

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Biologia Cellulare, Molecolare e Industriale
Progetto 1- Fisiologia Cellulare
XXV Ciclo**

Settore Concorsuale di afferenza 05/D1

Settore Scientifico disciplinare Bio/09

***Analisi Proteomica dei Meccanismi
Sottesi alla Malattia da Reflusso
Gastroesofageo***

Presentata da: Dott.ssa Giorgia Lazzarini

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa
Michela Rugolo

Relatore

Chiar.mo Prof.
Antonio Contestabile

Correlatore

Dott. Enzo Spisni

INDICE

INTRODUZIONE.....3

CAPITOLO 1: ANATOMIA FUNZIONALE DEL SISTEMA GASTROINTESTINALE..... 4

TRATTO GASTROINTESTINALE..... 4

Struttura della parete del tratto gastrointestinale..... 5

Anatomia funzionale degli organi del tratto gastrointestinale..... 7

Ghiandole accessorie..... 11

ESOFAGO..... 14

Epitelio esofageo..... 20

Patologie dell'esofago..... 21

MALATTIA DA REFLUSSO GASTROESOFAGEO..... 24

Classificazione GERD..... 25

Fattori di rischio..... 27

Fisiopatologia..... 28

Diagnosi..... 33

Trattamenti..... 34

GERD e infiammazione..... 35

Effetto dell'infiammazione sulla carcinogenesi..... 36

Infiammazione, GERD ed Esofago di Barrett..... 39

CAPITOLO 2: SISTEMA ENDOCANNABINOIDE..... 42

IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLA FISILOGIA DEL TRATTO GASTROINTESTINALE..... 47

IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLA FISIOPATOLOGIA DEL TRATTO GI..... 50

CAPITOLO 3: BIOMARKER DISCOVERY..... 57

BIOMARKER..... 58

Sviluppo dei biomarker..... 60

Biomarker proteici..... 62

Biomarker nelle malattie infiammatorie croniche intestinali..... 63

SCOPO DELLA RICERCA 66

MATERIALI & METODI 69

RISULTATI	81
DISCUSSIONE.....	97
BIBLIOGRAFIA	103
PUBBLICAZIONI	117

I. Introduzione

CAPITOLO 1

ANATOMIA FUNZIONALE DEL SISTEMA GASTROINTESTINALE

Il sistema gastrointestinale (digerente) è preposto alla digestione degli alimenti e all'assorbimento dei principi nutritivi. Queste attività si realizzano tramite diversi processi: un'attività meccanica che consente lo sminuzzamento, il rimescolamento e il trasporto dei nutrienti lungo il canale digerente; la secrezione di succhi digestivi, i cui enzimi consentono di idrolizzare gli alimenti nelle molecole fondamentali (zuccheri, amminoacidi, acidi grassi ecc.) e l'assorbimento dei nutrienti dall'ambiente esterno (lume intestinale) all'ambiente interno attraverso la parete intestinale.

L'attività dell'apparato digerente è sotto un controllo sia nervoso che umorale. Il controllo nervoso è esercitato da una rete nervosa intrinseca (mioenterica) e dal sistema nervoso autonomo, mentre quello umorale coinvolge una serie di ormoni secreti da cellule dello stesso apparato digerente.

Il sistema gastrointestinale comprende due parti fondamentali: Il canale digerente (tratto gastrointestinale, GI) e le ghiandole annesse localizzate all'esterno del tratto GI, che secernono diversi fluidi ed enzimi nel lume del canale per favorire i processi digestivi (Stanfield *et al.*, 2009).

TRATTO GASTROINTESTINALE

Il canale digerente è un tubo cavo lungo circa 4.5 metri che attraversa tutto il corpo e le cui estremità si aprono all'esterno. Il tubo comincia con la bocca, attraverso la quale entra il cibo, per poi proseguire con esofago, stomaco, intestino tenue (a sua volta diviso in duodeno digiuno e ileo) e intestino crasso (a sua volta diviso in cieco, colon ascendente, colon trasverso, sigma e retto) e termina a livello dell'ano attraverso cui fuoriesce il materiale non assorbito.

A parte la cavità orale, i diversi segmenti intestinali presentano pareti con diverse similitudini strutturali, in cui si distinguono 4 strati con diversa funzionalità (Carbone *et al.* 2008)

Struttura della parete del tratto Gastrointestinale

La parete di gran parte del tratto GI (eccetto, come già menzionato in precedenza, bocca, faringe, il primo terzo dell'esofago e la parete esterna dell'ano) presenta le stesse caratteristiche generali (**Fig 1**).

Si possono distinguere quattro strati principali: 1) la **mucosa**, che delimita il lume del tubo digerente; 2) la **sottomucosa**, uno strato di tessuto connettivo sottostante la mucosa; 3) la **Muscularis externa**, uno strato costituito principalmente da fibre muscolari lisce; 4) la **sierosa** (o *avventizia*), uno strato esterno costituito principalmente da tessuto connettivo.

La mucosa è costituita da tre strati: uno più interno di cellule chiamate membrana mucosa, uno strato intermedio chiamato lamina propria e uno strato esterno di tessuto muscolare liscio chiamato *muscularis mucosae* (Artico 2006).

La membrana mucosa è formata da cellule epiteliali eterogenee definite enterociti, che rivestono la parte del tratto GI, formando una barriera continua che separa il lume dall'ambiente interno dell'organismo. Alcuni enterociti sono specializzati nell'assorbimento e nel trasporto di nutrienti e di altro materiale nel lume del circolo, e per questo vengono chiamati cellule assorbenti. Altri vengono classificati come cellule esocrine in base alla loro funzione di secernere fluidi ed enzimi nel lume. Fanno parte di queste ultime le cellule caliciformi che secernono muco, il quale forma una pellicola protettiva per la mucosa, che impedisce l'abrasione dei tessuti da parte di alcune sostanze presenti nel lume, e le cellule endocrine che secernono ormoni nel torrente circolatorio (Artico, 2006).

La lamina propria è uno strato di tessuto connettivo sottostante la mucosa. All'interno di questo ci sono capillari, nervi, vasi linfatici, linfonodi e placche del peyer. Contiene quindi anche tessuto linfoide che svolge una funzione protettiva nei confronti dei numerosi batteri presenti nel lume intestinale (Artico, 2006).

La *muscularis mucosae* è un sottile strato di tessuto muscolare liscio con la funzione di contrarre la mucosa in pieghe, facilitando il rimenscolamento del contenuto intestinale e il contatto con la superficie della mucosa. All'interno di questo strato vi sono fibre muscolari longitudinali che decorrono nel senso della lunghezza del tratto GI, e fibre muscolari circolari, che decorrono nel senso della circonferenza (Artico, 2006).

La sottomucosa è uno strato spesso di tessuto connettivo che conferisce al tratto GI elasticità ed elasticità, caratteristiche necessarie per impedire l'insorgere di danni dovuti a un forte stiramento. All'esterno della sottomucosa si trova il plesso sottomucoso (o plesso di Meissner), una rete di

cellule nervose che comunica con un'altra rete di cellule nervose presenti nella muscolaris externa, chiamato plesso mioenterico (o plesso di Auerbach) (Artico, 2006).

Questi plessi insieme formano il sistema nervoso enterico o intrinseco, il quale è costituito da una rete complessa di neuroni sensoriali, motoneuroni e interneuroni localizzati nello spessore della parte del tratto GI.

La muscolaris externa è responsabile della maggior parte della motilità del tratto GI e contiene uno strato più interno di tessuto muscolare circolare e uno più esterno di tessuto muscolare longitudinale. Lo strato di tessuto muscolare circolare è costituito da muscolatura liscia unitaria capace di generare depolarizzazioni spontanee. La contrazione delle fibre muscolari circolari riduce il diametro del tratto gastrointestinale. Lo strato di tessuto muscolare longitudinale è costituito da muscolatura liscia multiunitaria che dipende da input nervosi per la contrazione. La contrazione di questo strato diminuisce la lunghezza del tratto GI. Le contrazioni coordinate di questi due strati favoriscono la propulsione del contenuto del lume lungo il tratto GI e il suo rimescolamento. Ciò favorisce anche il contatto tra il cibo non digerito e gli enzimi digestivi e quello tra i prodotti finali della digestione e l'epitelio della mucosa intestinale al fine di produrre un efficace assorbimento.

La sierosa costituisce lo strato più esterno della parete gastrointestinale ed è costituita da uno strato interno di tessuto connettivo fibroso con funzione strutturale, e uno strato esterno di tessuto epiteliale, mesotelio, che secerne un liquido lubrificante che facilita lo scivolamento di un organo sull'altro. Il mesotelio è in continuità con il mesentere un sistema di membrane che connette tra loro molti degli organi addominali e contiene anche vasi sanguigni e nervi che arrivano a tali organi. Il mesentere è molto importante perché tiene gli organi nella loro sede ed è in continuità con il peritoneo, una membrana che delimita l'interno della cavità addominale (Stanfield *et al.*, 2009).

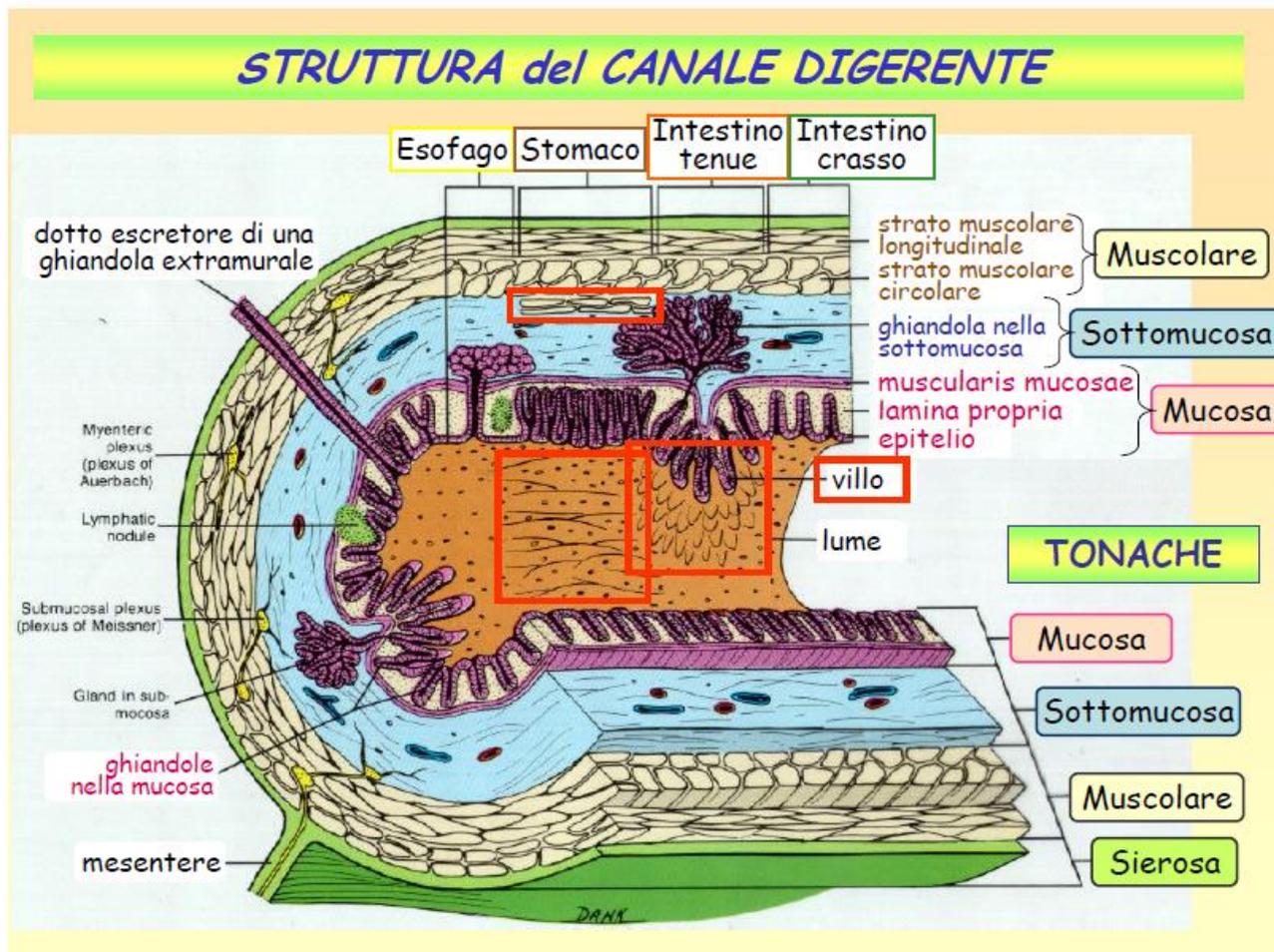


Fig 1 Struttura della parete del tratto gastrointestinale che mostra i quattro strati principali e la loro suddivisione (Artico, 2006)

Anatomia funzionale degli organi del tratto gastrointestinale

La **bocca**, o cavità orale, segna l'inizio del tratto gastrointestinale. Qui iniziano i processi di frammentazione meccanica e di digestione del cibo, il quale viene masticato e frammentato in piccole particelle grazie all'azione di taglio e triturazione operata dai denti. Il cibo viene poi mescolato alla saliva, una secrezione che lo lubrifica e che contiene l'amilasi salivare, un enzima che inizia la digestione dei carboidrati scindendo l'amido e il glicogeno.

Dalla bocca il cibo mescolato alla saliva, chiamato bolo alimentare, viene spinto dalla lingua nella faringe, una via di passaggio comune per cibo e aria. Dalla faringe poi le vie per il passaggio del cibo e dell'aria divergono: l'aria entra nella laringe e nella trachea procedendo verso i polmoni, il cibo entra nell'esofago che decorre parallelamente e dorsalmente alla trachea (Stanfield *et al.*, 2009).

L'**esofago** è un tubo muscolare, lungo all'incirca 25 metri, che assicura il trasporto del bolo alimentare allo stomaco. Dell'esofago parlerò in maniera più dettagliata nella sezione successiva.

Lo **stomaco** è un sacco a forma di "J" localizzato al di sotto del diaframma la cui funzione principale è quella di immagazzinare il cibo deglutito e di farlo passare, lentamente, nell'intestino tenue, in modo da consentirne la digestione e l'assorbimento. La parete dello stomaco contiene delle ghiandole, denominate ghiandole gastriche, che secernono nel lume il succo gastrico. L'attività contrattile della muscolatura liscia della parete dello stomaco frammenta il cibo in particelle più piccole e lo mescola al succo gastrico formando il chimo (Stanfield *et al.*, 2009).

Lo stomaco possiede tre grandi regioni anatomiche : una porzione superiore a forma di cupola denominata fondo, che si estende al di sopra dello sfintere esofageo inferiore; una regione centrale denominata corpo, che occupa la maggior parte del volume dello stomaco; e una regione inferiore denominata antro, che è più stretta e meno voluminosa (Cattaneo *et al.*, 1990) . Le contrazioni dell'antro spingono il chimo dallo stomaco verso l'intestino tenue, processo chiamato svuotamento gastrico. Non appena il cibo fuoriesce dallo stomaco, decorre lungo un canale molto stretto chiamato piloro. Il passaggio del chimo attraverso il piloro è regolato da un anello di muscolatura liscia denominato sfintere pilorico, che si apre e si chiude in relazione ad ogni contrazione ciclica dello stomaco, così che il chimo fuoriesce dallo stomaco a getti (Carbone *et al.*, 2008).

La parete dello stomaco si differenzia anatomicamente e funzionalmente in diverse regioni. Nel fondo la parete è sottile e si espande facilmente per consentire gli incrementi di volume dovuti all'introduzione del cibo. Nel corpo la mucosa gastrica si dispone in pieghe longitudinali chiamate rugae piloriche che si distendono quando lo stomaco si espande. Queste due specializzazioni anatomiche consentono allo stomaco di espandersi circa venti volte, da 50 ml vuoto a 1000 ml dopo completo riempimento. L'antro è dotato di uno spesso strato muscolare e produce forti contrazioni responsabili del rimescolamento e dello svuotamento. Sia il fondo che il corpo presentano fossette gastriche che contengono le cellule secernenti i prodotti presenti nel succo gastrico.

Le fossette gastriche contengono vari tipi di cellule secretorie, sia esocrine che endocrine. Nella regione superiore delle fossette le cellule apicali producono muco. Nel fondo della fossetta vi sono le ghiandole gastriche che contengono: cellule principali (secernono pepsinogeno, precursore della pepsina, un enzima proteolitico); cellule parietali che secernono idrogenioni per acidificare il contenuto dello stomaco, e il fattore intrinseco necessario per l'assorbimento della vitamina B₁₂; cellule G che producono l'ormone gastrina (Stanfield *et al.*, 2009).

Il lume dello stomaco è l'unica parte del tratto GI il cui contenuto è acido. Ciò è necessario per convertire il pepsinogeno nella sua forma attiva, la pepsina, e per denaturare le proteine contenute nel cibo e per uccidere alcuni batteri presenti nel cibo e quindi per proteggere da alcune malattie

La parete dello stomaco è protetta dagli effetti potenzialmente pericolosi dell'acido e della pepsina da uno strato di muco e bicarbonato definito barriera gastromucosale. Le cellule apicali delle fossette gastriche secernono muco, mentre le celle presenti nella superficie dell'epitelio secernono sia muco che bicarbonato. Se la barriera mucosale è penetrata da un acido può prodursi un'ulcera.

Dallo stomaco il bolo passa nell'intestino tenue, un tubo avvolto su se stesso lungo circa 2,5-3 metri, sede primaria per la digestione di tutti i nutrienti contenuti nel cibo e per l'assorbimento della maggior parte dei nutrienti ingeriti, l'acqua, le vitamine e i minerali (Stanfield *et al.*,2009).

L'**intestino tenue** è diviso in tre regioni principali: una parte iniziale denominata duodeno, che inizia a livello del piloro e si estende per circa 30cm,; una porzione intermedia denominata digiuno, che si estende per circa un metro; una porzione terminale, l'ileo, che si estende per circa 1,5 metri e si unisce al colon (Stanfield *et al.*,2009).

Nel **duodeno** il chimo è mescolato con una soluzione acquosa proveniente dal pancreas (succo pancreatico), che contiene diversi enzimi digestivi. Il bicarbonato neutralizza l'acidità del chimo proveniente dallo stomaco, cosa necessaria perché gli enzimi presenti nel succo pancreatico agiscono al normale pH dell'intestino tenue (leggermente alcalino), ma non a un pH acido. Oltre al succo pancreatico il duodeno riceve anche la bile, un fluido secreto dal fegato che contiene bicarbonato e sali biliari, che favoriscono la digestione dei lipidi.

Non appena i nutrienti presenti nel chimo sono attaccati dagli enzimi, i prodotti della loro digestione sono rilasciati in soluzione e assorbiti dalle cellule dell'epitelio della mucosa.

Questi processi simultanei di digestione e assorbimento cominciano nel duodeno e continuano, completandosi, nel resto dell'intestino tenue. L'intestino tenue ha una notevole capacità di assorbire i nutrienti, dovuta in parte al ripiegarsi della superficie della mucosa in strutture denominate villi che aumentano la superficie dell'intestino di circa dieci volte. Ogni villo è costituito da strutture fondamentali per l'assorbimento dei nutrienti che includono una rete di capillari e un vaso linfatico a fondo cieco denominato vaso chilifero. Dopo che i nutrienti sono stati assorbiti dalle cellule del lume, vengono trasportati attraverso l'epitelio della mucosa nel liquido interstiziale presente dall'altro lato delle cellule stesse. Da qui la maggior parte dei nutrienti diffonde nei capillari allontanandosi dall'intestino e riversandosi nella circolazione generale (l'assorbimento dei grassi rappresenta però un'eccezione).

Un altro fattore che incrementa la capacità di assorbimento dell'intestino tenue è la presenza di un orletto a spazzola sulla superficie della mucosa che incrementa ulteriormente la sua area. Questo

orletto a spazzola è costituito da microvilli (tra i 3000 ne i 6000 per cellula), localizzati sulla superficie apicale delle cellule epiteliali.

L'epitelio dell'orletto a spazzola è destinato alla digestione e all'assorbimento. Alcuni enzimi digestivi e carrier proteici sono localizzati sulla punta dei villi, e per questo motivo vengono chiamati enzimi dell'orletto a spazzola. Altre aree dell'epitelio intestinale hanno funzione secretiva. Cellule secernenti dell'intestino tenue sono localizzate nelle cripte del Lieberkühn, le quali riversano nel lume intestinale una grande quantità di fluido ricco di ioni bicarbonato, denominato succo enterico (Stanfield *et al.*, 2009).

I materiali che sono assorbiti dall'intestino sono trasportati al fegato attraverso la circolazione sanguigna, che estrae alcuni nutrienti per una ulteriore elaborazione. Il sangue proveniente dai capillari intestinali si riversa nelle vene mesenteriche ed è condotto al fegato dalla vena porta. Il sangue distribuito dalla vena porta è deossigenato, ma l'apporto di sangue ossigenato necessario per le funzioni proprie del fegato è fornito a quest'organo dall'arteria epatica. Il sangue viene trasportato dal fegato alla circolazione generale per mezzo della vena epatica, che si riversa nella vena cava inferiore (Stanfield *et al.*, 2009).

Il **colon** anatomicamente è diviso in quattro regioni principali: il colon ascendente che decorre verso l'alto sul lato destro del corpo dalla fine dell'intestino tenue fino al diaframma; il colon trasverso, che attraversa la cavità addominale, il colon discendente, che decorre verso il basso sul lato sinistro; il colon sigmoideo, un segmento a forma di "S" che confuisce nel retto (Cattaneo 1990). I primi tre segmenti sono specializzati nell'assorbimento di acqua e ioni dal chimo, il colon sigmoideo funziona come deposito per qualunque materiale rimasto nel lume dopo che è stato completato l'assorbimento. Sebbene la parete del colon abbia la stessa struttura di altre parti del tratto GI, lo strato muscolare longitudinale della muscolaris externa non è continuo, ma compreso in tre bande abbastanza strette denominate *teniae coli*, che decorrono per tutta la lunghezza del colon.

A livello della giunzione tra l'ileo e il colon, il passaggio del materiale è regolato da un anello di tessuto muscolare liscio denominato sfintere ileocecale, al di sotto del quale vi è un canale a fondo cieco denominato appunto cieco, a cui è attaccata l'appendice vermiforme (Stanfield *et al.*, 2009).

Quando il chimo raggiunge il colon, esso contiene pochi nutrienti digeribili perchè la maggior parte del materiale presente in esso è già stato assorbito. Ciò che rimane è essenzialmente acqua, ioni inorganici, materiale non digeribile presente nel cibo e batteri. La funzione primaria del colon è ridurre il volume del chimo tramite l'assorbimento dell'acqua rimasta al suo interno e quindi trasformarlo in un materiale semisolido, le feci. Il colon trattiene quindi le feci fino a quando non sono pronte per essere eliminate dall'organismo. Il cieco, il colon e il retto costituiscono nell'insieme l'**intestino crasso** (Stanfield *et al.*, 2009).

Il colon si contrae ad intermittenza, spingendo il materiale fecale nel retto. Le feci non lasciano l'intestino e il corpo immediatamente perchè il loro allontanamento è controllato da due sfinteri: lo sfintere anale interno, costituito da tessuto muscolare liscio, e lo sfintere anale esterno, un anello di tessuto muscolare striato che controlla l'apertura verso l'esterno. Il rilasciamento di entrambi gli sfinteri, che di norma sono chiusi, consente alle feci di essere eliminate dall'organismo mediante un processo denominato defecazione. (Stanfield *et al.*, 2009).

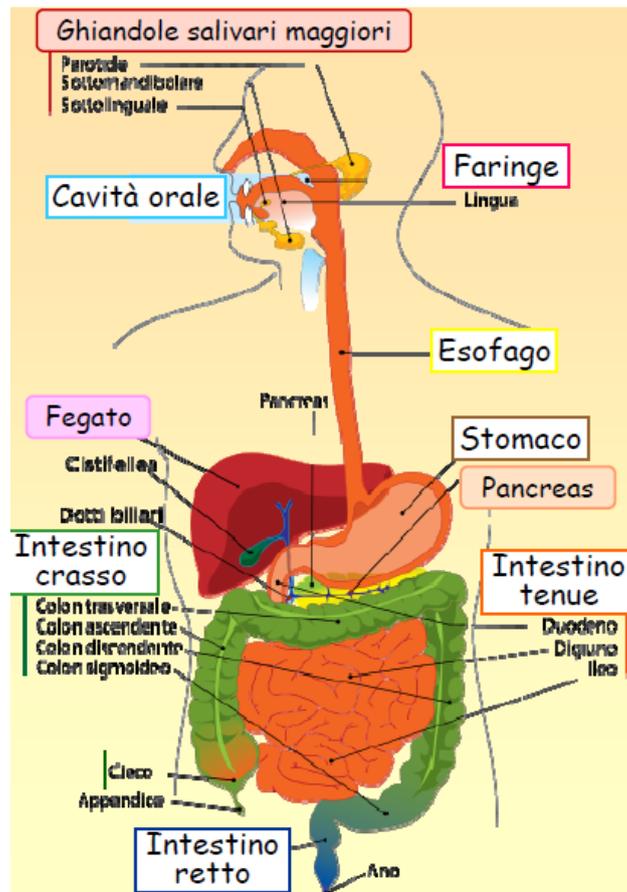


Fig 2. Principali organi del sistema digerente (Artico, 2006)

Ghiandole accessorie

Le ghiandole accessorie del sistema digerente includono le **ghiandole salivari**, che secernono la saliva, il **pancreas**, che secreta il succo pancreatico, ed il **fegato**, che secreta la bile. Le secrezioni di queste ghiandole sono riversate nel tratto GI attraverso dotti rivestiti di cellule epiteliali e all'interno del corpo della ghiandole i dotti si ramificano, terminando in uno spazio ristretto che è completamente circondato da uno strato di cellule epiteliali secretorie specializzate. Nelle ghiandole salivari e nel pancreas queste cellule sono distribuite in raggruppamenti di forma circolare denominati acini, i quali secernono un fluido (secrezione primaria) contenente acqua ioni inorganici e

altri soluti, la cui natura dipende dalla ghiandola in questione. Quando questo fluido scorre attraverso i dotti, le cellule epiteliali che costituiscono i dotti secernono o assorbono ioni e/o acqua, modificandone in questo modo la composizione (Stanfield *et al.*, 2009).

La saliva è prodotta da tre **ghiandole salivari** principali: le ghiandole parotidi, localizzate a entrambi i lati del capo in prossimità del lobo dell'orecchio; le ghiandole sottolinguali, localizzate sotto entrambi i lati della lingua; le ghiandole sottomandibolari, localizzate su ciascun lato in corrispondenza del ramo inferiore della mandibola. Altre ghiandole salivari più piccole si trovano nella parete della bocca e della faringe. La saliva è composta da bicarbonato (rende la saliva alcalina e aiuta a neutralizzare gli acidi), muco (fluidifica il cibo e protegge la bocca dalle abrasioni), amilasi salivare (enzima digestivo che demolisce amido e glicogeno), lisozima (enzima che attraverso la lisi di alcuni batteri aiuta a prevenire il deterioramento dei denti) (Stanfield *et al.*, 2009).

Il **pancreas** è situato dietro e sotto lo stomaco. Esso è sia un organo esocrino del sistema digerente che un organo endocrino che secerne ormoni importanti per la regolazione del metabolismo. Il pancreas esocrino comprende numerosi acini e i loro dotti associati, mentre quello endocrino è caratterizzato da isole pancreatiche disseminate tra gli acini e i dotti. I dotti provenienti dagli acini convergono in dotti più larghi, che danno origine al dotto pancreatico, il dotto principale che porta il succo pancreatico nel duodeno.

Il succo pancreatico contiene bicarbonato, enzimi digestivi quali l'amilasi pancreatica, simile a quella salivare, e le lipasi pancreatiche che scindono i grassi, proteasi che frammentano le proteine e nucleasi che demoliscono gli acidi nucleici (Stanfield *et al.*, 2009).

Il **fegato** è l'organo più grande presente nella cavità addominale. Le sue funzioni principali sono:

- Secrezione della bile
- Trasformazione metabolica dei nutrienti. Dopo un pasto il fegato converte parte del glucosio assorbito in glicogeno e parte degli aminoacidi in acidi grassi, sintetizza trigliceridi e colesterolo utilizzandoli per sintetizzare particelle lipoproteiche che rilascia in circolo. Quando non sono assorbiti nutrienti converte il glicogeno in glucosio e gli acidi grassi in chetoni. Esso produce anche glucosio per gluconeogenesi e sintetizza l'urea dall'ammoniaca, che origina dal catabolismo degli amminoacidi.
- Rimozione dei globuli rossi vecchi dal sangue. La rimozione avviene ad opera dei macrofagi che rimuovono anche i batteri dal sangue. L'emoglobina proveniente dai globuli rossi vecchi viene demolita dal fegato. Alcuni componenti come il ferro vengono conservati per essere riutilizzati, altri vengono eliminati dall'organismo (come ad esempio la bilirubina).

- Eliminazione dei rifiuti dall'organismo. La bilirubina e altri prodotti che derivano dal catabolismo dell'emoglobina sono secreti nella bile ed eliminati dall'organismo con le feci. Altre sostanze eliminate con la bile includono il colesterolo in eccesso, altri componenti organici estranei all'organismo (ad esempio farmaci, veleni ecc.) e metalli in tracce. Il fegato trasforma anche composti idrofobici in forma idrofila in modo tale da poter essere disciolti più rapidamente nel plasma ed eliminati dai reni.
- Sintesi delle proteine plasmatiche. Il fegato sintetizza molte proteine presenti nel plasma, tra cui l'albumina, proteine che legano gli ormoni steroidei e tiroidei, proteine del sistema della coagulazione e l'angiotensinogeno.
- Secrezione e modificazione degli ormoni. Il fegato, assieme al rene, partecipa all'attivazione della vitamina D e secerne ormoni chiamati somatomedine o fattori di crescita insulino-simili. Il fegato inoltre metabolizza molti ormoni facilitandone l'eliminazione (Carbone *et al.*, 2008).

Secernendo la bile, il fegato fa parte del sistema biliare, che comprende tutte le strutture coinvolte nella sintesi e nell'immagazzinamento della bile e nel suo passaggio nel tratto GI. Infatti la bile viene continuamente prodotta, ma il suo rilascio nel tratto GI avviene solo in presenza di cibo. Tra un pasto e l'altro la bile secreta dal fegato è immagazzinata in un piccolo sacco muscolare la cistifellea o colecisti, localizzato inferiormente al fegato. Durante i pasti la cistifellea si contrae riversando la bile in essa contenuta nel dotto biliare comune denominato coledoco, che la riversa nel duodeno. A livello della loro congiunzione col duodeno, il coledoco e il dotto pancreatico convergono formando una via di passaggio unica (ampolla di Vater) sia per il flusso della bile che per quello del succo pancreatico. Il flusso di questi due fluidi è regolato da un anello di muscolatura liscia denominato sfintere di Oddi, che si apre in presenza del cibo. Durante la fase interparadiale, quando lo sfintere risulta chiuso, la bile secreta dal fegato ritorna nel coledoco e si riversa nella colecisti, dove viene immagazzinata e concentrata.

La secrezione della bile, come quella della saliva e del succo pancreatico, è un processo che include sia la formazione di una secrezione primaria che la sua modificazione nei dotti. Il fegato però, presentando una struttura spongiforme, è strutturalmente diverso dalle ghiandole salivari e dal pancreas, poiché contiene numerose cavità ripiene di sangue, i sinusoidi, che prendono il posto dei veri capillari. Il sangue che riempie questi sinusoidi è sia ossigenato (proveniente dai rami dell'arteria epatica) che deossigenato (proveniente dai rami della vena porta). Le pareti dei sinusoidi sono costituite da strati sottili di epatociti, i quali prelevano le materie prime per la sintesi della bile dal sangue per poi secernele nei canalicoli biliari, i quali defluiscono nei dotti biliari che

infine convergono a formare il dotto epatico comune, che trasporta la bile al di fuori del fegato (Stanfield *et al.*,2009).

L'ESOFAGO

L'esofago è un tubo muscolare cavo la cui funzione primaria è quella di condurre i cibi solidi e liquidi dalla faringe allo stomaco. Si tratta di un canale muscolomembranoso che inizia nel collo, a livello della sesta vertebra cervicale, e scende in gran parte anteriormente alla colonna vertebrale, passando attraverso il diaframma all'altezza della decima vertebra toracica e terminando nell'orifizio del cardias dello stomaco a livello della undicesima vertebra toracica. E' il segmento più stretto di tutto il canale alimentare, fatta eccezione per l'appendice vermiforme, e presenta quattro restringimenti molto importanti dal punto di vista clinico per il passaggio di strumenti lungo l'esofago: cricoideo, vicino alla faringe, aortico, dove l'esofago incrocia l'aorta, bronchiale, vicino al bronco sinistro, e diaframmatico (Cattaneo 1990).

Tra i restringimenti, l'esofago si presenta leggermente dilatato, assumendo aspetto fusiforme; queste dilatazioni prendono rispettivamente il nome *fuso cricoaortico*, *fuso broncodiaframmatico* e *imbuto precordiale*.

- La *parte cervicale* dell'esofago, compresa fra il corpo della 6^a vertebra cervicale e il margine superiore della 2^a vertebra toracica, è in rapporto anteriormente con la parete membranosa della trachea, alla quale è unita da fasci connettivali densi e da esili fascetti muscolari (muscolo tracheoesofageo); una parte della faccia anteriore dell'esofago resta tuttavia libera dal rapporto tracheale e viene ricoperta dal lobo sinistro della ghiandola tiroide e dai muscoli sternotiroideo e sternioioideo, entrando inoltre in contatto con il nervo ricorrente sinistro che passa nell'angolo diedro formato da trachea ed esofago; il nervo ricorrente destro è invece in rapporto con la faccia laterale dell'esofago.
- La *faccia posteriore* dell'esofago cervicale è in contatto con la fascia cervicale profonda dalla quale è separata dallo *spazio retroesofageo* che prosegue in alto nello spazio retrofaringeo. Le facce laterali entrano in rapporto con i lobi tiroidei, le arterie tiroidee inferiori e le carotidi comuni, oltre che con i nervi ricorrenti, secondo le modalità già indicate.
- La *parte toracica* dell'esofago decorre nel mediastino posteriore e si può dividere in due tratti posti rispettivamente al di sopra e al di sotto dell'incrocio dell'esofago stesso con il

bronco sinistro che gli passa al davanti. Questi due tratti, denominati *epibronchiale* e *ipobronchiale*, presentano diversi rapporti sia anteriormente che posteriormente e lateralmente. Anteriormente l'esofago corrisponde alla parete membranosa della trachea e alla parte iniziale del bronco sinistro (tratto epibronchiale), quindi ai linfonodi della biforcazione e alla faccia posteriore del pericardio (tratto ipobronchiale). Il rapporto tra esofago e trachea è abbastanza stretto ed è reso più intimo dalle fibre del muscolo tracheoesofageo, un fascio muscolare liscio che riunisce trachea ed esofago. Una formazione muscolare analoga, il muscolo broncoesofageo, si trova a riunire il bronco sinistro con l'esofago, nel punto in cui i due condotti si incrociano. Posteriormente, il tratto epibronchiale dell'esofago decorre in stretto rapporto con la colonna vertebrale fino a livello della 4^a vertebra toracica (biforcazione della trachea); se ne discosta quindi portandosi in avanti, e dietro al tratto ipobronchiale dell'esofago decorrono allora le vene azigos ed emiazigos, il dotto toracico e il tratto toracico dell'aorta discendente. Lateralmente, a destra, l'esofago è in rapporto con la pleura mediastinica e con la vena azigos che, a livello della 4^a vertebra toracica, descrive un arco anteriore per sboccare nella vena cava superiore. Lateralmente e a sinistra l'esofago, oltre che con la pleura mediastinica, si mette in rapporto con l'arco dell'aorta e con il tratto iniziale dell'aorta discendente. A destra, la pleura mediastinica forma un cul di sacco che si estende tra esofago e vena azigos e prende il nome di *seno interazigosoesofageo*. Un'analoga formazione si costituisce, a sinistra, tra l'esofago e l'aorta discendente e prende il nome di *seno interaorticoesofageo*. Al di sotto della biforcazione tracheale, i nervi vaghi si mettono in rapporto con le pareti laterali dell'esofago e si dividono, ciascuno, in un ramo anteriore e un ramo posteriore. I due rami anteriori si riuniscono sulla faccia anteriore dell'esofago (tronco comune anteriore); i rami posteriori formano un analogo dispositivo (tronco comune posteriore) in corrispondenza della faccia posteriore dell'esofago.

