarra e incredibile narrata giusto per chiudermi la bocca, ma una lezione sullo sviluppo dell'embrione e del feto. Naturalmente, poiché la domanda resta uno dei grandi quesiti irrisolti della biologia, non mi rendevo conto che non poteva ottenere risposta. Fino a non molto tempo fa, l'approccio dello sviluppo poteva essere solo descrittivo ma non meccanicistico. La cronologia degli eventi che si susseguono dal momento in cui l'ovulo viene fecondato al giorno della nascita è stata definita con grande precisione. Ma perché tali eventi accadano è un'altra questione. Quello che succede è noto da molto tempo. Mentre quello che fa succedere tutto viene effettivamente studiato solo adesso.

Il problema che si pone davanti a chiunque cerchi di spiegare lo sviluppo è semplice da descrivere. Ogni cellula del corpo possiede la stessa serie di geni e quindi tutte le cellule lavorano utilizzando le stesse matrici. Nessuna cellula possiede istruzioni genetiche non reperibili nelle altre cellule. Ciononostante, è possibile interpretare questo unico progetto per produrre miriadi di tipi di cellule. Questo avviene perché le singole cellule non seguono l'intero elenco di istruzioni (l'intero genoma) presente nel loro nucleo. Alcuni geni vengono attivati (*espressi*) mentre altri vengono disattivati (*repressi*). La conformazione di ciascuna cellula specifica viene quindi definita dal particolare sottogruppo di geni che la cellula esprime. Ne consegue che lo sviluppo è un processo complesso e improbabile che stabilisce quali geni attivare per ogni cellula del corpo, quali disattivare e quando e in che ordine disporre gli interruttori genetici. Per capire lo sviluppo è quindi necessario conoscere come l'espressione dei geni viene controllata in modo differente nelle varie cellule, nei tessuti e negli organi del corpo. Non c'è da stupirsi quindi che mia madre non abbia trovato risposta alla mia domanda. La risposta non è un gioco da bambini.

Molti anni più tardi, all'inizio della mia carriera scientifica, ero di nuovo pronto a chiedere da dove arrivasse qualcosa. Questa volta, il contesto della domanda era un progetto per ottenere da un intestino in via di sviluppo delle informazioni che non era facile ottenere da ricerche su un intestino adulto.

Il mio vecchio sponsor, Edith Bülbring, e Grame Campbell, la sua vecchia bestia nera, avevano, ognuno per proprio conto, scoperto la presenza di nervi inibitori intrinseci nell'intestino. Questi nervi sembravano non essere simpatici pur esercitando un effetto, il rilassamento intestinale, molto simile a quello risultante dalla stimolazione dei nervi simpatici. Geoffrey Burnstock, il capo di Graeme, un ricercatore inglese che allora lavorava in quello che lui considerava un auto-esilio (in Australia), aveva suggerito che i nervi inibitori intrinseci non contenessero né norepinefrina né acetilcolina. Di fatto, partendo in modo radicato da un giudizio comunemente accettato, Geoff suggerì che il trasmettitore inibitorio utilizzato da questi nervi fosse l'ATP, la stessa molecola che le cellule utilizzano anche internamente per ottenere l'energia di cui hanno bisogno per costringere le reazioni chimiche a correre in salita. Il suggerimento di Geoff fu salutato dalla comunità scientifica con tutto l'entusiasmo che aveva usato per dare il benvenuto alla mia precedente proposta che la serotonina fosse un neurotrasmettitore enterico. Per Geoff, così come per me, due neurotrasmettitori (l'acetilcolina e la norepinefrina) si facevano compagnia, ma tre (apparentemente qualsiasi terzo trasmettitore) erano una folla.

Ritengo che Geoff abbia sofferto ancor più di me delle battute e delle frecciate offensive dei colleghi. Ma ebbe modo di tirarsi su di morale perché alla fine dimostrò di aver ragione, sia sul fatto che i nervi inibitori intrinseci non fossero simpatici, sia sul fatto che l'ATP è un neurotrasmettitore. Geoff oggi è il grande vecchio del sistema nervoso autonomo ed è stato in grado di ritornare in Inghilterra da vincitore, ma il suo cammino verso il riconoscimento fu tutt'altro che facile.

Avendo iniziato la sua carriera come pugile professionista nell'East London, Geoff non parla con l'accento di Oxford. Sfortunatamente in Inghilterra esistono alcuni circoli dove la parola e le buone maniere (l'educazione) sono più importanti della sostanza. Questi circoli non trattarono con particolare gentilezza Geoff e le sue idee radicali e quando si tratta di snobbare, queste persone sono i campioni del mondo. Alla fine Geoff fu snobbato finché si trasferì in Australia e quando ritornò fu solo per diventare professore di anatomia all'University College di Londra, una delle cattedre più prestigiose del paese.¹

Il pensiero che mi attirò verso lo sviluppo della questione fu la possibilità che i nervi intrinseci potessero differenziarsi nell'intestino del feto prima della crescita dei nervi estrinseci. Sapevo che i neuroni simpatici sono tutti posizionati a una certa distanza dalla parete dell'intestino. Quindi dovevano succedere molte cose prima che le fibre simpatiche potessero entrare nel tratto intestinale. Per esempio, le cellule nervose simpatiche dovevano nascere, formare i gangli e mandar fuori gli assoni. Gli assoni simpatici dovevano poi trovare l'intestino e invaderlo. Mi aspettavo che tutti questi eventi richiedessero del tempo. Quindi pensai che potessimo essere in grado di approfittare di un breve periodo durante lo sviluppo, quando nell'intestino probabilmente non c'erano ancora i nervi simpatici. Il trucco stava nello stabilire se a questo punto le cellule nervose intrinseche fossero in grado di indurre il rilassamento della

muscolatura del feto.

Presentai le mie idee sulla possibilità di utilizzare lo sviluppo come strumento sperimentale a una studentessa che stava preparando il dottorato di ricerca, Elizabeth (Tiz) Thompson, che si dimostrò ansiosa di sperimentarle. Tiz era incredibilmente intelligente, ma spesso si lasciava prendere dalla depressione. Voleva essere una scienziata ma non voleva rinunciare a diventare madre. Secondo lei erano due obiettivi irrevocabilmente in conflitto tra di loro. Al giorno d'oggi è difficile immaginare un tempo in cui ci si aspettava che una donna abbandonasse la propria carriera per badare ai figli non appena nascevano. Però Tiz era stata educata a credere che il laboratorio non fosse posto per una donna, concetto contro il quale lottai a lungo. Per questo non lavorò in modo uniforme o ininterrotto al progetto, ma lavorò bene comunque. Alla fine terminò la ricerca, scrisse una bella tesi, prese il suo dottorato e mi portò fuori a cena da Lutece per celebrare.

Tiz si predispose a stabilire quale fosse il primo momento dello sviluppo durante il quale la muscolatura liscia dell'intestino primitivo del topo e del coniglio acquisiva la capacità di muoversi e quando questo muscolo potesse essere guidato da nervi enterici stimolati elettricamente. Lo studio implicava una grande delicatezza e uno strumento incredibilmente sensibile che permettesse di rilevare le contrazioni della muscolatura primitiva. Quando la muscolatura liscia fetale si stirava per la prima volta, lo fa con delicatezza. Per registrare la forza delle contrazioni muscolari usammo una microbilancia capace di misurare i milionesimi di grammi. Fummo gratificati dallo scoprire che sia il movimento spontaneo della muscolatura sia la sua sollecitazione da parte dei nervi avvengono nel primo periodo di vita del feto. Inoltre, le fibre nervose primitive erano in grado sia di eccitare la muscolatura liscia e farla contrarre sia, fatto ancor più importante dal nostro punto di vista, di inibire la muscolatura liscia e farla rilassare.

Tiz scopri ben presto che i nervi che eccitavano la muscolatura liscia utilizzavano come neurotrasmettitore l'acetilcolina, ma era anche chiaro che i nervi che inibivano il muscolo non potevano aver usato un neurotrasmettitore simpatico, la norepinefrina. Infatti, questi nervi inibitori rilassavano l'intestino fetale ancor prima che l'apparato intestinale contenesse o fosse in grado di produrre norepinefrina; inoltre, gli studi istologici confermarono che quando i nervi facevano prima rilassare l'intestino, i nervi simpatici non erano ancora entrati nel tratto intestinale. Poiché l'intestino del feto era rilassato quando non disponeva di nervi simpatici, era chiaro che questi non potessero essere responsabili del rilassamento. Tiz non arrivò a identificare i neurotrasmettitori inibitori (che ora sappiamo essere in varie sedi l'ATP, l'ossido nitrico e il VIP) ma il suo lavoro fu molto importante perché riuscì a stabilire in modo definitivo che l'intestino contiene veramente nervi inibitori intrinseci che non utilizzano l'acetilcolina o la norepinefrina come neurotrasmettitore. Tiz ci aiutò quindi a seppellire il vecchio concetto che esistono solo due neurotrasmettitori periferici e fornì una chiara conferma della maggior parte delle ipotesi avanzate da Geoffrey Burnstock.

Da quando il lavoro di Tiz è stato pubblicato, Geoff mi adora.

I critici avevano torto

Avevo appena finito di supervisionare la ricerca di Tiz Thompson quando mi accorsi che lo sviluppo poteva essere ugualmente utile per mettere alla prova le mie stesse ipotesi e cioè che la serotonina è un neurotrasmettitore dell'intestino. Forse ricordate che Marcello Costa e John Furness avevano dubitato dell'importanza della mia osservazione, ovvero che la serotonina radioattiva veniva prodotta dai nervi enterici quando iniettavo nei topi una versione radioattiva della sua molecola precursore (il 5-HTP). Marcello e John suggerirono che i nervi enterici nei quali avevo trovato la serotonina potessero di norma non contenerla. Al contrario, proposero che la serotonina radioattiva potesse essere stata prodotta in modo non specifico nelle fibre nervose simpatiche che avevano opportunamente captato il 5-HTP radioattivo che le circostanze non fisiologiche del mio esperimento avevano reso disponibile. Quindi la loro idea era che la serotonina radioattiva che avevo trovato nel sistema nervoso enterico non era altro che un falso neurotrasmettitore nelle fibre nervose simpatiche. Chiaramente, l'obiezione che Marcello e John avevano sollevato era seria. Se avessero avuto ragione, allora la mia ipotesi era probabilmente sbagliata e i miei esperimenti privi di significato.

Pensai a una serie di modi per stabilire se i nervi nell'intestino contrassegnati dalla serotonina radioattiva fossero simpatici. Per esempio, avrei potuto distruggere i nervi simpatici con i farmaci o bloccare la loro capacità di captare i neurotrasmettitori. Alla fine tentai entrambe le strade, senza però interferire con l'accumulo di serotonina radioattiva nelle fibre nervose enteriche. I farmaci però lasciano spazio all'incertezza perché possono esercitare effetti sconosciuti. Era possibile fare una verifica più trasparente che non implicasse l'uso di farmaci sfruttando l'arrivo ritardato delle fibre nervose simpatiche nell'intestino fetale. I neuroni intrinseci si sviluppano proprio nell'intestino e almeno alcuni di essi, come avevo appena scoperto con Tiz Thompson, si differenziano prima che l'intestino in via di sviluppo riceva l'innervazione simpatica. In quel momento non sapevo ancora a che punto dello sviluppo si presentassero i neuroni enterici contenenti serotonina, ma le mie osservazioni avevano già suggerito che fossero intrinseci. Pertanto pensai che in una gara nello sviluppo essi potessero tranquillamente sconfiggere i nervi simpatici. Se la serotonina radioattiva doveva essere fatta nei nervi enterici in fase di sviluppo prima che i nervi simpatici più precoci si sviluppassero nell'intestino fetale, allora potevo allontanare dal mio precedente lavoro le critiche di Marcello e di John.

Avevo ancora in testa il lavoro svolto con Tiz quando istruii un'altra giovane laureata, Taube Rothman, a studiare lo sviluppo dei nervi enterici che fabbricano la serotonina. Taube aveva risolto il problema del conflitto tra scienza e maternità sposandosi giovane, crescendo i suoi figli per poi dedicarsi alla carriera. Inoltre non lavorava per guadagnarsi da vivere. Lo faceva per la pura gioia di farlo. Trovare le risposte a domande scientifiche era la sua forza motrice e il suo entusiasmo era contagioso. L'esercito americano dovrebbe arruolare ufficiali come Taube Rothman.

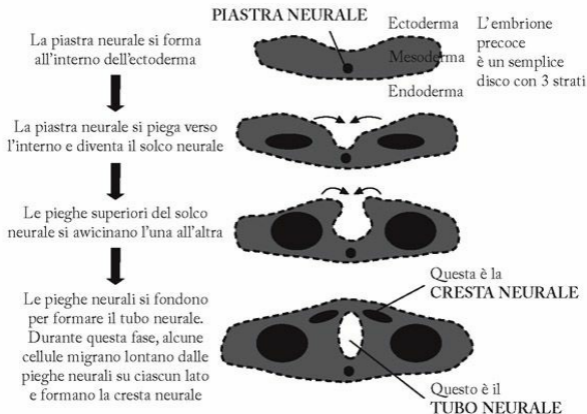
Ben presto Taube scoprì che nella corsa per lo sviluppo non c'era storia. Utilizzò la radioautografia per dimostrare che i nervi enterici vengono avvolti dalla serotonina radiotattiva sintetizzata dal 5-HTP radioattivo o captata dal fluido che li circonda molto prima che le fibre nervose simpatiche si avventurino nel tratto intestinale. Usando la captazione della norepinefina radioattiva per trovare le fibre simpatiche in via di sviluppo, Taube non ebbe nessuna difficoltà nel distinguerle dai nervi contrassegnati con la serotonina radioattiva. I suoi esperimenti poterono così stabilire che le obiezioni di Marcello Costa e di John Furness erano infondate e che la serotonina radioattiva non entrava casualmente nei nervi simpatici. Le osservazioni furono importanti nel dimostrare tutto ciò, ma mi coinvolsero anche nello studio dello sviluppo in sé. Cominciai a chiedermi: da dove arriva il sistema nervoso enterico?

Le origini

I primi studiosi delle origini dello sviluppo del sistema nervoso enterico non fecero nulla di utile. Le prime teorie sull'argomento sono più imbarazzanti che altro. Credo che il problema dei primi ricercatori dell'argomento fosse che la vera origine del sistema nervoso enterico sembrava così improbabile da rendere lungo il cammino verso la verità. Di fatto, le cellule che danno origine al sistema nervoso enterico non fanno neppure parte dell'intestino al momento della formazione dell'apparato intestinale. A rendere le cose più difficili, si aggiunge il fatto che i mammiferi attraversano la fase dello sviluppo embrionale e fetale racchiusi in un utero, dove fino a poco tempo fa era difficile per uno scienziato raggiungerli.

Il grande cambiamento si verificò nel 1954 e nel 1955, quando Yntema e Hammond utilizzarono embrioni di pollo per fornire la prima prova evidente del fatto che il sistema nervoso enterico, come la maggior parte del resto del sistema nervoso periferico, proviene da una struttura embrionale, detta *cresta neurale*. La cresta neurale è un aggregato temporaneo di cellule, che compare accanto alla struttura che diventerà il cervello e al midollo spinale di tutti gli embrioni dei vertebrati, e che poi scompare quando le sue cellule, prese dalla voglia di girovagare, intraprendono diversi viaggi attraverso l'embrione. Nell'uomo, la cresta neurale ha origine al termine della terza settimana di sviluppo (nei polli durante il secondo e il terzo giorno). In questo stadio, l'embrione non ha una grande consistenza. Non ci sono braccia, gambe o organi riconoscibili. L'embrione è solo un disco piatto fatto da tre strati ([vedi figura](#)). I tre strati sono l'*ectoderma* nella parte superiore, il *mesoderma* al centro e l'*endoderma* sul fondo. Anche se è difficile crederlo, questo semplice disco è in grado, durante lo sviluppo successivo, di esprimersi in una serie complessa di passaggi, per formare il corpo, costruire l'apparato intestinale e dare origine al sistema nervoso.

IL PROCESSO DI "NEURULAZIONE"



L'ectoderma appare come un semplice strato di cellule, che formano l'involucro esterno dell'embrione, una volta che il disco embrionale è sufficientemente sviluppato da stabilire l'esistenza di una parte interna e di una esterna. Le cellule ectodermiche, tuttavia, hanno anche una missione evolutiva ben più importante, rispetto alla semplice formazione della cute. Quando sottoposte all'*induzione* da parte del giusto tipo di molecole fornite dalle cellule vicine, attraversano un processo detto *neurulazione*, che dà origine al cervello, al midollo spinale e al sistema nervoso periferico (oltre che ad alcune ghiandole e a molte ossa e muscoli del viso). Per quanto mi riguarda, la neurulazione è l'evento più importante nella vita di ciascun individuo.

La neurulazione inizia con un ispessimento, detto *piastra neurale*, che compare al centro dell'ectoderma dell'embrione, mentre questo è ancora un semplice disco. La piastra neurale si sviluppa verso l'interno per produrre un *solco neurale*. Le parti superiori del solco neurale danno origine a *pieghe neurali*, che si avvicinano l'una all'altra e che infine si uniscono e si

fondono per trasformare il solco neurale nel *tubo neurale*. Il tubo neurale si separa quindi dal banale ectoderma e prosegue, producendo il cervello e il midollo spinale. Proprio prima che le pieghe neurali si fondano per formare il tubo neurale, alcune cellule si staccano dalle punte delle pieghe e si allontanano, per produrre alette cellulari su uno dei lati del tubo neurale in corso di fusione. Queste alette cellulari liberate, che acquisiscono una voglia irrefrenabile di viaggiare, rappresentano la *cresta neurale*.

Uno dei lati positivi della sperimentazione sugli embrioni di pollo è il fatto di poterli riorganizzare chirurgicamente. Per scoprire quali derivati vengano formati dalla cresta neurale, pertanto, è possibile rimuovere la cresta nella fase precoce di sviluppo e vedere che cosa manca negli embrioni successivi, come risultato dell'intervento.

Questo è esattamente ciò che fecero Yntema e Hammond. Estrassero un'ampia porzione della cresta neurale, consentirono all'embrione di sopravvivere abbastanza a lungo per formare l'apparato intestinale e scoprirono che conteneva pochi gangli enterici o nessuno. Questo semplice esperimento, che dimostrava come in assenza di cresta neurale non esista un sistema nervoso enterico, forniva una prova tangibile del fatto che il sistema nervoso enterico deriva dalla cresta neurale. La rimozione di ampie porzioni della cresta neurale, tuttavia, è un intervento alquanto invasivo su un embrione. Pertanto, è concepibile che la perdita di una parte tanto importante provochi anomalie alle strutture embrionali, anche se la cresta neurale non partecipa direttamente alla loro formazione. Quindi è necessario prevedere due tipologie di risultati dalle grandi eliminazioni sperimentali della cresta neurale. Una è diretta. Alcune strutture possono non svilupparsi, perché normalmente hanno origine dalle cellule della cresta neurale che sono state rimosse chirurgicamente. L'altra è meno ovvia. Alcune strutture embrionali possono essere disturbate, non perché sono esse stesse derivate della cresta neurale, ma perché il loro sviluppo richiede un segnale da parte di qualche altra struttura neurale, derivata dalla cresta. Perciò era necessario confermare le conclusioni di Yntema e Hammond mediante un metodo che non danneggiasse così profondamente l'embrione.

La conferma necessaria dell'origine dalla cresta neurale del sistema nervoso enterico si ottenne da una straordinaria serie di osservazioni che cambiarono il volto della moderna biologia evolutiva. Queste osservazioni furono effettuate da una scienziata francese, Nicole Le Douarin, che allora lavorava non solo sulla risoluzione dei problemi evolutivi, ma anche per superare lo sciovinismo maschile della comunità scientifica francese. Ho avuto modo di conoscere Nicole molto bene e ho avuto l'opportunità di collaborare con lei. È una donna molto affascinante ed elegante, nella maniera di cui solo le francesi sono capaci. È molto aggraziata, ma possiede anche una determinazione di ferro che non va mai sottovalutata. Nicole è dotata di grandi capacità di osservazione, sa apprezzare il significato di dettagli che ad altri sfuggono e ha una stupenda abilità di programmare l'esperimento appropriato che risponda a domande importanti. Molti studi raggiungono ipotesi intriganti; quelli di Nicole tendono a porre soluzioni definitive. Sono poche le onorificenze scientifiche importanti che le sono sfuggite. Ha vinto la medaglia di Kyoto e il Louisa Gross Hurwitz Prize e, se dipendesse da me, avrebbe vinto pure il premio

Nobel. Ha ereditato la tradizione di laboratorio e scientifica di Marie Curie, ma a differenza di quest'ultima, ha superato con successo il gruppetto di maschi che per tradizione hanno fatto la guardia all'ingresso dell'Accademia Francese delle Scienze, diventandone membro. È diventata anche membro della nostra.

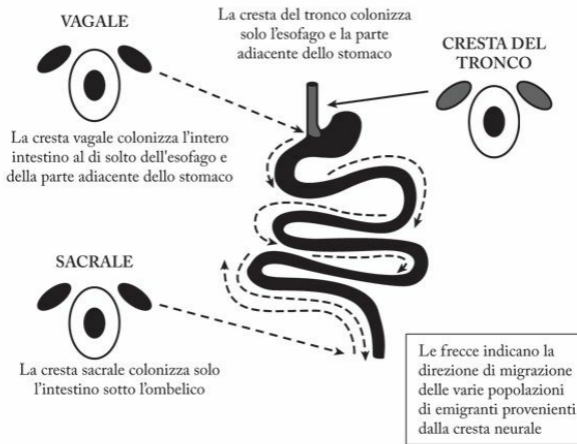
All'inizio della sua carriera, Nicole osservò che era in grado di distinguere le cellule delle quaglie da quelle dei polli. Il DNA nel nucleo delle cellule delle quaglie è distribuito in modo «divertente». Le cellule sembrano obiettivi, bersagli per fecchette persi lungo la strada per il bar. Di per sé, questa scoperta sembra banale, e lo sarebbe stata se non fosse per l'uso che ne fece Nicole. Si rese conto che durante l'inizio della vita embrionale, prima che si sviluppi il sistema immunitario, è possibile sostituire le cellule di una specie con quelle di un'altra, sempre che la specie del donatore non sia un parente troppo lontano di quella del recettore. I polli e le quaglie sono abbastanza prossimi. Siccome le cellule delle quaglie sono così particolari da poter essere riconosciute a 50 passi in un campo di cellule di pollo, sono marcatori ideali da usare per rintracciare il percorso delle cellule che migrano da un posto all'altro in un embrione. Ha seguito le peregrinazioni delle cellule di quaglia attraverso gli embrioni di pollo, rendendo importanti contributi in molti campi, compreso lo sviluppo sia del sistema immunitario sia di quello nervoso. Tuttavia è probabilmente molto più nota per il suo lavoro sulla cresta neurale.

Nicole rimosse la cresta neurale a vari livelli in embrioni di pollo e li sostituì con gli equivalenti di quaglia. In questo processo, le cellule di quaglia trapiantate si sentirono evidentemente quasi a casa nei nuovi ospiti e migrarono attraverso l'embrione di pollo, proprio come se fossero state lasciate indisturbate nelle loro normali sedi. Un animale prodotto dagli sforzi combinati di due specie di cellule è detto *chimera*, in questo caso parte pollo e parte quaglia. La bellezza di questo animale sta nel fatto che tutte le sue parti di quaglia sono derivati della cresta neurale; inoltre, queste strutture sono marcate in modo definitivo, come se un ispettore doganale celestiale avesse scritto sopra di esse: «Prodotte nella quaglia dalla cresta neurale».

Nicole utilizzò la propria tecnica di esecuzione della chimera quaglia-pollo per produrre una mappa del destino della cresta neurale. Facendo ciò, ha definito faticosamente il derivato da ogni porzione della cresta. Questi studi hanno rivelato che il sistema nervoso enterico è formato dalle cellule che migrano verso l'intestino, provenienti solo da tre regioni molto specifiche della cresta neurale. Le cellule nervose enteriche e il gruppo di cellule che le supportano derivano principalmente da un punto della cresta che si trova proprio sotto la zona dove si svilupperanno le orecchie dell'embrione. Questo livello, posto accanto al romboencefalo che si sta sviluppando (e che è prodotto dal tubo neurale), è detto regione *vagale* della cresta. Le cellule della cresta neurale migrano dall'area vagale verso l'intestino, lungo un percorso seguito successivamente dai nervi vaghi. Le cellule della cresta vagale colonizzano l'apparato intestinale, per tutta la sua estensione oro-ale. Anche un secondo gruppo di cellule della cresta neurale, sito appena sopra la coda dell'embrione, la regione *sacrale* della cresta, migra verso l'intestino, ma queste cellule colonizzano solo la porzione dell'apparato intestinale che si trova sotto l'ombelico. L'*intestino*

posteriore (l'ultima parte dell'intestino), pertanto, riceve cellule derivate dalla cresta di origine sia vagale sia sacrale. L'esofago riceve la terza infusione di cellule della cresta neurale, che provengono dal livello posto proprio sotto la cresta vagale ([vedi figura](#)).

COLONIZZAZIONE DELL'INTESTINO DA PARTE DI EMIGRANTI PROVENIENTI DALLA CRESTA NEURALE



Il potenziale

Le cellule nervose del secondo cervello, pertanto, hanno moltissimo in comune con la maggior parte degli Americani, me compreso. Come noi, le cellule nervose enteriche rappresentano la progenie di immigranti. La cresta neurale è il paese di provenienza delle cellule nervose dell'intestino. Una volta appurati questi fatti, sorse la domanda in merito a ciò che rappresenterebbe la Statua della Libertà per gli emigranti provenienti dalla cresta neurale. Che cosa spinge queste coraggiose cellule migranti verso l'intestino promesso? Pensano «intestino» e se ne vanno in giro nelle terre selvagge dell'embrione alla ricerca di un ideale enterico, o si tratta di dir qualcosa di completamente diverso? Si potrebbe pensare che la circoscritta delimitazione delle fonti di cellule nervose enteriche a un numero di siti ristretto nella cresta neurale suggerisca che le cellule in queste sedi siano destinate ad andare verso l'intestino. Se fosse così, le cellule delle altre regioni della cresta mancano presumibilmente delle indicazioni necessarie per «andare a casa» e trovare l'intestino e quindi vanno da un'altra parte. Se le cellule «intelligenti» fossero dotate di informazioni guida, e voi pensaste che «andassero a casa», dirette verso i propri obiettivi come le bombe gettate durante la Guerra del Golfo, avreste torto. La capacità di Nicole di seguire la migrazione delle cellule di quaglia negli embrioni di pollo le consentì di verificare l'ipotesi che le cellule derivate dalla cresta neurale migrassero verso l'apparato intestinale perché sono previste per questo e perché sanno come fare. L'ipotesi non superò il test.

L'approccio di Nicole era quello di trapiantare la cresta neurale da una regione di una quaglia che, se lasciata ai propri meccanismi, nel proprio embrione, non produce mai cellule che migrano verso l'apparato intestinale. Scelse come tessuto del donatore una regione della cresta neurale che fornisce cellule per la ghiandola surrenale. Nicole rimosse la cresta neurale vagale da un embrione di pollo (impedendo in questo modo a qualunque cellula di pollo di raggiungere l'intestino al di sopra dell'ombelico) e la sostituì con la cresta «surrenalica» proveniente dal donatore quaglia. Se il destino delle cellule della cresta neurale fosse stato definito prima della migrazione, allora le cellule del donatore avrebbero dovuto cercare un luogo nell'embrione del destinatario per formare una ghiandola surrenale e non ci si sarebbe aspettato che migrassero verso l'apparato intestinale. Inoltre, dovunque andassero nell'embrione, le cellule di quaglia non avrebbero dato origine a un sistema nervoso enterico. Tuttavia, di fatto Nicole riscontrò che le cellule di quaglia del donatore, collocate al posto sbagliato, migrarono proprio verso l'intestino dell'embrione di pollo. Lo trovarono da sole e, quando lo raggiunsero, formarono i gangli enterici. L'esperimento inverso fornì risultati complementari. Quando Nicole trapiantò la cresta vagale di un embrione di quaglia nella regione «surrenalica» di un embrione di pollo, le cellule del donatore migrarono non verso l'apparato intestinale del proprio ospite (che sarebbe stata la cosa corretta da fare per le cellule della cresta vagale), bensì verso il sito dove si sviluppa la ghiandola surrenale; inoltre, dopo il raggiungimento di questo sito, formarono una ghiandola adrenale normale.

Taube Rothman e io collaborammo con Nicole in esperimenti successivi che dimostrarono come i gangli dell'apparato intestinale, originati da cellule della cresta neurale, provenienti dalla regione «surrenale» del donatore quaglia, si organizzassero, in un volatile chimerico, in ciò che sembrava essere un sistema nervoso enterico perfettamente normale. Esaminati al microscopio elettronico, per esempio, i gangli avevano la tipica struttura simil-cerebrale del sistema nervoso enterico, piuttosto che la struttura dei nervi periferici. Riscontrammo anche cellule nervose contenenti serotonina nei gangli enterici degli uccelli chimerici. Inoltre, tutte queste cellule nervose contenenti serotonina erano cellule di quaglia, a conferma del fatto che erano derivate dalla cresta «surrenale». Il livello «surrenale» della cresta neurale non produce normalmente cellule nervose contenenti serotonina, che si rilevano, al di fuori del cervello, solo nell'apparato intestinale.

Queste osservazioni resero chiaro il fatto che le cellule della cresta neurale non colonizzano l'intestino perché sono state predisposte a farlo prima della migrazione. Invece, le cellule della cresta neurale seguono percorsi definiti nell'embrione, che portano all'intestino da specifiche regioni della cresta neurale. Ponendo quasi qualunque cellula della cresta neurale su questo percorso, essa finisce nell'apparato intestinale. Gli stessi esperimenti suggerirono inoltre che il potenziale evolutivo di una popolazione di cellule derivate dalla cresta neurale è molto grande, o *multipotente*. I destini della popolazione non sono predeterminati prima che le rispettive cellule lascino la cresta neurale, ma dipendono invece da segnali che queste cellule ricevono dal microambiente incontrato lungo i percorsi migratori, oppure all'interno degli organi target che colonizzano alla fine.

