

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE**

Ciclo XXXII

Settore Concorsuale: 07/H1
Settore Scientifico Disciplinare: VET/01

Aspetti Morfo-Fisiologici dell'Apparato Digerente nei Mammiferi

Presentata da: Dott.ssa Agnese Stanzani

Coordinatore Dottorato

Prof. Arcangelo Gentile

Supervisore

Prof. Paolo Clavenzani

Esame finale anno 2020

Abstract Tesi

La tesi verte sullo studio morfo-fisiologico e/o patologico del tratto gastrointestinale (GI) di mammiferi.

La prima ricerca è basata sull'identificazione, attraverso metodiche di next generation sequencing, di geni coinvolti nell'insorgenza di acalasia sporadica nell'uomo. Tale patologia risulta caratterizzata dalla presenza di anomalie a carico di neuroni del plesso mienterico e cellule interstiziali di Cajal (ICC), che esita in una compromissione della peristalsi del tratto esofageo. È emerso che nei pazienti con acalasia vs controlli il gene C-KIT è down-regolato, mentre INPP4B è up-regolato. Questi geni risultano essere importanti per lo sviluppo e differenziamento neuronale e delle ICC.

Il secondo argomento verte allo studio dei processi di de- e fosforilazione della proteina Tau in condizioni fisiologiche e neurodegenerative. Nell'Alzheimer si osserva un accumulo irreversibile di phospho-Tau che induce neurotossicità. Nell'encefalo di animali letargici la proteina Tau viene iperfosforilata in ipotermia, ma defosforila al rientro della normotermia. Inducendo torpore sintetico nel ratto si è osservato che nel sistema nervoso centrale e nel tratto gastrointestinale la phospho-Tau si accumula durante lo stato ipotermico, ma defosforila al ripristino delle temperature fisiologiche. Comprendere le modificazioni associate alla Tau può rappresentare un valido supporto per meglio comprendere quali meccanismi sono alterati in condizioni patologiche.

L'ultima parte delle ricerche è stata finalizzata allo studio della distribuzione dei recettori per cannabinoidi quali CB1R, CB2R, GPR55, PPAR α , PPAR γ , TRPA1 e 5-HT1aR, nel tratto GI di gatto attraverso metodiche immunoistochimiche. Molti autori riportano come l'attivazione di questi recettori svolga un ruolo chiave nei processi infiammatorie ed in generale sulla sensibilità viscerale. La conoscenza della presenza e distribuzione di questi recettori può rappresentare un efficace contributo per future applicazioni in campo farmaceutico/terapeutico.

La parte finale dell'elaborato contiene progetti ai quali ho partecipato che esulano dalla tematica principale della tesi ma che hanno esitato in pubblicazioni o partecipazioni a Congressi.

INPP4B overexpression and c-KIT downregulation in human achalasia

1 Introduzione	1
1.1 <i>Il Sistema Nervoso Enterico: organizzazione morfo-funzionale</i>	3
1.2 <i>Organizzazione dei Plessi</i>	6
1.3 <i>Classificazione dei neuroni del SNE</i>	9
1.4 <i>Cellule Interstiziali di Cajal (ICC)</i>	14
1.5 <i>Alterato funzionamento del SNE e conseguenti anomalie della motilità del tGI</i>	15
1.5.1 <i>Gastroparesi</i>	15
1.5.2 <i>Malattia di Hirschsprung (HSCR)</i>	16
1.6 <i>Acalasia</i>	17
1.6.1 <i>Eziopatogenesi</i>	18
2 Scopo	26
3 Materiali e Metodi	27
3.1 <i>Reclutamento dei pazienti e dei tessuti</i>	27
3.2 <i>Estrazione dell'RNA, allestimento della libreria e sequenziamento dell'RNA (RNAseq)</i> . 27	
3.3 <i>Analisi dei dati di RNAseq</i>	29
3.4 <i>Validazione dei dati</i>	30
3.4.1 <i>Estrazione DNA</i>	30
3.4.2 <i>Retrotrascrizione</i>	31
3.4.3 <i>PCR Real time (RT-PCR)</i>	32
3.4.4 <i>Western Blot</i>	34
3.4.5 <i>Immunoistochimica (IHC)</i>	35
3.4.6 <i>Analisi Statistica</i>	36
4 Risultati	37
4.1 <i>Analisi dell'RNA totale tramite RNAseq</i>	37
4.2 <i>Analisi dei geni tramite software PANTHER</i>	39
4.3 <i>Analisi dei network molecolari in cui sono coinvolti i geni alterati nell'acalasia</i>	40
4.4 <i>Conferma dei risultati di RNAseq</i>	42
4.4.1 <i>PCR real-time quantitativa (rt-qPCR) su 9 geni selezionati</i>	42
4.4.2 <i>Western Blot su proteine estratte da tessuto esofageo</i>	45
4.4.3 <i>Immunoistochimica (IHC) sviluppata con tecnica DAB su biopsie a tutto spessore</i> . 47	
4.4.4 <i>INPP4B: importanza nel signaling di Akt?</i>	48
5 Discussione	50
6 Bibliografia	52

Phosphorylation and Dephosphorylation of Tau Protein During Synthetic Torpor

1 Introduzione	61
1.1 <i>Espressione e Struttura della Proteina Tau</i>	61
1.2 <i>Ruolo Fisiologico della Proteina Tau</i>	65
1.3 <i>Ruolo Patologico della Proteina Tau</i>	66

1.4 Ruolo della proteina Tau nel torpore.....	71
1.5 Sistema Nervoso Centrale e Controllo della Termoregolazione.....	75
1.6 Torpore Sintetico.....	78
2 Scopo.....	82
3 Materiali e Metodi.....	83
3.1 Animali.....	83
3.2 Procedura Chirurgica.....	83
3.3 Torpore Sintetico.....	84
3.4 Immonoistochimica.....	86
3.5 Acquisizione Immagini e Analisi.....	88
3.6 Analisi Statistica.....	91
4 Risultati.....	93
4.1 Analisi complessiva delle aree encefaliche AT8-pTau-IR.....	93
4.2 Analisi delle singole aree encefaliche AT8-pTau-IR.....	93
4.2.1 N30 (campioni ottenuti durante l'induzione del TS).....	93
4.2.2 N (campioni ottenuti durante il TS, al nadir ipotermico).....	94
4.2.3 ER (campioni ottenuti durante early recovery da TS, quando la TB raggiunge 35,5°C)	94
4.2.4 R6 (campioni ottenuti 6h dopo aver raggiunto 35,5°C).....	94
4.2.5 R38 (campioni ottenuti 38h dopo aver raggiunto 35,5°C).....	95
4.3 Cellule e fibre pTau-IR nel tGI (dati preliminari).....	101
5 Discussione.....	105
6 Bibliografia.....	111

Localization of cannabinoid receptors in the cat gastrointestinal tract

1 Introduzione.....	122
1.1 La Cannabis nell'antichità.....	122
1.2 La Cannabis nella storia moderna.....	124
1.3 Il Sistema Endocannabinoide: un quadro molecolare.....	126
1.3.1 Recettori associati a proteine G: CB1R, CB2R, GPR55.....	128
1.3.2 Recettori canale che determinano variazioni transitorie di potenziale TRP: TRPV1 e TRPA1.....	134
1.3.3 Recettori attivati dai proliferatori perossisomiali: PPAR α e PPAR γ	138
1.3.4 Recettori per la serotonina (5-HT).....	141
1.4 I Fitocannabinoidi.....	143
1.5 Gli Endocannabinoidi.....	147
1.5.1 Anandamide e 2-arachidonoil-glicerolo.....	148
1.5.2 Palmitoiletanolamide (PEA).....	150
1.6 Cannabinoidi Sintetici.....	153
1.7 Anatomia Microscopica del tGI.....	155
1.7.1 Stomaco.....	156
1.7.2 Intestino tenue.....	157

1.7.3 Intestino Crasso	162
<i>1.8 Ruolo fisiologico dei cannabinoidi nel tGI</i>	163
1.8.1 Food Intake.....	163
1.8.2 Vomito e nausea.....	164
1.8.3 Secrezione gastrica e intestinale.....	165
1.8.4 Motilità del tGI.....	165
1.8.5 Secrezione di fluidi.....	168
1.8.6 Sensibilità viscerale.....	169
1.8.7 Infiammazione.....	169
1.8.8 Cancro	170
2 Scopo	172
3 Materiali e metodi	173
3.1 Reclutamento degli animali.....	173
3.2 Raccolta dei tessuti.....	173
3.3 Reazione di Immunofluorescenza (IF)	174
3.4 Specificità degli anticorpi primari	176
3.5 Analisi di Western Blot.....	177
4 Risultati	180
4.1 CB1R	180
4.2 CB2R	183
4.3 GPR55	186
4.4 PPAR α	188
4.5 PPAR γ	188
4.6 TRPA1	190
4.7 5-HT1aR.....	190
5 Discussione	192
6 Bibliografia	200

Altri Progetti e Attività Svolte

1 Hibernation and Radioprotection: Gene Expression in the Liver and testicle of Rats Irradiated under Syntethic Torpor	223
2 Neuropeptidergic profile of hypothalamic neurons involved in the control of brown and white adipose tissue in normal rats and obese rats fed with high energy diet from early age	242
3 Novel mutations in neurogenic chronic intestinal pseudoobstruction identified by high-throughput sequencing	244
4 Taste receptors expression in the gastrointestinal tract in an animal model of artificial torpor	246

Prefazione primo argomento

Durante il primo anno di dottorato mi sono occupata dello studio dell'acalasia (ACA), grave patologia del tratto gastrointestinale che interessa l'esofago, che si presenta con mancanza di peristalsi esofagea e conseguente assenza di deglutizione. Sebbene casi di acalasia siano principalmente attestati nell'uomo, anche nel regno animale si parla di patologie ad interessamento esofageo che causano un fenotipo simile (i.e. megaesofago nel cavallo, cane). Questa analisi genetico-molecolare permette di gettare le basi per la descrizione della patogenesi di questa malattia nelle forme idiopatiche. Lo studio è stato svolto in collaborazione con il DIMEC – Ospedale Sant'Orsola-Malpighi con il gruppo del Professor Roberto De Giorgio. Questo studio ha esitato nella pubblicazione di un lavoro su *Neurogastroenterology and Motility* e un abstract (premio miglior poster) al congresso del “Gruppo Italiano per lo Studio della Motilità dell'Apparato Digerente” (GISMAD) che si è svolto a marzo 2017.

Abstract Lavoro

INPP4B overexpression and c-KIT downregulation in human achalasia

Bonora E¹, Bianco F^{1,2}, **Stanzani A**^{1,2}, Giancola F^{1,2,3}, Astolfi A⁴, Indio V⁴, Evangelisti C⁵, Martelli AM⁵, Boschetti E^{1,3}, Lugaesi M¹, Ioannou A¹, Torresan F⁶, Stanghellini V¹, Clavenzani P², Seri M¹, Moonen A⁷, Van Beek K⁷, Wouters M⁷, Boeckxstaens GE⁷, Zaninotto G⁸, Mattioli S¹, De Giorgio R⁹

¹Department of Medical and Surgical Sciences, DIMEC, University of Bologna and St. Orsola-Malpighi Hospital, Bologna, Italy; ²Department of Medical and Veterinary Sciences, DIMEVET, University of Bologna, Bologna, Italy; ³Centro di Ricerca Biomedica Applicata, St.Orsola-Malpighi Hospital, Bologna, Italy; ⁴Interdepartmental Center for Cancer Research “G. Prodi” (CIRC), University of Bologna, Bologna, Italy; ⁵Department of Experimental Medicine, DIMES, University of Bologna, Bologna, Italy; ⁶Department of Digestive System, St. Orsola-Malpighi Hospital, Bologna, Italy; ⁷Translational Research in GastroIntestinal Disorders (TARGID), Department of Clinical and Experimental Medicine, KU Leuven University, Leuven, Belgium; ⁸Division of Surgery, Imperial College London, London, UK; ⁹Department of Medical Sciences, Nuovo Arcispedale S.Anna at Cona (Ferrara), University of Ferrara, Ferrara, Italy

Background: Achalasia is a rare motility disorder characterized by myenteric neuron and interstitial cells of Cajal (ICC) abnormalities leading to deranged/absent peristalsis and lack of relaxation of the lower esophageal sphincter. The mechanisms contributing to neuronal and ICC changes in achalasia are only partially understood. Our goal was to identify novel molecular features occurring in patients with primary achalasia. Methods: Esophageal full- thickness biopsies from 42 (22 females; age range: 16- 82 years) clinically, radiologically, and manometrically characterized patients with primary achalasia were examined and compared to those obtained from 10 subjects (controls) undergoing surgery for uncomplicated esophageal cancer (or upper stom -ach disorders).

Tissue RNA extracted from biopsies of cases and controls was used for library preparation and sequencing. Data analysis was performed with the “edgeR” option of R-Bioconductor. Data were validated by real-time RT-PCR, western blotting and immunohistochemistry. Key Results: Quantitative transcriptome evaluation and cluster analysis revealed 111 differentially expressed genes, with a $P \leq 10^{-3}$. Nine genes with a $P \leq 10^{-4}$ were further validated. CYR61, CTGF, c-KIT, DUSP5, EGR1 were downregulated, whereas AKAP6 and INPP4B were upregulated in patients vs controls. Compared to control immunohistochemical analysis revealed a clear increase in INPP4B, whereas c-KIT immunolabeling resulted downregulated. As INPP4B regulates Akt pathway, we used western blot to show that phospho-Akt was significantly reduced in achalasia patients vs controls. Conclusions & Inferences: The identification of altered gene expression, including INPP4B, a regulator of the Akt pathway, highlights novel signaling pathways involved in the neuronal and ICC changes underlying primary achalasia. KEYWORDS: achalasia, cell signaling, c-KIT, INPP4B, transcriptome

Abbreviazioni:

- **ACA:** Acalasia
- **tGI:** Tratto Gastrointestinale
- **SNE:** Sistema Nervoso Enterico
- **SNP:** Sistema Nervoso Periferico
- **SNC:** Sistema Nervoso Centrale
- **ICC:** Cellule Interstiziali di Cajal
- **SNA:** Sistema Nervoso Autonomo
- **MP:** Plesso Mienterico
- **SMP:** Plesso Sottomucoso
- **LES:** Sintere Esofageo Inferiore

1 Introduzione

Il Tratto Gastrointestinale (tGI) è un organo altamente complesso per la sua struttura e per la sua funzione. Esso è costituito da muscolature specifiche, come ad esempio gli sfinteri, che lo suddividono in regioni ben differenziate con caratteristiche funzionali completamente differenti. La presenza di queste muscolature fa sì che i cibi vengano distribuiti in senso oro-aborale ad una velocità adeguata tale da favorire che ogni compartimento del tGI svolga adeguatamente la sua funzione di assorbimento. La muscolatura che caratterizza il tGI è sia di tipo liscio che scheletrico (primo terzo dell'esofago e sfintere anale esterno) e la loro coordinazione in pattern motori ben definiti favorisce diverse funzioni lungo tutto il canale alimentare, come la triturazione (stomaco), segmentazione (intestino tenue) e austrazione (colon), che mescolano (o trattengono temporaneamente) i contenuti endoluminali prima della propulsione ed espulsione del materiale indigerito sotto forma di feci (Furness JB et al., 2014). Le secrezioni favoriscono il mantenimento del corretto pH lungo tutto il tGI, regolando in concerto alla motilità l'osmolarità, le secrezioni enzimatiche e la produzione di muco endoluminale. Il lume è separato dal milieu interno corporeo per mezzo di una barriera mucosa semipermeabile, in costante rigenerazione (Clevers H, 2013). Questa barriera è fondamentale non solo per tutti i processi di assorbimento, ma anche perché previene il leakage di molecole fondamentali che altrimenti verrebbero perse dal versante endoluminale, per la traslocazione di enzimi digestivi, di tossine e di germi della flora intestinale (microbiota) all'interno dell'organismo. La barriera epiteliale è supportata meccanicamente da una matrice di tessuto connettivo lasso, con all'interno una grande varietà di cellule del sistema immunitario. Si può concludere dicendo che tutte queste funzioni estremamente complesse, ossia motilità, secrezione, barriera mucosa, attività immunologica, hanno alla base un livello di coordinazione e regolazione che vengono orchestrate del sistema nervoso caratteristico del tGI, ovvero il Sistema Nervoso Enterico (SNE) (Furness JB e Costa M, 1987). Il SNE è la struttura più complessa del Sistema Nervoso Periferico (SNP), esso è caratterizzato da un numero molto elevato di neuroni e cellule gliali che sono distribuiti per tutta la lunghezza del tratto alimentare, biliare e

pancreatico (Gershon MD 1998). Il SNE controlla le funzioni del tGI creando un vero e proprio network che prende il nome di “brain-in-the-gut”, un vero e proprio cervello nell’apparato digerente, in quanto il SNE è in grado di mantenere un’attività nervosa anche in assenza di input da parte del Sistema Nervoso centrale (SNC) e dal SNP (Gershon MD 1998). Molte condizioni patologiche o *noxae* possono sfociare in una neuropatia enterica: una alterazione morfo-funzionale del SNE responsabile di meccanismi fisiopatologici e disturbi gastrointestinali (Knowles CH et al., 2013). Infatti, danni funzionali ai neuroni enterici esitano nella maggior parte dei casi in alterazione della coordinazione delle attività motorie con conseguente anomalia del transito intestinale (Goyal RK e Hirano I, 1996). Inoltre, alterazioni nella muscolatura liscia, nelle cellule interstiziali di Cajal (ICC) e nella glia enterica possono essere alla base della patogenesi delle dismotilità del tGI (Di Nardo G et al., 2008). Sono note da letteratura una serie di patologie estrinseche come quelle causate da diabete mellito e amiloidosi, riconoscibili soprattutto per i disordini che causano a livello sistemico, ma soffermandoci sull’acalasia, in questo caso si tratta di una patologia circoscritta a livello del tGI, prettamente all’esofago, che per questo motivo prende il nome di malattia intrinseca. L’eziologia della maggior parte di queste patologie ad oggi non è del tutto nota. La gravità di queste neuropatie intrinseche dipende dal grado di interessamento del sistema nervoso e del segmento di apparato digerente coinvolto. Tra le più gravi patologie a fenotipo motorio ricordiamo ad esempio: la malattia di Hirschsprung, che presenta un mancato sviluppo dei gangli del tratto distale dell’intestino (aganglionosi); la pseudo-ostruzione intestinale cronica, caratterizzata da sub-occlusioni intestinali in assenza di una reale causa meccanica; la gastroparesi, caratterizzata da un ritardo dello svuotamento gastrico; e l’acalasia, patologia che altera la motilità dell’esofago (Knowles CH et al., 2013; Furness JB 2012).

1.1 Il Sistema Nervoso Enterico: organizzazione morfo-funzionale

Dato il suo ruolo centrale nella patogenesi delle dismotilità del tGI, è necessaria una breve presentazione delle caratteristiche anatomiche e funzionali del SNE.

Il SNE, assieme al Sistema Nervoso Simpatico e Parasimpatico, costituisce il Sistema Nervoso Autonomo (SNA), componente principale del Sistema Nervoso Periferico. Il SNA regola le funzioni fisiologiche involontarie quali la frequenza cardiaca, la pressione arteriosa, la respirazione, la digestione e i comportamenti sessuali. Il Sistema Nervoso Simpatico e Parasimpatico contengono le fibre afferenti ed efferenti che trasportano input sensitivi e motori rispettivamente verso e dal SNC. Generalmente questi due sistemi sono formati da due serie di neuroni: un neurone pregangliare con il corpo cellulare nel SNC e uno postgangliare con pirenoforo alla periferia, che innerva direttamente il tessuto target. Il SNE a differenza degli altri elementi del SNP, è costituito da un network di neuroni e cellule di supporto (cellule gliali) che sono interconnessi da fibre nervose intergangliari. Questi neuroni hanno la caratteristica di funzionare autonomamente, senza dipendere dal SNC (Sternini C 1997; Karemaker JM 2017).

Il SNE origina dalla cresta neurale vagale con cellule che migrano in direzione rostro-caudale attraverso la parete intestinale, formando questo network composto da glia e neuroni. Le cellule del SNE completano la loro migrazione da quattro a sette settimane di sviluppo e arrivano ad esprimere tutti i tipi di neurotrasmettitori alla ventiquattresima settimana di gestazione. Nonostante tutto, la motilità del tGI comincia a manifestarsi tra le ultime settimane di gestazione e i primi giorni di vita. Il SNE è costituito da oltre 100 milioni di neuroni con più di 15 morfologie, un numero maggiore della somma di tutti i gangli periferici, ed è il principale responsabile delle funzioni digestive. Il SNE è quindi caratterizzato dalla presenza di pathways nervosi riflessi che controllano le funzioni digestive attraverso la contrazione/rilassamento dei muscoli, secrezione/assorbimento e flusso sanguigno (Sasselli V et al., 2012; Lake JI et al., 2013; Siéssere S et al., 2008). L'elevata complessità di questo sistema fa sì che esso venga definito anche *little brain* o secondo cervello (De Giorgio R e Camilleri M, 2004; Gershon MD 2006).