- La *parte diaframmatica* dell'esofago corrisponde al breve tratto che s'impegna nell'orifizio esofageo del diaframma. A questo livello si può avere il distacco, dal contorno dell'orifizio diaframmatico, di un fascetto muscolare che termina sulla parete dell'esofago e prende il nome di *muscolo frenooesofageo*.
- La *parte addominale* dell'esofago si mette in rapporto anteriormente con la faccia inferiore del lobo sinistro del fegato, posteriormente con l'aorta addominale e i pilastri mediali del diaframma, a destra con il lobo caudato del fegato, a sinistra con il fondo dello stomaco. I tronchi comuni del vago mantengono la loro posizione anteriore e posteriore. Il tratto addominale dell'esofago è ricoperto dal peritoneo sulla sua faccia anteriore. Qui, il peritoneo

prosegue con la lamina sierosa che riveste la faccia anteriore dello stomaco. In alto, il peritoneo abbandona l'esofago per rivestire la faccia inferiore del diaframma. A sinistra, il peritoneo prosegue dall'esofago sul diaframma, mentre a destra si porta verso il fegato, costituendo l'origine del legamento epatogastrico. La faccia posteriore del tratto addominale dell'esofago è invece priva di rivestimento peritoneale in quanto la lamina sierosa che riveste la faccia posteriore dello stomaco non risale al di sopra del cardias. (Martini *et al.*,...) (Fig.4)

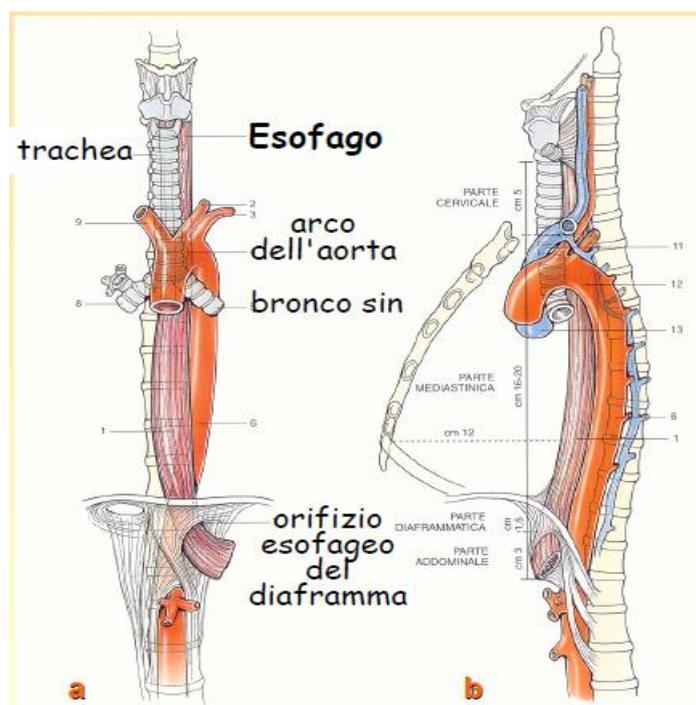


Fig 4

Esso possiede una parete sottile e flessibile così che può essere facilmente stirato per accogliere il cibo quando questo viene deglutito; quando non è presente il cibo le sue pareti sono normalmente collassate.

Dal punto di vista microscopico la tonaca a contatto con il cibo è la mucosa, molto spessa e costituita da epitelio, lamina propria e muscolaris mucosae.

L'epitelio è squamoso, stratificato e non cheratinizzato, piuttosto spesso 300-500µm. Il confine tra epitelio e lamina propria è netto ma irregolare a causa della presenza di papille di tessuto connettivo che invaginano la base dell'epitelio, favorendo il suo ancoraggio ai tessuti sottostanti. Alla base dell'epitelio si trova una lamina basale, alla quale le cellule epiteliali sono unite mediante emidesmosomi.

L'epitelio esofageo può essere suddiviso in uno strato proliferativo basale, in uno strato parabasale di cellule sottoposte a differenziazione terminale e uno strato di cellule superficiali o squame che conservano i loro nuclei. Vi sono delle cellule di Langerhans nell'epitelio, cellule dendritiche importanti per la immunostimolazione delle cellule T native per la difesa della mucosa.

Queste cellule epiteliali sono in continuo rinnovamento per mitosi delle cellule basali cubiche e delle cellule parabasali più profonde. Nel migrare verso il lume esse diventano progressivamente poligonali e di conseguenza più appiattite ed infine desquamano in corrispondenza della superficie epiteliale. Questo rinnovo cellulare dura circa 2-3 settimane. L'epitelio dell'esofago per via del suo spessore e della presenza di muco sulla sua superficie, offre una protezione efficace contro gli insulti meccanici durante la deglutizione; protezione tuttavia limitata dall'esposizione ripetuta delle secrezioni fortemente acide e ricche di proteasi dello stomaco che si verifica in modo anomalo durante il reflusso gastroesofageo.

La parete esofagea è organizzata come la parete degli altri organi dell'apparato digerente (presenta le tonache mucosa, sottomucosa e muscolare), ma mostra alcune caratteristiche peculiari:

- La mucosa dell'esofago contiene un epitelio pavimentoso stratificato resistente alle abrasioni.
- Mucosa e sottomucosa si sollevano in pieghe che occupano l'intera lunghezza dell'esofago, consentendo l'ampliamento del lume durante il passaggio di un grosso bolo. Fatto salvo il movimento della deglutizione, il tono muscolare della parete fa sì che il lume rimanga chiuso.
- Lo strato di muscolatura liscia della muscolaris mucosae può essere molto sottile o mancare del tutto in vicinanza della faringe, ma si ispessisce gradualmente fino a 200-400 µm vicino allo stomaco.
- La sottomucosa contiene ghiandole tubulari semplici (ghiandole esofagee) sparse, che producono un secreto mucoso che lubrifica il bolo e protegge la superficie epiteliale.
- La tonaca muscolare presenta due strati muscolari: circolare interno e longitudinale esterno. Nel terzo superiore dell'esofago entrambi gli strati contengono fibre muscolari scheletriche; nel terzo medio vi sono fibre sia scheletriche che lisce; nel terzo inferiore solo fibre muscolari lisce. La muscolatura (sia liscia che scheletrica) è controllata dai riflessi viscerali (non esiste controllo volontario).
- Esternamente alla tonaca muscolare non vi è una tonaca sierosa, ma uno strato di connettivo che ancora l'esofago alla parete corporea dorsale, definito tonaca avventizia. Per 1-2 cm tra

il diaframma e lo stomaco, l'esofago si trova in posizione retroperitoneale, con il peritoneo (una membrana sierosa che riveste internamente la cavità addominale e la superficie dei visceri contenuti) che copre le superfici anteriore e laterale sinistra. (Martini *et al.*,...) (**Fig 5**)

Il passaggio del cibo dalla faringe all'esofago è regolato dallo sfintere esofageo superiore, un anello di muscolatura striata che circonda l'esofago nel suo estremo superiore (uno sfintere si definisce in genere come un anello muscolare che circonda un orifizio e regola il passaggio di materiale attraverso di esso modificando il suo diametro). All'estremità inferiore dell'esofago è presente lo sfintere esofageo inferiore, un anello di muscolatura liscia che regola il passaggio di cibo dall'esofago allo stomaco. Entrambi questi sfinteri sono normalmente chiusi e si aprono solo quando il cibo viene deglutito. Lo sfintere esofageo inferiore impedisce che il contenuto acido dello stomaco entri nell'esofago. Tuttavia un rigurgito di materiale gastrico nello stomaco (reflusso gastrico) può avvenire occasionalmente, determinando pirosi, una sensazione di bruciore a localizzazione toracica determinata dall'irritazione della parete esofagea.

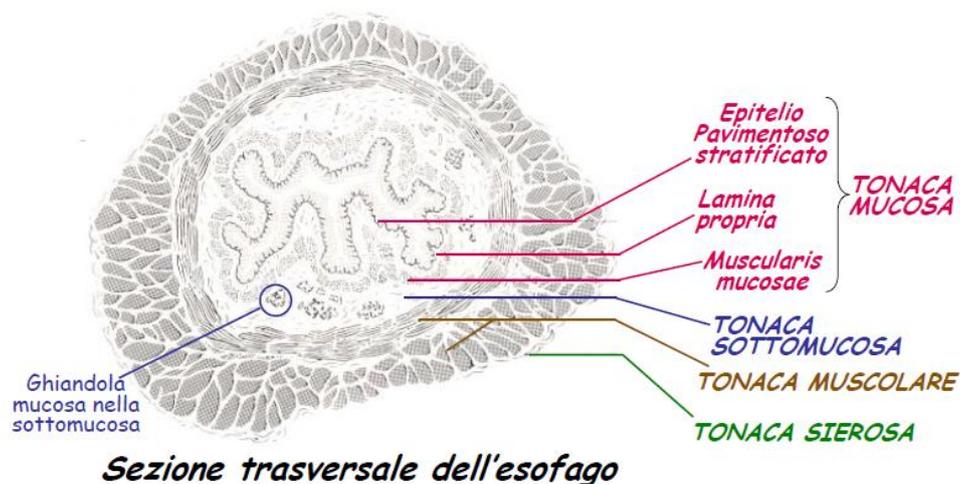


Fig 5: Sezione trasversale dell'esofago

Epitelio esofageo

L'epitelio esofageo è un epitelio squamoso non cheratinizzato multistratificato, composto da diversi strati di cellule appiattite che costituiscono lo strato corneo, un numero maggiore di strati di cellule costituiscono lo strato spinoso, e un singolo o doppio strato di cellule mitoticamente attive costituiscono lo strato basale germinativo basale. Le cellule dello strato corneo, forniscono la prima difesa nella forma di barriera permeabile, la quale è composta da membrane cellulari apicali e complessi giunzionali apicali, che prevengono la diffusione dell'acido luminale direttamente all'interno delle cellule e nello spazio intercellulare, rispettivamente. la membrana cellulare apicale è in grado di fare ciò grazie alla sua idrofobicità e dal momento che i suoi canali per il sodio, non selettivi, sono inibiti da pH luminale acido; il complesso giunzionale apicale invece crea un pathway acquoso di permeazione selettiva formato dalle tight junctions, giunzioni aderenti e desmosomi che limitano la diffusione paracellulare di ioni (Orlando *et al.* 2010). (**Fig 6**)



Fig 6: Sezione trasversale di esofago a forte ingrandimento. Colorazione ematossilina-eosina. Si osserva il dettaglio dell'epitelio pluristratificato, non corneificato. In altre specie, come il ratto, l'epitelio dell'esofago può essere corneificato. Le cellule dello strato germinativo (G), proliferante, presentano nuclei intensamente tingibili, a testimonianza della intensa attività mitotica che comporta una condensazione della cromatina. I nuclei sono inoltre molto ravvicinati, per la scarsa quantità di citoplasma. Negli strati più superficiali i nuclei divengono sempre più piccoli e i citoplasmi perdono gradualmente la affinità per i coloranti basici (Viola scuro) per la progressiva diminuzione degli RNA citoplasmatici

In particolare le tight junctions formano la componente più stretta del pathway, funzione supportata anche dalle sottostanti giunzioni aderenti, mentre l'integrità strutturale dovuto all'opposizione molto stretta delle membrane cellulari adiacenti avviene ad opera dei desmosomi. All'interno dello spazio intercellulare dell'epitelio esofageo è anche presente una matrice glicoproteica che si pensava fungesse da aiuto al complesso giunzionale apicale nel limitare la diffusione paracellulare di ioni (Orlando *et al.*, 1992). Al contrario, è stato dimostrato che la distruzione del legame dei desmosomi ai filamenti intermedi aumenta marcatamente la permeabilità paracellulare (Tobey *et al.* 2010). (**Tab 1**)

Properties within the esophageal epithelium for protection against luminal acidity.

Apical Cell Membrane

Hydrophobic lipid bilayer

Nonselective sodium channel

Apical Junctional Complex

Tight junction

Adherens junction

Desmosome

Ion Transport

Na⁺/H⁺ exchanger

Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger

Buffers

Bicarbonate ions

Phosphate ions

Basic proteins

Reparative Processes

Cell replication

Cell regeneration

Inflammation

Tab 1: Orlando *et al.* 2010

Patologie dell'esofago

Le patologie dell'esofago coprono una gamma di processi che vanno da neoplasie maligne altamente letali a comuni bruciori cardiaci che si verificano dopo un pasto abbondante. Vanno incluse le anomalie congenite quali *l'atresia e fistole*, difetti dello sviluppo dell'esofago, che causano il rigurgito immediato del cibo ingerito. Anomalie che vengono scoperte subito dopo la nascita e che vanno corrette immediatamente in quanto incompatibili con la vita. L'atresia vede la rappresentazione dell'esofago con un sottile cordone non canalizzato. Le fistole non sono così rare, poiché l'apparato gastrointestinale e l'apparato respiratorio si originano da un segmento tubulare comune, la fistola connette la tasca inferiore dell'esofago con un bronco o con la trachea. (Kinottenbelt *et al.*, 2010)

A carico dell'esofago possono presentarsi restringimenti non neoplastici congeniti o acquisiti, denominati *stenosi*. La stenosi acquisita è il risultato dell'azione del reflusso gastroesofageo, radiazioni e danni caustici. Questa patologia consiste in un ispessimento fibroso della parete esofagea, in particolare della sottomucosa. In casi più gravi le stenosi portano ad una progressiva ostruzione totale dell'esofago. (Pinheiro *et al.*, 2012)

L'esofago deve avere una funzionalità motoria coordinata per una corretta discesa del cibo nello stomaco e per prevenire il reflusso del contenuto gastrico, la sola forza di gravità non è sufficiente. Ci sono delle patologie causate o che inducono disfunzione motoria dell'esofago come *l'acalasia*, consiste in un mancato rilasciamento con conseguente dilatazione dell'esofago, caratterizzata sotto il profilo clinico da rigurgiti e disfagia progressiva. La patogenesi di questa disfunzione non è ancora ben conosciuta ma sembrano siano implicate degenerazioni dell'innervazione dell'esofago. Questa condizione può portare ad una dilatazione dell'esofago al di sopra dello sfintere inferiore e causare un assottigliamento della muscolare oppure la tonaca muscolare può andare incontro ad ipertrofia. (Goyal *et al.*, 2010)

La *Disfagia* è una disfunzione dell'apparato digerente che consiste nella difficoltà a deglutire sia cibi solidi che semiliquidi o liquidi, e quindi è caratterizzata dal transito non corretto del bolo nelle vie digestive superiori. Quasi sempre si manifesta come conseguenza di altri disturbi ostruttivi o motori, come presenza di neoplasie o acalasia (Granell *et al.*, 2012).

Un'altra patologia implicata nella disfunzione motoria è *l'ernia iatale*, causata dal passaggio di una porzione dello stomaco dall'addome al torace attraverso lo iato esofageo. Si distinguono diversi tipi di ernia iatale, la più frequente (costituisce il 90% di tutti i casi), è l'ernia da scivolamento, caratterizzata dallo scivolamento in cavità toracica dell'esofagosottodiaframmatico con una porzione dello stomaco più o meno grande. Ciò determina nella maggior parte dei casi il disturbo

tipico della malattia chiamato reflusso gastroesofageo. Questo passaggio è talvolta reversibile e particolarmente sensibile agli sbalzi di pressione addominale (Andrici *et al.*, 2012). La deglutizione, uno sforzo eccessivo, un colpo di tosse possono facilitare la fuoriuscita dell'ernia che può tornare spontaneamente nella sua posizione iniziale. In condizioni normali, lo sfintere gastro-esofageo, che si estende da 1-2 cm al di sotto del diaframma a 3-4 cm al di sopra di esso, impedisce il reflusso di secrezione acida dallo stomaco all'esofago. Bisogna anche tenere presente che la pressione intragastica è uguale a quella intraddominale e maggiore di quella intratoracica. Una compressione addominale sterna fa elevare la pressione addominale, ma fa elevare anche la pressione nello sfintere, perchè viene compresso anche l'esofago sottodiaframmatico. In caso di scivolamento nella cavità toracica della porzione sottodiaframmatica dell'esofago, viene meno quella "barriera pressoria" che impedisce il reflusso quando la pressione addominale supera la pressione toracica. Non è ancora stata trovata una spiegazione univoca alla comparsa di questa malattia alcune persone sono colpite da ernia iatale dopo aver subito un forte trauma addominale, altre per motivi congeniti legati alla debolezza o all'eccessiva apertura dello iato esofageo. L'aumento della pressione addominale favorisce l'insorgenza della patologia. Sono quindi più a rischio i pazienti con tosse cronica, le donne durante la gravidanza e le persone in sovrappeso. anche il fumo, l'abitudine ad indossare vestiti stretti e l'età avanzata predispongono l'individuo alla comparsa dell'ernia iatale. Il quadro clinico dell'ernia iatale è piuttosto variabile; mentre per alcune persone la malattia è del tutto asintomatica, per altre può essere causa di disturbi più o meno gravi. A causa della risalita del contenuto gastrico (pH 0,9-3,5), le pareti esofagee possono lesionarsi causando i sintomi tipici della malattia: forti dolori al torace e senso di bruciore allo sterno, rigurgiti acidi, senso di amaro in bocca, scialorrea, raucedine. Questi sintomi tendono a comparire o a peggiorare in concomitanza di sforzi eccessivi o durante la gravidanza, a causa del temporaneo aumento della pressione intraaddominale. (Weber *et al.*, 2011)

Un'altra patologia che implica la disfunzione motoria dell'esofago sono le lacerazioni longitudinali a livello della giunzione esofago-gastrica, denominate *lacerazioni di Mallory-Weiss*, conseguenza di conati di vomito eccessivi. Il contenuto gastrico rigurgita improvvisamente e vince la contrazione dello sfintere del cardias, con conseguente dilatazione e lacerazione della parete esofagea a livello della giunzione esofago-gastrica. Le lacerazioni costituiscono il 10% di tutte le emorragie del tratto intestinale superiore (Carlson *et al.*, 2011)

Le *esofagiti* sono lesioni della mucosa esofagea, con conseguente infiammazione, molto comuni in tutto il mondo. Queste infiammazioni dell'esofago possono comparire in diverse circostanze: diminuzione dell'efficienza dei meccanismi antireflusso del contenuto gastrico, prolungata intubazione gastrica, ingestione di sostanze irritanti, presenza di un'ernia iatale e diminuzione delle

capacità riparativa della mucosa esofagea. Le alterazioni anatomiche dipendono dall'agente causale, dalla durata e dall'esposizione all'agente. (Molina-infante *et al.*, 2010)

Le *esofagiti eosinofile* rappresentano una patologia esofagea cronica antigene-mediata, caratterizzata clinicamente da sintomi legati a disfunzioni esofagee e istologicamente da una infiammazione eosinofila predominante (Maguire *et al.*, 2012).

L'*esofago di Barrett* è una complicanza del reflusso gastroesofageo di lunga durata, che insorge in circa l'11% degli affetti da malattia da reflusso. In questa condizione l'epitelio squamoso viene rimpiazzato da epitelio colonnare metaplasico, in risposta al prolungato insulto. Non è ben nota la ragione per cui in alcuni pazienti si sviluppi epitelio colonnare e in altri no. La patogenesi dell'esofago di Barrett vede un reflusso gastroesofageo prolungato che determina la trasformazione dell'epitelio fino alla sua ulcerazione. La guarigione avviene con riepitelizzazione da parte di cellule staminali pluripotenti che proliferando nel microambiente a basso pH si differenziano a formare un epitelio di tipo gastrico (Menon *et al.*, 2010). L'esofago di Barret è una condizione pre-maligna che porta allo sviluppo dell'adenocarcinoma esofageo (Agarwall *et al.*, 2012).

L'esofago inoltre è sede di tumori benigni e maligni. I tumori benigni molto piccoli non superano i 3cm, costituiti da masse intramurali compatte, di un caratteristico colore grigiastro. I carcinomi maligni dell'esofago, originano dallo strato epiteliale, costituiscono un numero molto elevato di decessi rispetto all'incidenza, in quanto la sintomatologia clinica insorge molto tardivamente e pertanto non è possibile fare una diagnosi precoce. (Chang *et al.*, 2004).

Il cancro esofageo è l'ottava forma tumorale più comune al mondo, ed è caratterizzato da due tipologie istologiche principali, a seconda del luogo d'insorgenza: *adenocarcinoma* e *carcinoma squamocellulare*. Questi due tumori hanno una sopravvivenza a 5 anni del 15%, presentano delle differenze caratteristiche che includono la casualità, l'origine cellulare e la distribuzione epidemiologica (Pera *et al.*, 2005). Essi originano da due differenti popolazioni cellulari: il carcinoma squamocellulare deriva dell'epitelio squamoso, mentre l'adenocarcinoma dalle cellule epiteliali metaplastiche intestinali (esofago di barrett) (Chang *et al.*, 2004).

Gli adenocarcinomi si manifestano in età adulta e sono più frequenti negli uomini rispetto alle donne, possono invadere il cardias, si sviluppano delle masse nodulari grandi fino a 5cm, ma al momento della diagnosi il tumore ha già invaso la parete dell'esofago e la tonaca avventizia. I fattopri di rischio per questo tipo di neoplasia sono l'obesità e il reflusso gastroesofageo. (DeMeester *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2005).

Il carcinoma squamocellulare, la tipologia predominante di tumore esofageo, compare anch'esso solitamente al di sopra dei 50 anni, incidenti sono i fattori dietetici e ambientali, come alcool, fumo e stile di vita. La sua comparsa inizia con una lesione in situ, fino a raggiungere cospicue

dimensioni a causa della fitta rete linfatica nella sottomucosa che ne favorisce la metastatizzazione (Bandla *et al.*, 2012).

MALATTIA DA REFLUSSO GASTROESOFAGEO

Il *reflusso gastroesofageo* è un fenomeno fisiologico che si verifica in tutti gli individui adulti sani. Prevede un anomalo passaggio del contenuto gastrico al di sopra dello stomaco. In alcuni soggetti questo fenomeno diviene patologico ed il contatto prolungato dell'epitelio esofageo con il reflusso acido determina i sintomi quali la piroisi ed il bruciore retrosternale. I soggetti che presentano i sintomi sono affetti da malattia da reflusso gastro-esofageo (GastroEsophageal Reflux Disease o GERD) (Orlando *et al.* 2008)

La malattia da reflusso gastroesofageo è un disordine cronico piuttosto comune in diverse parti del mondo (Vakil *et al.*, 2006). Oltre ad essere un peso economico che grava anche sulla qualità di vita delle persone affette, questa patologia è anche uno dei principali fattori predisponenti all'adenocarcinoma esofageo (Shaheen *et al.*, 2005; Wahlqvist *et al.* 2006, Dent *et al.*, 2005). Come conseguenza dell'irritazione causata dal reflusso di acido e dalla bile, l'adenocarcinoma esofageo si può sviluppare in questi pazienti rappresentando la fine di una sequenza che inizia con lo sviluppo della GERD, e prosegue con l'insorgenza di metaplasia (esofago di Barrett), basso grado di displasia, alto grado di displasia e adenocarcinoma.(Nwokediuko *et al.*, 2012)

A cusa della mancanza di un "gold standard" per la diagnosi di GERD, è difficile adottare una definizione soddisfacente per questa patologia. Ad oggi, le GERD sono definite come una condizione che si sviluppa quando il reflusso dei contenuti dello stomaco causa sintomi fastidiosi e/o complicazioni (Sontag *et al.*, 2007). Sulla base di questa definizione le GERD possono venire classificate all'interno di due sindromi: sindromi esofagee ed extra-esofagee.(**Tabella 2**) (Vakil *et al.*, 2006)

SINDROMI ESOFAGEE
Sindromi con sintomi i. Tipica sindrome da reflusso ii. Dolore al petto Sindromi con danno esofageo i. Esofagiti ii. Stenosi iii. Esofago di Barrett iv. Adenocarcinoma esofageo
SINDROMI EXTRAESOFAGEE
Associazioni stabilite i. Tosse ii. Laringite iii. Asma iv. Erosione dentale Associazioni proposte i. Faringite ii. Sinusite iii. Fibrosi polmonare idiopatica otite media ricorrente

Tab 2: definizione di Montreal di GERD e sindromi che la contraddistinguono

Classificazione GERD

La malattia da reflusso gastroesofageo viene classificata all'interno di due gruppi, sulla base di risultati endoscopici: la presenza sintomi caratteristici, senza però danno alla mucosa esofagea (esofagite erosiva ERD ed esofago di Barrett) e l'assenza di danno alla mucosa (malattia da reflusso non-erosiva NERD) . Le Nerd rappresentano il fenotipo più comune, infatti solo il 25% dei pazienti con reflusso gastroesofageo mostrano lesioni alla mucosa. (Hershcovici *et al.* 2010)

Tradizionalmente le GERD venivano considerate come una patologia all'interno della quale vi era un ampio spettro di sintomi più o meno gravi, con le NERD al un lato dello spettro, e le GERD più complicate all'altro lato dello spettro. In realtà studi recenti hanno dimostrato come la gran parte dei pazienti che presentano NERD o ERD rimangano all'interno del loro rispettivo gruppo di GERD per tutta la durata della loro vita. Queste nuove scoperte hanno posto l'accento su come in realtà il quadro genetico individuale di ogni soggetto determini una specifica presentazione fenotipica delle GERD, anche se questi individui vengono esposti agli stessi fattori ambientali. In altre parole i fenotipi GERD, una volta determinati, rimangono gli stessi. (Sontag *et al.*, 2006; Agrawal *et al.*, 2006).

La malattia da reflusso gastroesofageo non-erosiva, a sua volta, viene classificata in 3 sottogruppi sulla base dei risultati del monitoraggio del pH in 24 ore:

- Tipo1: pazienti che dimostrano un tempo di esposizione anomalo all'insulto acido in maniera molto simile a i pazienti con malattia da reflusso erosiva.
- Tipo2: pazienti con un tempo di esposizione all'insulto acido normale ma con sintomi e episodi di reflusso altamente correlati, suggerendo un'ipersensibilità all'acido. Questa categoria viene denominata "esofago ipersensibile".(Dent *et al.*, 1999; Fass *et al.*, 2001, Watson *et al.*, 1997)
- Tipo3: pazienti con sintomi tipici del reflusso, ma monitoraggio normale del pH e senza nessuna correlazione tra sintomi ed esposizione all'insulto acido. Questo sottogruppo viene poi ulteriormente diviso in altri 2 sottogruppi: quello in cui i pazienti rispondono alla terapia basata sugli inibitori di pompa protonica e quello in cui i pazienti non rispondono (Drossman *et al.*, 2006).

Anche se la distinzione tra ERD e NERD al livello clinico non è affatto facile, esistono caratteristiche fisiologiche, fisiopatologiche, anatomiche e anche istologiche che sono uniche per entrambe. Il corso naturale degli studi ha dimostrato come la maggior parte dei pazienti NERD non progredisce in ERD e non sviluppa esofago di barret (**Fig 7**) (Hershcovici *et al.*, 2010; Fass *et al.*, 2007).

La presenza dei sintomi da reflusso acido nell' esofago in assenza di erosioni visibili, lascia presupporre che il meccanismo fisiopatologico del dolore sia riconducibile non tanto alla presenza delle alterazioni macroscopiche visibili endoscopicamente quanto alla presenza di danni ultrastrutturali a livello della mucosa esofagea. Infatti la replicazione cellulare dello strato basale sembra essere una delle cause implicate nella resistenza della mucosa al danno, e nella difesa strutturale dell'epitelio. A sostegno di questa ipotesi è stato dimostrato, attraverso microscopia elettronica, che i pazienti con reflusso gastroesofageo sintomatici, sia con malattia erosiva che con malattia non erosiva, presentano una dilatazione degli spazi intercellulari tre volte maggiore rispetto ai controlli sani (Calabrese *et al.*, 2007). Calabrese e collaboratori (2007) hanno inoltre dimostrato che nei soggetti GERD, il grado di proliferazione dell'epitelio esofageo è ridotto, con un decremento del 50% nei soggetti NERD che arriva fino al 75% nei soggetti ERD, rispetto ai controlli sani (33). Per spiegare la ridotta attività proliferativa osservata nelle GERD sono state formulate due ipotesi plausibili: la prima è che il danno cellulare cronico indotto dal reflusso determini una riduzione nel tasso di proliferazione dell'epitelio esofageo; la seconda ipotesi stabilisce invece che una bassa capacità proliferativa costitutiva porti a una maggiore suscettibilità al danno indotto dall'insulto acido (Calabrese *et al.*, 2007). Ulteriori studi devono essere effettuati per avvalorare l'una o l'altra ipotesi.

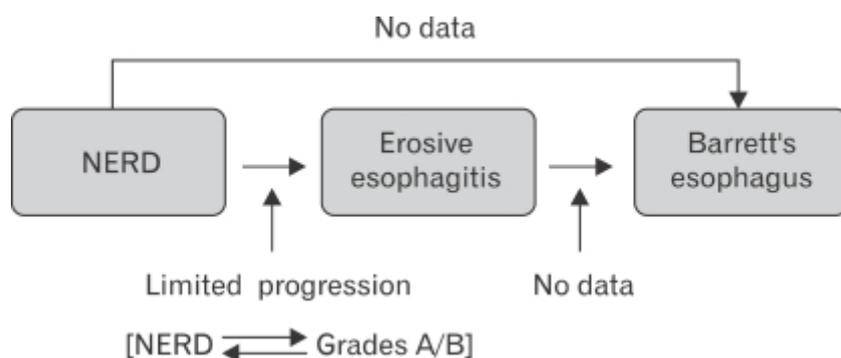


Fig 7: Nuovo paradigma proposto per la storia naturale delle NERD (35)

Fattori di Rischio

Diversi fattori giocano un ruolo nella patogenesi della malattia da reflusso gastroesofageo, tra cui ospiti fisiologici, fattori ambientali e genetici. Recenti studi hanno riportato un'associazione tra fattori genetici e GERD, e la conseguente sequenza esofago di Barrett e adenocarcinoma esofageo. Questi fattori genetici includono: (a) ruolo dei polimorfismi in diversi geni che codificano per citochine pro e anti infiammatorie, per proteine coinvolte nel pathway del DNA repair, per enzimi coinvolti nel metabolismo dei xenobiotici e per proteine che regolano il ciclo cellulare; (b) silenziamento genico ad opera dell'ipermetilazione del DNA e (c) ruolo dei microRNA nella progressione della malattia (Gohshal *et al.* 2011). Recenti studi sul ruolo di fattori genetici nell'insorgenza di altre patologie a carico del sistema gastrointestinale, come ad esempio la displasia o la sindrome del colon irritabile, suggeriscono come, insieme alle GERD, abbiano un'origine multifattoriale, e fattori genetici giochino un ruolo fondamentale nella loro patogenesi (Lembo *et al.* 2007).

Diversi studi suggeriscono come età elevata e sesso maschile siano associati con un'incidenza maggiore di esofagiti (Rajendra *et al.* 2004).

I soggetti obesi hanno 2,5 volte più probabilità di sviluppare GERD rispetto a quelli con un indice di massa corporea nella norma (Ayazi *et al.* 2009).

Consumo elevato di alcol, fumo di sigaretta (Watanabe *et al.* 2003) e la presenza di ernia iatale sono altri fattori di rischio per lo sviluppo di esofagiti e GERD (Buttar *et al.* 2001). Anche l'elevato consumo di caffè e bevande a base di cola sembrano incidere sullo sviluppo di questa patologia (Nwokediuko *et al.* 2009).

La malattia da reflusso gastroesofageo è facilmente riscontrabile in pazienti con malattie del tessuto connettivo, specialmente scleroderma (Patti *et al.* 2008), così come in pazienti con ostruzione

cronica delle vie aeree (Ruigomez *et al.* 2009). In più, un discreto numero di farmaci di uso comune e prodotti a base di ormoni sono stati associati a una più alta incidenza di GERD. Questi includono anticolinergici, benzodiazepina, bloccanti dei canali del calcio, dopamina, nicotina, nitrati, estrogeni, teofilline, progesterone, glucagone e alcune prostaglandine (infatti il bruciore di stomaco è piuttosto comune in gravidanza) (Nwokediuko *et al.* 2012).

Fisiopatologia

Il reflusso è un evento fisiologico normale, e molto spesso è causato da un rilassamento transiente dello sfintere esofageo inferiore (lower esophageal sphincter LES). Nei pazienti con GERD questo rilassamento avviene con molta più frequenza rispetto a quanto accade normalmente. Altri difetti del LES che possono contribuire alle GERD includono ipotonicità dello sfintere esofageo inferiore e disfunzioni anatomiche della giunzione esofago-gastrica, tra cui ernia iatale (Nwokediuko *et al.* 2012).

In condizioni normali i meccanismi endogeni di difesa limitano sia la quantità di materiale nocivo introdotto nell'esofago, sia eliminano rapidamente tale materiale dall'esofago, in modo tale da minimizzare l'irritazione della mucosa. Un esempio di tale meccanismo di difesa è rappresentato dall'azione del LES e dalla normale motilità esofagea. Nella patologia, gli insulti prodotti dal contenuto gastrico vincono le difese protettive dell'esofago e le resistenze del tessuto (**Tab 3**). La GERD è quindi il risultato di un contatto prolungato dell'acido con l'epitelio, contatto attribuito in gran parte all'indebolimento dei meccanismi di antireflusso, più specificamente dello sfintere esofageo inferiore. Un concetto essenziale nella patogenesi del reflusso gastroesofageo è che l'estensione delle lesioni della mucosa ed i sintomi sono proporzionali alla frequenza del reflusso e alla sua durata. L'integrità della mucosa negli individui sani riflette l'equilibrio tra gli insulti, e quindi acidità del contenuto gastrico e la potenza del reflusso, e le forze delle difese del tessuto (Orlando *et al.* 2008).

L'esofago, lo sfintere esofageo inferiore e lo stomaco formano un circuito in cui l'esofago funziona come una pompa anetrogada, il LES come una valvola e lo stomaco come un contenitore. Le disfunzioni che contribuiscono all'insorgenza delle GERD possono derivare da ognuno di questi componenti del sistema. Un'anomalia nel LES consente il reflusso di una quantità più elevata del succo gastrico, un fallimento dello svuotamento gastrico può aumentare sia il volume che la pressione dello stomaco fin quando il meccanismo della valvola viene soppraffato, portano all'insorgenza della malattia da reflusso. I meccanismi di difesa dell'esofago includono la clearance esofagea e la resistenza della mucosa. La clearance esofagea possiede sia una componente

meccanica (la peristalsi) che chimica (saliva), le quali, entrambe, limitano il tempo di esposizione dell'esofago all'insulto acido (Stein *et al* 1992). Il periodo di tempo in cui l'esofago rimane a pH minore di 4, a seguito di un episodio di reflusso, viene chiamato "tempo di clearance acida". Questa comincia con lo svuotamento dei fluidi refluiti attraverso la peristalsi e termina con la neutralizzazione degli acidi residui attraverso la saliva deglutita. (Helm *et al.*,1984).

Servono all'incirca 7 ml di saliva per neutralizzare 1 ml di HCL 0,1N e la quantità di saliva normalmente prodotta è 0,5ml/min. Dal momento che la salivazione diminuisce durante il sonno, la clearance acida negli episodi di reflusso che si verificano in questo arco di tempo sarebbe teoricamente compromessa, si pensa comunque che durante il sonno la clearance acida sia facilitata dalla secrezione di bicarbonato da parte delle ghiandole della sottomucosa esofagea. (Myers *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1993).

E' stato osservato che la metà dei pazienti con GERD ha una clearance acida prolungata, e che tempi più lunghi di clearance si associano alla presenza di ernia iatale (Johnson *et al.*, 1980).

Lo svuotamento esofageo nei pazienti con GERD può essere compromesso o da una disfunzione della peristalsi o dal meccanismo di re-reflusso associato ad alcune ernie iatali.

Il rilassamento transiente dell'esofago può essere causato dal cibo (caffè, alcol, cioccolato, grassi), farmaci (beta-bloccanti, nitrati ecc.) ormoni (ad es. Progesterone) e nicotina.

La funzione della saliva nella MRGE non si limita alla sola neutralizzazione dei residui acidi nell'esofago attraverso il suo contenuto in bicarbonato, infatti è ormai noto che la saliva contiene numerosi fattori di crescita, tra cui l'EGF, che possono contribuire alla riparazione della mucosa dalle ulcerazioni causate dall'esposizione all'acido. E' stato osservato su modelli animali che l'EGF fornisce citoprotezione contro irritanti, promuove la guarigione delle ulcere duodenali, diminuisce la permeabilità della mucosa esofagea agli ioni idrogeno (Konturek *et al.*, 1981; Sarosiek *et al.*, 1991). Anche se non sono state trovate delle differenze sistematiche nella funzionalità delle ghiandole salivari tra pazienti con MRGE e controlli, è stato visto che i pazienti fumatori, che hanno una ridotta secrezione salivare, hanno una clearance ridotta del 50% e che la loro saliva ha un contenuto basico con potere tamponante che è il 60% di quello dei controlli non fumatori. (Kahrilas *et al.*, 1989)

Lo sfintere esofageo inferiore è un segmento di 3-4 cm costituito da muscolatura liscia tonicamente contratta. La pressione a riposo del LES varia tra gli individui da 10 a 30 mmHg in relazione alla pressione intra-gastrica, può essere modificata dalla pressione intra-addominale, dalla distensione gastrica, da peptidi, da ormoni, da particolari alimenti e farmaci.. Il meccanismo di contrazione del LES non è ancora stato chiarito, tuttavia sembra che sia una proprietà intrinseca del muscolo piuttosto che un fenomeno innescato da impulsi nervosi, infatti è stato dimostrato su modelli

animali che l'inibizione dell'attività nervosa indotta da iniezione intra-arteriale di tetrodotossina influisce solo in minima parte sulla pressione del LES. (Goyal *Et al.*, 1976). La condizione di LES ipotonico può portare alla manifestazione di due fenomeni, il primo è chiamato "reflusso indotto da stress", il secondo è chiamato "reflusso libero". Nel primo caso l'episodio di reflusso è scatenato da un brusco aumento della pressione intra-addominale (ad esempio dalla tosse), nel secondo caso si assiste ad una diminuzione del pH intra-esofageo senza cambiamenti rilevabili nella pressione intragastrica o del LES. Questi due fenomeni sono molto rari, e si verificano in condizioni in cui la pressione del LES a riposo è minore di 10 mm Hg per il reflusso indotto da stress, e di 4 mmHg per il reflusso libero. (Dent J *et al.*, 1988).

Per quanto riguarda l'effetto dell'ernia iatale, non tutti i pazienti con tale patologia presentano i sintomi dovuti al reflusso. In presenza di ernia iatale, il LES può migrare prossimalmente nel torace e perdere la sua zona di elevata pressione addominale, o questa zona può decrescere in lunghezza. Lo iatu diaframmatico può venire ampliato da un'ernia piuttosto grande, impedendo alla crura di funzionare come sfintere esterno. Anche il contenuto gastrico può essere intrappolato nel sacco dell'ernia e riversarsi nell'esofago durante il rilassamento dello sfintere inferiore.