Gli studi pionieristici di Nicole e dei suoi collaboratori stabilirono che la popolazione delle cellule derivate dalla cresta che colonizza l'intestino è multipotente, ma non stabilirono il perché. La popolazione potrebbe essere multipotente, perché le cellule individuali sono di per sé multipotenti. In alternativa, potrebbe essere formata da cellule predestinate, ciascuna delle quali può dare origine solo a un singolo tipo di cellula matura. Se questo fosse il caso, allora dovrebbero essere presenti molti diversi tipi di cellule precursore predestinate, in modo che il gruppo, nel suo insieme, appaia multipotente. La distinzione tra queste due possibilità è importante. Se le cellule individuali derivate dalla cresta nell'intestino sono multipotenti, allora sarebbero necessari segnali microambientali forniti dalla parete dell'apparato intestinale che indichino loro cosa fare. L'intestino dovrebbe influire in modo istruttivo. D'altro canto, se molti tipi diversi di cellule derivate dalla cresta, irrevocabilmente predestinate, colonizzano l'intestino, allora il microambiente dell'apparato intestinale dovrebbe scegliere il corretto sottogruppo di precursori per produrre un sistema nervoso enterico. L'influsso dell'intestino rappresenterebbe una selezione anziché un'istruzione. In qualunque caso, il microambiente dell'intestino, come pure la cresta neurale, svolge chiaramente un ruolo importante nello sviluppo del sistema nervoso enterico.

Per decidere se le cellule individuali della cresta siano multipotenti, o limitate a una singola destinazione, è ovviamente essenziale vedere che cosa possano fare in realtà le singole cellule

derivate dalla cresta. Le cellule individuali della cresta neurale sono state studiate da Nicole Le Douarin e da molti altri ricercatori, fra i quali Maya Sieber-Blum, David Anderson, Marianne Bronner-Fraser e suo marito, Scott Fraser. Questi studi hanno chiaramente dimostrato che le cellule individuali della cresta neurale sono davvero multipotenti, non solo prima della partenza dalla stessa cresta neurale, ma anche mentre migrano attraverso l'embrione. Insieme a Nicole, Taube Rothman e io abbiamo continuato la ricerca, per dimostrare che le cellule derivate dalla cresta sono ancora multipotenti, anche al termine della migrazione e dopo l'ingresso trionfale nell'intestino in fase di sviluppo.

La tecnica che ha rivelato come l'intestino sia colonizzato da precursori multi-potenziali si chiama *back-transplantation* (reinnesto). Nicole l'ha usata per la prima volta in un contesto differente e noi l'abbiamo adattata all'intestino in fase di sviluppo. Per il reinnesto, un organo, nel nostro caso l'apparato intestinale, che è già stato colonizzato da cellule provenienti dalla cresta neurale, viene rimosso e trapiantato in un embrione ospite più giovane. Questa procedura determina il grado di mantenimento del potenziale evolutivo dei propri antenati delle cellule postmigratorie della cresta neurale. Una volta migrate, il loro destino diventa definito e quindi perdono la voglia di viaggiare? Oppure, le loro opzioni sono ancora aperte, possono ancora «andare all'estero» e girovagare?

Nei primi esperimenti, Nicole aveva dimostrato che, dopo il reinnesto, alcune delle cellule neurali derivate dalla cresta in un organo target del donatore più vecchio riacquistano il bisogno di viaggiare e di migrare una seconda volta attraverso i tessuti dell'embrione ospite. L'ambiente primitivo dell'embrione ospite più giovane sollecita questo potenziale. Nei nostri esperimenti, abbiamo reinnestato segmenti di intestino provenienti da un donatore quaglia in un pollo ospite. In alcuni esperimenti, abbiamo persino reinnestato un intestino chimerico, nel quale solo le cellule neurali derivate dalla cresta erano di quaglia, mentre le restanti erano di pollo. L'esperimento ci consentì di identificare le cellule derivate dalla cresta provenienti dall'intestino del donatore, a prescindere dal luogo di migrazione o da che cosa erano diventate nell'embrione ospite.

Taube posizionò i reinnesti di intestino accanto al tubo neurale, in modo che le cellule derivate dalla cresta nell'intestino più vecchio si trovassero in un percorso di migrazione della cresta neurale nell'embrione più giovane. Nicole desiderava proseguire con noi per vedere che cosa sarebbe accaduto, ma non si aspettava che le cellule derivate dalla cresta, che avevano già dato origine a gangli nell'intestino di quaglia, facessero granché nell'embrione ospite, anche dopo il reinnesto. Tuttavia, in modo romanzesco, le cellule derivate dalla cresta, che avevano precedentemente colonizzato l'intestino di quaglia, *ne uscirono* dopo il reinnesto e migrarono di nuovo nel proprio embrione ospite di pollo. Inoltre, la loro destinazione dipendeva da dove avevamo collocato l'intestino del donatore. Se l'intestino di quaglia era trapiantato nella regione vagale o sacrale dell'embrione ospite, le cellule della cresta derivate dall'intestino seguivano i percorsi idonei e colonizzavano l'intestino dell'ospite. Ma invece, se l'intestino del donatore era trapiantato in qualsiasi altra regione dell'embrione, nessuna delle cellule della

cresta derivata dall'intestino migrava verso l'intestino dell'ospite. Al contrario, seguivano percorsi adatti al livello dell'embrione di pollo sul quale era stato fatto il trapianto. Pertanto, a seconda di dove collocavamo l'intestino reinnestato, potevamo indurre le cellule derivate dalla cresta a migrare verso i gangli sensitivi dell'ospite, i gangli simpatici, i nervi periferici e la ghiandola surrenale. In altre parole, le cellule della cresta che colonizzano l'intestino ovviamente non imparano nulla dal loro viaggio verso l'apparato intestinale. Invece, restano multipotenti e in grado di dare origine a diversi tipi di cellula nervosa, anche ad alcuni che non producono quando si trovano nell'intestino.

Gli esperimenti condotti in collaborazione con Taube Rothman e Nicole Le Douarin per studiare il potenziale evolutivo delle cellule che formano il sistema nervoso enterico sono stati divertenti da progettare, da eseguire e da analizzare. Tuttavia, la stesura della documentazione che descriveva i nostri risultati è stata probabilmente la più difficile a cui io abbia mai partecipato. Come era abitudine nelle collaborazioni oltreoceano prima dell'avvento della posta elettronica, inviavamo molte bozze di manoscritti avanti e indietro, da una costa all'altra. Alla fine, quando eravamo quasi pronti ad avere qualcosa di apparentemente corretto per tutti, mi capitò di essere invitato a un convegno in Europa. Ciò mi dava l'opportunità di visitare il laboratorio di Nicole e di incontrarla per finire la documentazione. Inizialmente, andò tutto bene. Nicole e io ci incontrammo, raggiungemmo un accordo durante un breve colloquio e io mi apprestai a scrivere la versione finale. Ma questo si rivelò un problema.

Sia io sia Nicole utilizzavamo computer Macintosh. I suoi, però, avevano tastiere francesi, con le lettere disposte in un modo a cui io non ero abituato. La soluzione fu quella di utilizzare un Macintosh americano, che uno dei suoi colleghi di postdottorato aveva portato con sé in Francia. Quel computer si trovava nella sala degli animali, dove si registravano i suoni emessi da una stranissima popolazione di volatili chimerici, che Nicole e il suo collega avevano prodotto. Stavano studiando l'origine delle cellule nervose responsabili del canto degli uccelli. Nicole e il suo collega di postdottorato avevano trapiantato parte delle zone che avrebbero dato origine al cervello dei donatori di quaglia in embrioni di pollo, in modo da poter rintracciare le migrazioni dei precursori delle cellule nervose. In questo caso, ai volatili veniva permesso di covare. Gli animali sembravano polli, ma cinguettavano come quaglie. Con il passare del tempo, le cellule delle quaglie iniziarono a essere rigettate dal sistema immunitario dei polli. A differenza della maggior parte delle cellule nervose mature, quelle responsabili del canto degli uccelli possono essere sostituite. Pertanto, le cellule nervose delle quaglie venivano rigettate e sostituite da cellule nuove, però le nuove cellule nervose erano tutte di origine di pollo. Durante il processo di rigetto delle cellule nervose della quaglia con le quali erano nati, i volatili alternavano cinguettii da quaglia a coccodè, chiaramente tipici del pollo. Alla fine, eliminate tutte le cellule di quaglia, i volatili chiocciavano in modo adeguato, come in qualsiasi aia.

Mi trasferii nella sala degli animali per lavorare su quel Macintosh e scoprii di avere un problema. Sono terribilmente allergico ai polli. La gente mi ha chiesto spesso come io sia riuscito a sopravvivere fino all'età adulta, date le mie origini etniche e quella particolare allergia.

Eppure, polli o meno, avevo un lavoro da fare e lo avrei portato a termine, anche se mi avesse ucciso, e ci arrivai vicino. Credevo di trovarmi in una sorta di inferno aviario e quando arrivai alla fine, ero quasi irriconoscibile. Comunque l'articolo era importante e fu pubblicato senza difficoltà.

La dimostrazione del fatto che la popolazione di cellule derivate dalla cresta, che dà origine al sistema nervoso enterico, è multipotente, implica che lo stesso intestino deve svolgere un ruolo importante nella determinazione di ciò che accade alle cellule della cresta nella sua parete. In sostanza, le cellule neurali derivate dalla cresta sono simili agli studenti di medicina del primo anno, ai quali insegno alla Columbia. Come gli emigranti della cresta neurale nell'apparato intestinale, questa popolazione studentesca è multipotente. Dà origine a molti tipi diversi di specialisti e di medici di base, anche se quasi tutti gli studenti diventano medici. Nonostante siano multipotenti, le cellule derivate dalla cresta che colonizzano l'intestino sono analogamente limitate, nel senso che i loro orizzonti evolutivi sono ristretti al sistema nervoso. Per esempio, sembrano avere perso la capacità riscontrata in altre cellule della cresta neurale di dare origine a cellule pigmentate o ossee; tuttavia, come abbiamo visto, molti tipi diversi di cellule nervose, persino alcune che sarebbero inadatte all'intestino, possono svilupparsi dalla popolazione enterica degli emigranti provenienti dalla cresta neurale.

La scelta delle specialità mediche aperte agli studenti di medicina diventa progressivamente più limitata, con il procedere della loro formazione. Le opzioni diminuiscono e, mentre alcuni campi li attirano e vi proseguono gli studi, altri settori sono per loro di interesse minore, per cui li trascurano. Le scelte degli studenti sono fortemente influenzate dalla facoltà universitaria e da altri studenti più esperti, che fungono da modello. Analogamente, anche le scelte evolutive operate dalle cellule neurali derivate dalla cresta presenti nell'intestino sono influenzate da una «facoltà» e da «altri studenti». Per le cellule derivate dalla cresta neurale, la facoltà è rappresentata da cellule derivate dalla cresta non neurale dell'intestino, che fornisce loro le istruzioni, sotto forma di segnali chimici detti *fattori di crescita*. Questi fattori di crescita sono essenziali per lo sviluppo e persino per la sopravvivenza delle cellule, nervose enteriche e gliari (le cellule collose che supportano le cellule nervose del cervello e dell'intestino). Anche il gel di supporto, in cui vivono le cellule all'interno dell'intestino fetale (detto *matrice extracellulare*), partecipa all'istruzione delle cellule derivate dalla cresta. Alla fine, se le istruzioni fornite dalla «facoltà» dell'intestino sono complete e non distorte da un difetto congenito, le cellule nervose enteriche iniziano a differenziarsi nella parete addominale. Queste cellule nervose precoci, come gli studenti di medicina più avanzati, rendono un importante contributo allo sviluppo dei «ritardatari». Attraverso la loro attività e le azioni dei rispettivi neurotrasmettitori, queste cellule nervose con sviluppo precoce influiscono notevolmente sulle decisioni evolutive prese dalle cellule che seguono la loro scia.

Una delle grandi certezze della scienza è che qualunque importante progresso è messo in discussione dai revisionisti. In realtà questo processo è molto positivo, poiché garantisce che i concetti siano rigorosamente controllati prima di essere accettati nei canoni della conoscenza accettata. La fede non trova posto nel progresso scientifico. Le scoperte di Nicole Le Douarin sulle origini del sistema nervoso enterico non sono state un'eccezione. Poco dopo la pubblicazione delle sue osservazioni, due ricercatori australiani, Allen e Newgreen, le misero in discussione. Questi autori evidenziarono che gli esperimenti di Nicole sulle chimere quaglia-pollo mancavano di un controllo. Nicole era in grado di vedere dove migravano le cellule di quaglia negli embrioni di pollo e dove le cellule di pollo negli embrioni di quaglia. Tuttavia, non fu in grado di eseguire studi di controllo per osservare dove migrassero le cellule di pollo negli embrioni di pollo e quelle di quaglia negli embrioni di quaglia. Quindi il lavoro di Nicole era basato sul presupposto, non verificato, che una cellula di cresta estranea migra in un embrione ospite, proprio come avrebbero fatto le cellule della cresta, propria dell'ospite, se non fossero state sostituite. Allen e Newgreen erano particolarmente colpiti dall'identificazione di Nicole della cresta sacrale come fonte di precursori per il sistema nervoso enterico. Il loro lavoro aveva rivelato che le cellule nervose enteriche possono essere riconosciute in una regolare progressione orale-ale, che essi attribuirono al progredire delle cellule della cresta vagale lungo l'intestino. In anni recenti, Don Newgreen è stato assolutamente spietato nei suoi attacchi all'idea che la cresta neurale sacrale contribuisca alla formazione del sistema nervoso enterico.

Il ruolo della cresta neurale sacrale è una problematica importante, perché l'intestino caudale, una regione dell'apparato intestinale che queste cellule contribuiscono a colonizzare, è la parte dell'intestino più frequentemente colpita da difetti congeniti del sistema nervoso enterico. La malattia di Hirschsprung, per esempio, è un comune problema congenito, nel quale la parte terminale dell'intestino non contiene affatto gangli enterici (è perciò *agangliare*). La malattia di Hirschsprung si manifesta in una percentuale di circa un neonato su cinquemila. Siccome in America si contano quattro milioni di nascite l'anno, ciò significa che ogni anno circa ottocento americani nascono con un difetto che comporta una minaccia per la vita. Dato che questi bambini non hanno cellule nervose intrinseche nel proprio intestino terminale, questa regione dell'intestino manca dei riflessi propulsivi che dipendono da queste cellule. Ne risulta che il loro colon si ostruisce e si dilata in modo massivo al di sopra della zona agangliare. Un'altra definizione della malattia di Hirschsprung è quindi *megacolon congenito*. Se non viene trattata (e talvolta anche in caso contrario), questa patologia è mortale. L'intestino dilatato può perforarsi, consentendo all'infezione di estendersi a tutto il paziente. Il trattamento consiste nella resezione chirurgica della porzione agangliare dell'intestino, eseguibile se la zona agangliare non è troppo estesa, e nel successivo ricongiungimento del tratto intestinale sano all'ano. Chiaramente, per determinare il motivo per cui la parte terminale dell'intestino nella malattia di Hirschsprung diventa agangliare, è importante sapere se le cellule della cresta sacrale partecipano

normalmente alla colonizzazione di questa regione dell'intestino.

Per poter verificare la validità delle obiezioni di Don Newgreen al lavoro di Nicole Le Douarin, è necessario essere in grado di rintracciare le migrazioni delle cellule derivate dalla cresta, mediante una tecnica che non coinvolga la costruzione di chimere quaglia-pollo. Pertanto io mi preparai per questo compito insieme a Howard Pomeranz, uno studente del programma M.D.-Ph.D. della Columbia, che svolse la propria tesi di ricerca con me. Howard è un uomo dotato di una sensibilità letteraria e di una volontà indomita, pronto ad affrontare quasi qualunque esperimento, a prescindere da quanto possa sembrare difficile. Inizialmente Howard e io disponevamo della collaborazione di Bob Payette, neurologo specializzato e ricercatore esperto, che aveva precedentemente lavorato presso la University of Pennsylvania. Bob trovava la vita a Philadelphia terribilmente noiosa. Diceva sempre di essersi unito al mio laboratorio perché gli piaceva la mia ricerca, ma io sospettavo che il fatto che io lavorassi a New York fosse almeno altrettanto importante. Bob fu di grande aiuto nel fornire a Howard la preparazione per la ricerca. Sfortunatamente, la prematura scomparsa di Bob non gli consentì di assistere al completamento del progetto. Taube Rothman prese il posto di Bob ed eseguì le manipolazioni essenziali sugli embrioni di pollo.

Utilizzammo tre diversi metodi per seguire le migrazioni delle cellule dalla cresta neurale sacrale. Una tecnica consisteva semplicemente nel rintracciare le cellule che identificammo, dal punto di vista immunocitochimico, con anticorpi che riconoscono specificamente le cellule di origine crestale neurale. Negli esperimenti successivi, iniettammo un colorante fluorescente, detto *DiI*, nelle regioni vagale e sacrale della cresta neurale degli embrioni di pollo. Il *DiI* si inserisce nella membrana plasmatica delle cellule, dove si insedia e fornisce un utile marcatore cellulare. Infine, iniettammo un retrovirus geneticamente modificato nella cresta neurale degli embrioni di pollo. Il virus era stato alterato, in modo da essere in grado di invadere le cellule esposte, ma non di replicarsi all'interno di queste cellule, o di uscire da esse. Inoltre, era stato modificato in modo da contenere un gene per un enzima batterico, la *beta-galattosidasi*, che potevamo rilevare nelle sezioni tissutali. Dimostrando la presenza di *beta-galattosidasi*, potevamo identificare positivamente le cellule infettate. Siccome il virus, che non può diffondersi, era iniettato nella cresta sacrale, la presenza di cellule infettate nell'intestino avrebbe dimostrato che le cellule della cresta sacrale vi migrano.

Ognuna di queste tre tecniche confermò che Nicole aveva ragione. Le cellule derivate dalla cresta sacrale migrano davvero verso l'intestino. Il marcatore immunocitochimico rivelò una traccia delle cellule tra la cresta sacrale e l'intestino caudale e, dopo le iniezioni di *DiI* oppure del retrovirus nella cresta sacrale, c'erano sempre cellule marcate nell'intestino caudale. I nostri studi sui polli furono confermati ed estesi ai topi anche da Marianne Bronner-Fraser, che iniettò *DiI* nella cresta sacrale. Più recentemente, Nicole Le Douarin e Alan Burns, un giovane emigrato nord-irlandese che collaborava con lei per il postdottorato, ripresero la problematica della migrazione della cresta neurale sacrale e riscontrarono come il numero di cellule sacrali che partecipano alla formazione del sistema nervoso enterico della parte terminale dell'intestino sia

in realtà molto ampio. Le cellule sacrali, tuttavia, arrivano solo relativamente tardi nel corso dello sviluppo. Di fatto, consentono ai propri compagni vagali di attraversare l'intero intestino e di raggiungere il colon prima di loro. Questo ritardo è una motivazione della difficoltà incontrata da Don Newgreen e da altri nel trovare il componente sacrale del sistema nervoso enterico. L'ingresso delle cellule sacrali era mascherato dalla presenza di cellule vagali. È impossibile distinguere una cellula vagale da una cellula della cresta neurale sacrale, a meno che non vengano marcate prima di mischiarsi.

Gli studi recenti sul contributo della cresta neurale sacrale alla formazione del sistema nervoso enterico possono, in un certo senso, essere considerati come una riscoperta della ruota. Nicole Le Douarin disponeva effettivamente dell'osservazione di base, prima ancora che fossero intraprese queste ricerche. Eppure, anche in retrospettiva, io credo che fosse importante confermare le conclusioni di Nicole. Se questa particolare ruota non fosse stata riscoperta, non avremmo mai potuto fornire una spiegazione molecolare che spiegasse la patogenesi della malattia di Hirschsprung. Si tratta di un altro argomento che affronterò, ma siccome il fondo dell'intestino è completamente agangiare nei pazienti affetti da questa patologia, è ovvio che la lesione non si presenterà, a meno che non falliscano *due* correnti di cellule emigranti, derivate dalla cresta neurale, e non solamente una. Per spiegare l'origine della malattia di Hirschsprung è necessario considerare sia le cellule vagali sia quelle sacrali.

La mimica

Quando mi convinsi che il micro-ambiente dell'intestino svolge un ruolo cruciale nella formazione del sistema nervoso enterico, smisi di considerare anche altri fattori che possono essere importanti. Questo si rivelò un errore. In biologia nulla è semplice e si dovrebbe prevedere che una cosa complicata come il secondo cervello dipenda da più di una singola serie di fattori. Il primo indizio del fatto che lo sviluppo del sistema nervoso enterico dipendesse da qualcosa di diverso da ciò che può fornire l'intestino da solo, fu un'osservazione autonoma di Gladys Teitelman, una ricercatrice che in passato aveva trascorso un anno nel mio laboratorio, e di Philippe Cochard, un collega francese di Nicole Le Douarin, che in quel momento era in aspettativa e svolgeva ricerche alla Cornell. La scoperta fu che, per una breve finestra di tempo, l'intestino primitivo dei ratti fetali contiene temporaneamente cellule che sembrano assolutamente cellule nervose simpatiche. Queste cellule contengono il neurotrasmettitore postgangliare simpatico norepinefina. Siccome la norepinefina appartiene a una classe di sostanze chimiche dette *catecolamine*, le cellule contenenti temporaneamente catecolamina dell'intestino in corso di sviluppo, vennero denominate in breve cellule TC (da «temporaneamente catecolamina»). Non esistono cellule contenenti catecolamina nell'intestino adulto. Al momento della loro scoperta, la provenienza delle cellule TC e il motivo della loro scomparsa rimanevano un mistero.

Gladys Teitelman e io iniziammo una nuova collaborazione per cercare di scoprire quale fosse l'attività delle cellule TC. Gladys è una persona che mi porta a pensare quanto l'America debba agli odiosi dittatori presenti nel mondo. Ogni volta che una dittatura in qualche parte della terra diventa insopportabile, l'America riceve un'altra infusione di talenti. Gladys fu costretta a lasciare l'Argentina dalla giunta militare, che sembrava controllare ciò che era, in sostanza, una ricerca di talenti scientifici della Westinghouse (ora Intel) al contrario. I migliori scienziati furono perseguitati e i sopravvissuti furono obbligati a emigrare in America e in Europa. Quando Gladys si unì per la prima volta al mio laboratorio, i militari argentini facevano «sparire» le persone, durante il periodo noto come la «guerra sporca» (quasi che le guerre potessero mai essere pulite). Gladys lasciò l'Argentina quando i militari cominciarono ad attivarsi contro la sua famiglia. Per quanto mi riguarda, questo tipo di trasferimento di persone è solo un altro esempio del vecchio detto, secondo il quale i ricchi (noi) diventano più ricchi e i poveri (l'Argentina) ancora più poveri.

Gladys e io scoprimmo presto che le cellule TC, presenti nell'intestino del ratto fetale, e le controparti corrispondenti, presenti nell'intestino del topo fetale, esprimono una serie di molecole che si trovano solo nelle cellule nervose. Questa osservazione rivelava che le cellule TC appartengono alla famiglia delle cellule nervose. Siccome tutte le cellule nervose dell'intestino sono derivate dalla cresta neurale, concludemmo che le cellule TC o i loro progenitori devono arrivare all'apparato intestinale attraverso la migrazione dalla cresta neurale. Il mio primo pensiero fu che le cellule TC potessero in realtà essere state cellule nervose

simpatiche che avevano preso una direzione sbagliata durante la migrazione dalla cresta neurale, si erano perse ed erano finite nell'intestino. In questo caso, le cellule TC potevano scomparire perché il micro-ambiente enterico si oppone agli estranei e li uccide. Il corpo contiene molti ambienti difficili, dove le cellule che non vi appartengono o che non seguono le regole locali vengono semplicemente assassinate. La morte cellulare fa parte della vita ed è particolarmente comune durante lo sviluppo. A conti fatti, il mio primo pensiero si rivelò alquanto sbagliato. Quindi fui costretto a ripensarci.

Gladys e io iniziammo a pensare che la morte prematura non sia la ragione della scomparsa delle cellule TC, quando scoprimmo che proliferano. Le cellule nervose simpatiche non proliferano. Di fatto, con rare eccezioni (comprese le cellule nervose responsabili del canto degli uccelli e le cellule nervose sensitive che rilevano gli odori), le cellule nervose non si dividono o non proliferano in alcun modo. L'ultima divisione di un precursore di una cellula nervosa è quindi considerata «la data di nascita» della cellula nervosa. Quando una cellula nervosa tipica nasce, diventa insostituibile e la sua unica prospettiva è la morte. Gladys proseguì lo studio di altre problematiche, ma alla mia ricerca sulle cellule TC si unì uno studente laureato particolarmente motivato, Greg Baetge. Greg e io non solo confermammo la dimostrazione di Gladys che le cellule TC proliferano, ma in realtà ne cogliemmo diverse *in flagrante*, mentre eseguivano, senza alcuna vergogna, la *mitosi* (divisione cellulare). Il fatto che le cellule TC si dividano indicava che non sono cellule nervose. Siccome si tratta di cellule provenienti dalla cresta neurale, che esprimono marcatori cellulari nervosi, proponemmo che le cellule TC fossero precursori delle cellule nervose. Sembrava inoltre molto improbabile che cellule in procinto di morire si riproducessero. Iniziammo a sospettare che le cellule TC fossero progenitori del sistema nervoso enterico che scompaiono perché loro, o i loro successori, perdono le proprietà delle cellule nervose simpatiche che ne consentivano prima di tutto l'identificazione. Il nostro sospetto era quindi che le cellule TC continuino a dare origine a cellule nervose enteriche, completamente diverse da quelle che si trovano nel sistema nervoso simpatico. Per verificare questa idea, avremmo avuto bisogno di un nuovo marcatore che persistesse anche dopo che le proprietà di cellula nervosa simpatica delle cellule TC vanno perdute.

La persistenza molecolare

A questo punto dei nostri studi, ci prendemmo una pausa. Utilizzavamo metodi di biologia molecolare per osservare non solo gli enzimi che le cellule TC usano per produrre il loro neurotrasmettitore, ma anche le trascrizioni di RNA che dirigono la biosintesi di questi enzimi. Ricontrammo che le trascrizioni erano presenti nelle cellule solo per un brevissimo periodo di tempo. Pertanto le cellule TC erano «comparse», come la gente che incontro di tanto in tanto quando scendo dal treno della linea A alla stazione della metropolitana della 168^a strada. Si espongono brevemente e quindi si nascondono di nuovo. La proteina codificata dalle trascrizioni espresse in modo così evanescente dalle cellule TC continua a essere presente a lungo, dopo la scomparsa dell'RNA che la codifica. La persistenza di questa proteina consente ai successori delle cellule TC di essere individuati, anche dopo che hanno, per così dire, cambiato lavoro. Era come se le cellule TC si fossero indelebilmente macchiate con ciò che stavano facendo, in modo da poter essere individuate per sempre in seguito. Allo stesso modo, è possibile riconoscere i pittori dalla vernice che hanno sulle mani, anche dopo che hanno smesso di dipingere, e gli studenti di medicina del primo anno dall'odore di cadavere che portano in giro dopo che hanno terminato le dissezioni. Quindi potevamo seguire il progresso delle cellule, che una volta erano cellule TC, anche dopo che non producevano più gli enzimi che consentivano loro di mimare le cellule nervose simpatiche.

Un enzima in particolare, noto come DBH (acronimo per dopamina beta-idrossilasi),² è presente nelle cellule TC e non è mai totalmente perduto dalla loro progenie. Il DBH è l'enzima finale della catena necessaria per produrre norepinefrina. Esso continua a essere presente in determinate cellule nervose del sistema nervoso enterico adulto, anche negli animali completamente maturi. Abbiamo riscontrato il DBH, per esempio, in cellule nervose mature contenenti serotonina. Siccome nessuna delle cellule nervose enteriche adulte che contengono DBH produce norepinefrina, il DBH non ha nulla da fare in queste cellule. Queste non possono neanche produrre la molecola su cui lavora il DBH. La nostra conclusione fu che il DBH presente nelle cellule nervose enteriche adulte è un superstito privo delle funzioni del loro passato storico, un ricordo della loro esistenza precedente. Le nostre osservazioni indicavano quindi che le cellule TC non muoiono, ma scompaiono, perché sono precursori che si differenziano in cellule nervose enteriche non contenenti norepinefrina (o qualsiasi altra catecolamina). Tuttavia, non era ovvio il motivo per il quale lo sviluppo delle cellule nervose enteriche dovesse essere così ingannevole da presentare prima un volto e poi un altro.

Greg Baetge proseguì la dimostrazione del fatto che le cellule TC presenti nell'intestino sono realmente parte di una popolazione maggiore di emigranti, derivati dalla cresta vagale. Pertanto le cellule TC si trovano sgranate lungo tutto il percorso della migrazione delle cellule della cresta vagale verso l'intestino. Di fatto, esse definiscono il tracciato vagale. Mentre i pionieri TC entrano presto nell'intestino e discendono bene lungo l'apparato intestinale, prima di iniziare a perdere i propri marcatori simpatici, altre cellule TC migrano con un passo più

tranquillo e vengono sorpassate dalle fibre dei nervi vagali che crescono verso il basso. Tuttavia, alla fine, la migrazione costante pulisce il tracciato vagale e tutte le cellule TC entrano nell'intestino.

Dopo che Greg terminò la propria formazione di laurea con me, proseguì la carriera come patologo nella California meridionale, da dove proveniva e dove da sempre sognava di ritornare. Quando Greg se ne andò, uno studente israeliano di postdottorato, Eran Blaugrund, lo sostituì nella prosecuzione del progetto. Eran era stato mandato da me da Chaya Kalcheim, un'altra emigrata argentina e biologa evolutiva israeliana che avevo conosciuto tramite Nicole Le Douarin. Chaya è una grande scienziata, che tratta i propri amici nella maniera in cui i politici trattano i grandi sovvenzionatori. Una volta devo aver fatto qualcosa di carino per Chaya, senza rendermene conto. È troppo buona con me per credere che non mi stia ripagando di un debito immaginario. Comunque, Eran fu un regalo di Chaya.

Evidentemente Eran venne da me per ricevere una formazione, ma sembrava quasi uno scherzo, perché arrivò perfettamente preparato. Era nel mio laboratorio da poco più di una settimana, quando iniziò a insegnare agli altri come migliorare le procedure. L'apparato intestinale era un argomento nuovo per lui, come pure le cellule TC, ma per quanto mi riguardava, avevo acquisito un collaboratore esperto, non un apprendista. L'obiettivo di Eran era cercare di capire perché almeno alcune delle cellule che partecipano alla formazione del sistema nervoso enterico dedicano così tanta energia all'imitazione delle cellule nervose simpatiche, semplicemente per stancarsi di questo gioco dopo alcuni giorni e smettere tutto. Immaginate un travestito che faccia di tutto per perfezionare l'abbigliamento, il trucco e il portamento del sesso opposto e poi, dopo averlo utilizzato per breve tempo, lasci perdere.