Il SNE è formato da neuroni afferenti primari, sensibili a stimoli meccanici e chimici, interneuroni e motoneuroni che hanno come target la muscolatura o le cellule pacemaker (Cellule Interstiziali di Cajal), vasi sanguigni, ghiandole, epitelio e cellule del sistema immunitario che presiedono a quelle che sono le funzioni digestive, di assorbimento e attività motoria del tGI. Nonostante la sua autonomia, il SNE, in concerto con SNC e SNP modula le funzioni digestive. Quello che si crea è un sistema bidirezionale di controllo di un flusso di informazioni rispettivamente tra SNE - SNC e SNE - gangli simpatici paravertebrali. SNE ed SNC sono connessi tra loro attraverso il nervo vago, plesso pelvico e vie simpatiche. Le vie nervose generate dal SNC controllano i movimenti della muscolatura striata esofagea. Attraverso riflessi vago-vagali il SNC ha il compito di controllare anche lo stato di pienezza, l'attività contrattile e la secrezione acida dello stomaco. Contrariamente, il SNE nel piccolo intestino e colon presenta una serie di circuiti riflessi autonomi, formati da neuroni sensitivi, interneuroni e motoneuroni. Le funzioni di piccolo e grande intestino sono controllate dalla componente intrinseca del SNE, ma quest'ultimo, anche se topograficamente separato dal SNC, non può definirsi autonomo. La modulazione delle funzioni gastrointestinali non è altro che un sistema integrato di riflessi enterici locali, riflessi che vengono trasmessi attraverso i gangli simpatici e riflessi che passano attraverso l'intestino previo controllo del SNC. Riassumendo, le connessioni tra SNC e SNE possono essere classificate in vagale, spinale toraco-lombare e spinale lombo-sacrale (pelvica). Le afferenze sono costituite da neuroni pre-enterici che terminano in gangli enterici e controllano o modificano le attività dei neuroni enterici. Dal SNC partono invece vie che contengono neuroni che innervano un numero ristretto di effettori, come la muscolatura striata esofagea (innervazione vagale), gli sfinteri (innervazione simpatica) e i vasi sanguigni intrinseci (innervazione simpatica) (Furness JB et al., 2014) (**Figura 1**).

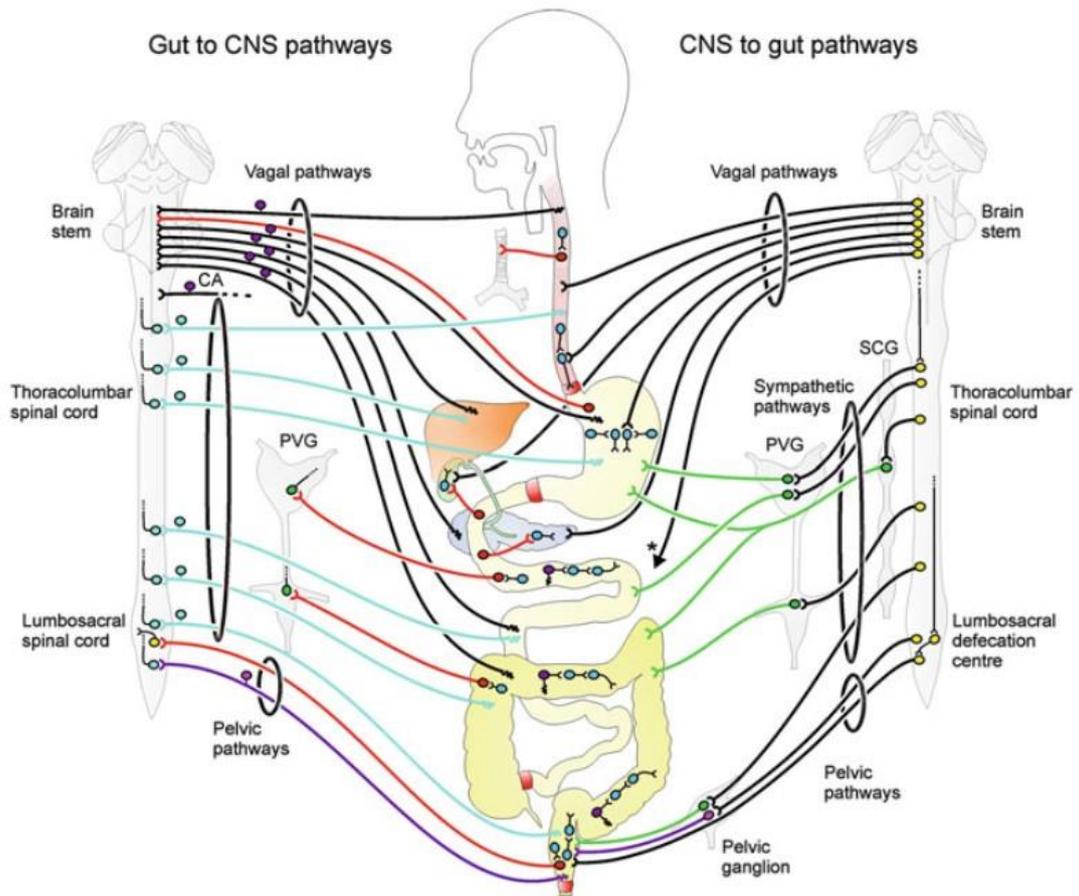


Figura 1: Rapporti tra SNC - SNP – SNE. (modificato da: Furness JB et al., 2014)

1.2 Organizzazione dei Plessi

I plessi che caratterizzano il SNE possono essere gangliari e agangliari e si distribuiscono lungo tutto il tGI a partire dall'esofago allo sfintere anale. I plessi gangliari sono la categoria più rappresentativa, costituiti sia da cellule che fibre nervose (**Figura 2**). Mentre i plessi agangliari sono costituiti da fibre nervose che innervano i vari tratti del tGI, i plessi gangliari si dividono in due tipologie: il plesso mienterico (MP), chiamato anche di Auerbach che l'ha scoperto nel 1864 (ma descritto anche da altri come Schabadash nel 1930, Stohr nel 1930, Li nel 1940) è localizzato tra la muscolatura longitudinale esterna e circolare interna, ed è quello maggiormente coinvolto nella motilità gastrointestinale e nel controllo secretivo e motorio della mucosa.

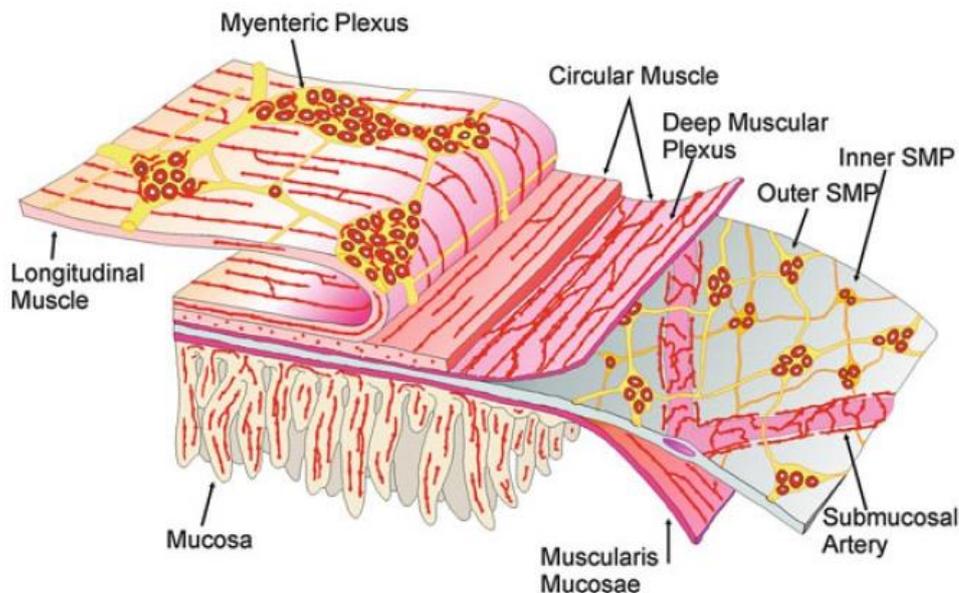


Figura 2: Rappresentazione dettagliata della configurazione della parete intestinale con in evidenza la struttura dei plessi (in rosso è possibile vedere i neuroni e la loro distribuzione) (fonte: <https://www.google.it/imghp?hl=it&tab=ri&ogbl>)

Il plesso sottomucoso (SMP) invece, anche chiamato di Meissner, ha funzione prevalentemente secretoria e di assorbimento intestinale (Furness JB 2006; Conti F 2010). Oltre alla morfologia cellulare differente, anche la neurochimica dei due plessi varia. I gangli che compongono il MP possono variare moltissimo per dimensioni, forma e distribuzione da specie a specie e da tratto considerato. Ad esempio, nell'ileo di cavia il numero di cellule nervose per ganglio varia da 5 ad oltre 200. Il MP invia proiezioni verso il plesso sottomucoso e ai gangli situati nella colecisti o nel pancreas, o anche verso i gangli simpatici prevertebrali (Conti F 2010). Può essere suddiviso in tre parti: una struttura primaria, una secondaria e una terziaria. La primaria è costituita da gangli di grossa dimensione interconnessi per mezzo di fasci nervosi (rami intergangliari); la secondaria da fasci più sottili paralleli alla muscolatura che spesso incrociano i rami intergangliari; la terziaria da fasci molto sottili che occupano gli spazi che vengono creati dalla componente primaria, con fibre prevalentemente destinate alla muscolatura intestinale (Furness JB 2006).

Il SMP risulta assente a livello esofageo e quasi del tutto assente a livello gastrico. È per lo più costituito da gangli di dimensioni molto inferiori rispetto all'MP, connettivo interposto tra la muscolatura circolare interna e la *muscularis mucosae* e da rami internodali sottili che si distribuiscono nel piccolo e grosso intestino. I gangli che lo costituiscono hanno terminazioni sull'epitelio ghiandolare, *muscularis mucosae*, cellule endocrine intestinali e vasi sanguigni. Negli animali di piccola taglia l'SMP è unico; nei mammiferi di grossa taglia ci possono essere due tipi di plesso: uno interno, nel versante sieroso della *muscularis mucosae* (plesso di Meissner propriamente detto) e uno esterno sul versante luminale della muscolatura circolare (plesso di Henle), quest'ultimo fondamentale nell'innervazione della muscolatura (Furness JB 2014; Conti F 2010). Negli animali dotati di doppio SMP, in prossimità della *muscularis mucosae* si può osservare una dislocazione di neuroni di questo plesso. Questi neuroni possono trovarsi nella lamina propria della mucosa, nell'intestino tenue, nel crasso e raramente nello stomaco (Furness JB 2006).

I plessi agangliari possono essere localizzati a livello sottosieroso (fibre che connettono nervi estrinseci e plessi intramurali), muscolare profondo (fasci nervosi connessi

principalmente all'MP), mucoso (fibre che innervano le cellule epiteliali ed endocrine della tonaca mucosa) e vascolare (fibre che innervano i vasi sanguigni) (Conti F 2010).

Esiste anche un plesso sottosieroso, localizzato nel connettivo esterno degli organi digestivi, ad esempio tra lo strato muscolare esterno dell'intestino e il rivestimento sieroso del peritoneo (Furness JB 2006).

Ogni strato muscolare ha una sua innervazione caratteristica: la longitudinale è data dal plesso muscolare longitudinale, ovvero fibre che decorrono parallele all'interno dello strato o dalla componente terziaria del plesso mienterico. L'innervazione di questo strato dipende dallo spessore: in animali grandi in cui questo strato risulta inspessito si osserva il plesso muscolare longitudinale, nelle specie in cui lo strato muscolare è sottile si osserva solo innervazione a carico delle fibre della componente terziaria. L'innervazione della circolare invece avviene tramite sottili fasci che decorrono paralleli alla lunghezza dello strato. Questi fasci risultano a contatto con la componente primaria e secondaria dell'MP e con il plesso muscolare profondo dell'intestino tenue. Nei piccoli mammiferi molti degli assoni del plesso muscolare circolare non sono altro che motoneuroni dell'MP, inoltre sono presenti fibre che derivano da cellule nervose del plesso sottomucoso esterno. Il plesso muscolare profondo e il sottomuscolare non sono altro che fasci di fibre vicino alla porzione interna dello strato muscolare circolare dell'intestino tenue e crasso. Questi fasci nervosi formano una rete continua attorno alla circonferenza e lungo tutto l'intestino, con orientamento parallelo alla direzione delle cellule della muscolatura circolare (Furness JB 2006).

1.3 Classificazione dei neuroni del SNE

I neuroni enterici possono essere classificati su base morfologica, funzionale, proprietà chimiche e proiezioni alle cellule bersaglio. Vengono distinte all'incirca 20 tipologie di cellule nervose enteriche che sono raggruppate per morfologia in tre gruppi principali: tipo I, tipo II e tipo III. La classificazione proposta qui di seguito è quella elaborata da Dogiel nel 1985, che tiene conto delle caratteristiche del pirenoforo, dell'assone e dei dendriti (**Figura 3**):

- I neuroni del tipo I sono multidendritici e uniassonali, con forma appiattita e profilo stellato. Innervano principalmente la muscolatura liscia e sono dotati di elevata eccitabilità in risposta a stimoli definiti di tipo S (da synaptic, in quanto sono i maggiori responsabili della trasmissione simpatica nicotinic gangliare). Hanno principalmente la funzione di motoneuroni, evocando la contrazione o il rilasciamento della muscolatura gastrointestinale. Alcuni di essi possono anche essere interneuroni ascendenti o discendenti (De Giorgio R et al., 2009; Furness JB 2006).
- I neuroni di tipo II di Dogiel sono cellule con numerosi dendriti dotati di un singolo assone. Alcune cellule di questa categoria hanno aspetto di classici neuroni pseudounipolari. Questi neuroni oltre a creare una comunicazione tra i vari plessi, proiettano anche a livello della mucosa. I neuroni di tipo II percepiscono gli stimoli luminali e attivano un'adeguata risposta motoria, secretoria o vascolare tramite interposizione di neuroni per via indiretta o diretta (tramite contatto con neuroni motori) (Furness JB et al., 1998). Nella cavia e nella pecora i neuroni di tipo II mostrano immunoreattività verso la calbindina, proteina che lega il calcio (Furness JB et al., 1990; Chiocchetti R et al., 2004). Questi neuroni hanno una fase di ineccitabilità particolarmente lunga e per questo vengono definiti di tipo AH (da hyperpolarization, iperpolarizzazione della membrana neuronale a seguito del singolo potenziale d'azione), sono neuroni senso-sensoriali, percepiscono stimoli meccanici, chimici e termici (ossia sono mecano-, chemo- e termocettori) (De Giorgio R et al., 2009).

- I neuroni di tipo III di Dogiel sono simili a quelli di tipo due, hanno neuroni dotati di più dendriti, ma relativamente più corti, che terminano all'interno del ganglio di origine. L'assone emerge o dal cono di emergenza o direttamente dal dendrite, decorrendo in un fascio di fibre che connette tra loro i plessi, prendendo il nome di neuroni con dendriti filamentosi. Per questa loro peculiare struttura si ipotizza che questi neuroni siano di tipo secretomotorio e vasomotorio (Conti F 2010; Furness JB 2006).

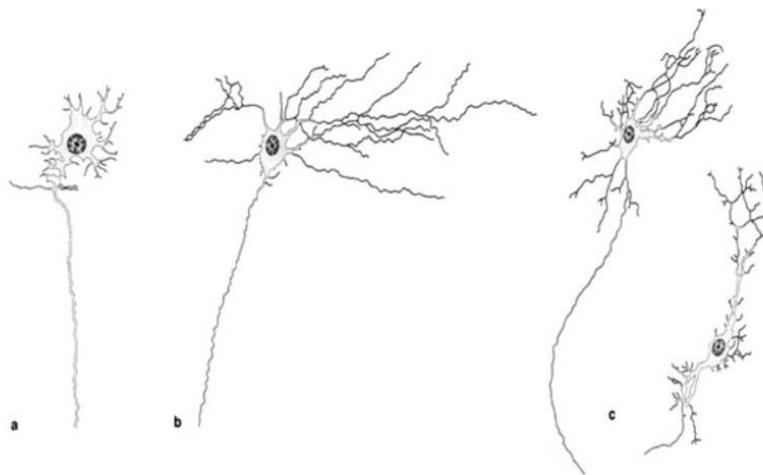


Figura 3: Neuroni secondo Dogiel. a – tipo I, b – tipo II, c – tipo III (modificato da: Furness JB, 2006)

La classificazione dei neuroni può anche essere fatta tenendo conto della loro funzionalità, suddividendoli in neuroni sensitivi - Intrinsic Primary Afferent Neurons (IPANs), neuroni intestinofugali - Intestinofugal Neurons, IFANs, interneuroni e motoneuroni (**Figura 4**).

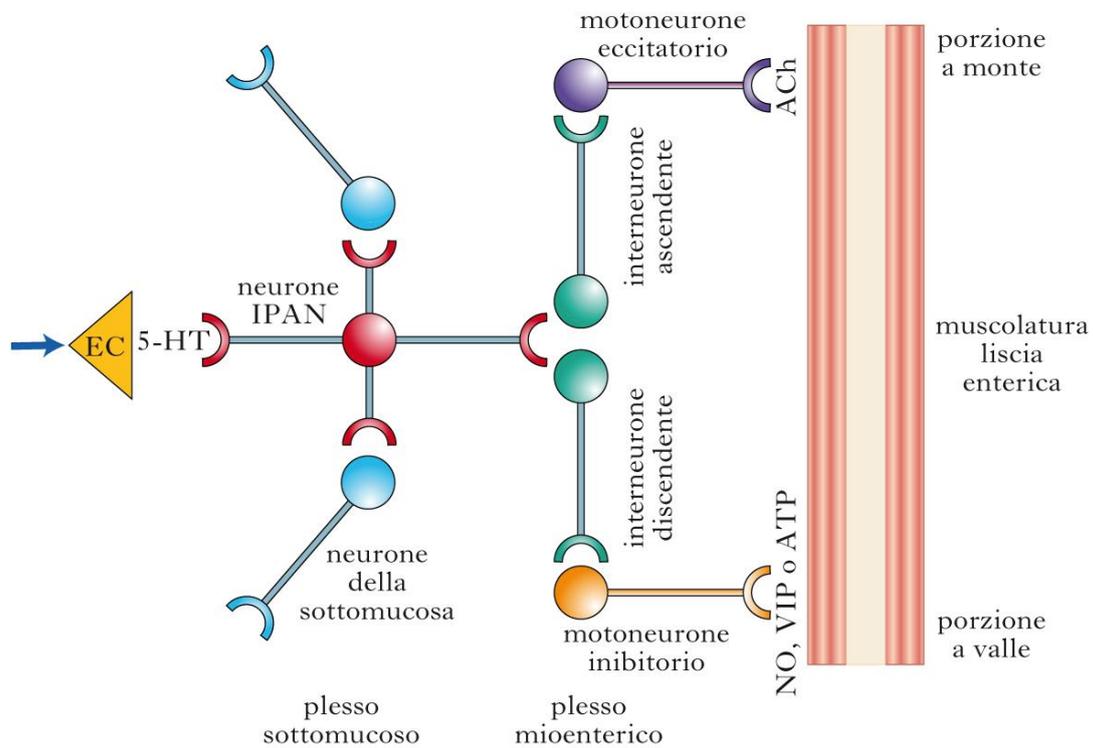


Figura 4: organizzazione dei neuroni nel tGI. (modificato da: Furness JB, 2006)

Gli IPANs sono in grado di avvertire lo stato fisico del tGI (come ad esempio la tensione della parete gastrointestinale) e il contenuto chimico del lume. Sono in grado di reagire a questi segnali favorendo un controllo della motilità, secrezione e del flusso sanguigno (Furness JB 2004). È possibile che questi neuroni siano coinvolti in cambiamenti patologici delle funzioni enteriche che si osservano a seguito di uno stato infiammatorio (Furness JB et al., 2004). I neuroni IPANs sono interconnessi tra loro, con gli interneuroni e direttamente con i neuroni motori, ricevendo sinapsi direttamente a livello dei corpi cellulari. Inizialmente sono stati identificati come grandi neuroni multiassonali (del tipo II di Dogiel), i cui corpi cellulari costituiscono all'incirca il 10 - 30 % dei neuroni nei gangli del MP e del SMP del piccolo e del grande intestino. Dato il fatto che le funzioni motorie dell'esofago sono controllate tramite il tronco encefalico, non è possibile trovare questa categoria di neuroni in questo tratto. Sono altrettanto rari a livello dello stomaco, dove la motilità viene controllata tramite pattern efferenti vagali che originano dalla *medulla oblongata* (Furness JB et al., 2014). Questi neuroni non sono propriamente dei neuroni di tipo sensitivo perché non trasmettono vere e proprie sensazioni, ma è più corretto dire che danno informazioni sullo stato di tensione della parete muscolare e sul contenuto chimico intraluminale. I neuroni sensitivi intrinseci sono suddivisi in: IPANs del plesso sottomucoso attivati a seguito di stimolazione meccanica e chimica della mucosa, IPANs del plesso mienterico attivati da stimoli chimici e infine quelli attivati per contrazione muscolare. Questi neuroni vengono attivati ad esempio da un incremento di tensione muscolare, mentre un rilasciamento ne riduce l'attivazione (Conti F et al., 2010).

Gli IFANs sono localizzati nel MP e nel SMP, inviano i loro assoni ai gangli prevertebrali dove fanno sinapsi con i neuroni gangliari simpatici (Kuntz A 1938; Szurszewski JH e Miller SM, 1994). Hanno principalmente immunoreattività a VIP/ChAT nella cavia (Anderson CR et al., 1995), nel cane invece hanno reattività per il peptide correlato al gene della calcitonina CGRP. Nell'intestino di cavia sono cellule di Dogiel di tipo I con dendriti brevi lamellari e filamentosi (Tassicker BC et al., 1999). I neuroni simpatici innervati dagli IFANs inibiscono motilità e secrezione (Furness JB 2006).