Per quel che concerne la resistenza tissutale nella malattia da reflusso, la mucosa esofagea, per quanto strutturalmente esile e sprovvista di uno strato di muco, è fisiologicamente adatta a proteggere tale organo dalla componente acida del reflusso; è stato dimostrato che la sinergia tra acido gastrico e pepsina (ed eventualmente sali biliari) determina, a parità di concentrazione, un danno maggiore di quanto il solo acido sarebbe in grado di causare, producendo una lesione a carico dell'apparato giunzionale dell'epitelio risultante nell'aumento della permeabilità parietale alle sostanze refluite (Orlando *et al.*, 2008).

La resistenza tissutale dell'esofago a tale insulto è data dall'integrazione di 3 componenti:

Componente Pre-epiteliale Nello stomaco e nel duodeno la difesa pre-epiteliale dall'insulto acido è costituita da uno strato di muco ed uno strato di acqua ricca di ioni bicarbonato. Questa difesa risulta efficace anche a pH <2 e viene creata attraverso la secrezione di muco e bicarbonato dalle cellule dell'epitelio gastrico e, nel duodeno, dalle ghiandole di Brunner (Allen *et al.*, 1980). Lo strato di muco è composto da glicoproteine ad alto peso molecolare che lo rendono viscoso ed elastico e gli permettono di interporsi fisicamente tra pepsina ed epitelio, e di fornire protezione dagli ioni idrogeno grazie alla sua capacità di intrappolare ioni bicarbonato. Nel lume esofageo le difese pre-epiteliali sono meno efficienti e riescono a proteggere la mucosa esofagea solo a pH >2, questo potrebbe essere dovuto al fatto che nel lume esofageo non esiste uno strato di muco in grado di intrappolare ioni bicarbonato, l'epitelio è ricoperto solamente da un sottile strato di saliva mista a mucina secreta dalle ghiandole salivari e della sottomucosa. Le glicoproteine che 10 compongono

la mucina non hanno la capacità di formare legami crociati, quindi non riescono a formare un vero strato viscoso come avviene invece nello stomaco e nel duodeno. Questo, pur potenzialmente esponendo le cellule ad un maggior insulto, consente di rimuovere i residui parietali di materiale acido refluito, facendoli defluire nuovamente verso il LES, inoltre, mantenendo la superficie a pH ~ 3, limita al minimo l'attività della pepsina. (Orlando *et al.*, 2008)

Componente epiteliale: L'epitelio esofageo è di tipo squamoso pluristratificato non cheratinizzato. I circa 30 strati di cellule che lo compongono sono funzionalmente suddivisibili in tre zone: strato corneo, spinoso e germinativo. Lo strato corneo è costituito da 5-10 strati di cellule pavimentose in degenerazione e formano una barriera di protezione da insulti sia meccanici che chimici (Elias *et al.*, 1977). Lo strato spinoso è costituito da circa 20 strati di cellule mature metabolicamente attive e responsabili del trasporto di sodio dal lume al sangue. Queste cellule migrano verso gli strati più esterni per andare a sostituire quelle dello strato corneo. Lo strato germinativo è costituito da 1 o due strati di cellule cubiche incolonnate, attaccate alla membrana basale attraverso emidesmosomi e capaci di effettuare mitosi. La componente difensiva “strutturale” dell'epitelio esofageo impedisce la penetrazione della pepsina attraverso l'epitelio esofageo ed è data recinzione formata dalle membrane cellulari, dalle tight junction e dalla matrice glicoproteica che si trova interposta ad esse (Elias *et al.*, 1977) Sulla membrana apicale cellulare sono presenti canali cationici non selettivi pH-dipendenti, a Ph luminale < 2 essi sono inibiti ed ogni scambio ionico è impedito (Elias *et al.*, 1977). Le tight junctions sono ponti proteici intercellulari collegati a tonofilamenti intracellulari, le principali componenti proteiche di queste giunzioni sono occludina, e-caderina e claudina. La presenza delle tight junction è in grado di limitare il passaggio di acido tra gli spazi intercellulari. In condizioni fisiologiche la loro carica negativa tende a renderle selettive per i cationi, quindi anche per gli ioni H⁺, tuttavia quando il pH luminale si abbassa diventano selettive per gli anioni, limitando così la diffusione di ioni H⁺ (Orlando *et al.*, 2008)

Le glicoproteine presenti negli spazi intercellulari sono di natura poco chiara, sembra che queste vengano secrete sottoforma di granuli dalle cellule dello strato spinoso per formare un rivestimento protettivo. A livello degli spazi intercellulari queste glicoproteine agiscono in sinergia con le tight junctions per impedire il passaggio degli ioni idrogeno (Elias *et al.*, 1977) La componente “funzionale” della resistenza epiteliale entra in gioco quando la rottura delle tight junctions espone la membrana basolaterale ad elevate concentrazioni di ioni idrogeno ed ha lo scopo di ristabilire il pH fisiologico a livello della mucosa e di rigenerare il tessuto danneggiato.

Le componenti tissutali in grado di tamponare gli ioni H⁺ sono proteine, fosfati e ioni bicarbonato.

All'interno della cellula la produzione di bicarbonato avviene a partire da acqua e diossido di carbonio con l'intervento delle anidrasi carboniche, mentre il bicarbonato extracellulare arriva per diffusione dal circolo sanguigno. (Orlando C. *et al.*, 2008)

Quando la capacità tamponante citosolica diventa insufficiente la neutralizzazione degli ioni idrogeno avviene attraverso il loro trasporto negli spazi intercellulari tramite la pompa Na/H⁺, ed attraverso la captazione di bicarbonato attraverso e la pompa Cl/HCO₃, la diminuzione di pH a livello degli spazi intercellulari viene a sua volta tamponata dagli ioni bicarbonato provenienti dal circolo sanguigno. (Orlando C *et al.*, 2008). La rigenerazione fisiologica dell'epitelio è in un ciclo che si svolge normalmente in 5-8 giorni. In presenza di una necrosi, le cellule germinative possono riparare il danno in due modi: il primo è la migrazione di cellule sane adiacenti la lesione stessa, questo avviene sotto stimolo di fattori di crescita quali: EGF (Epithelial Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) e HGF (Hepatocytes Growth Factor); avviene in breve tempo, non richiedendo neosintesi di acidi nucleici e di proteine, ma può provvedere alla sostituzione delle sole cellule profonde, prossime alla membrana basale, perché inibite ai pH superficiali compresi tra 3.0 e 6.5 (Orlando C. *et al.*, 2008).

Il secondo meccanismo, la replicazione cellulare, è il quello maggiormente attivo in condizioni di GERD in cui l'insulto acido-peptico è ripetuto e prolungato. Essa viene promossa da EGF, contenuto nella saliva che deterge il lume esofageo, e può quindi addentrarsi nelle zone lese venendo a contatto con i recettori specifici. Il processo è in grado di iniziare in soli 30 minuti ma richiede poi un tempo prolungato, di 2-4 giorni, e l'assenza di agenti lesivi per la completa riparazione delle aree epiteliali necrotiche. La proliferazione dell'epitelio esofageo è aumentata nella malattia da reflusso, in particolare nella NERD, segno di un aumentato turn-over cellulare, espressione del tentativo di riparazione del danno (Calabrese *et al.*, 2007).

In un articolo del 2011 Jojov *et al.* hanno dimostrato come nelle GERD l'epitelio esofageo presenti un aumento della permeabilità giunzionale, in associazione con il cleavage proteolitico dell'E-caderina. Una perdita di E-caderina, da sola, può essere responsabile della perdita della permeabilità giunzionale, e il cleavage di tale proteina rappresenta verosimilmente un evento molecolare critico nella patogenesi delle GERD, e l'identificazione dei frammenti prodotti dal taglio potrebbe essere un ipotetico strumento per l'individuazione di biomarker per la diagnosi di GERD (Jojov *et al.* 2001)

Componente Post-Epiteliale: L'afflusso sanguigno garantisce all'epitelio esofageo l'apporto di ossigeno, nutrienti e la rimozione di sostanze tossiche; importante, in presenza di alte concentrazioni di ioni idrogeno, è l'apporto di HCO₃⁻ dal letto vascolare attraverso un processo dinamico mediato, ad esempio, da Istamina, NO (ossido nitrico) e CGRP (Calcitonin Gene Related

Peptide) che consente un aumento dell'afflusso sanguigno parallelamente ad una elevazione dell'acidità luminale (Orlando C *et al.*, 2008)

TABLE 2. Factors Contributing to Tissue Resistance of Esophageal Epithelium

1. Preepithelial defenses
 - a. Mucus
 - b. Unstirred water layer
 - c. Surface bicarbonate ions
 2. Epithelial defenses
 - a. Apical cell membranes
 - b. Apical junctional complex
 - i. Tight junctions
 - ii. Adherens junctions
 - iii. Intercellular glycoconjugate
 - c. Cytosolic pH regulation (acid extruders)
 - i. Sodium-hydrogen exchanger
 - ii. Sodium-dependent chloride-bicarbonate exchanger
 - d. Cytosolic buffers
 - i. Protein
 - ii. Phosphates
 - iii. Bicarbonate (carbonic anhydrase-generated)
 - e. Extracellular buffers
 - i. Bicarbonate
 - ii. Phosphates
 - iii. Protein
 - iv. Cell reparative defense
 1. Restitution
 2. Replication
 3. Postepithelial defense
 - a. Blood supply
 - b. Tissue acid-base balance
-

Tab 3 Orlando C *et al* 2008

Diagnosi

Non esiste un gold standars per la diagnosi di GERD, infatti endoscopicamente solo il 40% dei casi risulta positivo, inoltre la scelta delle terapie anti reflusso si basa solo sulla risoluzione dei sintomi . La “ Society of American Gastrointestinal Endoscopic surgeon (SAGES) Practice Guidelines” stabilisce che la diagnosi di GERD può essere confermata se esiste almeno una delle seguenti condizioni: un danno alla mucosa evidenziato tramite endoscopia in pazienti con i sintomi tipici, esofago di Barret confermato da biopsia, una stenosi peptica in assenza di tumori, o pH metria positiva (Stefandis D. *Et al.*, 2010). Questa definizione ovviamente esclude i pazienti con malattia da reflusso non erosiva con pH metria negativa. Uno strumento diagnostico oggettivo con sensibilità e specificità accettabili rimane ancora una necessità non soddisfatta per clinici e ricercatori.

Diagnosi Clinica: Bruciore di stomaco e rigurgito sono sintomi caratteristici della sindrome da reflusso (Wong *et al.*, 2003). La tipica sindrome da reflusso può venire diagnosticata solo sulla base dei sintomi che la caratterizzano, senza l'utilizzo di test diagnostici, a condizione che siano stati esclusi sintomi allarmanti quali vomito, sanguinamento gastrointestinale, massa addominale, inspiegabile perdita di peso e disfagia progressiva, che potrebbero portare al sospetto della presenza di una neoplasia (1)

Endoscopia: questa tecnica ha alta specificità ma bassa sensibilità dal momento che più del 60% dei pazienti con ERD non presenta erosione (Nwokediuko *et al.*, 2009)

Istologia: diverse lesioni istologiche sono state descritte in pazienti con NERD, tra cui dilatazione degli spazi intracellulari (Ismail-Beigi *et al.*, 1970), iperplasia delle cellule basali (Brown *et al.*, 1984), allungamento papillare (Ballem *et al.*, 1960), eosinofili (Knuff *et al.*, 1984) e neutrofilii intraepiteliali (Nandurkar *et al.*, 2000).

Monitoraggio del pH ambulatoriale: pazienti con NERD che non rispondono ai medicinali con valutati molto bene col monitoraggio del p in ambulatorio. Tale test dovrebbe essere effettuato off-therapy se la diagnosi non è ancora certa, oppure on-therapy se si cerca di determinare l'adeguatezza di un trattamento. La pH-metria esofagea delle 24 ore è l'esame più sensibile e specifico, e rappresenta il "gold-standard" per la diagnosi di reflusso gastroesofageo patologico. Grazie alla pH-metria è possibile valutare il grado ed il tempo di esposizione dell'esofago al reflusso, l'intervallo impiegato dall'organo per ripulirsi dall'acido, la relazione del disturbo e dei suoi sintomi con i pasti e l'entità degli stessi. La pH-metria permette inoltre di stabilire il trattamento (farmacologico o chirurgico) più opportuno, per poi valutare periodicamente l'efficacia della terapia intrapresa. La versione più attuale dell'esame prevede il monitoraggio prolungato, per 24 ore, del pH endoluminale (Pohl *et al.* 2009)

Altri metodi utilizzati per la diagnosi di GERD sono la *manometria* e il *Proton Pump Inhibitor test*.

Trattamenti

La maggior parte dei trattamenti per le GERD prevede un miglioramento dei sintomi, la guarigione delle esofagiti, la prevenzione degli episodi di reflusso e delle complicazioni. Essi si basano anche sulle modificazioni dello stile di vita e sul controllo della secrezione acida dello stomaco utilizzando farmaci o trattamenti chirurgici che prevedono la chirurgia correttiva antireflusso.

Ovviamente la prima linea di trattamento prevede modificazioni dello stile di vita e in modo particolare della dieta. L'utilizzo di antiacidi serve a far diminuire i sintomi, specialmente dopo parzi abbondanti (Lieberman *et al.*, 1987).

Attualmente la terapia a base di soppressori di acido è il trattamento principale per le GERD. L'antagonista del recettore 2 dell'istamina (H₂RA) può diminuire la secrezione acida gastrica dopo un pranzo, ed è molto più efficace di un comune antiacido, anche se non possono guarire le lesioni della mucosa e la terapia di mantenimento con dosi standard di tale farmaco non è efficace nel prevenire le ricadute (Colin-Jones 1995).

Gli inibitori di pompa protonica (PPI) sono la tipologia di soppressori di acido più potente. Essi hanno sostituito il benzimidazolo che si legava irreversibilmente alla H⁺ K⁺ ATPasi lo step finale coinvolto nella secrezione acida (Richardson *et al.* 1998). Gli agenti procinetici sono efficaci solo in pazienti che presentano una sintomatologia lieve, gli altri di norma necessitano farmaci addizionali quali ad esempio i PPI. Ovviamente non tutti i pazienti rispondono in maniera uguale agli inibitori di pompa protonica, circa il 20-30% dei pazienti con GERD continua ad avere sintomi persistenti del reflusso anche dopo l'assunzione giornaliera di PPI. Ciò può dipendere da diversi fattori, tra cui dosi non corrette, reflusso duodenogastroesofageo ecc. (Fass *et al.*, 2009).

GERD e infiammazione

Le cellule infiammatorie della mucosa esogaga associate alle GERD includono una moderata infiltrazione di leucociti, macrofagi e mast cellule nella mucosa esofagea. I leucociti polimorfonucleati (PMN-PoliMorfoNuclear), che caratterizzano questa attività infiammatoria, sono presenti in più del 40% dei pazienti con reflusso gastroesofageo. Il ruolo degli eosinofili, identificati in alcuni pazienti con GERD, non è stato ancora del tutto chiarito ed è oggetto di parecchie discussioni. (Kandulski *et al.*, 2012).

Negli ultimi anni, le GERD sono state definite come delle lesioni caustiche causate dal danno all'epitelio squamoso ad opera dei contenuti acidi delle peptidasi, seguite poi dall'infiltrazione di cellule infiammatorie all'interno del sito lesionato per togliere i detriti a livello della mucosa. Il danno alla mucosa si pensa abbia inizio a livello della superficie del lume epiteliale per poi penetrare negli strati più profondi fino alla sottomucosa, con conseguente risposta proliferativa degli strati cellulari basali. (Livston *et al.* 1977). In questo modello tradizionale, gli ioni idrogeno e la pepsina esercitano un effetto corrosivo sulla superficie della mucosa esofagea, degradando le proteine giunzionali e distruggendo quindi la funzione epiteliale di barriera, con conseguente induzione dell'infiammazione intramucosa (Kandulski *et al.*, 2012). La presenza di chemochine e citochine a livello della mucosa si spiega tradizionalmente col rilascio dei neutrofilii infiltranti e dei linfociti. Il ruolo dei cheratinociti epiteliali e degli altri tipi di cellule che compongono la mucosa

viene ignorato nella patogenesi delle GERD e il potenziale meccanismo e la relazione patofisiologica tra queste cellule rimane ancora oggetto di studio (Orlando *et al.* 2008).

La risposta immunitaria nelle GERD è caratterizzata dal rilascio locale di citochine come molecole facenti parte del pattern infiammatorio. Sia le citochine che le chemochine sono piccole molecole peptidiche sintetizzate e rilasciate da quasi tutte le cellule del corpo. Esse svolgono un ruolo come comunicatori tra cellule modulando un'ampia varietà di funzioni. Le citochine inducono, amplificano, perpetuano e terminano l'infiammazione.

La risposta immunitaria predominante è guidata dai T-helper (T_{H1}) sia nelle ERD che nelle NERD, caratterizzata dal rilascio di citochine proinfiammatorie come IL-8 e IL-1 β . Diversi studi hanno valutato la presenza di queste e di altre citochine proinfiammatorie sia in biopsie provenienti da pazienti con GERD (Monkemuller *et al.*, 2009), che in modelli animali di GERD (Rieder *et al.*, 2007), dimostrando come la loro localizzazione fosse a livello dei cheratinociti esofagei. IL-8 e IL-1 β . Sono rilasciate ad alti livelli sia nelle ERD che nelle NERD, ed entrambe correlano con un quadro endoscopico ed istopatologico piuttosto severo. In particolare IL-8 è sia un potente chemoattrattante che un attivatore dei PMN e dei linfociti (Mukaida *et al.*, 2003). Anche altre citochine come IL-6 risultano incrementate nella malattia da reflusso. La tabella 4 riassume i mediatori infiammatori nell'infiammazione della mucosa associata alle GERD.

MEDIATORI DELL'INFIAMMAZIONE	FONTE	EFFETTO
IL-8; IL-1 β ; IL-6	cheratinociti epiteliali; cellule del sistema Immunitario (PMN, linfociti, cellule dendritiche) Cellule mesenchimali (fibroblasti, endotelio)	Chemoattrazione Proinfiammazione
IL-4; IL-10	Cellule del sistema immunitario (linfociti, cellule T Regolatorie, cellule dendritiche.)	Immuniregolazione
PAF	Cheratinociti epiteliali; cellule mesenchimali (fibroblasti, endotelio)	Proinfiammazione chemoattrazione, attivazione di cellule immunitarie e non

Tab 4: mediatori infiammatori nella mucosa infiammata associata alla malattia da reflusso gastroesofageo.

Concludendo: diversi studi hanno esaminato il profilo dei mediatori dell'infiammazione nelle GERD, mostrando una risposta infiammatoria con un aumento dei livelli di citochine proinfiammatorie tra cui IL-1 β , IL-6 e IL-8, PAF (Platelet-activating factor, un fosfolipide proinfiammatorio e chemoattraente, particolarmente per gli eosinofili), e ROS (reactive oxygen species, piccole molecole che includono gli anioni radicali superossido, il singoletto di ossigeno, e il perossido di idrogeno) nella mucosa esofagea. Queste scoperte sono ulteriormente supportate dall'aumento dell'attività di

NF- κ B (un fattore di trascrizione ubiquitario che regola la risposta proinfiammatoria) nella mucosa dei pazienti affetti da malattia da reflusso. NF- κ B può venire attivato da citochine proinfiammatorie e può quindi modulare la sintesi e la secrezione dei mediatori dell'inflammatione (Rieder *et al.* 2010).

L'inflammatione nell'esofago non è guidata solo dalle cellule del sistema immunitario. Le cellule epiteliali sono più probabilmente le iniziatrici dell'inflammatione, dal momento che sono esposte, e quindi reagiscono, al contenuto gastrico come la pepsina, la tripsina, l'acido e il succo gastrico, e potenzialmente anche contro il microbiom esofageo. Esse secernono attivamente mediatori proinfiammatori (citochine, ROS e PAF) i quali aumentano la risposta ma anche il danno epiteliale stesso, e allo stesso tempo attivano le cellule mesenchimali e endoteliali (Rieder *et al* 2010). La loro attivazione porta all'up-regolazione di molecole e mediatori che consentono la comunicazione con le cellule immunitarie e amplificano la risposta cellulare immunitaria. Questa risposta include l'up-regolazione delle molecole di adesione e la secrezione di citochine addizionali e chemoattraenti con attività proinfiammatoria diretta, che culmina in una perpetuazione dell'inflammatione e in un ciclo di auto-sostentamento (**Fig 8**)

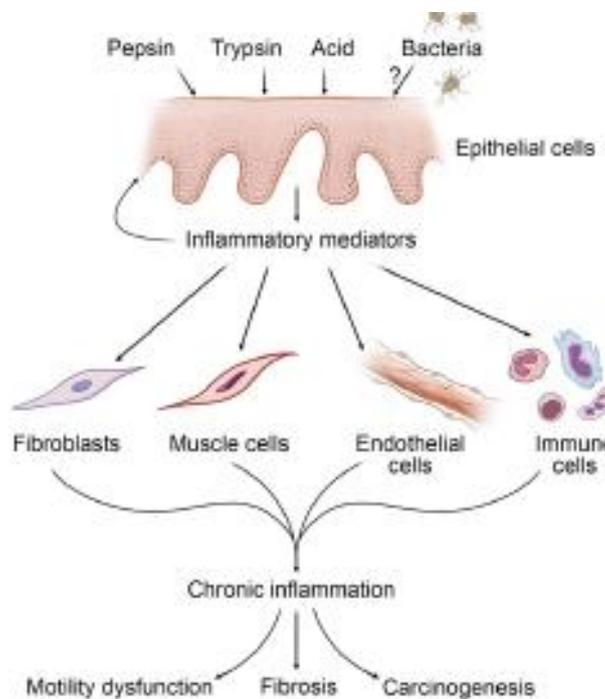


Fig 8: modello multidirezionale di interazione tra cellule del sistema immunitario e non immunitario nell'inflammatione della mucosa dell'esofago indotta dalla malattia da reflusso gastroesofageo questo schema spiega anche lo sviluppo di complicanze nei pazienti con GERD come ad esempio disturbi nella motilità esofagea, fibrosi e carcinogenesi (Rieder *et al.*, 2010)

Effetto dell'infiammazione sulla carcinogenesi

L'incidenza dell'adenocarcinoma esofageo è aumentata di almeno sei volte durante l'ultima decade nel mondo occidentale. Senza una diagnosi nei primi stadi di sviluppo, la sopravvivenza dopo 5 anni, con infiltrazione locale o metastasi, è del 20%. Di solito l'adenocarcinoma si sviluppa a partire dall'esofago di Barrett, e nei pazienti con tale patologia l'incidenza tumorale è di 30 volte superiore (Lagergren *et al.* 1999).

L'infiammazione sembra giocare un ruolo importante nella carcinogenesi attraverso due meccanismi distinti: primo, il rilascio di mediatori infiammatori dalle cellule immunitarie, principalmente ROS; secondo, un aumento dei meccanismi di riparazione dell'epitelio esofageo. Infatti, come accennato prima, l'infiammazione nelle GERD induce stress ossidativo, il quale, in modelli animali, porta allo sviluppo di adenocarcinoma che potrebbe essere mediato dal danno al DNA, RNA e lipidi, attraverso alterazioni geniche specifiche, instabilità genetica e metilazione aberrante del DNA (Seril *et al.* 2003). Questi cambiamenti causano un'alterazione delle funzioni di enzimi e proteine, come ad esempio l'attivazione dei prodotti degli oncogeni, e/o l'inibizione di proteine soppressive dei tumori. Un aumento dei livelli di ROS è evidenziabile nella mucosa delle GERD, nell'esofago di Barrett e nell'adenocarcinoma esofageo (Ohshima *et al.*, 2003).

Anche l'aumento della rigenerazione epiteliale può essere un innesco alla carcinogenesi. Alcuni errori genetici somatici, come ad esempio una non-disgiunzione cromosomica o errori nei geni del mismatch repair, avvengono normalmente durante la proliferazione cellulare, ma la quantità di tali errori è decisamente bassa e correggibile, ma un aumento della proliferazione delle cellule epiteliali in seguito a infiammazione, espone le cellule a una frequenza maggiore di errori di replicazione, e anche l'aumento del turnover cellulare contribuisce alla fissazione e all'espansione di tali errori nella popolazione cellulare (Itzkowitz *et al.*, 2004). Presi insieme quindi infiammazione, stress ossidativo e aumento del turnover cellulare possono lavorare sinergicamente per produrre tutta quella serie di eventi responsabili della trasformazione cellulare nell'esofago infiammato (**Fig 9**) (Rieder *et al.* 2010).

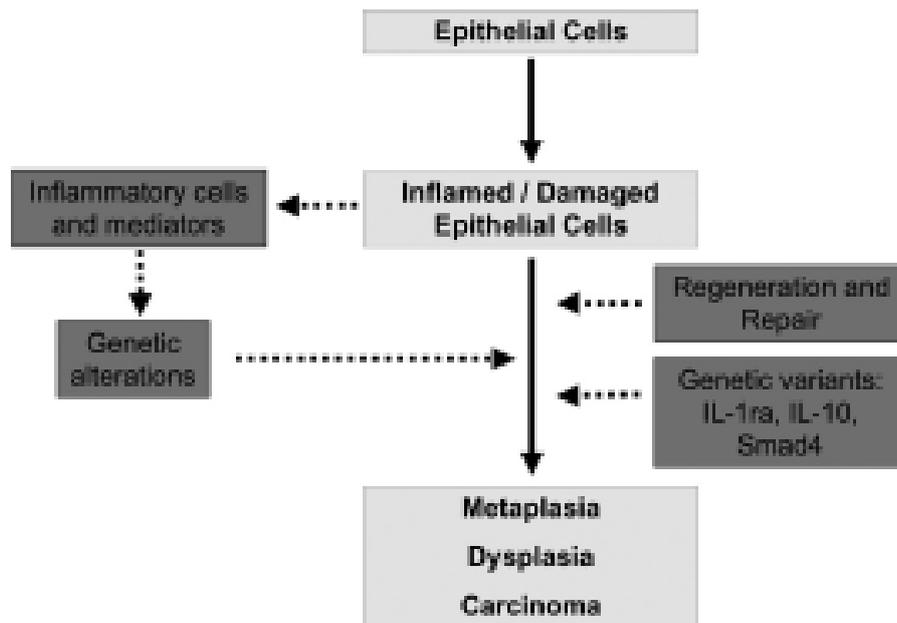


Fig 9: meccanismi di infiammazione che inducono carcinogenesi nelle GERD. Alterazioni genetiche e aumento della rigenerazione cellulare portano un epitelio infiammato e danneggiato a metaplasia, displasia e carcinoma.

Infiammazione, GERD ed esofago di Barrett

Non è ancora completamente chiaro quindi se l'infiammazione da sola sia sufficiente a dare inizio al processo di carcinogenesi. Dati raccolti negli ultimi anni mostrano che l'infiammazione può indurre ad alterazioni e instabilità genetiche attraverso i mediatori dell'infiammazione stessa, con conseguente sviluppo di anomalie geniche nelle cellule tumorali. Come già detto, il danno al DNA mediato dai ROS è un fattore critico per la tumorigenesi. Il danno alle molecole di DNA causato dai ROS causa alterazioni nella trascrizione, instabilità genomica, ed errori nella replicazione. In più, insieme a questi effetti dannosi diretti, esistono tutta una serie di meccanismi che alterano alcuni checkpoint fondamentali nei sistemi di riparazione del DNA e nel controllo del ciclo cellulare. L'instabilità genetica può verificarsi sia a livello cromosomico che a livello nucleotidico. Quest'ultima include l'instabilità delle sequenze ripetute dei microsatelliti (MSI), causata da difetti nel pathway del mismatch repair. In contrasto l'instabilità cromosomica (CIN) definisce l'esistenza di una quota accelerata di alterazioni cromosomiche (Pohlmann *et al.*, 2012).

Nell'esofago di Barret si riscontrano anomalie dei geni del mismatchrepair , che giocano un ruolo maggiore in altri tipi di tumore del tratto gastrointestinale, come il cancro al colon ereditario non associato a poliposi. Anche alterazioni dei microsatelliti sono state descritte a livello della sequenza che porta al Barret: metaplasia-displasia-adenocarcinoma. **(Fig 10)**

Un'altra comune alterazione genetica presente nell'esofago di Barrett è la LOH (loss of hetrozygosity). (Pohlmann *et al.*, 2012).

Le alterazioni epigenetiche che contraddistinguono la carcinogenesi del Barrett sono : silenziamento epigenetico di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (ad esempio pRb, p16, APC) del'apoptosi (DAPK), del DNA repair, dell'adesione cellulare (E-caderina) (Pohlmann *et al.*, 2012).. Inoltre diversi studi hanno dimostrato come alcuni microRNA (piccoli RNA non codificanti) siano implicati nella regolazione di geni coinvolti nella tumorigenesi esofagea (Giannakakis *et al.* 2007).

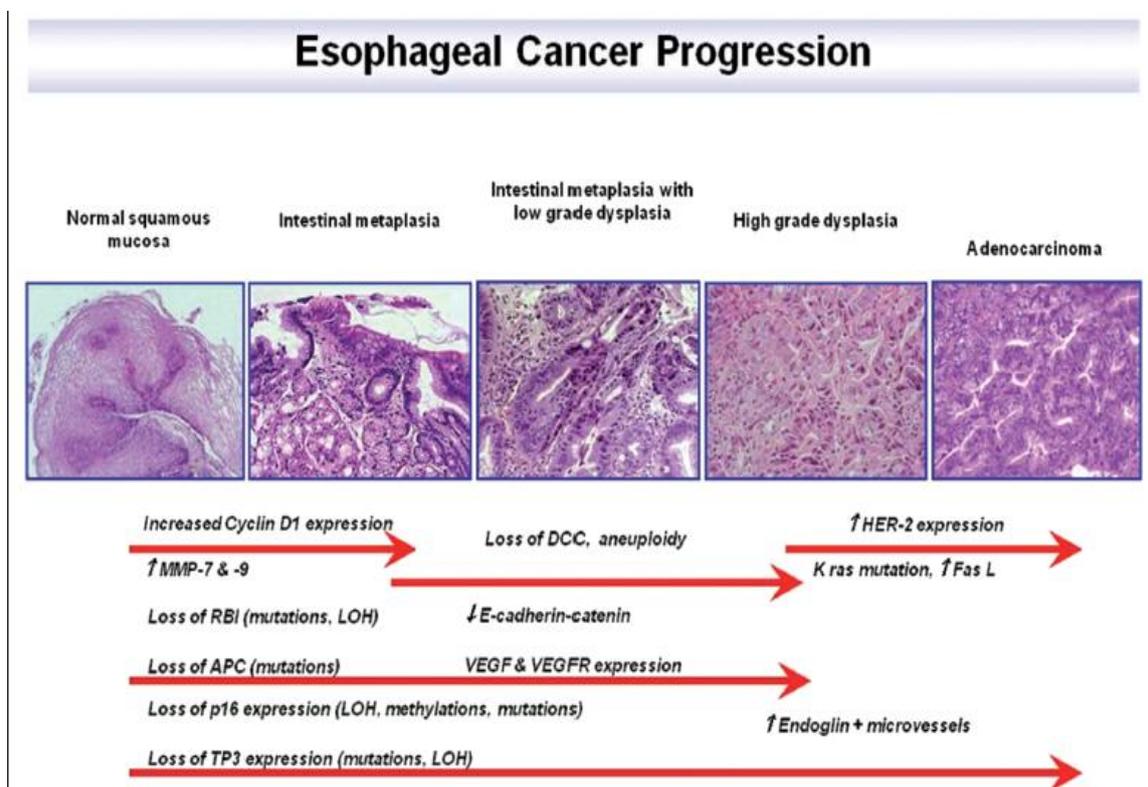


Fig 10: progressione del tumore esofageo (Villanacci *et al.*, 2012)

In tutti i testi di patologia generale si afferma come la metaplasia, tipicamente, si sviluppi in associazione con l'infiammazione cronica, la quale stimola il turnover cellulare, anch'esso tipico dell'esofago di Barrett. Questo alto turnover può portare ad alterazioni nell'espressione genica delle cellule epitaliali. In risposta ai mediatori infiammatori il fattore di trascrizione CDX2 vie indotto attraverso NFkB, ed entrambi svolgono unruolo importante nello sviluppo della metaplasia. La metaplasia si sviluppa preferenzialmente quando vengono coinvolti dei geni omeotici i quali sono

responsabili dell'alterazione dello sviluppo direzionale degli organi. Infatti nell'esofago di Barrett, l'epitelio squamoso si trasforma in epitelio colonnare, ad opera, probabilmente, del gene BMP4 (bone morphogenic protein 4) (Pohlmann *et al.* 2012).

Anche il pathway di segnalazione di WNT sembra essere coinvolto nella regolazione del gene CDX2 (Saegusa *et al.*, 2007).

L'epithelial-mesenchymal transition mediato da TGF- β sembra essere un fattore importante nello sviluppo tumorale nell'esofago (Rees *et al.*, 2006)

La figura 11 riassume i pathway molecolari che collegano l'infiammazione allo sviluppo dell'esofago di Barrett.

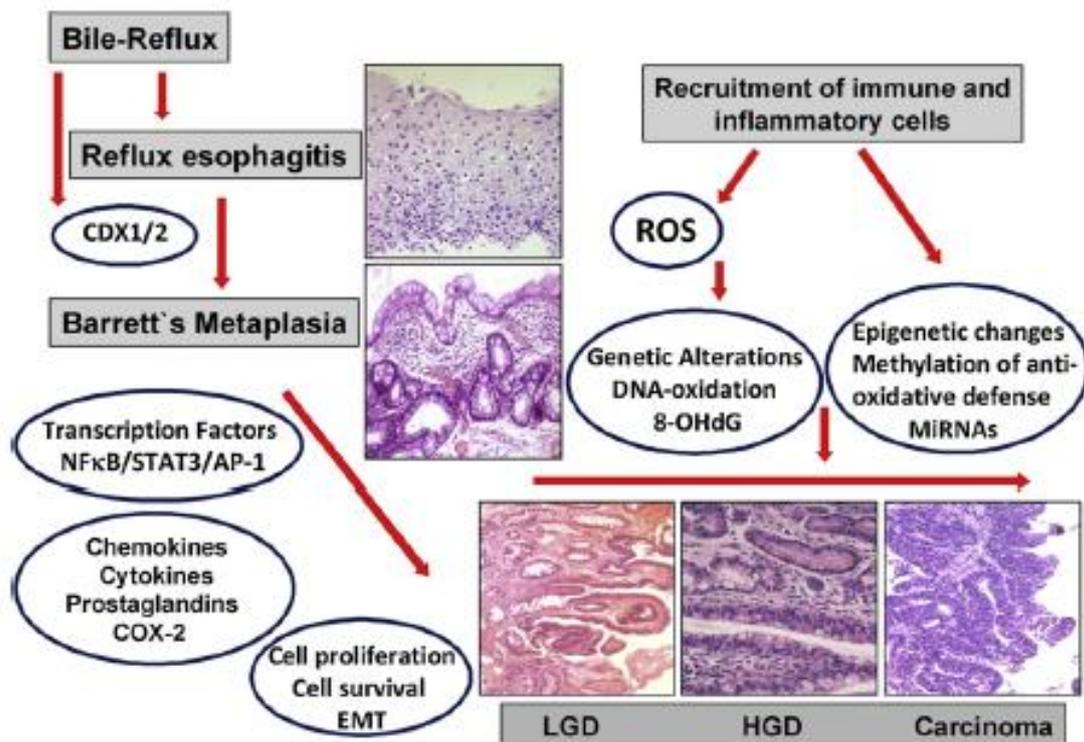


Fig. 11: il reflusso di bile innesca la malattia da reflusso gastroesofageo. Vengono reclutate cellule immunitarie e infiammatorie. I geni homeobox CDX1 e CDX2 innescano lo sviluppo della metaplasia di Barrett. Viene attivata l'espressione dei fattori di trascrizione i quali coordinano differenti mediatori dell'infiammazione (come ad esempio le citochine). Inm questa maniera aumenta la proliferazione cellulare e l'epithelial-mesenchymal transition viene attivato. Le cellule infiammtorie producono ROS che causano alterazioni genetiche (principalmente ossidazione del DNA) le cellule infiammtorie possono innescare alterazioni epigenetiche come la metilazione dei geni che difendono dall'ossidazione. Anche i microRNA sono considerati mediatori importanti dei tumori indotti da infiammazione.

CAPITOLO 2

IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Gli endocannabinoidi sono dei lipidi bioattivi derivanti dall'acido arachidonico che svolgono un ampio range di attività, attraverso il legame a due recettori a 7 eliche transmembrana accoppiati a proteine G (CB1 e CB2), e ad altri target putativi: *Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)*, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)*, *Orphan G-protein coupled receptors: GPR55 and GPR119* (Izzo *et al* 2010).

Il recettore CB1 è presente nel sistema nervoso centrale e media gli effetti dei cannabinoidi endogeni come il Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), il componente attivo della marijuana. Nel cervello sia i cannabinoidi che gli endocannabinoidi combinano col recettore CB1 sull'assone terminale, e regolano l'attività dei canali ionici e il rilascio dei neurotrasmettitori (**Fig 12**). Il legame con il recettore CB1 è responsabile dell'attività analgesica dei endocannabinoidi così come della modulazione della locomozione o del controllo della temperatura (Hermanson *et al.*, 2011).