Quando Eran e io iniziamo ad analizzare il comportamento peculiare delle cellule TC, sapevamo che davano origine a cellule nervose enteriche, ma non sapevamo a quante. Ritenevamo che solo alcune cellule nervose enteriche si sviluppavano da progenitori TC, ma per quanto ne sapevamo allora, era possibile che l'intero sistema nervoso enterico si comportasse così. L'osservazione del fatto che solo alcune cellule nervose enteriche mature sono marcate con DBH, il marcatore rimasto dalla fase TC dei loro progenitori, suggeriva che solo una sotto-serie di cellule nervose enteriche avesse antenati TC. Eppure, siccome non avevamo idea di quanto l'espressione del DBH fosse un tatuaggio indelebile, era possibile che le cellule nervose mature che non esprimevano il DBH potessero essere riuscite a cancellarlo (reprimerlo). Decidemmo di cercare di scoprire se la mimica simpatica fosse una stravaganza espressa da alcuni precursori eccentrici, oppure una peculiarità dell'intera serie di emigranti derivati della cresta nell'intestino.

Il precursore di tutto?

Mentre stavamo studiando l'universalità dell'origine TC delle cellule nervose enteriche, Carnahan, Anderson e Patterson pubblicarono un articolo che suggeriva che l'intero sistema nervoso enterico, il sistema nervoso simpatico e la parte centrale della ghiandola surrenale (la midollare del surrene) siano tutti derivati da un precursore embrionale comune. Chiamarono questa specie di «Abramo» della cellula, la cui progenie sarebbe numerosa quanto le stelle del cielo e la sabbia del mare, il progenitore *simpatico-adreno-enterico*. David Anderson e Paul Patterson stanno alla neurobiologia evolutiva come E.F. Hutton stava al mondo finanziario nei vecchi spot televisivi. Quando parlano la gente ascolta. L'ipotetico progenitore simpatico-adreno-enterico dominò il nostro pensiero e ci accingemmo a determinare se esistesse effettivamente.

La proposta che le cellule nervose enteriche e quelle simpatiche fossero ancestralmente collegate si basava sull'osservazione del fatto che le cellule TC mimano di più le proprietà delle cellule nervose simpatiche, anziché semplicemente il meccanismo coinvolto nella produzione e nell'uso della norepinefrina. Le cellule TC e le cellule nervose enteriche indossano anche la stessa uniforme. Mentre si sviluppano, le cellule esprimono una serie distinta di proteine nella propria membrana plasmatica, dette *antigeni di differenziazione*, poiché gli anticorpi di queste proteine sono prodotti quando vengono introdotte in un animale di specie diverse. La serie particolare di antigeni di differenziazione che le cellule presentano all'esterno costituisce letteralmente la loro uniforme e consente ai membri della stessa tribù di essere individuati. Carnahan, Anderson e Patterson avevano seguito la comparsa e la scomparsa di una serie di antigeni di differenziazione sulle superfici delle cellule nervose simpatiche. Queste proteine erano parse dapprima come specifiche dei precursori simpatici e surrenalici, ma il loro nuovo articolo rivelava ora che avevano scoperto come gli stessi antigeni di differenziazione fossero anche espressi da cellule TC presenti nell'intestino fetale. Questi antigeni di differenziazione, inoltre, non sono solo condivisi da cellule TC e cellule nervose simpatiche, ma compaiono e scompaiono su entrambi i tipi di cellula, negli stessi momenti durante lo sviluppo. Pertanto, le cellule enteriche e simpatiche fanno di più che indossare semplicemente la stessa uniforme. La indossano e se la tolgono anche in sincronia. Fu questa condivisione di uniforme e la sincronizzazione nell'indossarla e toglierla che suggerirono a Carnahan, Anderson e Patterson che le cellule TC e le cellule nervose simpatiche appartenessero allo stesso esercito cellulare.

Eran riusciti a fare in modo che le cellule TC conducessero la propria routine in una coltura tissutale. Rimosse l'intestino di ratti fetali, utilizzò enzimi idonei per dissolvere la «colla» (matrice extracellulare) che tiene insieme le cellule e mise in coltura la sospensione risultante di cellule «dissociate». E così invero, alcune delle cellule in coltura acquisirono le caratteristiche delle cellule nervose simpatiche e poi le persero, anche se le cellule crescevano tutte da sole in una soluzione definita. Questo fenomeno era interessante di per sé, poiché dimostrava che la temporaneità delle cellule TC è il risultato di proprietà intrinseche delle cellule stesse. Le

cellule TC non hanno bisogno di ricevere segnali da un'altra parte del feto, o persino dell'intestino, per perdere il proprio aspetto simpatico. Sono programmate per imitare le cellule nervose simpatiche per un periodo definito di tempo e smettono semplicemente di fare ciò alla scadenza di questo periodo.

Eran proseguì la ricerca, utilizzando anticorpi che riconoscono la serie simpatica degli antigeni di differenziazione sulle superfici delle cellule TC, come agenti selettivi di morte. Un gruppo di proteine ematiche, detto *complemento*, esegue firi mortali nella membrana plasmatica delle cellule che hanno anticorpi legati alle loro superfici. Il complemento ignora le cellule alle quali non sono attaccati anticorpi. Così Eran aggiunse sia anticorpi sia complemento a queste colture e attese che le cellule TC morissero. L'approccio di Eran fu positivo. Tutte le cellule delle sue colture, che cominciavano anche solo a esprimere gli antigeni di differenziazione che le marcavano come cellule TC, furono uccise istantaneamente. Se tutte le cellule del sistema nervoso enterico avessero dovuto derivare da precursori delle cellule TC, allora nessuna cellula nervosa sarebbe stata in grado di svilupparsi nelle colture esposte ad anticorpi e complemento. Di fatto, però, nonostante il trattamento, le cellule nervose continuavano a svilupparsi, anche se in numero ridotto. Queste osservazioni suggerivano che esistono almeno due ceppi di precursori di cellule nervose enteriche. Una può essere comune al sistema nervoso simpatico, ma l'altra chiaramente non lo è.

I nostri studi sullo sviluppo delle cellule TC mi portarono a chiamare David Anderson per discutere la problematica con lui. A quel tempo lui aveva studiato un topo geneticamente modificato, nel quale era stato disattivato un gene essenziale per lo sviluppo del sistema nervoso simpatico. Questo gene si chiama *mash-1*.³ Siccome le cellule nervose simpatiche dipendono dal *mash-1*, i topi con knockout (disattivazione) del *mash-1* nascono quasi senza sistema nervoso simpatico. I topi con knockout del *mash-1* morirono tutti alla nascita. David aveva notato l'esistenza di cellule nervose nell'intestino degli animali con knockout del *mash-1*, che si sviluppano durante la vita fetale, anche se la loro comparsa iniziale avviene con due giorni di ritardo. Ovviamente, il fatto che le cellule nervose enteriche siano presenti in topi nei quali lo sviluppo del sistema nervoso simpatico viene perduto, non sostiene l'idea che le cellule nervose enteriche e simpatiche abbiano origine da un progenitore comune. Come concetto, la mutazione può non essere mortale per il precursore simpatico-adreno-enterico postulato, ma solo per le cellule nervose simpatiche che hanno origine da esso, a uno stadio successivo di sviluppo. Fu così possibile aggirare i fatti spiacevoli, con una spiegazione (o razionalizzazione). Tuttavia, dopo averci pensato, David fu d'accordo con me sul fatto che fosse interessante studiare ulteriormente la serie particolare di cellule nervose enteriche che si sviluppano nell'intestino dei topi con knockout del *mash-1*.

Dopo avere discusso i dati di Eran, David accettò di collaborare con noi per verificare l'ipotesi che esistano linee multiple di precursori di cellule nervose enteriche. Io sapevo già, grazie agli studi condotti con Taube Rothman e con un associato, Tuan Pham, che cellule nervose enteriche di diversi tipi hanno origine in una sequenza riproducibile. Le cellule che

contengono serotonina erano tra le prime a svilupparsi, mentre quelle che contenevano un peptide detto CGRP⁴ erano le ultime. Il concetto che ci accingevamo a valutare era che il ritardo nello sviluppo di cellule nervose enteriche, osservato da David nei topi con knockout del *mash-1*, non fosse il risultato di un ritardo generale che occorreva nei topi che non erano normali, ma piuttosto il risultato di una specifica perdita di cellule nervose enteriche che si sviluppano precocemente. L'eliminazione selettiva della sottoserie di cellule nervose enteriche nate precocemente avrebbe creato un ritardo nella comparsa di cellule nervose nell'intestino fetale. Anche se le cellule nervose «nate in anticipo» non fossero comparse, le cellule nervose con sviluppo ritardato si sarebbero presentate a tempo debito, dando l'impressione di un ritardo evolutivo.

Volevamo individuare la fonte delle cellule nervose nate precocemente che, secondo la nostra proposta, sarebbero mancate negli apparati intestinali dei topi con knockout del *mash-1*. Le cellule TC mimano le proprietà delle cellule nervose simpatiche; pertanto, erano i nostri candidati primari. Siccome le cellule nervose contenenti serotonina si sviluppano presto e contengono DBH quando crescono, ipotizzammo che le cellule nervose contenenti serotonina si sviluppano da precursori delle cellule TC. Al contrario, siccome le cellule nervose contenenti CGRP nascono tutte in ritardo, proponemmo che nessuna di esse abbia origine da cellule TC. Le nostre ipotesi potevano così essere facilmente verificate. Esse prevedevano che i topi con knockout del *mash-1* non avrebbero avuto cellule nervose enteriche contenenti serotonina, ma avrebbero posseduto una normale serie completa di cellule nervose che contengono CGRP. Pochissime tra le mie ipotesi sono state confermate dagli esperimenti effettivi in modo così preciso come queste.

Quando esaminammo l'intestino del topo con knockout del *mash-1*, non erano presenti, come previsto, cellule TC e cellule nervose contenenti serotonina; tuttavia, erano presenti le cellule nervose contenenti CGRP. Riscontrammo inoltre che il gene *mash-1* era espresso selettivamente dalle cellule TC nell'intestino fetale normale. Quindi Eran ritornò alle proprie colture e rilevò che gli anticorpi e il complemento utilizzato per distruggere le cellule TC avevano impedito lo sviluppo di cellule nervose contenenti serotonina, ma non di quelle contenenti CGRP. Perciò questi studi stabilirono che esistono ceppi multipli (almeno due) dei precursori, che contribuiscono allo sviluppo del sistema nervoso enterico. Quindi il ceppo d'origine e il micro-ambiente enterico definiscono il sistema nervoso enterico.

I fattori ambientali lavorano solo su cellule preparate a rispondere a essi. Prima che una cellula possa essere influenzata da qualunque tipo di segnale, per esempio, deve esprimere recettori sulla propria superficie e questi recettori devono essere accoppiati a un meccanismo di trasduzione interno. I ceppi d'origine cui appartengono le cellule determinano la serie di recettori che esse esprimono e le vie di trasduzione alle quali sono collegati questi recettori; pertanto, le linee cellulari d'origine decidono quali segnali possono influire sui precursori delle cellule nervose.

Per studiare i segnali micro-ambientali dell'intestino fetale in azione, è necessario estrarre le cellule neurali derivate dalla cresta dall'intestino, dopo che lo hanno colonizzato, e separarle dalle loro vicine, non derivate dalla cresta neurale. Le cellule derivate dalla cresta isolate possono quindi essere messe in coltura in un mezzo⁵ definito (che non contiene di per sé alcuna sostanza potenzialmente interferente) ed esposte a molecole di segnale. L'obiettivo di tutte queste manipolazioni è isolare i precursori del sistema nervoso enterico da influssi esterni incontrollati. Se alle cellule di vario tipo dovesse essere consentito interagire, non si potrebbe sapere in alcun modo che cosa si dicono l'una con l'altra. Una cellula potrebbe facilmente consegnare di nascosto a un'altra un messaggio evolutivo falso, senza essere scoperta. I risultati sorprendenti sono positivi per la scienza, ma, quando si permette ai soggetti sperimentali di interagire in maniera ignota, si commettono errori. I soggetti di ricerca, comprese le cellule, devono essere trattati come i cittadini in una dittatura. Per mantenere il controllo della popolazione, è essenziale isolare gli individui da qualsiasi possibilità di input, eccetto quelli forniti da chi ha il controllo. I segnali sconosciuti sono i nemici degli scienziati nello stesso modo in cui il fax e Internet sono i nemici degli autocrati.

Isolare le cellule della cresta neurale è facile se ci si accontenta di ricavarle, prima che migrino verso gli organi da colonizzare. Basta rimuovere il tubo neurale che si sta chiudendo e metterlo in coltura. Le cellule della cresta neurale quindi si separano, migrando lontano dal tubo neurale, lungo la superficie della piastra di coltura. Dopo l'esodo delle cellule della cresta neurale, il tubo neurale si può rimuovere dalla coltura, con un sottile ago di tungsteno, e nella coltura non resta quasi nient'altro se non le cellule della cresta neurale. Tuttavia, queste cellule non sono uguali a quelle che colonizzano l'intestino. Le cellule che hanno completato la propria migrazione attraverso un embrione per entrare nell'intestino sono sia più vecchie sia più esperte dei propri predecessori premigratori. Le cellule postmigratorie dovrebbero essere chiamate «derivate dalla cresta neurale», piuttosto che cellule «della cresta neurale», poiché hanno subito cambiamenti che o sono stati programmati secondo istruzioni genetiche per avvenire spontaneamente appena le cellule maturano, oppure come risposta a segnali che le cellule incontrano lungo il proprio percorso migratorio. Per studiare gli effetti dei segnali micro-ambientali sullo sviluppo delle cellule nervose enteriche, pertanto, è necessario pescare le cellule derivate dalla cresta neurale dall'apparato intestinale stesso.

Trovare un metodo relativamente semplice per isolare le cellule derivate dalla cresta neurale da un segmento di recente colonizzazione dell'intestino fetale era un problema difficile, che impedì il progresso per diversi anni. Le cellule derivate dalla cresta neurale migrano attraverso la miscela dell'intestino fetale con altri tipi di cellule e, se non fosse per i marcatori molecolari, sarebbe impossibile distinguerle dalle loro vicine, non derivate dalla cresta neurale. Tuttavia, esistono i marcatori molecolari. Gli antigeni di differenziazione, che comprendono l'uniforme distintiva indossata dalle cellule, consentono alle cellule derivate dalla cresta neurale di essere

identificate nella parete dell'intestino fetale. Eran Blaugrund aveva usato anticorpi degli antigeni di differenziazione espressi da cellule TC per selezionarne la morte. Ora io decisi di utilizzare anticorpi simili per selezionare l'intera popolazione di cellule derivate dalla cresta neurale, per destinarle a una vita in coltura.

Iniziai i miei esperimenti per isolare le cellule derivate dalla cresta neurale nell'intestino fetale, insieme con Howard Pomeranz e Taube Rothman, e li terminai con Alcmène Chalazonitis. Prima di unirsi al mio laboratorio Alcmène aveva operato come ricercatrice indipendente presso l'Albert Einstein Medical School. Al contrario degli studenti laureandi e studenti di postdottorato con i quali lavoro di solito, Alcmène era già una ricercatrice di fatto. Quindi venne per collaborare, non per essere formata. Il metodo che utilizzammo era scegliere un antigene di differenziazione, espresso nell'intestino solo da cellule originarie della cresta neurale. Quindi dissociammo l'intestino fetale con enzimi, per produrre una sospensione di cellule isolate, e le esponemmo ad anticorpi, che riconoscevano specificamente l'antigene che avevamo selezionato. Questo trattamento decorava le superfici delle cellule derivate dalla cresta neurale con anticorpi. La fase successiva era aggiungere una seconda serie di anticorpi che reagivano non alle cellule, ma agli anticorpi che avevamo appena applicato agli antigeni di differenziazione sulle superfici cellulari. Questi secondi anticorpi erano accoppiati a perle magnetiche. Quando successivamente applicammo un magnete alla sospensione cellulare, le cellule derivate dalla cresta neurale, che ora contenevano un rivestimento di perle magnetiche, erano attratte da esso. La cosa stupefacente di questo processo di *immunoselezione* magnetica fu che funzionava davvero. Ci ritrovammo con due gruppi di cellule. Uno, il gruppo «immunoselezionato», conteneva una popolazione quasi pura di cellule derivate dalla cresta neurale. L'altro, il gruppo «residuo», conteneva un misto di tutte le cellule rimaste dopo la rimozione delle cellule derivate dalla cresta neurale mediante il campo magnetico. La popolazione «residua» di cellule era quindi deprivata di cellule della cresta neurale.

Perciò, quando mettemmo in coltura le cellule dei due gruppi ottenuti mediante immunoselezione provenienti da intestini in corso di sviluppo di topo, ratto, pollo o quaglia, le cellule nervose e la glia si svilupparono solo nelle colture delle cellule immunoselezionate. Le colture delle cellule residue contenevano muscolatura liscia. Alcuni anni più tardi, Jun Wu, uno studente del corso di laurea che lavora ancora con me, scopri che anche le cellule interstiziali di Cajal si sviluppavano esclusivamente in colture di cellule residue. Gli esperimenti di Jun confermarono che le cellule interstiziali di Cajal, che solo di recente avevano dimostrato essere reali, non sono derivate dalla cresta neurale. Le cellule interstiziali sono presenti nelle colture di cellule residue, perché provengono dalla stessa famiglia di progenitori che produce anche la muscolatura liscia. Non eravamo i primi a giungere a questa conclusione. Kent Sanders e Nicole Le Douarin lo avevano già suggerito prima. L'ipotesi di Kent si basava sull'osservazione del fatto che una varietà di molecole, ritenute specificamente espresse dalla muscolatura liscia, si trovano anche nelle cellule interstiziali di Cajal. La conclusione di Nicole si basava su esperimenti effettuati con chimere quaglia-pollo. Quando sostitui la cresta neurale vagale di un

embrione di pollo con quella di una quaglia, tutte le cellule nervose che si svilupparono nell'intestino sopra l'ombelico erano cellule di quaglia, ma tutte le cellule interstiziali di Cajal erano di pollo.

L'immunoselezione fornì a Alcènne lo strumento necessario per studiare il significato molecolare del termine «micro-ambiente enterico». Le cellule derivate dalla cresta neurale che immunoselezionò dall'intestino potevano essere esposte a molecole che lei riteneva potessero essere fattori di crescita per le cellule nervose enteriche, e la risposta delle cellule derivate dalla cresta neurale a questi fattori poteva essere determinata in modo non ambiguo. Alcènne poté inoltre esaminare direttamente i recettori del fattore di crescita espresso dalle cellule derivate dalla cresta neurale, poiché disponeva di una serie purificata di queste cellule da analizzare; inoltre, poteva distinguere i fattori prodotti dalle cellule derivate dalla cresta neurale per comunicare l'una con l'altra, dai fattori prodotti dalle cellule non derivate dalla cresta neurale della parete intestinale. Per la prima volta, era stato possibile «inserirsi» nelle conversazioni molecolari tra le cellule che influiscono sullo sviluppo del secondo cervello.

Segnali e knockout

Alcmène iniziò i propri studi esaminando i membri di una famiglia di fattori di crescita detti *neurotrofine*. Il primissimo fattore di crescita di qualunque tipo mai identificato, il *fattore di crescita nervoso* (detto NGF), è una neurotrofina. Rita Levi-Montalcini e Stanley Cohen ricevettero il premio Nobel per il proprio contributo alla scoperta dell'NGF. La famiglia delle neurotrofine è nota avere almeno cinque membri: NGF, fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF) e neurotrofina-3, -4/5 e -6 (*NT-3*, *NT4/5* e *NT-6*). L'NT-6 è stato scoperto solo recentemente e non si sapeva che esistesse al tempo dello studio di Alcmène. Tutte le neurotrofine si legano a due tipi di recettore. Uno di questi recettori, comunemente detto p75^{NTR}, non è discriminante nei propri gusti per le neurotrofine ed è felice di consentire a qualunque di esse di legarsi a lui. Il secondo tipo di recettore è più selettivo, lega neurotrofine con maggiore affinità e mostra preferenze per neurotrofine particolari. Le molecole selettive sono dette recettori Trk.⁶ Esistono tre recettori Trk. Al TrkA piace l'NGF, il TrkB preferisce BDNF oppure NT-4/5, mentre il TrkC preferisce l'NT-3.

Ciò che spinse Alcmène verso le neurotrofine fu il fatto che Greg Baetge aveva in precedenza scoperto che tutte le cellule derivate dalla cresta neurale che colonizzano l'intestino fetale esprimono p75^{NTR}. Di fatto, Alcmène trovò che gli anticorpi del p75^{NTR} sono sonde stupende per l'immunoselezione delle cellule derivate dalla cresta nell'intestino fetale. L'espressione di p75^{NTR} da parte della popolazione enterica di cellule derivate dalla cresta suggerisce che almeno alcune di queste cellule tendono a rispondere a una o più neurotrofine; tuttavia, siccome il p75^{NTR} non è selettivo, la sua espressione non dice nulla in merito a quale(i) neurotrofina(e) possa(no) influire sullo sviluppo di cellule nervose enteriche o glia.

Anche se Alcmène provò tutte le neurotrofine eccetto l'NT-6 (che non era stata ancora individuata), in realtà riscontrò che solo l'NT-3 esercitava un effetto sullo sviluppo delle cellule derivate dalla cresta neurale, immunoselezionate da lei dall'intestino fetale. L'NT-3 favoriva lo sviluppo di cellule nervose e di glia nelle colture, mentre NGF, BDNF e NT-4/5 non facevano nulla di rilevabile. In presenza di NT-3 veniva prodotto un maggior numero di cellule nervose enteriche, ma l'NT-3 non causava la proliferazione di cellule precursori; pertanto, l'NT-3 doveva avere aumentato la proporzione dei precursori che scelgono di differenziarsi come cellule nervose o glia. Alcmène riscontrò inoltre che le cellule nervose indotte a svilupparsi mediante NT-3 ne diventavano dipendenti. Una volta che queste cellule rispondevano all'NT-3, esse diventavano così dipendenti da una «dose» di NT-3 che morivano se esso non veniva più rifornito. Pertanto l'NT-3 è un fattore di sopravvivenza oltre che un fattore che favorisce lo sviluppo di cellule nervose enteriche e glia.

Alcmène continuò a eseguire esperimenti analoghi, che stabilirono l'efficacia di diversi fattori di crescita aggiuntivi. Il più potente di essi era detto GDNF (neurotrofina derivata dalla linea gliale cellulare). Originariamente questo fattore era stato scoperto come prodotto di secrezione da una linea di cellule gliali in coltura, che erano state derivate da un tumore maligno. L'azione del

GDNF che per prima attrasse l'attenzione fu la capacità di favorire lo sviluppo e la sopravvivenza in coltura di cellule di mesencefalo, che contengono il neurotrasmettitore *dopamina*. Siccome la degenerazione di queste cellule è la causa del morbo di Parkinson, qualunque cosa accentui la capacità di sopravvivere delle cellule nervose del cervello medio, contenenti dopamina, è considerata fattore fondamentale. Come ho osservato in precedenza, il morbo di Parkinson può colpire il sistema nervoso enterico oltre al cervello. Di fatto, le lesioni sintomatiche, dette *corpi di Lewy*, che consentono ai neuropatologi di eseguire una diagnosi tissutale certa del morbo di Parkinson, non si trovano solo nel cervello, ma anche nell'intestino. Siccome le cellule nervose del mesencefalo contenenti dopamina e quelle enteriche degenerano entrambe nel morbo di Parkinson, deducemmo che il sistema nervoso enterico può contenere almeno alcune cellule correlate alle cellule nervose contenenti dopamina del mesencefalo. Se ciò fosse vero, allora ciò che il GDNF fa di positivo per le cellule nervose del cervello, potrebbe farlo anche per le cellule nervose dell'intestino.

Almène e io impiegammo del tempo per arrivare a studiare le azioni enteriche del GDNF. Appena ci riuscimmo, fummo certi che il GDNF si sarebbe dimostrato un importante protagonista nello sviluppo del sistema nervoso enterico. Vassilis Pachnis, che lavorava dall'altra parte della strada alla Columbia, nel laboratorio di Frank Costantini, aveva prodotto topi portatori di una mutazione target in un gene detto *c-ret*. Quando Vassilis e Frank produssero questi animali knockout, sapevano che il *c-ret* codificava un recettore di superficie cellulare, il Ret (il Ret, come i recettori Trk, è un recettore della tirosina chinasi); tuttavia la molecola (legante) che si legava al Ret e che lo attivava era sconosciuta. Nonostante non sapessero quale potesse essere il suo legante, Vassilis e Frank erano interessati al Ret, perché le mutazioni nel gene *RET*⁷ umano causano terribili problemi clinici. Queste mutazioni, che consentono al recettore di attivarsi spontaneamente (vale a dire che il Ret si attiva anche in assenza di un legante che lo stimoli), si riscontrano in soggetti che soffrono, e spesso muoiono, di carcinomi multipli delle ghiandole endocrine. Vassilis e Frank speravano di riuscire a comprendere la normale funzione del Ret nello sviluppo, determinando che cosa vada storto quando il Ret è assente. I topi knockout, che non avevano Ret, morirono alla nascita ed erano privi di cellule nervose al di sotto dell'esofago e della regione immediatamente adiacente dello stomaco (i topi senza Ret, inoltre, sono privi di reni). I topi con knockout del *c-ret* quindi dimostrarono che la stimolazione del Ret è assolutamente essenziale per lo sviluppo di tutte le cellule nervose enteriche, eccetto per la piccola popolazione che proviene dalla cresta neurale del tronco e che colonizza l'esofago e un pezzetto della regione adiacente dello stomaco.

Successivamente diversi gruppi di ricercatori scoprirono che il legante funzionale che stimola il Ret era il GDNF.⁸ Quindi, una mutazione con il target nel prevenire l'espressione del GDNF produce esattamente gli stessi effetti mortali di una mutazione che elimina il Ret. In entrambi i casi, quindi, il sistema nervoso enterico è condannato comunque, che si estragga il legante o il suo recettore. Mentre queste osservazioni mostrano chiaramente che lo sviluppo del sistema nervoso enterico è dipendente dal GDNF, gli studi sugli animali knockout non dimostrano il

perché. Le cellule dell'intestino in corso di sviluppo che esprimono il Ret hanno tutte origine dalla cresta neurale e ciò suggerisce che queste cellule siano di per sé probabili target del GDNF. Di fatto, David Anderson aveva usato anticorpi del Ret per immunoselezionare le cellule derivate dalla cresta neurale nell'intestino fetale di topi. Molte delle cellule immunoselezionate dagli anticorpi del Ret erano multipotenti e ciò indicava che il loro stato di differenziazione non era molto avanzato.

L'ipotesi che Alcènè e io ci accingevamo a verificare era che il GDNF sia richiesto per stimolare lo sviluppo dei precursori più precoci e più primitivi, derivati dalla cresta neurale sacrale e dalla vagale del sistema nervoso enterico. Se un comune progenitore di tutto deve essere stimolato dal GDNF per differenziarsi o sopravvivere, allora nell'ambito di un sistema nervoso enterico non si potrebbe prevedere nulla che sviluppasse l'assenza di GDNF o Ret. La nostra ipotesi quindi avrebbe spiegato ciò che accade nell'intestino di topi con knockout di GDNF oppure Ret.

Alcènè immunoselezionò cellule derivate dalla cresta neurale di topi fetali di varie età, mise le cellule in coltura e le espose al GDNF. I risultati furono spettacolari. Quando per la prima volta Alcènè esaminò una piastra di cellule trattate con il GDNF, sussultò. Nessuno di noi aveva mai visto nulla del genere. L'NT-3 aveva favorito lo sviluppo di cellule nervose, ma i suoi effetti non erano nulla rispetto a quelli del GDNF. La piastra di coltura conteneva un «campo» virtuale di cellule nervose.

La ragione per la quale l'effetto del GDNF fu così stupefacente è il fatto che esso compie qualcosa che l'NT-3 e gli altri fattori di crescita studiati in precedenza non fanno. Come l'NT-3, il GDNF favorisce lo sviluppo e la sopravvivenza di cellule nervose enteriche, ma a differenza dell'NT-3, il GDNF provoca anche la proliferazione dei precursori di queste cellule derivati dalla cresta neurale. Ne risulta che la popolazione trattata con GDNF, nell'insieme cresce e acquisisce un numero maggiore di progenitori delle cellule nervose. Questi effetti sminuiscono le azioni degli altri fattori di crescita, che accentuano la differenziazione delle cellule nervose enteriche e gli altri a spese dei precursori proliferanti.

Alcènè riscontrò che gli effetti del GDNF sono altamente dipendenti dall'età. Il GDNF è molto efficace all'inizio dello sviluppo, ma la sua efficacia diminuisce quando viene applicato a cellule di feti più maturi. Nei primissimi tempi, quando l'effetto del GDNF è al massimo della potenza, le cellule enteriche derivate dalla cresta non sono in grado di rispondere affatto all'NT-3. I primi precursori del sistema nervoso enterico rispondono così al GDNF prima di diventare reattivi all'NT-3. Di fatto, se i progenitori non vedono prima il GDNF, non saranno mai in grado di rispondere all'NT-3. Alla fine, una volta che le cellule acquisiscono la capacità di rispondere all'NT-3, gli effetti di GDNF e NT-3 si sommano, in modo che l'effetto delle cellule esposte a una combinazione di questi due fattori è maggiore di quello di uno dei due da solo. Queste osservazioni erano tutte ben compatibili con la nostra ipotesi di partenza.

È stupefacente come siano diversi gli effetti sull'intestino dell'esclusione di GDNF o Ret da quelli dell'esclusione di *mash-1*. La perdita di GDNF o Ret è una catastrofe, che impedisce

persino lo sviluppo di una singola cellula nervosa o gliale, in qualunque parte dell'intestino al di sotto dell'esofago e dello stomaco adiacente. La perdita di *mash-1*, tuttavia, elimina selettivamente solo un ceppo di cellule nervose enteriche e consente alle cellule gliali di svilupparsi a piacimento. Effetti ancora più limitati vengono prodotti dal knockout di altri geni coinvolti nella costruzione del sistema nervoso enterico.