Gli interneuroni hanno morfologia di Dogiel di tipo I, sono localizzati sia in via ascendente (orale) che discendente (aborale). Gli ascendenti inviano e ricevono input sia da neuroni intrinseci contenenti calbindina che da interneuroni ascendenti (Furness JB

2006; Conti F 2010). Gli interneuroni discendenti possono avere proiezioni aborali molto lunghe e contengono quattro classi di neuroni. Una sono interneuroni colinergici che contengono neurofilamento e serotonina (come nel coniglio e nella cavia), altre due classi somatostatina e VIP, l'ultima classe contiene acetilcolina e ossido nitrico (NO), peptidi e a volte ATP. Gli interneuroni che contengono somatostatina hanno proiezioni molto lunghe e oltre all'innervazione del MP alcuni possono innervare anche SMP. Alcuni interneuroni del colon possono essere anche dei meccanocettori, e i riflessi che ne derivano sono attivati dallo stiramento (Conti F 2010; Furness JB et al., 2014).

I motoneuroni enterici sono sia di tipo eccitatorio che inibitorio e si suddividono in:

- Motoneuroni che proiettano alla muscolatura circolare e longitudinale;
- Secretomotori coinvolti nella regolazione dei processi secretivi che proiettano alle ghiandole secretorie;
- Neuroni vasomotori responsabili del flusso ematico splanchnico che innervano i vasi sanguigni;
- Motoneuroni che innervano le cellule enteroendocrine e i follicoli linfoidi.

I motoneuroni hanno principalmente morfologia di Dogiel di tipo I. gli eccitatori presentano pirenoforo più piccolo degli inibitori, inoltre, gli inibitori discendenti con proiezioni lunghe hanno il soma più grande di quelli con proiezioni corte. Queste differenze nella morfologia sono dovute al diverso contenuto neurochimico di questi neuroni. Infatti, i neuroni discendenti con proiezioni lunghe e soma grande contengono la proteina neurofilamentous protein (NFP), che è assente in quelli con proiezioni corte (Conte F 2010). I motoneuroni eccitatori hanno come neurotrasmettitore principale l'acetilcolina e le tachinine. Gli inibitori invece funzionano per mezzo di NO, VIP e ATP. Nella cavia e in piccoli mammiferi il corpo cellulare dei neuroni che innervano la muscolatura circolare è localizzato nei gangli mienterici; nel cane, nel suino, nell'uomo e nel cavallo una componente di innervazione deriva anche dai gangli sottomucosi (Furness JB et al., 2014; Sanders KM e Smith TK, 1986; Furness JB et al., 1990; Chiocchetti R et al., 2009). La maggior parte dei motoneuroni che innervano la circolare sono eccitatori colinergici con corpi cellulari localizzati in posizione aborale rispetto alla sede di innervazione. Nei piccoli animali, il soma dei motoneuroni che innervano la muscolatura longitudinale si trova nel MP. Nei grandi animali, la maggior parte di corpi

cellulari sono nel MP, ma alcuni motoneuroni della longitudinale hanno il corpo del SMP. Nell'esofago e nello stomaco invece sono le terminazioni nervose dei neuroni motori vagali che vanno ad innervare le cellule muscolari. Anche la *muscularis mucosae* è innervata da neuroni motori eccitatori e inibitori. L'innervazione nella *muscularis mucosae* è ad opera di cellule nervose localizzate nei gangli sottomucosi (Furness JB et al., 2014).

1.4 Cellule Interstiziali di Cajal (ICC)

Le ICC sono degli elementi cellulari del tGI in grado di scaturire depolarizzazioni spontanee che terminano con la genesi di potenziali elettrici che prendono il nome di pacemaker. Questi potenziali sono in grado di propagarsi da ICC a ICC tramite giunzioni cellulari che prendono il nome di tight junctions, che connettono tra loro le ICC e assieme al muscolo vanno a costituire un sincizio funzionale. Le depolarizzazioni che vengono prodotte dalle ICC sono note come onde lente. Le ICC possono essere suddivise in tre categorie:

- quelle che formano plessi attorno ai gangli mienterici (ICCs – MY), ovvero le pacemaker propriamente dette;
- ICCs dello strato muscolare (ICCs – IM);
- ICCs poste tra muscolatura circolare e sottomucosa, ovvero nel plesso muscolare profondo (ICCs – DMP).

Le ultime due categorie, essendo coinvolte nella trasduzione di input dai neuroni motori enterici alla muscolatura liscia, contribuiscono a funzioni non – pacemaker. Hanno recettori per la neurokinina1 e per la somatostatina e modulano stimoli inibitori a livello esofageo sintetizzando e rilasciando NO (Gockel I et al., 2008; De Giorgio R e Camilleri M, 2004). Le ICC esprimono il proto-oncogene c-kit, tirosina-chinasi che ha come ligando lo stem cell factor (SCF). Il legame tra queste due molecole è fondamentale per lo sviluppo, il mantenimento e la sopravvivenza delle ICCs. Infatti, topi knock out (ko) per

questo gene mostrano un fenotipo con dilatazione del tratto gastrico e assenza di peristalsi, confermando un ruolo basilare nel controllo della motilità del tGI (Farrugia G 2008).

1.5 Alterato funzionamento del SNE e conseguenti anomalie della motilità del tGI

Le malattie primitive che coinvolgono la componente neurale del tGI esitano nella maggior parte dei casi in anomalie della motilità e del transito del contenuto intestinale, ma, salvo rare eccezioni in cui l'eziologia è ben nota, il collegamento risulta essere poco chiaro. Queste malattie, chiamate anche neuropatie, vengono raggruppate in congenite, sporadiche, acquisite, associate ad altre patologie e su base iatrogena (secondarie ad altre malattie) (Furness JB 2012). Di seguito verranno riportati alcuni esempi.

1.5.1 Gastroparesi

I pazienti con gastroparesi presentano un ritardo nello svuotamento dei solidi e dei liquidi dallo stomaco. Tra i sintomi principali vi sono nausea, gonfiore, vomito, sazietà precoce e dolore nella parte alta dell'addome. Nel 50% la gastroparesi si presenta come idiopatica, oppure collegata al diabete mellito (Horowitz M e Fraser RJ, 1995; Patrick A e Epstein O, 2008). La patogenesi di questa malattia potrebbe essere causata da alterazioni nella via nervosa estrinseca autonoma adibita all'innervazione dello stomaco. Oltre ad un danno di tipo neuronale degenerativo, la gastroparesi può essere causata anche da stati infiammatori, come la ganglionite mienterica e infiammazioni derivanti da sindromi paraneoplastiche. Nei pazienti pediatrici ad esempio è più comune una forma rara di gastroparesi che si presenta con stenosi ipertrofica del piloro. Nella patogenesi di questa forma sembra essere coinvolta un'alterazione della NO sintasi dei neuroni mienterici,

questo porta ad una contrazione pilorica di tipo tonico che ha come conseguenza ipertrofia muscolare (Chinn JS e Schuffer MD, 1988).

1.5.2 Malattia di Hirschsprung (HSCR)

La malattia di Hirschsprung (OMIM*142623) fa parte del gruppo delle neuropatie enteriche ed è piuttosto conosciuta, con una prevalenza di 1/5000 nati vivi (Kapur RP 1999). In questa malattia si ha una condizione di aganglionosi, ovvero l'assenza del plesso mienterico e sottomucoso in un tratto del canale digerente, ma la porzione maggiormente colpita è quella distale. Nella HSCR si ha un arresto della migrazione delle cellule della cresta neurale in direzione cranio-caudale tra la quinta e la dodicesima settimana di gestazione, il periodo corrispondente alla formazione del tGI. La porzione agangliare è adinamica e priva di movimenti peristaltici, la porzione a monte di questo tratto invece risulta dilatata poiché deve vincere l'inerzia della porzione a valle (Bolande RP 1974). Sono presenti sia forme familiari che sporadiche, forme a segmento corto principalmente sporadiche (se limitate principalmente al retto, 60-85% dei casi) o lungo principalmente familiari (quando interessano il colon o tutto l'intestino nei casi più gravi). Le forme sporadiche rappresentano il 70%, il 12% sono associate a mutazioni e il 18% può essere associato a malattie congenite (Heanue TA e Pachnis V, 2007; Torfs CP 1998). La base genetica di questa malattia è supportata dal fatto che figli di pazienti affetti hanno un rischio 200 volte più elevato di contrarre la malattia (Passarge E 2002); vi è una maggior prevalenza nella popolazione maschile (4:1) (Badner JA et al., 1990); vi è associazione con sindromi genetiche e anomalie cromosomiche (Amiel J et al., 2008); studi in vivo su animali con aganglionosi mostrano uno specifico pattern di ereditarietà (Pichel JG et al., 1996; Shepherd IT et al., 2004; Panza E et al., 2012). Si tratta di una patologia altamente eterogenea, in quanto possono contribuire alla patogenesi sia varianti rare che molto comuni. Una frazione di pazienti presenta mutazioni nel proto-oncogene RET (50% casi familiari e 10-20% casi sporadici), che è coinvolto nello sviluppo del SNE. Altre proteine che possono essere mutate anch'esse coinvolte nello sviluppo del SNE sono *GDNF*, *NRTN*, *PSPN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *NTF3*, *NTRK3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *LICAM*, *ZFHX1B*, *KIAA1279*, *TCF4*, *PROK1*, *PROKR1*, *PROKR2*, *GFRA1*, *NRG1*, *NRG3*, *Class 3 SEMAPHORINs* (3A, 3C e 3D) e *DNMT3B* (Camilleri M 2001; Pingault V et al., 1998;

Luzón-Toro B et al., 2015). La HSCR può anche essere associata a forme sindromiche come la sindrome di Down e la Neoplasia Endocrina Multipla 2A (MEN2A), in cui si hanno mutazioni del proto-oncogene *RET* (Eng C 1999; Romeo G et al., 1998, Yin L et al., 2007).

1.6 Acalasia

Acalasia è un termine che deriva dal greco “*α-χάλασις*” (mancato rilasciamento). L’acalasia primaria è caratterizzata principalmente da perdita dei neuroni dei gangli del plesso mienterico nell’esofago e a livello dello sfintere esofageo inferiore (LES) (Furuzawa-Carballeda J et al., 2016). Fa parte del gruppo delle dismotilità, e si manifesta a livello esofageo con disfagia e rigurgito. Possono manifestarsi nelle forme più gravi anche sintomi di tipo respiratorio (come tosse notturna, aspirazioni ricorrenti e polmonite *ab ingestis*), dolore toracico e perdita di peso (Boeckxstaens GE et al., 2014). Le forme idiopatiche di acalasia rappresentano un disordine primario della motilità a livello esofageo, con una prevalenza a livello mondiale di 10 individui affetti ogni 100000, con un’incidenza di 0.3-1.63 su 100.000 adulti, incidenza che aumenta con l’età (la diagnosi solitamente viene fatta al di sopra dei 50 anni) (Farruckh A et al., 2008; Sadowski DC et al., 2010; Enestvedt BK et al., 2011); infatti, al di sopra degli 80 anni l’incidenza diventa pari a 17 casi su 100000 all’anno (95% CI 2-61). Non vi sono differenze di frequenza né fra i sessi né fra le diverse etnie (Farruckh A et al., 2008). Sulla base dei diversi tipi di contrazione esofagea è possibile distinguere tre tipologie di acalasia con tre differenti pattern di motilità alterati: tipo I con pressurizzazione minima, dove l’evento di deglutizione induce premature contrazioni simultanee; tipo II con compressione esofagea, in cui mancano completamente le contrazioni esofagee; tipo III con spasmi, in cui si hanno contrazioni simultanee in cui l’evento ha ampiezza da normale a molto elevata (Farrokhi F e Vaezi MF, 2007). Queste anomalie possono sfociare in un differente pattern di alterazione motoria, in quanto la gravità dipende da quanto tempo intercorre tra la comparsa dei sintomi e la diagnosi. Questi cambiamenti nel pattern motorio dipendono

principalmente dalla presenza di un coinvolgimento dei neuroni colinergici o meno. A livello patologico c'è un'inflammatione cronica dei neuroni del plesso mienterico dell'esofago che inizialmente coinvolge solo i neuroni inibitori, ma nelle forme più gravi vi è un interessamento anche dei neuroni eccitatori colinergici. Studi a lungo termine mostrano che in alcuni pazienti vi può essere una progressione della patologia con conseguente dilatazione del corpo dell'esofago. In queste porzioni di esofago spesso sono riscontrabili anomalie della mucosa a causa della stasi del cibo che esita in esofagiti linfocitarie e displasie. Anche se nella maggior parte dei casi si presenta come malattia sporadica, in studi all'interno di famiglie di consanguinei si è osservata la presenza di acalasia con trasmissione del tratto in maniera autosomica recessiva, monogenica e ad insorgenza precoce (MIM* 200400) (Annese V et al., 1995; Dayalan N et al., 1972; Sachdev A et al., 2004; Kaar TK et al., 1991; Stoddard CJ e Johnson AG, 1992; Boshier LP e Shaw A, 1981). Il fatto che alla base di questa patologia vi sia una componente genetica è avvalorato da uno studio su quattro gemelli monozigoti, nel quale tre coppie su quattro erano affette da acalasia (Eckrich JD e Winans CS, 1979). Inoltre, l'acalasia può presentarsi come parte di sindromi genetiche complesse (i.e. sindrome di Down, sindrome di Allgrove, neuropatia familiare viscerale) e/o con anomalie isolate (Gockel HR et al., 2010).

1.6.1 Eziopatogenesi

È oramai noto che l'acalasia è causata principalmente da una riduzione delle ICC, ma molto più importante da una perdita selettiva dei neuroni inibitori del plesso mienterico dell'esofago, che è associato ad una perdita di NO e di peptide intestinale vasoattivo (VIP). Questa componente è fondamentale al fine dello scatenarsi della malattia ed è provato dal fatto che studi in vivo su topi ko per il gene della NO sintasi neuronale (*nNOS*^{-/-}) presentano ipertensione dello sfintere esofageo inferiore con conseguente difficoltà nel rilassamento, che conducono allo sviluppo di un modello patologico simile all'acalasia in concomitanza a gastroparesi (Sivarao DV et al., 2001). Anche studi sull'uomo hanno suggerito una significativa decrescita o assenza dell'innervazione ad NO nel plesso

mienterico di pazienti con acalasia. Studi immunoistochimici su pazienti con acalasia sottoposti a chirurgia mostrano livelli bassi di VIP, nNOS, S-100, sostanza P e PGP9.5 rispetto ad individui sani. Si può quindi assumere che un'alterata produzione di NO e VIP siano coinvolte nella patogenesi di questa malattia (Gockel I et al., 2006; Patel DA et al., 2015; Hoshino N et al., 2013). L'avanzare della patologia potrebbe essere dato da un'interazione tra risposte autoimmuni e infiammatorie, possibilmente scaturite da un'infezione virale in individui geneticamente predisposti (Furuzawa-Carballeda J et al., 2016) (**Figura 5**).

Uno dei meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo di questa malattia potrebbe essere una risposta immuno-mediata a livello del plesso mienterico esofageo con conseguente stato infiammatorio accompagnato da un'infiltrazione di linfociti T, del quale però non si conosce ancora l'innescò. Questa condizione causa neuriti e ganglioniti che inizialmente non si manifestano con perdita di neuroni all'interno dei gangli o fibrosi della muscolatura liscia.

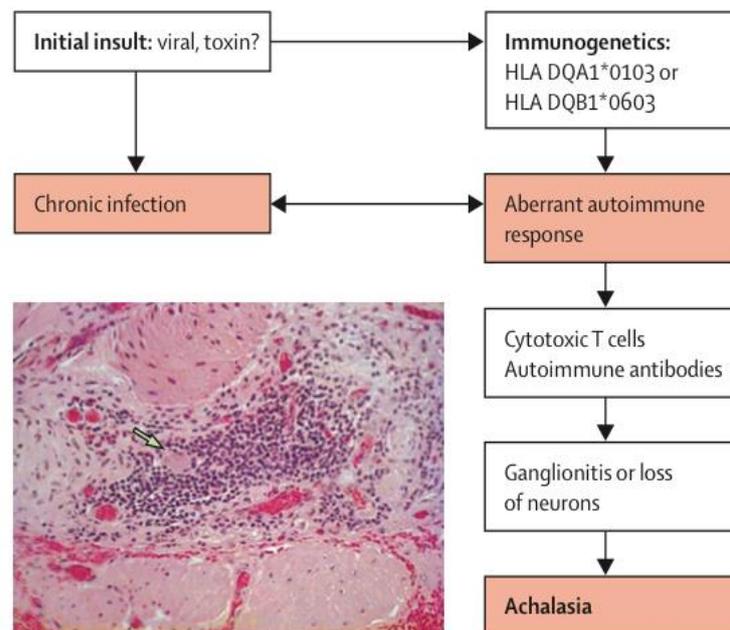


Figura 5: Fisiopatologia dell'acalasia. (modificato da Boeckxstaens GE et al., 2014)

L'analisi proteomica di questi pazienti mostra un aumento rispetto al gruppo di controllo della transtiretina (TTR), proteina fondamentale per il trasporto della tiroxina (T4) e della proteina legante il retinolo, associata con polineuropatia amiloide familiare. L'aumento della TTR avvalorava l'ipotesi di danno neuronale osservato nei pazienti acalasi. Inoltre, in alcuni pazienti con acalasia si osserva a livello del plesso mienterico un accumulo del complesso C5b-C9 e di IgM. Quindi, l'alterata produzione di NO e VIP associata a questo stato infiammatorio con conseguente fibrosi neuronale porta alla condizione patologica (Im SK et al., 2013; Storch VB et al., 2002; Gockel HR et al., 2012).

Come evento in grado di scaturire lo stato infiammatorio cronico è stato proposto l'insulto virale per mezzo di virus neurotrofici o infezione batterica. Boeckstaens e colleghi hanno proposto come trigger un'infezione da herpes simplex virus HSV-1, infatti, il virus sopravvive nei neuroni esofagei, dando vita ad una persistente attivazione immunitaria che in alcuni individui geneticamente predisposti può innescare la distruzione della componente neuronale. Il punto di ingresso del virus è la zona periorale e la mucosa esofagea. Inoltre, questo virus presenta un forte tropismo per le fibre nervose e dopo la prima infezione può rimanere latente nel nucleo dei neuroni (Furuzawa-Carballeda J et al., 2015). Facco et al. hanno dimostrato che in pazienti con acalasia c'è un elevato numero di linfociti CD3+/CD8+ oligoclonali infiltrati nel LES, i linfociti T infatti sono coinvolti nella risposta contro HSV-1. Quindi, un'infezione cronica di tipo virale può costituire l'innescò per una risposta immunitaria aberrante che assieme ad una componente genetica e ambientale può facilitare la perdita di neuroni a livello esofageo (Furuzawa-Carballeda J et al., 2016).

L'eziologia su base autoimmune è supportata dalla presenza di anticorpi anti-neuroni mienterici nel sangue e di infiltrati di linfociti T nel plesso mienterico. Vi è inoltre una correlazione tra acalasia e particolari polimorfismi del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (HLA II). Anticorpi anti-neurone sono stati riscontrati soprattutto in pazienti portatori degli alleli *HLA DQA1*0103* e *DQB1*0603*, l'HLA svolge un ruolo cruciale nel riconoscimento antigenico, creando una risposta immune aberrante (Ruiz-de-Leon A et al., 2002). Recenti studi hanno dimostrato che pazienti con acalasia hanno una probabilità di 3.6 più alta di sviluppare una malattia autoimmune come ad esempio uveite (RR= 259), sindrome di Sjögren (RR= 37); lupus eritematoso sistemico

(RR= 43); diabete di tipo I (RR= 5.4); artrite reumatoide (RR= 2.4), la comorbidità inoltre è molto più elevata in pazienti in età infantile (Kraichely RE et al., 2010). Ad avvalorare questa ipotesi vi è il fatto che molti acalasiaci trattati con farmaci immunosoppressivi mostrano miglioramento nella sintomatologia (Al-Jafar H et al., 2012).

I fattori genetici potrebbero avere un ruolo basilare nello sviluppo di questa malattia. Tuttavia, molte informazioni su un possibile coinvolgimento della componente genetica derivano da studi in vivo in modelli murini con diverse mutazioni:

- ❖ *kit* (sul cromosoma 4q11) (Gockel HR 2010) è fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento delle ICC. Quindi, in topi *KIT^{-/-}* si ha una riduzione della neurotrasmissione NO-dipendente a livello del LES (Ward SM et al., 1998);
- ❖ *spry2* (Sprouty Homolog 2) (gene *SPRY2* cromosoma 13q31) (Taketomi T et al. 2005). *Spry2* è un inibitore del segnale tirosin-chinasico coinvolto nel pathway GDNF-RET, fondamentale per lo sviluppo, il mantenimento della struttura e della funzione del SNE (Barlow A et al., 2003; Ceccherini I et al., 1993). Il *glial cell line-derived neurotrophic factor gene*, GDNF, codifica per il prodotto del gene RET (*rearranged during transfection*). I topi *spry2^{-/-}* hanno megaesofago e incapacità di rilassamento del LES (Taketomi T et al., 2005; Gockel HR et al., 2012), dovuto a iperganglioni esofagea del SNE, quindi con caratteristiche istopatologiche molto diverse da quelle che si riscontrano nell'acalasia nell'uomo, ma fenotipicamente risulta molto simile. I topi *spry2^{-/-}* mostrano iperreattività del pathway GDNF-RET, somministrando anticorpi anti-GDNF preserva il SNE da iperplasia e dilatazione dell'esofago. Quindi, *Spry2* si comporta da regolatore negativo del pathway GDNF-RET (Taketomi T et al., 2005).