Il recettore CB2 è presente nel tessuto infiammatorio e media gli effetti antiinfiammatori degli endocannabinoidi e dei cannabinoidi derivati dalle piante (Izzo *et al.*, 2009). Sia il CB1 che il CB2 si accoppiano a proteine G riducendo i livelli intracellulari di cAMP (Munro *et al.*, 1993)

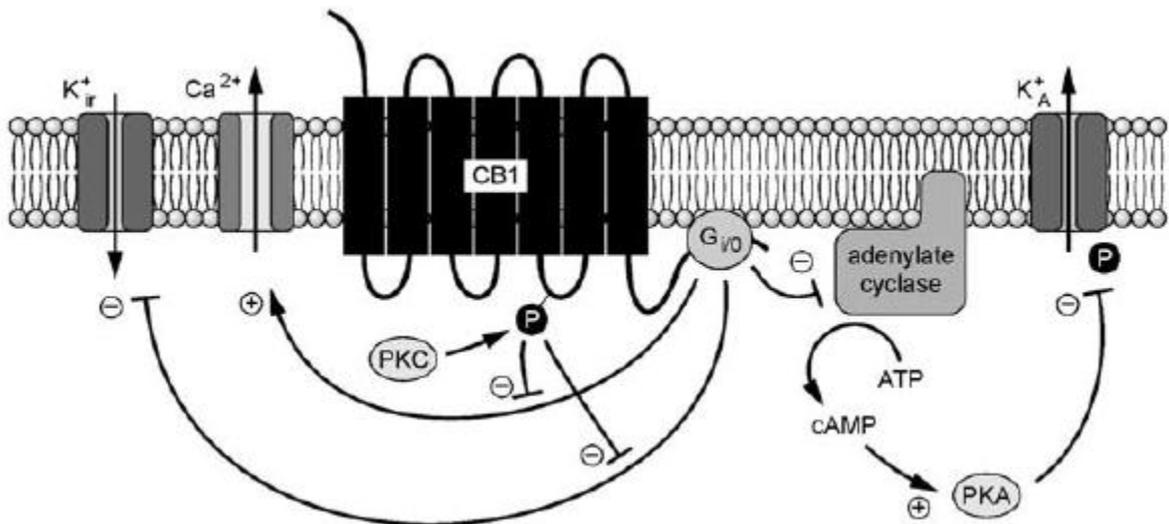


FIG 12: Rappresentazione schematica dei principali effetti del recettore CB1 sui canali ionici. L'attivazione dei recettori CB1 porta alla stimolazione delle proteine G_i/o o la conversione mediata dall'adenilato ciclasi dell'adenosina trifosfato in adenosina monofosfato, la quale si lega alla subunità regolatoria della proteina chinasi A e causa la liberazione della subunità catalitica che a sua volta fosforila i canali A per il potassio, causando una diminuzione dell'efflusso di K^+ . Dato l'effetto negativo del CB1 sull'adenilato ciclasi, il risultato finale è l'attivazione dei canali di tipo A per il potassio. La proteina G_i/o attivata dal CB1 può inibire direttamente i canali per il calcio di tipo N o P/Q, e attivare i canali per il potassio (K_{ir}). Gli ultimi due effetti sono regolati dalla proteina chinasi C, la quale può fosforilare il recettore CB1 nel terzo loop citoplasmatico e sganciare il recettore dai canali ionici. (Massa *et al.*, 2005)

Funzioni degli endocannabinoidi: regolazione dei circuiti cerebrali del vomito (Izzo *et al.* 2010), modulazione dell'appetito (Izzo *et al.*, 2010), modulazione della spasticità associata alla sclerosi multipla (Baker *et al.*, 2000), attività analgesica (Meng *et al.*, 1998), ruolo nei processi associati alla regolazione della memoria (Marsicano *et al.*, 2002), azione vasodilatatoria e ipotensiva (Randall *et al.*, 2004), regolazione dei processi riproduttivi (Maccarone *et al.*, 2005), azione anticonvulsivante (Wallace *et al.*, 2002), modulazione della risposta immunitaria (Crowford *et al.*, 2005), azione anti-ossidativa (Marsicano *et al.*, 2002), ruolo nei processi che regolano la proliferazione cellulare (Wright *et al.*, 2005)

Sintesi degli endocannabinoidi: Il primo endocannabinoide ad essere stato identificato, nel 1992, è l'anandamide o arachidonoiletanolammide (AEA), un'amide dell'acido arachidonico con etanolamina, seguito dal 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Devane *et al.* 1992). Più recentemente sono stati identificati altri tre cannabinoidi endogeni: il 2-arachidonil-gliceril-etero (noladin, 2-AGE), un analogo strutturale del 2-AG, la virodamina e la N-arachidonoildopamina (NADA). Gli endocannabinoidi vengono prodotti nelle cellule neuronali e, a differenza di altri neuromediatrici, non vengono immagazzinati in vescicole ma vengono sintetizzati on-demand a partire da precursori fosfolipidici di membrana in risposta a uno stimolo che provoca la depolarizzazione della membrana cellulare.

In particolare per l'anandamide, il processo si divide in due fasi, la prima fase vede la scissione stimolo-mediata di un fosfolipide precursore di membrana, l'N-arachidonoilfosfatidiletanolamina, in AEA e acido fosfatidico, catalizzata da una fosfolipasi D. La seconda fase è la rigenerazione del fosfolipide precursore ad opera della N-aciltrasferasi (NAT), che catalizza il passaggio di un gruppo acido arachidonico dalla posizione sn-1 della fosfatidilcolina all'estremità della fosfatidiletanolamina (Pomelli 2003). NAT per attivarsi richiede la presenza di Ca^{2+} poiché è inattiva in sua assenza, mentre l'AMPc attiva NAT indirettamente attraverso la fosforilazione dell'enzima ad opera della proteina chinasi A (Di Marzo *et al* 1994). Il 2-arachidonoilglicerolo è un estere di glicerolo e omega-6-acido arachidonico appartenente ai monoacilgliceroli. Esistono due possibili vie di sintesi. La prima, quella più accreditata, vede la formazione di 1,2-diacilglicerolo (DAG) a partire dal fosfatidilinositolo ad opera della fosfolipasi C (PLC), con conseguente idrolisi del DAG in 2-DAG ad opera della lipasi DAG.) La seconda via di sintesi è la produzione di 2-arachidonoil fosfolipide, un lisofosfolipide (Liso-PI) mediante fosfolipasi A1 (PLA1) che viene poi idrolizzato dalla lisofosfolipasi C in 2-AG (Pomelli D. 2003). Anche la sintesi di questo cannabinoide è promossa da un aumento intracellulare di Ca^{2+} .

Rilascio e degradazione degli endocannabinoidi e suoi recettori: Data la natura lipofila sia dell'anandamide che del 2-arachidonoilglicerolo e poiché i neuroni contengono nella membrana i precursori di entrambi, si pensa che gli endocannabinoidi siano rilasciati dalla cellula appena sintetizzati mediante un meccanismo on-demand.

Gli endocannabinoidi vengono inattivati mediante due meccanismi: un trasporto nella cellula mediato da carrier ed idrolisi intracellulare.

Anche se gli endocannabinoidi sono in grado di muoversi all'interno della membrana plasmatica per diffusione passiva, esistono evidenze che mostrano un carrier energia-dipendente che accelera il processo di internalizzazione (Beltramo, *et al* 1997). Una volta all'interno del neurone l'azione di due serina-idrolasi citosoliche scindono sia l'anandamide che il 2-arachidonoilglicerolo.

Fatty acid amide hydrolase (FAAH), membro della famiglia delle serine idrolasi è un enzima catabolico di una classe di enzimi bioattivi chiamati amididi degli acidi grassi, idrolizza l'anandamide in acido arachidonico ed etanolamina mentre la monoacilglicerolo (MAGL) scinde il 2-arachidonoilglicerolo in acidi grassi e glicerolo (Pomelli. 2003)

La MAGL è ampiamente distribuita nel sistema nervoso centrale, la sua presenza si sovrappone parzialmente a quella di FAAH, ma mentre la FAAH si trova principalmente nei terminali post-sinaptici la MAGL è principalmente pre-sinaptica (**Fig 13**) (Dinh . *et al*. 2002).

I recettori dei cannabinoidi, CB1 e CB2 sono recettori accoppiati a proteine G, in particolare del sottotipo G_i/o inibitorio (Kunos G. 2006). Il recettore CB1 fu scoperto nel 1990, e il recettore CB2

individuato nel 1993. Alcuni ricercatori ritengono possibile l'esistenza di un terzo tipo di recettore, ma esso non è stato ancora isolato. Questi recettori sono costituiti da una catena polipeptidica a sette domini transmembrana i quali formano tre loop extracellulari e tre loop intracellulari.

La distribuzione dei recettori è stata studiata mediante autoradiografia di legame recettore-ligando su sezioni di cervello di ratto montate su vetrino, tramite ibridazione in situ e immunohistochimica e tramite autoradiografia di cervello umano (Herkenham *et al.* 1990).

I recettori CB1 si trovano principalmente nell'encefalo, in particolare nei gangli basali, globus pallidus e substantia nigra e, in misura minore, nel cervelletto, nell'ippocampo, nel nucleo caudato, nel putamen, nell'ipotalamo e nell'amigdala. Sono stati inoltre individuati, ma con minore densità, anche nei polmoni, nel fegato, nei reni, nelle cellule dell'apparato riproduttivo sia maschile che femminile, nei muscoli lisci e nelle cellule endoteliali.

I recettori CB1 sono invece assenti nel midollo allungato, la parte del sistema nervoso che presiede al controllo delle funzioni respiratorie e cardiovascolari.

L'attivazione dei recettori CB1 porta alla stimolazione delle proteine G che inibiscono l'enzima adenil-ciclastasi con conseguente calo dei livelli citoplasmatici di cAMP, effetto contrario a quello della adrenalina, inoltre ha un effetto inibitorio sulla conduttanza ionica trans membrana. L'attivazione di CB1 può inoltre stimolare l'attività di alcune chinasi intracellulari come la focal adhesion kinase (FAK), la fosfatidil-inositolo-3 chinasi (PI3-K) le chinasi ERK, la p38 MAP chinasi (p38). L'attivazione di queste chinasi intracellulari può mediare l'espressione CB1-indotta degli immediate early genes (IEG) come i fattori di trascrizione c-focus, c-jun, zif-268 e il brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Pagotto *et al.* 2006).

I recettori CB2 invece sono presenti quasi esclusivamente nelle cellule immunitarie, dove si pensa siano implicati nella regolazione della risposta immunitaria. Diversi studi però dimostrano un'espressione di CB2 anche in cellule non immunitarie, come per esempio i cheratinociti (Ibrahim *et al.* 2005). A causa della loro ampia localizzazione i recettori dei cannabinoidi, in particolare CB1, sono stati oggetto di ricerca farmacologica per cercare dei composti che potessero agire da antagonisti per modulare l'azione del sistema endocannabinoide. Il primo CB1-antagonista selettivo ad essere scoperto è stato Rimonabant (SR14176A), appartenente alla classe dei diarilpirazoli, testato sull'uomo per il trattamento dei sintomi della schizofrenia, nella terapia anti-fumo e nell'obesità, anche se con scarsi risultati ed importanti effetti collaterali (Anthenelli. *et al* 2004).

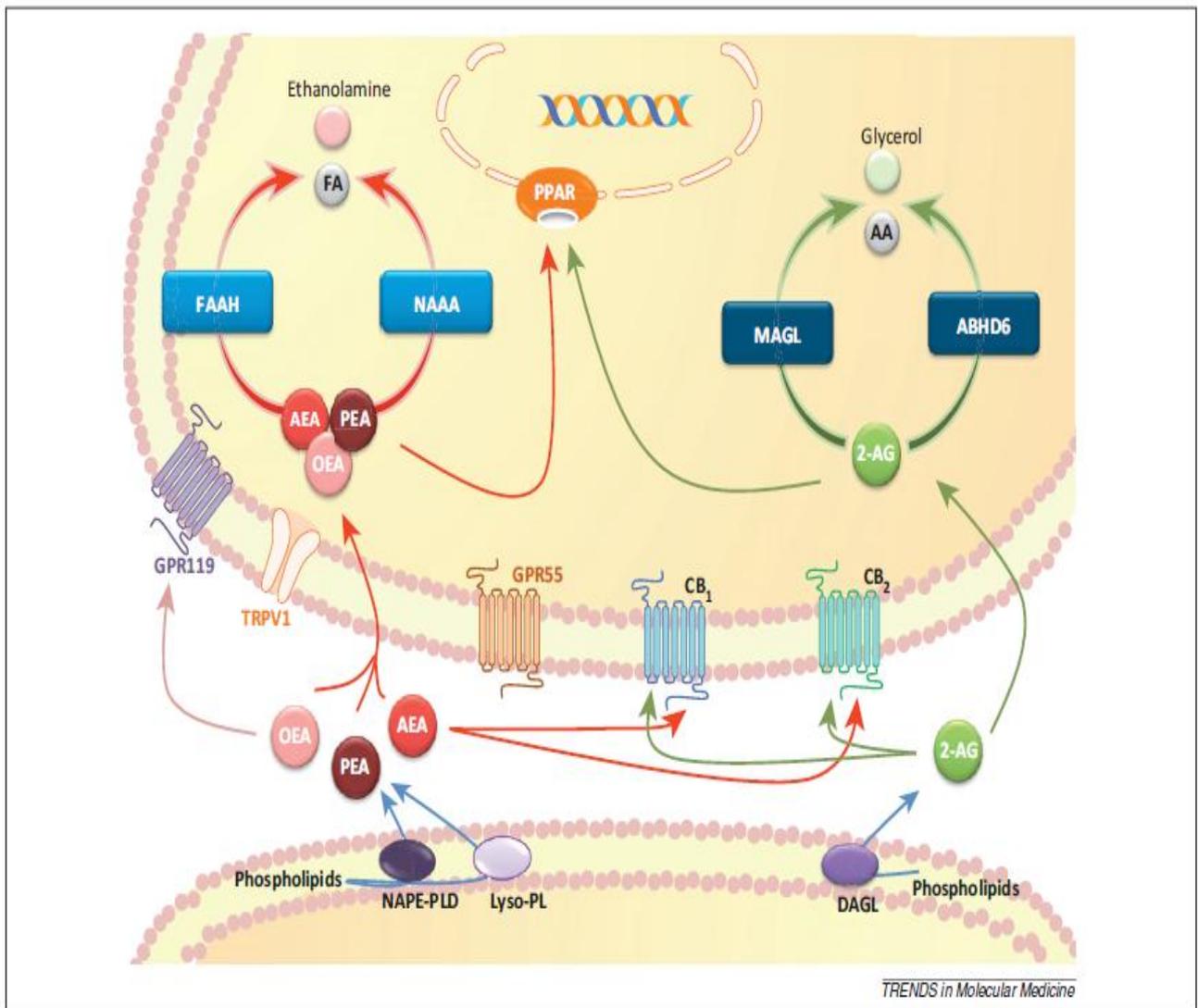


Fig 13: il sistema endocannabinoide in un guscio di noce. LN-aciletanolamina (NAE)-anadamide (AEA) N-palmitoiletanolamina (PEA) e N-oleoiletanolamina (OEA) vengono sintetizzate a partire dal precursore di membrana N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) o direttamente attraverso una fosfolipasi d selettiva per il NAPE, o attraverso un'azione seriale di alcune lipasi (fosfolipasi C e poi fosfatasi o fosfolipasi A2 e successivamente da fosfolipasi D). 2-arachidonilglicerolo (2-AG) è prodotto principalmente dal diacilglicerolo derivante dai fosfolipidi ad opera delle lipasi a e b per il diacilglicerolo (GAGL). Questi lipidi bioattivi possono attivare: recettori accoppiati a proteine G come i recettori per i cannabinoidi CB1 e CB2 (AEA, 2-AG), GPR119 (OEA) o GPR55 (probabilmente dal PEA); i recettori per i canali TRPV1 (AEA); i the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (AEA, OEA, PEA, 2-AG). Questi lipidi vengono idrolizzati all'interno della cellula attraverso diverse lipasi. I due enzimi primari che idrolizzano NAPE sono: la serina amidasi FAAH e la cisteina amidasi NAAA. 2-AG viene idrolizzata da due serine idrolasi, MAGL e ABHD6. (Alhouayek *et al.*, 2012).

Il sistema endocannabinoide nella fisiologia del tratto gastrointestinale

I recettori CB1 sono stati trovati a livello del tratto gastrointestinale di differenti specie, tra cui il topo, il ratto, il maiale il porcellino d'india e l'uomo. Analisi effettuate tramite immunoistochimica hanno evidenziato la presenza della proteina CB1 nel sistema nervoso enterico, in modo particolare nei neuroni e nelle fibre dei plessi mienterici della sottomucosa (Coutts *et al.*, 2002). Mentre studi di elettrofisiologia hanno dimostrato l'esistenza dei recettori CB1 pre-giunzionali nella muscolatura liscia longitudinale dell'ileo (Crocchi *et al.*, 1998). Dall'altra parte il messaggero del recettore CB2 è stato individuato principalmente nelle cellule immunitarie, tra cui i mastociti peritoneali del ratto (Facci *et al.*, 1995). Molto probabilmente questa espressione è particolarmente importante durante i processi infiammatori a carico del tratto GI (Izzo *et al.*, 2004).

Esperimenti eseguiti sul piccolo intestino di cavie da laboratorio hanno messo in luce la presenza dei messaggeri dei recettori CB1 e CB2 su questo tessuto, ma mentre il recettore CB1 è stato trovato anche durante la preparazione del plesso mienterico, il recettore CB2 è stato individuato sull'intero segmento dell'intestino, suggerendo che le cellule del sangue sono responsabili della presenza del recettore CB2 (Griffin *et al.*, 1997).

Nell'intestino i recettori CB1 sono co-localizzati con l'acetilcolina transferasi, un marker per i neuroni colinergici. Questa osservazione conferma il ruolo degli endocannabinoidi nell'inibizione della motilità e della secrezione intestinale, inibendo probabilmente la neurotrasmissione colinergica nel tratto GI (Di Carlo *et al.*, 2003). I recettori CB1 inoltre sono parzialmente co-localizzati con i neuroni intestinali immunoreattivi alla sostanza P, ma non con i neuroni o fibre immunoreattivi all'ossido nitrico sintasi. Infine studi di immunoistochimica hanno rilevato che alcuni neuroni che presentano immunoreattività ai recettori δ oppioidi- simili sono anche immunoreattivi ai recettori κ oppioidi, CB1 e TRPV1. Queste osservazioni indicano che questi sistemi di recettori possono interagire gli uni con gli altri per modulare le funzioni sensomotorie nel plesso mioenterico (Kulkarni-Narla *et al.*, 2001).

Una delle caratteristiche più interessanti del sistema endocannabinoide è la sua elevata e selettiva specificità di attivazione spazio e tempo dipendente. La sintesi, il rilascio, l'attivazione dei recettori e l'eventuale degradazione degli endocannabinoidi, avvengono on-demand, quando e dove sono richieste appropriate condizioni durante i processi fisiologici e patofisiologici. Trattamenti generalizzati con gli agonisti dei cannabinoidi (naturali, sintetici o endogeni) non mimano sempre

le funzioni fisiologiche e patofisiologiche del sistema. Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che gli endocannabinoidi svolgono differenti ruoli importanti nella fisiologia del tratto GI (Massa *et al.* 2005).

Motilità intestinale: Gli agonisti del recettore CB1 e gli endocannabinoidi che agiscono su tale recettore, ma non gli agonisti del recettore CB2, riducono la motilità intestinale e la secrezione.

Esperimenti condotti sui guinea pig dimostrano che agonisti CB1 sono in grado di inibire le contrazioni della muscolatura liscia intestinale attraverso l'inibizione del rilascio di acetilcolina, inoltre è stato dimostrato che nei casi di ipomotilità intestinale associata ad ileo paralitico sono presenti elevate concentrazioni di anandamide ed un'elevata espressione di CB1 (Sanger 2007); il recettore CB2 sembra invece che intervenga nel controllo della motilità intestinale nei casi di ipermotilità indotta da lipopolisaccaridi suggerendo un ruolo specifico nel ripristino della motilità fisiologica alterata da stimoli infiammatori

Secrezione gastrica: Gli agonisti del recettore CB1, ma non del CB2, riducono la secrezione acida gastrica (Sanger 2007)

A livello della mucosa gastrica il recettore CB1 è espresso dalle cellule parietali (responsabili della secrezione acida) è stato dimostrato che nei topi il Δ -9 tetraidrocannabinolo è in grado di inibire la secrezione indotta da istamina e che gli agonisti CB1 WIN-55,212-2 e HU210 sono in grado di inibire la secrezione gastrica attraverso meccanismi periferici, questo effetto viene bloccato da antagonisti CB1, cosa che conferma il coinvolgimento diretto di questo recettore nella regolazione della secrezione gastrica (Massa *et al.*, 2005).

Svuotamento gastrico: E' stato osservato che la somministrazione intravenosa di il Δ -9 tetraidrocannabinolo causa una diminuzione dello svuotamento dello stomaco e dell'intestino tenue sia nei roditori che nell'uomo l'effetto è mediato direttamente dal recettore CB1, infatti può essere mimato utilizzando agonisti CB1 (WIN 55,212-2) ed inibito da antagonisti CB1 (SR141716) (Massa *et al.* 2005).

Food intake: Gli agonisti del recettore CB1 e gli endocannabinoidi che agiscono al livello del recettore CB1, ma non gli agonisti del recettore CB2, aumentano il food intake e il peso corporeo sia nei roditori che nell'uomo (Sanger 2007).

Oltre ai numerosi studi che dimostrano che il sistema endocannabinoide possa regolare l'assunzione del cibo attraverso effetti diretti sul sistema nervoso centrale e periferico è stato anche dimostrato

un meccanismo di azione mediato dai recettori della capsaicina a livello intestinale.(Massa *et al.* 2005). (Fig 14)

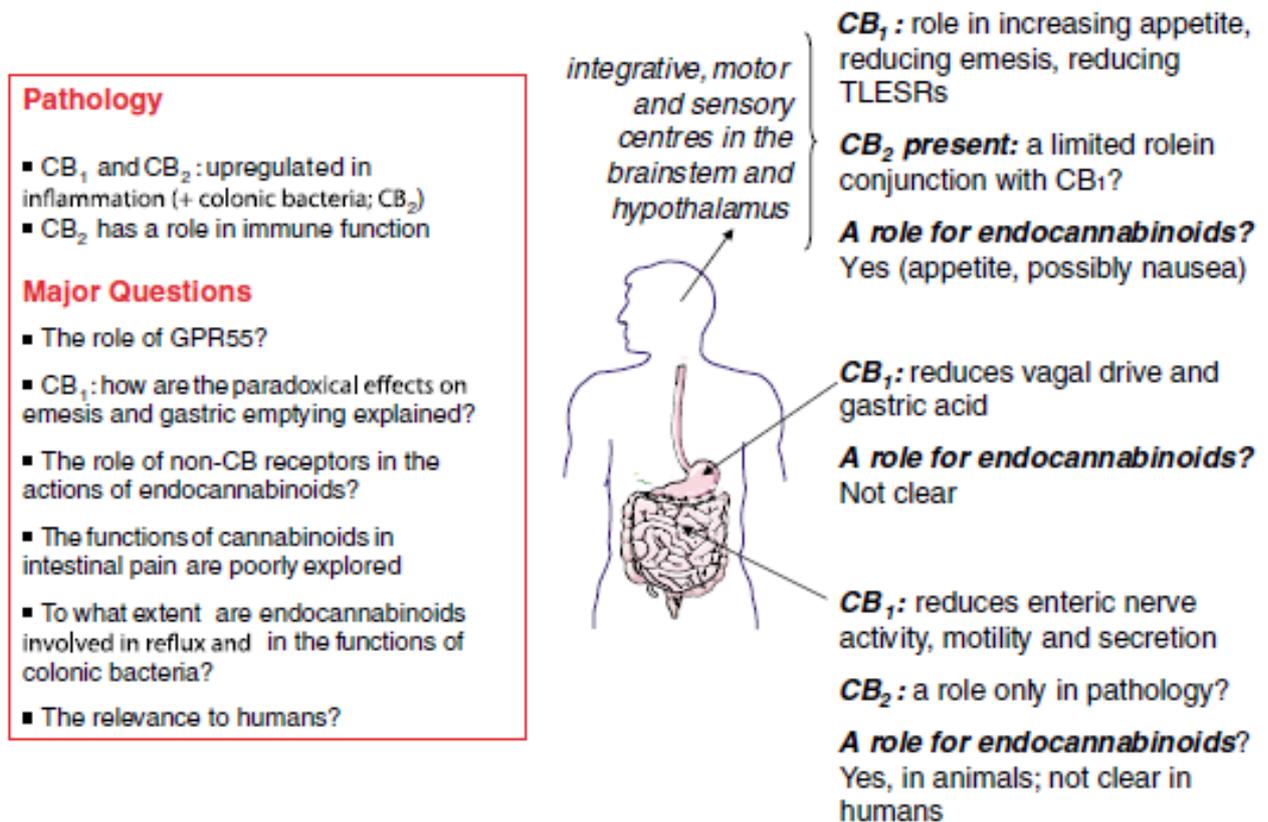


FIG 14: fisiologia e patologia degli endocannabinoidi nel tratto gastrointestinale

Il sistema endocannabinoide nella fisiopatologia del tratto gastrointestinale

Ad oggi, ci sono molti dati a sostegno del ruolo del sistema endocannabinoide nella fisiologia del tratto GI, mentre per quanto riguarda gli studi sulla fisiopatologia non è ancora ben chiaro il suo coinvolgimento. Ci sono molti dati a sostegno del ruolo degli endocannabinoidi in svariate disfunzioni che affliggono in tratto GI nell'uomo: alcuni report su pazienti suggeriscono che stati di diarrea o crampi addominali possono essere trattati con estratti cannabinoidi (Massa *et al.*, 2005).

Nausea ed emesi: nell'uomo gli effetti benefici antiemetici ed anti-nausea degli endocannabinoidi sono ben chiari grazie a studi (ben 40 studi clinici) condotti su pazienti oncologici che hanno ricevuto chemio o radio terapia, o in pazienti che hanno ricevuto una terapia immunodepressiva. (porter *et al.*, 2001). Studi su animali hanno dimostrato il coinvolgimento sia del sistema nervoso centrale che di quello periferico. Interessante è il fatto che i cannabinoidi causano lo svuotamento gastrico, che a sua volta causa nausea, suggerendo come gli effetti del SNC siano più importanti di quelli periferici nel ridurre la nausea e il vomito (Coutts *et al.*, 2004).

Disordini legati all'iper produzione di acido: un eccesso di secrezione acida gastrica può portare a gastrite o a ulcerazione dello stomaco o del duodeno. I recettori CB1 localizzati sul pathway vagale afferente sembrano essere coinvolti nel mediare la riduzione della produzione acida gastrica (Adami *et al.* 2002).

Sindrome del colon irritabile: La sindrome da colon irritabile (IBS) è un disordine caratterizzato da disturbi addominali, dolore, irregolarità intestinale (Longstreth *et al.*, 2006; Drossman *et al.*, 2006). I più recenti criteri diagnostici definiscono la sindrome come tale solo se questi sintomi si manifestano almeno per 3 giorni in un mese e per almeno 3 mesi e solo se la sintomatologia migliora con la defecazione, o se è associata con una variazione nella frequenza della defecazione e nella consistenza delle feci. La sintomatologia può variare tra i pazienti, tanto che la sindrome da colon irritabile può presentarsi in due forme, nella prima il sintomo predominante è la diarrea (D-IBS), nella seconda prevale la costipazione (C-IBS), in alcuni casi le due forme possono alternarsi in una patologia definita mista (M-IBS) (Drossman *et al.*, 2006) Nella D-IBS il transito a livello del colon appare aumentato (Vassallo *et al.*, 1992) mentre sembra diminuire nella C-IBS. Il sistema endocannabinoide è coinvolto nella regolazione di molti dei fattori che sono associati alla patogenesi delle IBS; infatti è noto che la stimolazione dei recettori CB1 è in grado di diminuire la

motilità intestinale mentre l'utilizzo di antagonisti causa un aumento della motilità (Pertwee *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2002). I recettori CB2 non hanno lo stesso effetto in condizioni fisiologiche, tuttavia sembrano essere in grado di regolare la motilità intestinale quando questa è alterata da uno stato infiammatorio. Un altro sintomo caratteristico delle IBS è il dolore addominale che sembra essere legato ad un fenomeno di ipersensibilità viscerale (Anand *et al.*, 2007; Aziz *et al.*, 2006) ed è stato dimostrato che il sistema endocannabinoide è coinvolto nella trasmissione e modulazione del dolore viscerale (Jhaveri *et al.*, 2007). E' ancora oggetto di dibattito il ruolo della secrezione intestinale nelle IBS, è stato ipotizzato che anomalie nel riassorbimento dei liquidi a livello dell'ileo distale o del colon potrebbero essere la causa della diarrea. Il recettore CB1 è presente a livello del plesso sottomucosale a livello del quale il sistema endocannabinoide interviene nella regolazione di secrezione mediata dall'innervazione colinergica (MacNaughton *et al.*, 2004), è stato osservato nei topi che la somministrazione di il Rimonabant (un inibitore dei recettori CB1) provoca un aumento della quantità di acqua presente nelle feci. Nonostante l'implicazione del sistema endocannabinoide nella patogenesi delle IBS non sia stata dimostrata, il potenziale terapeutico di agonisti ed antagonisti dei recettori CB1 in questa patologia sembra essere elevato.

Malattie infiammatorie croniche intestinali: Le malattie infiammatorie croniche intestinali (morbo di Crohn e colite ulcerosa) sono disordini infiammatori cronici di eziologia sconosciuta (D'argenio *et al.*, 2006), caratterizzate da infiltrazione di neutrofili a livello della mucosa, ulcerazioni e necrosi epiteliale. Studi condotti su pazienti con colite ulcerosa hanno dimostrato che nelle forme moderate di pancolite si ha un aumento dell'espressione del recettore CB2 ed una diminuzione di NAPE-PLD, nelle forme in remissione si ha una diminuzione di DAGL-alfa ed un aumento di NAPE-PLD, soprattutto nei pazienti trattati con 5-ASA corticosteroidi. MAGL e FAAH aumentano nella pancolite e diminuiscono dopo il trattamento (Marquez *et al.*, 2009).

Gli endovanilloidi sono definiti come dei ligandi endogeni per TRPV1. Il primo endovanilloide ad essere identificato è stato l'anandamide (AEA), che attiva TRPV1 a concentrazioni più alte rispetto a quelle richieste per l'attivazione dei recettori dei cannabinoidi. Nel tratto digerente, TRPV1 viene espresso principalmente dai neuroni afferenti primari. McVey *et al.* hanno trovato che l'anandamide intraluminale stimola l'accumulo di fluidi e l'attività della mieloperossidasi (un marker dell'infiammazione intestinale) nell'ileo dei ratti, e che gli endocannabinoidi sono in grado di mediare l'infiammazione intestinale causata dalla tossina A del *Clostridium difficile*. In un differente studio è stato dimostrato che l'anandamide stimola il rilascio di acetilcolina nei nervi mienterici del porcellino d'india. Quindi, l'attivazione di TRPV1 ad opera dell'anandamide può causare effetti sull'infiammazione, l'ipersecrezione e ipercontrattilità, che sono opposti a quelli evocati dall'attivazione dei recettori dei cannabinoidi (Izzo *et al.*, 2009) (**Fig 15**).

Ulteriori studi sull'uomo hanno mostrato che i livelli di anandamide tissutale aumentano nei pazienti con colite ulcerosa attiva (D'argenio *et al.*, 2006), mentre studi in vitro su linee cellulari di colonociti dimostrano che la stimolazione con agonisti CB1 può essere efficace nello stimolare la guarigione epiteliale (Wright *et al.*, 2005). L'effetto dei cannabinoidi è stato studiato anche su modelli animali di IBD. La colite indotta con trinitrobenzene (TNBS) e dinitrobenzene (DNBS) provoca un aumento dell'anandamide tissutale. Il trattamento dei topi con VDM-11, un inibitore del reuptake dell'anandamide, provoca una totale remissione dell'infiammazione. Il trattamento con AA-5HT, un inibitore dell'idrolisi dell'anandamide, provoca una parziale remissione dell'infiammazione (D'argenio *et al.*, 2006). Ulteriori esperimenti sono stati condotti su topi *cb1*^{-/-} (K.O) e su *CB1*^{+/+} (WT). Sia nei K.O che nei W.T è stata indotta l'infiammazione tramite DNBS, i topi *Cb-/-* hanno mostrato un grado di infiammazione molto elevato, se paragonato ai wild type. Per verificare il ruolo di *cb1* nella protezione contro l'infiammazione i topi W.T. cui è stata indotta l'infiammazione sono stati trattati con antagonisti *cb1*, questo ha provocato un aumento della severità dell'infiammazione mentre la somministrazione di agonisti provoca un miglioramento. Il recettore CB1 in particolare sembra agire sia a livello della motilità intestinale che a livello di protezione della mucosa colica, dimostrandosi efficace anche quando gli agonisti vengono somministrati prima dell'induzione della colite (Massa *et al.*, 2005).

Effetti protettivi contro l'infiammazione sono associati anche alla stimolazione dei recettori CB2 (Storr *et al.*, 2009) su modelli animali di colite indotta con DNBS e TNBS, inoltre è stato dimostrato che il 2-AG è in grado di diminuire la produzione di TNF-alfa in modelli di colite indotta con LPS (Gallily *et al.*, 2000)

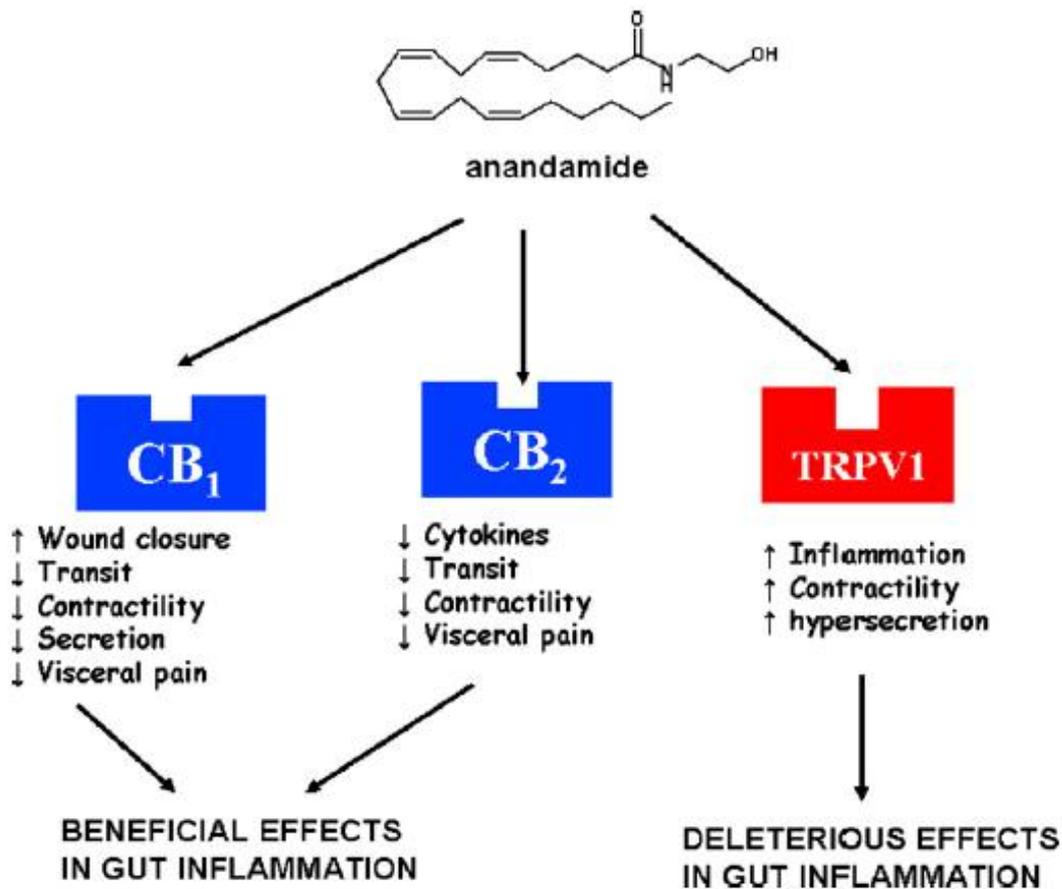


FIG 15: Anandamide e infiammazione intestinale. L'anandamide attiva i recettori CB1 e CB2 con conseguenti benefici, e ad alte concentrazioni attiva TRPV1 con conseguenti effetti negativi. Questo schema riflette solo l'azione dell'anandamide, e non di quella degli altri agonisti dei recettori degli endocannabinoidi (Izzo *et al.*, 2009)

Cancro intestinale: I cannabinoidi esercitano un'azione antiproliferativa, antimetastatica e antiapoptotica in cellule epiteliali di colon carcinoma, così come effetti anti-tumorali in modelli sperimentali di tumore al colon. L'azione anti-tumorale potrebbe essere mediata dall'attivazione dei recettori CB1 e CB2, o attraverso meccanismi non mediati da recettori cannabinoidi, come ad esempio la produzione di prostamidi (Izzo *et al.*, 2009).

Gli effetti antiproliferativi/pro-apoptotici degli agenti cannabinoidi, sono stati studiati in differenti linee tumorali di colon che esprimono diversi livelli dei due recettori CB1 e CB2. Gli esperimenti suggeriscono che l'attivazione del recettore CB1, e probabilmente anche del CB2, causa una diminuzione della sopravvivenza cellulare, un effetto associato all'aumento dell'attività della caspasi-3, enzima che fa parte di un meccanismo pro-apoptotico.

I pathway coinvolti nell'induzione dell'apoptosi nelle cellule tumorali ad opera del recettore CB1 sono:

- inibizione del pathway RAS-MAPK e PI3-AKT (Greenhough *et al.*, 2007)
- down-regolazione del fattore anti-apoptotico survivina (Wang *et al.*, 2008)
- attivazione della ceramide, un lipide pro-apoptotico che sembra agire come secondo messaggero nell'azione dei cannabinoidi (Velasco *et al.*, 2005) (**Fig 16**)

L'anandamide e il 2-AG sono substrati per la cicloossigenasi-2 (COX-2) che causa la generazione delle prostaglandine etanolamidi, chiamate prostamidi. Questi componenti mediano una serie di effetti distinti da quelli dei prostanoidi convenzionali (Woodward *et al.*, 2008). Diversi studi dimostano che l'anandamide induce la morte cellulare in cellule di colon carcinoma che esprimono COX-2 attraverso la produzione dei metaboliti di COX-2 stessa (prostamidi). Ciò porta a pensare che esista la possibilità che le cellule tumorali di colon che esprimono alti livelli di COX-2 potrebbero essere un target per gli agonisti dei CB che causano morte cellulare.