L'esempio di un effetto più limitato si osserva quando si eseguono mutazioni che hanno come target l'eliminazione di geni che codificano recettori per una classe di fattori di crescita chiamati *citochine neuropoietiche*. Il knockout del recettore della citochina neuropoietica causa solo l'assenza specifica delle cellule nervose motorie che eccitano o inibiscono la muscolatura liscia.⁹ (Io detesto il nome «citochina neuropoietica», difficile da pronunciare e da ricordare, o persino da sillabare. Esiste una logica nella nomenclatura, ma siccome è arcana, tecnica e neppure interessante, preferisco non ricordarmela). Per quanto riguarda il topo appena nato, la differenza degli effetti di questi diversi knockout genetici è altamente accademica. Quello che succede al topo è sempre la stessa cosa. L'intestino si gonfia poco dopo la nascita e il topo muore. O il sistema nervoso enterico è pronto e attivo il giorno della nascita, oppure un animale non sopravvive per più di qualche ora. D'altra parte, per quanto riguarda gli scienziati, le differenze degli effetti dei diversi knockout e le azioni dei fattori di crescita sono altamente informative.

La danza

La ricerca sulle azioni dei diversi fattori di crescita suggerisce che lo sviluppo del sistema nervoso enterico sia come una combinazione di passi di danza. (Questa danza e gli effetti dei possibili errori sono illustrati nella figura). L'ordine sequenziale dei passi è importante quanto lo stile dei passi stessi. I primi fondatori del sistema nervoso enterico esprimono il Ret quando entrano nell'intestino e hanno bisogno di essere accarezzati dal GDNF, che è prodotto da cellule non derivate dalla cresta neurale nella parete dell'intestino. I fondatori muoiono se il GDNF viene portato via e, se la stimolazione prodotta dal GDNF è assente, non esisterà affatto il sistema nervoso enterico. Pertanto, se il primo passo (stimolazione GDNF) viene eseguito male, non importa più che cosa viene dopo.

Quando i precursori derivati dalla cresta neurale sono adeguatamente stimolati dal GDNF, essi continuano a organizzarsi in due ceppi cellulari distinti, uno dei quali deve esprimere il gene *mash-1*, mentre l'altro no. Questo è il passo successivo della combinazione. Se il gene *mash-1* viene eliminato, le cellule TC non compaiono, e tutte le cellule nervose con sviluppo precoce che hanno origine da cellule TC sono perdute. Le cellule nervose che si sviluppano tardi, però, continuano a differenziarsi come da programma. Quando manca il gene *mash-1*, non ci sono quindi cellule nervose contenenti serotonina (e probabilmente nessun nervo motorio verso la muscolatura liscia), ma sono presenti cellule nervose che contengono CGRP e glia. Il ceppo d'origine *mash-1* sembra quindi organizzarsi in ceppi secondari ancora più ristretti. Uno dei ceppi secondari diventa dipendente dalla stimolazione del recettore neuropoietico citochina e forma le cellule nervose motorie, che parlano alla muscolatura liscia. Questo è il terzo passo della combinazione; NT-3 e TrkC probabilmente influiscono anche su gruppi più piccoli di cellule nervose rispetto alla citochina neuropoietica, perché, diversamente dagli altri fattori, NT-3 e TrkC possono essere eliminati senza danneggiare a morte lo sviluppo del sistema nervoso enterico. Le loro azioni quindi rappresenterebbero passi ancora successivi della danza evolutiva del sistema nervoso enterico. Pertanto, nello sviluppo del sistema nervoso enterico, prima si richiede un determinato segnale, più profondo sarà l'effetto della sua eliminazione.

COLONIZZAZIONE DELL'INTESTINO DOPO IL KNOCKOUT DI GDNF O DI RET

Le cellule precursore migrano ancora verso l'intestino dalla cresta neurale



Le cellule derivate dalla cresta vagale e sacrale muoiono perché non possono sopravvivere se non sono stimolate da GDNF. L'intestino diventa agangiare al di sotto dell'esofago e dello stomaco adiacente

COLONIZZAZIONE DELL'INTESTINO DEL TOPO CON KNOCKOUT DI *MASH-1*

Le cellule precursore migrano verso l'intestino dalla cresta neurale; la popolazione è multipotente



Le cellule derivate dalla cresta vagale e sacrale proliferano e popolano l'intestino al di sotto dell'esofago

All'interno dell'intestino, le cellule esprimono Ret

Prendono la "dose di GDNF" così sopravvivono



Tutte le cellule *mash-1*-dipendenti muoiono; pertanto, l'intestino manca di tutte le cellule nervose (derivate dalle cellule TC) di questo ceppo

Il ceppo *mash-1*-indipendente si sviluppa come da programma



Identità?

Cellule nervose contenenti CGRP

COLONIZZAZIONE DELL'INTESTINO DEL TOPO DOPO KNOCKOUT DEL RECETTORE CITOCHINA NEUROPOIETICO

Le cellule precursore migrano verso l'intestino dalla cresta neurale;
la popolazione è multipotente

Le cellule derivate dalla cresta vagale e sacrale proliferano e popolano
l'intestino al di sotto dell'esofago

All'interno dell'intestino,
le cellule esprimono Ret

Prendono la "dose di GDNF"
così sopravvivono

Il ceppo *masb-1*-dipendente
sopravvive

Il ceppo *masb-1*-indipendente
sopravvive

Cellule nervose contenenti
serotonina

Non ci
sono cellule
nervose
motorie

Identità?

Cellule nervose contenenti CGRP

COLONIZZAZIONE DELL'INTESTINO DEL TOPO NORMALE

Le cellule precursore migrano verso l'intestino dalla cresta neurale;
la popolazione è multipotente



Le cellule derivate dalla cresta vagale e sacrale proliferano
e popolano l'intestino al di sotto dell'esofago



All'interno dell'intestino,
le cellule esprimono Ret

Hanno bisogno
di una "dose di GDNF"
per sopravvivere



Questa linea
è *mash-1*-dipendente



Questa linea
è *mash-1*-indipendente



Cellule nervose
contenenti
serotonina



Cellule nervose
motorie (citochina
neuroipietica-dipendenti)



Identità?



Cellule nervose
contenenti CGRP

La serotonina come segnale evolutivo

Anche se è ovvio che la vita stessa dipende dall'aver un sistema nervoso enterico che si sia sviluppato sufficientemente bene da funzionare al momento della nascita, il sistema nervoso enterico di un animale o di una persona appena nati non è ancora completamente maturo. Dopo la nascita lo sviluppo continua. Nei topi, le nuove cellule nervose enteriche continuano a generarsi per tutto il primo mese di vita. Non è mai stato determinato per quanto tempo dopo la nascita gli esseri umani continuano ad aggiungere cellule nervose enteriche, ma data la differenza di ciclo vitale tra gli esseri umani e i topi, un mese di vita di un topo equivarrebbe a poco più di tre anni di un essere umano. L'acquisizione postnatale di nuove cellule nervose enteriche significa che il sistema nervoso di un neonato è ancora plastico e in sviluppo. Pertanto è possibile che le prime esperienze di un intestino giovane possano influire sulla «personalità» del secondo cervello che matura al suo interno.

Anche se non ho mai visto uno studio che dimostri questo punto, si dice spesso che i bambini affetti da coliche intestinali diventano adulti con sindrome del colon irritabile. È difficile ottenere informazioni affidabili sul rapporto tra l'esperienza dell'intestino precoce e il comportamento dell'intestino maturo. Eppure, recenti osservazioni dell'effetto della serotonina sullo sviluppo delle cellule nervose enteriche mi hanno fornito una ragione molecolare per prendere sul serio l'idea che ciò che accade all'intestino durante l'infanzia possa influire sul tipo di apparato intestinale che esso diventa.

Il primo sviluppo di cellule nervose enteriche contenenti serotonina solleva la possibilità che la serotonina possa essere un fattore di crescita oltre che un neurotrasmettitore convenzionale. Questa possibilità è stata rafforzata da micrografie elettroniche del sistema nervoso enterico del porcellino d'India in sviluppo, prese anni fa da Diane Sherman. Queste immagini rivelavano che le cellule nervose enteriche per prime sviluppatasi, in realtà formano sinapsi sui precursori in corso di divisione delle cellule nervose enteriche. Anche le cellule EC contenenti serotonina del rivestimento dell'intestino si sviluppano prima che nasca il grosso delle cellule nervose enteriche. Perciò, le cellule nervose enteriche che si sviluppano tardi sono probabilmente esposte alla serotonina mentre si differenziano. Tuttavia per essere influenzate dalla serotonina, queste cellule nervose in corso di sviluppo devono esprimere recettori idonei.

Come ho già detto, i recettori della serotonina enterica sono argomenti che studio da lungo tempo. Più recentemente, ho collaborato con una giovane collega, Elena Fiorica-Howells, nel tentativo di donare il gene che codifica il recettore 5-HT_{1P} ancora sfuggente. Elena è estremamente piena di risorse. Anche se non è stata ancora in grado di donare il recettore 5-HT_{1P}, durante questo tentativo, ha donato altri diversi recettori della serotonina provenienti da gangli mienterici isolati. Uno di questi, il recettore 5-HT_{2B}, fōmì una sorpresa interessante. Precedentemente si pensava che questo recettore fosse espresso nell'intestino solo dalla muscolatura liscia in una regione particolare (il fundus) dello stomaco di topi e ratti. Perciò era difficile prendere sul serio il recettore 5-HT_{2B}, poiché non esiste una regione analoga nello

stomaco umano. Il fundus dello stomaco del ratto e del topo è un reparto specializzato, nel quale vivono batteri simbiotici che digeriscono la cellulosa ingerita da questi animali. Nonostante la convinzione prevalente che il recettore 5-HT_{2B} sia un recettore limitato alla muscolatura, Elena lo donò da cellule nervose dell'intestino tenue e crasso di cavie, nonché da quello di topi e ratti. In pratica, siccome per Elena il recettore 5-HT_{1P} era un limone, decise di utilizzare il recettore 5-HT_{2B} per fare la limonata.

Elena ottenne anticorpi da un collaboratore francese, Luc Maroteaux (che aveva anche donato il recettore 5-HT_{2B} del topo), per localizzare il recettore 5-HT_{2B} nei tessuti mediante tecnica immunocitochimica, e produsse sonde molecolari, in modo da poter utilizzare ibridazione *in situ* per localizzare le cellule nell'intestino che sintetizzavano il recettore 5-HT_{2B}. Non era possibile prevedere i risultati dei suoi esperimenti. Nell'intestino maturo del roditore, il recettore 5-HT_{2B} fu rilevato davvero nei gangli del plesso mienterico, ma solo in un piccolissimo numero di cellule. Il recettore poté essere rilevato in non oltre una cellula ogni quattro o cinque dei gangli mienterici adulti. Nei topi fetali, però, Elena trovò che il recettore 5-HT_{2B} è sorprendentemente abbondante e prodotto in molte cellule, virtualmente in ogni ganglio.

Studi dettagliati dimostrarono che il recettore 5-HT_{2B} è «regolato in modo evolutivo». Ciò significa che la sua espressione aumenta e diminuisce durante lo sviluppo, come l'Impero romano nel corso della storia. Il recettore 5-HT_{2B} fa il proprio debutto nell'intestino dei topi fetali il quattordicesimo giorno di gestazione, si mette in mostra il quindicesimo e sedicesimo giorno e quindi svanisce a livelli più alti di espressione, al momento della nascita dei topi, circa diciotto giorni dopo il concepimento. Questi tempi sono interessanti alla luce di ciò che avviene contemporaneamente alle fonti enteriche della serotonina. Il recettore 5-HT_{2B} è al massimo quando nascono le ultime cellule nervose contenenti serotonina (al quindicesimo giorno di gestazione) e quando compaiono per la prima volta le cellule EC contenenti serotonina (al sedicesimo giorno di gestazione). Quindi la tempistica della sua espressione suggerisce che il recettore 5-HT_{2B} nell'intestino fetale possa ben occuparsi delle azioni evolutive della serotonina.

Elena e io decidemmo che i dati preliminari erano sufficienti per verificare se la serotonina e il recettore 5-HT_{2B} influissero davvero sullo sviluppo delle cellule nervose enteriche. Eravamo anche incoraggiati dai dati che Luc Maroteaux aveva acquisito dagli studi sulle cellule derivate dalla cresta neurale craniale (la regione davanti alla cresta vagale) e sul sistema cardiovascolare, secondo i quali i recettori 5-HT_{2B} potevano esercitare effetti evolutivi. Elena isolò cellule derivate dalla cresta neurale dall'intestino di topi fetali, a età in cui aveva riscontrato la presenza del recettore 5-HT_{2B}, e li colturò in mezzi ben determinati, in presenza o in assenza di serotonina. Ebbene, la serotonina agiva come un fattore di crescita e favoriva lo sviluppo di cellule nervose enteriche nelle colture, almeno quanto aveva fatto il ben noto fattore di crescita NT-3 nei precedenti esperimenti di Alcènè Chalazontitis; inoltre, Elena poté mimare gli effetti della serotonina con un farmaco detto DOI (un derivato dell'LSD), conosciuto come un agonista che stimola il recettore 5-HT_{2B}. Poté anche bloccare gli effetti di serotonina e di DOI con

antagonisti di 5-HT_{2B} (metisergide o ritanserina). Queste osservazioni sono compatibili con l'idea che la serotonina sia un fattore di crescita che influisce sullo sviluppo del sistema nervoso enterico.

Molti ricercatori avevano in precedenza suggerito che la serotonina possa influire sullo sviluppo del cervello. L'evidenza a favore di queste ipotesi è forte ma piuttosto indiretta. Pertanto il lavoro di Elena è importante perché rappresenta la prima dimostrazione diretta del fatto che la serotonina favorisca realmente lo sviluppo di almeno alcune cellule nervose dei vertebrati. L'idea che la serotonina possa essere un fattore di crescita nonché un neurotrasmettitore esce così dal regno del sospetto ed entra nel mondo delle azioni dimostrate. Ora sappiamo che cosa *può fare* la serotonina ai precursori delle cellule nervose in corso di sviluppo. Data la presenza di serotonina nell'intestino fetale e la regolazione evolutiva dei recettori 5-HT_{2B}, sembra probabile che a favorire lo sviluppo delle cellule nervose enteriche sia qualcosa che la serotonina *fa* davvero nella vita reale. Tuttavia questa conclusione resta da dimostrare.

I neurotrasmettitori sono rilasciati da cellule nervose che vengono stimulate. Siccome un neurotrasmettitore, la serotonina, può influire sullo sviluppo delle cellule nervose enteriche, ne consegue che qualunque cosa attivi le cellule nervose enteriche contenenti serotonina (o altri neurotrasmettitori attivi nello sviluppo) nell'intestino immaturo influisce probabilmente, nel bene o nel male, sullo sviluppo del sistema nervoso enterico. Quest'esperienza dell'intestino neonato determina come diventino attive varie cellule nervose enteriche e quando queste cellule siano attivate o disattivate. Quindi, regolando l'attività delle cellule nervose enteriche e il rilascio dei neurotrasmettitori attivi nello sviluppo, come la serotonina, l'esperienza può modificare il corso dello sviluppo del sistema nervoso enterico. Ne consegue che sarebbe probabilmente saggio trattare bene l'intestino immaturo. Sfortunatamente, nessuno sa che cosa il sistema nervoso enterico immaturo consideri un buon trattamento. Ma, fortunatamente, questa domanda fornisce un'ulteriore motivazione per continuare la ricerca.

L'origine comune

La storia dello sviluppo del sistema nervoso enterico è incredibilmente simile alla storia dell'immigrazione in America. Su quest'argomento Irving Howe potrebbe avere scritto la prosecuzione del libro *The World of Our Fathers (Il mondo dei nostri padri)*, anche se forse avrebbe avuto qualche problema con il titolo. *The World of Our Fathers' Bellies (Il mondo della pancia dei nostri padri)* suona piuttosto male e *The Guts of Our Fathers (L'intestino dei nostri padri)* assume un significato diverso. I precursori delle cellule nervose enteriche sono tutti emigranti che vengono da lontano. La cresta neurale è il loro vecchio paese. Che cosa spinge queste intrepide cellule a migrare verso l'intestino promesso? Non è chiaro. Forse stanno cercando, in un modo non ben definito, di sfuggire alla tirannia del cervello e del suo vassallo, il midollo spinale? Le cellule derivate dalla cresta neurale sono emigranti alla ricerca della libertà e dell'indipendenza dall'intestino, dove il sistema nervoso enterico può operare, indipendentemente dal controllo del sistema nervoso centrale? I percorsi seguiti dagli emigranti, dalla cresta neurale all'intestino, sono stabiliti, ma sono lunghi e tortuosi. Durante il viaggio verso la destinazione dell'intestino, nuove cellule nascono e vecchie cellule vacillano. La colonizzazione dell'intestino è quindi piena di difficoltà, e la morte delle cellule è in agguato, nei ghetti enterici fondati dagli immigrati appena arrivati.

Quando gli emigranti derivati dalla cresta neurale maturano, essi interagiscono con l'ambiente che trovano nella parte inferiore del colon (e nel resto dell'intestino). La progenie che si sviluppa dagli immigrati originari è irrevocabilmente modificata da quest'interazione e è piuttosto diversa dai propri genitori. Eppure, la natura e le origini si evidenziano. L'origine, non meno dell'ambiente dell'intestino, svolge un ruolo importante nello sviluppo della nuova generazione.

Gli italo-americani, i polacco-americani, gli afro-americani, gli asiatici-americani e gli irlandesi-americani sono tutti americani e sono estremamente diversi dagli italiani, dai polacchi, dagli africani, dagli asiatici e dagli irlandesi dei paesi da cui provengono. L'esperienza americana influisce persino sulla prima generazione nata nel Nuovo Mondo; ciononostante, ognuno di questi gruppi di «americani col trattino» si distingue anche dagli altri. L'origine conta. Gli immigrati riflettono le proprie radici perché i genitori trasmettono un'eredità da una generazione all'altra. È lo stesso per gli emigranti derivati dalla cresta neurale dell'intestino. Anch'essi riflettono sia gli effetti del proprio ambiente sia l'influsso del proprio retaggio. È questo fermento di forze interagenti che produce l'incredibile diversità delle cellule nervose nell'intestino, che lavorano insieme nel crogiolo ricco, multiculturale e poliglotta del sistema nervoso enterico.

¹ I racconti di Geoff sull'inizio della sua carriera in Inghilterra riportano alla mente la Rivoluzione americana. Gli inglesi dovettero usare una bella dose di snobismo per perdere le colonie americane ma, come ho sempre detto, quando gli snob inglesi mal consigliati ci mettono il naso, nessuno al mondo è in grado di batterli. Dopo aver parlato

con un inviato inglese (che non era neppure un vero ministro) durante le trattative di Parigi avviate in seguito a Yorktown, John Adams scrisse: «L'orgoglio e la vanità di una nazione è una malattia, è il suo delirio. Sono stati lusingati per così tanto tempo da loro stessi e dagli altri da rendere tutto depravato». Gli inglesi non si degnarono mai di riferirsi a George Washington come al Generale Washington. Per loro, era solo il Sig. Washington che, naturalmente, aveva avuto a Yorktown la sua vendetta sulla Cornovaglia. E lui glielo rinfacciò pure, facendo suonare alla banda, durante la cerimonia della resa, un brano musicale chiamato *The World Turne Upside Down* (il mondo si è rovesciato).

² La norepinefrina è prodotta con la tirosina degli aminoacidi introdotti con la dieta. Si ottiene principalmente scomponendo le proteine che mangiamo. La *tirosina* viene convertita da un enzima, detto *tirosina idrossilasi*, in una molecola che porta il nome di L-dopa («dopa» è l'abbreviazione di *deidrossifenilalanina*). L-L-dopa è la molecola che ha rivoluzionato il trattamento del morbo di Parkinson. Ha consentito alle persone irrigidite di muoversi nuovamente. L-L-dopa viene convertita in un prodotto detto *dopamina* da un altro enzima, *L-aminoacido decarbossilasi*. La dopamina viene utilizzata dalle cellule nervose del cervello come un neurotrasmettitore, ma nelle cellule nervose simpatiche è il precursore immediato della norepinefrina. Il DBH converte la dopamina in norepinefrina.

³ Il gene *mash-1* è un acronimo che indica l'omologo mammifero di un gene della mosca della frutta detto *achaete-scute*. È abitudine scrivere i nomi dei geni in corsivo.

⁴ CGRP è un'abbreviazione di *peptide correlato al gene della calcitonina*. La calcitonina è un ormone prodotto nella ghiandola della tiroide. È codificato dallo stesso gene che codifica anche il CGRP. La trascrizione di RNA produce due prodotti diversi mediante un processo detto *accoppiamento alternativo* (alternative splicing).

⁵ I *mezzi* sono liquidi all'interno dei quali le cellule vengono cresciute in coltura. Spesso le cellule richiedono complessi supplementi da aggiungere ai mezzi di coltura, come siero ematico ed estratto embrionale di pollo (preparato mettendo gli embrioni di pollo in un miscelatore). Il siero ematico e l'estratto embrionale di pollo contengono molte sostanze sconosciute.

⁶ I recettori Trk sono tutti enzimi che hanno la capacità di aggiungere gruppi di fosfato all'aminoacido tirosina nelle proteine. Un enzima che aggiunge fosfati è detto *chinasi*. I recettori Trk sono pertanto *recettori tirosina chinasi*; perciò il nome Trk

⁷ Il gene animale è chiamato *c-ret*, mentre il gene umano è in maiuscolo *RET*.

⁸ Il GDNF in realtà non si lega direttamente al Ret. Per stimolare il Ret, il GDNF richiede un corecettore, un amico che gli dia una mano. Tale corecettore, che non è un componente intrinseco di una membrana cellulare, è chiamato *alfa-componente*. Esiste più di un tipo di corecettore che aiuta i leganti a stimolare il Ret. Quello che sembra essere più importante per il GDNF è una molecola detta *GFR alfa-1*.

⁹ L'identità del legante effettivo che stimola il recettore della citochina neuropoietica, dal quale dipende lo sviluppo delle cellule enteriche nervose motorie, è sconosciuta. Il recettore della citochina neuropoietica ha tre componenti, un alfa, che si lega a un legante, e due beta, che sono proteine intrinseche alla membrana e che danno il segnale. Il componente alfa di questo recettore è noto essere essenziale, perché lo sviluppo delle cellule nervose motorie enteriche viene impedito, quando si elimina solo il componente alfa. Una molecola detta neurotrofina ciliare (o in breve CNTF) si lega al componente alfa, attiva il recettore della citochina neuropoietica e favorisce lo sviluppo delle cellule nervose enteriche e della glia. La CNTF, però, può essere eliminata nei topi, senza influire sullo sviluppo del sistema nervoso enterico, e circa il 2% della popolazione umana, altrimenti normale, del Giappone manca di CNTF. Pertanto una molecola diversa dalla CNTF deve eseguire la stimolazione del recettore della citochina neuropoietica nello sviluppo del sistema nervoso enterico.

11. La destinazione è tutto!

La massima soddisfazione di un viaggio lungo e difficile non è il primo passo ma l'ultimo. Anche per le cellule che arrivano all'intestino dalla cresta neurale. L'ultimo passo è spesso il più problematico e alcune persone¹ non lo compiono mai. Per gli ebrei che scapparono dalla schiavitù in Egitto, per esempio, deve essere stato sicuramente magnifico lasciarsi le piramidi alle spalle. Eppure, una volta finito il trambusto della fuga dall'Egitto, ciò che li aspettava erano quarant'anni di peregrinazioni attraverso il deserto del Sinai. Se non avete mai visto il Sinai, lasciate che vi dica che quarant'anni in un posto del genere sono un'esperienza debilitante. Perciò la gioia dei genitori che iniziarono l'esodo dall'Egitto non deve essere stata nulla in confronto alla felicità dei loro figli quando presero possesso di Canaan. Per le cellule della cresta neurale, l'ultimo tratto del colon è Canaan.

Ogni anno, in occasione della Pasqua ebraica, gli ebrei sono soliti raccontare la storia dell'Esodo. Esiste una tavola del Seder che fa venire in mente un parallelo biologico con l'esodo dall'Egitto.² Alla mia tavola del Seder, si ricorda l'esodo dalla cresta neurale dei progenitori del secondo cervello. La mia preoccupazione non è la fuga di questi precursori dalla schiavitù delle pieghe neurali, o il cammino attraverso la natura selvaggia dell'embrione. Mi interessano invece i luoghi designati, tra gli strati del muscolo intestinale, che si trovano alla fine del viaggio e che sono stati dati ai discendenti degli emigranti originari per fondare il proprio sistema nervoso.

La lunga marcia

Spesso la colonizzazione dell'intestino da parte di cellule provenienti dalla cresta neurale avviene tranquillamente, come la colonizzazione di Canaan per gli Israeliti. Di fatto, la colonizzazione dell'intestino spesso è ancora più semplice, perché non ci sono Cananei enterici da spostare e non c'è bisogno di un Giosuè, derivato dalla cresta neurale, che conduca un esercito di cellule alla conquista. La morte delle cellule è importante per la formazione di alcuni organi, come il rene, dove ciascun rene finale è il successore di due predecessori (come se una civiltà superiore ne sostituisse due precedenti).³ In alcune persone e in alcuni animali, però, l'esodo dalla cresta neurale verso l'intestino fallisce e, in questo caso, il fallimento accade al termine del viaggio, nella parte terminale del colon. Come Mosè sul Monte Nebo, le cellule predestinate derivate dalla cresta neurale si avvicinano, ma non riescono a raggiungere la propria destinazione. Le cellule derivate dalla cresta neurale vagale che falliscono entrano nel colon, ma interrompono la migrazione molto prima di raggiungere la parte finale più bassa. Nello stesso tempo, le cellule derivate dalla cresta neurale sacrale arrestano la propria migrazione ai confini del colon e non entrano neppure nella parte inferiore dell'intestino. Quando l'esodo dalla cresta neurale è incompleto, la parte terminale del colon diventa agangiare. Come abbiamo già visto, l'assenza di gangli in un segmento di intestino è una catastrofe, che senza l'intervento di un chirurgo è incompatibile con la vita.

Un sistema nervoso enterico intatto e funzionante è un requisito essenziale per la propulsione intestinale; pertanto, quando una regione dell'intestino è priva di gangli, ostruisce il flusso del contenuto intestinale. Come se all'interno dell'intestino fosse stata costruita una diga, il materiale fecale indietreggia sopra la zona agangiare, causando la dilatazione dell'intestino soprastante. Mancanza di gangli equivale a ostruzione, a prescindere dal fatto che l'intestino sia congenitamente agangiare, come nei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung, o che i gangli muoiano, come nei pazienti colpiti da malattia di Chagas. La malattia di Hirschsprung, o megacolon congenito, per chi non ama gli eponimi, non è epidemica; però, come ho osservato in precedenza parlando della regione sacrale della cresta neurale, è un difetto congenito relativamente comune. Diversi animali, fra cui topi, ratti, conigli e cavalli, nascono con lo stesso problema dei pazienti affetti dalla malattia di Hirschsprung. Questi «modelli animali» sono classificati in base all'aspetto (maculato), al destino (la morte) e alla specie.

La mutazione genetica è la fonte dei problemi di tutti gli animali, che ereditano la mancanza di gangli dai genitori. I geni mutati sono anche la fonte dei problemi della malattia di Hirschsprung, ma, a differenza degli animali, i pattern ereditari non sono sempre chiari e solo talvolta si conosce il gene anomalo. La malattia di Hirschsprung può essere una predisposizione familiare, ma ha la tendenza irritante a manifestarsi spontaneamente, come un controllo casuale dell'Ufficio Tributario. Mosè ubbidì senza discutere ai comandi divini di rimanere fuori dalla terra di Canaan. Io, invece, ho dedicato moltissimo tempo a chiedermi perché alle cellule provenienti dalla cresta neurale venga negato l'ingresso nella parte terminale dell'intestino negli

esseri umani affetti da malattia di Hirschsprung e nei topi che presentano questa patologia.

La colonizzazione del colon

Condussi i miei primi studi sul problema del megacolon congenito insieme a Taube Rothman, utilizzando una razza di topo detta *lethal spotted* (maculato mortale). Questi animali erano stati scoperti presso il Jackson Laboratory di Bar Harbor, dove il massiccio allevamento di topi e l'osservazione accurata della progenie produce molti modelli animali di patologie umane. I topi *lethal spotted* non sono mostri provenienti dallo spazio che uccidono le persone. Al contrario, sono loro che muoiono. L'aggettivo «letale» nella denominazione «*lethal spotted*» riflette il fatto che, a differenza dei pazienti con malattia di Hirschsprung, solitamente non si salva l'animale, tagliando via il colon terminale agangiare. Le cellule che colorano il mantello di un topo, come le cellule nervose enteriche, derivano dalla cresta neurale; pertanto, l'associazione di macchie e di assenza di gangli non è poi sorprendente.

I topi *lethal spotted* ereditano sia le macchie sia il megacolon come carattere recessivo. Ciò significa che, per fare in modo che un topo erediti la patologia, ognuno dei due geni possibili⁴ sui siti cromosomici che interessano questa problematica deve essere mutato. Se uno dei geni è *wild-type* (non mutato) per natura, i topi sono normali. Se s'incrociano l'uno con l'altro due topi *lethal spotted*, né la madre né il padre hanno un gene normale da dare ai cuccioli. Entrambi i geni dei due genitori sono mutati. Quindi il 100% della progenie sarà colpito dalla malattia. È difficile, ma possibile, mantenere vivi i topi *lethal spotted* abbastanza a lungo da farli accoppiare. Quando si tratta di sesso, la forza del topo è davvero ammirevole. Gli animali con un colon tanto dilatato da non riuscire quasi a camminare avranno comunque un comportamento amoroso e si accoppieranno.

Il fascino dell'eredità recessiva, visto da una prospettiva sperimentale, è che ogni singolo feto risultante da un accoppiamento di topi *lethal spotted* si svilupperà con sicurezza in un topo *lethal spotted*. Pertanto è possibile studiare i primi stadi dello sviluppo dell'assenza di gangli nei feti degli animali. Non è necessario attendere che l'intestino diventi agangiare per sapere che diventerà così; inoltre, è nota anche l'ubicazione della regione dell'intestino che diventerà anomala, prima che tale anomalia si manifesti.

La garanzia della trasmissione del carattere *lethal spotted* a tutta la progenie dei genitori *lethal spotted* è stata in assoluto ciò che ci ha consentito di studiare meglio che cosa vada storto nella formazione del sistema nervoso enterico in questi topi. In passato, all'inizio di questi esperimenti, questa garanzia era necessaria, perché non conoscevamo il prodotto del gene che era mutato nei topi e non disponevamo di sonde molecolari da utilizzare per identificare gli animali colpiti. Naturalmente, una volta che il topo acquisisce le macchie, l'identificazione degli animali colpiti è facile; però, il colore del mantello si acquisisce dopo la nascita e non sono presenti macchie sulla pelle di un feto di topo. Inoltre non disponevamo di marcatori molecolari per identificare le cellule nervose enteriche o i loro precursori. Quindi, per sapere se una cellula fosse una cellula nervosa, era davvero necessario attendere che maturasse e che diventasse ovviamente riconoscibile per la forma o il neurotrasmettitore. Così ideammo un test indiretto

per rilevare la presenza di precursori derivati dalla cresta neurale delle cellule nervose enteriche nell'intestino.