Nell'uomo, l'esistenza di casi familiari suggerisce che l'acalasia possa essere ereditata e che quindi abbia una componente genetica. Inoltre, è stata trovata una correlazione statistica fra l'acalasia con sindromi genetiche ben definite:

- ❖ *ALADIN* (alacrima-achalasia-insufficienza di ACTH) (gene *AAAS* cromosoma 12q13) (Tullio-Pelet A et al., 2000; Weber A et al., 1996).

La sindrome di Allgrove è una malattia neurologica complessa dove il 75% dei pazienti mostra acalasia come uno dei sintomi più rilevanti (Gockel HR et al., 2010). Ad essere mutata in questa patologia è la proteina ALADIN. Questa mutazione causa una totale assenza di cellule gangliari e fibre nervose nello sfintere esofageo inferiore (Houlden H et al, 2002). Questa proteina favorisce il trasporto nucleare attraverso il complesso del poro della membrana nucleare. La sua presenza sia nelle cellule neuroendocrine che cerebrali fa pensare ad un possibile ruolo nello sviluppo dei sistemi nervoso ed endocrino (Huebner A et al., 2004). ALADIN favorisce inoltre l'aumento a livello nucleare di proteine di riparazione del DNA come la DNA ligasi I e l'aprataxina, che porta ad un aumento di danno al DNA e morte cellulare. È interessante notare che è stato riportato un caso di un paziente con una forma di acalasia sporadica recante una mutazione nel gene che codifica per l'aprataxina, causa dell'ataxia cerebellare (MIM*208920) (Hirano M et al., 2006; Murphy MS et al., 1989);

- ❖ Associazione con la neoplasia endocrina multipla di tipo 2 (MEN2) B, di preciso una mutazione nella linea germinale nell'esone 16 del proto-oncogene RET, sul cromosoma 10q11 che porta alla sostituzione di una metionina con una treonina in posizione 918, portando ad una inattivazione di RET, poiché questa mutazione si trova proprio a livello del dominio tirosin-chinasico. Le mutazioni nella MEN si manifestano con un'augmentata predisposizione alla cancerogenesi, con un modello di ereditarietà autosomico dominante. Di questa famiglia fanno parte anche la MEN2A e il carcinoma tiroideo midollare (Gockel HR et al., 2012);
- ❖ Associazione con la sindrome di Down. 2% dei bambini con sindrome di Down mostrano acalasia, questo probabilmente è dovuto al fatto che vi è una significativa riduzione dei neuroni presenti nel plesso esofageo dei pazienti con sindrome di Down (Hallac C et al., 2012).

Le forme idiopatiche di acalasia sono molto rare, quindi un altro approccio previsto per identificare eventuali geni candidati è stato quello di basarsi sulla ricerca di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) e classificarli in base al fenotipo:

- ❖ Due esempi sono rappresentati dall'ossido nitrico sintasi (*NOS*) (geni nNOS, iNOS ed eNOS sui cromosomi: 12q24, 17q11 e 7q36) (Mearin F et al., 1993; Shteyer E et al., 2015); e dal recettore per il peptide intestinale vasoattivo (gene *VIPR1* cromosoma 3p22) (Gockel HR 2010). I geni che codificano gli enzimi preposti alla sintesi dell'NO e quelli che portano al VIP sono ottimi candidati nello studio dell'eziologia dell'acalasia dato il loro ruolo noto di trasmettitori inibitori (Park V e Vaezi MF, 2005). nNOS nel LES è il maggior produttore di NO e la sua riduzione potrebbe portare all'alterazione della motilità che si manifesta nell'acalasia (Takahashi T 2003). Topi *Nos1*^{-/-} (privi dell'isoforma nNOS) hanno ipertensione a livello del LES e alterata capacità di rilassamento, mimando una condizione simil-acalasia (Sivarao DV et al., 2001). Una mutazione nel gene *NOS1* è stata recentemente osservata anche nell'uomo. Tramite analisi dell'esoma si è osservato, in due fratelli con acalasia ad insorgenza in età pediatrica, la presenza di un codone di stop nel gene *NOS1* sul residuo Tyr1202, in una posizione chiave per il legame dei cofattori (ad esempio FMN, FAD, NADPH): questa mutazione abolirebbe l'assemblaggio corretto della NOS al fine della corretta sintesi di NO (Shteyer E et al., 2015). Per quanto riguarda il VIP invece, questo è codificato dal gene *VIPR1* che mappa sul cromosoma 3p22 (Sreedharan SP et al., 1995). Il signaling VIP/*VIPR1* è un regolatore negativo dei processi infiammatori, infatti studi recenti hanno stabilito che certi polimorfismi in *VIPR1* possono portare a downregolazione dell'espressione di *VIPR1* e quindi ad un possibile incremento della risposta immunitaria (Pozo D e Delgado M, 2004). Polimorfismi in *VIP* sono spesso associati a forme di acalasia a tarda insorgenza, suggerendo che la base genetica delle forme ad insorgenza precoce e tardiva possa essere diversa (Paladini F et al., 2009).

Nella **Figura 6** sono rappresentati schematicamente i meccanismi d'azione di VIP e NOS.

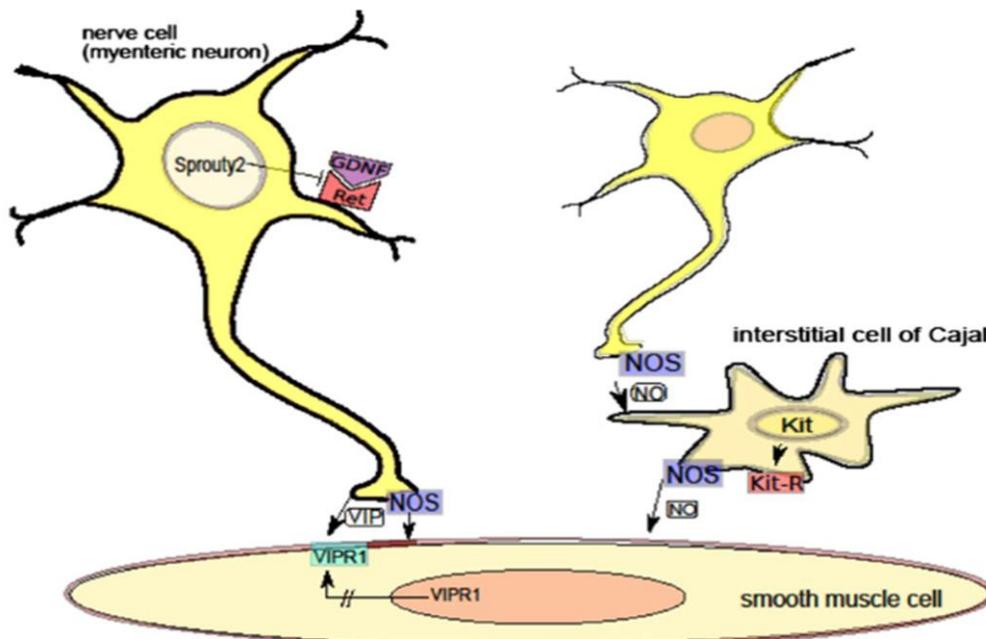


Figura 6: Rappresentazione riassuntiva dei possibili geni e i relativi meccanismi d'azione coinvolti nella patogenesi dell'acalasia (modificato da Gockel HR et al., 2010)

- ❖ polimorfismi HLA di classe II (Gockel I et al., 2014). Il complesso maggiore di istocompatibilità può essere associato a malattie autoimmuni e come abbiamo già visto l'acalasia ha una forte componente autoimmune. Infatti, alcuni HLA di classe II rappresentano il tipo cellulare predominante negli infiltrati a livello del LES nei pazienti acalasi. L'HLA di classe II si trova sul cromosoma 6p21 e contiene più di 30 geni HLA-DP, DQ e DR (Gebe GA et al., 2002). L'HLA-DQ è stato il più studiato per vedere se possa esservi una correlazione tra polimorfismi nell'HLA e malattia. In uno studio di associazione condotto da Gockel et al. su 1068 acalasi e 4242 controlli si è osservata la presenza di alcuni aplotipi HLA e polimorfismi amminoacidici, con maggior rischio di acalasia dato dall'inserzione in posizione 227-234 nel dominio citoplasmatico di HLA-DQB1 (gene *HLA-DQB1*0503* e *HLA-DQB1*0601*) e come mostra la **Figura 7**, l'inserzione viene a trovarsi vicino al sito di legame del peptide, perturbando la presentazione antigenica. Maggiore suscettibilità è indotta inoltre da due sostituzioni di due

residui amminoacidici in posizione 41 del dominio extracellulare di HLA-DQ α 1, ma non è chiaro il ruolo che potrebbero avere nella patogenesi dell'acalasia queste due sostituzioni (Gockel I et al., 2014).

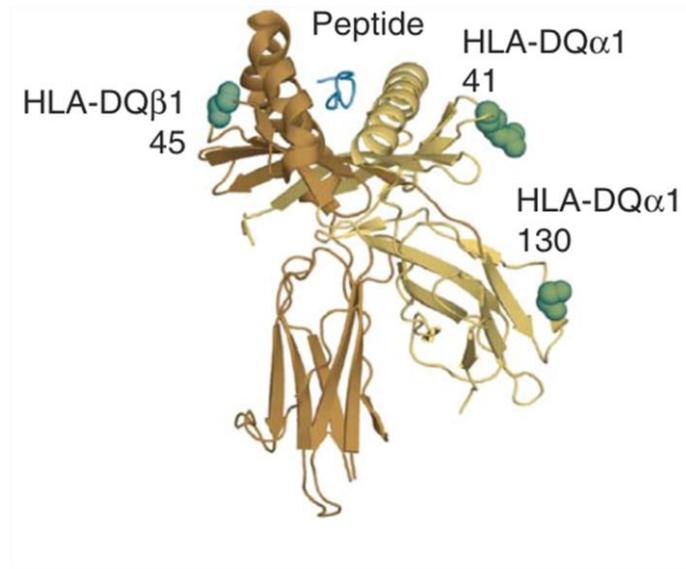


Figura 7: *Struttura tridimensionale dell'HLA-DQ.*
(modificato da Gockel I et al., 2014)

2 Scopo

Lo scopo di questo studio è stato quello di allestire un'analisi genetico-molecolare e funzionale dell'acalasia. Si tratta di uno studio di tipo genome-wide di sequenziamento al fine di investigare un ampio array di geni che potrebbero essere coinvolti nell'eziopatogenesi delle forme sporadiche di questa malattia.

3 Materiali e Metodi

3.1 Reclutamento dei pazienti e dei tessuti

Per questo studio sono stati reclutati 42 pazienti di etnia caucasica (n=20 dall'Italia; n=22 dal Belgio; 22 femmine; età compresa tra 16-82) con storia clinica caratterizzata, ovvero con diagnosi radiologica e manometrica di acalasia primaria. Ogni paziente è stato sottoposto a chirurgia e sono stati prelevati 1-2 campioni a tutto spessore di esofago distale (muscolatura circolare e longitudinale con MP compresi). I Tessuti di controllo sono stati prelevati dall'esofago di 10 individui (3 femmine; età compresa tra 45-87 anni) sottoposti a chirurgia per cancro all'esofago o per disturbi a livello gastrico, assicurandosi che i tessuti prelevati fossero istologicamente non compromessi. È stato ottenuto il consenso informato per ogni paziente arruolato nello studio e la manipolazione dei dati è stata fatta in accordo con la dichiarazione di Helsinki. Lo studio è stato approvato dal comitato etico (studio 42/2011/0/Oss protocollo #877/211).

3.2 Estrazione dell'RNA, allestimento della libreria e sequenziamento dell'RNA (RNAseq)

È stato estratto l'RNA da 4 pazienti con acalasia e 4 controlli mediante utilizzo del RiboPure™ kit (Ambion®, Life Technologies). Le biopsie esofagee sono conservate in RNA later, quindi per estrarre 150 ng di RNA è stato preventivamente rimosso l'RNA later e il tessuto è stato tagliato in piccoli frammenti inferiori a 150 ng e omogeneizzato in 10V di TRI reagent (soluzione monofasica contenente fenolo e guanidina tiocinato) che serve per lisare le cellule e inattivare tutte le nucleasi presenti. L'omogenato è stato incubato a temperatura ambiente (TA) per 5 minuti al fine di innescare la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici, successivamente il tutto è stato centrifugato

a 12000x g per 10 minuti a 4°C e il sovrantante è trasferito in eppendorf. Sono stati successivamente aggiunti 100 µl di bromocloropropano (BCP) ad 1 ml di omogenato e la soluzione è stata vortexata per 15 secondi a massima velocità e incubata a TA per 5 minuti. Successivamente è stata eseguita una centrifuga a 12000 x g per 10 minuti a 4°C per separare in fasi la mix: la fase organica rossa nella parte più bassa; una intermedia; una incolore e acquosa più in alto, in cui si trova l'RNA. 400 µl di fase acquosa sono stati trasferiti in una nuova eppendorf da 1,5 ml a cui sono stati aggiunti 200 µl di etanolo 100%, il tutto vortexato a massima velocità per 5 secondi per favorire la precipitazione dell'RNA. Ogni campione è stato poi trasferito in un Filter Cartridge-Collection Tube e il tutto è stato centrifugato a 12000x g per 30 secondi a temperatura ambiente, affinché tutto il campione passasse attraverso il filtro. L'RNA, a questo punto attaccato al filtro, è stato lavato con 500 µl di Wash Solution e centrifugato per altri 30 secondi a TA per far passare tutta la wash solution attraverso il filtro. Ripetuto una seconda volta questo procedimento, è stata fatta una centrifuga a TA per 30 secondi per rimuovere la restante wash solution dal filtro. Il filtro è stato trasferito in una nuova collection tube e sono stati aggiunti 100 µl di Elution buffer e il tutto è stato incubato per 2 minuti a temperatura ambiente. L'RNA è stato rimosso dal filtro e depositato sul fondo del collection tube mediante ulteriore centrifuga di 30 secondi. L'RNA a questo punto può essere conservato a -80°C fino ad un anno. La quantificazione è stata fatta con Agilent Bioanalyzer 2100 instrument (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Sono stati utilizzati 150 ng di RNA per la preparazione di ogni libreria sulla base del protocollo TruSeq RNA Sample Prep v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). Le molecole di Poly(A)-RNA sono state purificate a partire da 500 ng di RNA utilizzando sfere magnetiche legate ad oligo-dT. A seguito della purificazione, l'mRNA è stato frammentato e unito a dei primer random per la trascrizione inversa, dalla quale è stato ottenuto il cDNA a a sua volta legato a degli adattatori di sequenza paired-end. Il cDNA legato a questi adattatori è stato a sua volta amplificato per creare una library. Il sequenziamento dell'RNA è stato fatto tramite HiScan SQ platform (Illumina) con coverage a 75bp.

3.3 Analisi dei dati di RNAseq

Le sequenze paired-end ottenute tramite HiScan SQ sono state filtrate e allineate tramite il tool AdapterRemoval (<http://code.google.com/p/adaptorrecovery/>) per escludere le sequenze di bassa qualità e gli adattatori. Le reads sono state allineate e mappate sul genoma umano di riferimento hg19 (<https://genome.ucsc.edu/>) e con su pipeline Bowtie/Tophat (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>). I duplicati di PCR sono stati rimossi tramite Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/>). La quantificazione dell'espressione genica è stata svolta tramite software Python package htseq-count (<http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/overview.html>) con Ensembl release 72 annotation feature (<http://www.ensembl.org>). La conta delle sequenze è stata normalizzata con il pacchetto R-Bioconductor - edger come “numero di reads per milione” (cpm). Sono stati filtrati i geni e selezionati solo quelli con $cpm > 3$ in almeno 2 campioni su 4. Questo ha permesso di includere 9616 geni, che sono stati analizzati con il pacchetto R-Bioconductor limma per verificare se vi fossero esperienze significative nell'espressione dei geni. La funzione lmFit è stata utilizzata per creare un modello lineare, e la funzione eBayes è stata utilizzata per calcolare il t-test. I geni sono stati raggruppati in ordine di differenza di significatività utilizzando come unità di misura il \log_2 (\log_2FC) e il P value. È stato utilizzato il Multiple Experiment Viewer (MEV) (v4.8.1) per raggruppare i dati ottenuti in due modi differenti: clustering gerarchico (distance: Manhattan; clustering method: average) e l'analisi delle componenti principali. Sono stati selezionati un totale di 111 geni espressi in maniera differente ($P \leq 10^{-3}$) al fine di valutarne una classificazione funzionale nei processi biologici e una eventuale correlazione nei pathway cellulari. Questo tipo di analisi è stata fatta tramite i tools PANTHER13.1 (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships; <http://pantherdb.org>) e STRING. PANTHER è strettamente correlato con diversi databases di genomica: InterPro Consortium per la classificazione delle proteine, il Quest for Orthologs Consortium and UniProt. PANTHER contiene diverse informazioni sulla funzione e sulla filogenetica dei geni ottenute direttamente dal Gene Ontology Consortium (GO). L'analisi è stata svolta utilizzando l'opzione PANTHER Functional Classification and over-representation Tests, usando il processo the PANTHER GO-Slim

Biological e per l'analisi statistica the Fisher's exact with false discovery rate (FDR) multiple test correction. Il database STRING è stato utilizzato per vedere se vi fossero correlazioni proteina-proteina. Le interazioni includono associazioni dirette (fisiche) e indirette (funzionali), derivanti da predizioni computazionali; ottenute dalle conoscenze riguardanti altri organismi e da informazioni ottenute da altri databases.

3.4 Validazione dei dati

3.4.1 Estrazione DNA

Il DNA è stato estratto da sangue di pazienti acalasici con kit QIAGEN (QIAmp DSP DNA Blood Mini Kit). In provetta di lisi sono stati aggiunti 20 µl di QIAGEN proteasi, 200 µl di sangue e 200 µl di tampone di lisi e il tutto vortexato per 15 secondi. Il campione è stato successivamente incubato a 56°C per 10 minuti e centrifugato per 5 secondi massima velocità. Sono stati aggiunti 200 µl di etanolo 100%, vortexato per 15 secondi e poi centrifugato a velocità massima per 5 secondi. Il lisato è stato trasferito in QIAmp Mini Spin Column e centrifugato a 6000 x g per 1 minuto e trasferito in un nuovo collection tube eliminando il tubo contenente il filtrato. Alla nuova QIAmp Mini Spin Column sono stati aggiunti 500 µl di tampone di lavaggio 1 ed è stata centrifugata a 6000 x g per 1 minuto eliminando successivamente il tubo di lavaggio contenente il filtrato e sostituendolo con uno nuovo. Sono stati poi aggiunti 500 µl di tampone di lavaggio 2 ed è stato centrifugato a massima velocità eliminando nuovamente il tubo di lavaggio e sostituendolo con uno nuovo. Il prodotto è stato centrifugato a velocità massima in modo tale da far asciugare completamente il filtro. La QIAmp Mini Spin Column è stata posizionata in una nuova provetta di eluizione aggiungendo 200 µl di tampone di eluizione al centro della membrana. La colonnina è stata incubata a TA per 1-5 minuti e centrifugata a 6000 x g per 1 minuto, in modo da eluire il DNA.

3.4.2 Retrotrascrizione

L'RNA precedentemente estratto è stato pretrattato con l'enzima DNasi I per degradare l'eventuale DNA genomico, e con inibitori delle. In un volume finale di 10 µL, 1 µL di Buffer 10X (Fermentas), 40 U di inibitore delle RNasi (Fermentas), 1 U di DNase I-RNase free (Fermentas), 1 µg di RNA e acqua a volume. La reazione è condotta incubando a 37°C per 30 minuti . La DNase I è stata successivamente inattivata con l'aggiunta di 1µL di EDTA 50 mM a pH 8.0 a 65°C per 15 minuti. La retrotrascrizione è stata fatta con SuperScript® II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen™) contenente una retrotrascrittasi ingegnerizzata da quella estratta dal Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) e purificata da cloni di E. coli esprimenti il gene pol modificato di M-MLV. Si tratta di una retrotrascrittasi termostabile che possiede una ridotta attività RNase H, cosicchè il filamento di mRNA stampo non si degradi durante la sintesi. Per la retrotrascrizione sono serviti 11 µL di RNA trattato con DNasi e 50 ng di primers esamerici N6, 1 µL di dNTP Mix 10 mM (Invitrogen™). Il tutto è stato incubato a 65°C per 5 minuti, per favorire l'annealing dei random primers al filamento stampo di mRNA. Sono stati poi aggiunti 4 µL di First-Strand Buffer 5X (Invitrogen™), 1 µL di DTT 0.1 M (Invitrogen™), 40 U di RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen™) e 200 U di SuperScript II RT (Invitrogen™). La reazione di retrotrascrizione è stata fatta con termociclatore 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®) con il seguente programma:

- 42°C per 30 minuti
- inattivazione per 10 minuti a 55°C.

in parallelo vengono preparate due reazioni di controllo per stimare la specificità del processo di retrotrascrizione. Nella prima si aggiunge la mix ma senza la retrotrascrittasi, mentre nella seconda reazione non viene aggiunto l'RNA, portando a volume con acqua entrambe le reazioni. Il cDNA così prodotto è stato utilizzato come stampo per la reazione di PCR, con la quale si è amplificata la regione codificante di interesse. La PCR viene fatta in un volume finale di 20 µL utilizzando 10 µL di KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABiosystem®), 0.6 µL di primer F 10 µM, 0,6 µL di primer R, 10 µM, 2 µL di cDNA

e acqua a volume. La reazione è stata condotta in termociclatore 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®) con il seguente programma:

- 95°C per 3 minuti
- ripetizione per 44 cicli degli step a 98°C per 20 secondi
- 58°C per 15 secondi
- 72°C per 15 secondi
- 72°C per 2 minuto.

La KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABiosystem®) contiene al suo interno la KAPA HiFi DNA Polymerase (KAPABiosystem®) una DNA-polimerasi DNA-dipendente dotata di attività di correzione delle bozze (proofreading). La KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPABiosystem®) contiene anche dNTPs (0.3 mM di ciascun dNTP 1X), MgCl₂ 2.5 mM 1X e stabilizzatori di reazione. La validazione del prodotto di PCR è stata fatta con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in TBE.

3.4.3 PCR Real time (RT-PCR)

Questa è una tecnica molecolare che permette di amplificare e quantificare il cDNA, che noi abbiamo utilizzato per valutare l'espressione dei geni CYR61, CTGF, INPP4B, KIT, EGR1, AKAP6 e HSPA4L in diverse condizioni sperimentali. Il gene reference (housekeeping) utilizzato nel nostro laboratorio è il gene umano della β -actina, che viene utilizzato per normalizzare i livelli di espressione dei geni che stiamo testando. Per quantificare viene usato il SYBER Green, una sonda fluorescente in grado di intercalarsi al DNA a doppio filamento ed emettere fluorescenza solo se legata al DNA. La fluorescenza è direttamente proporzionale a quanto prodotto viene accumulato durante la reazione di amplificazione. Con questa la RF-PCR sono i primers che determinano la specificità. La formazione di omo-eterodimeri è vista dalla real-time come un aumento di fluorescenza osservabile durante la reazione di PCR, questo potrebbe contribuire a dare

falsi positivi. Dall'amplificazione del cDNA si ottiene quindi una curva con andamento sigmoide dalla quale è possibile estrapolare il valore che ci interessa con il metodo del Delta-DeltaCT ($\Delta\Delta Ct$). Il volume finale di reazione è pari a 25 μ l e vengono aggiunti: cDNA 2.0 μ l, SYBR Green mix 2X, Primers 5 μ M (40 cicli a 95° C per 15", 60° C per 1', con al termine curva di dissociazione per favorire la specificità). La curva di dissociazione di un prodotto di PCR specifico si ha ad una temperatura di melting T_m di 82° C, mentre quella relativa ad un prodotto di dimeri di primers avviene ad una temperatura inferiori dimeri di primer si associano a temperature inferiori ($T_m = 75^\circ$ C).

I primers utilizzati per la RT-PCR quantitativa sono:

GENE	Primer Reverse	Primer Forward
HSPA4L	CAGCATTCCAGTAACTTGCTCA	GATCAGGCTTCCCTATGAACTG
CYR61	GAACAATACATTTCTGGCCTTG	GGTGGAGTTGACGAGAAACAT
CTGF	TACACCGTACCACCGAAGAT	CACAAGGGCCTATTCTGTCACT
INPP4B	CGCATCCACTTATTGTCAGATG	AAGTGTGCCCTGGTATGTGAAT
KIT	ATGGGATACTCAGATGGGAATG	GAGTCTGACAAGATACTCCAGCA
LIF	ATGTTTCCAGTGCAGAACCAA	CATTTGAGCATGAACCTCTGAA
EGF1	AAAGCGGCCAGTATAGGTGAT	CCTGACATCTCTCTGAACAACG
CD69	TTACAGCACACAGGACAGGAAC	TTGTTTCGTAGCAGAGAACAGC
AKAP6	AGGGAGAACTCTGTTTCAAGGA	GACCTAACCTATTCAGTCCAGCA

3.4.4 Western Blot

Le proteine sono state estratte da biopsie esofagee fresche mediante sonicazione in 100 µl di RIPA buffer contenente inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma Aldrich inhibitors cocktail). Il ciclo di sonicazione, ad una frequenza di 20-60 kHz (output power 25-210W), prevede i seguenti passaggi (sonicatore Bioruptor Pico Sonication System V1.1):

- 30 secondi TIME ON
- 30 secondi TIME OFF
- 8 cicli a 4°C.

Le concentrazioni delle proteine estratte sono state determinate tramite corsa sul gel di poliacrilammide al 10% e colorazione con Blu di Coomassie. Il gel di poliacrilammide è formato da due parti, stacking gel che è costituito da acqua, 7 % Acrylamide/Bis Solution (Biorad), SDS 0,1%, 125 mM Tris-HCl a pH 6.8, 0,1% APS e TEMED (Sigma Aldrich). APS e TEMED catalizzano la polimerizzazione del gel. Nel running gel avviene la separazione delle proteine in base al peso molecolare. Il running gel viene preparato in un volume finale di 10 ml con acqua, 11,2 % Acrylamide/Bis Solution (Biorad), SDS 0,1%, 0,4 M Tris-HCl a pH 8.7 APS 0,1%, TEMED (Sigma Aldrich). La denaturazione ei lisati proteici avviene a 99°C per 10 minuti. Al lisato vengono aggiunti Loading Buffer 4X (Tris pH 6.8 60 mM, glicerolo 5%, SDS 2%, β-mercaptoeptanolo 2,5%, blu di bromofenolo 0,01%). La corsa elettroforetica viene eseguita con “Running Buffer” 1X, che è composto da Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%, acqua distillata. Dopo la corsa elettroforetica le proteine vengono trasferite sul filtro di nitrocellulosa mediante Trans-Blot® Turbo™ Blotting System a 25V per 30 minuti (BIO-RAD, Hercules, California, USA), verificandone l'avvenuto trasferimento delle proteine su membrana mediante Rosso Ponceau. La membrana viene successivamente lavata con acqua bidistillata e saturata con Blocking Solution (Western Breeze - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) per 30 minuti a TA e poi messa in incubazione 16 ore in agitazione con gli anticorpi primari, diluiti alla concentrazione ottimale in TBS-T 1X (TBS 1X, TWEEN-20 0,1%). La membrana di nitrocellulosa viene lavata 3 volte per 10 minuti in TBS-T 1X, vengono lasciati in incubazione per 45 minuti a TA gli anticorpi secondari

coniugati con l'enzima HRP (Horse Radish Peroxidase) diluiti in TBS-T 1X e poi la membrana viene nuovamente lavata per 3 volte per 10 minuti in TBS-T 1X e a seguire 1 volta per 10 minuti in H₂O mQ. La rilevazione del segnale viene fatta tramite incubazione per un minuto con un substrato di rilevazione sensibile alla perossidasi Super Nova (QIAGEN, Hilden, Germania) tramite l'esposizione al Chemidoc. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: C-KIT (mouse, 1:750), INNP4B (rabbit, 1:750), vinculina (mouse, 1:10000). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi secondari: anti-mouseHRP 1:35000, anti-rabbitHRP 1:35000.

3.4.5 Immunoistochimica (IHC)

Le reazioni di IHC sono state eseguite su sezioni rispettivamente di esofago fissate in paraformaldeide (PFA) al 4%. I campioni sono stati reidratati mediante una serie di lavaggi in alcoli a diluizioni crescenti (xilolo- alcol 100% - alcol 95% - alcol 70% - alcol 50%- acqua bidistillata) e infine PBS. I legami aspecifici vengono schermati con incubazione di 1 ora in "Blocking Solution" (PBS con Triton X-100 0,3%, siero di scimmia al 0,1% e PBS_{AA}). Gli anticorpi primari per IHC sono stati diluiti in PBS_{AA}, quelli per IF sono stati diluiti in PBS con Triton X-100 0,1% e sono stati incubati 16 ore a 4°C. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: C-KIT (mouse, 1:100), INPP4B (rabbit, 1:100). Dopo lavaggio con PBS (3 volte per 10 minuti), sono stati aggiunti gli anticorpi secondari per 1 ora a temperatura ambiente, seguiti da ulteriori 3 lavaggi in PBS da 10 minuti. Per sviluppare la reazione è stata utilizzata la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) secondo le indicazioni del protocollo standard (DAB500 IHC Select® kit; Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). È stato assegnato uno score in base all'intensità della colorazione di DAB (0 = no colorazione; + = 10%-50% colorazione; ++ = 50%-90% colorazione; +++ = ≥90% colorazione; tutte le immagini sono state acquisite ad ingrandimento 10x) in accordo con gli standard patologici. Le immagini sono state valutate da tre persone differenti in doppio cieco. Il microscopio utilizzato per l'acquisizione è un Nikon con camera DS-5M (Nikon Instruments, Düsseldorf, Germany).

3.4.6 Analisi Statistica

Differenze quantitative nella densitometria delle bande nel western blot sono state calcolate con l'opzione Student's t test su GraphPad Quickstat calculator; differenze significative nello score di IHC nei differenti campioni di biopsie sono state calcolate con Fisher's test (tavole di contingenza 4×2) usando il programma Vassarstats.

4 Risultati

4.1 Analisi dell'RNA totale tramite RNAseq

L'RNA totale estratto dalle biopsie esofagee di 4 pazienti con acalasia (2F; età compresa tra 30 e 58 anni) e 4 controlli (3F; età compresa tra 27 e 50 anni) è stato utilizzato per la creazione di librerie e per il sequenziamento tramite Illumina HiScan SQ Platform. I dati ottenuti dal sequenziamento massivo sono stati quindi analizzati e filtrati allestendo in seguito delle pipelines di espressione genica. L'analisi quantitativa dei dati utilizzando R-Bioconductor nell'opzione edgeR, che calcola i Count per Million (CMP, numero di sequenze che mappano a livello di uno specifico trascritto su un milione di sequenze analizzate) ha permesso di individuare 111 geni disregolati nei pazienti con acalasia sporadica, con una differenza di espressione negli acalasici rispetto ai controlli con $P \leq 10^{-3}$. I criteri di inclusione hanno richiesto un valore di almeno 3 CMP in almeno 2 campioni. Rispetto ai controlli, nei pazienti con acalasia 77 geni sono downregolati e 34 sono upregolati. In Figura 8 potete osservare l'analisi dei dati effettuata tramite Multiple Experiment Viewer v4.8.1, un software in grado di clusterizzare i geni tra loro e fare un'analisi differenziale, al fine di poter constatare se sono presenti differenze di espressione tra i pazienti e i controlli. Quello che si nota è che c'è una grande concordanza, poiché laddove i geni risultano essere upregolati nei pazienti con acalasia, nei controlli risultano downregolati e *viceversa*.

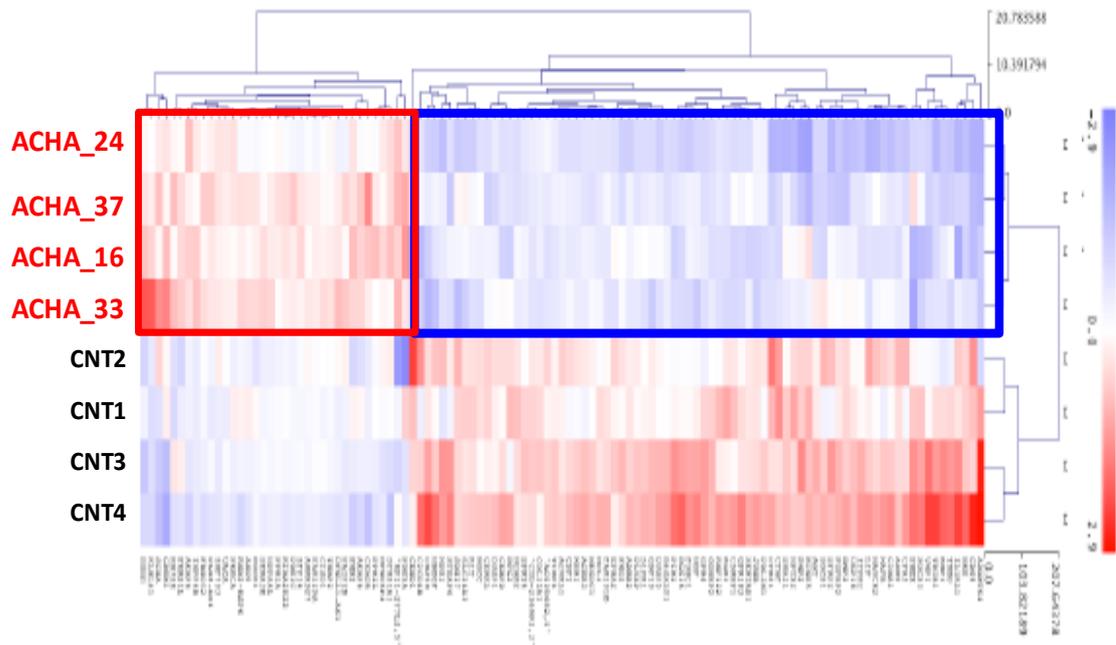


Figura 8: *concordanza di espressione differenziale osservata nei tessuti dei pazienti con acalasia rispetto ai controlli elaborata tramite software MeV v4.8.1. in rosso i geni upregolati in blu i geni downregolati.*

4.2 Analisi dei geni tramite software PANTHER

PANTHER Functional Classification test (PANTHER GO-Slim Process) è un tool che permette di raggruppare i 111 geni disregolati nell'acalasia e di mapparli in base alla funzione o processo biologico in cui sono coinvolti (**Figura 9**): i.e. adesione cellulare, sviluppo, biogenesi, processi immuni e metabolici e in risposta a stimoli (<http://www.pantherdb.org/chart/pantherChart.jsp?listType=1&filterLevel11&type=2&chartType=1&save=yes&basketItems=all&zoom=1.25&trackingId=4DCA8C9D00F5C4649E3257CE82CFAC3E>). Questa analisi è stata svolta utilizzando come riferimento l'H. sapiens e mostrando che nel set di geni over rappresentati nell'acalasia vi sono principalmente quelli coinvolti nella fosforilazione, tra cui la cascata delle MAP-Kinasi (inclusi i processi di trasduzione del segnale intracellulari e la comunicazione cellula-cellula), la regolazione del metabolismo del fosfato e processi di sviluppo come differenziamento e morte cellulare.

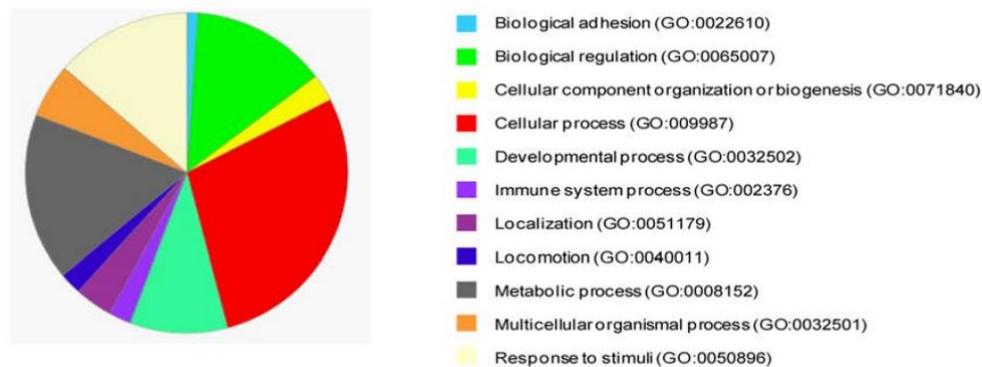


Figura 9: Processi biologici in cui sono coinvolti i geni (GO-Slim Biological processes) disregolati nell'acalasia, identificati tramite PANTHER Functional Classification analysis.

4.3 Analisi dei network molecolari in cui sono coinvolti i geni alterati nell'acalasia

Sulla base dei risultati che abbiamo ottenuto abbiamo effettuato un'analisi per identificare i network in cui sono coinvolti i 111 geni disregolati nell'acalasia. Per fare questo studio abbiamo utilizzato STRING (<https://stringdb.org/cgi/network.pl?taskId=u9O5yLo4Lf2G>), usando sempre come genoma di riferimento l'H. sapiens e come background per l'analisi statistica l'intero genoma. Dei 111 geni abbiamo osservato una correlazione in 104 di essi. Alcuni dei pathway coinvolti (**Figura 10**) sono principalmente implicati nei processi biologici come ad esempio lo sviluppo, il differenziamento, la differenziazione cellulare, l'angiogenesi, la vascolarizzazione. Inoltre, come si evince dal riquadro rosso, molti dei geni convergono su c-KIT, uno dei geni che abbiamo selezionato per i saggi di validazione, di cui parlerò tra poco.

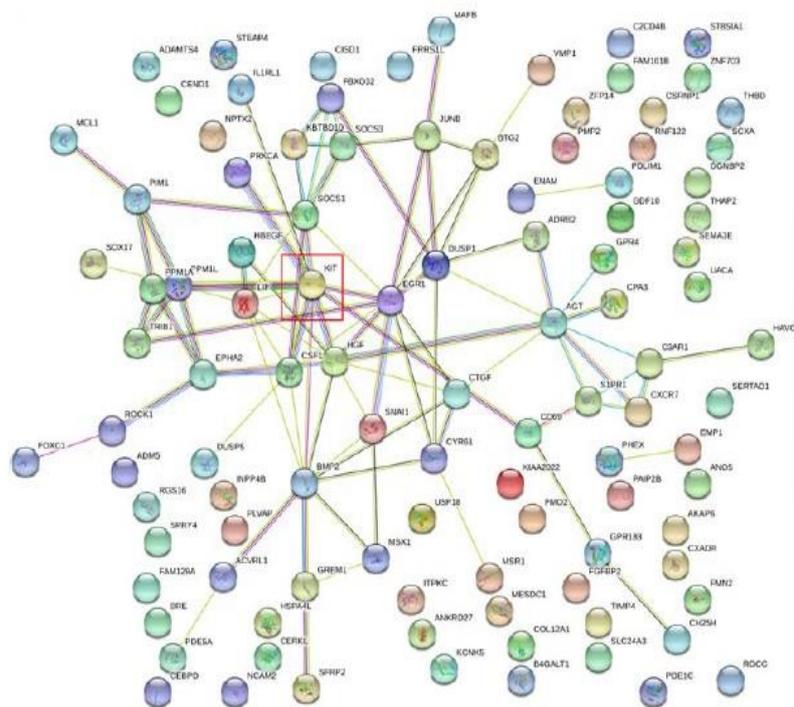


Figura 10: interazioni proteina-proteina determinate tramite analisi con STRING. I cerchi colorati corrispondono a una proteina mentre le linee corrispondono al differente tipo di interazione proteina-proteina

4.4 Conferma dei risultati di RNAseq

4.4.1 PCR real-time quantitativa (rt-qPCR) su 9 geni selezionati

Questa seconda parte del progetto verte sulla validazione dei dati di disregolazione genica ottenuti mediante RNAseq nei pazienti acalastici. Dei 111 geni trovati tramite l'analisi ne sono stati selezionati 9 con $P \leq 10^{-4}$ (Figura 11) al fine di validare i dati di *whole transcriptome*.

GENE name	FC	p-value	q-value	CPM cases				CPM ctrl			
				ACHA_33	ACHA_16	ACHA_24	ACHA_37	CNT1	CNT2	CNT3	CNT4
CYR61	2.99	9.71E-06	0.05726272	363	356	132	247	2120	4524	1204	2663
CTGF	2.74	1.19E-05	0.05726272	881	698	314	732	7697	6250	2616	3927
INPP4B	-1.63	1.42E-04	0.45427972	148	130	86	67	39	40	40	37
KIT	1.48	4.17E-04	0.67914084	62	97	41	109	255	206	207	282
LIF	2.40	4.23E-04	0.67914084	8	9	3	11	21	57	35	69
EGR1	1.95	4.65E-04	0.67914084	1135	1307	1357	1436	9172	3987	3377	9447
CD69	3.84	4.94E-04	0.67914084	13	5	4	5	58	109	46	365
AKAP6	-1.63	7.28E-04	0.72390603	129	136	68	162	84	34	51	30
HSPA4L	-1.07	8.99E-04	0.72390603	87	65	48	64	41	32	38	33

Figura 11: Gruppo di 9 geni selezionati per la validazione iniziale

Abbiamo valutato l'espressione di questi geni mediante qRT-PCR. L'RNA totale è stato estratto da 9 biopsie di esofago (7 acalastici e 2 controlli) mediante kit commerciale e successivamente retrotrascritto tramite l'uso di Superscript Reverse Transcriptase III e random hexamers. Il cDNA che abbiamo così ottenuto è stato utilizzato per andare a valutare mediante qRT-PCR l'espressione dei seguenti geni:

- CYR61
- CTGF
- INPP4B
- KIT
- LIF
- EGR1
- CD69
- AKAP6

- HSPA4L

Il gene normalizzatore endogeno che abbiamo utilizzato è la β -actina. I dati sono stati normalizzati utilizzando pool commerciali di RNA estratti da esofago di 5 individui sani (AMSBIO), utilizzando il metodo del $\Delta\Delta C_t$. L'analisi di retrotrascrizione e di qRT-PCR sono state condotte indipendentemente. Per LIF e CD69 non abbiamo ottenuto dati statisticamente significativi probabilmente a causa dei bassi livelli di espressione, come già osservato dall'analisi di RNAseq, invece per gli altri sette geni abbiamo confermato la loro disregolazione anche tramite qRT-PCR (**Figura 12**).