Anche gli esrogeni sembrano up-regolare l'espressione del recettore CB1.

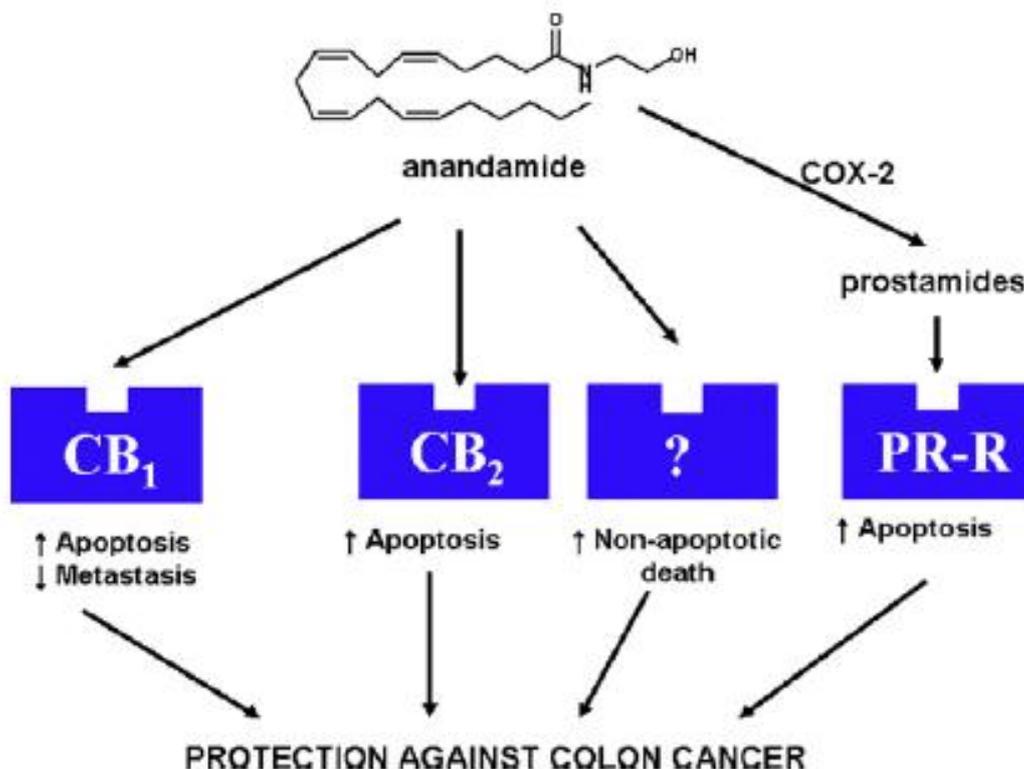


FIG 16: Anandamide e cancro al colon. L'anandamide esercita un'azione anti-neoplastica attraverso l'attivazione dei recettori CB₁ e CB₂, o causare una morte delle cellule cancerose non apoptotica attraverso un meccanismo non ancora ben identificato. In più l'anandamide potrebbe generare, attraverso COX-2, dei prostamidi i quali esercitano un'azione apoptotica attraverso l'attivazione dei recettori putativi per i prostamidi (PR-R) (Izzo *et al.*, 2009)

Malattia da reflusso gastroesofageo: lo sfintere esofageo inferiore (LES) è una regione specializzata della muscolatura circolare liscia esofagea che consente il passaggio del bolo allo stomaco,

prevenendo il reflusso del contenuto gastrico all'interno dell'esofago stesso (Farrè *et al.*, 2008). Gli agonisti del recettore CB1 inibiscono il rilassamento transiente del LES nei cani e nei furetti, attraverso l'attivazione del recettore CB1, e l'effetto, in modo particolare nei cani risulta associato all'inibizione del reflusso gastroesofageo (Lehmann *et al.* 2002, Beaumont *et al.*, 2009, Partosoedarso *et al.*, 2003). Ciò è in accordo con con l'osservazione che l'immunorattività del recettore CB1 è presente nei neuroni all'interno del complesso vagale dorsale e nei gangli nodosi. In linea con gli studi animali Δ^9 -THC riduce il numero dei rilassamenti transienti del LES e causa una riduzione non significativa degli episodi di reflusso acido nella prima ora post-prandiale di volontari sani (Beaumont *et al.*, 2003).

Uno studio interessante di Cuy *et al.* (2007) estende i potenziali benefici terapeutici dei recettori CB anche alla malattia da reflusso gastroesofageo.

CAPITOLO 3

BIOMARKER DISCOVERY

La genomica funzionale ha fatto enormi progressi dai suoi inizi nel 1980. Molte delle scoperte più recenti in questo campo si devono all'avvento della tecnologia NGS (Next Generation Sequencing), che ha contribuito ad un aumento esponenziale dei dati genomici disponibili per diverse patologie umane (Patterson *et al.*, 2000, Kilpinen *et al.*, 2102).

Lo scopo principale della genomica funzionale è quello di chiarire i dati genomici per descrivere le funzioni dei geni e delle proteine e le loro interazioni nella popolazione sana, così come di identificare aberrazioni geniche e proteiche che influenzano lo sviluppo di patologie complicate, prima tra tutte il cancro. L'espansione dei dati genomici disponibili che riguardano le variazioni e le mutazioni nei genomi di pazienti con tumori, ha portato alla scoperta di pathway molecolari e signalling aberranti associati allo sviluppo di queste malattie. Sono state anche identificate diverse molecole che potrebbero essere utilizzate come biomarker, ma purtroppo i progressi in questa direzione sono ancora piuttosto lenti. Solo pochi marker sono stati adottati nella pratica clinica (Chi *et al.*, 2008) (**Fig 17**). Le ragioni principali sono (a) complessità ed eterogeneità dei tumori, che contribuiscono alla bassa specificità e alla poca sensibilità dei marker correntemente usati (b) problemi nella trasformazione dell'enorme quantità di dati all'interno di end point clinici valutabili. In più, la grande complessità dei test, la difficoltà nell'implementare test analitici e ottenere informazioni sulla validità clinica dei biomarker in una popolazione molto ampia, impediscono l'integrazione dei biomarker all'interno della pratica clinica (Hanash 2011).

Recentemente sono stati fatti enormi passi nell'area delle tecnologie proteomiche, sia in quella classica che in quella che prevede il processamento di un grande numero di campioni in un tempo ridotto (high-throughput), le quali mostrano del potenziale per il miglioramento delle diagnosi, delle prognosi e del management di un gran numero di malattie (Ling *et al.*, 2007).

Le proteine riflettono i cambi patologici in maniera più accurate rispetto ai cambiamenti nel DNA o nel mRNA. Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di trascritto non correlano necessariamente con quelli delle proteine. Una ragione che spiega questo fenomeno risiede nei normali processi biologici, i quali prevedono delle modificazioni post-traduzionali (PTM) che influenzano l'emivita, la stabilità e l'attività (nonché la quantità) delle proteine, e la produzione di un ampio numero di

isoforme (Kocevar *et al.*, 2012). In più la stabilità delle molecole di messaggero e il loro splicing alternativo, sono altrettanto responsabili della produzione di differenti isoforme proteiche, e contribuiscono alla natura dinamica del proteoma umano (Vidal *et al.* 2012). Queste caratteristiche biologiche possono essere studiate solo a livello delle proteine, e quindi un approccio proteomico risulta essere lo strumento più indicato per la valutazione dei PTM, dell'espressione, della degradazione e dell'attività proteica nei tessuti tumorali (Dasilva *et al.*, 2012).

Biomarker

Il biomarker è stato definito come “ una caratteristica che può essere oggettivamente misurata e valutata come indicatore dei normali processi biologici, patologici e delle risposte farmacologiche in seguito ad interventi terapeutici (Frangogiannis 2012). A livello clinico un biomarker viene considerato come un parametro che misura i progressi di una malattia o gli effetti di una cura farmacologica. Questi parametri possono essere chimici, fisiologici o molecolari. Esempi di biomarker molecolari possono essere specifiche variazioni nella sequenza di DNA (nella linea germinale o somatica), pattern anomali di metilazione, trascritti aberranti, piccoli RNA non codificanti (microRNA,), proteine, o altre molecole biologiche tra cui lipidi e prodotti metabolici (Kocevar *et al.*, 2012).

I due targaardi più importanti nella ricerca di biomarker sono l'identificazione di una singola firma molecolare, che riesca a distinguere, ad esempio, le cellule tumorali rispetto a quelle sane, e lo sviluppo di saggi molto sensibili e specifici che siano in grado di screenare e diagnosticare diverse patologie, che consentano di predirne e monitorarne la progressione, e che indirizzino al giusto piano terapeutico. L'individuazione di queste molecole deve essere il meno possibile invasiva, deve risultare specifica e sensibile, semplice e poco costosa (Ludwig *et al.*, 2005). L'ideale sarebbe poterla misurare all'interno dei fluidi corporei più accessibili, come ad esempio il sangue (o plasma), l'urina e la saliva (Petricoin *et al.*, 2004).

Nel management tumorale i biomarker sono divisi in: 1) diagnostici, 2) prognostici (previsione della progressione della malattia) 3) predittivi (predizione della risposta al trattamento) 4) farmacodinamica/farmacocinetica (stabilire la terapia e/o il dosaggio di un farmaco più efficace) 5) un tipo di biomarker per stabilire le recidive della malattia 6) screenig di biomarker (utilizzato per stabilire il rischio dello sviluppo di una neoplasia in soggetti sani o per identificare individui con patologie subcliniche).

I biomarker proteici ci si aspetta siano dei predittori attendibili dello stato patologico o dell'outcome clinico, dal momento che riflettono il fenotipo della malattia (Izzotti *et al.*, 2012). Per lo sviluppo di biomarker specifici e sensibili, è stato suggerito di recente che la ricerca futura debba orientarsi sull'identificazione di proteine che siano secrete e stabili, ed evitare proteine intracellulari anche se risultano essere più abbondanti. In più le proteine secrete sono responsabili della comunicazione cellulare, e quindi riuscire a tradurre questi segnali all'interno delle informazioni biologiche potrebbe portare alla conoscenza esatta dei meccanismi neoplastici (Fang *et al.*, 2011).

Biomarker	Type	Source	Cancer type	Clinical use
α -Fetoprotein	Glycoprotein	Serum	Nonseminomatous testicular	Staging
Human chorionic gonadotropin- β	Glycoprotein	Serum	Testicular	Staging
CA19-9	Carbohydrate	Serum	Pancreatic	Monitoring
CA125	Glycoprotein	Serum	Ovarian	Monitoring
Pap smear	Cervical smear	Cervix	Cervical	Screening
CEA	Protein	Serum	Colon	Monitoring
Epidermal growth factor receptor	Protein	Colon	Colon	Selection of therapy
KIT	Protein (IHC)	Gastrointestinal tumour	GIST	Diagnosis and selection of therapy
Thyroglobulin	Protein	Serum	Thyroid	Monitoring
PSA (total)	Protein	Serum	Prostate	Screening and monitoring
PSA (complex)	Protein	Serum	Prostate	Screening and monitoring
PSA (free PSA%)	Protein	Serum	Prostate	Benign prostatic hyperplasia versus cancer diagnosis
CA15-3	Glycoprotein	Serum	Breast	Monitoring
CA27-29	Glycoprotein	Serum	Breast	Monitoring
Cytokeratins	Protein (IHC)	Breast tumour	Breast	Prognosis
Oestrogen receptor and progesterone receptor	Protein (IHC)	Breast tumour	Breast	Selection for hormonal therapy
HER2/NEU	Protein (IHC)	Breast tumour	Breast	Prognosis and selection of therapy
HER2/NEU	Protein	Serum	Breast	Monitoring
HER2/NEU	DNA (FISH)	Breast tumour	Breast	Prognosis and selection of therapy
Chromosomes 3, 7, 9 and 17	DNA (FISH)	Urine	Bladder	Screening and monitoring
NMP22	Protein	Urine	Bladder	Screening and monitoring
Fibryn/FDP	Protein	Urine	Bladder	Monitoring
BTA	Protein	Urine	Bladder	Monitoring
High molecular weight CEA and mucin	Protein (Immunofluorescence)	Urine	Bladder	Monitoring

BTA, bladder tumour-associated antigen; CA, cancer antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; FDP, fibrin degradation product; FISH, fluorescent *in-situ* hybridization; GIST, gastrointestinal stromal tumour; IHC, immunohistochemistry; NMP22, nuclear matrix protein 22; PSA, prostate-specific antigen.
Source: Nat Rev cancer © 2005 Nature publishing Group

FIG 17: Biomarker approvati dall'FDA (Food and Drug Administration) (Jason *et al.*, 2013)

Sviluppo dei Biomarker

La biomarker discovery è un campo molto attivo con numerose sfide al suo interno, tra cui il disegno sperimentale, l'accessibilità ai campioni biologici, la qualità e la variabilità (sia all'interno che tra i gruppi), e la rapidità con cui si sviluppano nuove tecnologie (**Tab 3**). Un esperimento di biomarker discovery deve avere un chiaro scopo con sufficiente potere statistico e accesso a campioni ben definiti.

La divisione di prevenzione del cancro al National Cancer Institute ha stabilito il network di ricerca di rilevazione precoce (Early Detection Research Network), per coordinare i ricercatori che lavorano nei diversi settori (sviluppo e validazione dei biomarker, screening della popolazione ecc.). Per riflettere lo sviluppo del farmaco, l'Early Detection Research Network ha impostato un processo formale per guidare lo sviluppo dei biomarker per l'individuazione precoce (Pepe *et al.*, 2001).

Fase 1 per lo sviluppo dei biomarker: Studi Pre-clinici Esplorativi

Il primo step inizia con gli studi pre-clinici, i quali possono includere modelli animali, linee cellulari o campioni biologici. Il processo di discovery può coinvolgere due approcci complementari: un metodo basato sulla conoscenza, nel quale solo uno specifico set di proteine o di trascritti genici, che si pensa sia coinvolto in un determinato processo biologico, viene misurato, e un metodo oggettivo, o imparziale, nel quale vengono misurate decine o anche centinaia di molecole, usando array sia proteici che genici (Vade *et al.*, 2000).

Fase 2: Sviluppo di un assay clinico

Una volta che si sono individuate le molecole di interesse occorre sviluppare un saggio clinico. Questo deve riuscire a distinguere malato da non malato, o soggetto che risponde alla terapia da colui che non risponde. Se un biomarker è misurato solo su una scala binaria (ed esempio positivo vs negativo) il tasso di "veri positivi" (TRP) è la proporzione dei soggetti malati biomarker-positivi, mentre il tasso di falsi positivi (FPR) è la proporzione dei soggetti di controllo biomarker-positivi.

Durante lo sviluppo del saggio è importante valutare i fattori associati al biomarker nel gruppo di controllo. Questi fattori possono includere: età, sesso, fumo, dieta ecc. Per i casi di tumore, lo sviluppo del saggio deve valutare l'associazione del biomarker alle caratteristiche della malattia come ad esempio lo stadio, il grado, la prognosi e l'istologia (Naylor *et al.*, 2003)..

Fase 3: Studio longitudinale retrospettivo

Una volta sviluppato un buon saggio, occorre effettuare un'analisi retrospettiva usando campioni storici, per determinare se il biomarker può realmente individuare l'outcome di interesse, e definire il cut-point per un biomarker con molti valori. L'analisi retrospettiva può comparare marker

multiplici di interesse e sviluppare algoritmi per la combinazione dei marker. Uno degli aspetti più complicati nello sviluppo di un test per l'individuazione di biomarker è trovare i campioni adatti per l'analisi retrospettiva. Questi campioni sono in un numero limitato, specialmente per i biomarker tissutali, e sono riservati solo per gli studi più meritevoli (Brandi Heckmann-Stoddard 2012).

Fase 4: Studio prospettivo

Nello studio prospettivo di un biomarker, il biomarker viene testato per determinare se fa realmente ciò che si era ipotizzato dovesse fare. Per un biomarker early detection, significa individuare il tumore, ad esempio, ad uno stadio precoce della malattia.

Per i biomarker utilizzati per verificare l'efficacia di un farmaco, spesso il biomarker è anche un target del farmaco (Ad esempio recettore per gli estrogeni e tamoxifen) (Brandi Heckmann-Stoddard 2012).

Gli studi prospettivi richiedono una grande quantità di tempo e denaro, e spesso necessitano di un numero molto elevato di campioni i quali devono anche essere screenati affinché venga trovata la popolazione idonea a partecipare al trial. La pianificazione e il pilotaggio del disegno dello studio sono molto importanti in fase 4. L'outcome di un trial in fase 4 deve essere il valore positivo di predizione di un biomarker il valore positivo di predizione (PPV-Positive Prediction Value) è una delle misurazioni più importanti in un saggio clinico. PPV è la proporzione tra i veri positivi e i positivi totali (veri +falsi positivi) (Puntmann *et al.*, 2009). PPV dipende dalla prevalenza della malattia all'interno della popolazione in modo tale che un biomarker per lo screening abbia un PPV significativamente più basso di quello del biomarker diagnostico.

Fase 5: controllo della malattia

La fase finale dello sviluppo di un saggio per la biomarker discovery è un esame di come questo biomarker si comporta nella popolazione. Uno studio prospettivo ben pianificato, con sufficienti finanziamenti e tempi di follow-up, porterà lo scienziato a stabilire se un biomarker sia in grado di ridurre la mortalità per una determinata malattia. Ovviamente la popolazione generale in cui viene testato il biomarker, deve essere differente da quella inclusa nello studio prospettivo, in modo tale che possano essere raccolti dati aggiuntivi per stimare l'effetto complessivo del biomarker sulla mortalità per tale malattia.

La validità clinica di un test è definita come l'abilità di tale test di predire in maniera accurata e realistica la presenza o l'esposizione a una malattia (usato nella predizione del rischio). Tuttavia con l'aumento del costo della salute, solo quei biomarker con performance eccellenti ottengono supporto per il loro utilizzo clinico (Puntmann *et al.*, 2009).

Phase	Type of Experiment	Outcome
1	Preclinical exploratory	Promising biomarkers identified
2	Clinical assay and validation	Clinical assay developed
3	Retrospective longitudinal	Biomarker detects outcome and cut-points are defined
4	Prospective study	Extent and characteristics of outcome detected by biomarker are defined and positive predictive value is identified
5	Cancer control	The impact of the biomarker on reducing the burden of disease on the population is quantified

Tab 3: fasi dello sviluppo dei biomarker

Biomarker proteici

I saggi per l'individuazione di biomarker proteici più utilizzati in diagnostica si basano sull'individuazione di proteine over-esprese nel siero dei pazienti, oppure sulla loro presenza/assenza a livello tissutale tramite saggi immunologici (ELISA, immunocistochemica). Questi metodi presentano molti inconvenienti che limitano il loro utilizzo nella pratica clinica. Ad esempio, i saggi immunologici dipendono dalla specificità degli anticorpi, e l'individuazione di proteine poco abbondanti nei fluidi biologici influenza la sensibilità dei test (Omenn 2006). Lo sviluppo di nuove tecniche in proteomica, associato alle nanotecnologie e a nuovi metodi di rilevazione, ha fornito una nuova piattaforma molto utile per l'identificazione e la caratterizzazione degli effetti delle mutazioni geniche sulla stabilità e sulle funzioni delle proteine. Queste tecniche consentono anche l'individuazione di proteine multiple, aumentando così la sensibilità e la specificità del test (Dasilva *et al.*, 2012).

Il plasma e il siero sono i materiali biologici più accessibili e più abbondanti, e la ricerca di biomarker a livello di questi fluidi risulta di grande rilevanza clinica. Purtroppo il loro proteoma è particolarmente difficile da caratterizzare, a causa della sua estrema complessità e dei suoi cambiamenti dinamici in concentrazione struttura e funzioni, che sono il risultato di fattori fisiologici, patologici e farmacologici (Omenn 2006).

Le tecniche per la separazione delle proteine più utilizzate sono:

Elettroforesi bidimensionale: metodo on-gel, utilizzato per separare le proteine in due dimensioni; in base al loro punto isoelettrico e al loro peso molecolare. Le proteine così separate vengono visualizzate come spot su di un gel di poliacrilammide. Tali spot devono poi essere analizzati (tramite spettrometria di massa) per l'identificazione proteica. Ovviamente questa tecnica non può

essere utilizzata per l'identificazione di biomarker in diagnostica perché piuttosto costosa, richiede parecchio tempo ed è poco riproducibile (Rabilloud *et al.*, 2010) (**Fig 18**)

Spettrometria di massa: analizza le proteine attraverso la produzione di ioni volatili, la separazione in base al loro rapporto massa/carica e alla rilevazione proteica (Lane 2005).

Una tecnica molto interessante che si basa sulla spettrometria di massa è lo shot-gun proteomics, che si basa sull'utilizzo di tecniche di proteomica "bottom-up", nelle quali le proteine presenti all'interno di campioni biologici vengono digerite prima di essere separate e successivamente analizzate tramite spettrometria di massa. Generalmente la cromatografia in fase liquida (LC) viene accoppiata alla spettrometria di massa in tandem (MS/MS), con conseguente analisi peptidica ad elevato throughput. Lo spettro derivante dall'analisi MS/MS viene ricercato all'interno di un database di proteine per identificare i peptidi presenti nel campione (Hu *et al.*, 2007). I programmi più comunemente utilizzati per l'identificazione peptidica sono "Mascots" e "Sequest". Paragonata alle tecniche di proteomica "top-down", shot gun proteomics evita la modesta efficienza di separazione e la bassa sensibilità dello spettro di massa associati con l'analisi delle proteine intatte, ma incontra anche dei problemi nell'analisi dei dati, quelli di determinare il set di proteine presenti nel campione sulla base dei risultati derivanti dall'identificazione dei peptidi. In più non possono venire analizzati contemporaneamente più di due campioni alla volta (Hu *et al.* 2007).

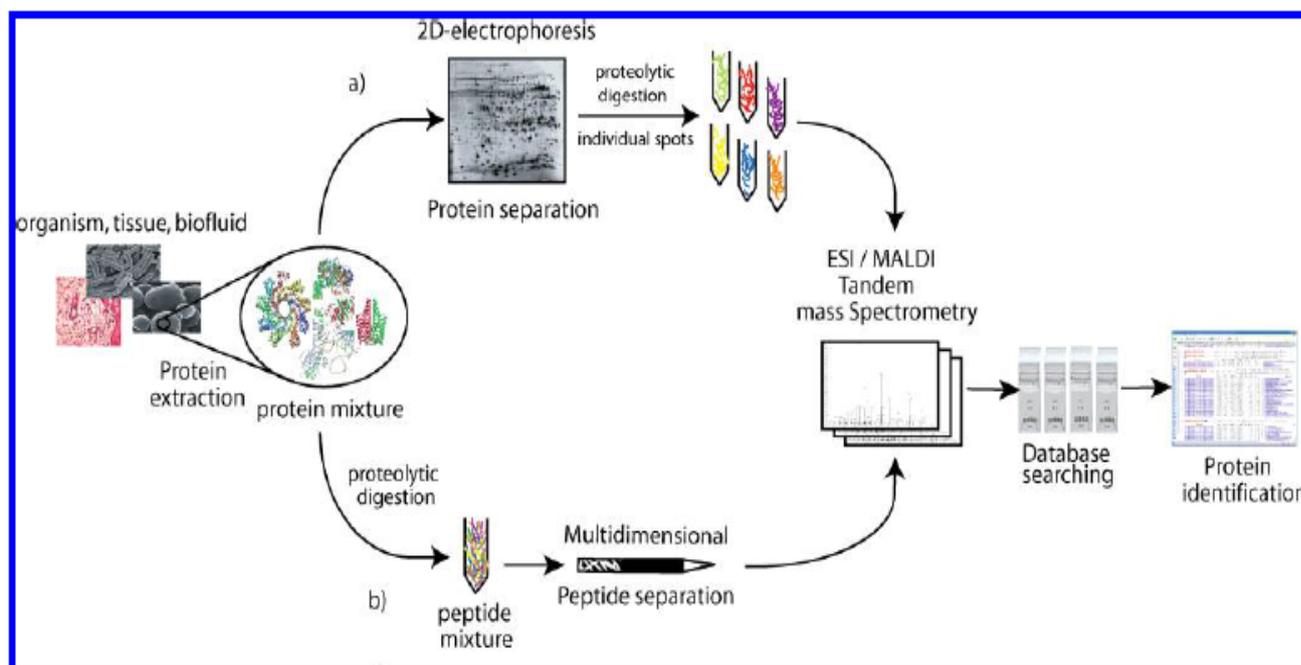


FIG 18: analisi proteomica tramite un approccio basato su gel (a) e gel free (b). Attraverso il primo approccio le proteine vengono separate tramite elettroforesi bidimensionale. Prima tramite isoelettrofocusing, successivamente tramite SDS-PAGE. Dopo la visualizzazione degli spot le proteine vengono estratte dal gel, digerite e analizzate tramite spettrometria di massa per la conseguente ricerca e identificazione nel database. Attraverso l'approccio off-gel il mix di proteine viene digerito direttamente in una miscela peptidica, la quale viene separata tramite metodi di separazione multidimensionali. I peptidi vengono successivamente analizzati tramite spettrometria di massa. Le proteine vengono identificate tramite database a partire dallo spettro di massa generato. (Fornier *et al.* 2007).

Biomarker nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)

Le due forme maggiori di malattie infiammatorie croniche intestinali sono il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. Insieme queste due malattie affliggono più di un milione di individui negli Stati Uniti (Loftus *et al.*, 2007).

Il morbo di Crohn è caratterizzato da regioni discontinue di infiammazione intestinale, che più frequentemente coinvolge la parte terminale dell'ileo e il colon, ma può interessare ogni parte del tratto gastrointestinale dalla bocca all'ano. Dolore addominale, perdita di peso, e vari gradi di diarrea sono i sintomi tipici di questa malattia. Il processo infiammatorio del morbo di Crohn in natura è transmurale e, come risultato, le potenziali complicazioni includono fibrosi intestinali, stenosi e formazioni di fistole.

Il processo infiammatorio della colite ulcerosa è limitato alla mucosa e alla sottomucosa del colon, con malattia quasi invariata che coinvolge il retto. Diarrea, ematochezia e tenesmo sono sintomi classici di questa malattia. Le manifestazioni extraintestinali delle IBD coinvolgono le articolazioni, gli occhi e /o la pelle, e affliggono il 25% di questi pazienti. Entrambe queste patologie vanno in remissione e presentano frequenti ricadute. L'attività persistente della malattia anche dopo terapia necessita in genere di un intervento chirurgico (Iskandar *et al.*, 2011).

La diagnosi sia del morbo di Crohn che della colite ulcerosa si basa sui sintomi clinici in combinazione con esami endoscopici, la radiologia e infine con la patologia.

Anche i biomarker sono comunemente usati nella pratica clinica, in combinazione con i test di routine. I ruoli che questi biomarker hanno nelle IBD sono: supporto nella diagnosi della malattia, discriminazione tra morbo di Crohn e colite ulcerosa, determinazione dell'attività della malattia, rischio di stratificazione dei i pazienti per la gravità del decorso della malattia, predizione della risposta alla terapia (Iskandar *et al.*, 2011) (**Fig 19**).

Esempi di marker sierologici della risposta in fase acuta,

- proteina c reattiva (proteina prodotta dal fegato in risposta a diverse condizioni presenti nella fase acuta e cronica dell'infiammazione) (Darlington *et al.*, 1986)
- Tasso di sedimentazione eritrocitaria ESR (tasso al quale le cellule rosse del sangue migrano attraverso il plasma nel periodo di un ora. L'ESR fornisce una rapida valutazione della fase acuta infiammatoria) (Mendoza *et al.*, 2009)

Marker sierologici anticorpali

- Anticorpi citoplasmatici anti-neutrofili (ANCA) e anticorpi anti *Saccaromices cervisiae* (ASCA) (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2007; McKenzie *et al.*, 1990)
- Anticorpi anti ompC (outer membrane porin), anti I₂ e anti Cbir1 (Barnich *et al.*, 2007; Lodes *et al.*, 2004; Sutton *et al.*, 2000)
- Anticorpi anti-glicani (ACCA, AMCA, ALCA, AΣMA) (Simondi *et al.*, 2008)

Marcatore sierologici autoanticorpali (Desai *et al.*, 2007)

- Anticorpi anti cellule del globet
- Anticorpi anti cellule esocrine del pancreas
- Anticorpi anti-UBE4A IgG
- Anticorpi anti-GP2
- Anticorpi anti-pANCA

Biomarker fecali

- Calprotectina fecale (Roseth *et al.*, 1992)
- Lactoferrina fecale (Baveye *et al.*, 1999)
- S100A12 fecale (Kaiser *et al.*, 2007)

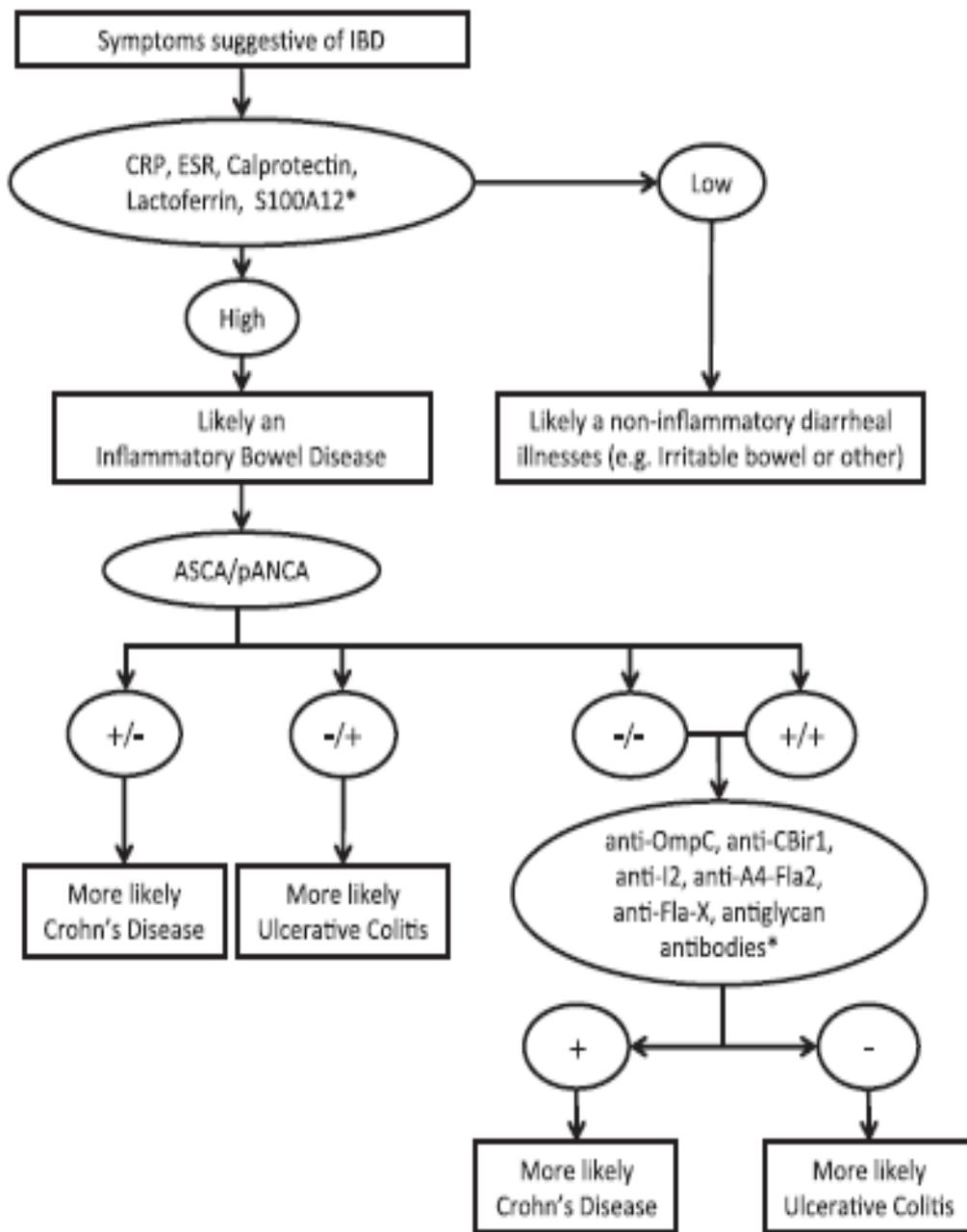


FIG 19: utilizzo di biomarker come adiuvanti nella valutazione clinica per la diagnosi di IBD (Iskandar *et al.*, 2011)

II. Scopo della Ricerca

L'esofagite da reflusso è una patologia piuttosto diffusa che tende a cronicizzare. Dal punto di vista clinico, a parità di sintomatologia ed a parità di insulti (dati di pH-metria) una esofagite ad uno stadio iniziale può evolvere con il tempo sia in una forma erosiva (ERD) che in una non erosiva (NERD). Queste due varianti dell'esofagite da reflusso presentano complicanze che dal punto di vista della casistica sono molto differenziate: mentre i pazienti con danno erosivo tendono con il tempo a sviluppare metaplasia e carcinoma, i pazienti NERD non mostrano affatto questa tendenza. Acquista quindi una grande importanza il poter suddividere i pazienti, anche in una fase iniziale della malattia, tra chi evolverà in ERD e chi in NERD, poichè i primi richiedono un follow-up più attento.

Il principale evento nella patogenesi delle GERD è il movimento dei succhi gastrici dallo stomaco all'esofago. E' stato dimostrato che l'esposizione agli agenti lesivi (acido, enzimi digestivi ed anche bile) è la stessa nei pazienti con GERD endoscopicamente negativi e nei pazienti con esofagite erosiva, questo lascia pensare che ci siano altri fattori che influenzano il grado di alterazioni macroscopiche e microscopiche a livello della mucosa esofagea esposta al reflussato.

I meccanismi di difesa della mucosa esofagea operano a tre livelli: barriera pre-epiteliale, epiteliale e post-epiteliale, quest'ultima rappresentata dalla lamina propria. Mentre per quanto riguarda i meccanismi di difesa pre-epiteliale, le conoscenze, ad oggi, sono piuttosto esaustive. Sui meccanismi di difesa epiteliali invece, si conosce ancora poco.

E' stato dimostrato che i pazienti con GERD hanno una capacità proliferativa epiteliale ridotta rispetto agli individui sani, ed in particolare l'attività proliferativa diminuisce del 50% nei pazienti con NERD e del 75% nei pazienti con ERD (Calabrese *et al.*, 2007). Dal momento che i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno non sono ancora conosciuti, sulla base di un articolo pubblicato nel 2005 (Wright *et al.*, 2005), che ipotizza il coinvolgimento del recettore CB1 nei processi di riparazione della mucosa intestinale si è voluto ricercare la presenza dei recettori per gli endocannabinoidi (CB1 in particolare) anche a livello della mucosa esofagea, quali possibili corresponsabili della diversa attività proliferativa dell'epitelio di pazienti NERD ed ERD, nel confronto con i controllo sani.

Una volta ottenuto questo dato, sia a livello di espressione proteica che a livello di espressione di RNA messaggero, si è pensato di utilizzare tecniche più potenti di proteomica per tracciare un quadro più esaustivo dell'espressione differenziale proteica nella mucosa esofagea di questi pazienti. Lo scopo era anche quello di ricercare dei possibili biomarcatori per la diagnosi precoce delle due diverse forme della malattia da reflusso, in modo da poterle discriminare sin dalle prime fasi della malattia, nella maniera meno invasiva possibile. Abbiamo così deciso di costruire dei pool pesati di proteine, partendo da biopsie conservate in azoto di pazienti ERD e pazienti NERD e

di sottoporre questi pool proteici ad una analisi di espressione differenziale con la tecnica definita shotgun, grazie alla collaborazione con il Prof. Andrea Urbani ed il suo staff dell'Università degli Studi di Roma Tor Vergata i quali hanno provveduto ad effettuare l'analisi. Ottenuti i risultati dell'analisi differenziale shotgun, abbiamo scelto nell'elenco delle 33 proteine differenzialmente espresse, le 7 che ci sembravano più interessanti, sia come possibili biomarcatori per una analisi precoce della evoluzione dell'esofagite da reflusso, sia per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'evoluzione della malattia verso la forma ERD o verso la forma NERD. Queste sette proteine sono state sottoposte a Western Blot ed analisi in immunostochimica, per avere un quadro che comprendesse sia i livelli di espressione di queste proteine nei singoli pazienti, sia la loro localizzazione subcellulare nella mucosa sana e patologica.

III. Materiali & Metodi

Studio di popolazione

Per il primo studio sono stati valutati 110 pazienti. I criteri di inclusione sono stati la presenza da almeno un anno sintomi riconducibili alla malattia da reflusso gastro-esofageo (pirosi e/o episodi di rigurgito), presenza di pH esofageo alterato durante 24 ore di monitoraggio e probabilità basata sull'associazione dei sintomi (SAP). I criteri di esclusione sono stati la presenza di tumori maligni nell'esofago o nello stomaco, presenza di esofago di Barrett, ulcere gastriche o duodenali, operazione chirurgiche all'esofago o allo stomaco, sintomi extraesofagei, assunzione di inibitori di pompa protonica o farmaci procinetici rispettivamente 30 e 15 giorni prima dell'arruolamento. Dei 110 pazienti, 77 (età media 45+/- 13.4 anni, range 21-80, 35 uomini) sono risultati idonei per partecipare allo studio (**Fig.3.1**). Questi pazienti sono stati sottoposti ad endoscopia durante la quale sono stati effettuati prelievi bioptici per la valutazione istologica della patologia. Dei 77 pazienti 39 presentavano la mucosa apparentemente illesa (NERD), mentre 38 avevano esofagite erosiva (ERD) (tab.3.1) Questa popolazione è stata comparata con 10 volontari sani (età media 38.2+/-17,6 anni, range 25-63, 6 uomini)(**Tab 3.1**). I volontari sani non presentavano i tipici sintomi né le tipiche manifestazioni della GERD, non presentavano lesioni visibili alla mucosa né alterazioni di esposizione agli acidi. (la media del reflusso acido totale è 1,1%+/-0,4%) Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato approvato dal comitato etico locale.