Il nostro metodo di rilevamento del precursore consisteva nel far crescere l'intestino in coltura tissutale, attendere una settimana e quindi determinare se nella piastra di coltura si fossero sviluppate o meno cellule nervose. Il concetto era semplice. Per quanto le cellule di derivazione neurale siano evidentemente migratorie, esse non possono attraversare una stanza e saltare in una piastra di coltura; pertanto, se le cellule nervose si sviluppavano nei nostri segmenti coltivati di intestino, i loro precursori dovevano essere presenti nell'intestino, quando il segmento originario era stato rimosso dall'animale. Dividendo l'intestino del feto di topo in molti piccoli segmenti e coltivando ognuno di essi in una piastra separata, potevamo localizzare il livello dei precursori delle cellule nervose dell'intestino a qualunque età.

Il nostro test indiretto rivelò che la colonizzazione dell'intestino del topo da parte dei precursori delle cellule nervose era un processo molto più rapido di quanto ci avessero portato a prevedere gli studi di Nicole Le Douarin sugli embrioni chimerici quaglia-pollo. Sembrava che la cresta neurale del topo non impiegasse molto più di un giorno per colonizzare l'intero intestino. Inoltre, quel giorno particolare arrivava molto presto durante la gestazione, iniziando pressappoco a metà del nono giorno. Una volta soddisfatti del fatto che il saggio funzionava, Taube e io proseguimmo lo studio, comparando la colonizzazione dell'intestino fetale dei precursori delle cellule nervose, in topi normali e topi lethal spotted.

La parte orale dell'intestino dei due tipi di animale sembrava essere colonizzata più o meno nello stesso momento. La differenza più importante tra i topi lethal spotted e quelli normali sembrava essere il fatto che gli ultimi due millimetri dell'intestino lethal spotted non erano mai stati colonizzati. Le cellule nervose si sviluppavano nelle colture ottenute in ogni altro segmento dell'intestino, ma le colture degli ultimi due millimetri non ne evidenziavano alcuna. Cominciammo a sospettare che il problema affrontato dai topi lethal spotted e, per analogia, dai pazienti affetti da malattia di Hirschsprung, potesse avere a che fare con il colon tanto quanto con la cresta neurale. Pensavamo inoltre che fosse possibile che le cellule precursori rimanessero semplicemente fuori dalla cosiddetta «probabile zona agangliare»; ciononostante, i nostri esperimenti non escludevano la possibilità alternativa che le cellule derivate dalla cresta neurale entrassero in effetti in questa zona, ma che muoiano dopo averlo fatto.

Qualche tempo dopo la pubblicazione dei nostri esperimenti indiretti, Raj Kapur, un neuropatologo pediatrico della University of Washington di Seattle, introdusse in una razza di topi un gene batterico, codificante l'enzima beta-galattosidasi (lo stesso enzima che Howard Pomeranz, Bob Payette e io avevamo usato per identificare le cellule infettate viralmente). I topi che esprimono geni estranei, come questo, sono detti *animali transgenici* e il gene che viene introdotto sperimentalmente in un animale transgenico è chiamato *transgene*. La beta-galattosidasi introdotta da Raj nei topi transgenici era controllata da un promotore, che induceva i precursori delle cellule nervose a esprimere la proteina batterica mentre migravano verso l'intestino. Raj usò il promotore per il DBH, che se ricordate è l'enzima che le cellule nervose

enteriche derivate da cellule TC non riescono mai a reprimere. I topi transgenici DBH-beta-galattosidasi si rivelarono animali davvero stupendi per lo studio dello sviluppo del sistema nervoso enterico. La beta-galattosidasi espressa dalle cellule derivate dalla cresta vagale le rende facilmente riconoscibili nell'apparato intestinale, come un McDonald's in un'autostrada nel deserto.

Incrociando i topi transgenici DBH-beta-galattosidasi con animali lethal spotted, Raj fu in grado di produrre cuccioli lethal spotted con cellule derivate dalla cresta neurale vagale marcate. Poté così seguire la migrazione delle cellule derivate dalla cresta neurale vagale lungo l'intestino lethal spotted. Raj scoprì che la migrazione delle cellule derivate dalla cresta neurale, marcate beta-galattosidasi, nell'intestino lethal spotted, resta normale fino a quando le cellule raggiungono il colon. Quando le cellule entrano nell'intestino crasso, però, la loro progressione rallenta, diventa irregolare e infine si arresta, poco prima dell'ano. Quindi sia i nostri dati sia quelli di Raj sembravano indicare che le cellule derivate dalla cresta neurale di topi lethal spotted non erano di per sé anomale. Se fossero state tali, si sarebbe dovuto verificare qualcosa di anomalo durante la migrazione attraverso l'intestino tenue. Sembra anche improbabile che il sistema nervoso enterico dell'intestino tenue si sviluppi normalmente come accade sia nei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung sia nei topi lethal spotted, se i precursori derivati dalla cresta neurale delle cellule nervose fossero sostanzialmente difettosi. Le osservazioni di Raj, come le nostre, puntavano quindi verso la presenza di una notevole anomalia nel colon dei topi lethal spotted.

Cominciammo a osservare il colon lethal spotted. Bob Payette, il neurologo della University of Pennsylvania che si era unito al mio laboratorio, decise che l'idea migliore era quella di esaminare la sostanza attraverso la quale migrano le cellule, la matrice extracellulare. Il suo ragionamento mi sembrava saggio. Se le cellule avessero avuto problemi a entrare in un pezzo di «zolla» corporea, allora era certamente possibile che il terreno si presentasse difficoltoso. In particolare, Bob riteneva che fosse interessante esaminare alcune molecole della matrice extracellulare, alle quali le cellule aderivano. Come è logico, queste sostanze sono conosciute nel loro insieme come *molecole di adesione*. Il primo esperimento di Bob si rivelò interessante. Una molecola di adesione molto grande, che si chiama *laminina*, era estremamente abbondante nella regione terminale del colon lethal spotted. La comparazione, segmento per segmento, con l'intestino normale rivelò non solo che la laminina si accumulava nella regione dell'intestino lethal spotted che diventava agangiare, ma anche che la distribuzione della laminina all'interno di questa regione era anomala. La laminina accumulata era concentrata nella parte esterna della parete dell'intestino, e ciò la poneva proprio sul percorso delle cellule derivate dalla cresta neurale che cercavano di colonizzare l'intestino. Inoltre, l'eccesso di laminina poteva essere rilevato anche prima della comparsa delle cellule nervose nella parte terminale del colon. Cominciammo a chiederci se una sovrabbondanza di laminina potesse contribuire a mantenere le cellule derivate dalla cresta neurale al di fuori della parte terminale del colon.

I risultati di Bob erano intriganti, ma problematici. Non avevamo previsto di trovare un eccesso di molecole di adesione nel probabile intestino agangiare. Siccome il carattere lethal spotted era stato ereditato come recessivo, ci aspettavamo che il difetto genetico provocasse in qualche misura la carenza del prodotto del gene mutato. Mentre ci rendevamo conto che la perdita di un fattore regolatorio poteva causare indirettamente la sovrabbondanza di un'altra proteina, eravamo molto impreparati all'idea che l'eccesso di una molecola di adesione potesse essere la causa del fallimento della migrazione delle cellule crestali neurali.

Le cellule derivate dalla cresta neurale in migrazione rimangono aderenti agli elementi strutturali della matrice extracellulare, per lo più fibre di collagene (il cavo biologico che tiene insieme i tessuti), poiché le cellule sono incollate a essi dalle molecole di adesione. Il fallimento della migrazione delle cellule della cresta neurale sarebbe quindi l'effetto che si potrebbe prevedere da una carenza, non da un eccesso, di una molecola di adesione. Se le cellule non possono prendere possesso del terreno sul quale devono strisciare, è probabile che scivolino e non vadano da nessuna parte. Si potrebbe prevedere che tali cellule, non aderenti, si comportassero come automobili senza catene o pneumatici da neve, su una strada dopo una tempesta di ghiaccio. Gli effetti di un eccesso di una molecola di adesione erano più difficili da immaginare. Ci domandammo se le cellule che stavano migrando attraverso l'intestino lethal spotted si incollassero con troppa forza alle proprie fibre di supporto. La laminina accumulata avrebbe così potuto trasformare la matrice extracellulare del colon lethal spotted in qualcosa di

simile alla carta moschicida, intrappolando le cellule che l'avevano toccata e impedendo loro di proseguire. Tuttavia, il concetto di matrice cellulare simile alla carta moschicida non era molto avvincente. Per esperienza, la carta moschicida non funziona mai. Alcune mosche vi rimangono attaccate, ma la maggior parte vi passa vicino e continua a fare i propri comodi.

Bob riscontrò subito che l'ipotesi della laminina quale causa di assenza di gangli creava problemi più che semplici argomentazioni concettuali. La prima scoperta problematica fu che la laminina non era l'unica molecola che si accumulava eccessivamente nella probabile regione agangiare del colon lethal spotted. Riscontrò che il colon lethal spotted contiene anche un eccesso di ogni altra molecola che, come la laminina, costituisce la struttura, detta *lamina basale*. Le lamine basali sono strati relativamente amorfi di materiale, che separano il tessuto connettivo dalle cellule che rivestono le cavità corporee e che ricoprono le cellule muscolari. Il rivestimento dell'intestino quindi poggia su una lamina basale, che riveste ciascuna cellula della muscolatura liscia dell'intestino. Inoltre le lamine basali circondano i vasi sanguigni e possono agire come filtri, trattenendo le cellule e le molecole di maggiori dimensioni, e consentendo ai liquidi e alle molecole più piccole di attraversarli. Pertanto il difetto degli animali lethal spotted sembrava essere di regolazione della lamina basale, non solo di produzione di laminina.

La seconda scoperta problematica di Bob fu che la laminina e gli altri componenti delle lamine basali non si accumulavano solo nel colon lethal spotted. Erano ugualmente abbondanti in tutta la regione pelvica dei topi. Il colon sembrava quasi essere coinvolto solo come un osservatore innocente. Disponeva di troppo materiale nella lamina basale perché gli capitasse di attraversare una zona dove l'accumulo massiccio di quella imbottitura era «una moda». Siccome la laminina si accumulava sia all'esterno sia all'interno del colon lethal spotted e la sovrabbondanza di laminina nei topi lethal spotted non era specifica di quella molecola, cominciammo a pensare che l'anomalia di laminina potesse essere solo uno di un gruppo di difetti di un topo bizzarro. Perciò la scoperta di Bob poteva non essere correlata al determinarsi dell'assenza di gangli per caso. Tuttavia io non ero pronto a lasciar perdere la laminina. Di certo, talvolta le cose negative rappresentano più il risultato di un incidente che di una programmazione. Pertanto, teoricamente, il difetto dell'intestino dei topi lethal spotted poteva essere il risultato casuale di un guasto locale nella regolazione della produzione di un gruppo di molecole, una delle quali, la laminina, finisce per interferire con la migrazione delle cellule derivate dalla cresta neurale. Tuttavia, anche se questo ragionamento poteva sostenere la teoria, era chiaro che, se non si fosse scoperto velocemente qualche fatto nuovo, l'ipotesi di Bob che la laminina potesse contribuire a determinare la mancanza di gangli sarebbe stata abbandonata.

Mentre pensavamo a quali potessero essere gli aspetti non specifici dell'eccesso di laminina nei topi lethal spotted, Betty Hay, allora direttore del Dipartimento di Anatomia di Harvard, gettò altra acqua fredda sull'idea che una sovrabbondanza di laminina potesse essere correlata per caso a un fallimento della migrazione della cresta neurale. Betty aveva appena pubblicato un articolo in cui dimostrava che la laminina, in realtà, favoriva la migrazione delle cellule della cresta neurale primaria lontano dal tubo neurale che si stava chiudendo. Betty era stata una delle

mie insegnanti a Medicina e perciò ero molto imbarazzato quando mi disse che la mia ipotesi sul possibile contributo della laminina al fallimento della colonizzazione dell'intestino da parte delle cellule neurali era ridicola. In realtà, Betty pensava che un'abbondanza di laminina nell'intestino lethal spotted potesse favorire la migrazione delle cellule derivate dalla cresta neurale, anziché fermarla. Detesto quando mi si dice che le mie idee sono ridicole (anche quando lo sono); perciò, ribadii a Betty il concetto ovvio, per cui le cellule derivate dalla cresta neurale che entrano nell'intestino, cioè le cellule che stavamo esaminando, non sono le stesse cellule che lasciano il tubo neurale, cioè le cellule che stava studiando lei. Le cellule della cresta neurale premigratorie non hanno avuto l'opportunità di apprendimento delle informazioni impartite alle cellule derivate dalla cresta neurale, mentre migrano verso e all'interno dell'intestino. Quindi le nostre cellule erano più mature e più sagge delle sue. La laminina può perciò esercitare effetti sulle cellule derivate dalla cresta neurale nell'intestino, che sono completamente diverse da quelli che Betty aveva osservato. Betty non era convinta, né lo ero io, nonostante le mie affermazioni coraggiose. Prima di combattere per la laminina, avrei avuto bisogno di dati aggiuntivi.

I nuovi dati che volevo erano solide informazioni sulle risposte alla laminina da parte delle cellule derivate dalla cresta neurale che avevano davvero colonizzato l'intestino. Volevo anche sapere se le cellule derivate dalla cresta presenti nell'intestino entrano realmente in contatto con la laminina, mentre migrano attraverso la parete dell'intestino. L'immuno-selezione fornì un'opportunità di scoprire che cosa può fare la laminina alle cellule derivate dalla cresta neurale penetrate nell'intestino, e questa non era una possibilità che potevo permettermi di rifiutare. Quindi suggerii a Alcènè Chalazonitis di incontrare ed effettuare esperimenti con Virginia Tennyson, allora collaboratrice mia e di Taube Rothman nello studio dei topi lethal spotted. Virginia era stata alla Columbia per molti anni e mi aveva accolto all'Università al momento dell'assunzione. Siccome alcuni dei membri di facoltà più anziani del Dipartimento di Anatomia non erano entusiasti della mia devozione alla ricerca ed erano francamente ostili, il benvenuto di Virginia le procurò un posto speciale nel mio cuore. Quando i fondi per la sua ricerca sullo sviluppo delle cellule nervose contenenti dopamina si esaurirono, fui felice di averla con me per studiare l'intestino.

Alcènè e Virginia utilizzarono un anticorpo primario nuovo per immunoselezionare le cellule dell'intestino di feto di topo. Avevamo ricevuto questo anticorpo da Hynda Kleinman, un ricercatore del National Institutes of Health. L'anticorpo si lega a un recettore della laminina che Hynda aveva recentemente scoperto sulle superfici delle cellule nervose. Hynda chiamò questo recettore LBP110. Le iniziali LBP stanno per *Laminin Binding Protein* (proteina legante della laminina), mentre il numero 110 si riferisce al suo peso molecolare (misurato in unità dette chilodalton).

Howard Pomeranz e Bob Payette avevano utilizzato in precedenza gli anticorpi di Hynda per il recettore LBP110, in uno studio immunocitochimico di sezioni tissutali, e avevano trovato che gli anticorpi si legano alle superfici delle cellule derivate dalla cresta neurale nell'intestino.

Era interessante che gli anticorpi non riconoscessero le cellule nella cresta neurale premigratoria e che non reagissero neanche con le cellule derivate dalla cresta neurale in procinto di migrare verso l'intestino. Solo dopo che le cellule derivate dalla cresta neurale entravano nell'intestino, esse acquisivano il recettore LBP110 e potevano essere viste dagli anticorpi di Hynda.

Alcmène e Virginia scoprirono ora che gli anticorpi del recettore LBP110 potevano essere utilizzati per immunoselezionare cellule dall'intestino e che le cellule scelte dagli anticorpi erano precursori di cellule nervose. Quando le cellule immunoselezionate venivano coltivate in coltura, a seguito di immunoselezione con anticorpi del recettore LBP110, le cellule nervose si sviluppavano selettivamente nelle colture delle cellule immunoselezionate. Per contrasto, le colture delle cellule residue, cioè le cellule che non erano state selezionate dagli anticorpi del recettore LBP110, contenevano poche cellule nervose, o nessuna. Nell'insieme, queste osservazioni confermavano che le cellule derivate dalla cresta neurale che migrano verso l'intestino sono realmente diverse da quelle della cresta neurale premigratoria, proprio come avevo sostenuto con Betty Hay. La serie di cellule derivate dalla cresta neurale di cui ci occupavamo, quella dell'intestino, esprimeva il recettore LBP110, mentre le cellule della cresta neurale studiate da Betty, quelle della cresta neurale premigratoria, non lo facevano. Ancora più importante, l'acquisizione dell'espressione del recettore LBP110 solo dopo che le cellule derivate dalla cresta neurale entrano nell'intestino, suggeriva che la laminina potesse influire sulla popolazione enterica in modo diverso da come influisce sui suoi predecessori.

La carta moschicida è davvero un fattore di crescita

Quando Alcmène e Virginia esposero alla laminina le cellule derivate dalla cresta neurale, che avevano immunoselezionato dall'intestino fetale, gli effetti furono incredibili. La laminina favoriva notevolmente lo sviluppo di cellule nervose. Quando Alcmène e Virginia iniziarono gli esperimenti, non si pensava che la laminina fosse un fattore di crescita. Eppure, se la laminina non era un fattore di crescita, ne offriva una buona imitazione. Quando riferimmo le nostre osservazioni, i critici storsero il naso dicendo che la laminina, cioè una molecola di adesione, probabilmente consentiva semplicemente ai precursori delle cellule nervose di aderire al fondo della piastra di coltura. I critici sostenevano che, in assenza di laminina, i precursori delle cellule nervose potevano semplicemente sparire. Dal loro punto di vista, la ragione per la quale osservavamo un maggior numero di cellule nervose in presenza di laminina nelle colture di cellule immunoselezionate era che la laminina induceva i precursori delle cellule nervose a fermarsi, non a differenziarsi. Di fronte a queste critiche, modificammo il progetto degli esperimenti, per consentire alle cellule di aderire al fondo della coltura prima di esporle alla laminina. Le cellule aderiscono bene a un'altra molecola, un polimero sintetico, la *polilisina*. Così mettemmo in coltura le cellule immunoselezionate su polilisina per ventiquattro ore. Dopo questo «intervallo di adesione», eliminammo tutte le cellule libere e quindi aggiungemmo la laminina al mezzo, in una forma solubile. Nuovamente, la laminina favorì lo sviluppo di cellule nervose e i suoi effetti furono notevoli, come quando era presente all'inizio dell'esperimento e costituiva un componente del fondo delle colture.

La laminina esercitava un altro effetto che secondo noi rifletteva in modo poco probabile il suo ruolo di molecola di adesione. Essa, anche se aggiunta a cellule immunoselezionate che avevano già aderito alla piastra di coltura, stimolava le cellule a esprimere il gene precoce immediato *c-fos*. Come descritto in precedenza, Fos, la proteina codificata da *c-fos*, è coinvolta nell'attivazione di un apparato genetico della cellula, quando la cellula viene stimolata in modo adeguato. Le cellule nervose, come abbiamo visto, esprimono Fos quando diventano fisiologicamente attive, e quasi tutte le cellule esprimono Fos quando rispondono a un fattore di crescita. Inoltre, l'espressione di Fos, indotta dalla laminina, evidenziava tutte le caratteristiche previste in una risposta a un fattore di crescita. L'espressione Fos poteva essere rilevata nel nucleo delle cellule esposte alla laminina, poco dopo l'esposizione, e questa loro espressione era piuttosto transitoria. Come ho detto, la laminina era un fattore di crescita, oppure interpretava superbamente questo ruolo.

A questo punto sospettavamo seriamente che il recettore LBP110 fosse responsabile della mediazione degli effetti della laminina sullo sviluppo delle cellule nervose. Per determinare se il recettore LBP sulle superfici delle cellule derivate dalla cresta neurale potesse davvero mediare la promozione dello sviluppo di cellule nervose da parte della laminina, sfruttammo le informazioni molecolari che Hynda Kleinman aveva ottenuto sull'interazione recettore LBP-laminina. La laminina si presenta in molti tipi. Di fatto, non esiste una molecola di laminina,

ma diverse. Le varie molecole (laminina-1, laminina-2 ecc.) sono gruppi modulari di tre diverse classi di subunità, dette α , β e γ . Alle subunità di ciascuna classe vengono attribuiti dei numeri, in modo da conservare una traccia, e quindi c'è una α -1, una α -2, una β -1, una β -2, una γ -1 ecc. Il tipo di laminina dell'intestino fetale non era conosciuto quando Alcmène e Virginia stavano svolgendo i loro esperimenti, però sapevano che il tipo aggiunto alle cellule immunoselezionate era laminina-1, composta da una subunità α -1, una β -1 e una γ -1. La presenza dell'unità α -1 era significativa, poiché Hynda Kleinman aveva dimostrato che si tratta della subunità che contiene il sito legante per il recettore LBP. Il sito legante LBP110 è una sequenza di cinque aminoacidi: isoleucina, lisina, valina, alanina, valina. Siccome le catene di aminoacidi, in proteine e peptidi, tendono a essere molto lunghe, è stato elaborato un codice di aminoacidi che vengono indicati con una lettera singola, per evitare la complicazione di scrivere i nomi. Secondo il codice, la sequenza isoleucina, lisina, valina, alanina, valina della sequenza legante LBP110 è IKVAV.

Inizialmente, Alcmène e Virginia cercarono di mimare gli effetti dell'intera molecola di laminina, aggiungendo un peptide con la sequenza IKVAV. Speravano che il sito legante da solo sarebbe stato sufficiente per attivare il recettore LBP e favorire la differenziazione delle cellule nervose. Di fatto, non accadde nulla dopo che le cellule erano state esposte al peptide IKVAV. Semplicemente, le cellule se ne stavano lì, come se fossero stupide. Pochissime cellule si svilupparono e Fos non si attivò. Quindi il peptide IKVAV non era un agonista. Alcmène e Virginia aggiunsero poi il peptide IKVAV alla laminina-1 e le cellule continuavano il loro atteggiamento passivo. Ancora una volta, si svilupparono pochissime cellule e Fos non si attivò. Però, questa volta, la laminina-1 era presente e avrebbe dovuto favorire lo sviluppo di cellule nervose e attivare Fos. Il fatto che la laminina non lo facesse, in presenza del peptide IKVAV, dimostrava che il peptide impediva in modo competitivo alla molecola più grande di legarsi e di stimolare il recettore. Inoltre, nessuna delle cellule cadeva dalla piastra di coltura quando erano esposte al peptide IKVAV. Così il peptide non interferiva con l'aderenza delle cellule derivate dalla cresta neurale, ma solo con la loro risposta evolutiva alla laminina-1. Diversamente dal peptide IKVAV, i peptidi di controllo (composti da una sequenza senza senso di aminoacidi, o dalla sequenza di laminina α -1 adiacente a IKVAV) non erano in grado di interferire con gli effetti della laminina-1. Un anticorpo della laminina α -1, che copriva la regione IKVAV, antagonizzava anche gli effetti della laminina-1. Queste osservazioni stabilivano che la laminina-1 è un fattore di crescita, che favorisce in maniera potente lo sviluppo di cellule nervose enteriche e che agisce, attraverso un'interazione della corrispondente subunità α -1, con il recettore LBP sulla superficie cellulare.

Avendo stabilito che la laminina può favorire lo sviluppo delle cellule nervose enteriche, diventava importante sapere se i precursori delle cellule nervose riescano realmente a vedere la laminina nel momento in cui si differenziano nell'intestino. Per determinare se le cellule migranti derivate dalla cresta neurale all'interno dell'intestino entrano in contatto con la laminina mentre migrano, Virginia Tennyson e Diane Sherman eseguirono uno studio al

microscopio elettronico. Avevano bisogno dell'alta risoluzione per poter visualizzare la laminina e distinguere il contatto effettivo da contatti ravvicinati. Utilizzarono l'immunocitochimica con due serie di anticorpi per individuare contemporaneamente molecole della matrice extracellulare e cellule derivate dalla cresta neurale. Ciascun anticorpo era contrassegnato con particelle d'oro di diverse dimensioni, in modo da poterli distinguere uno dall'altro quando osservati al microscopio elettronico. Gli antigeni di differenziazione, espressi selettivamente dalle cellule originate dalla cresta neurale, fornivano il marcatore, che consentiva a queste cellule di essere riconosciute. Virginia e Diane dimostrarono che le cellule derivate dalla cresta neurale entrano realmente in contatto con fiocchi di laminina, che riscontrarono non limitata a formare le lamine basali nell'intestino in corso di sviluppo. Usando gli anticorpi di Hynda Kleinman del recettore LBP110, scoprono inoltre la presenza di cluster del recettore LBP110 in molti siti dove le cellule derivate dalla cresta neurale entravano in contatto con la laminina.

Le osservazioni sul fatto che la laminina possa favorire lo sviluppo di cellule nervose enteriche e che i precursori delle cellule nervose enteriche migranti nell'intestino incontrino la laminina, mi convinse a considerare seriamente l'accumulo di laminina, che si verifica nei topi lethal spotted. Devo comunque ammettere che la capacità della laminina di favorire la differenziazione di cellule nervose piuttosto che di inibire la migrazione dei precursori mi confuse per molto tempo. La confusione si attenuò quando mi resi conto, in uno di quegli improvvisi momenti di rivelazione che avvengono in me, perché religioso, che la differenziazione delle cellule derivate dalla cresta neurale in cellule nervose è un'importante modalità per fermare la migrazione di queste cellule. Le cellule derivate dalla cresta neurale sono grandi viaggiatrici, mentre le cellule nervose sono sedentarie, come è tipico delle cellule. Le cellule nervose piantano i propri corpi nel terreno e inviano gli assoni e i dendriti a esplorare. Le cellule di per sé devono stare dove sono, perché sono gli obiettivi di altre cellule nervose che le cercano per innervarle. E abbastanza incredibile che i milioni di miliardi di collegamenti nervosi che esistono nel cervello vengano eseguiti quando le cellule nervose stanno ferme. Non riesco a immaginare come gli assoni potrebbero trovare i propri obiettivi se questi potessero spostarsi.

Comunque, quando una cellula vagante derivata dalla cresta neurale diventa una cellula nervosa e invia un assone, è come se la cellula stesse gettando un'ancora. Compresi inoltre che è opportuno per la cellula migrante, per prima cosa, raggiungere la propria destinazione. Se una cellula si differenziasse troppo presto, perderebbe la regione di destinazione prevista. Una sovrabbondanza di laminina nell'intestino lethal spotted, quindi, può contribuire all'assenza di gangli, spingendo le cellule derivate dalla cresta neurale a diventare cellule nervose prima del tempo. In altre parole, l'intestino lethal spotted potrebbe essere troppo allettante. La differenziazione può così avvenire a spese della migrazione costante. Quindi, la migrazione non sarebbe completata e l'ultima parte dell'intestino da colonizzare diventerebbe agangiare.

Mentre cercavo di immaginare un possibile meccanismo che potesse correlare l'eccesso di laminina scoperto da Bob Payette con il determinarsi della mancanza di gangli nei topi lethal

spotted, diversi ricercatori riferirono che proprio gli stessi difetti della matrice extracellulare che avevamo trovato nei topi lethal spotted si verificavano anche nell'intestino di pazienti affetti dalla malattia di Hirschsprung. La laminina e altre molecole riscontrate nelle lamine basali erano quindi sovrabbondanti nelle zone agangliari di uomini (e donne) tanto quanto nei topi. Tra le molecole della lamina basale, solo la laminina ha dimostrato di essere un promotore potente della differenziazione delle cellule nervose. Il fatto che non sia l'unica molecola che si accumula nell'intestino anomalo quindi non significa che il suo accumulo sia banale. Il fatto che la laminina si accumuli anche al di fuori dell'intestino è altrettanto importante. Le cellule derivate dalla cresta sacrale vedono questa laminina esterna e devono negoziare il proprio passaggio, proprio per raggiungere l'intestino. Pertanto, il modello dell'accumulo di laminina nei topi lethal spotted e nei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung porta la molecola a interferire contemporaneamente con entrambi i flussi di cellule derivate dalla cresta neurale (vagale e sacrale), diretti verso il colon. La laminina cominciava a definirsi come una gran bella canaglia nella trama della malattia di Hirschsprung.

Taube Rothman e Jingxian Chen peggiorarono la sua immagine. Dimostrarono che ognuna delle tre subunità di laminina-1 (alfa-1, beta-1 e gamma-1) è sintetizzata con eccessivo zelo nell'intestino dei topi lethal spotted. Queste molecole non solo si accumulano, per esempio, perché il sistema di smaltimento dei rifiuti dell'intestino è fuori uso e questo materiale rimane in giro per troppo tempo. Il colon del topo lethal spotted, in realtà, produce troppa laminina-1. Il problema è quello di un'eccessiva biosintesi. Inoltre, l'espressione della laminina-1 è regolata secondo lo sviluppo. È elevata quando i gangli enterici si stanno formando, ma si riduce mentre i feti maturano. Questo modello è coerente con l'idea che la laminina-1 sia fornita ai precursori delle cellule nervose quando ne hanno bisogno. A ogni età, però, la subunità alfa-1 essenziale è molto più abbondante nel colon dei topi lethal spotted che nei topi normali. Inoltre la laminina-1 non si accumula nell'intestino quando l'apparato intestinale manca di cellule derivate dalla cresta neurale, per ragioni non correlate al gene *lethal spotted*. Non si osserva, per esempio, nell'intestino del topo con knockout Ret, che non dispone affatto di cellule derivate dalla cresta neurale. La produzione eccessiva di laminina-1 che caratterizza l'intestino lethal spotted e di Hirschsprung, pertanto, è un risultato primario dei difetti genetici e non è una conseguenza secondaria dell'assenza di cellule derivate dalla cresta neurale nel fondo dell'intestino.

Il mio entusiasmo all'idea che la laminina svolga un ruolo nell'evoluzione agangiare dell'intestino terminale dei topi lethal spotted e dei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung seguì il percorso delle montagne russe. Ci furono alti e bassi, nel nostro lavoro sugli effetti della laminina α -1. I momenti di sconforto nacquero da una scoperta tanto inaspettata che i dati sconvolsero persino chi li aveva scoperti. Fu identificato il gene mutato nei topi lethal spotted e il suo prodotto si rivelò una molecola di segnale, che non si era mai sospettato svolgesse un ruolo nello sviluppo.