Gene	RNAseq (whole-genome)	Real-time qRT-PCR (target gene)
CYR61	downregulated	downregulated
CTGF	downregulated	downregulated
INPP4B	upregulated	upregulated
KIT	downregulated	downregulated
EGR1	downregulated	downregulated
AKAP6	upregulated	upregulated
HSPA4L	upregulated	upregulated

Figura 12: Validazione RNAseq tramite RT-PCR quantitativa

Per c-KIT e INPP4B abbiamo ottenuto la conferma dell'alterazione dell'espressione. Gli istogrammi di seguito in **Figura 13** mostrano i livelli di mRNA di C-KIT e INPP4B. sui quali abbiamo anche effettuato degli studi relativi all'espressione proteica e tissutale.

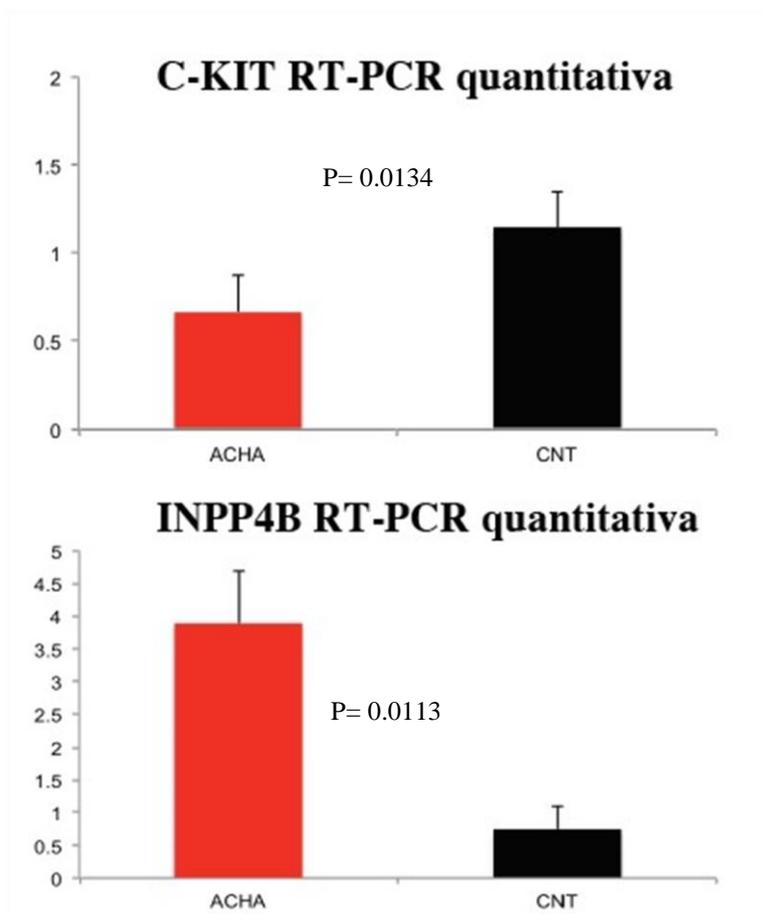


Figura 13: Livelli di mRNA in 7 pazienti acalasi (ACHA-rosso) rispetto a 2 controlli (CNT-nero) valutati con RT-PCR quantitativa

4.4.2 Western Blot su proteine estratte da tessuto esofageo

Tramite Western Blot abbiamo valutato i livelli delle proteine C-KIT, INPP4B. Le proteine (7 pazienti e 2 controlli) sono state estratte da tessuto esofageo mediante sonicazione con Bioruptor Pico Sonication System, per 8 cicli a 20-60 kHz. Successivamente sono state risospese in 100 μ l di RIPA Buffer con inibitori di proteasi e fosfatasi. Le proteine sono state separate con SDS-PAGE e analizzate mediante Western Blot. Per accertarsi della corretta estrazione proteica tramite sonicazione 5 μ l di lisato denaturato in Laemmli sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10%, colorato con Coomassie Blue (**Figura 14**).

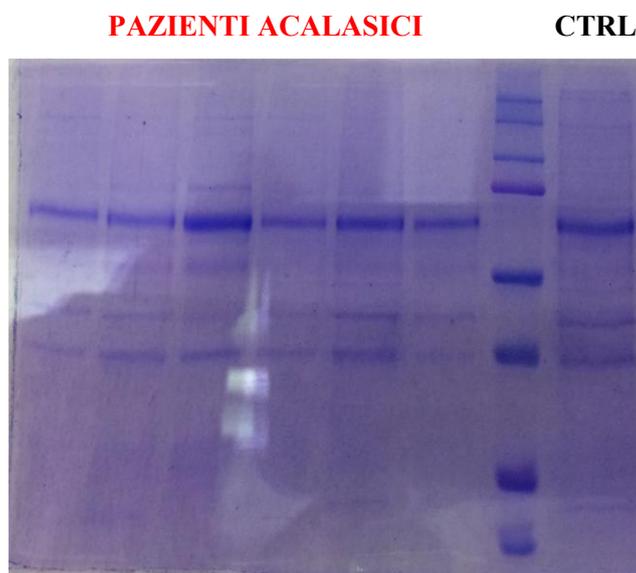


Figura 14: *Coomassie Blue di proteine estratte da tessuto esofageo*

Il Coomassie ha permesso di selezionare i campioni proteici con quantità di lisato paragonabile e di correrne 40-50 μ g di ciascuno su gel di poliacrilammide per l'immunodetection di C-KIT (155 kDa), INPP4B (107 kDa). Mediante blotting con Trans-Blot® Turbo™ Blotting System, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa, valutandone l'avvenuto trasferimento mediante Rosso Ponceau. Il marker per la visualizzazione della banda proteica utilizzato è il Dual Color Marker. L'indice di normalizzazione è la vinculina endogena. E l'analisi densitometrica è stata fatta tramite

il software Image Lab™. Anche da western blot si evince un aumento dell'espressione proteica di INPP4B, e una diminuzione di c-KIT confermando i dati di whole genome sequencing. (Figura 15).

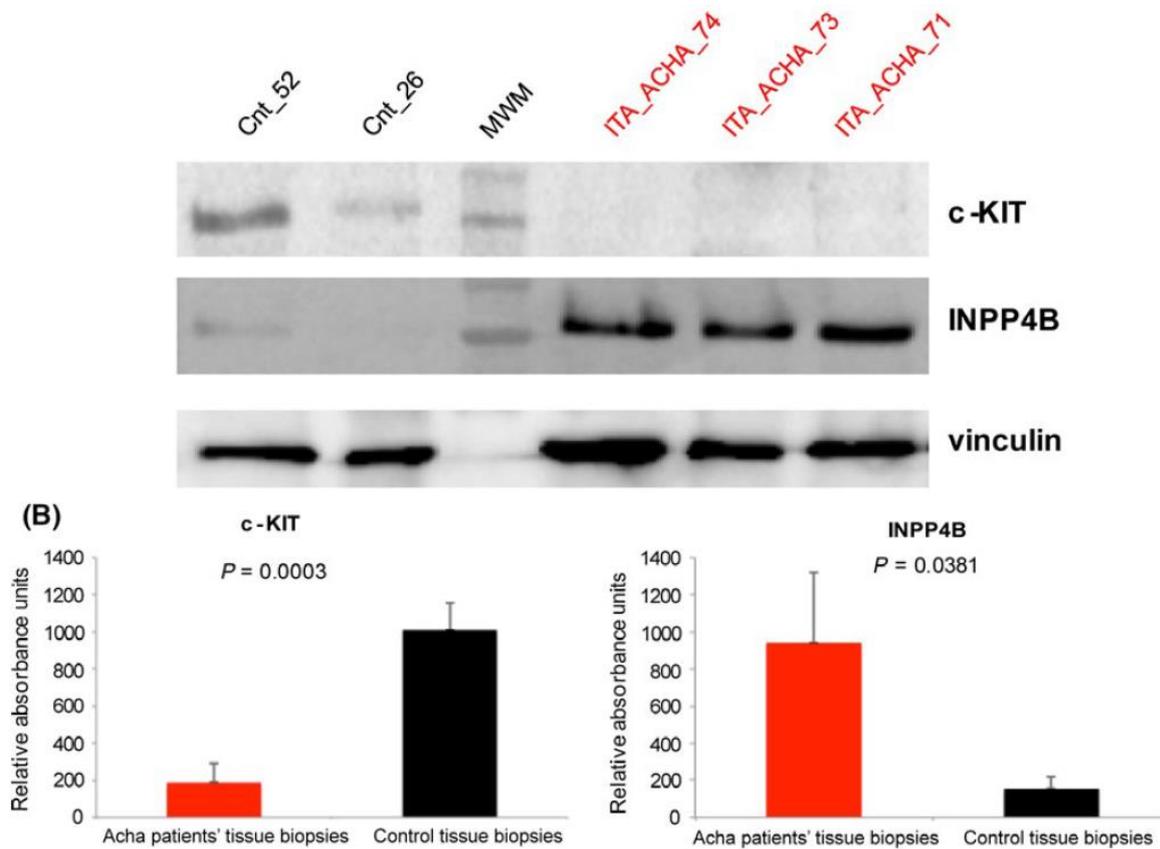


Figura 15: analisi di Western Blot su proteine estratte da tessuto esofageo che conferma l'alterazione dell'espressione dei due geni. I pazienti con acalasia sono indicati in rosso, i controlli in nero.

4.4.3 Immunoistochimica (IHC) sviluppata con tecnica DAB su biopsie a tutto spessore

Al fine di confermare i dati di western blot e per determinare la localizzazione cellulare di INPP4B e c-KIT abbiamo eseguito un'analisi di IHC con tecnica di rilevazione DAB su 6 CTRL e 18 ACA. Come si evince in **Figura 16** il numero di cellule c-KIT-IR (con tipica forma delle ICC) è più basso in ACA che nei CTRL. L'analisi statistica è stata eseguita con il test di Fisher e mostra un $P=0.0005$. Rispetto ai CTRL, la marcatura con INPP4B è più intensa in ACA rispetto ai controlli. Nei casi INPP4B positivi, la marcatura è localizzata in differenti tipi cellulari, incluse cellule muscolari e gangli del plesso mienterico. INPP4B nei CTRL è molto ridotto o quasi completamente assente ($P=0.0023$).

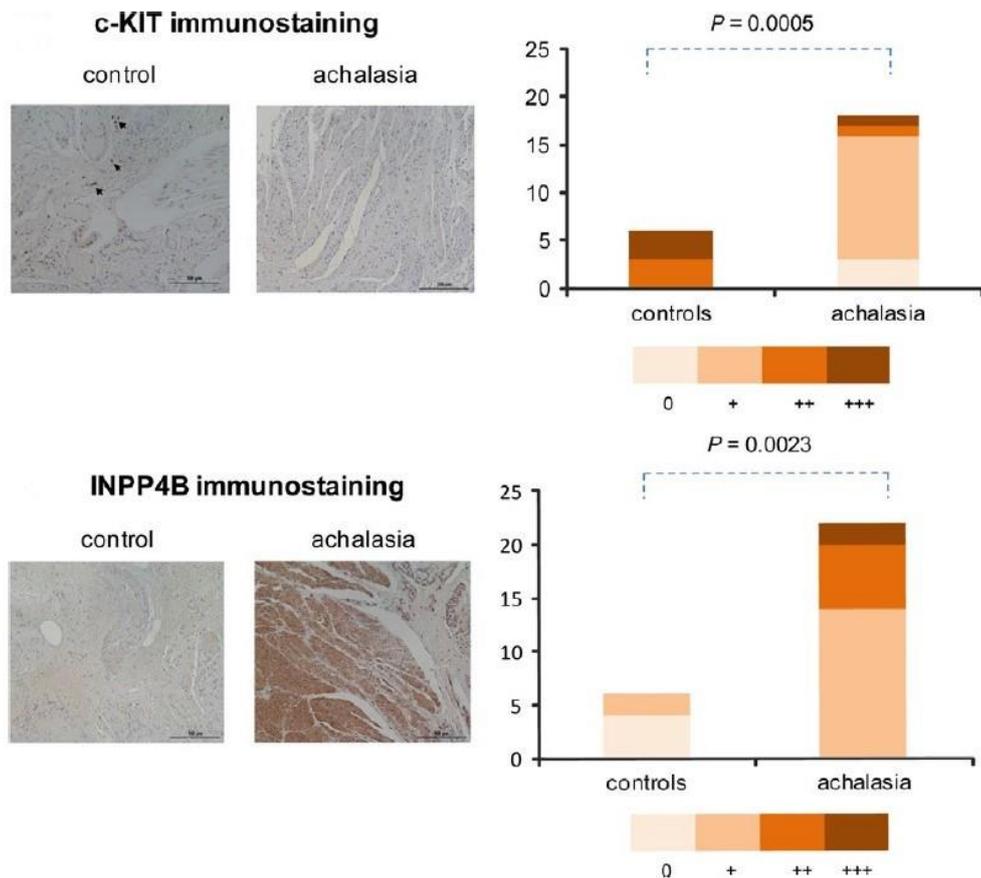


Figura 16: IHC per c-KIT e INPP4B. I controlli (control) sono a sinistra, mentre i pazienti (achalasia) sulla destra. Le frecce indicano la presenza di cellule marcate. Le scale bar sono a 100 μm .

4.4.4 INPP4B: importanza nel signaling di Akt?

INPP4B risulta essere overespresso nell'acalasia. Ranjan M. e colleghi hanno ipotizzato che INPP4B è coinvolto nel signaling di Akt (proteina chinasi B), nella crescita e sopravvivenza cellulare. Akt può essere attivato parzialmente in Thr308 da PDK1, rimanendo legato alla membrana, oppure può essere attivo nella sua massima forma tramite fosforilazione del residuo Ser473 da parte di mTORC2 (Bhaskar PT e Hay N, 2007; Brugge J et al., 2007). Un aumento dell'espressione di INPP4B potrebbe ridurre i livelli di Akt (Ranjan M et al., 2013). Abbiamo così deciso tramite western blot di andare a valutare se a seguito dell'alterata espressione di INPP4B vi fossero cambiamenti nella fosforilazione delle diverse isoforme di Akt (Akt, p-Akt(Thr308), p-Akt(Ser473)). Abbiamo caricato su gel le stesse proteine sonicate da tessuto utilizzate per il western blot, ma utilizzando come normalizzatore endogeno abbiamo utilizzato la β -actina (42 kDa). Avendo le tre isoforme di Akt pesi molecolari molto simili (intorno ai 60 kDa), abbiamo caricato i campioni in doppio su due gel al 10%, visualizzando in uno Akt e β -actina e nell'altro le due isoforme fosforilate in due tempi diversi, a seguito dello *stripping* della membrana. I risultati nella **Figura 17** sono comprensivi di analisi densitometrica delle bande. A parità di espressione della proteina *reference* (β -actina), si evince che le due isoforme fosforilate di Akt mostrano una minore espressione, confermando che nei pazienti acalasiaci l'upregolazione di INPP4B potrebbe influire su questa via del segnale. L'analisi densitometrica mette in luce il fatto che i pazienti con acalasia mostrano una riduzione della fosforilazione di Akt, in particolare sulla Ser473 (t-test $P=0.0495$).

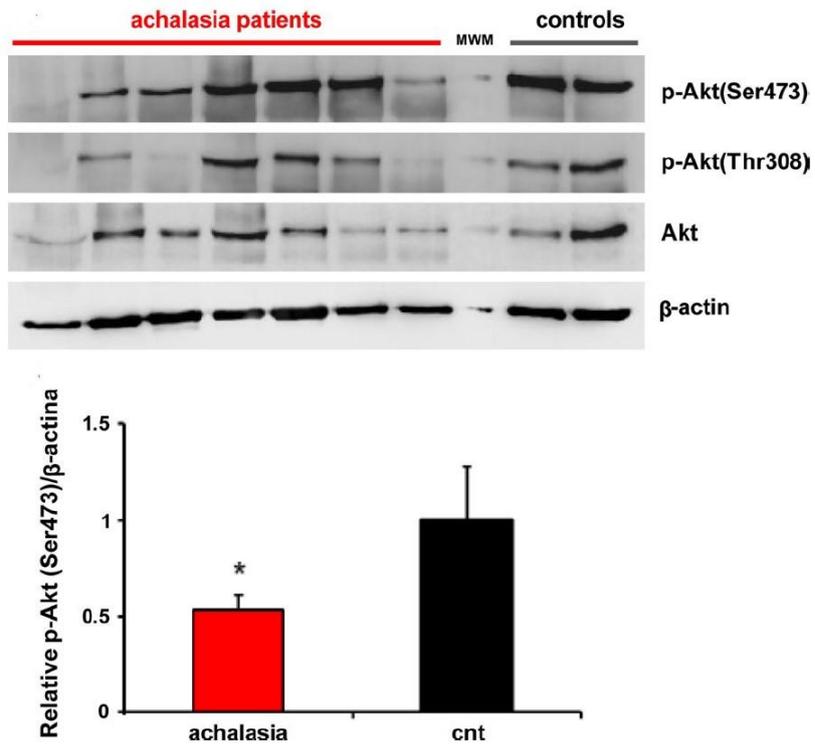


Figura 17: *p-Akt* è downregolata nell'acalasia. Profilo di espressione delle due *p-Akt* (Ser473 e Thr308) e Akt totale nei pazienti acalasi (achalasia patients) e controlli (controls). Alla base del riquadro vi è invece l'analisi quantitativa (media e deviazione standard). Gli esperimenti sono stati riprodotti in duplicato e l'analisi statistica è stata fatta tramite *t-test*.

5 Discussione

È ormai noto che le forme primarie di acalasia causino danni significativi della motilità esofagea, portando ad un complessivo deterioramento della qualità di vita. Questa patologia però presenta un'eziopatologia estremamente complessa. Recenti studi indicano che è necessario un insulto sia di tipo infiammatorio, immuno-mediato, anticorpi circolanti anti-neurone per innescare la malattia (i.e. ganglioniti mienteriche causate da herpes virus) (Moneen A e Boeckstaens GE, 2016). La predisposizione genetica causata dagli HLA può contribuire alle anomalie sviluppate nell'acalasia. Nella sindrome da tripla A (Allgrove's syndrome) sono state ben caratterizzate le componenti genetiche coinvolte nell'insorgenza del fenotipo acalasia, dove la mutazione del gene ALADIN è stata riscontrata in tutte le famiglie (Tullio-Pelet A et al., 2000). Un altro esempio è lo stop codon nel gene che codifica per NOS1 riscontrato in due fratelli, i quali mostravano un quadro clinico molto severo con anche acalasia. Nonostante tutto, la maggior parte delle cause alla base dell'acalasia non sono state ancora identificate, è per questo infatti che si è ancora molto lontani dalla possibilità di creare una terapia target, in quanto un *primum movens* non è ancora stato individuato. Questo studio ha infatti avuto come obiettivo quello di comprendere il *pathway* molecolare che viene ad essere coinvolto e alterato nell'acalasia. Al fine di trovare nuovi target terapeutici abbiamo usato tessuti esofagei da pazienti con acalasia nei quali abbiamo valutato l'espressione genica tramite whole transcriptome analysis. Tramite questa analisi abbiamo individuato 111 geni con espressione alterata. La classificazione funzionale e l'analisi dei processi biologici è stata effettuata tramite due tool bioinformatici, PANTHER e STRING. I risultati hanno mostrato che vi è una over-rappresentazione dei processi fosforilativi, comunicazione intracellulare, processi di sviluppo/differenziamento, inclusa morte cellulare. Questi dati suggeriscono che vi sia uno sbilanciamento nei processi di morte/sopravvivenza cellulare, dove la morte cellulare non causa solo la perdita di neuroni a livello esofageo, ma proprio una degenerazione generale del tessuto. Degno di nota il fatto che Palmieri e colleghi abbiano osservato in un'analisi del trascrittoma di pazienti con acalasia un significativo aumento di processi neuro-muscolari e neuro-immuni. Questi dati suggeriscono che

l'acalasia sia la conseguenza di una degenerazione alterazione/perdita di neuroni del MP principalmente causata da processi infiammatori cronici diretti verso il plesso stesso. Tra questi geni alterati, abbiamo confermato tramite real-time qPCR la downregolazione di *c-KIT* e l'upregolazione di *INNP4B*. la downregolazione di *c-KIT*, validata tramite sia western blot che immunoistochimica, conferma e avvalora l'ipotesi che in questa patologia si abbia una perdita del normale network delle ICCs. Quindi, questi dati suggeriscono che SCF, il maggior ligando di c-KIT, non riesce a mediare il mantenimento e la sopravvivenza delle ICCs, come se ci fosse una morte cellulare programmata. Dato che le ICC hanno un ruolo fondamentale nella motilità esofagea, una loro perdita può essere alla base dell'alterazione della motilità che si ha nei pazienti con acalasia. INPP4B codifica invece per una inositolo polifosfato-4-fosfatasi di tipo IIB, un regolatore negativo di Akt. Questo indica che nei pazienti con acalasia, essendoci questa upregolazione si ha un aumento di segnali di tipo inibitorio sulla sopravvivenza cellulare, portando quindi ad un correlato aumento dei geni coinvolti nella morte cellulare. Infatti, nei tessuti di pazienti con acalasia si osserva una diminuzione della fosforilazione della Ser473 in Akt, che è fondamentale per l'attivazione di questa proteina. Quindi, questa alterazione della sopravvivenza cellulare a lungo andare può portare al danno tissutale. Perciò, dato che molte terapie antitumorali studiano il pathway Akt/INPP4B, si potrebbe valutare lo sviluppo di una terapia *ad hoc* per questo tipo per i pazienti con acalasia primaria.