Per il secondo studio stati arruolati 56 pazienti (24 ERD, 22 NERD e 10 volontari sani), i pazienti sono stati sottoposti a endoscopia del tratto GI superiore dopo sedazione con midazolam (2.5mg), per verificare la presenza o l'assenza di esofagite erosiva. La classificazione di Los Angeles è stata utilizzata per classificare il grado di esofagite. Per ogni soggetto sono state prese 8 biopsie 5 cm sopra la giunzione squamo-colonnare (SCJ) da mucosa esofagea macroscopicamente intatta (non-erosa) (**Fig 3.2**). Le biopsie sono state prese solo nella mucosa apparentemente normale. In questo modo abbiamo studiato il comportamento della mucosa esposta all'insulto acido cronico, ma lontano dalle erosioni, e specialmente dagli eventi riparativi che subentrano in risposta alla mancanza della mucosa superficiale.

Le biopsie sono state prelevate dall'esofago solo 5 cm al di sopra della linea Z e non in parti eccessivamente distali dell'esofago. Infatti cambiamenti istologici quali iperplasia delle cellule basali e l'aumento della lunghezza papillare, si verificano in grado minore nel reflusso fisiologico: questo fenomeno potrebbe limitare l'applicabilità delle biopsie vicino alla linea Z, determinando una diminuzione della sensibilità della valutazione.

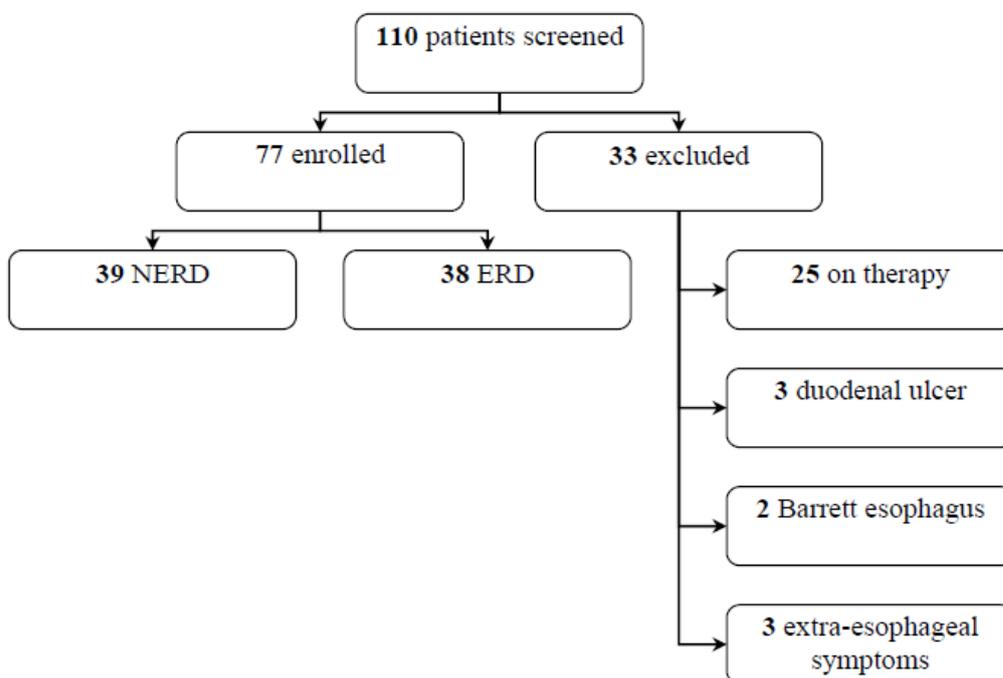


FIG 3.1: Disegno sperimentale del primo studio

	Normal	NERD	ERD
No. of subjects	10	39	38
Gender (m/f)	6/4	17/22	18/20
Mean age \pm s.d. (range)	38.2 \pm 17.6 (25-63)	48.4 \pm 14.6 (22-80)	42.1 \pm 12.3 (21-70)
Endoscopy			
Normal	10	39	0
A	0	0	0
B	0	0	28
C	0	0	9
D	0	0	1
Histology			
Normal	10	38	30
Mild	0	1	8
Moderate	0	0	0
Severe	0	0	0
24-h pH monitoring			
Mean % of acid exposure time (\pm s.d.)	0.9 (\pm 0.5)	10.1 (\pm 1.2)	10.6 (\pm 1.2)
Mean number of acid reflux events (\pm s.d.)	9 (\pm 3)	128 (\pm 21)	127 (\pm 22)

TAB 3.1: Dati demografici, endoscopici, istologici e monitoraggio del pH esofageo per 24 ore dello studio di popolazione (Calabrese *et al.* 2010)

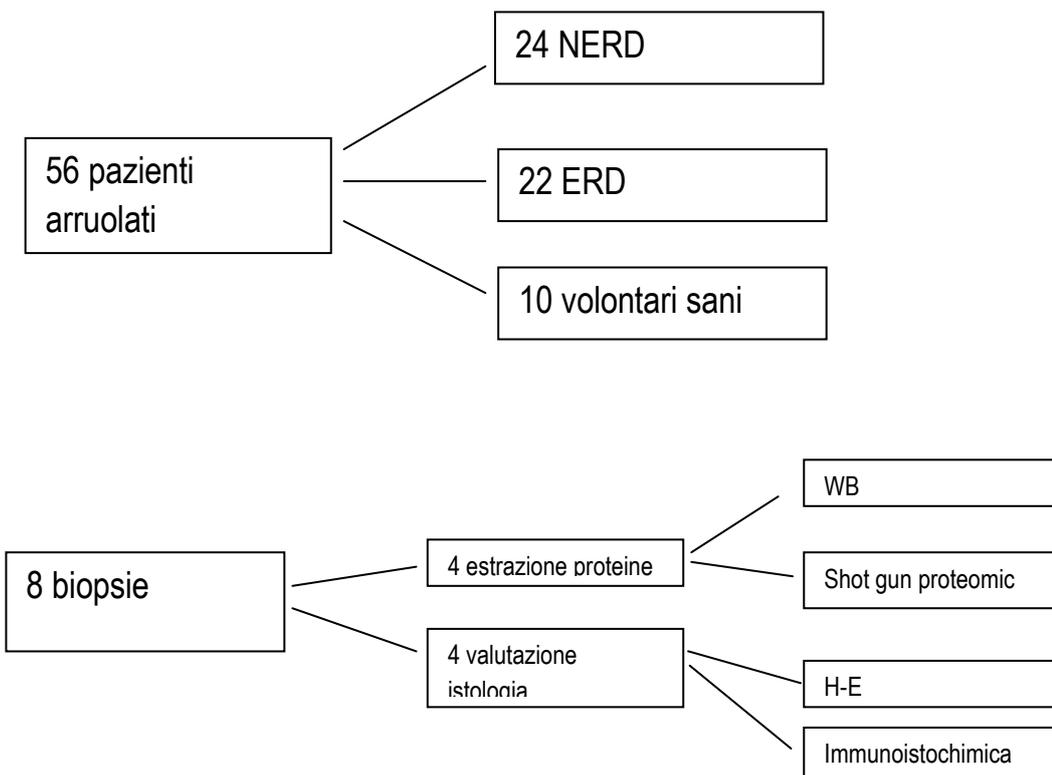


FIG 3.2 : disegno sperimentale del secondo studio

Monitoraggio del pH per 24 ore

Tutti i pazienti sono stati sottoposti per 24 ore al monitoraggio del pH in accordo con il protocollo precedentemente descritto (Calabrese et al., 2007). Durante il test la composizione e l'orario dei pasti sono stati standardizzati. I parametri di reflusso sono stati valutati in accordo con la metodica descritta da Jihansson e DeMestee (Bibliografia!).

E' stata tenuta in considerazione solo la percentuale di tempo in cui il pH era <di 4.0. Il pH è stato considerato anomalo solo se presente per più del 5% delle 24 ore. Il SAP è stato calcolato in accordo con Weusten et al. (anno xxx), ed è stato considerato positivo solo con percentuale maggiore del 95%.

Prelievi biotici

I pazienti sono stati sottoposti a gastroscopia con videogastroscoPIO Olympus GIF 140, dopo sedazione con midazolam (i.v.; 2,5 mg) per valutare il grado di esofagite, in accordo con la classificazione di Los Angeles (Armstrong et al., 1996). In ogni soggetto sono stati effettuati 8 prelievi biotici con pinza standardizzata (Olympus FB 24K). Da ognuno dei quattro quadranti è stato effettuato un prelievo doppio, 5 cm sopra la giunzione squamo-colonnare (SCJ), da mucosa macroscopicamente intatta. La SCJ (o linea Z) è stata definita come il bordo tra le ghiandole gastriche e l'epitelio esofageo.

Degli 8 prelievi effettuati, 5 sono state orientate in supporto di cellulosa acetata (Endofilters Biotica, Milan, Italy), fissate in formalina al 4% ed infine incluse in paraffina per l'esame istologico e per la valutazione in immunohistochimica; 3 biopsie sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C per l'estrazione delle proteine e dell'RNA .

Valutazione di MIB-1

L'espressione di MIB 1 è stata valutata utilizzando un anticorpo anti-Ki-67 (MoAbs) (clone MIB- 1; BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA). I tessuti sono stati sottoposti a smascheramento antigenico con buffer di sodio citrato 10 mM (pH 6.0) per 20 minuti. La reazione è stata sviluppata in 3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride e le sezioni sono state inseguite colorate con ematossilina. La valutazione quantitativa di MIB1 è stata effettuata su campi contigui utilizzando un

Pentium III OC dotato di 3 CCD (charged couple device) efotocamera (KY F55B, JVC, Pinebrook NJ, USA) connessa ad un microscopio ottico (Leitz DIAPLAN).

Per ogni caso è stata effettuata la valutazione dell'intera sezione longitudinale del tessuto al di sopra delle papille connettivali, per circa 100 µm dallo strato basale. L'indice di positività (MIB1-LI) è stato calcolato dal rapporto tra numero di cellule positive e numero di cellule totali, ed espresso in percentuali.

Estrazione delle proteine dalle biopsie, dosaggio proteico e Western Blot

Le biopsie precedentemente congelate a -80°C sono state risospese in 300 µl di buffer di lisi, e successivamente omogenate tramite "turrax" e sonificatore.

Al surnatante ottenuto è stata aggiunta una mix di acetone-metanolo (12:1) pari a 3,5 volumi del campione, per consentire la precipitazione delle proteine.

Il pellet così formatosi è stato risospeso in un buffer REBII, contenente urea e tiourea, e successivamente sottoposto a dosaggio proteico in modo da definire la quantità di proteine contenuta in ogni singolo campione.

Ciascun campione è stato dosato in triplicato. Sono stati preparati tre campioni aggiuntivi da utilizzare come "bianco", contenenti 999 Quick Start Bradford Dye Reagent, più 1 µl di Lisi Buffer. A 1 µl di ciascun campione da dosare sono stati aggiunti 999 µl di Quick Start Bradford Dye Reagent. La lettura della densità ottica, rapportata al contenuto proteico attraverso una curva di taratura in 10 punti, è stata ottenuta utilizzando uno spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 595 nm.

Agli estratti proteici ottenuti dalle biopsie è stato aggiunto SDS-PAGE Sample Buffer 4X. I campioni sono poi stati fatti bollire per 5 minuti in acqua bollente.

I campioni biotici utilizzati per l'analisi d'espressione dei recettori CB1 e CB2 sono stati caricati su un gel di poliacrilamide al 12% con 10 pozzetti. La quantità di proteine totali caricata è stata di 60 µg. Invece, per i campioni utilizzati per l'analisi dei livelli di espressione delle proteine identificate tramite shotgun, è stato utilizzato un gel precasted (BioRad) al 12% di poliacrilamide, con 18 pozzetti. La quantità di proteine totali caricate è stata di 80 µg.

Le proteine separate sul gel sono poi state trasferite su Amersham Hybond-LFD PVDF Transfer membrane (GE Healthcare), e incubate con i seguenti anticorpi primari:

- ✓ Anticorpo Anti-CB1 (Sigma-Aldich), rabbit, policlonale
- ✓ Anticorpo Anti-CB2 (Caymann), rabbit, policlonale
- ✓ Anticorpo anti-Actina (Sigma, USA), rabbit, policlonale
- ✓ Anticorpo anti-Annessina A1 (Abcam, England), rabbit, policlonale
- ✓ Anticorpo anti-FABP5 (Abcam, England), rabbit policlonale
- ✓ Anticorpo anti-14-3-3 tau (Cell Signaling), rabbit, policlonale
- ✓ Anticorpo Anti-Hsp90 (Cell Signaling), rabbit, policlonale
- ✓ Anticorpo Anti-VCP (Cell Signaling), rabbit, monoclonale
- ✓ Anticorpo Anti-S100A11 (Abcam, England), mouse, monoclonale
- ✓ Anticorpo Calmodulina (Cell Signaling), rabbit, monoclonale
- ✓ Anticorpo GAPDH (Abcam), mouse, policlonale
- ✓ Anticorpo anti AGP1 (Cell Signaling), rabbit, policlonale

Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati:

- ✓ Anticorpo Anti-Rabbit –FLUO CY5 (Amersham, USA)
- ✓ Anticorpo Anti-Mouse-FLUO CY3 (Amersham, USA)

La Rilevazione immunologica dell'anticorpo secondario fluorescente è stata effettuata tramite scanner Pharos Fx Molecular Imager (Bio-Rad) low intensity con filtri settati per l'acquisizione della fluorescenza dei fluorocromi Cy5 o Cy3.

Preparazione dei pool proteici

Sono stati ottenuti 3 pool pesati da ogni popolazione (Sano, ERD e NERD).

Ciascun pool è stato preparato unendo 50 ug di proteine totali per ciascuna biopsia, utilizzando un totale di 24 biopsie differenti per pazienti NERD, 22 per ERD e 10 per i controlli sani.

I pool ERD e NERD sono stati utilizzati per l'analisi Shotgun e per il Western Blot, mentre il pool Sano è stato utilizzato esclusivamente per la rilevazione immunologica (Western Blot ed immunoistochimica).

Immunohistochimica

Le biopsie sono state fissate in formalina al 4% ed incluse in paraffina. Sezioni di tessuto di 3 μm ottenute con microtomo (Marca e modello!!!) sono state montate su vetro portaoggetto, deparaffinate con xilene e reidratate attraverso una scala decrescente di alcool. Le fettine sono state bloccate con Albumina di siero bovino (BSA) al 5 % in buffer fosfato (PBS) per 1 h e successivamente incubate overnight a 4°C con gli anticorpi:

- ✓ Anti CB1 (Cayman Chemicals, USA) diluito 1:500 in PBS.
- ✓ Anti GAPDH monoclonale mouse (Abcam)
- ✓ Anti Annessina A1 policlonale rabbit (Abcam)
- ✓ Anti AGP1 monoclonale topo (Abcam)
- ✓ Anti VCP monoclonale topo (Cell Signaling)

Il controllo negativo è stato effettuato bloccando l'anticorpo con blocking peptide come suggerito dalla ditta produttrice (Cayman Chemicals, USA). Le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario anti-rabbit a temperatura ambiente per 30 minuti con 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO) per 4 minuti. Le sezioni sono state colorate in ematossilina.

Estrazione del RNA dalle biopsie e Real-Time PCR

L'RNA totale dalle biopsie è stato estratto utilizzando il reagente Eurozol (CELBIO, Italy) in accordo con le istruzioni della ditta produttrice. L'RNA estratto da ogni campione è stato quantificato e trattato con DNasi I per rimuovere ogni contaminazione di DNA genomico. Utilizzando il DNA-free kit (Ambion, USA). La retro trascrizione è stata effettuata utilizzando il RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, Canada). I livelli di mRNA sono stati analizzati attraverso real-time PCR utilizzando il SYBR supermix kit ed il Bio-Rad iCyclersystem (Bio-Rad, USA) in accordo con le istruzioni della ditta produttrice. Per il controllo positivo sono stati utilizzati campioni di mucosa di colon. Ogni campione di DNA è stato analizzato in triplicato ed i livelli di mRNA di CB1 sono stati normalizzati sul messaggero della β -glucuronidasi (GUSB). L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando la formula $2^{-2\Delta\text{Ct}}$ values ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene} - \text{Ct}$

hk).

I primers utilizzati per il CB1 sono:

5'- TATGCTCTGCCTGCTGAAC-3' (Forward)

5'-TGACCGTGCTCTTGATGC-3' (Reverse)

i primer utilizzati per GUSB sono:

5'-TGGTATAAGAAGTATCAGAAGCC-3' (Forward)

5'-GTATCTCTCTCGCAAAGGAAC-3' (reverse)

I primers utilizzati per il CB2 sono:

5' – TTGGCAGCGTGACTATGAC – 3' (Forward)

5' – GAGGAAGGCGATGAACAGG – 3' (Reverse)

Shot-gun Proteomic

Questa tecnica è stata effettuata dallo staff del prof. Andrea Urbani, presso l'Università degli Studi di Tor Vergata, unità di Proteomica.

I pool proteici sono stati fatti precipitare con 50% etanolo, 25% metanolo e 25% acetone e successivamente sciolti in 6 M urea, 100 mM Tris pH 7.9. Dopo riduzione con DTT e alchilazione con 20mM iodoacetamide, i campioni proteici sono stati digeriti 100:1 (w/w) con diverse concentrazioni sequenziali di tripsina (Promega, Madison, WI, USA) overnight a 37°C. La reazione è stata fermata aggiungendo un acido trifluoroacetico con una concentrazione finale allo 0.1%.

I campioni sono stati diluiti con 0.1% di acido formico 3% di acetonitrile alla concentrazione di 0.375 µg/1L, e 0.75 µg di proteina digerita sono stati caricati su una colonna per la separazione di peptidi. Precedentemente al caricamento sono stati aggiunti ai campioni 100fmol/1L di digerito di Enolase *Saccharomyces cerevisiae* (Waters, Milford, MA, USA,), come standard interno. I peptidi sono stati intrappolati in una colonna C18 (Waters) e separati usando un gradiente di reversed phase per la durata di 190 min a 250 nL/min (dal 3 al 40% acetonitrile).

I peptidi così separati sono stati analizzati con uno spettrometro di massa a tempo-di-volo collegato ad un Q-ToF Premier, (Waters Corp.), spettrometro in grado di fornire acquisizioni in modalità MS ed MS/MS, utilizzando basse (4eV) ed alte (15-40eV) energie di collisione nella cella ionizzante. I dati ottenuti dalla spettrometria di massa, in tre serie di acquisizioni indipendenti per ciascun campione sono stati processati per le analisi qualitative e quantitative usando il software Protein-Lynx Global Server v.2.3 (PLGS, Waters). L'identificazione delle proteine è stata ottenuta con

l'algoritmo Mascott con la ricerca indirizzata ai database UniProt KB/ Swiss-Prot con restrizione tassonomica all'*Homo sapiens*, al quale sono stati aggiunti i dati ottenuti dall'enolasi di *Saccharomyces cerevisiae*.

Ingenuity Pathway Analysis

(IPA, Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>)

Ingenuity Pathway Analysis usa Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB), un robusto database che contiene informazioni su più di 20.000 geni e proteine dei mammiferi, 1,4 milioni di interazioni biologiche e un centinaio di pathway canonici che incorporano più di 6000 concezioni di geni discreti. Questi geni, chiamati “focus genes”, sono stati sovrapposti all'interno di network molecolari globali sviluppati da informazioni contenute nel IPKB. Il dataset sperimentale di prodotti genici di NERD vs ERD è stato usato per interrogare IPA (versione 8.7) applicando questo set di analisi: Reference set: Ingenuity Knowledge Base (Genes Only); Relationship da includere: dirette and indirette; includere prodotti chimici endogeni; Filter Summary: Considerare tutte le molecole e/o le relazioni.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate partendo dall'ipotesi che ERD e NERD siano due variabili indipendenti. Le analisi quantitative sono state svolte usando il software Expression Analysis (PGLS v. 2.3, Waters Corp). Lo score di Mascott è stato utilizzato per definire la probabilità di errore di ogni singola identificazione. Tutte le proteine identificate con score inferiori a 45 sono state escluse dalle analisi.

Le misurazioni ottenute dalle analisi in Western Blot sono state usate per calcolare i livelli di proteina sia per ogni paziente che a livello di pool. Le bande ottenute sono state normalizzate e quantificate utilizzando il software Quantity one (BioRad) Il test di Student è stato applicato per le comparazioni tra i livelli di espressioni delle proteine. Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per comparare i dati ottenuti dalla quantificazione dei WB, in ogni gruppo di pazienti. I dati sono stati analizzati usando il software SPSS (SPSS10, Chicago, IL, USA). Valori di $P < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

BUFFER PER SDS-PAGE

Lisi Buffer: (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 ed inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics, Germania).

REBII: (UREA 8M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, Tris HCl 20mM)SDS-PAGE Sample Buffer 4X: Tris-HCl (Sigma, USA) 1M (Ph 6,8), SDS (ICN, USA), Glicerolo (Carlo Erba, Italia), 2-mercaptoetanololo (Merk, Germany , acqua bi-distillata fino a volume.

Running buffer 1X per la corsa elettroforetica del gel al 12% di acrilamide da 10 pozzetti da soluzione madre 5X: Tris -base (Sigma, USA), SDS (ICN, USA) Glicina (Sigma, USA), acqua bi-distillata fino a volulme.

Running Buffer 1X per la corsa elettroforetica del gel precasted al 12% di acrilamide da 18 pozzetti: 20% Buffer MOPS (BioRad), 80% acqua bidistillata

Parametri di corsa del gel al 12% di acrilamide da 10 pozzetti: 15 mA per ogni gel di spessore 0.75 mm, 7 W e 100 V massimi

Parametri della corsa elettroforetica del gel precasted: corrente 40 mA (costante) e potenza 7 watt (per gel) e 250 volt massimi.

TBS-Tween 1X e BSA 5% per la diluizione degli anticorpi (da soluzione madre TBS 10 X): Tris-HCl 24.2g, NaCl 80g, H₂O bi distillata fino a volume 1L, Tween-20 0.1%)

REAL-TIME PCR

Parametri RT-PCR

HOLD	20 min	15°C
HOLD	10 min	25°C
HOLD	40 min	42°C
HOLD	10 min	75°C

Parametri Thermal Cycling

HOLD		
Attivazione Taq	95°C	2 min
5+35 cicli		
Denaturazione	95°C	30 sec
Anealing	51°C	20 sec
Estensione	72°C	30 sec

Parametri curva di melting

Hold	48°C	60 sec
104 cicli	+0,5°C/ciclo	10sec/ciclo
Hold	25°C	∞

Risultati

IMMUNOISTOCHEMICA DEL RECETTORE CB1

L'immunoistochimica effettuata con anticorpo anti-CB1 mostra la presenza di questo recettore nella mucosa esofagea sia di pazienti GERD che di pazienti sani. Una debole positività è stata osservata nelle cellule squamose mature (**Fig. 4.1 A** freccia nera) e nelle papille connettivali (**Fig.4.1 B** frecce rosse) della mucosa dei pazienti sani. Nei pazienti con esofagite non erosiva è si evidenzia una forte colorazione a livello delle cellule squamose mature (**Fig. 4.1 B**, freccia nera), nelle cellule squamose (**Fig. 4.1 B** freccia blu) ed a livello delle papille connettivali (**Fig. 4.1 B** freccia rossa). Nei pazienti con malattia da reflusso erosiva è stata trovata positività nelle cellule squamose mature (**Fig. 4.1 C** freccia nera) e nelle cellule squamose (**Fig. 4.1 C** frecce blu), mentre le papille connettivali sembrano essere negative.

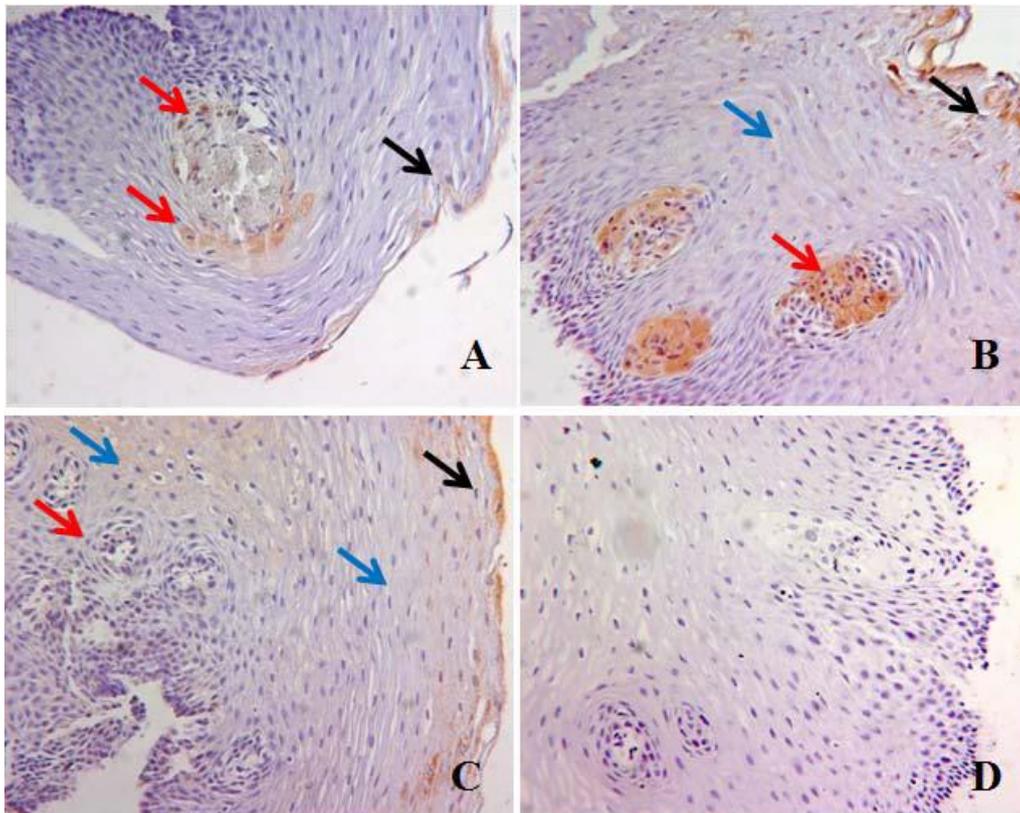


Figura 4.1: Immunoistochimica del recettore CB1 in sezioni di mucosa esofagea. I soggetti sani(A) mostrano una debole positività localizzata nelle cellule squamose mature (freccia nera) e in corrispondenza delle papille connettivali (freccia rossa). I pazienti NERD (B) Mostrano espressione del CB1 a livello delle cellule squamose mature, (freccia nera), nelle cellule squamose (freccia blu) ed a livello delle papille connettivali (freccia rossa). I pazienti ERD (C) Mostrano positività al CB1 solo a livello delle cellule squamose mature (freccia nera) e nelle cellule squamose (frecce blu), mentre le papille connettivali appaiono negative (freccia rossa). Controllo negativo effettuato con blocking peptide (D)

QUANTIFICAZIONE DI MIB-1

Le cellule proliferanti sono state localizzate nei tre gruppi studiati principalmente nella zona basale nei tre gruppi, non sono state individuate differenze nella distribuzione a livello della mucosa. L'indice di positività (MIB-LI) di MIB 1 è variato in un range dal 12 al 78% tra tutti i soggetti, con un valore medio di 31,6 % ($\pm 15,8$) ed un valore mediano di 25,6%. I valori MIBLI nei volontari sani era 67,8% ($\pm 9,87$) mentre nei pazienti con MRGE era del 27% ($\pm 9,1$) Nei pazienti NERD ed ERD la media di MIB1-LI era rispettivamente del 31,3% ($\pm 8,7$) e 22,6% ($\pm 7,3\%$), con una differenza significativa tra i due gruppi ($p < 0,001$) (**Fig 4.2**).

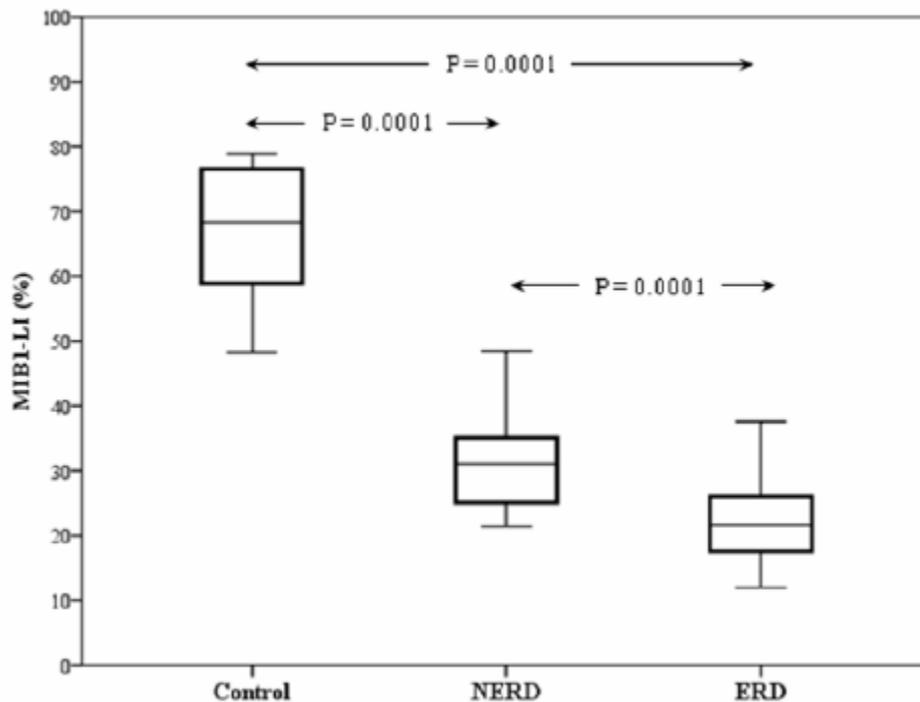


Fig 4.2: Box plots del MIB-1 label index (LI), mediana (linea nel box), e range interquartile line superiori ed inferiori) nella mucosa esofagea di pazienti sani, NERD ed ERD

REAL- TIME PCR SUL MESSAGGERO DEL RECETTORE CB1

Nei pazienti con malattia erosiva (ERD) l'espressione relativa dell' mRNA di CB1 è fortemente diminuita rispetto ai pazienti con malattia non erosiva (NERD), in particolare l'espressione relativa nei NERD è tre volte superiore rispetto agli ERD, con una elevata variabilità tra i soggetti. Nei pazienti sani l'espressione relativa del messaggero di CB1 è significativamente differente rispetto ai NERD. L'espressione relativa di CB1 mRNA/GUSB mRNA varia da 0.5 tra 0.968 in tutti i pazienti, con un valore medio (\pm la deviazione standard) di 0.32 (\pm 0.28). La media di CB1 mRNA/GUSB mRNA nei soggetti volontari sani 38 è di 0.66 (\pm 0.28) mentre nei pazienti con GERD è 0.28 (\pm 0.24). Nei pazienti NERD e ERD la media dei valori di CB1/GUSB è 0.38 (\pm 0.3) e 0.17 (\pm 0.09), rispettivamente, con differenze significative tra il gruppo NERD ed il gruppo ERD ($p < 0.001$) (**Fig. 4.2**).

Esperimenti di Real-Time PCR per valutare la presenza del messaggero del recettore CB2 sugli stessi campioni hanno dato risultati negativi.

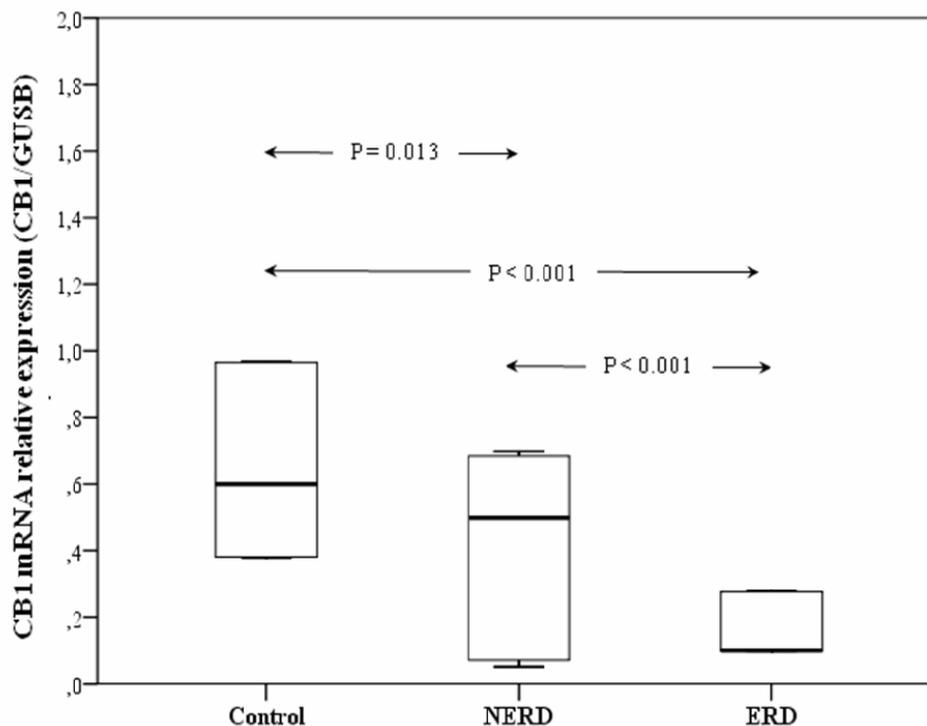


Figura 4.2: Box plots dell'espressione relativa CB1 (normalizzato contro l'espressione del mRNA di GUSB), mediana (linea più spessa nel box), e il range interquartile (linee più alte e più basse nel box) nella mucosa esofagea di controlli sani, pazienti NERD ed ERD .

WESTERN BLOT: ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI REATTORI CB1 E CB2 NEI CAMPIONI ERD NERD E SANO

L'analisi semi-quantitativa dell'espressione proteica del recettore CB1, effettuata tramite analisi Western Blot, mostra una differenza di espressione di tale recettore tra la mucosa di pazienti erosivi e quella dei non erosivi. In particolare i pazienti NERD mostrano un'espressione maggiore di CB1 rispetto agli ERD. (Fig. 4.3 A). L'espressione relativa CB1/ β -actina varia da 59 a 125 tra tutti i soggetti, con valori medi di 84,7 (\pm 18,8) ed un valore mediano di 82,7. La media dei valori dell'espressione relativa di CB1/ β -actina nei controlli sani è 68,9% (\pm 5,9), mentre nei pazienti NERD ed ERD la media di CB1/ β -actina è rispettivamente 99,9 (\pm 15,8) e 73,3 (\pm 10,5), con una differenza significativa tra i NERD rispetto ai controlli ed i pazienti ERD ($p < 0.001$) (Fig. 4.3 B). La proteina CB2 non è stata individuata nelle biopsie dei pazienti GERD e nei controlli sani (Fig 4.3 C)

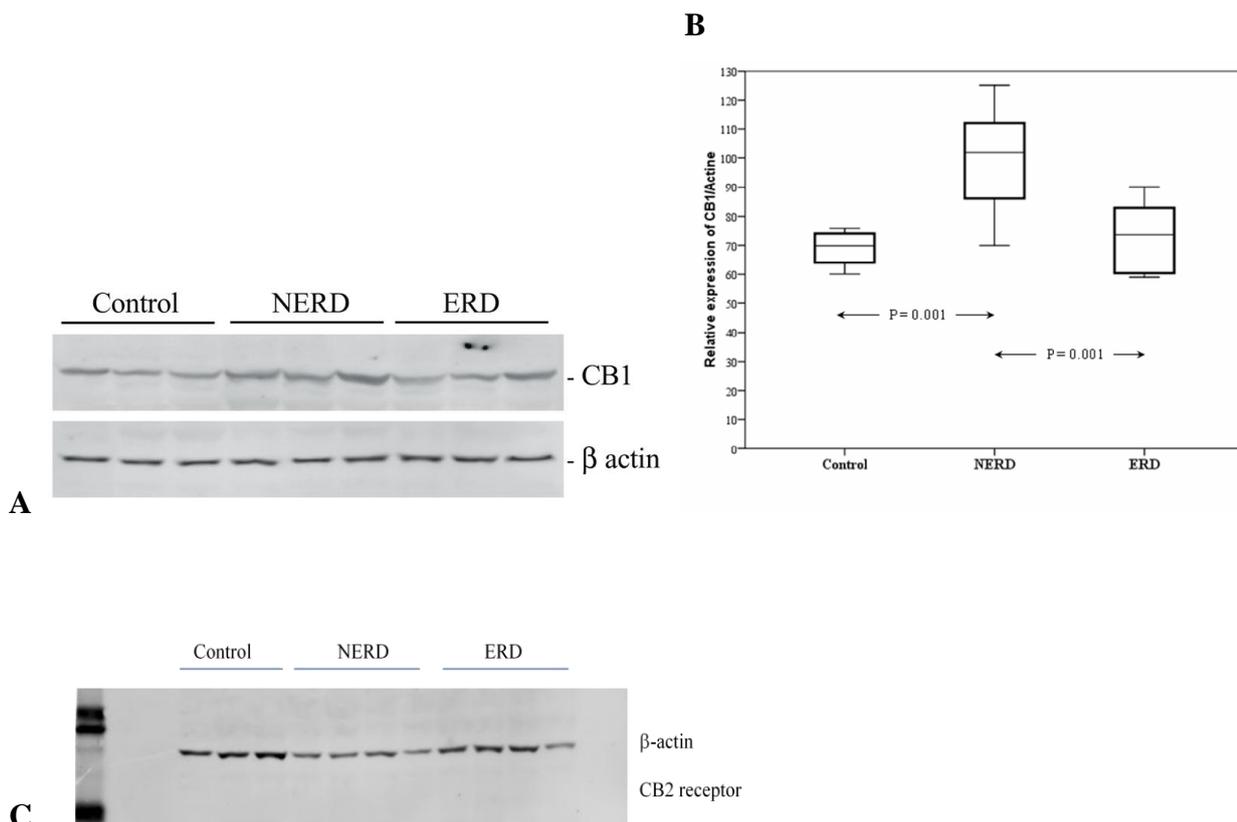


Figura 4.5: A: Analisi WB dell'espressione del recettore CB1 nella mucosa esofagea di controlli sani, pazienti NERD ed ERD. La figura è rappresentativa di almeno 3 esperimenti B :Box plots dell'espressione del recettore di CB1 (normalizzata contro l'espressione della β -actina), mediana (linea più spessa nel box), range interquartile (linee superiore ed inferiore nel bonx) nella mucosa esofagea di controlli sani, pazienti NERD ed ERD C: Analisi WB dell'espressione del recettore CB2 nella mucosa esofagea sana, NERD ed ERD.