La capacità di eliminare virtualmente qualsiasi gene che un ricercatore scelga di cancellare ha avuto un effetto rivoluzionario sulla biologia evolutiva. Per lungo tempo, gli uccelli e i vermi erano sembrati gli animali prescelti per lo studio dei sistemi in evoluzione. Gli embrioni dei volatili sono accessibili e disponibili per la manipolazione chirurgica, mentre i vermi sono semplici, dispongono di sistemi nervosi ridotti e tutte le loro cellule nervose sono conosciute. La capacità di scegliere le caratteristiche che si desidera vengano ereditate da un animale, però, è un vantaggio importante quanto una qualunque di queste proprietà. Così i topi hanno acquisito un notevole interesse da parte degli scienziati. La tecnica di knockout dei geni, tuttavia, è piena di sorprese. Molti geni ritenuti assolutamente essenziali per la vita, o almeno per qualche funzione fondamentale, sono stati eliminati senza conseguenze considerevoli. La capacità dei geni di compensare la perdita dei propri compagni è prodigiosa. Si estrae un gene, e altri possono trovare una maniera diversa per eseguire ciò che faceva solitamente il gene eliminato. In altri casi, la compensazione non si verifica e si perde una funzione che in precedenza non si sospettava richiedesse l'espressione del gene eliminato. Gli esperimenti che implicano «giochi» con i geni del topo, perciò, non vanno bene per le persone che amano vivere vite prevedibili.

Gli studi che rivoluzionarono la ricerca sulla causa della malattia di Hirschsprung furono gli esperimenti nei quali un gene, eliminato per studiare la regolazione della pressione sanguigna, produceva inaspettatamente topi affetti da megacolon congenito. Masashi Yanagisawa, che lavorava presso l'University of Texas Southwestern Medical Center di Dallas, aveva studiato un gruppo di peptidi di segnale detti *endotelina*. Questi peptidi, che sono catene di ventuno aminoacidi, sono disponibili in tre tipologie: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) ed endotelina-3 (ET-3). Le endoteline agiscono su due recettori cellulari, definiti scientificamente in breve come ETA ed ETB. Il recettore ETA preferisce essere stimolato dall'endotelina-1, accetta l'endotelina-2, ma ignora l'endotelina-3. Il recettore ETB, invece, è più tollerante e non dimostra favoritismi per un'endotelina o un'altra; l'ETB si lascia stimolare da qualsiasi endotelina. A causa di queste proprietà dei recettori, l'endotelina-3 è inutile, a meno che non disponga di recettori ETB su cui agire.

Al tempo in cui Masashi Yanagisawa stava prendendo in considerazione il knockout dei geni che codificano le endoteline e i loro recettori, si sapeva che i peptidi venivano prodotti dalle cellule di rivestimento dei vasi sanguigni⁵ e che causavano la contrazione della muscolatura

liscia che circonda tali vasi. Di fatto, era la capacità incredibilmente potente delle endoteline di ridurre il lume dei vasi sanguigni che le rendeva interessanti per la comunità biomedica. Questo interesse aumentò con la scoperta che le endoteline stimolano anche il cuore a battere più rapidamente e con maggior forza. Perciò Masashi era interessato agli effetti cardiovascolari delle endoteline e sperava che il knockout dei peptidi e/o dei loro recettori avrebbe fornito una spiegazione del ruolo svolto nella fisiologia del sistema cardiovascolare, particolarmente nella regolazione della pressione sanguigna.

I topi knockout prodotti da Masashi non ebbero mai occasione di manifestare problemi cardiovascolari. Avevano tutti problemi di sviluppo talmente gravi da non sopravvivere abbastanza a lungo. Tra i topi knockout prodotti da Masashi vi era una serie di animali che mancavano di endotelina-3 (l'endotelina che agisce solo sui recettori ETB) e un'altra che mancava di ETB (il recettore dell'endotelina che consente di essere stimolato solo dall'endotelina-3). Con sua grande sorpresa, gli animali che mancavano o di endotelina-3 o di ETB nascevano con macchie e con una mancanza di gangli mortale nella parte terminale del colon. Masashi non è uno che si lascia deprimere dai risultati imprevisi. Perciò, quello che era cominciato come uno studio sul sistema cardiovascolare si trasformò presto in una ricerca sulla cresta neurale e sulla sua capacità di colonizzare l'intestino.

La sindrome simile alla malattia di Hirschsprung introdotta dall'eliminazione dell'endotelina-3 e del recettore ETB sarebbe stata incredibile anche se Masashi avesse solo pubblicato queste osservazioni senza fare altro. Ma lui non si fermò qui. Proseguì nello studio dei ceppi di topi, nei quali si verificano anomalie analoghe in modo naturale, come risultato di difetti congeniti ereditati. Uno di essi era il topo che studiavo da anni, il *lethal spotted*.

Gli ulteriori studi di Masashi rivelarono che i topi *lethal spotted* portano una mutazione che impedisce loro di produrre endotelina-3 attiva. La sintesi delle endoteline inizia con la produzione di una grande proteina, detta *preproendotelina*, che contiene 203 aminoacidi. Questa *preproendotelina* è suddivisa in cellule, per produrre un peptide intermedio, detto *endotelina grande*, che ha trentanove aminoacidi. L'endotelina grande non è di per sé attiva. Per arrivare al peptide attivo di ventinove aminoacidi, l'endotelina grande deve essere ridotta ulteriormente, questa volta da un nuovo *enzima di conversione dell'endotelina*, legato alla membrana. Non è chiaro il motivo per il quale lo sviluppo abbia reso la produzione delle endoteline un processo tanto complicato, ma come si può immaginare, una catena di eventi complessa come questa può essere disturbata in una molteplicità di sedi.

La mutazione dei topi *lethal spotted* provoca un minuscolo errore nella sequenza della *preproendotelina*. Quando la grande endotelina-3 intermedia viene prodotta dalla *preproendotelina* anomala nelle cellule dei topi *lethal spotted*, uno dei trentanove aminoacidi è quello sbagliato. L'aminoacido, arginina, è sostituito da un altro aminoacido, triptofano, vicino all'estremità terminale della molecola. Si ricordi che le proteine e i peptidi sono scritti in un linguaggio composto da aminoacidi. Se esiste un errore nella sequenza degli aminoacidi, allora una parola (la proteina o il peptide) è scritta in modo errato. La sostituzione di un singolo

aminoacido può avere o meno conseguenze negative. Dipende se l'errore modifica il significato della parola o ne impedisce il riconoscimento. Lo stesso vale per lo spelling delle parole in inglese. La sostituzione di una lettera può essere priva di effetti, oppure disastrosa. Considerate, per esempio, l'effetto della sostituzione della lettera «i» con la lettera «e» nella parola «six».

A causa del posizionamento del triptofano al posto dell'arginina, l'endotelina-3 grande, composta in modo errato nei topi *lethal spotted*, non può essere riconosciuta dall'enzima di conversione dell'endotelina e quindi la sfortunata endotelina-3 grande non viene trasformata in endotelina-3 attiva. Perciò i topi *lethal spotted* sono carenti di endotelina-3. La loro endotelina-3 grande è inutile, perché non può stimolare il recettore ETB (l'endotelina-3 grande non avrebbe potuto stimolare il recettore ETB anche se avesse avuto la sequenza corretta; la regola fisiologica è o conversione o niente). Per la parte terminale del colon di un topo non fa alcuna differenza se l'endotelina-3 manca perché l'animale non la può produrre dall'endotelina-3 grande, oppure perché il gene che codifica la preproendotelina-3 è eliminato. Il risultato finale delle due anomalie genetiche è lo stesso: i mantelli dei topi mutanti sono macchiati e l'intestino terminale è agangiare.

Masashi e il suo gruppo eseguirono ricerche anche su un altro tipo di mutante naturale. Si era scoperto che questo topo, detto *piebald lethal* (pezzato mortale), portava una mutazione che gli impediva di produrre recettori ETB. L'aspetto finale di questi topi mutanti è identico a quello degli animali con knockout di ETB. In realtà questi topi assomigliano anche molto ai topi con knockout di endotelina-3 e *lethal spotted*. Pertanto, per fare in modo che il colon sia colonizzato da cellule provenienti dalla cresta neurale, i recettori ETB su qualche cellula, da qualche parte, a un certo punto, durante lo sviluppo, devono essere stimolati mediante endotelina-3. Quali cellule richiedano la stimolazione dei recettori ETB e il perché era una problematica non ancora chiarita dagli esperimenti di Masashi.⁶

Siccome i topi *lethal spotted* e *piebald* sono modelli animali della malattia di Hirschsprung, era logico cercare di determinare se la patologia degli esseri umani, come quella dei topi, sia dovuta alla perdita o dell'endotelina-3 o del recettore ETB. Masashi e i suoi colleghi scoprirono che il difetto genetico di alcuni pazienti affetti da malattia di Hirschsprung è sostanzialmente lo stesso dei topi *piebald lethal*. A questi pazienti mancano recettori ETB. Più recentemente, si è scoperto che altri pazienti sono carenti di endotelina-3. Sfortunatamente, né le mutazioni dei geni che codificano ETB né quelle che codificano endotelina-3 sono responsabili della maggioranza dei casi di malattia di Hirschsprung. Evidentemente, la malattia di Hirschsprung si può verificare quando uno qualunque tra altri diversi geni è mutato. Il gene che codifica l'ETB è solo uno dei colpevoli che si sono manifestati nei pazienti. Altri sono *RET*, *GDNF*, *SOX10* e *DLX-2* (i nomi di molti geni sono iniziali arcane). Non è chiaro come o perché le mutazioni di tutti questi geni non correlati producano la stessa sindrome. Di fatto, quando Masashi pubblicò le sue scoperte rivoluzionarie in tre articoli su *Cell* (con un'immagine a colori in copertina che illustrava topi maculati molto carini) non era chiaro neppure quale(i) ruolo(i) potessero svolgere l'endotelina-3 e i recettori ETB nella formazione del sistema nervoso enterico.

Cresta neurale o colon, dov'è la lesione?

Masashi fu colpito dalla coincidenza per la quale i mantelli di tutti i modelli animali della malattia di Hirschsprung erano maculati. Il pigmento che colora il mantello di un animale si dice melanina. È prodotto da cellule chiamate *melanociti*. Come le cellule nervose enteriche, i melanociti sono derivati dalla cresta neurale. Uno dei percorsi precisi che partono dalla cresta neurale conduce alla pelle e le cellule che seguono questo percorso danno origine ai melanociti. Perciò Masashi concluse che l'endotelina-3 è necessaria per lo sviluppo sia del sistema nervoso enterico sia dei melanociti. La sua ipotesi, proponibile nel 1994, era che endotelina-3 e il recettore ETB sono espressi ognuno da cellule migranti derivate dalla cresta neurale. Masashi propose che queste cellule secernessero endotelina-3, che poi si gira e stimola i loro recettori ETB. Ipotizzò che le cellule derivate dalla cresta neurale richiedano che i propri recettori ETB vengano attivati per poter sopravvivere e svilupparsi come cellule nervose o melanociti. Questo tipo di auto-stimolazione è detto *effetto autocrino*.

Mi sono sempre sentito a disagio di fronte al concetto di azioni autocrine. Mi ricordano troppo quando i miei genitori mi dicevano che una certa cosa mi avrebbe fatto crescere i peli sulle mani. Eppure, in assenza di un dato che sostenesse il contrario, l'«ipotesi autocrina» era molto stimolante. Spiegava sia l'assenza di gangli sia le macchie che si verificavano negli animali quando mancavano endotelina-3 o recettori ETB. D'altra parte, esisteva un problema effettivo che non veniva preso in considerazione dall'«ipotesi autocrina». Se le cellule derivate dalla cresta neurale richiedono la stimolazione dei recettori ETB per sopravvivere e differenziarsi in cellule nervose enteriche (o glia, che pure manca dai segmenti agangliari della parte terminale del colon nei topi *lethal spotted*), allora perché il difetto era così geograficamente localizzato quando mancavano endotelina-3 o recettori ETB? Persino nei topi *piebald lethal* e nei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung, che non hanno affatto recettori ETB, le cellule nervose enteriche si sviluppano molto bene nell'intestino tenue e nella prima parte del colon.

Ricordo vivamente la mia prima lettura degli articoli di Masashi. La mia sensazione iniziale fu di ammirazione infinita per l'eleganza del lavoro e per la chiarezza delle informazioni. Se mancava una qualche conclusione, o un nodo che Masashi aveva lasciato insoluto, non riuscivo a vederlo. La mia sensazione successiva fu di depressione, perché io avevo lavorato sui topi *lethal spotted* per anni senza avvicinarmi a individuare il gene mutato degli animali. Tutti sanno di avere dei limiti e quelli tra di noi che sono ricercatori più anziani sanno che il nostro impegno sarà sorpassato dai colleghi più giovani. Di fatto, dedichiamo moltissimo tempo a formare persone che speriamo davvero arrivino a superarci. Eppure, i tre articoli di Masashi su *Cell* mi colpirono come il Don Giovanni di Mozart colpì Salieri nell'opera teatrale *Amadeus* di Peter Shaffer. La mia terza reazione fu di lasciare da parte le assurdità personali, di andare avanti e di cercare di collegare le nuove scoperte di Masashi Yanagisawa con ciò che avevo imparato in precedenza sullo sviluppo del megacolon congenito nei topi *lethal spotted* e nei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung.

Mi disturbava, nell'ipotesi pubblicata da Masashi, il suo fallimento nel trovare la causa del normale sviluppo di gangli enterici nei topi lethal spotted e nei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung, ovunque eccetto che nella parte terminale del colon. Decisi di chiamarlo e di chiedergli come si spiegasse questo fatto. Pensavo che avesse dedicato molta considerazione a questo problema e che avrebbe avuto una spiegazione che forse non aveva pubblicato, magari perché le idee erano troppo speculative. Non avevo mai incontrato prima Masashi e non sapevo cosa aspettarmi. Si rivelò una persona molto comunicativa, felice di discutere problemi comuni. Però non sapeva perché le cellule nervose enteriche fossero in grado di svilupparsi nell'intestino tenue e nella prima parte del colon di animali che non avevano recettori ETB. Mi fece notare che la sua ipotesi di lavoro era stata esposta solo come un'idea da studiare. Non voleva essere l'ultima parola, ma piuttosto un quadro utile per definire gli esperimenti futuri. Tuttavia, eravamo d'accordo sul fatto che, qualunque spiegazione in merito all'effetto della stimolazione del recettore ETB, fosse infine accettata, essa avrebbe dovuto chiarire la netta localizzazione della lesione negli animali carenti di endotelina-3/ETB.

Dopo la pubblicazione degli articoli di Masashi, Nicole Le Douarin cominciò a esplorare gli effetti dell'endotelina-3 sulle cellule della cresta neurale. Come sua abitudine, lavorò su cellule della cresta neurale di volatili. Quando aggiunse endotelina-3 alle cellule della cresta neurale che crescevano in coltura, i risultati furono stupefacenti. Le cellule proliferarono selvaggiamente in risposta all'endotelina-3 e coprirono il fondo delle piastre di coltura con tappeti nerissimi di melanociti. Quindi Nicole propose che l'effetto più importante dell'endotelina-3 sulle cellule della cresta neurale è quello di farle proliferare. Siccome le cellule isolate della cresta neurale rispondevano all'endotelina-3, concluse che devono esprimere recettori ETB. Anche se la maggior parte della popolazione notevolmente accresciuta delle cellule derivate dalla cresta neurale non fosse stata di cellule nervose, Nicole pensava che l'effetto osservato fornisse una buona spiegazione della genesi di una parte terminale di colon agangiare nei topi o negli esseri umani che mancano di endotelina-3 o di recettori ETB.

Secondo l'idea di Nicole, era necessaria una massa sostanziale di cellule derivate dalla cresta neurale vagale per portare la popolazione fino alla parte terminale del colon, che si trova al termine del loro percorso. Se la popolazione che entra nell'intestino è troppo esigua, come lei ipotizzava fosse negli animali incapaci di usare il sistema endotelina-3/ETB per stimolare la proliferazione degli emigranti della cresta neurale, allora la massa cellulare si sarebbe esaurita prima di raggiungere la parte terminale del colon. Quest'idea sfruttava l'osservazione che l'endotelina-3 causa proprio la proliferazione delle cellule della cresta neurale, però, come la precedente ipotesi di Masashi Yanagisawa, non spiegava tutti i dati. Secondo me, alcuni dei dati meno compatibili con il concetto di Nicole erano proprio i suoi.

L'idea che le cellule della cresta neurale possano non arrivare in fondo al colon se non sono presenti cellule sufficienti nella popolazione di emigranti andava bene finché era applicata solo alla serie vagale di queste cellule. Però, quando si includeva la serie sacrale delle cellule derivate dalla cresta neurale, l'ipotesi di Nicole diventava meno interessante. Le cellule derivate dalla

cresta neurale sacrale entrano nell'intestino nell'estremità inferiore. Se dovessero raggiungere l'intestino e non arrivare alla linea di traguardo del proprio percorso migratorio, non riuscirebbero a salire fino all'ombelico. Perciò potrebbe esserci un intervallo nell'innervazione del colon, tra i punti dove le due popolazioni di cellule derivate dalla cresta neurale si staccano e interrompono la migrazione. Tuttavia, in assenza del sistema endotelina-3/ETB, non si riscontra un intervallo nel sistema nervoso enterico. La regione agangiare è sempre in fondo all'intestino. Pertanto l'ipotesi di Nicole non prendeva in considerazione il contributo reso dalla cresta neurale sacrale nella formazione del sistema nervoso enterico. Siccome, di fatto, lei era stata la persona che aveva scoperto questo contributo, ero sorpreso di vederla esporre una teoria che non lo considerava.

Negli studi successivi Nicole scoprì che gli uccelli presentano un sottotipo speciale di recettore ETB, non ancora riscontrato nei mammiferi, che lavora particolarmente bene sulle cellule del ceppo melanocita. L'esistenza di questo recettore spiega probabilmente il perché lei avesse prodotto così tanti melanociti, anziché cellule nervose, con l'aggiunta di endotelina-3 alle colture di cellule della cresta neurale dei volatili. Recentemente, Nicole ha inoltre documentato ancora una volta (in collaborazione con Alan Burns) l'importanza della regione sacrale della cresta neurale nella formazione del sistema nervoso enterico. Tuttavia, il problema più importante dell'ipotesi di Nicole di attribuire l'assenza di gangli nella parte terminale del colon a un numero inadeguato di emigrati derivati dalla cresta neurale è che non lascia spazio al coinvolgimento di alcun tessuto, eccetto la cresta neurale. Però ora è piuttosto chiaro che l'assenza di gangli nell'intestino, sia nei topi lethal spotted (carenti di endotelina-3) sia nei topi piebald (carenti di ETB) non è solo colpa della cresta neurale. Anche il colon è coinvolto.

In realtà, Taube Rothman e io avevamo iniziato a studiare il problema sulla possibilità che l'assenza di gangli nella parte terminale del colon dei topi lethal spotted fosse il risultato di cellule difettose derivate dalla cresta neurale, o di un brutto colon, anni prima che Masashi Yanagisawa identificasse la lesione genetica. In collaborazione con una collega di postdottorato, Janet Jacobs Cohen, coltivammo segmenti di intestino insieme a cellule della cresta neurale in co-cultura. Utilizzammo diverse fonti, sia di cellule normali della cresta neurale sia di topi lethal spotted. L'idea alla base dei nostri esperimenti era semplice: determinare che cosa avrebbero fatto le cellule della cresta neurale quando fossero state tentate da un bel pezzetto di intestino, di per sé privo di cellule originarie della cresta neurale. Le cellule della cresta neurale normali o lethal spotted avrebbero colonizzato un tale segmento di intestino? Alcune di queste cellule della cresta neurale potevano colonizzare la probabile regione agangiare intestinale dei topi lethal spotted?

I risultati dei nostri studi dimostrarono che, teoricamente, qualsiasi fonte delle cellule della cresta neurale scelta avrebbe colonizzato un segmento di intestino normale, quando entrambe le tipologie fossero presenti nella stessa piastra di coltura. Nella coltura non operavano confini di specie. Le cellule derivate dalla cresta neurale di quaglia erano felici di colonizzare un segmento di intestino di topo e le cellule derivate dalla cresta neurale di topo erano altrettanto contente di

entrare in un intestino di pollo o di quaglia. Potevamo persino utilizzare lo stomaco o l'intestino tenue di un topo lethal spotted come fonte di cellule derivate dalla cresta neurale, per colonizzare l'intestino caudale di un pollo. Al contrario della capacità di quasi ogni tipo di cresta neurale di fornire cellule che entrano in un intestino normale, nessuna fonte di emigrati della cresta neurale, da qualunque posto provengano, fornisce cellule che entrerebbero nella regione terminale dell'intestino lethal spotted. Queste osservazioni indicavano pesantemente che le cellule derivate dalla cresta neurale dei topi lethal spotted sapevano comportarsi normalmente, quando si trovavano ad affrontare un intestino normale, ma che c'era qualcosa di radicalmente sbagliato nel colon dei topi lethal spotted.

Taube Rothman proseguì esaminando il colon del topo lethal spotted in un secondo modo, completamente diverso. Come abbiamo già esposto, essa aveva precedentemente collaborato con Nicole Le Douarin alla tecnica del reinnesto per valutare il potenziale evolutivo delle cellule provenienti dalla cresta neurale. Questi studi avevano rivelato che, quando le cellule derivate dalla cresta neurale, reinnestate, che avevano già colonizzato l'intestino, si trovavano in un percorso di migrazione della cresta neurale in un embrione più giovane, lasciavano l'intestino e migravano nuovamente attraverso i tessuti del nuovo ospite. Ora Taube trasportò questa tecnica a un livello successivo. Reinnestò il colon proveniente sia da topi normali sia da topi lethal spotted in embrioni di quaglia più giovani. Il DNA è distribuito in modo così diverso nei nuclei delle cellule di topo e di quaglia che è facile distinguere una cellula di topo da una di quaglia negli embrioni chimerici risultanti. Le cellule di quaglia, in particolare, non hanno motivo per essere colpite da un'anomalia genetica di topo.

Una delle possibilità che il reinnesto dell'intestino di topo in un ospite più giovane doveva valutare era se, o meno, le cellule derivate dalla cresta neurale entrino nel colon terminale dei topi lethal spotted e muoiano quando arrivano lì. Secondo il nostro ragionamento, potrebbe essere più difficile per le cellule derivate dalla cresta neurale sopravvivere nella parte terminale del colon che nelle regioni più «imbottite» del resto dell'intestino. In questo caso, avremmo potuto essere in grado di salvare queste cellule, fornendo loro un modo di fuggire dal colon, saltando nell'ambiente di un embrione di quaglia più giovane. Di fatto, le cellule derivate dalla cresta neurale partivano dai segmenti reinnestati del colon normale di topo e migravano verso i nervi e i gangli degli ospiti quaglia; però, nessuna cellula lasciava mai il colon lethal spotted. Molto più interessante, le cellule della cresta neurale provenienti dall'ospite quaglia migravano attraverso e nel colon reinnestato di un topo normale, ma il colon di un topo lethal spotted fermava il percorso delle cellule quaglia. Le cellule della cresta neurale di quaglia formavano gangli giganti, immediatamente all'esterno del colon lethal spotted, ma non entravano mai né migravano attraverso di esso.

I risultati dei nostri esperimenti in co-cultura e quelli che implicavano il reinnesto sono incompatibili con l'ipotesi di lavoro iniziale di Masashi Yanagisawa, secondo la quale l'endotelina-3 è un fattore di crescita autocrino, sia prodotto sia richiesto dalle cellule derivate dalla cresta neurale. Se le cellule derivate dalla cresta neurale fossero la fonte essenziale

dell'endotelina-3, le cellule della cresta neurale normali sarebbero state in grado di colonizzare il colon lethal spotted (in co-cultura o dopo reinnesto). La nostra ricerca dimostrò che persino le cellule normali derivate dalla cresta neurale non potevano entrare nel colon lethal spotted. Quindi i nostri esperimenti indicavano che il colon diventa intrinsecamente anomalo quando l'endotelina-3 è carente.

Due esperimenti ulteriori, uno che effettuai con Taube Rothman e Dan Goldowitz, un collaboratore attualmente presso la University of Tennessee, e un altro, eseguito da Raj Kapur, non lasciavano dubbi che il difetto dei topi carenti o di endotelina-3 o del recettore ETB non è solo un problema della cresta neurale. Questi studi utilizzavano i cosiddetti topi *chimerici di aggregazione*. Le ultime chimere di cui abbiamo parlato erano animali che contenevano cellule provenienti da due specie diverse. Nicole Le Douarin aveva prodotto queste chimere, combinando cellule di embrioni di quaglia e di pollo. I topi chimerici di aggregazione sono prodotti combinando gli embrioni di due diversi ceppi di topo. Per produrre queste chimere, i topi sono accoppiati e si lascia appena il tempo sufficiente affinché gli ovuli della madre siano fertilizzati e si dividano una o due volte. Quindi gli embrioni precoci di topo vengono estratti dagli ovidotti dei topi materni. Gli embrioni che si ottengono consistono così di due o quattro cellule. La loro capsula protettiva viene dissolta (con un enzima idoneo) e i due embrioni uniti con un micro-manipolatore. Gli embrioni si fondono, formando un singolo embrione chimerico che contiene quattro o otto cellule. Questa è l'«aggregazione» a cui si riferisce il termine «chimera di aggregazione». Quando gli embrioni fusi vengono impiantati in una madre surrogato, si sviluppano e nascono come figli di quattro genitori (un topo tetraparentale). Ciascuno degli embrioni fusi aveva una madre e un padre; pertanto, siccome il cucciolo risultante è il prodotto di due embrioni, aveva due madri e due padri. Non si tratta di fantascienza. Le cellule di ciascun embrione cooperano nella produzione del cucciolo di topo chimerico di aggregazione, che è quindi un mosaico delle cellule di ciascun embrione originale. Nel nostro caso, fondemmo topi lethal spotted con un altro ceppo senza megacolon congenito. I due ceppi furono selezionati in modo che potessimo riconoscere le cellule di ciascun ceppo (con un marcatore endogeno) negli animali chimerici risultanti. Quasi nessuno dei topi chimerici acquisì megacolon. I colon degli animali chimerici non diventarono agangliari. L'osservazione più incredibile, comunque, fu che le cellule nervose lethal spotted (ognuna delle quali portava due geni mutati su due) si trovavano in ogni ganglio enterico degli animali chimerici, anche nella regione più terminale dell'intestino. Le cellule mutanti derivate dalla cresta neurale possono quindi colonizzare la parte terminale del colon senza difficoltà, sempre che almeno alcune delle cellule dell'intestino nel quale migrano siano normali.

Raj Kapur ottenne gli stessi risultati con chimere di aggregazione, costruite fondendo embrioni di topo lethal spotted con quelli dei suoi animali transgenici DBH-beta-galattosidasi. Utilizzò la beta-galattosidasi per individuare le cellule degli embrioni normali. Cosa ancora più interessante, Raj fuse anche embrioni di topi piebald lethal con quelli di animali transgenici DBH-beta-galattosidasi. La differenza tra i due esperimenti di Raj è che i topi lethal spotted

sono carenti di endotelina-3, mentre i topi piebald lethal non hanno recettori ETB. Masashi Yanagisawa aveva obiettato che le chimere di aggregazione che noi e Raj avevamo studiato inizialmente, che coinvolgevano la fusione di topi normali e lethal spotted, non escludevano un difetto limitato alla cresta neurale. Sugeriva che le cellule della cresta neurale migrano attraverso gli embrioni una di fianco all'altra. Siccome i topi chimerici di aggregazione sono mosaici e le cellule derivate dalla cresta neurale rimangono vicine, la secrezione di endotelina-3 da parte di cellule normali derivate dalla cresta neurale negli animali chimerici può salvare le loro vicine lethal spotted, carenti di endotelina-3.

Al tempo di questi studi, non si sapeva quali cellule producano effettivamente l'endotelina-3; pertanto, la possibilità che la secrezione di endotelina-3 da parte di cellule normali derivate dalla cresta neurale potesse salvare cellule lethal spotted in animali chimerici non poteva essere confutata. L'importanza del secondo studio di Raj Kapur con i topi piebald lethal carenti di ETB fu che è inattaccabile a questa critica. Ciò che lo studio di Raj sulle chimere aveva stabilito con topi piebald lethal fu che le cellule derivate dalla cresta neurale potevano colonizzare l'intero intestino, anche se mancavano dei recettori ETB. Le cellule carenti di recettori ETB non possono rispondere in alcun modo all'endotelina-3; pertanto, non esiste la possibilità che vengano salvate dall'endotelina-3 delle loro vicine. È impossibile spiegare questi dati senza ipotizzare che qualcosa vada storto nel colon, quando l'endotelina-3 non è disponibile, oppure quando i recettori ETB non sono presenti per essere stimolati.

Le nostre osservazioni sulla sovrapproduzione della laminina nell'intestino lethal spotted e le osservazioni di altri sul fatto che la laminina viene sovrapprodotta anche nell'intestino agangiare di pazienti affetti da malattia di Hirschsprung, sono naturalmente dimostrazioni dirette del fatto che accade davvero qualcosa di sbagliato nel colon, quando l'endotelina-3 non è disponibile o quando i recettori ETB non sono presenti per essere stimolati. Quindi il colon non è un ricettacolo passivo per cellule provenieriti dalla cresta neurale, bensì un partecipante attivo che determina se consentirà di essere colonizzato o meno.

Fino a questo punto della storia, Raj Kapur e io eravamo stati ragionevolmente d'accordo su che cosa accada negli animali carenti di endotelina-3/ETB. Concordiamo ancora sulle osservazioni di base, ma esistono alcune sfumature importanti diverse nel modo di interpretare i dati. Raj e io pensiamo che l'intestino non diventi agangiare negli animali carenti di endotelina-3/ETB, semplicemente perché le cellule derivate dalla cresta neurale non possono dare origine a cellule nervose enteriche, a meno che i loro recettori ETB siano stimolati dall'endotelina-3. Riteniamo inoltre che l'assenza di gangli non possa essere spiegata da un'anomalia che si limiti alla cresta neurale. Nel linguaggio scientifico, l'assenza di gangli non è *autonoma dalla cresta neurale*. Tuttavia, abbiamo proposto ipotesi diverse per spiegare che cosa, a parte le cellule derivate dalla cresta neurale, sia coinvolto.