In conclusione, il nostro studio ha sottolineato il fatto che nell'acalasia prima vi è un'alterazione dell'espressione di due geni c-KIT e INPP4B, rispettivamente down- e upregolati. I nostri studi potrebbero fornire le basi per una ricerca futura indirizzata a cercare nuovi target terapeutici per i pazienti con acalasia primaria.

6 Bibliografia

- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 45(1): 1-14
- Anderson CR, Furness JB, Woodman HL, Edwards SL, Crack PJ, Smith AI. (1995). Characterisation of neurons with nitric oxide synthase immunoreactivity that project to prevertebral ganglia. *J Auton Nerv Syst* 52: 107-116
- Annese V, Bassotti G. Non-surgical treatment of esophageal achalasia. (2006). *World J Gastroenterol* 12: 5763– 6
- Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A. (1990). A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 46: 568-580
- Bhaskar PT, Hay N. (2007). The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12(4): 487-502
- Boeckxstaens GE, Zaninotto G, Richter JE. (2014). Achalasia. *Lancet* 383: 83–93
- Bolande RP. (1974). The neurocristopathies; a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol* 5:409–20
- Boshier LP, Shaw A. (1981). Achalasia in siblings. Clinical and genetic aspects. *Am J Dis Child* 135:709–710
- Brugge J, Hung MC, Mills GB. (2007). A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* 12(2): 104-107
- Chinn JS, Schuffler MD. (1988). Paraneoplastic visceral neuropathy as a cause of severe gastrointestinal motor dysfunction. *Gastroenterology* 95: 1279– 86
- Chiochetti R, Bombardi C, Mongardi-Fantaguzzi C, Venturelli E, Russo D, Spadai A, Montoneri C, Romagnoli N, Grandis A: (1990). Intrinsic innervation of the horse ileum. *Res.vet.science.* 87: 177-185
- Clevers H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154: 274-84
- Conti F, autori vari a cura di Fiorenzo Conti, (2010): *Fisiologia medica, Vol II. Seconda Edizione, Edi---Ermes---Arti Grafiche Stefano Pinelli, Milano*
- Dayalan N, Chettur L, Ramakrishnan MS. (1972). Achalasia of the cardia in sibs. *Arch Dis Child* 47:115–118
- De Giorgio R, Camilleri M. (2004). Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 16:515–531

- De Giorgio R, Camilleri M. (2004). Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 16:515–531
- De Giorgio R, Fustini E, Barbara G, Stanghellini V, Tonini M, Salvioli B, Guerrini S, De Ponti F, Sternini C, Corinaldesi R. (2009). Il cervello intestinale: neurologia e neurobiopatologia dell'apparato digerente, Running Title: Fisiologia e Fisiopatologia dell'Innervazione Enterica.
- Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, Colucci R, Stanghellini V, Barbara G, Del Tacca M, Tonini M, Corinaldesi R, De Giorgio R. Molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:25–42
- Eckrich JD, Winans CS (1979). Discordance for achalasia in identical twins. *Dig Dis Sci* 24:221–224
- Enestvedt BK, Williams JL, Sonnenberg A. (2011). Epidemiology and practice patterns of achalasia in a large multi-centre database. *Aliment Pharmacol Ther* 33: 1209–14
- Eng C. (1999). RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 17: 380–93
- Farrokhi F, Vaezi MF. (2007). Idiopathic (primary) achalasia. *Orphanet J Rare Dis* 2:38
- Farrugia G. (2008). Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* 20(1): 54–63
- Farrukh A, DeCaestecker J, Mayberry JF. (2008). An epidemiological study of achalasia among the south Asian population of Leicester, 1986–2005. *Dysphagia* 23: 161–64
- Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 817: 39-71
- Furness JB, Padbury RTA, Baimbridge KC, Skinner JM, Lawson DEM, (1998): Calbindin Immunoreactivity IS A characteristic of enterochromaffin-like cells (ECL cells) of the human stomach. *Histochemistry* 92: 449-451
- Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Smith TK. (1990). Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell and tissue research*, 260(2), 261-272
- Furness JB. (2006). *The Enteric Nervous System*. Blackwell. 278 pp
- Furness JB. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(5):286-94
- Furness, JB, Costa M, Rökaeus Å, McDonald TJ, Brooks BD. (1987). Galanin-immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine: their projections and relationships to other enteric neurons. *Cell Tissue Res* 250, 607–615
- Gershon MD. (1998). V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am J Physiol* 275(5 Pt 1):G869-73
- Gershon MD. (2006): *Il Secondo Cervello*, II edizione. Utet edizione Torino
- Gockel HR, Schumacher J, Gockel I, Lang H, Haaf T, Nöthen MM. (2010). Achalasia: will genetic studies provide insights? *HumGenet* 128: 353–64

- Gockel I, Bohl J R, Eckardt V F, Junginger T. (2008). Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. *Am J Gastroenterol* 103: 856–64
- Goyal RK, Hirano I. (1996). The enteric nervous system. *New Engl J Med*. 25: 1106–15
- Heanue TA, Pachnis V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 8: 466–79
- Horowitz M, Fraser RJ. (1995). Gastroparesis: diagnosis and management. *Scand J Gastroenterol* 213 (Suppl.): 7–16
- Kaar TK, Waldron R, Ashraf MS, Watson JB, O'Neill M, Kirwan WO. (1991). Familial infantile oesophageal achalasia. *Arch Dis Child* 66:1353–1354
- Kapur RP. (2000). Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol* 227: 146–55
- Karemaker JM. (2017). An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas* 38(5):R89-R118.
- Knowles CH, Lindberg G, Panza E, De Giorgio R. (2013). New perspectives in diagnosis and management of enteric neuropathies. *Nat Rev gastroenterol Hepatol* 10(4): 206-218
- Kuntz A. The structural organization of the celiac ganglia. *J. Comp. Neurol.* 1938 69:1- 12
- Lake JJ, Heuckeroth RO. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305(1):G1-24
- Luzón-Toro B, Espino-Paisán L, Fernández RM, Martín-Sánchez M, Antiñolo G, Borrego S. (2015). Next-generation-based targeted sequencing as an efficient tool for the study of the genetic background in Hirschsprung patients. *Medical Genetics* 16:89
- Moonen A, Boeckxstaens GE. Finding the right treatment for achalasia treatment: risks, efficacy, complications. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2016; 14:420-428
- Panza E, Knowles CH, Graziano C, Thapar N, Burns AJ, Seri M, Stanghellini V, De Giorgio R. (2012). Genetics of human enteric neuropathies. *Progress in Neurobiology* 96: 179-189
- Passarge E. (2002). Dissecting Hirschsprung disease. *Nat Genet* 31: 11-12
- Patrick A, Epstein O. Gastroparesis. (2008). *Aliment Pharmacol Ther* 27: 724–40
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H. (1992). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382(6586): 73-76
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, et al. (1998). SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18: 171–3
- Ranjan M, Gruber J, Ng LF, Halliwell B. (2013). Repression of the mitochondrial peroxiredoxin antioxidant system does not shorten life span but causes reduced fitness in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 63:381-9
- Romeo G, Ceccherini I, Celli J, et al. (1998). Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *J Intern Med* 243: 515–20

- Sachdev A, Sandhu BS, D’Cruz S, Lehl SS, Agarwal V. (2004). Achalasia cardia in mother and son. *Indian J Gastroenterol* 23:109
- Sadowski DC, Ackah F, Jiang B, et al. (2010). Achalasia: incidence, prevalence and survival. A population-based study. *Neurogastroenterol Motil* 22: e256–61
- Sanders KM, Smith TK. (1986). Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. *J. Physiol* 380: 293-310
- Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. (2012). The enteric nervous system. *Dev. Biol.* 366(1):64-73
- Shepherd IT, Pietsch J, Elworthy S, Kelsh RN, Raible DW. (2004). Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development* 131(1): 241-249
- Siéssere S, Vitti M, Sousa LG, Semprini M, Iyomasa MM, Regalo SC. (2008). Anatomic variation of cranial parasympathetic ganglia. *Braz Oral Res* 22(2):101-5
- Sternini C. (1997). Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc* 2(1):1-7
- Stoddard CJ, Johnson AG. (1982). Achalasia in siblings. *Br J Surg* 69:84–85
- Szurszewski JH, Miller SM. (1994). Physiology of prevertebral ganglia. In: Johnson L.R. (ed) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, USA. pp 795---877
- Tassicker BC, Henning GW, Costa M, Brookes SJ. (1999). Rapid anterograde and retrograde tracing from mesenteric nerve trunks to the guinea-pig small intestine in vitro. *Cell Tissue Res.* 295: 437-452
- Torfs CP. (1998). An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial California population *The Third International Meetings: Hirschsprung disease and related neurocristopathies*
- Yin L, Puliti A, Bonora E, et al. (2007). C620R mutation of the murine ret proto-oncogene: loss of function effect in homozygotes and possible gain of function effect in heterozygotes. *Int J Cancer* 121:292–300

Prefazione secondo argomento

Questo studio è stato svolto in collaborazione con il Laboratorio di Neurochimica del Sonno del Professor Amici (DIBINEM dell'Università di Bologna). Tramite un modello in vivo di torpore artificiale ricreato dal gruppo del DIBINEM stiamo studiando i meccanismi fisiologici alla base delle malattie neurodegenerative note come Taupatie. È noto ormai da tempo che durante lo stato ipotermico che si verifica durante il torpore naturale si hanno dei meccanismi neuro-protettivi che esitano nella salvaguardia del neurone dalla degenerazione. È molto interessante scoprire se effettivamente anche in mammiferi non ibernanti, inducendo l'ipotermia tramite torpore artificiale, siano presenti i meccanismi di modificazione post-traduzionale che proteggono le strutture nervose. Lo studio che abbiamo svolto sul sistema nervoso centrale ha portato alla pubblicazione di un lavoro su *Frontiers in Neuroanatomy* di cui sono co-autrice e sul quale si basa la maggior parte di questo argomento, ma anche di un abstract presentato al congresso congiunto SIF-FEPS tenutosi a settembre 2019 a Bologna. Essendo le malattie neurodegenerative patologie invalidanti per l'organismo *in toto* abbiamo spostato la nostra attenzione anche sul sistema nervoso enterico, quindi mostrerò anche dati preliminari su questo tratto.

Abstract Lavoro

Phosphorylation and Dephosphorylation of Tau Protein During Synthetic Torpor

Marco Luppi¹, Timna Hitrec¹, Alessia Di Cristoforo¹, Fabio Squarcio¹, **Agnese Stanzani**², Alessandra Occhinegro¹, Pierfrancesco Chiavetta¹, Domenico Tupone^{1,3}, Giovanni Zamboni¹, Roberto Amici¹ and Matteo Cerri¹

¹ Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, ² Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy, ³ Department of Neurological Surgery, Oregon Health & Science University, Portland, OR, United States

Tau protein is of primary importance for many physiological processes in neurons, where it affects the dynamics of the microtubule system. When hyperphosphorylated (PP-Tau), Tau monomers detach from microtubules and tend to aggregate firstly in oligomers, and then in neurofibrillary tangles, as it occurs in a group of neurodegenerative disorders named tauopathies. A hypothermia-related accumulation of PP-Tau, which is quickly reversed after the return to normothermia, has been shown to occur in the brain of hibernators during torpor. Since, recently, in our lab, a hypothermic torpor-like condition (synthetic torpor, ST) was pharmacologically induced in the rat, a non-hibernator, the aim of the present work was to assess whether ST can lead to a reversible PP-Tau accumulation in the rat brain. PP-Tau was immunohistochemically assessed by staining for AT8 (phosphorylated Tau) and Tau-1 (non-phosphorylated Tau) in 19 brain structures, which were chosen mostly due to their involvement in the regulation of autonomic and cognitive functions in relation to behavioral states. During ST, AT8 staining was strongly expressed throughout the brain, while Tau-1 staining was reduced compared to control conditions. During the following recovery period, AT8 staining progressively reduced close to zero after 6 h from ST. However, Tau-1 staining remained low even after 38 h from ST. Thus, overall, these results show that ST induced an accumulation of PP-Tau that was, apparently, only partially reversed to normal during the recovery period. While the accumulation of PP-Tau may only depend on the physicochemical characteristics of the enzymes regulating Tau phosphorylation, the reverse process of dephosphorylation should be actively regulated, also in non-

hibernators. In conclusion, in this work a reversible and widespread PP-Tau accumulation has been induced through a procedure that leads a non-hibernator to a degree of reversible hypothermia, which is comparable to that observed in hibernators. Therefore, the physiological mechanism involved in this process can sustain an adaptive neuronal response to extreme conditions, which may however lead to neurodegeneration when particular intensities and durations are exceeded.

Abbreviazioni:

- **AD:** Malattia di Alzheimer
- **KO:** Knock-out
- **LTD:** Depressione a Lungo Termine
- **APP:** Proteina Precursore Dell'Amiloide
- **PART:** Taupatia Tau Correlata
- **SNC:** Sistema Nervoso Centrale
- **EEG:** Elettroencefalogramma
- **tGI:** tratto Gastrointestinale
- **TS:** Torpore Sintetico
- **HR:** Heart Rate, frequenza cardiaca
- **HLI:** Heat Loss Index, indice di perdita di calore
- **TC:** Temperatura Centrale
- **BAT:** Tessuto Adiposo Bruno
- **TA:** Temperatura Ambiente
- **LD:** Light-Dark
- **aCSF:** Liquido Cerebrospinale Artificiale

1 Introduzione

1.1 Espressione e Struttura della Proteina Tau

La proteina Tau umana è codificata dal gene MAPT - microtubule -associated protein Tau gene, che è formato da 16 esoni localizzati sul cromosoma 17q21 (Andreadis A 2006). Nell'encefalo, la proteina Tau è stata riscontrata principalmente nei neuroni ma anche a livelli basali nella glia e extracellulare (LoPresti P et al., 1995). L'encefalo umano alla fine dello sviluppo contiene sei isoforme principali di questa proteina, che sono generate dallo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10. Queste isoforme differiscono sulla base della presenza di un inserto di 29 aminoacidi vicino all'N-terminale, codificato dagli esoni 2 e 3; inoltre, le diverse isoforme possono anche essere categorizzate in base al numero di ripetizioni (3 o 4) che possono essere presenti al C-terminale. Lo splicing alternativo dell'esone 10 è molto importante perché è spesso associato a diverse Taupatie (Dickinson DW et al., 2011). La proteina Tau è idrofila e altamente solubile: la sua isoforma più lunga, la 2N4R contiene 80 residui di Ser o Thr, 56 residui negativi di Asp o Glu, 58 residui positivi di Lys o Arg e 8 aromatici di cui 5 Tyr e 3 Phe. Nel complesso la proteina Tau è una proteina basica, ma vi è una discrepanza di distribuzione di carica, in quanto i 120 residui all'N-terminale sono principalmente acidi, mentre i 40 al C-terminale neutri. Questa asimmetria di carica è importante per l'interazione con i microtubuli e altri partners cellulari, per il ripiegamento interno della proteina e per l'aggregazione con altre proteine. La proteina può essere suddivisa in due grandi domini, in base all'interazione con i microtubuli e in base al tipo di aminoacidi: microtubule-assembly domain al C-terminale e projection domain all'N-terminale. Ad unione di questi due domini vi è una regione ricca di residui di Pro che contiene sette domini PXXP, che serve come sito di legame per le proteine segnale con il dominio di omologia SRC 3 (SH3), come la tirosina chinasi FYN (**Figura 1**).

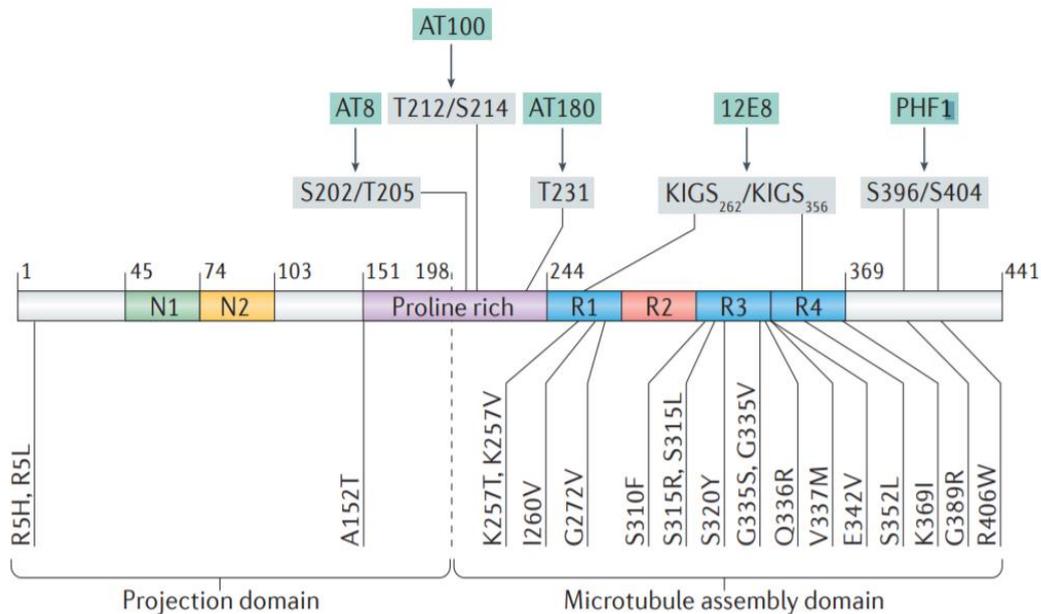


Figura 1: struttura della proteina Tau. microtubule-assembly domain al C-terminale contenente il dominio di sequenze ripetute e la regione fiancheggiante. Il dominio al C-terminale è responsabile del legame ai microtubuli e dell'aggregazione della proteina Tau. Il projection domain all'N-terminale invece non ha contatti con i microtubuli. La regione intermedia ricca di Pro (aa 151-243) è una regione target di chinasi come la GSK3 β , CDK5, MAPK e JNK, siti fondamentali di fosforilazione nelle Taupatie. (modificata da: Wang Y e Mandelkow E, 2016)

L'interazione con questa tirosina chinasi può determinarne una modificazione del targeting post-sinaptico (Lee G et al., 1998; Ittner LM et al., 2010). La Tau monomerica si aggrega a formare polimeri fibrosi elicoidali di 20 nm di spessore che si incrociano periodicamente ogni 80 nm formando filamenti, che a loro volta si uniscono tra loro a formare fasci neurofibrillari (tau-tangles) nel citosol dei neuroni, associati all'accumulo di proteina β -amiloide (noto anche come $\alpha\beta$). Nonostante questa capacità, normalmente questa proteina ha la caratteristica di trovarsi in forma non ripiegata monomerica, in una conformazione "intrinsecamente disordinata", con una tendenza molto scarsa all'aggregazione. Comunque, la proteina Tau può formare aggregati a livello locale quando interagisce con particolari proteine ed elementi cellulari (ad esempio i

microtubuli) (Kadavath H et al, 2015; Gruning CS et al., 2011). Sebbene la natura di questa proteina tenda a conformazioni non ripiegate, globalmente tende ad acquisire una disposizione a graffetta, in cui l’N-, il C- terminale e i domini ripetuti interagiscono tra loro (Jeganathan S et al., 2006). Questa conformazione potrebbe proteggere la Tau dall’aggregazione, invece, l’eliminazione del C-/N-terminale potrebbe favorirla. Quando la proteina Tau aggrega, i domini ripetuti formano il core del polimero fibroso, mentre l’N- e il C- terminale formano l’envelope indefinito esterno. Il core contiene foglietti- β , mentre l’envelope esterno prende anche il nome di fuzzy coat in quanto è difficile da individuare con la maggior parte di tecniche laboratoristiche (Wegmann S et al., 2016).

La fosforilazione della Tau è regolata da condizioni ambientali, tanto che la forma fetale contiene più domini fosforilati della forma adulta (7 contro 2 domini fosforilati). Nell’Alzheimer i domini fosforilati sono circa 8 (Köpke E et al., 1993). Ci sono all’incirca 85 siti che possono essere fosforilati in questa proteina (80 Ser/Thr e 5 Tyr) nell’isoforma più lunga 2N4R, e molti di questi siti sono accessibili solo nella forma non ripiegata (Hanger DP et al., 2009). Le proteina fosfatasi 1 (PP1), 2A, 2B, 2C e la 5 sono state implicate nella defosforilazione della Tau. Tra queste, la 2A è quella che si occupa del 70% dell’attività di defosforilazione di questa proteina a livello encefalico, e la sua attività è ridotta dal 20 al 40% nella malattia di Alzheimer (AD) (Gong CX et al., 1993). La riduzione dell’attività della fosfatasi PP2A nell’AD potrebbe essere dovuta a modificazioni post-traduzionali nel dominio catalitico, una diminuzione dell’espressione della fosfatasi stessa o un aumento degli inibitori della fosfatasi. Degno di nota il fatto che le fosfatasi a differenza delle chinasi sono più sensibili ai cambiamenti di temperatura, infatti l’ipotermia inibisce le fosfatasi esponenzialmente, mentre le chinasi sono inibite in maniera lineare. Questo potrebbe spiegare perché durante il letargo e nell’ipotermia indotta da anestesia si osserva iperfosforilazione della proteina Tau (Planel E et al., 2004; Arendt T et al., 2003; Planel E et al., 2007). La fosforilazione della Tau è fondamentale nel controllare le funzioni fisiologiche di questa molecola, inclusa la capacità di legarsi ai microtubuli e quindi la stabilizzazione e l’assemblaggio ai microtubuli stessi. Infatti, la fosforilazione da parte delle chinasi MARK, PKA o CAMKII del motivo KXGS (in particolare sulla Ser262) sul dominio ripetuto della Tau può scatenare il distacco della Tau dai microtubuli, invece, la fosforilazione su motivi Thr-Pro o Ser-Pro sulla regione adiacente non influenza il binding della Tau ai microtubuli

(Lu PJ et al., 1999). La proteina Tau può essere soggetta ad altri tipi di modificazioni post-traduzionali come la glicosilazione, glicazione, deaminazione, isomerizzazione, nitratura, metilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e rimozione dei gruppi C- e N-terminale. Infatti, negli encefali di pazienti con AD si è osservata la presenza di N-glicosilazione, che sembra mantenere e stabilizzare i polimeri filamentosi di Tau. In generale, tutte queste modificazioni sono state riscontrate nei polimeri di proteina Tau, dove probabilmente favorisce il processo di aggregazione (Watanabe A et al., 2004).