ANALISI TRAMITE SHOTGUN DI POOL PROTEICI: NERD vs ERD

L'analisi tramite tecnica "shotgun proteomics" delle proteine espresse all'interno dei pool proteici provenienti da pazienti NERD e ERD (Figura 4.6) ha analizzato 143.252 frammenti triptici. L'analisi in spettrometria di massa di quelli differenzialmente espressi ha permesso l'identificazione di 33 proteine espresse preferenzialmente o nelle biopsie provenienti da pazienti ERD, o in quelle provenienti dai pazienti NERD. Di queste 33 proteine, 9 sono state ritenute particolarmente interessanti, in quanto coinvolte nella proliferazione cellulare, nel processo di cheratinizzazione oppure nella risposta allo stress (tabella 4.1). Per queste 6 proteine quindi si è proceduto alla validazione dei risultati ottenuto con lo shotgun tramite western blot.

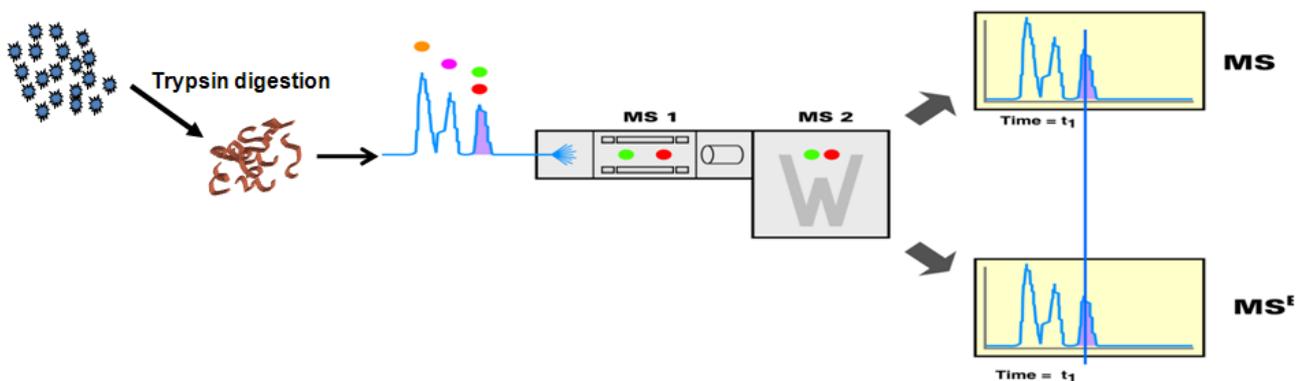


FIG 4.6: schema a blocchi dell'analisi shotgun

Table 1 Significant differentially regulated proteins in NERD and ERD samples identified using label-free LC-MS^E						
Accession*	Description (Protein name)	PLGS Score†	Highly represented‡	NERD:ERD ratio§	NERD:ERD Log(e)Ratio	NERD:ERD Log(e)StdDev
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	670.48	NERD			
Q7Z3Z0	Keratin, type I cytoskeletal 25	621.92	NERD			
P62158	Calmodulin	438.49	NERD			
P62805	Histone H4	190.5	NERD			
Q7Z3Y7	Keratin, type I cytoskeletal 28	403.79		1.92	0.65	0.25
P02042	Haemoglobin subunit delta	677.18		1.86	0.62	0.09
P01860	Ig gamma-3 chain C region	430.6		1.84	0.61	0.24
P31949	Protein S100-A11	521.67		1.79	0.58	0.36
P01861	Ig gamma-4 chain C region	416.48		1.75	0.56	0.18
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	435.93		1.72	0.54	0.23
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	730.12		1.68	0.52	0.13
P01857	Ig gamma-1 chain C region	559.96		1.68	0.52	0.19
A8MUU1	Putative fatty acid-binding protein 5-like protein 3	535.49		1.65	0.5	0.42
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	735.14		1.62	0.48	0.2
P27348	14-3-3 protein theta	332.59		1.58	0.46	0.41
O60437	Periplakin	1660.25		1.57	0.45	0.15
P06454	Prothymosin alpha	344.89		1.57	0.45	0.42
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	1037.7		1.54	0.43	0.17
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	226.32		1.48	0.39	0.35
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	709.92		1.45	0.37	0.17
P02647	Apolipoprotein A-I	381.22		1.43	0.36	0.24
P31947	14-3-3 protein sigma	1102.38		1.42	0.35	0.18
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	633.17		1.4	0.34	0.26
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	536.89		1.4	0.34	0.19
P23528	Cofilin-1	517.67		1.38	0.32	0.33
P01040	Cystatin-A	323.36		1.38	0.32	0.14
P04083	Annexin A1	2738.2		1.36	0.31	0.08
Q9UBC9	Small proline-rich protein 3	723.48		1.36	0.31	0.14
Q14568	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2	317.02	ERD			
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	321.96	ERD			
P02679	Fibrinogen gamma chain	439.65	ERD			
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	644.85	ERD			
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	705.32	ERD			

* Unique protein sequence identifier according to UniProtKB/Swiss-Prot Protein Knowledgebase, release 2010_08 of 13-July-10.

† ProteinLynx Global Server score.

‡ Protein found highly represented in NERD or in ERD samples.

§ Ratio of expression between NERD and ERD.

TAB 4.1: elenco delle 33 proteine differenzialmente espresse in ERDvsNERD, rilevate tramite tecnica shotgun proteomics.

ANALISI DEI PATHWAY MOLECOLARI DELLE PROTEINE RILEVATE TRAMITE SHOTGUN PROTEOMICS

Per cercare di capire il ruolo di queste proteine all'interno dei pathway cellulari, è stato utilizzato un dataset sperimentale di prodotti genici appartenenti a NERD ed ERD, per interrogare IPA (Ingenuity Pathway Analysis).

Il risultato è stato l'individuazione di una over-rappresentazione di proteine coinvolte nella morte, nell'assemblaggio, nell'organizzazione e nello sviluppo cellulare (**Fig.4.6**). In più l'analisi del singolo network, originato dalla fusione di tutti i network identificati, ha mostrato delle connessioni interessanti tra tutte le proteine rilevate (**Fig. 4.7**).

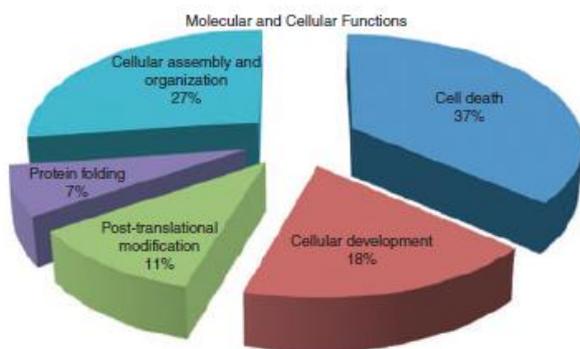


FIG 4.6: Ingenuity Pathway Analysis: analisi molecolare e cellulare

Network Analysis, IPA: Merge

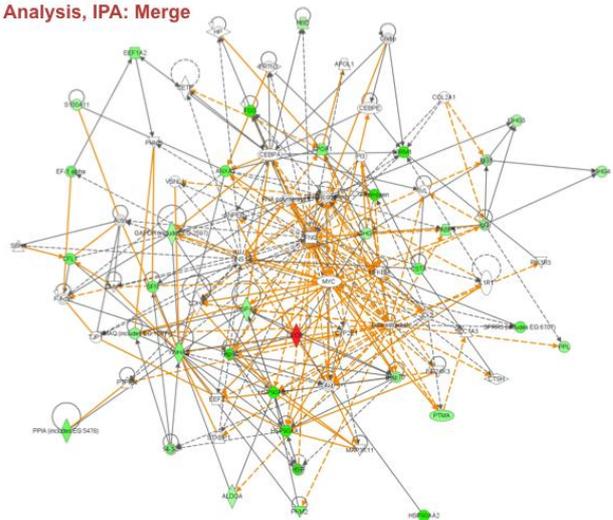


FIG 4.7: Rappresentazione grafica IPA delle interazioni molecolari tra le proteine differenzialmente espresse nei campioni ERD e NERD

***ANALISI TRAMITE WESTERN BOLOT ED
IMMUNOISTOCHEMICA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE
DELLE PROTEINE: TER ATPASE, ANXA1, CALM
1/2/3, GAPDH, AGP FABP5, 14-3-3 IN BIOPSIE DI PAZIENTI
ERD E NERD, COMPARATA CON I CONTROLLI SANI.***

Tra le 33 proteine differenzialmente espresse in ERD e NERD, è stato scelto un subset di 9 proteine per la conferma in Western Blot dei dati ottenuti tramite lo shotgun proteomics, e di 4 proteine per l'analisi in immunohistochemical della loro localizzazione subcellulare.

Le proteine per l'analisi proteica tramite WB sono state scelte in base al loro coinvolgimento nel mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale nella mucosa GERD: TER-ATPase, Calmodulina, e 14-3-3 τ sono probabilmente coinvolte nella proliferazione cellulare, un fattore che presenta notevoli differenze tra la mucosa sana e la mucosa GERD; FABP5 risulta coinvolto nella cheratinizzazione epiteliale, un altro fattore che sembra partecipare al mantenimento dell'integrità della mucosa esofagea; GAPDH svolge un ruolo nel pathway del metabolismo glucidico, quest'ultimo coinvolto nello sviluppo e nella differenziazione cellulare; AGP1 è una proteina implicata nella risposta allo stress infiammatorio (importante nella patogenesi delle GERD); infine ANXA1, una proteina molto interessante, coinvolta in numerosi pathway cellulari, sia fisiologici che patologici, tra cui l'apoptosi, la risposta infiammatoria, le interazioni cellula-cellula, la proliferazione e la differenziazione cellulare e l' "epithelial mesenchymal transition".

Le 4 proteine per l'analisi in immunohistochemical (TER-ATPase, GAPDH, AGP1 e ANXA1) sono state scelte sulla base di un loro ipotetico ruolo a livello epiteliale, dipendente dalla loro localizzazione subcellulare. Queste proteine sono state inizialmente considerate come i migliori candidati Biomarker per la diagnosi di GERD e per la distinzione ERD e NERD.

TER-ATPase

La **Fig 4.8 (a,b,c)** mostra i livelli di espressione di TER-ATPase (Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase) nei pazienti ERD, NERD e nei controlli sani. Questi ultimi mostrano livelli più elevati di espressione di tale proteina. Il rapporto dell'espressione di TER-ATPase in NERD/ERD di 2,2 conferma i dati ottenuti con la massa, che avevano rilevato un'espressione maggiore di questa proteina nei campioni NERD rispetto agli ERD.

La figura **4.8 d** mostra l'immunostaining di TER-ATPase, la quale risulta espressa a livello delle cellule squamose nei controlli sani (**d1**) e nelle biopsie NERD (**d2**). Nella mucosa ERD l'espressione di TER-ATPase risulta fortemente diminuita a livello delle cellule squamose (**d3**), con un debole segnale nello strato basale. Non si osservano differenze nella sua localizzazione subcellulare che risulta principalmente citoplasmatica e (c'è un debole segnale nucleare) sia nei controlli sani che nei pazienti GERD.

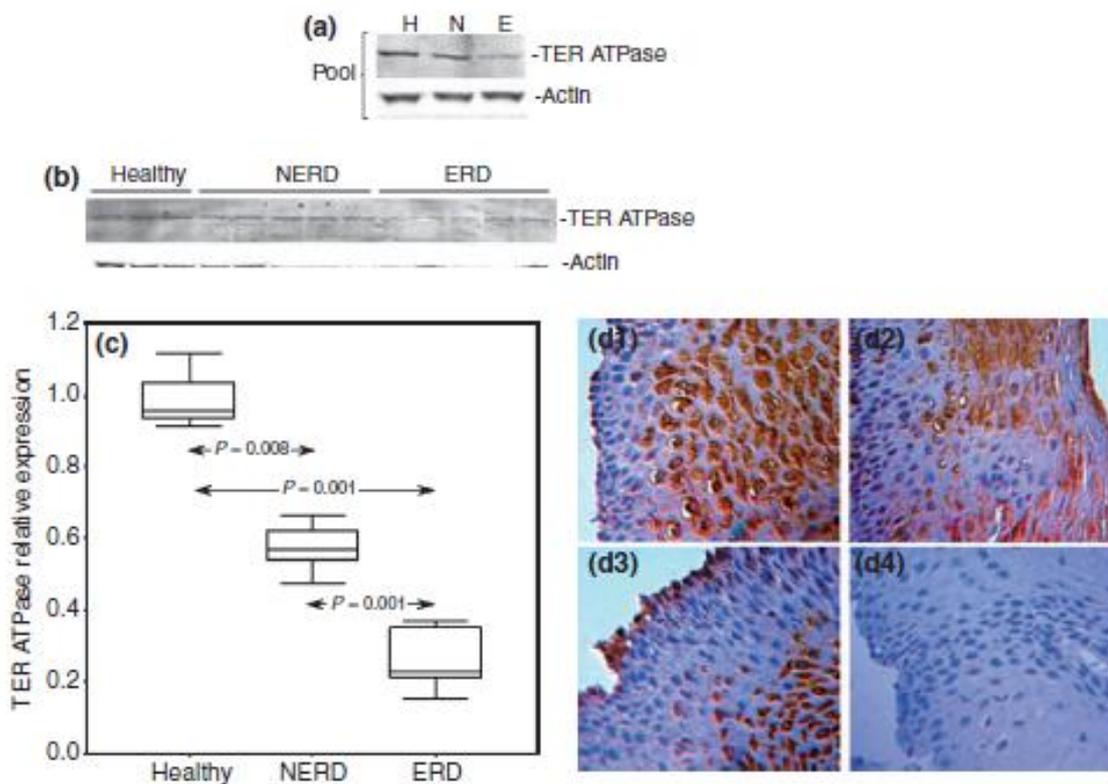


FIG 4.8: (a.) analisi Western blot dell'espressione di TER-ATPase nella mucosa di controlli sani (Healthy, H) NERD (N) e ERD (E) nei pool e (b) nei pazienti singoli.

Le immagini sono rappresentative di tutti gli esperimenti effettuati. (c) Box plot dell'espressione relativa di TER-ATPase (normalizzata contro la β -actina). I dati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. (d) immunostaining di TER-ATPase in sezioni istologiche della mucosa esofagea sana (d1), NERD (d2) ERD (d3) e controllo (incubazione con anticorpo secondario d4).

Calmodulina 1/2/3 e 14-3-3

La figura 4.9 (a,b,c) mostra i livelli di espressione della calmodulina. I pazienti sani e i NERD mostrano livelli maggiori di tale proteina rispetto ai pazienti ERD. Il rapporto NERD/ERD della sua espressione proteica è di 2.4, in accordo con i dati ottenuti dall'analisi in spettrometria di massa. La figura 4.9 (d,e,f) mostra i livelli di espressione della proteina 14-3-3 τ . I pazienti ERD e NERD mostrano un'espressione più alta di questa proteina rispetto ai controlli sani. Il rapporto NERD/ERD della sua espressione è di 1.6, e conferma i dati ottenuti tramite spettrometria di massa.

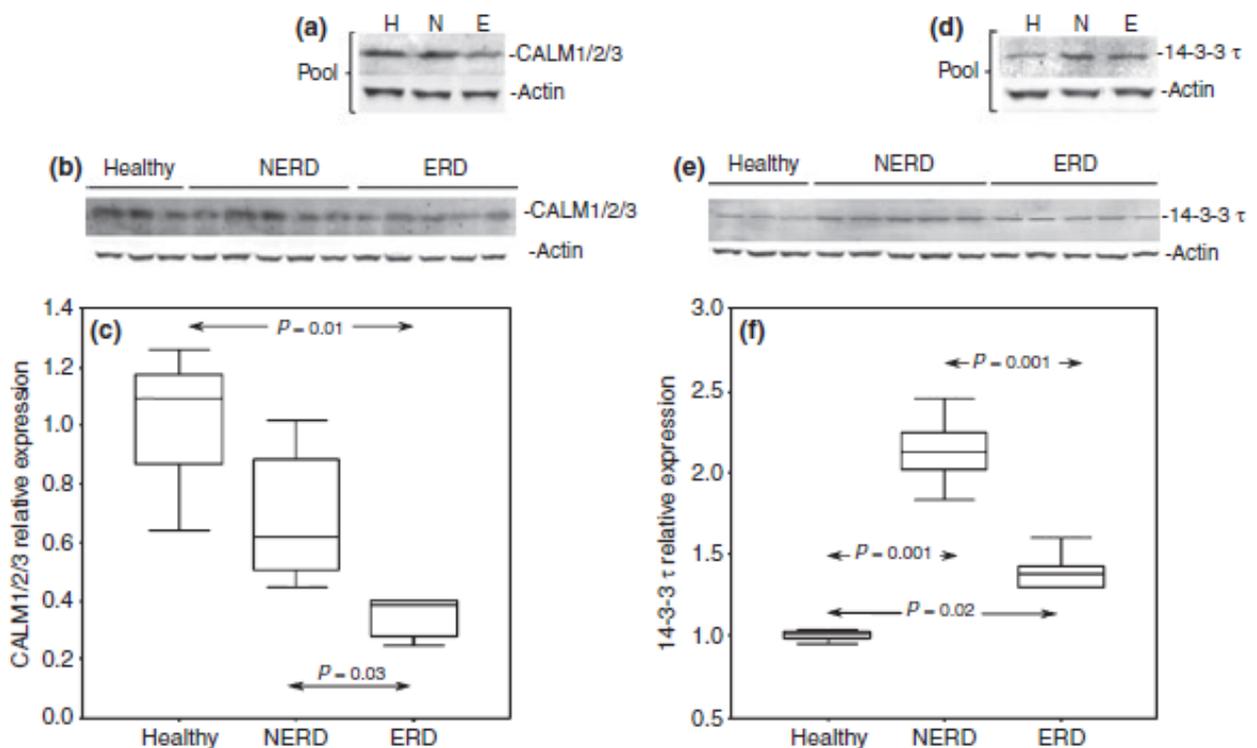


FIG 4.9: Analisi Wester Blot dei livelli di espressione della calmodulina (CALM 1/2/3) (a,b) e di 14-3-3 (d, e) nella mucosa esofagea di controlli sani (Healthy, H), NERD (N) e ERD (E), a livello di pool e di pazienti singoli. (c,f) Box plot dell'espressione relativa di CALM 1/2/3 e di 14-3-3 (normalizzata contro la β -actina). I dati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti.

Gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi

La figura 4.10 (a,b,c) mostra i livelli di espressione di GAPDH, i quali risultano più elevati nei pazienti con malattia da reflusso (ERD e NERD) rispetto ai controlli sani. Il rapporto NERD/ERD dei livelli di espressione di tale proteina è di 1.1, in accordo con i dati ottenuti tramite spettrometria di massa. La figura 4.10 d mostra l'immagine immunostochimica della proteina GAPDH, il cui segnale è egualmente localizzato sia a livello del citosol che dello strato basale e delle cellule squamose della mucosa dei pazienti GERD, con un segnale più intenso nella mucosa dei pazienti NERD. Nella mucosa dei pazienti sani, è rilevabile solo un debole segnale a livello delle cellule squamose.

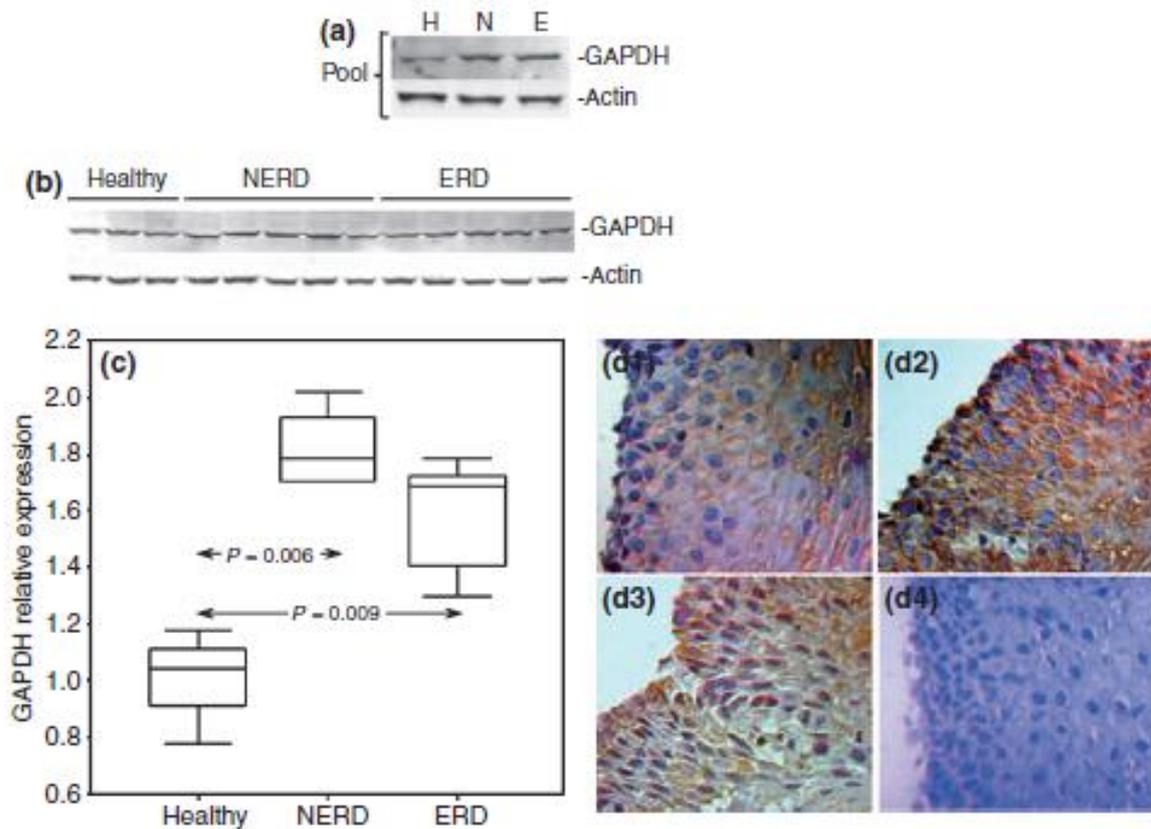


FIG 4.10: (a.) analisi Wester blot dell'espressione di GAPDH nella mucosa di controlli sani (Healthy, H) NERD (N) e ERD (E) nei pool e (b) nei pazienti singoli. Le immagini sono rappresentative di tutti gli esperimenti effettuati. (c) Box plot dell'espressione relativa di GAPDH (normalizzata contro la β -actina). I dati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. (d) immunostainig di GAPDH in sezioni istologiche della mucosa esofagea sana (d1), NERD (d2) ERD (d3) e controllo (incubazione con anticorpo secondario (d4).

Alpha Glico Protein 1

La figura 4.11 (a,b,c) mostra i livelli di espressione proteica di AGP1, i quali risultano maggiori nei pazienti con malattia da reflusso (GERD) rispetto ai controlli sani. La figura 4.11 d mostra l'immunostainig della proteina AGP1, la quale presenta una differente localizzazione tra la mucosa sana, a livello della quale viene espressa solo nello strato basale, e la mucosa GERD, a livello della quale, invece, è evidente un più ampio pattern di espressione. In particolare, AGP viene espressa attraverso tutto lo spessore della mucosa dei pazienti ERD, mentre i NERD risultano positivi all'anticorpo anti-AGP1 solo a livello dello strato basale e delle cellule squamose. Il segnale di AGP1 è localizzato nel citosol e sulla membrana cellulare, sia dei pazienti ERD e NERD che nei controlli sani.

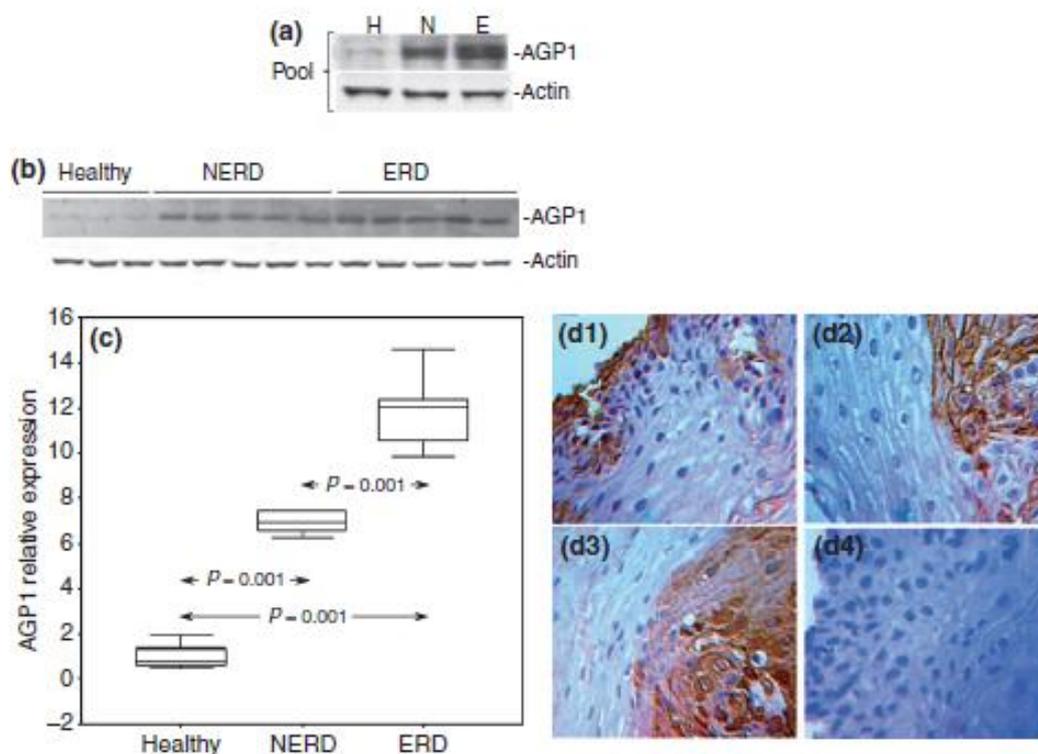


FIG 4.11: (a) analisi Wester blot dell'espressione di AGP1 nella mucosa di controlli sani (Healthy, H) NERD (N) e ERD (E) nei pool e **(b)** nei pazienti singoli. Le immagini sono rappresentative di tutti gli esperimenti effettuati. **(c)** Box plot dell'espressione relativa di AGP1 (normalizzata contro la β -actina). I dati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. **(d)** immunostainig di AGP1 in sezioni istologiche della mucosa esofagea sana **(d1)**, NERD **(d2)** ERD **(d3)** e controllo (incubazione con anticorpo secondario **(d4)**).

Annexina A1

La figura 4.12 (a,b,c) mostra i livelli di espressione proteica di ANXA1, i quali risultano più bassi nei pazienti con malattia da reflusso (GERD) rispetto ai controlli sani. Il rapporto NERD/ERD dei livelli di espressione di ANXA1 è di 0.85, e conferma i dati ottenuti tramite spettrometria di massa. La figura 4.11 d mostra l'immagine immunostochimica della proteina ANXA1, la quale mostra notevoli differenze di localizzazione sia nella mucosa sana che in quella dei pazienti ERD e NERD. Nella mucosa sana ANXA1 è localizzata principalmente sulla membrana citoplasmatica, mentre i pazienti GERD la esprimono a livello citoplasmatico, con un segnale più intenso nella mucosa NERD.

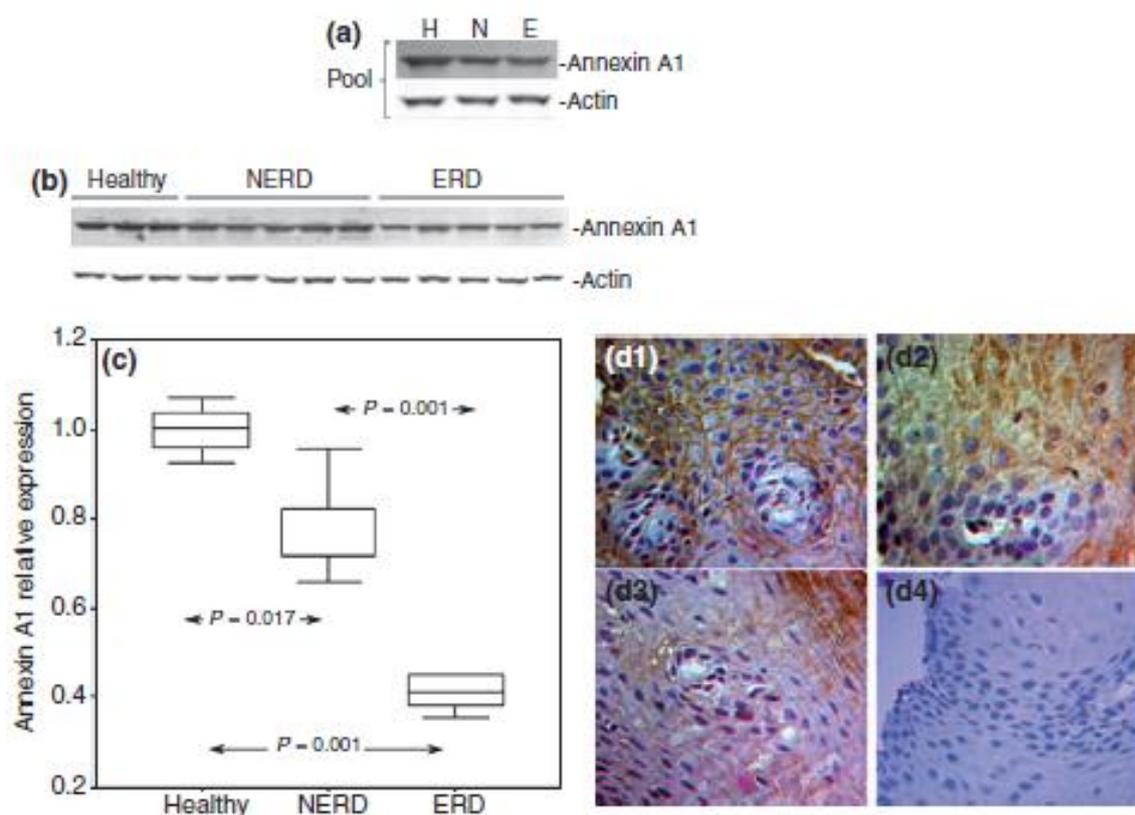


FIG 4.12: (a) analisi Wester blot dell'espressione di ANXA1 nella mucosa di controlli sani (Healthy, H) NERD (N) e ERD (E) nei pool e (b) nei pazienti singoli. Le immagini sono rappresentative di tutti gli esperimenti effettuati. (c) Box plot dell'espressione relativa di ANXA1 (normalizzata contro la β -actina). I dati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. (d) immunostainig di ANXA1 in sezioni istologiche della mucosa esofagea sana (d1), NERD (d2) ERD (d3) e controllo (incubazione con anticorpo secondario (d4)).

Fatty Acid Binding Protein 5

La figura **10.13** mostra l'analisi Western blot dei livelli di espressione di FABP5, la quale presenta dei livelli di espressione media piuttosto variabili, sia nella mucosa NERD che in quella ERD. Tuttavia, quando sono stati analizzati i singoli pazienti, sono emerse forti differenze individuali che hanno reso impossibile un'adeguata analisi statistica.

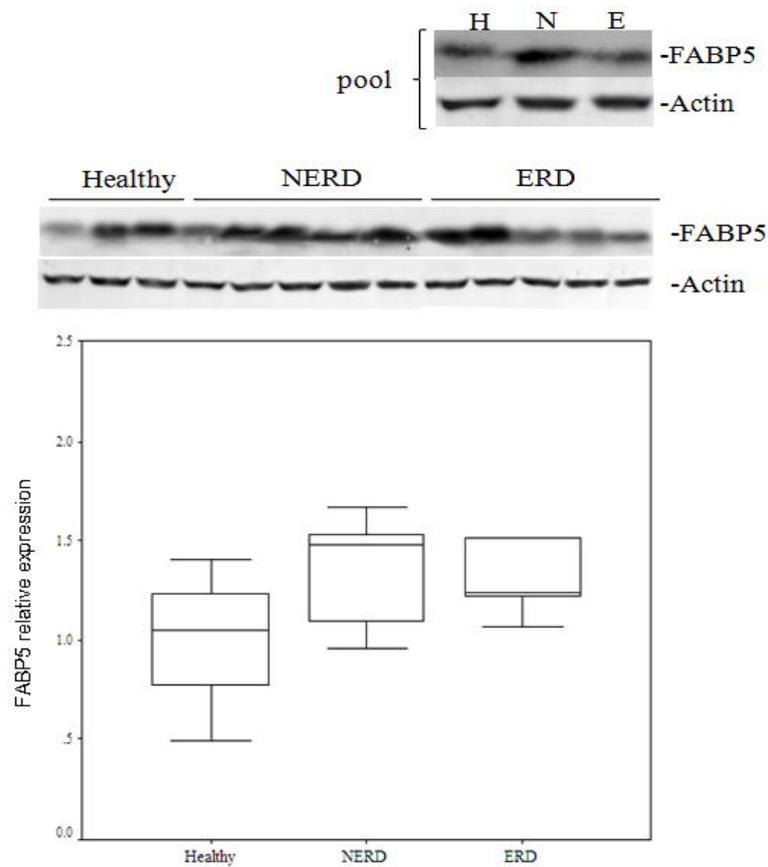


FIG 4.13: Analisi Wester Blot dei livelli di espressione di FABP5 nella mucosa esofagea di controlli sani (Healthy, H), NERD (N) e ERD (E), a livello di pool e di pazienti singoli. Box plot dell'espressione relativa di FABP5 (normalizzata contro la β -actina). I dati rappresentano la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti.

NOTA: Tutte le immagini presenti in questa sezione sono state prese da:

Calabrese C, Marzano V, Urbani A, **Lazzarini G**, Valerii MC, Liguori G, Di Molfetta S, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Spisni E.

Distinct proteomic profiles characterise non-erosive from erosive reflux disease.

Aliment Pharmacol Ther. 2011 Aug 17.

Calabrese C, Spisni E, Liguori G, **Lazzarini G**, Valerii MC, Strillacci A, Gionchetti P, Pagotto U, Campieri M, Rizzello F.

Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in the pathogenesis of erosive and non-erosive gastro-oesophageal reflux disease.

Aliment Pharmacol Ther. 2010 May 22.

IV. Discussione

Con la prima parte del nostro studio si è dimostrato, per la prima volta, la presenza del recettore CB1 a livello dell'epitelio esofageo, e come tale recettore presenti livelli di espressione differenti nei pazienti GERD con e senza erosioni.

Ad oggi diverse prove suggeriscono come le modifiche a livello delle erosioni, individuate tramite endoscopia, nella mucosa esofagea di pazienti GERD accompagnate da esofagite da reflusso, siano il risultato di un disequilibrio tra fattori aggressivi e meccanismi protettivi (Namiot *et al.*, 1994; Sarosiek *et al.*, 1994). Dal momento che i fattori aggressivi sembrano operare nello stesso modo, sia nei pazienti ERD che in quelli NERD, è ragionevole pensare che siano quindi i meccanismi di difesa epiteliale a determinare, o meno, l'insorgenza di danni istologici.

Calabrese *et al.*, nel 2007 hanno dimostrato che la mucosa esofagea dei pazienti con sintomi del reflusso e con esofagite erosiva presenta una capacità proliferativa diminuita rispetto alla mucosa di pazienti con malattia non erosiva, anche se il monitoraggio del pH nelle due tipologie di pazienti non mostra differenze significative. Ciò conferma che gli insulti acidi e peptici sono necessari nella determinazione del danno, in modo particolare a livello ultrastrutturale (dilatazione degli spazi intercellulari), ma che la capacità proliferativa cellulare della mucosa potrebbe rappresentare un fattore chiave nello switch da una forma all'altra della patologia (Tobey *et al.*, 1996).

Sempre Calabrese e coworkers, in uno studio del 2003, hanno dimostrato che il trattamento con inibitori di pompa protonica, che riducono l'insulto acido-peptico, è in grado di aumentare la proliferazione cellulare della mucosa esofagea, e che lo stesso trattamento, a lungo termine, potrebbe essere di grande aiuto nell'incrementare la proliferazione cellulare dell'epitelio esofageo nei pazienti GERD.