L'ipotesi di Raj è che normalmente le cellule derivate dalla cresta neurale siano stimolate da endotelina-3 (attraverso i recettori ETB), per emettere un segnale che prepara il colon al loro ingresso. Mi piace definire il suggerimento di Raj come l'ipotesi araldica. Trasforma l'intestino

crasso in un bel posto, servito da cellule la cui funzione, alla ricezione della notizia dell'imminente arrivo della delegazione proveniente dalla cresta neurale, è quella di preparare l'intestino per un ingresso regale. Così la colonizzazione del colon da parte di cellule derivate dalla cresta neurale viene considerata come un evento grandioso, come lo storico incontro, nel 1520, tra Enrico VIII e Francesco I sul Campo del Vello d'Oro. Sarebbe stato impensabile per il re d'Inghilterra o per quello di Francia arrivare al luogo dell'incontro senza un idoneo benvenuto. Questa accoglienza sarebbe stata attivata da un discreto messaggio, prima dell'imminente arrivo, inviato dai gruppi regali in avanzamento.

Nell'idea di Raj, le cellule derivate dalla cresta neurale suonano i propri corni e inviano il messaggio, che consente al colon di prepararsi per l'arrivo. Inoltre, per poter fare questo, Raj richiede che siano stimolati i recettori ETB sulle cellule derivate dalla cresta neurale. La natura del segnale che le cellule derivate dalla cresta neurale trasmettono al colon è ignota, come lo è quella dell'accoglienza preparata dall'intestino. Eppure è impensabile, nell'ipotesi di Raj, che le cellule derivate dalla cresta neurale migrino attraverso un colon che non sia stato idoneamente preparato a riceverle. Devo rendere merito a Raj. Chi altro potrebbe concepire un dramma, in cui il colon recita il ruolo del Campo del Vello d'Oro?

Le mie idee sono molto più plebee di quelle di Raj. Il colon non ha bisogno di araldi per annunciare l'arrivo della cresta neurale. Secondo me, il segnale che l'intestino richiede per consentire di essere colonizzato dalle cellule provenienti dalla cresta neurale è l'endotelina-3, e produce l'endotelina-3 tutto da solo. Io credo che l'endotelina-3 agisca sui recettori ETB, che sono espressi nel colon dai precursori della muscolatura liscia enterica (oltre che da cellule provenienti dalla cresta neurale). In risposta all'endotelina-3, queste cellule riducono la propria biosintesi dei componenti della lamina basale, compresa la laminina-1. In assenza di questo effetto dell'endotelina-3, viene prodotta troppa laminina-1 e, a causa della subunità α -1 della laminina-1, la laminina-1 accumulata fornisce cellule derivate dalla cresta neurale con uno stimolo troppo forte per differenziarsi. Così, le cellule derivate dalla cresta neurale si trasformano in cellule nervose, prima di avere terminato la colonizzazione dell'intestino. Le cellule derivate dalla cresta neurale vagale interrompono la migrazione nella parte superiore del colon e le cellule derivate, dalla cresta neurale sacrale interrompono la migrazione, prima ancora di entrare nell'intestino. La funzione essenziale dell'endotelina-3, pertanto, è di scoraggiare la ricezione che il colon fornisce alle cellule derivate dalla cresta neurale. Io considero l'endotelina-3 come un fattore necessario per la limitazione e la moderazione, non un benvenuto regale. In assenza di endotelina-3, l'esuberanza delle cellule derivate dalla cresta neurale, presumibilmente eccitate dallo splendido micro-ambiente che incontrano nel colon, le porta a una caotica e diversiva differenziazione. Come risultato di questa baldoria, le cellule precursore si ritrovano a essere cellule nervose, prima di avere terminato la propria marcia fino al termine dell'intestino. A quel punto, naturalmente, è troppo tardi. L'intestino terminale è irreversibilmente agangiare.

Le azioni dell'endotelina-3

La potenza della biologia molecolare ha generato un'ondata di entusiasmo che a volte trascende i confini della realtà. Molte persone, compresi i pochi scienziati che dovrebbero invece saperne abbastanza, hanno creduto davvero che la scoperta del gene o dei geni responsabili della causa di un difetto congenito avrebbe portato alla risoluzione del problema. Le soluzioni però hanno dimostrato di essere evasive. Per comprendere perché si verifica un difetto genetico, è necessario, ma non sufficiente, conoscere l'identità del gene anomalo. Il meccanismo dell'azione del gene, che è spesso difficile da comprendere, è ugualmente importante, e non viene rivelato solo dalla conoscenza dell'identità del gene, o anche del suo prodotto. La scoperta del fatto che le mutazioni dei geni che codificano endotelina-3 e recettori ETB causano il megacolon congenito illustra questi limiti molto bene. Sebbene Masashi Yanagisawa abbia reso un importante contributo alla biologia e alla medicina con le sue scoperte, questa rivoluzione di per sé non ha rivelato che cosa sia richiesto all'endotelina-3 di fare, affinché il colon venga colonizzato dalle cellule derivate dalla cresta neurale. Certamente, sarebbe impossibile comprendere perché si manifesti il megacolon congenito, senza sapere che endotelina-3 e recettori ETB svolgono un ruolo essenziale nella colonizzazione dell'intestino, da parte delle cellule provenienti dalla cresta neurale; ciononostante, la mera conoscenza del fatto che i geni codificanti endotelina-3 e i recettori ETB sono coinvolti nel processo non ha rivelato esattamente la loro attività.

Masashi Yanagisawa e Raj Kapur hanno collaborato per cercare di capire che cosa faccia realmente l'endotelina-3 per il colon. Nel loro lavoro hanno utilizzato i topi transgenici di Raj, nei quali il promotore DBH viene impiegato per indurre le cellule derivate dalla cresta neurale vagale a esprimere geni specifici nell'intestino di topi transgenici. Il primo esperimento di Masashi e Raj fu di impiegare il promotore DBH per attivare l'espressione di endotelina-3 nelle cellule derivate dalla cresta neurale vagale all'interno dell'intestino di topi lethal spotted. L'esperimento funzionò. Le cellule derivate dalla cresta neurale vagale dei topi lethal spotted con un transgene DBH-ET-3, esprimevano realmente endotelina-3; inoltre, l'espressione dell'endotelina transgenica impediva al colon dei topi lethal spotted di diventare agangiare. Tuttavia, nonostante l'espressione di endotelina-3 nel loro intestino, i topi transgenici lethal spotted non persero le macchie. L'importanza dei risultati di questi esperimenti è che definiscono l'intestino quale luogo di azione dell'endotelina-3. Il promotore DBH non si attiva fino a quando le cellule derivate dalla cresta neurale vagale entrano nell'intestino; inoltre, il fatto che i melanociti restino anormali, nonostante l'introduzione di una normale fonte di endotelina-3, indica che gli effetti dell'endotelina-3 diretti verso l'intestino sono alquanto locali. Inoltre questo esperimento esclude definitivamente la possibilità, suggerita da Nicole Le Douarin, che il ruolo dell'endotelina-3 sia quello di stimolare la popolazione premigratoria delle cellule della cresta neurale a espandersi in modo sufficiente da colonizzare l'intero intestino.

Un secondo esperimento di Masashi Yanagisawa e Raj Kapur fu l'impiego del promotore DBH per dirigere l'espressione dei recettori ETB verso le cellule derivate dalla cresta neurale

vagale nell'intestino di topi, geneticamente incapaci di produrre il recettore. Ancora una volta, l'introduzione di un transgene prevenne l'insorgenza di un colon privo di gangli. I precedenti esperimenti transgenici con endotelina-3 avevano dimostrato che il locus dell'azione dell'endotelina-3 è nell'intestino; però, siccome l'endotelina-3 può muoversi all'interno dell'intestino, la correzione di una carenza di endotelina-3 mirata al legante dell'intestino non stabilisce quale sia la cellula enterica problematica. Al contrario, la correzione di un deficit di ETB puntando i recettori ETB sulle cellule derivate dalla cresta neurale, che colonizzano l'intestino, suggerisce certamente con forza che i recettori ETB sulle cellule derivate dalla cresta neurale devono essere stimolati per colonizzare il colon. Curiosamente, la tecnica di dirigere transgenicamente l'espressione del recettore ETB verso le cellule derivate dalla cresta neurale è migliore nella cura dell'assenza di gangli di topi carenti di ETB che di ratti carenti di ETB. Comunque, grazie al risultato di questi esperimenti più recenti su animali transgenici, ora sappiamo che l'endotelina-3 agisce nell'intestino e che deve operare sulle cellule derivate dalla cresta neurale. Per spiegare perché l'assenza di gangli associata a un deficit di endotelina-3/ETB non è autonoma dalla cresta neurale, perciò, è necessario ipotizzare o che le cellule derivate dalla cresta neurale inviano un segnale al colon, prima del proprio arrivo (ipotesi araldica di Raj), oppure che un'altra cellula nel colon, oltre alle cellule derivate dalla cresta neurale, debba essere stimolata dall'endotelina-3 (la mia ipotesi plebea).

Per determinare che cosa fa l'endotelina-3 per la cresta neurale e per il colon, assunsi un approccio piuttosto diverso da quello di Masashi Yanagisawa e Raj Kapur. Io decisi di determinare che cosa fa l'endotelina-3, sia a una popolazione purificata di cellule derivate dalla cresta neurale, immunoselezionate dall'intestino del topo in sviluppo, sia alla popolazione residua di cellule che rimane dopo la rimozione di cellule derivate dalla cresta neurale (mediante immunoselezione). Questi esperimenti furono condotti con Jun Wu, lo studente laureato che aveva precedentemente utilizzato l'immunoselezione per confermare che le cellule interstiziali di Cajal non hanno origine dalla cresta neurale.

Jun proviene dalla Repubblica Popolare Cinese e rappresenta un grande esempio dei vantaggi di cui gode l'America quando si ignorano i confini nazionali, in campo scientifico ed educativo. Stiamo vivendo un momento di declino del numero di americani che scelgono una carriera nella ricerca biomedica. Questo ha creato un vuoto, colmato dalla Cina e da altri paesi. Jun forse ritornerà in Cina, ma io ho potuto trarre grande beneficio dall'opportunità di lavorare con lui e i nostri studenti americani hanno goduto della possibilità di interagire con lui. Naturalmente, io mi sono occupato della formazione di Jun come ricercatore, ma se continua a fare scoperte fondamentali e importanti in campo biomedico, che differenza fa la sua nazionalità? Il nostro governo continua a limitare i fondi per la formazione ai cittadini americani o ai possessori di carta verde. Questa politica si scontra con il carattere internazionale della scienza e è sempre più controproducente. I non cittadini, di cui cerchiamo di prevenire la formazione, molto probabilmente sono le persone dalle quali la scienza americana dipenderà in futuro.

Gli effetti dell'endotelina-3 sulle cellule enteriche provenienti dalla cresta neurale rivelarono

non essere affatto ciò che si prevedeva e in realtà erano tutt'altro che intuitive. Siccome quando l'endotelina-3 è carente in una regione dell'intestino, non si verifica lo sviluppo delle cellule nervose, la spiegazione più ovvia è che il ruolo evolutivo dell'endotelina-3 sarebbe quello di un segnale essenziale, che favorisce la differenziazione e/o la sopravvivenza delle cellule nervose enteriche.

Per esempio, si potrebbe prevedere che l'endotelina-3 agisse come GDNF e stimolasse la proliferazione di precursori delle cellule nervose. In alternativa, si potrebbe prevedere che l'endotelina-3 agisse come NT-3 e accentuasse la differenziazione e/o la sopravvivenza delle cellule nervose mature. In realtà, però, è stato scoperto che l'endotelina-3 non fa nulla di ciò che una persona ragionevole si aspetterebbe da lei.

La prima sorpresa degli esperimenti di Jun fu la sua dimostrazione del fatto che le cellule nervose enteriche si sviluppano senza alcun problema, in totale assenza di endotelina-3, e altrettanto bene in presenza di un antagonista degli effetti dell'endotelina-3 sui recettori ETB. L'ipotesi originaria di Masashi Yanagisawa, secondo la quale l'endotelina-3 sarebbe richiesta per lo sviluppo di cellule nervose enteriche, si dimostrò pertanto sbagliata. L'endotelina-3 non è necessaria per lo sviluppo di queste cellule e non lo è neppure la stimolazione del recettore ETB. Al contrario, Jun riscontrò che in realtà la stessa endotelina-3 inibisce lo sviluppo di cellule nervose in un modo molto fine che dipende dalla concentrazione. Per di più, Jun dimostrò anche che i composti che imitano le azioni dell'endotelina-3 sul recettore ETB (cioè agiscono come agonisti) sono anche inibitori altamente efficaci della differenziazione delle cellule nervose enteriche in coltura di cellule. Al contrario degli effetti prodotti quando sono applicati da soli alle colture di precursori di cellule nervose enteriche, cioè non fare nulla, gli antagonisti ETB bloccano completamente gli effetti dell'endotelina-3 sullo sviluppo delle cellule nervose enteriche.

Quando vidi per la prima volta i dati di Jun Wu, credetti che l'endotelina-3 dovesse impedire lo sviluppo delle cellule nervose perché stimolava la proliferazione dei loro precursori. Se le cellule precursori continuavano a dividersi, non ne avremmo osservato lo sviluppo in cellule nervose. Siccome Nicole Le Douarin aveva riscontrato che l'endotelina-3 esercita proprio questo effetto sulle cellule premigratorie della cresta neurale, sarebbe stato alquanto naturale presumere che l'endotelina-3 avrebbe fatto la stessa cosa alle cellule postmigratorie derivate dalla cresta neurale, che Jun aveva pescato nell'intestino. Fortunatamente, non ci accontentammo di fare questa supposizione e studiammo che cosa stesse facendo effettivamente l'endotelina-3. Di fatto, l'endotelina-3 non aumentava il tasso di proliferazione dei precursori derivati dalla cresta neurale, né stimolava la proliferazione di qualunque altra cellula nelle colture ottenute dall'intestino fetale. Per osservare la proliferazione in modo razionale, misurammo l'assorbimento di due molecole che erano state incorporate nel DNA delle cellule che proliferano, *timidina* radioattiva e *bromodeossiuridina*. Il consumo di nessuna delle due molecole era stato modificato in alcuno modo dall'endotelina-3. Quindi l'endotelina-3 sembra agire da freno sulla differenziazione. Gli effetti dell'endotelina-3 sulle cellule postmigratorie

derivate dalla cresta neurale, come quelli della laminina-1, sono perciò differenti dagli effetti dell'endotelina-3 sulle cellule premigratorie della cresta neurale stessa. Le cellule derivate dalla cresta neurale che alla fine arrivano nell'intestino non sono le stesse dei propri predecessori. Comunque, i dati di Jun rivelano che l'endotelina-3 è probabilmente una molecola limitante, che trattiene le cellule derivate dalla cresta neurale e impedisce loro di differenziarsi, prima del tempo.

Jun utilizzò un marcatore specifico della muscolatura liscia, una molecola chiamata *desmina*, per studiare gli effetti dell'endotelina-3 sulle colture delle cellule residue. Al contrario degli effetti sullo sviluppo delle cellule nervose enteriche, scoprì che l'endotelina-3 favorisce lo sviluppo della muscolatura liscia. Mentre l'endotelina-3 riduce il numero di cellule nervose che si sviluppano in colture di cellule immunoselezionate, essa aumenta il numero delle cellule della muscolatura liscia, che si sviluppano in colture di cellule residue. Forse, siccome l'endotelina-3 accentua la maturazione dei precursori delle cellule muscolari, che sono secretorie, nelle cellule della muscolatura liscia, che concentrano la propria energia per la contrazione, l'endotelina-3 riduce anche la biosintesi delle subunità di laminina-1, compresa quella della subunità α -1, che favorisce lo sviluppo delle cellule nervose.

Durante l'osservazione del fatto che lo sviluppo delle cellule della muscolatura liscia è favorito dall'endotelina-3, Jun riscontrò che il recettore ETB viene espresso dalle cellule nella popolazione residua, oltre che dalle cellule derivate dalla cresta neurale. Questa osservazione fu confermata da Jingxian Chen, che dimostrò successivamente come il recettore ETB venga espresso nell'intestino di topi con knockout *Ret*, fetali e appena nati. Siccome nell'intestino di topi con knockout *Ret* non sono affatto presenti cellule originate dalla cresta neurale, la presenza del recettore ETB nell'intestino con knockout *Ret* dimostra che i recettori ETB sono espressi nell'intestino da cellule non derivate dalla cresta neurale. Le cellule dell'intestino, che provengono dalla cresta neurale, e le cellule che non provengono dalla cresta neurale, esprimono pertanto entrambe il recettore ETB.

Cheryl Gariepy, una studentessa di postdottorato che lavora nel laboratorio di Masashi Yanagisawa, ha recentemente confermato (mediante ibridazione *in situ*) che endotelina-3 e recettori ETB sono espressi nell'intestino fetale da cellule non derivate dalla cresta neurale. Cheryl ha riscontrato che i trascritti di RNA, codificanti preproendotelina-3, si trovano in realtà di preferenza in cellule non neuronali, nella parete dell'intestino fetale. Al contrario, i trascritti RNA codificanti il recettore ETB sono espressi potentemente nell'intestino fetale, da cellule derivate dalla cresta neurale; ciononostante, poco dopo la loro comparsa negli emigrati provenienti dalla cresta neurale, i trascritti codificanti il recettore ETB vengono espressi anche da cellule che non hanno origine dalla cresta neurale.

Gli esperimenti di Jun Wu e l'ubicazione dell'RNA, codificante endotelina-3 e recettori ETB, fornirono una notevole conferma di ciò che in precedenza avevo sospettato rispetto alla causa dell'assenza di gangli. Quando endotelina-3 o recettori ETB sono assenti, le cellule derivate dalla cresta neurale, che «tentano» di colonizzare il colon, fronteggiano una doppia iettatura. Da

una parte vengono private di una limitazione (la capacità dell'endotelina-3 di inibire la loro differenziazione prematura), dall'altra incontrano un importante promotore dello sviluppo delle cellule nervose (la catena alfa-1 della laminina-1, eccessivamente espressa), mentre entrano nel colon carente di endotelina-3/ETB. Di fronte a questa situazione, credo che i precursori delle cellule nervose non siano in grado di trattenersi dal differenziarsi in cellule nervose.

La conseguenza dello sviluppo prematuro delle cellule nervose è che l'intestino resta colonizzato in maniera incompleta. Siccome le cellule derivate dalla cresta neurale, mentre si differenziano, interrompono pure la divisione, anche il numero totale delle cellule provenienti dalla cresta neurale, all'interno del colon carente di endotelina-3/ETB, è ridotto. La sovrapproduzione di laminina-1 si verifica all'esterno dell'intestino, oltre che all'interno. Come risultato, esistono gangli fuori posto (*ectopici*) nella pelvi dei topi *lethal spotted*, che non sono presenti nella pelvi dei loro compagni normali. Alcuni di questi gangli ectopici si fondono in realtà con quelli del plesso mienterico del colon, proprio sopra la zona agangiare. Io interpreto i gangli ectopici come prova del fatto che le cellule derivate dalla cresta neurale sacrale si fermano e si differenziano in cellule nervose, prima di raggiungere i loro obiettivi nell'intestino.

Resta da verificare la mia ipotesi sull'origine dell'assenza dei gangli negli animali carenti di endotelina-3, che non va presa come un vangelo, ma presenta diversi vantaggi. Uno è che l'ipotesi considera tutti i dati. Un altro è che tutti i suoi principi sono supportati da osservazioni effettive. L'endotelina-3 inibisce davvero lo sviluppo delle cellule nervose, mentre favorisce quello delle cellule muscolari. L'endotelina-3 diminuisce davvero la secrezione di laminina-1, probabilmente mediante l'accentuazione della conversione dei precursori secretori delle cellule muscolari in cellule muscolari mature contrattili. La laminina-1, di fatto, favorisce lo sviluppo di cellule nervose enteriche.

L'assenza di gangli che si verifica nell'intestino dei pazienti affetti da malattia di Hirschsprung è una problematica più complessa di quella presente negli animali modelli di questa patologia. Quando sono sbagliate le mutazioni dei geni che codificano endotelina-3 o recettori ETB, sembra probabile che la patogenesi del megacolon congenito umano sia analoga, se non identica, ai difetti negli animali correlati alle stesse anomalie. Gli altri deficit genetici che sono stati correlati alla malattia di Hirschsprung, però, impediscono qualunque tipo di spiegazione semplice.

I difetti di *Ret* o *GDNF* sono superficialmente spiegabili, perché questo recettore e il suo legante sono richiesti per la sopravvivenza dei precursori delle cellule nervose enteriche nell'intestino. D'altra parte, quando *Ret* o *GDNF* vengono eliminati nei topi, il risultato non è solo un colon agangiare, ma l'intero intestino al di sotto dell'esofago e della parte adiacente dello stomaco. Inoltre, affinché qualunque anomalia sia riscontrata negli animali, l'anomalia genetica deve coinvolgere sia il gene ereditato dalla madre sia il gene ereditato dal padre. Negli esseri umani, solo uno dei geni *RET* è sempre anomalo (se lo sono entrambi, il difetto è probabilmente così grave che i soggetti colpiti non sopravvivono neppure tanto a lungo da arrivare alla nascita) e l'anomalia si limita al colon. Ovviamente, è necessario apprendere di più

in merito alla patologia umana, che probabilmente origina da una varietà di meccanismi.

Più apprendiamo sulla malattia di Hirschsprung, come illustrano i fatti complessi appena presentati, più diventa evidente che la patologia porta il nome sbagliato. Hirschsprung, quando descrisse il problema, vedeva solo il risultato finale, un intestino senza gangli nell'estremità terminale. Non aveva idea di quali fossero le cause. Fece l'unica cosa possibile: descrisse quello che vedeva. Però ora si evince che probabilmente non esiste solo una malattia di Hirschsprung, ma una serie di malattie di Hirschsprung. Tutte queste patologie portano a un risultato finale analogo, perché il repertorio delle cellule migranti derivate dalla cresta neurale è limitato. Il colon terminale per loro è come la California per la gente nel '49, una destinazione che poteva essere irraggiungibile per una serie di ragioni. Le motivazioni per il mancato raggiungimento dell'intestino terminale da parte delle cellule derivate dalla cresta neurale possono variare, ma se le cellule non arrivano, il risultato finale è sempre lo stesso: i gangli non si trovano dove devono essere. Le cellule possono morire durante il cammino, venire sviolate, oppure uccise al momento dell'arrivo. Qualunque sia la causa, un colon senza un sistema nervoso è un megacolon.

La malattia di Hirschsprung illustra una verità lapalissiana rispetto a qualunque tipo di viaggio. Quando si viaggia è saggio sapere dove si va, capire se si è arrivati e come fermarsi quando si arriva. Le cellule derivate dalla cresta neurale che colonizzano l'intestino non fanno eccezione. Devono trovare i siti corretti per fondare i gangli che formeranno e devono sapere quando hanno raggiunto questi posti. Se le cellule derivate dalla cresta neurale interrompono la migrazione nel posto sbagliato, il colon è perduto, proprio come se queste cellule fossero morte. Quando si tratta dell'attività del colon e del rispettivo controllo, ogni cosa è dettaglio. Ciò significa che non esiste nulla di più importante per il colon della formazione dei gangli nei posti giusti; in altre parole, il posto è tutto: il posto, il posto, il posto!

¹ I soggetti affetti da malattia di Hirschsprung, detta anche megacolon congenito, cioè l'assenza congenita di cellule gangliari nell'ultimo tratto del colon.

² La Pasqua ebraica, che dura otto giorni, si celebra principalmente in casa, con cene dette Seder, che significa «ordine», in quanto contraddistinte da un ben preciso rituale di letture (l'Haggadah, cioè il racconto dell'Esodo), canti e cibi, ciascuno con un preciso simbolismo.

³ Durante lo sviluppo si forma un pronefro che viene sostituito da un mesonefro e infine da un metanefro, che è il nostro rene. Vengono mantenuti pezzetti dei reni precedenti, ma la maggior parte muore come gli antichi Caananiti.

⁴ Il gene «lethal spotted» era detto *ls* prima che si sapesse quale proteina codificasse il gene. I geni sono posizionati in successione lungo un cromosoma, come una fila di perle in una collana. Siccome i cromosomi sono a coppie abbinati, possono esserci due geni (o alleli) per ogni sito cromosomico (o locus), uno per ciascun cromosoma della coppia. I due alleli su ciascun loco possono essere o non essere gli stessi. Se sono gli stessi, ogni allele dirige la sintesi dello stesso prodotto. Se i due alleli non sono gli stessi, ciascun allele dirige la sintesi del proprio prodotto in una cellula o in un'altra. In questo caso, tuttavia, un prodotto è solo la metà della quantità di quello prodotto quando entrambi gli alleli sono identici. Un gene di un locus può mutare e codificare una proteina che o non può essere prodotta, oppure non è in grado di fare il proprio lavoro se prodotta. Se metà della quantità abituale è idonea a mantenere la funzione per la quale la proteina è necessaria, la mutazione sarà irrilevante. Il gene normale copre il partner anomalo e si dice dominante. Questo è il caso dei topi «lethal spotted». Se la composizione genetica

dell'animale è $Is/+$, cioè c'è un allele mutato e uno wild-type, i topi stanno bene. Per acquisire le macchie e la mancanza di gangli i topi devono essere Is/Is . Come casualità, un genitore $Is/+$ può contribuire alla propria progenie o un gene Is o un $+$; pertanto, ci si aspetterebbe che solo (?) dei cuccioli (gli sfortunati vincitori dell'estrazione) che prende il gene Is da ciascun genitore fosse anomalo. D'altra parte, se un genitore è $+/+$, allora nessun figlio avrà la malattia, a prescindere dalla composizione genetica dell'altro genitore. Al contrario, quando topi Is/Is si incrociano uno con l'altro, tutta la progenie è anomala.

⁵ Le cellule che rivestono i vasi sanguigni sono dette cellule endoteliali. Pertanto, le endoteline hanno preso il nome dalla loro origine dalle cellule endoteliali.

⁶ Inoltre, siccome i recettori ETB sono in grado di rispondere ugualmente bene a tutte le endoteline, sorge la domanda del perché l'endotelina-1 o l'endotelina-2 non compensino la perdita dell'endotelina-3. I recettori ETB sono intatti nei topi con knockout di endotelina-3 e nei lethal spotted; perciò, se endotelina-1 o endotelina-2 potessero raggiungere i recettori ETB degli animali mutanti, non ci sarebbe bisogno di endotelina-3. L'endotelina-1 o l'endotelina-2 in circolazione salverebbero il colon. Se non lo fanno, ciò implica che le endoteline non circolano nei feti di topi.

12. Lo stato dell'intestino

Negli ultimi anni i progressi nella comprensione del secondo cervello e della sua evoluzione sono stati estremamente rapidi. Anche se dico questo, se foste contrari alla mia opinione, potreste avere ragioni per metterla in discussione. Recentemente ho riesaminato la letteratura mondiale sulla malattia di Hirschsprung per un articolo tecnico che scrissi su quell'argomento. Osservando tutte le informazioni ora disponibili su pazienti umani affetti da megacolon congenito e sui modelli animali della patologia, mi ritrovo ancora incapace di fornire una risposta soddisfacente alla domanda: che cosa porta la parte terminale del colon a diventare agangiare? Superficialmente, la risposta è semplice. I geni sono andati a male e non stanno inviando le informazioni che dovrebbero. Però questa semplice dichiarazione non è una risposta. Posso citare una varietà di geni che, se alterati, portano alla malattia di Hirschsprung. È quello che ho appena fatto. Tuttavia il problema è partire dai geni per arrivare al colon agangiare. Non siamo ancora in grado di farlo.

Siamo vicini a conoscere che cosa accade quando i geni mutati, associati con la malattia di Hirschsprung, sono quelli che normalmente codificano l'endotelina-3 o i recettori ETB. Ma anche con questi geni, disponiamo solo di teorie conflittuali per spiegare che cosa succeda, non di una serie definita di fatti. Inoltre, come abbiamo visto, il meccanismo che produce il colon agangiare quando mancano l'endotelina-3 o i recettori ETB è improbabile che sia operativo quando il gene mutato è *RET* o *GDNF*. Siccome, a differenza dell'endotelina-3 e dei recettori ETB, l'espressione di *RET* e *GDNF* è realmente richiesta dagli emigrati derivati dalla cresta neurale per sopravvivere nell'intestino, sembra probabile che una perdita della loro funzione provochi una qualche anomalia dei precursori delle cellule nervose enteriche; ciononostante, si sa molto meno del perché il colon diventi agangiare quando *RET* o *GDNF* vengono mutati, rispetto a quando i geni mutati sono ET-3 o ETB. Nel caso di *RET* o *GDNF*, possiamo solo ipotizzare che cosa esattamente vada storto nell'intestino, perché le lesioni nell'intestino umano si limitino alla parte terminale del colon e perché gli esseri umani e gli animali siano colpiti in modo differente dalle mutazioni degli stessi geni. Si sa ancora meno delle azioni degli altri geni, che si è scoperto essere correlati a casi di malattia di Hirschsprung.

È facile osservare questo riassunto malinconico sui limiti delle conoscenze attuali e chiedersi come noi scienziati utilizziamo il tempo. Ogni anno miliardi di dollari pubblici vengono riversati nella ricerca biomedica e una domanda semplice come il perché alcune persone nascano senza alcuna cellula nervosa nell'intestino terminale non ha ancora trovato una risposta adeguata. Tuttavia, uno sguardo più attento alla stessa serie di fatti rivela che le cose sono in

realtà piuttosto entusiasmanti e che lo diventano sempre di più.

Una parola scritta, probabilmente, fu incisa per la prima volta in una pietra vicino al fiume Eufrate, da un nostro antenato sumero oltre cinquemila anni fa. Si può dire che quell'atto sia stato l'inizio della storia del mondo occidentale. Però, trascorse molto tempo tra l'iniziale incisione di parole nella pietra e la scrittura sistematica, da parte dei nostri predecessori, di un resoconto scritto degli eventi di cui furono testimoni. La Bibbia è la registrazione scritta sulla quale si basa la civiltà giudaico-cristiana. L'ebraico scritto, la lingua della Bibbia, risale pressappoco al decimo secolo a.e.c.¹ Il Pentateuco probabilmente non esisteva come lo conosciamo noi, fino a dopo la prigionia babilonese (538 a.e.c.). Quindi, per arrivare dalla prima parola umana alla Bibbia, i nostri antenati impiegarono oltre duemila anni. Trascorse più o meno lo stesso tempo tra il completamento della Bibbia e l'articolo, pubblicato nel 1954 da Yntema e Hammond, che dimostrava che il sistema nervoso enterico è formato da emigranti che si spostano verso l'intestino dalla cresta neurale. Quel manoscritto stava al secondo cervello come la parola sumera incisa nella pietra stava alla civiltà giudaico-cristiana, l'inizio della sua storia.

In paragone, noi scienziati non stiamo andando poi tanto male. Non abbiamo impiegato due millenni per passare dall'inizio della ricerca moderna sul secondo cervello all'identificazione di geni che ne controllano la formazione e che, se mutati, provocano la malattia. Ci sono voluti solo quarant'anni. Nel limitato periodo di quattro anni dalla scoperta del ruolo dell'endotelina-3 nella formazione del sistema nervoso enterico, abbiamo imparato come influisce sulle cellule provenienti dalla cresta neurale e come le sue azioni cambino, dopo che le cellule derivate dalla cresta neurale colonizzano l'intestino. Inoltre, mentre non sappiamo ancora precisamente come le anomalie dell'endotelina-3 o dei recettori ETB provochino difetti nella formazione dei gangli enterici, almeno disponiamo di ipotesi testabili in merito. Di importanza ancora maggiore, il complicato processo, apparentemente insondabile, dello sviluppo del secondo cervello è stato sufficientemente decodificato da comprendere che è un meccanismo ordinato. Abbiamo imparato che l'intestino è colonizzato da precursori cellulari nervosi sia specifici sia generici, che questi colonizzatori sono controllati da segnali forniti dal micro-ambiente enterico e che le loro risposte sono determinate, in parte, dall'eredità che i vari ceppi di origine delle cellule derivate dalla cresta neurale portano all'intestino.

In breve, anche se esistono ancora mondi sconosciuti, i progressi nella comprensione dello sviluppo del secondo cervello non possono essere considerati lenti. Gli scienziati hanno utilizzato bene il proprio tempo. Ma ci sarà un ritorno agli investimenti pubblici? Sicuramente nessuno può, o dovrebbe, mettere in discussione se il pubblico stia meglio per avere sostenuto la ricerca biomedica in generale. È certamente così. Rispetto ai costi per proteggersi dalla passata Unione Sovietica durante la guerra fredda, le spese per difendersi dalla malattia sono state assolutamente irrilevanti. Ammetto che i sovietici facessero paura, ma molti più americani vengono uccisi ogni anno da cancro al colon, germi, infarti cardiaci e ictus che dagli sforzi combinati dei sovietici durante il periodo della guerra fredda. Una società che poté permettersi di

spendere migliaia di miliardi di dollari l'anno per difendersi dalla potenziale minaccia dell'Unione Sovietica può facilmente concedersi di spendere una minuscola frazione di quell'importo per proteggersi dalla minaccia molto più immediata della malattia.

Di fatto, i dollari spesi dal governo degli Stati Uniti per difendersi da malattie di vario tipo sono stati investimenti estremamente positivi. A parte le vite che hanno salvato e la sofferenza che hanno prevenuto, i dollari spesi, in particolare nella ricerca biomedica di base, hanno probabilmente ottenuto un profitto notevole. La sanità non costa poco. Ogni malattia prevenuta dal progresso scientifico rappresenta quindi denaro in banca per la nazione.

Quando ero bambino, i miei genitori vivevano nella paura della poliomielite. Ogni estate sembrava che ci fosse un allarme polio. Un campeggio per bambini nelle vicinanze veniva chiuso per un'epidemia di polio, oppure una minaccia di epidemia causava la cancellazione di un viaggio. Il presidente, che loro ammiravano più di qualunque uomo sulla terra, era diventato zoppo per questo. Le terribili epidemie di polio che un tempo erano reali oggi non lo sono più. Paragonate il costo della distribuzione del vaccino antipolio a quanto costerebbe oggi la poliomielite, se fossero ancora necessari i polmoni di acciaio, i ricoveri, la quarantena, i supporti ortopedici, la riabilitazione, l'aiuto ai disabili e i funerali precoci correlati. Paragonate il costo della chirurgia per l'ulcera a quello dell'omeprazolo e della ranitidina, e comparate anche il costo del trattamento medico di ulcere, pirosi e cancro allo stomaco a un unico ciclo di antibiotici per sradicare l'*Helicobacter pylori*. Le scoperte fondamentali, rispetto ai progressi tecnici nel trattamento, risparmiano denaro.

Oltre al risparmio monetario (e al miglioramento della vita) dovuto al progresso della scienza biomedica, gli investimenti fatti dal nostro governo per sostenere il lavoro dei propri scienziati hanno dato vita a un'industria biotecnologica leader mondiale. Questo settore sta iniziando a sfornare prodotti utili e ne verranno molti altri ancora, la sua esistenza ha già prodotto un notevole numero di posti di lavoro e grande benessere. La giustificazione della ricerca biomedica in generale perciò non è difficile. Non è un argomento controverso. Siccome nessuno è immortale o invulnerabile, tutti traggono vantaggio dalla ricerca biomedica, e non esiste alcun lato oscuro. Il progresso della sanità non è un gioco a somma zero, dove uno guadagna quello che un altro perde. Si fa un passo in avanti e diventa disponibile per tutti. Persino ai politici piace la ricerca biomedica. Dopo tutto, che tipo di sostenitori hanno i germi? Nessuno sta dalla parte della malattia.

Al contrario della ricerca biomedica in generale, è spesso difficile vedere ciò che di buono proviene dalla ricerca di base in generale. I progressi fondamentali sono il risultato di piccoli incrementi nella conoscenza. I piccoli passi si sommano, ma non sono di per sé spettacolari, e persino chi li fa può non sapere dove portano. In effetti, quelli di noi che esplorano cose sconosciute all'inizio degli studi, non sanno mai dove si dirige la propria ricerca. Questa è la natura dell'ignoto. È molto diverso dal campo della ricerca applicata, dove necessità specifiche forniscono la motivazione per effettuare il lavoro e dove non si deve scoprire nulla di nuovo per farlo. La ricerca applicata consiste nell'uso della conoscenza disponibile per raggiungere gli

obiettivi desiderati. Quindi è improbabile, per esempio, che si chieda a una persona che cerca di progettare una valvola cardiaca artificiale quale sia l'utilità della sua impresa. È ovvio che le valvole cardiache sono spesso danneggiate da varie entità patogene e che debbano essere sostituite. Esiste un rischio nella sostituzione della valvola cardiaca, che potrebbe essere ridotto fornendo ai chirurghi valvole migliori. Gli scienziati di base quindi si trovano spesso a dover fornire un razionale del proprio lavoro, mentre gli scienziati applicati raramente fronteggiano questo problema.

Il mio stesso lavoro di una vita sul secondo cervello è stato alquanto «di base» per natura. Le persone del settore non hanno mai avuto problemi nel comprendere perché io faccia quel che faccio. Come ho riconosciuto prima, non sono stati sempre d'accordo con le mie osservazioni e i colleghi talvolta hanno avvertito le mie conclusioni, ma non hanno mai messo in dubbio l'utilità del mio impegno. Invece molte delle persone che amo realmente, compreso il mio stesso padre, hanno espresso seri dubbi sul suo valore.

Mio padre non mi ha mai completamente perdonato di essermi dedicato alla ricerca anziché alla cura dei malati. Spesso si sedeva con me, di solito la domenica dopo il pranzo, e mi poneva la domanda: «Allora, Michael, che cosa hai scoperto di recente?». Dirglielo era un vero problema. Spiegargli che aveva un cervello nella pancia, che io stavo cercando di capire, non mi portava da nessuna parte. La mia esperienza nel cercare di convincere un mondo scettico del fatto che esistono almeno tre neurotrasmettitori (inclusa la serotonina) nel sistema nervoso periferico, non solo i due accettati, lo lasciava indifferente. L'espressione genetica sequenziale nello sviluppo del sistema nervoso enterico era un argomento che non avrei neppure pensato di affrontare con lui. Ogni volta che gli riferivo i risultati di uno studio particolare, mio padre mi ascoltava con attenzione e poi chiedeva: «Allora, Michael, quale malattia curerà?». Arrivai al punto in cui cercavo un posto dove nascondermi ogni volta che una conversazione con mio padre iniziava con le parole «Allora, Michael,...».

Mio padre è morto poco più di un anno fa. Se ne andò serenamente, a casa, nel proprio letto, circondato dalla famiglia, proprio come avrebbe voluto. In quel momento era pronto per andarsene. Penso che abbia aspettato che nascesse il suo primo pronipote, per tenerlo fra le braccia, e che un presidente democratico fosse rieletto ancora una volta (la prima dai tempi dell'amato Roosevelt). A questo punto della scrittura del mio libro mi viene in mente mio padre. So che se fosse qui, leggerebbe con attenzione ciò che ho scritto e mi porrebbe una domanda. Sarebbe una domanda difficile che comincerebbe con: «Allora, Michael,...». Non devo completarla, sapete già come sarebbe il seguito. Sento che devo a mio padre una qualche risposta.

Non intendo questo libro come una specie di «manuale», che spiega ai lettori come affrontare una gamma di problemi gastrointestinali. In questo senso, come la mia ricerca, nessuna malattia del tipo che potrei spiegare a mio padre potrà essere curata con quello che si può trovare in queste pagine. D'altra parte, esiste una malattia che spero moltissimo venga attaccata dal mio sforzo letterario. È la malattia della disperazione, affrontata da così tante vittime di un apparato

intestinale ingestibile. Mi sento davvero vicino a queste persone, la cui esistenza travagliata per tanto tempo ha fatto venire fuori il peggio proprio da quelli ai quali si sono rivolti in cerca di aiuto.

I problemi gastrointestinali hanno qualcosa che, fino a poco tempo fa, ha respinto sia la comprensione sia l'empatia di molti medici. La storia della malattia psichiatrica è stata contrassegnata da un atteggiamento analogo. Molti dei problemi affrontati dal cervello della testa sono stati lasciati da parte, perché non era stata individuata alcuna anomalia anatomica o biochimica che ne fosse la causa. A differenza del cuore, che batte in modo visibile, non possiamo vedere il cervello che pensa; perciò, quando il pensiero è disturbato per ragioni che non sono evidenti, esiste la tendenza a dare la colpa al pensatore che non lo fa nel modo giusto. Spesso è stato proprio così anche per l'intestino. Quando la causa del malfunzionamento gastrointestinale non è ovvia, esiste la tendenza a negare che il problema sia reale, oppure, se la negazione diventa insostenibile (come può essere di fronte a difficoltà evidenti), ad attribuire i problemi dell'intestino a cattivi pensieri provenienti dal cervello. Ancora una volta questa attribuzione fornisce una motivazione per dare la colpa al pensatore.

Vorrei che i lettori di questo libro capissero che la riscoperta del cervello nel loro intestino apre una porta alla speranza. La focalizzazione dell'attenzione scientifica sul secondo cervello porta in sé un grande potenziale, una parte del quale è già stata realizzata, per comprendere come trattare e prevenire la malattia gastrointestinale. La comprensione che all'interno dell'addome esiste un centro indipendente di attività nervosa integrativa è diventata una calamita per attirare ricerca di buona qualità. Questa attrazione magnetica ha trasformato un campo dimenticato in un'arena «bollente» di scoperta. Nel fermento del lavoro così ispirato, vi è una varietà di cure per malattie che non sono ancora state scoperte e che oggi esistono solo come sindromi miste o complessi sintomatici.

Forse il grande potenziale di tutto è l'entusiasmo generato dalle nuove informazioni sullo sviluppo del secondo cervello. Io credo davvero che la malattia di Hirschsprung sia la punta di un iceberg enorme. Il megacolon congenito è ovvio, poiché produce una zona agangiare visibile. Tuttavia non c'è dubbio che esistano anche molte altre condizioni che non sono così facili da riconoscere. Per esempio, stiamo appena cominciando a capire che troppi gangli, o gangli del tipo sbagliato, possono essere tanto dannosi alla capacità di funzionamento dell'intestino quanto la totale assenza di essi. Chiamiamo questi problemi emergenti *displasia neurointestinale*. Attualmente si sa poco sulle cause della displasia neurointestinale, ma ci arriveremo presto.

Le patologie funzionali intestinali, compreso il colon irritabile, che colpisce il 20% degli americani, potrebbero avere origini durante lo sviluppo. La capacità di neurotrasmettitori come la serotonina di influire sulle cellule nervose enteriche in sviluppo fornisce un meccanismo mediante il quale l'esperienza di un intestino primitivo influenzabile può incidere sulla personalità dell'apparato intestinale maturo che ha origine da esso. La concezione delle malattie infiammatorie intestinali (colite ulcerosa e malattia di Crohn) è passata durante il corso della

mia vita da malattie mentali a patologie autoimmunitarie. Le malattie infiammatorie intestinali possono anche avere la loro base durante lo sviluppo dell'organismo.

Il sistema nervoso lavora così a stretto contatto con il sistema immunitario nella difesa dell'intestino che si dovrebbe prevedere un'interazione evolutiva tra il sistema nervoso e quello immunitario, ognuno dei quali secerne sostanze chimiche che influiscono sull'altro. Per esempio, esiste un maggior numero di cellule nervose nei segmenti dell'intestino colpiti da malattie infiammatorie intestinali. Siccome le cellule nervose intestinali non proliferano, come può succedere? Queste cellule nervose aggiuntive sono il prodotto di precursori conservati nel sistema nervoso enterico degli adulti, oppure erano preesistenti? Potrebbe essere che troppe cellule nervose in regioni particolari dell'intestino siano una causa della malattia intestinale infiammatoria? Ovviamente, non posso rispondere a queste domande, ma il fatto che ora io le possa porre rappresenta una motivazione del perché l'esplosione della scoperta del secondo cervello porti con sé tanta speranza per migliorare la vita delle persone con intestino problematico.

Se potessi mai sedermi ancora dopo un pranzo domenicale con mio padre, finalmente risponderei alla sua domanda. Appena mi dicesse: «Allora, Michael,...», lo interrompereì e risponderei, usando il nome con cui era conosciuto in famiglia. «Bomber» gli direi «nella mia vita non ho curato nessuno. Questo lo lascio fare a tua nuora Anne, la pediatra. Ho fatto qualcosa di altrettanto buono. Ho fatto la mia parte per rendere possibile la scoperta di molte cure per molte persone». Alla fine, nel profondo, so che sarebbe finalmente soddisfatto.

¹ Uso l'abbreviazione a.e.c. (prima dell'era comune) anziché quella più frequentemente utilizzata a.C. (avanti Cristo) per evitare la connotazione religiosa di quest'ultimo termine. Per la stessa ragione, userò la definizione e.c. (era comune) invece di a.D. (anno Domini: nell'anno del Signore) [Diverse religioni contano gli anni in modo diverso. Gli ebrei li numerano dalla data della presunta creazione del mondo (l'anno 2005 sarebbe il 5763). La datazione comunemente usata negli affari internazionali è quella cristiana, che parte dall'anno in cui si presume sia nato Gesù Cristo: nel mondo cristiano si direbbe che viviamo nell'anno 2003 dopo Cristo (d.C.), o anno Domini (a.D.), o dell'era volgare (e.v.). Nel mondo ebraico si dice e.c. (era comune) (N.d.T.)].

Gli animali nella ricerca medica

DESIDERO spiegare perché gli scienziati biomedici sono disposti ad uccidere gli animali. Nessuno di noi prova piacere nella sofferenza e non abbiamo alcun desiderio di essere gli agenti dell'inutile morte di un qualunque essere vivente. Perciò applichiamo standard rigorosi di cura e pietà nel modo in cui trattiamo le cavie. Vivono in ambienti spaziosi e con aria condizionata e vengono nutrite con alimenti indicati che loro amano. Per garantire che gli standard siano osservati, in tutte le strutture di ricerca con fondi federali sono stati creati comitati per la cura e l'impiego degli animali.

Diversamente dagli scienziati biomedici, la malattia non pone limiti al grado di sofferenza che provoca, sia negli animali che negli esseri umani. Il cancro diffuso alle ossa, per esempio, ne può causare la rottura senza tregua o possibilità di guarigione, ed ogni rottura è agonizzante. Le ulcere provocano dolore e quando perforano l'intestino, l'infezione risultante, lo shock e il tormento sono strazianti. Pertanto ciò che porta gli scienziati ad eseguire esperimenti sugli animali è semplicemente l'effettiva compassione che provano per i propri simili. Inoltre, gli studi sugli animali sono stati e continuano ad essere necessari ed efficaci. Gli importanti progressi della medicina che ora diamo per scontati sono tutti dovuti alla sperimentazione sugli animali. Quasi nessuna malattia può essere trattata senza fare uso di agenti o procedure, che sono il risultato della ricerca eseguita sugli animali.

Le persone contrarie alla ricerca sugli animali sono cieche di fronte ai benefici che comporta. Soffrono per gli animali, ma non soffrono per le persone. Nelle crociate per i diritti degli animali, gli attivisti spesso accusano gli scienziati di «specismo», un termine che eguagliano al razzismo o al sessismo. Tuttavia, usare semplicemente il termine «specismo» è proclamare di non essere in grado di comprendere che la vita umana è sacra. Siccome la ricerca sugli animali allevia la malattia e la sofferenza umana, le richieste che questa ricerca si fermi sono in verità proposte di diffusione della malattia e di incitamento alla sofferenza umana. Questo è inaccettabile. Adolf Hitler si oppose alla ricerca sugli animali e ciò per lui era moralmente coerente. La sua alternativa era Dachau. Da quando gli scagnozzi di Hitler furono giudicati a Norimberga, è stato stabilito un codice di comportamento etico. L'articolo tre vieta specificamente che vengano eseguiti esperimenti sulle persone se non sono basati su risultati precedentemente acquisiti con gli animali. Pertanto i prodotti e le procedure non sono applicati

sugli esseri umani fino a quando non si dispone almeno di un percorso che ne qualifichi la sicurezza.

Io non ho mai notato coerenza morale negli attivisti di diritti animali. Chi si oppone alla ricerca sugli animali dovrebbe rinunciare all'uso di prodotti e di tecniche che provengono da essa. Gli attivisti devono, in quanto tali, proclamare ed eseguire il boicottaggio personale, per esempio, di antibiotici, terapia tumorale, antidolorifici, vaccini e cardiocirurgia, che sono tutti frutto della sperimentazione sugli animali. Se qualcuno l'ha fatto, io non ne ho mai sentito parlare. Se un attivista dei diritti degli animali rinunciasse ai vantaggi della sperimentazione sugli animali, io lo considererei una persona incredibilmente stupida e ne prevederei una morte prematura e probabilmente dolorosa; però, lo piangerei come una persona che ha vissuto una vita davvero corretta e coerente.

L'impiego di animali per migliorare la vita umana è stato considerato morale durante la storia. L'uso di animali da parte dell'uomo si riscontra nelle fonti antiche ed è esplicitamente riconosciuto nella Bibbia. «Dio disse: Creiamo il genere umano a nostra immagine, secondo il nostro desiderio! Che domini sui pesci del mare, sugli uccelli del cielo, su tutti gli animali della Terra e sulle cose che strisciano su di essa!» (Genesi I: 26). Questo è un precetto di cui non si deve abusare, ma che non va neppure dimenticato. Gli animali lavorano con e per noi. I cavalli tirano carri e portano fantini. I buoi arano i campi. I cowboy guidano le mandrie di bovini da carne e la maggior parte di noi ama le costine di agnello. I vegetariani che non desiderano mangiare la carne, ne fanno una questione personale e questa decisione non danneggia nessuno. Questo è ammirevole. Invece i tentativi degli attivisti di impedire la ricerca sugli animali sono dannosi per gli altri e pertanto non sono ammirevoli. Il fondamentalismo, che allarga il proprio credo personale agli altri, non è migliore quando è praticato nel nome degli animali piuttosto che dagli ayatollah in nome di Dio.

Talvolta si suggerisce di usare computer o cellule coltivate in coltura invece degli animali. Queste idee sono proposte da chi non sa nulla di ricerca o biologia. I computer manipolano le informazioni che vengono inserite, non esplorano l'ignoto, come fanno gli scienziati. I computer sono utili per creare modelli che si possono verificare attraverso esperimenti effettivi, sono stupendi per ritrovare i fatti sepolti in mezzo ad enormi quantità di dati e sono spettacolari per manipolare i numeri, ma non inventano né scoprono.

Anche le cellule coltivate in coltura sono utili, ma in ultima istanza derivano sempre da persone o animali. Ancora peggio, non pensano come un cervello, non pompano come un cuore, non corrono come un atleta, né digeriscono come un apparato gastrointestinale. Le cellule si aggregano per formare tessuti che a loro volta si aggregano per formare organi; perciò, gli studi limitati a cellule singole, su piastre di coltura, non possono rivelare le attività di tessuti o organi in corpi viventi. In particolare nel mio caso, non esiste alcun sistema nervoso enterico in una cellula coltivata in coltura. Perciò l'intestino e il sistema nervoso enterico possono essere studiati solo dove si trovano, negli animali e nelle persone. Noi apprendiamo dai problemi delle persone e facciamo esperimenti sugli animali per risolverli. L'obiettivo, che è stato e continua

ad essere raggiunto ad un livello incredibile, è il miglioramento della condizione umana.

Per determinare che cosa fa una sostanza all'intestino, è necessario isolare l'apparato intestinale, per accertare che la molecola in esame agisca davvero direttamente sull'intestino stesso. Se invece il composto fosse somministrato ad un animale intatto, la molecola potrebbe diffondersi in tutto il corpo. Questa disseminazione rende possibile tutte le tipologie di effetti indiretti. Gli ormoni, che possono influire sull'intestino, possono essere rilasciati in organi distanti e raggiungere l'intestino attraverso la circolazione. I nervi possono essere stimolati ovunque e influenzano l'intestino, direttamente o indirettamente. I composti possono inoltre influire sul comportamento dell'intestino, modificando la disponibilità della sua vascolarizzazione, per esempio, aumentando o diminuendo la frequenza cardiaca, o contraendo o dilatando i vasi sanguigni. Gli scienziati non possono affrontare questo genere di complessità, perché impedisce la chiara interpretazione dei fenomeni che osservano. Desideriamo che gli esperimenti siano semplici, in modo da poter stabilire la casualità, con la probabilità che sia corretta in nostro favore. Introduciamo un fattore disturbante ed osserviamo la reazione. Minore è il numero degli elementi presenti in un sistema da sottoporre al nostro fattore disturbante, maggiore è la probabilità che sia chiaro l'effetto di tale disturbo.

Perciò la sperimentazione animale è una parte essenziale e morale della vita. Come dipendiamo dagli animali per cibo e lavoro, così dipendiamo da loro anche per la conoscenza di come migliorare la salute dell'umanità. Non sappiamo ancora abbastanza su come prevenire o curare molte delle malattie che ci affliggono. Fino ad allora, dobbiamo continuare ad affidarci agli animali per imparare quello che dobbiamo sapere. La riscoperta del secondo cervello è stato un evento relativamente recente, i cui vantaggi stanno appena iniziando ad evidenziarsi. Per mantenere attivo il flusso delle scoperte e sfruttare le promesse, è essenziale testare nuovi farmaci, procedure e ipotesi sperimentali sugli animali. Fortunatamente, gli animali domestici e da fattoria che hanno stabilito una partnership con gli esseri umani e che dipendono da noi per il soddisfacimento dei propri problemi, trarranno lo stesso nostro vantaggio dai progressi raggiunti dagli scienziati biomedico. Non c'è ragione di credere che gli esseri umani siano gli unici ad avere un sistema nervoso enterico che funziona male. I veterinari sono coinvolti e si aspettano che i nuovi farmaci e le procedure siano disponibili per gli animali domestici e da fattoria. Perciò la sperimentazione animale deve continuare. Sia gli esseri umani che gli animali dipendono da essa.

Ringraziamenti

Da giovane ero solito immaginare che gli autori di libri fossero spiriti intrepidi che lavoravano ore e ore, in solitudine, mentre il loro lavoro scorreva facilmente dalla penna alla pagina. Sebbene nutrissi ammirazione per i supposti autori che evocavo, non avrei mai sperato di poterli emulare. Ero cosciente dei miei limiti. La capacità di lavorare da solo su qualcosa di significativo non era il mio forte. Se essere uno scrittore significava produrre un volume completo senza l'aiuto di nessuno, allora mi rendevo conto che il mio destino non era quello di scrivere libri. Io ho bisogno di interagire. Quindi per me la condizione necessaria per il successo è il riscontro e il supporto dei miei colleghi. Per fortuna, la mia meditazione prematura sul processo creativo si rivelò errata. Non è detto che i libri debbano essere scritti in assoluta solitudine. È possibile ricevere supporto e, se uno ha la fortuna che ho avuto io, è anche possibile trovare persone gentili e intelligenti che desiderano aiutarvi. In breve, ho scritto questo libro, ma non senza aiuto nei momenti critici. Pertanto, vorrei approfittare di questa occasione per esprimere la mia gratitudine a quanti si sono prodigati per renderne possibile la stesura e dedicare loro questo libro.

Innanzitutto, vorrei ringraziare mia moglie Anne Gershon per la sua disponibilità a fornire una critica sincera e a volte dolorosa. Non si è mai stancata di ascoltare le mie ciarle sulle mie idee ed era sempre pronta a leggere e giudicare qualunque cosa scrivessi. Soprattutto, non posso neanche iniziare a elencare il numero di concetti da lei aggiunti al testo, perché sono troppi per poter essere tenuti a mente. Queste aggiunte preziose e a volte fondamentali sono state sempre delicatamente offerte come «consigli» sottoposti al mio giudizio. Infine, che gli autori siano intrepidi o meno, sicuramente devono esserlo le loro mogli. Come già accennato prima, non è detto che il destino di uno scrittore debba essere la solitudine, ma certo è che sembra esserlo quello della moglie di uno scrittore. Il processo creativo comporta lunghe ore di lavoro, che altro non sono se non tempo tolto alla gioiosa ricerca della vita insieme, che è l'essenza di un matrimonio felice. Quindi, non desidero solo ringraziare Anne per il suo aiuto, ma voglio anche scusarmi con lei pubblicamente per essere andato in letargo durante la stesura del libro: mea culpa.

In secondo luogo, sarò grato per il resto della mia vita alla mia redattrice, Nellie Sabin. Nellie è stata arbitro letterario, filologo e psicoterapeuta. Mi ha impedito di abbandonare il progetto quando pensavo che tutto fosse perduto, e mi ha aiutato a capire quando ho iniziato a scrivere in inglese invece che in «scientificese». Non ho mai smesso di stupirmi per la rapidità e la professionalità con cui Nellie lavora. Altrettanto stupefacenti erano la sua

allegria e disponibilità nell'ascoltare le mie filippiche. È stata senza alcun dubbio Nellie a rendere possibile la stesura di questo libro; non ce l'avrei mai fatta senza di lei.

In terzo luogo, molte altre persone mi hanno consentito, con la loro assistenza, di scrivere un libro. Innanzitutto, mi hanno convinto a farlo i miei agenti Herb e Nancy Kratz, per esempio. Loro, e solo loro, sono responsabili per avermi spronato e incitato abbastanza da farmi superare un periodo iniziale di enorme resistenza all'idea. Nancy e Herb hanno avuto fiducia in me ancor prima che ne avessi io stesso. Sono inoltre stati preziosi come critici e controllori, facendo attenzione a che il lavoro fosse terminato nei tempi stabiliti; inoltre, sono assolutamente in debito nei loro confronti per avermi così efficacemente evitato i compiti insiti nel lavoro dello scrittore e avermi consentito invece di concentrarmi sui suoi aspetti creativi. Il mio redattore esecutivo, Larry Ashmead, e i miei revisori, Jason Kaufman e Allison McCabe, tutti della HarperCollins, meritano un ringraziamento per il loro coraggio nel voler ingaggiare uno scrittore la cui produzione stampata precedente consisteva interamente in articoli tecnici (e domande per borse di studio) scritte per il più specialistico dei pubblici. La loro intuizione che un pubblico più ampio e non specialistico (la gente comune) dovesse venire a conoscenza del secondo cervello, e la loro volontà di fare in modo che tale pubblico potesse raggiungere questo obiettivo è altrettanto encomiabile quanto il loro coraggio. Vorrei ringraziare il mio collega Michael Camillieri della Fondazione Mayo per avermi fornito una lezione estemporanea (durante un meeting del consiglio dell'American Gastroenterological Association) sui disturbi funzionali dell'intestino e per avermi pazientemente spiegato i criteri di Roma per la diagnosi di tale patologia. Infine, vorrei esprimere il mio apprezzamento alla mia segretaria, Helena Leiter, che ha monitorato senza posa il mio peripatetico girovagare per il mondo intero. Per quanto lontana fosse la destinazione, o insolito il meeting scientifico, Helena è stata in grado di condurmi lì e riportarmi indietro, e di fare in modo che le persone che dovevano raggiungermi potessero farlo.

Le ultime parole di questa sezione sono di nuovo delle scuse. Sono rivolte ai miei colleghi di lavoro, sia del Dipartimento di Anatomia e Biologia cellulare alla Columbia sia del mio laboratorio. Mi spiace essermi assentato così a lungo dalle loro vite. Vorrei dire loro ciò che Evita disse all'Argentina: «Non vi ho mai lasciato». Ora, ho portato a termine un libro che spero darà nuova speranza e conoscenza alle molte persone che hanno bisogno di entrambe. Comunque, ormai ho terminato di scriverlo e sono tornato. Prometto nuovamente di dedicarmi, nell'ordine, alla ricerca, all'istruzione e all'amministrazione. Dopotutto, a prescindere da ciò che ho scritto sul secondo cervello, c'è ancora tanto altro da dire, e io devo cercare di capire cosa sia.

Michael Gershon - Il secondo cervello - 2013

Frontespizio	3
Copyright	5
Indice	6
Presentazione di Umberto Solimene	8
Prefazione	15
Il secondo cervello	22
Parte prima Le conquiste iniziali	24
1. La scoperta del secondo cervello	26
2. Il sistema nervoso autonomo e la storia della neurotrasmissione chimica	34
3. La svolta	69
4. Il workshop	92
Parte seconda Diario di viaggio	118
5. Dietro i denti: il territorio di caccia della piroisi e dell'ulcera	120
6. Avanti e in basso	157
7. La fine non arriva mai	194
8. Un cattivo intestino	228
Parte terza Il secondo cervello: origine e disturbi	241
9. Il sistema nervoso enterico oggi	243
10. Gli immigrati e il colon dei quartieri bassi	295
11. La destinazione è tutto!	338
12. Lo stato dell'intestino	370
Nota conclusiva	377
Ringraziamenti	381