Possono essere formulate due ipotesi che spieghino in maniera plausibile la riduzione dell'attività proliferativa cellulare osservata nella malattia da reflusso: la prima è che il danno cellulare cronico indotto dal reflusso determini una riduzione del tasso proliferativo dell'epitelio esofageo, la seconda è che sia una minore capacità proliferativa costitutiva a portare a una maggiore suscettibilità ai danni indotti dal reflusso. I pazienti con una capacità proliferativa epiteliale più efficiente potrebbero avere minori possibilità di sviluppare lesioni macroscopiche mucosali se sottoposti a stress acido. Probabilmente esiste una componente genetica che influenza tale capacità.

Ci sono diverse prove a favore del fatto che gli endocannabinoidi (EC) e i recettori CB1 siano up-regolati durante l'infiammazione intestinale (Izzo *et al.*, 2001), e che un aumento della produzione di EC, agendo principalmente a livello del recettore CB1, possa causare una diminuzione della motilità durante l'infiammazione intestinale e proteggere contro il danno epiteliale (Wright *et al.*, 2005). In maniera molto simile i dati presentati in questo lavoro dimostrano che i livelli di espressione del recettore CB1 aumentano nei pazienti NERD, paragonati con quelli dei pazienti

ERD. Le analisi effettuate tramite Real-Time PCR dimostrano che i livelli di CB1 mRNA diminuiscono sia nei pazienti NERD che in quelli ERD, paragonati con una mucosa di controllo, e che i livelli di tale recettore nella mucosa NERD sono di due volte superiori rispetto ai livelli riscontrabili nella mucosa ERD. Questi dati correlano con quelli ottenuti tramite Western blot i quali indicano che i livelli proteici del recettore CB1 sono di 1,4 volte superiori nei NERD rispetto agli ERD. In più l'espressione relativa media del recettore CB1, sia a livello di proteina che di messaggero, mostrano una variabilità tra pazienti molto più ampia nel gruppo dei NERD rispetto al gruppo ERD. Mentre a livello di mRNA si osserva una forte diminuzione dei livelli di espressione del recettore nella mucosa dei pazienti GERD, paragonata a quella sana, e livello proteico la mucosa dei pazienti ERD e dei pazienti sani mostra un'espressione simile del recettore CB1, mentre i pazienti NERD mostrano dei livelli molto più bassi di proteina. Questo dato rafforza l'ipotesi che nei pazienti con malattia da reflusso possa entrare in gioco una diversa regolazione post-trascrizionale che potrebbe essere alla base delle differenze fenotipiche osservate, ed è possibile che l'infiammazione a livello della mucosa causi un'alterazione dell'espressione del gene CB1 mediata da micro-RNA (Song *et al.*, 2013).

Nel 2005 Wright *et al.* hanno evidenziato la capacità proliferativa del recettore CB1 nell'epitelio sano di colon. In particolare, è stato riportato che linee cellulari epiteliali di colon rispondono sia ai cannabinoidi sintetici che a quelli endogeni, attraverso la fosforilazione di ERK, PKB e GSK3 α/β , e che questi eventi sono mediati dal recettore CB1. I nostri dati sono in accordo con i risultati di questo studio. Infatti abbiamo dimostrato che il recettore CB1 viene espresso maggiormente nelle cellule squamose mature dell'epitelio esofageo, mentre livelli di recettore CB2 non sono stati individuati. Questi dati rafforzano l'ipotesi di un ruolo fisiologico del sistema endocannabinoide nel tratto gastrointestinale, e confermano che il recettore CB1 possa essere anch'esso coinvolto nei meccanismi di difesa della mucosa esofagea.

In conclusione, sia la colorazione immunohistochimica che le analisi in Western blot e Real-Time confermano che il recettore CB1 viene espresso nella mucosa esofagea, e sostengono l'ipotesi che il recettore CB1 possa svolgere una funzione di difesa epiteliale contro l'insulto del reflusso a livello della mucosa esofagea, anche se non si può escludere che possa anche avere un ruolo immunomodulante. Ulteriori studi saranno necessari per capire il ruolo del sistema endocannabinoide nei meccanismi difensivi epiteliali.

Con la seconda parte dello studio, invece, si è dimostrato che ERD e NERD presentano dei pattern proteici estremamente differenti, sia per quanto riguarda la presenza o meno di determinate proteine nell'uno o nell'altro gruppo, sia per quanto riguarda i livelli di espressione di specifiche proteine, che variano in presenza o meno di erosioni. Nonostante questo non siamo riusciti ad individuare degli

ipotetici biomarker che discriminassero tra ERD e NERD, poichè non siamo riusciti ad individuare proteine espresse solo da una delle due forme di esofagite. L'analisi dell'espressione differenziale proteica nelle due patologie mostra che la maggior parte delle 33 proteine identificate differenzialmente espresse, hanno funzioni correlate essenzialmente a tre processi: cheratinizzazione, proliferazione, metabolismo degli zuccheri e risposta allo stress. Questo è in linea con i risultati ottenuti fino ad ora che dimostrano che esistono differenze proliferative, a livello dell'epitelio esofageo, tra pazienti ERD e NERD. E' quindi probabile che lo sviluppo di una forma o dell'altra di esofagite dipenda dalla risposta individuale ai medesimi insulti chimici.

L'attenzione è stata puntata su 7 proteine delle 33 individuate, in particolare su TER ATPase, Calmodulina e 14-3-3 che sono coinvolte nel ciclo cellulare, FABP5, coinvolta nei processi di cheratinizzazione, GAPDH, coinvolta nel metabolismo degli zuccheri, AGP1 che agisce in risposta a stress infiammatori e Annessina A1 la quale è implicata in molteplici funzioni, tra cui la migrazione cellulare e l'interazione tra cellule.

TER-ATPase (Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase) è un membro appartenente alla superfamiglia dei geni AAA-ATPasi. Essa agisce come chaperone in diversi processi cellulari tra cui la degradazione proteica ubiquitina-dipendente, ricostruzione dell'envelope nucleare e assemblamento del reticolo endoplasmatico e del Golgi (Liu *et al.*, 2012). Molte di queste attività sono regolate direttamente o indirettamente dal sistema ubiquitina-proteosoma, il quale è coinvolto nell'up-regolazione della proliferazione cellulare e nella down-regolazione della morte cellulare programmata nelle cellule cancerose (Dou *et al.*, 2003). Nel nostro studio TER-ATPase è down-espresa, in modo particolare nella mucosa dei pazienti ERD. Questa diminuzione dei livelli di espressione potrebbe significare che nei pazienti ERD e NERD l'equilibrio tra rigenerazione e apoptosi sia alterato, suggerendo quindi la presenza di una ridotta capacità proliferativa dell'epitelio dei pazienti ERD vs NERD, in accordo con i nostri dati precedenti.

14-3-3: è una proteina dimerica che esiste in sette isoforme (noi abbiamo individuato l'isoforma τ), coinvolta nel controllo della progressione del ciclo cellulare (regola la transizione dalla fase G2 alla M) e nella regolazione dell'apoptosi (Gardino *et al.*, 2011). Nel contesto delle GERD non è facile capire perchè questa proteina aumenti i suoi livelli di espressione nei pazienti malati, anche se dati riportati in altri studi affermano che un suo aumento di espressione potrebbe essere legato al blocco del pathway apoptotico, suggerendo un ruolo nei meccanismi di sopravvivenza cellulare (Malaspina *et al.*, 2000).

Calmodulina: essa media il controllo di diversi enzimi attraverso il suo legame con il calcio. Il mantenimento di una concentrazione ottimale di calcio risulta sostanziale per la sopravvivenza

cellulare (in accordo con l'ipotesi del set-point del calcio), specialmente in assenza di fattori tropici (Takedera *et al.*, 2007).

La riduzione dei livelli di espressione della calmodulina nella mucosa dei pazienti ERD potrebbe essere correlata con una ridotta capacità rigenerativa epiteliale osservata in questi pazienti.

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase): enzima chiave nella glicolisi. Per molto tempo è stato considerato come gene housekeeping, ma oggi si sa che i suoi livelli cambiano in risposta a fattori fisiologici (come ad esempio all'ipossia), in modo particolare nei colonociti (Caradec *et al.*, 2010). L'immunostaining in sezioni di mucosa GERD evidenzia un aumento della sua espressione a livello dello strato basale.

Alpha 1 Acid Glycoprotein 1 (AGP): è una proteina coinvolta nella modulazione della risposta immunitaria all'infiammazione acuta. Essa viene sintetizzata anche dalle cellule epiteliali, probabilmente in risposta all'invasione leucocitaria (Gendler *et al.*, 1982). È l'unico marker infiammatorio individuato nella nostra analisi, a conferma del fatto che probabilmente lo scenario infiammatorio in ERD e NERD è del tutto simile. I suoi livelli di espressione sono maggiori dove il danno è più evidente, cioè nella mucosa dei pazienti ERD, dove la troviamo espressa lungo tutto lo spessore.

ANXA1 (Annexin A1): è una proteina inducibile dai glucocorticoidi, che inibisce la fosfolipasi A2 citosolica. Essa però è implicata in molteplici pathway cellulari, tra cui il traffico di membrana, la proliferazione e la differenziazione cellulare (Lim *et al.*, 2007). Questa proteina è anche stata associata allo sviluppo di metastasi e alla transizione epiteliale-mesenchimale (De Graauv *et al.*, 2010). Infatti alcune linee cellulari, in seguito alla sua traslocazione sulla membrana, hanno acquisito un carattere più invasivo (Babbin *et al.*, 2006). È chiaro che una diminuzione dei suoi livelli di espressione evidenziati nella mucosa di pazienti GERD, associata a una mancata traslocazione sulla membrana, sia coinvolta in un decremento della proliferazione e della migrazione cellulare, il quale contribuisce a una disfunzione nella rigenerazione epiteliale, che risulta più evidente nei pazienti ERD.

FABP5 (Fatty Acid Binding Protein 5): è una proteina citoplasmatica presente in nove isoforme, nominata (e numerata) a seconda del tessuto dal quale viene espressa. La forma 5 (epidermica) risulta coinvolta nei processi di cheratinizzazione (e quindi di differenziazione cellulare) (Storch *et al.*, 2008). A livello tumorale questa proteina sembra promuovere la proliferazione e l'invasione tumorale (Fang *et al.*, 2009). Anche se i nostri dati rivelano una variabilità molto elevata tra i singoli pazienti, ci sembra comunque evidente che i suoi livelli di espressione nella mucosa dei pazienti ERD vs NERD abbiano andamento decrescente, a conferma di come molto probabilmente i meccanismi di proliferazione cellulare siano down-regolati nella malattia da reflusso erosiva.

Dalle considerazioni riportate sopra, si evince quindi che ERD e NERD siano due entità distinte della malattia da reflusso gastroesofageo. Ciò risalta anche l'importanza di un approccio proteomico, soprattutto nel cercare di individuare degli ipotetici biomarker per la diagnosi precoce. Una considerazione va fatta sulla sovrapposizione soltanto parziale dei dati ottenuti con la tecnica shotgun rispetto a quelli ottenuti tramite WB. Si tratta di due tecniche completamente differenti, che non danno mai risultati totalmente univoci. Per esempio, mentre la shotgun risente fortemente delle modificazioni post-traduzionali che le singole proteine subiscono, il WB non è affatto sensibile ad esse. E' perciò possibile che sia proprio la presenza di tali modificazioni a spiegare le discrepanze a livello dei risultati, ottenuti in alcuni casi con le due tecniche.

Concludendo si può affermare che questo studio supporta l'ipotesi che gli individui che sviluppano la forma erosiva della malattia da reflusso abbiano una minore capacità di rispondere agli insulti acidi e peptici, e abbiano anche una minore capacità proliferativa e rigenerativa del tessuto epiteliale. Inoltre, probabilmente, il danno cellulare a livello microscopico (ad esempio la dilatazione degli spazi intercellulari), nei pazienti ERD progredisce causando un danno macroscopico (le erosioni) a causa di deficit nella barriera epiteliale, dovuti ad alterazioni individuali in determinati pathway cellulari.

V. Bibliografia

Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, De Caro G, Coruzzi G, Soldani G Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 2002

Agarwal A, Rahul Polineni, Zulfiqar Hussein, Ivette Vigoda, Tushar D Bhagat, Sanchari Bhattacharyya, Anirban Maitra, Amit Verma. Role of epigenetic alterations in the pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma *Int J Clin Exp Pathol* 2012.

Agrawal A. and Castell D., GERD is chronic but not progressive, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2006.

Alhouayek M, Muccioli GG The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases: from pathophysiology to therapeutic opportunity *Trends Mol Med*. 2012 .

Anand P, Aziz Q, Willert R, Van Oudenhove L. Peripheral and central mechanisms of visceral sensitization in man. *Neurogastroenterol Motil* 2007

Andrici J, Tio M, Cox MR, Eslick GD Hiatal Hernia and the Risk of Barrett's Esophagus: A Meta-Analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Jun 13.

Anthenelli RM., Despres JO., "effect of ribonant in the reduction of major cardiovascular risk factor. Result from the stratus-us trial (smoking cessation in smokers motivated quit). Proc Annual Meeting of the American college of Cardiology, New Orleans , LA, 2004

Artico M. *Anatomia umana-Principi*, 2006 EdiErmes, Milano

Ayazi S J. A. Hagen, L. S. Chan et al., "Obesity and gastroesophageal reflux: quantifying the association between body mass index, esophageal acid exposure, and lower esophageal sphincter status in a large series of patients with reflux symptoms," *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2009.

Aziz Q. Visceral hypersensitivity: fact or fiction. *Gastroenterology* 2006.

Babbin BA, Lee WY, Parkos CA, et al. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem* 2006.

Baker D et al Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 2000.

- Ballem C. M., H. W. Fletcher, and R. D. Mc Kenna, "The diagnosis of esophagitis," *The American Journal of Digestive Diseases*, 1960.
- Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007.
- Baveye S, Elass E, Mazurier J, Spik G, Legrand D. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin Chem Lab Med* 1999.
- Beaumont, H., Jensen, J., Carlsson, A., Ruth, M., Lehmann, A., & Boeckxstaens, G. Effect of delta9-tetrahydrocannabinol, a cannabinoid receptor agonist, on the triggering of transient lower oesophageal sphincter relaxations in dogs and humans. *Br J Pharmacol* 2009
- Beltramo M. "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition" *Science* 1997.
- Brandy M. Heckman-Stoddard: *Oncology Biomarkers: discovery, validation, and clinical use* Seminars in Oncology Nursing, 2012.
- Brown L. F., Goldman H. , and Antonioli D. A., "Intraepithelial eosinophils in endoscopic biopsies of adults with reflux esophagitis," *American Journal of Surgical Pathology*, 1984.
- Buttar N.S. and G. W. Falk, "Pathogenesis of gastroesophageal reflux and Barrett esophagus," *Mayo Clinic Proceedings*, 2001.
- Calabrese C, Marzano V, Urbani A, Lazzarini G, Valerii MC, Liguori G, Di Molfetta S, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Spisni E. Distinct proteomic profiles characterise non-erosive from erosive reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Aug 17.
- Calabrese C, Spisni E, Liguori G, Lazzarini G, Valerii MC, Strillacci A, Gionchetti P, Pagotto U, Campieri M, Rizzello F. Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in the pathogenesis of erosive and non-erosive gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010 May 22.
- Calabrese C, Trerè D, Fabbri A, Cenacchi G, Vici M, Derenzini M, Di Febo G. Endoscopic appearance of GERD: putative role of cell proliferation. *Dig Liver Dis* 2007
- Calabrese C, Trere D, Fabbri A, et al. Endoscopic appearance of GERD: putative role of cell proliferation. *Dig Liver Dis* 2007.
- Calabrese C, Trere´ D, Liguori G, et al. Esophageal cell proliferation in gastroesophageal reflux disease: clinical-morphological data before and after pantoprazole. *World J Gastroenterol* 2009.
- Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, et al. 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer* 2010.
- Carbone E., Cicirata F., Aicardi G. *Fisiologia dalle molecole ai sistemi integrati*, (2008). EdiSES
- Carlson DS, Pfadt E. Mallory-Weiss syndrome *Nursing*. 2011 Oct.
- Cattaneo L. *Anatomia e fisiologia dell'uomo* 1990, Monduzzi editore

- Chang JT, Katzka DA. Gastroesophageal reflux disease, Barrett esophagus, and esophageal adenocarcinoma. *Arch Intern Med.* 2004.
- Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 2008.
- Colin-Jones D. G, “The role and limitation of H₂-receptor antagonists in the treatment of gastroesophageal reflux disease,” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 1995.
- Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol* 2002.
- Coutts AA, Izzo AA The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* 2004
- Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol.* 2005.
- D’Argenio G, Valenti M, Scaglione G., Cosenza V., Sorrentini I, and Di Marzo V. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *The FASEB journal* , 2006.
- Darlington GJ, Wilson DR, Lachman LB. Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J Cell Biol* 1986.
- Dasilva N, Diez P, Matarraz S, Gonzalez-Gonzalez M, Paradinas S, Orfao A, et al. Biomarker discovery by novel sensors based on nanoproteomics approaches. *Sensors (Basel)* 2012.
- Davane WB., Hanus L. Breur A., Peterwee RG. Syevenson LA., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Meuchoulame R. “Isolation And structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992.
- De Graauw M, van Miltenburg MH, Schmidt MK, Pont C, Lalai R, Kartopawiro J, Pardali E, Le Dévédec SE, Smit VT, van der Wal A, Van't Veer LJ, Cleton-Jansen AM, ten Dijke P, van de Water B. Annexin A1 regulates TGF-beta signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 .
- DeMeester SR. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. *Ann Surg Oncol.* 2006.
- Dent J., Brun J., Fendrick A. M. ., An evidencebased appraisal of reflux disease management—the Genval Workshop Report, *Gut*, 1999.
- Dent J., Dodds WJ., Hogan WJ., Toouli J. Factors that influence induction of gastro-esophageal reflux in normal human subjects. *Dig Dis Sci* 1988.
- Dent J., El-Serag H. B., Wallander M. A., and Johansson S., Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review, *Gut*, 2005.
- Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007.

Di Carlo G, Izzo AA Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 2003.

Di Marzo V., "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons". *Science* 1994.

Dinh TP., Carpenter D. "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci* 2002.

Dou QP, Smith DM, Daniel KG, Kazi A. Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res* 2003.

Drossman D. Rome III, The Functional Gastrointestinal Disorders, Degnon Associates, McLean, Va, USA, 3rd edition, 2006

Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006.

Elias PM, McNutt NS, Friend DS. ; Membrane alterations during codification of mammalian squamous epithelia: a freeze fracture, tracer and thin section study. *Anat Rec* 1977.

El-Serag H. B., Time trends of gastroesophageal reflux disease: a systematic review, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2007.

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995

Fang LY, Wong TY, Chiang WF, Chen YL Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2010 .

Fang Q, Kani K, Faca VM, Zhang W, Zhang Q, Jain A, et al. Impact of protein stability, cellular localization, and abundance on proteomic detection of tumor-derived proteins in plasma. *PLoS One* 2011.

Farré, R., & Sifrim, D. Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter. Relevance to drug discovery for oesophageal disorders. *Br J Pharmacol* 2008.

Fass , R. Fennerty M. B. and Vakil N., Non erosive reflux disease-current concepts and dilemmas, *American Journal of Gastroenterology*, 2001.

Fass R. and D. Sifrim, "Management of heartburn not responding to proton pump inhibitors," *Gut*, 2009.

Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD) and erosive esophagitis--a spectrum of disease or special entities? *Z Gastroenterol*. 2007

Fournier ML, Gilmore JM, Martin-Brown SA, Washburn MP . "Multidimensional separations-based shotgun proteomics". *Chem. Rev*. 2007.

Frangogiannis NG. Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. *Translational Research* 2012.

Gardino AK, Yaffe MB 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2011.

Gendler SJ, Dermer GB, Silverman LM, To'ke's ZA. Synthesis of alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-acid glycoprotein by human breast epithelial cells. *Cancer Res* 1982.

Ghoshal UC, Chourasia D. Genetic factors in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Indian J Gastroenterol.* 2011 Mar.

Giannakakis A., G. Coukos, A. Hatzigeorgiou, R. Sandaltzopoulos, L. Zhang, miRNA genetic alterations in human cancers, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007

Goyal Raj K. and Chaudhury Arun "Pathogenesis of Achalasia: Lessons From Mutant Mice". *Gastroenterology.* 2010

Goyal RK., Rattan S. Genesis of basal sphincter pressure: effect of tetrodotoxin on lower esophageal sphincter pressure in opossum in vivo. *Gastroenterology* 1976.

Granell J, Garrido L, Millas T, Gutierrez-Fonseca R. Management of oropharyngeal Dysphagia in laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Int J Otolaryngol.* 2012.

Greenhough A, PatsosHA,WilliamsAC, Paraskeva C. The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signaling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2007.

Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, Shire D, Huffman JW, Yu S, Lainton JA, Pertwee RG Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 1997

Hanash S. Progress in mining the human proteome for disease applications. *OMICS* 2011.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC."Cannabinoid receptor localization in brain." *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 .

Hermanson DJ, Marnett LJ Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Dec.

Hershovici T, Fass R Nonerosive Reflux Disease (NERD) - An Update. *J Neurogastroenterol Motil.* 2010 Jan.

Hu L, Ye M, Jiang X, Feng S, Zou H "Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis--a review". *Anal. Chim. Acta* 2007.

Hu L, Ye M, Jiang X, Feng S, Zou H "Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis--a review". *Anal. Chim. Acta* 2007.

Ibrahim MM., Porreca F., Lai J., Albrecht PJ., Rice FL., Khodorova A. "CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids" *Proc Natl Acad Sci USA* 2005.

- Iskandar HN, Ciorba MA Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res.* 2012 .
- Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970.
- Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004.
- Izzo AA Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 2004
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb *Trends Pharmacol Sci.* 2009.
- Izzo AA, Fezza F, Capasso R, et al. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 2001.
- Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts *Pharmacol Ther.* 2010.
- Izzotti A. Molecular medicine and the development of cancer chemopreventive agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012.
- Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2007.
- Johnson LF. 24-hour pH monitoring in the study of gastroesophageal reflux. *J Clin Gastroenterol* 1980.
- Jovov B, Que J, Tobey NA, Djukic Z, Hogan BL, Orlando RC. Role of E-cadherin in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2011.
- Kahrilas PJ, Gupta RR. The effect of cigarette smoking on salivation and esophageal acid clearance. *J Lab Clin Med* 1989.
- Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, et al. Faecal S100A12 as a noninvasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007.
- Kandulski A, Malfertheiner P. Gastroesophageal reflux disease--from reflux episodes to mucosal inflammation *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011.
- Kilpinen H, Dermitzakis ET. Genetic and epigenetic contribution to complex traits. *Human Molecular Genetics* 2012.
- Kinottenbelt G, Skinner A, Seefelder C. Tracheo-oesophageal fistula (TOF) and oesophageal atresia (OA). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010 Sep.
- Knuff T. E, S. B. Benjamin, G. F. Worsham, J. E. Hancock, and D. O. Castell, "Histologic evaluation of chronic gastroesophageal reflux. An evaluation of biopsy methods and diagnostic criteria," *Digestive Diseases and Sciences*, 1984.

- Koc̆evar N., Hudler P. and Komel R. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. *New Biotechnology* 2012.
- Konturek SJ, Radecki T., Brzozowski R., Piastucki I, Dembniski A, Gastric cytoprotection by epidermal growth factor, role of endogenous prostaglandins and DNA synthesis. *Gastroenterology* 1981.
- Kulkarni-Narla A, Brown DR Opioid, cannabinoid and vanilloid receptor localization on porcine cultured myenteric neurons. *Neurosci Lett* 2001
- Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999.
- Lane CS. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005.
- Lehmann, A., Blackshaw, L. A., Brändén, L., Carlsson, A., Jensen, J., Nygren, E., et al. Cannabinoid receptor agonism inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations and reflux in dogs. *Gastroenterology* 2002
- Lembo A, Zaman M, Jones M, Talley NJ. Influence of genetics on irritable bowel syndrome, gastro-oesophageal reflux and dyspepsia: a twin study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007.
- Lieberman D. A, “Medical therapy for chronic reflux esophagitis. Long-term follow-up,” *Archives of Internal Medicine*, 1987.
- Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J* 2007.
- Ling MM, Ricks C, Lea P. Multiplexing molecular diagnostics and immunoassays using emerging microarray technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2007.
- Liu Y, Ye Y. Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Curr Protein Pept Sci.* 2012 .
- Livstone E.M., Sheahan D.G. & Behar J. “ Studies of esophageal epithelial cell proliferation in patients with reflux esophagitis” *Gastroenterology* 1977
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004.
- Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn’s disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006.
- Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer* 2005.

Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci.* 2005

MacNaughton WK, Van Sickle MD, Keenan CM, Cushing K, Mackie K, Sharkey KA. Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin- sensitive nerves. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004

Maguire A. & Sheahan K. “Pathology of oesophagitis” *Histopathology* 2012.

Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. A 14-3-3 mRNA is up-regulated in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Neurochem* 2000.

Marquez L., Suarez J, Iglesias M, Bermudez-Silva FJ, Rodriguez de Fonseca F., Andreu M. Ulcerative Colitis change the expression the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS ONE* 2009.

Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem.* 2002

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglansberger W, Di Marzo V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature.* 2002 .

Martini/Timmons/Tallitshch , *Anatomia umana*, terza edizione, E diSES

Massa F, Storr M, Lutz B The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med (Berl).* 2005 .

Massa F, Storr M, Lutz B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract *J Mol Med (Berl).* 2005.

McKenzie H, Main J, Pennington CR, Parratt D. Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker’s and brewer’s yeast) and *Candida albicans* in Crohn’s disease. *Gut* 1990.

Mendoza JL, Abreu MT. Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. *Gastroenterol Clin Biol* 2009.

Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 1998.

Menon D., Tania Stafinski, Heng Wu, Darren Lau, Clarence Wong. “Endoscopic treatments for Barrett’s esophagus: a systematic review of safety and effectiveness compared to esophagectomy”. *BMC Gastroenterology* 2010.

Molina-Infante J, Ferrando-Lamana L, Ripoll C, Hernandez-Alonso M, Mateos JM, Fernandez-Bermejo M, Dueñas C, Fernandez-Gonzalez N, Quintana EM, Gonzalez-Nuñez MA. “Esophageal eosinophilic infiltration responds to proton pump inhibition in most adults”. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010 Oct

Mönkemüller K, Wex T, Kuester D, Fry LC, Peitz U, Beyer M, Roessner A, Malfertheiner P. Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with them histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease *Digestion*. Epub 2009.

Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003.

Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 1993

Myers RL, Orlando RC. In vivo bicarbonate secretion by human esophagus. *Gastroenterology* 1992;

Namiot Z, Sarosiek J, Rourk RM, et al. Human esophageal secretion: mucosal response to luminal acid and pepsin. *Gastroenterology* 1994.

Nandurkar S., N. J. Talley, C. J. Martin, and S. Adams, “Esophageal histology does not provide additional useful information over clinical assessment in identifying reflux patients presenting for esophagogastroduodenoscopy,” *Digestive Diseases and Sciences*, 2000.

Narayani RI, Burton MP, Young GS. Utility of esophageal biopsies in the diagnosis of nonerosive reflux disease. *Dis Esophagus* 2003.

Nwokediuko S.C. Current Trends in theManagement of Gastroesophageal Reflux Disease: A Review, *ISRN Gastroenterolog y* 2012

Nwokediuko S.C., U. Ijoma, O. Obienu, and C. Agunyenwa, “Gastroesophgeal reflux disease: a clinical and endoscopic study of Nigerian patients,” *The Internet Journal of Gastroenterology*, 2009.

Nwokediuko SC. Current trends in the management of gastroesophageal reflux disease: a review. *ISRN Gastroenterol*. Epub 2012 Jul 11.

O’Shaughnessy JA, Kelloff GJ, Gordon GB, Dannenberg AJ, Hong WK, Fabian CJ, Sigman CC, Bertagnolli MM, Stratton SP, Lam S, Nelson WG, Meyskens FL, Alberts DS, Follen M, Rustgi AK, Papadimitrakopoulou V, Scardino PT, Gazdar AF, Wattenberg LW, Sporn MB, Sakr WA, Lippman SM, Von Hoff DD. Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. *Clin Cancer Res*, 2002.

Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammationinduced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 2003.

Omenn GS. Strategies for plasma proteomic profiling of cancers. *Proteomics* 2006.

Orlando R.C. “Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease”. *J Clin Gastroenterol*. 2008

Orlando RC, Lacy ER, Tobey NA, Cowart K. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1992 Mar.

Orlando Roy C., MD, Mary Kay & Eugene Bozymski and Linda & William Heizer “The integrity of the esophageal mucosa. Balance between offensive and defensive mechanism” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2010.

- Pagotto U., Marsicano G., Cota D., Lutz B., Pasquali R. "The emerging role of the endocannabinoid system in the regulation of feeding behavior." *Nature Reviews Neuroscience* 2006.
- Patterson M, Dhand R. Functional genomics. *Nature* 2000.
- Patti M.G., W. J. Gasper, P. M. Fisichella, I. Nipomnick, and F. Palazzo, "Gastroesophageal reflux disease and connective tissue disorders: pathophysiology and implications for treatment," *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2008
- Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001.
- Pera M, Manterola C, Vidal O, et al. Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2005.
- Pertwee RG Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001
- Petricoin E, Wulfkuhle J, Espina V, Liotta LA. Clinical proteomics: revolutionizing disease detection and patient tailoring therapy. *Journal of Proteome Research* 2004.
- Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J, Chamaillard M. IBD serological panels: facts and perspectives. *Inflamm Bowel Dis* 2007.
- Pinheiro PF, Simões e Silva AC, Pereira R. Current knowledge on esophageal atresia. *World J Gastroenterol*. 2012 Jul 28
- Pinto L, Capasso R, Di Carlo G, Izzo AA. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002.
- Piomelli D. "The molecular logic of endocannabinoid signalling". *Nat rev Neurosci* 2003.
- Pohl D. and R. Tutuian, "Reflux monitoring: pH-metry, bilitec and oesophageal impedance measurements," *Best Practice and Research*, 2009.
- Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst*. 2005
- Porter AC, Felder CC The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 2001
- Puntmann VO. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J* 2009.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics* 2010.
- Rajendra S., K. Kutty, and N. Karim, "Ethnic differences in the prevalence of endoscopic esophagitis and Barrett's esophagus: the long and short of it all," *Digestive Diseases and Sciences*, 2004.
- Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol*. 2004.

- Rees J.R., B.A. Onwuegbusi, V.E. Save, D. Alderson, R.C. Fitzgerald, In vivo and in vitro evidence for transforming growth factor-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma, *Cancer Res.* 2006
- Richardson P, C. J. Hawkey, and W. A. Stack, "Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders," *Drugs*, 1998
- Rieder F, Biancani P, Harnett K, Yerian L, Falk GW *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. 2010 May.
- Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992..
- Ruigomez A, M. A. Wallander, S. Johansson, and L. A. G. Rodríguez, "Irritable bowel syndrome and gastroesophageal reflux disease in primary care: is there a link?" *Digestive Diseases and Sciences*, 2009.
- Saegusa ., M. Hashimura, T. Kuwata, M. Hamano, Y. Wani, I. Okayasu, A functional role of Cdx2 in beta-catenin signaling during transdifferentiation in endometrial carcinomas, *Carcinogenesis* 2007
- Sanger GJ. Endocannabinoids and the gastrointestinal tract: what are the key questions? *Br J Pharmacol.* 2007
- Santhoshi Bandla, Pennathur Arjun, Luketich James D. , Beer David G. , Lin Lin, Bass Adam J., Godfrey Tony E. , and Litle Virginia R. Comparative Genomics of Esophageal Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma *Ann Thorac Surg.* 2012.
- Sarosiek J, Feng T, McCallum R. The interrelationship between salivary epidermal growth actor and fuctional integrity of the esophageal mucosa. *Am J Med Sci* 1991.
- Sarosiek J, Namiot Z, Piascik R, et al. What part do the mucous cells of submucosal mucous glands play the esophageal pre-epithelial barrier? In: Giuli R, Tytgat GNJ, DeMeester TR, eds. *The Esophageal Mucosa*. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 2003.
- Shaheen N. J. , Hansen R. A., Morgan D. R., The burden of gastrointestinal and liver diseases, *American Journal of Gastroenterology*, 2006.
- Simondi D, Mengozzi G, Betteto S, et al. Antiglycan antibodies as serological markers in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008.
- Singh S, Bradley LA, Richter JE. Determinants of oesophageal "alkaline" pH environment in controls and patients with gastro.oesophageal reflux disease. *Gut* 1993.
- Song S, Ajani JA The role of microRNAs in cancers of the upper gastrointestinal tract.*Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 .

- Sontag S. J., Sonnenber A. , Schnell T. G., Ley J. , and Metz A., The long-term natural history of gastroesophageal reflux disease, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2006
- Stefanidis D, W. W. Hope, G. P. Kohn, P. R. Reardon, W. S. Richardson, and R. D. Fanelli, "Guidelines for surgical treatment of gastroesophageal reflux disease," *Surgical Endoscopy*, 2010.
- Stein H.J. and T. R. DeMeester, "Outpatient physiologic testing and surgical management of foregut motility disorders," *Current Problems in Surgery*, 1992.
- Sutton CL, Kim J, Yamane A, et al. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000.
- Syanfield Cindy L., Germann William J. *Fisiologia*, terza edizione (2009), EdiSES
- Takadera T, Ohyashiki T. Calmodulin inhibitor-induced apoptosis was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2007.
- Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996.
- Tobey NA, Djukic Z, Brighton LE, Gambling TM, Carson JL, Orlando RC. Lateral cell membranes and shunt resistance in rabbit esophageal epithelium. *Dig Dis Sci*. Jul 2010.
- Vakil N., van Zanten S. V., Kahrilas P., The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus, *American Journal of Gastroenterology*, 2006.
- Vassallo M, Camilleri M, Phillips SF, Brown ML, Chapman NJ, Thomforde GM. Transit through the proximal colon influences stool weight in the irritable bowel syndrome.
- Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Haro A, Guzmán M. Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Sci* 2005.
- Vidal M, Chan DW, Gerstein M, Mann M, Omenn GS, Tagle D, et al. The human proteome—a scientific opportunity for transforming diagnostics, therapeutics, and healthcare. *Clinical Proteomics* 2012.
- Villanacci V, Bassotti G, Salemme M, Rossi E. Influence of genetics on tumoral pathologies: The example of the adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012
- Wade A. Derivation versus validation. *Arch Dis Child* 2000.
- Wahlqvist P., Reilly M. C., and Barkun A., Systematic review: the impact of gastro-oesophageal reflux disease on work productivity, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2006.
- Wallace MJ, Martin BR, DeLorenzo RJ. Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur J Pharmacol*. 2002.
- Wang D, Wang H, Ning W, Backlund MG, Dey SK, DuBois RN. Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. *Cancer Res* 2008.

Watanabe, Y. Fujiwara, M. Shiba et al., "Cigarette smoking and alcohol consumption associated with gastro-oesophageal reflux disease in Japanese men," *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 38, no. 8, pp. 807–811, 2003.

Watson R. G. P., Tham T. C. K., Johnston B. T., and McDougall N. I., Double blind cross-over placebo controlled study of omeprazole in the treatment of patients with reflux symptoms and physiological levels of acid reflux—the 'sensitive oesophagus', *Gut*, 1997.

Weber C, Davis CS, Shankaran V, Fisichella PM. Hiatal hernias: a review of the pathophysiologic theories and implication for research. *Surg Endosc*. 2011 Oct.

Wong W. M., K. C. Lai, K. F. Lam et al., "Prevalence, clinical spectrum and health care utilization of gastro-oesophageal reflux disease in a Chinese population: a population-based study," *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2003.

Woodward DF, Liang Y, Krauss AH. Prostanoids (prostaglandinethanolamides) and their pharmacology. *Br J Pharmacol* 2008.

Wright K et al. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 2005.

VI. Pubblicazioni

Maria Chiara Valerii, Massimo Benaglia, Cinzia Caggiano, Alessio Papi, Antonio Strillacci, **Giorgia Lazzarini**, Massimo Campieri, Paolo Gionchetti, Fernando Rizzello, and Enzo Spisni
Drug delivery by polymeric micelles: an in vitro and in vivo study to deliver lipophilic substances to colonocytes and selectively target inflamed colon.
Nanotechnology, Biology, and Medicine, Dec 6.

Calabrese C, Marzano V, Urbani A, **Lazzarini G**, Valerii MC, Liguori G, Di Molfetta S, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Spisni E.
Distinct proteomic profiles characterise non-erosive from erosive reflux disease.
Aliment Pharmacol Ther. 2011 Aug 17.

Strillacci A, Griffoni C, **Lazzarini G**, Valerii MC, Di Molfetta S, Rizzello F, Campieri M, Moyer MP, Tomasi V, Spisni E.
Selective cyclooxygenase-2 silencing mediated by engineered E. coli and RNA interference induces anti-tumour effects in human colon cancer cells
Br J Cancer. 2010 Aug 17.

Strillacci A, Griffoni C, Valerii MC, **Lazzarini G**, Tomasi V, Spisni E.
RNAi- based strategies for cyclooxygenase-2 inhibition in cancer.
J Biomed Biotechnol. 2010.

Calabrese C, Spisni E, Liguori G, **Lazzarini G**, Valerii MC, Strillacci A, Gionchetti P, Pagotto U, Campieri M, Rizzello F.
Potential role of the cannabinoid receptor CB1 in the pathogenesis of erosive and non-erosive gastro-oesophageal reflux disease.
Aliment Pharmacol Ther. 2010 May 22.

A. Strillacci, C. Griffoni, P. Sansone, P. Paterini, G. Piazza, **G. Lazzarini**, E. Spisni, MA. Pantaleo, G. Biasco, and V. Tomasi
miR-101(1) downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells
Exp Cell Res. 2009 May 1.