La distribuzione della Tau è regolata da fattori ambientali, infatti, nei neuroni giovani si trova principalmente nel corpo cellulare e nel neurite. Nel neurone sviluppato invece si accumula principalmente a livello dell'assone, e in minore quantità nei dendriti e nei nuclei. Il meccanismo che porta a questa distribuzione polarizzata all'interno dei neuroni non è ancora stato completamente chiarito ma sembra essere associato al fatto che l'mRNA della Tau tende a localizzarsi nella regione prossimale dell'assone, inoltre, a livello somatodendritico la proteina Tau ha un turnover molto più elevato rispetto a quello che ha a livello assonale. Comunque, il sorting di questa proteina sembra essere influenzato anche dal tipo di isoforma, in quanto isoforme diverse presentano una distribuzione diversa nei compartimenti cellulari (Wang Y e Mandelkow E, 2015).

1.2 Ruolo Fisiologico della Proteina Tau

È stata originariamente identificata come proteina associata ai microtubuli, ma recentemente sono emersi alcuni nuovi ruoli. Come precedentemente detto, la Tau è principalmente distribuita a livello assonale, dove interagisce con i microtubuli attraverso l'ausilio dei domini ripetuti e le regioni fiancheggianti tali domini. Inoltre, la Tau può stabilizzare i microtubuli, favorirne l'assemblaggio e, in particolare, regolare la dinamica tubulare che permette la riorganizzazione del citoscheletro. La proteina Tau si lega nell'interfaccia tra i dimeri di α - e β - tubulina su alcuni specifici residui. Quando si lega ai microtubuli la Tau non è in grado di aggregarsi perché i due esapeptidi VQIINK e VQIVYK, essenziali per l'aggregazione, favoriscono la tipica conformazione a graffetta che rende la Tau inerte (Kavadath H et al., 2015). Inoltre, può controllare il traffico assonale in diverse maniere: 1) competendo con chinesina e dineina nel legame con i microtubuli; 2) riducendo il numero di proteine motore accoppiate con le proteine cargo, interferendo quindi nel trasporto assonale; 3) competendo con altre proteine cargo nel legame con chinesina e dineina; 4) regolando il rilascio delle proteine cargo da chinesina e dineina, attivando tramite l'N-terminale la fosfatasi PP1 e la glicogeno sintasi chinasi 3β (GSK3 β); 5) interagendo con la subunità p150 della dinactina, fondamentale per l'interazione microtubuli-dineina, fortificando quindi i meccanismi di trasporto (Wang Y e Mandelkow E, 2015). Si può dire che la Tau sembra essere essenziale per il trasporto assonale, l'allungamento e la maturazione dell'assone. Infatti, culture di neuroni di ratto knock-out (KO) per la Tau non mostrano formazione del neurite, invece, overespressione della Tau favorisce la formazione di neuriti anche di tipo non-neuronale (Knops J et al., 1991).

Al contrario, la funzione fisiologica della Tau a livello dendritico non è ancora stata compresa del tutto. Probabilmente in questo contesto è coinvolta nella regolazione della plasticità sinaptica, dato che in culture neuronali murine l'attivazione assonale tramite farmaci induce la traslocazione della Tau endogena dai dendriti al compartimento eccitatorio postsinaptico (Fransdemiche ML et al., 2014). In culture neuronali e in vivo, in condizioni fisiologiche e di stress ipertermico, la Tau nucleare sembra mantenere l'integrità del DNA genomico, dell'RNA citoplasmatico e nucleare (Sultan A et al.,

2011). È emerso da recenti studi che topi knock-out per la proteina Tau mostrano alcuni cambiamenti in senso patologico che attestano il coinvolgimento di questa proteina in attività neuronali, neurogenesi, trasporto del ferro e depressione a lungo termine (LTD). Infatti, l'espressione di bassi livelli di Tau protegge dalla tossicità extracellulare causata dall'accumulo di $\alpha\beta$ o altre esotossine in topi che overesprimono la proteina precursore dell'amiloide (APP), la APP umana e la presenilina (PS1) umana. La neurogenesi ippocampale nell'adulto è severamente compromessa in una linea cellulare murina Tau-knock-out (Hong XP et al., 2010). L'accumulo di ferro intraneuronale, la neurotossicità a livello della substantia nigra e il declino nelle funzioni locomotorie sono stati osservati in topi di 12 mesi Tau-Knock-out (Lei P et al., 2012). L'assenza della Tau può causare accumulo di ferro nel neurone evitando l'accumulo di APP a livello della superficie cellulare. L'APP di solito interagisce con la ferroportina alterando il trasporto del ferro e inducendo uno stato di tossicità. Gli accumuli di ferro sono stati osservati in diverse aree cerebrali in concomitanza a livelli di proteina Tau non solubile. Recenti studi hanno mostrato che la Tau ha un ruolo importante anche nella plasticità: topi knock-out mostrano a livello ippocampale in CA1 deficit nella LTD ma non nel potenziamento a lungo termine sia in vivo che ex vivo (Kimura T et al., 2014).

1.3 Ruolo Patologico della Proteina Tau

La base della neurodegenerazione Tau-mediata deve ancora essere elucidata. Nelle Taupatie familiari la mutazione del gene MAPT sembra essere il motivo principale alla base dell'aggregazione della proteina Tau, ma nelle forme sporadiche come ad esempio nell'AD il *trigger* scatenante non è ancora noto. Le Taupatie possono essere classificate in tre gruppi in base all'isoforma di proteina Tau riscontrata negli aggregati: le Taupatie 4R come la degenerazione corticobasale (CBD); le 3R come la malattia di Pick (PiD) e le 3R+4R come l'AD. Generalmente, si suppone che la neurodegenerazione sia dovuta ad una perdita di funzione, neurotossicità e accumulo della proteina Tau (Wang Y e Mandelkew E, 2015).

È attestata la presenza di più di 80 mutazioni sia nella regione esonica che intronica del gene umano MAPT che sono collegate a diverse Taupatie come ad esempio la CBD e la demenza frontotemporale con parkinsonismo-17 (FTDP-17). Queste mutazioni possono essere classificate come mutazioni missenso, che alterano la sequenza della proteina Tau; e mutazioni che causano splicing alternativo, che cambiano il rapporto delle diverse isoforme della proteina senza esitare nella produzione di Tau mutata (Kouri N et al., 2014; Coppola G et al., 2012). La maggior parte delle mutazioni missenso (ad esempio: G272V, N279K) si trova a livello del microtubule-binding domain, causando una riduzione dell'affinità per i microtubuli e una maggior tendenza all'aggregazione (Barghorn S et al., 2000; Hong M et al., 1998). Un'altra conseguenza della presenza di mutazioni missenso può essere un effetto neurotossico. Ad esempio la mutazione R5H/R5L è fuori dal microtubule-binding domain, ma è in grado di distruggere la capacità di legame della Tau alla p150 del dynactin-complex, cofattore essenziale per il funzionamento della dineina, interferendo in questo modo con il trasporto assonale. La maggior parte di mutazioni splicing si trovano a livello dell'introne 10, favorendo il mantenimento dell'esone 10 portano ad un aumento delle ripetizioni R2, aumentando il rapporto dell'isoforma 4R della Tau rispetto alla 3R. Probabilmente la propensione all'aggregazione è dovuta al fatto che le due isoforme hanno una differente capacità di stabilizzazione dei microtubuli, cosicché un'aumento della 4R sulla 3R porta ad una maggior capacità di aggregazione (Wang Y e Mandelkow E, 2015).

Data la natura unfolded della proteina, la tendenza all'aggregazione non è intuitiva, nonostante tutto la Tau è causa di molte patologie neurodegenerative, a tal punto che si parla anche di una vera e propria Taupatia età-correlata (PART), nonostante resti dibattito aperto se questa patologia rappresenti semplicemente l'inizio dell'AD, in quanto non è attestato un vero e proprio danneggiamento della componente cognitiva. Come abbiamo discusso in precedenza vi sono due corti esapeptidi che risultano essere fondamentali per l'inizio dell'aggregazione, poiché normalmente questi sono disposti a formare delle regioni cerniera che, qualora venissero meno favorirebbero la tendenza della proteina Tau ad aggregare, innescando la formazione dei foglietti- β del core. Inoltre, la fosforilazione di alcuni siti rende maggiormente incline la proteina all'aggregazione. Proteine Tau iperfosforilate di encefalo con AD mostrano anch'esse in vitro la tendenza a formare aggregati fibrillari, ma non è noto se siano fondamentali o meno altri cofattori per questo

evento. Al contrario, è noto che la fosforilazione di alcuni siti sia protettiva contro l'aggregazione (Schneider A et al., 1999). In vivo durante l'ibernazione di alcune specie e durante l'ipotermia in anestesia si osserva l'iperfosforilazione AD-like della proteina, ma non l'aggregazione, indicando che quindi l'evento fosforilativo da solo è una condizione non sufficiente ad indurre la formazione dei polimeri fibrosi (Arendt T et al., 2003; Planel E et al., 2007). Al contrario, si è dimostrato in vitro che l'aggregazione può essere indotta anche tramite cofattori polianionici, senza fosforilazione. È perciò possibile che alcuni cofattori inneschino l'aggregazione della Tau nell'AD e che la fosforilazione in qualche modo possa accelerare questo evento, per esempio, limitando l'affinità della Tau ai microtubuli (Goedert M et al., 1996; Wang Y e Mandelkow E, 2012). Alcuni particolari domini della proteina, se esposti, potrebbero essere pronti all'aggregazione e predisposti a formare i foglietti- β del core. Il meccanismo alla base dell'evento di aggregazione è di "nucleazione – elongazione": da polimeri di proteina si staccano semi patologici predisposti ad aggregare, che a loro volta vengono distribuiti ai neuroni sinapticamente collegati (Clavaguera F et al., 2009) (**Figura 2**).

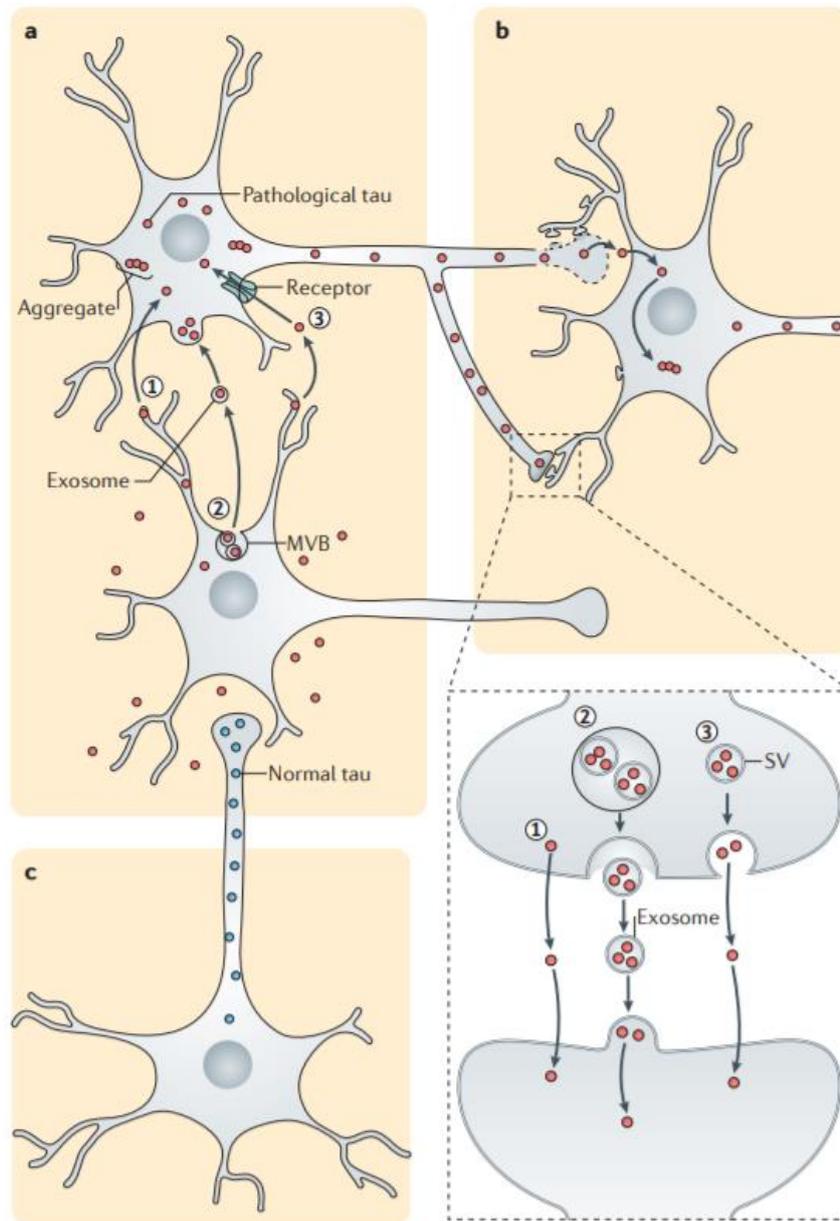


Figura 2: meccanismo di trasmissione della Tau patologica. a) in neuroni in prossimità mediante esocitosi come in 1 e 3 oppure tramite esosomi 2; b) tramite degenerazione dei terminali presinaptici che causa il rilascio di Tau patologica che diffonde con i meccanismi precedentemente citati nei neuroni limitrofi e comincia l'aggregazione; c) nelle regioni a monte non si sa bene quando vengano innescati i meccanismi patologici in quanto la Tau non viene trasportata con meccanismi retrogradi. (modificata da: Wang Y e Mandelkow E, 2016)

La perdita di funzione della proteina Tau è sempre stata correlata ad aggregazione ed iperfosforilazione. Più nello specifico, l'iperfosforilazione della proteina sui domini ripetuti riduce l'affinità di legame ai microtubuli, che a sua volta può causare disassemblaggio di questi ultimi, portando ad un deficit del trasporto assonale. L'aggregazione invece diminuisce i livelli di Tau solubile funzionante che a sua volta può portare a disassemblaggio dei microtubuli. Inoltre, dato che la proteina Tau è coinvolta in numerose funzioni come ad esempio il trasporto del ferro, la neurogenesi, l'LTD e la protezione del DNA neuronale, la perdita della funzionalità di questa proteina può innescare neurotossicità attraverso alcuni di questi meccanismi (Kimura T et al., 2014).

È stato però provato che la formazione dei grovigli neurofibrillari di proteina Tau tipici dell'AD non sono essi stessi la causa di danneggiamento delle sinapsi e dei tipici deficit cognitivi della patologia, ma potrebbero, nel breve termine, costituire un evento protettivo. Infatti, in linee cellulari murine transgeniche (knock-out/wild-type per la proteina Tau umana), è stato provato che la perdita delle sinapsi e i deficit cognitivi sono eventi che avvengono sia prima che in assenza della formazione di aggregati fibrillari di proteina Tau, dimostrando che il danno potrebbe dipendere anche dalla presenza di altre isoforme monomeriche solubili (Santacruz K et al., 2005). Probabilmente la formazione di questi aggregati fibrillari nel breve termine costituisce una protezione cellulare, in quanto, inglobando i monomeri unfolded di proteina Tau, gli aggregati inibiscono la formazione di ROS in risposta alla presenza dei monomeri tossici. Comunque sia, a lungo termine, questi aggregati sequestrano altri componenti cellulari, e alla fine compromettono la funzionalità neuronale, inoltre, l'ingombro sterico può arrivare a compromettere il trasporto assonale, portando alla neurodegenerazione. Resta però ancora molto difficile determinare che tipo di monomeri di proteina Tau causino neurotossicità e soprattutto se siano necessari sia questi che gli aggregati per causare patogenesi. Sembra anche che l'iperfosforilazione dei monomeri di proteina causi una certa tossicità indipendentemente dalla presenza di aggregati neurofibrillari: la pTau monomerica sembra interagire con la proteina scaffold fondamentale nel funzionamento della chinesina, danneggiando quindi il trasporto assonale (Ittner LM et al., 2009).

La tossicità può anche essere causata da un accumulo di proteina Tau nel compartimento dendritico. L'accumulo di Tau nei dendriti può fungere da scaffold per il trasporto della

chinasi FYN nei terminali postsinaptici, che a sua volta fosforila la subunità 2 del recettore NMDA, stabilizzando il legame di quest'ultimo con la proteina 95. Quest'ultima potenzia il segnale glutammatergico che, associato all'accumulo β -amiloide, porta ad elevata tossicit  neuronale (Ittner LM et al., 2010).

1.4 Ruolo della proteina Tau nel torpore

Il torpore, o ibernazione,   un comportamento adattativo usato da alcune specie di mammiferi per minimizzare la spesa energetica in condizioni ambientali critiche, come ad esempio durante l'inverno. Gli animali endotermi solitamente mantengono la temperatura corporea costante tramite termoregolazione, che in ambiente freddo richiede la produzione di calore metabolico, evento estremamente dispendioso a livello energetico per l'organismo. Alcuni animali sono in grado di ridurre questa spesa energetica mantenendo temporaneamente la loro temperatura al di sotto dei valori di normotermia. Il torpore o letargo   caratterizzato da ipotermia corporea e abbassamento generale del metabolismo (Geiser F 2004). In particolare, l'encefalo di mammifero, come altri tessuti (i.e. il tratto gastrointestinale), ha un'attivit  energeticamente dispendiosa. Perci , anche solo una modesta riduzione dell'attivit  di questo tessuto potrebbe avere un ruolo adattativo considerevole al fine di conservare energia. Infatti, il dispendio metabolico durante il torpore   al di sotto del 5%. Questa riduzione   accompagnata ad un drastico calo a livello del sistema nervoso centrale (SNC) dell'attivit  neuronale, e tramite elettroencefalogramma (EEG) si vede una quasi totale assenza di attivit  cerebrale (Jacobs LF 1996; Igelmund P et al., 1993; Daan S et al., 1991). Si pu  quindi affermare che con l'ibernazione gli animali possono salvare fino al 90% dell'energia che sarebbe normalmente richiesta in condizioni estreme. Gli animali vivono una condizione di vita minima, dove l'energia richiesta e quella effettivamente fornita per sopravvivere sono basse ma in perfetto equilibrio.   per questo che l'equilibrio omeostatico viene preservato e non vi   danno dei tessuti. Perci  l'ibernazione favorisce una buona tolleranza alla deprivazione di ossigeno e glucosio, a differenza di ci  che avviene in condizioni estreme

(i.e. digiuno), in cui l'energia minima richiesta e quella fornita sono sbilanciate, e questo porta ad un possibile danno cellulare (Arendt T et al., 2015). Conoscere i meccanismi che portano ad un uso minimo dei tessuti (in particolare dell'encefalo), potrebbe essere fondamentale per capire la fisiopatologia delle malattie neurodegenerative, in cui prima della morte i neuroni vanno incontro ad una condizione ipometabolica e a plasticità neuronale. Quindi, per molti aspetti, il torpore potrebbe rappresentare uno strumento per comprendere cosa induca lo stato patologico. Uno dei meccanismi più utilizzati per ridurre il tasso metabolico è la fosforilazione reversibile di enzimi e proteine. La fosforilazione è una modificazione post-traduzionale che è in grado di inattivare la proteina cambiandone la conformazione. Durante l'ipotermia quindi vengono attivati meccanismi di fosforilazione reversibile che possono riguardare le proteine localizzate sulle membrane sinaptiche (fenomeno fondamentale per la plasticità sinaptica) (Walaas SI e Greengard P 1991) e anche la proteina Tau (Arendt T et al., 2003). Diversi studi mostrano che durante il torpore nello scoiattolo europeo, nello scoiattolo artico, nel criceto siriano e nell'orso bruno si ha la fosforilazione della proteina Tau sui residui di Ser/Thr. Questa modificazione favorisce la formazione di polimeri a doppia elica di Tau, che sono tipici anche dell'AD (Sadik G et al., 2009). Inoltre, anche altre condizioni stressogene come ad esempio lunghi periodi di digiuno o un'anestesia generale possono causare la fosforilazione della proteina Tau (Luppi M et al., 2019). I filamenti a doppia elica di proteina che si vengono a formare durante il torpore sembrano essere ben tollerati dall'organismo e generalmente è un fenomeno rapidamente reversibile a seguito del ripristino di condizioni fisiologiche (Arendt T et al., 2014) (**Figura 3**).

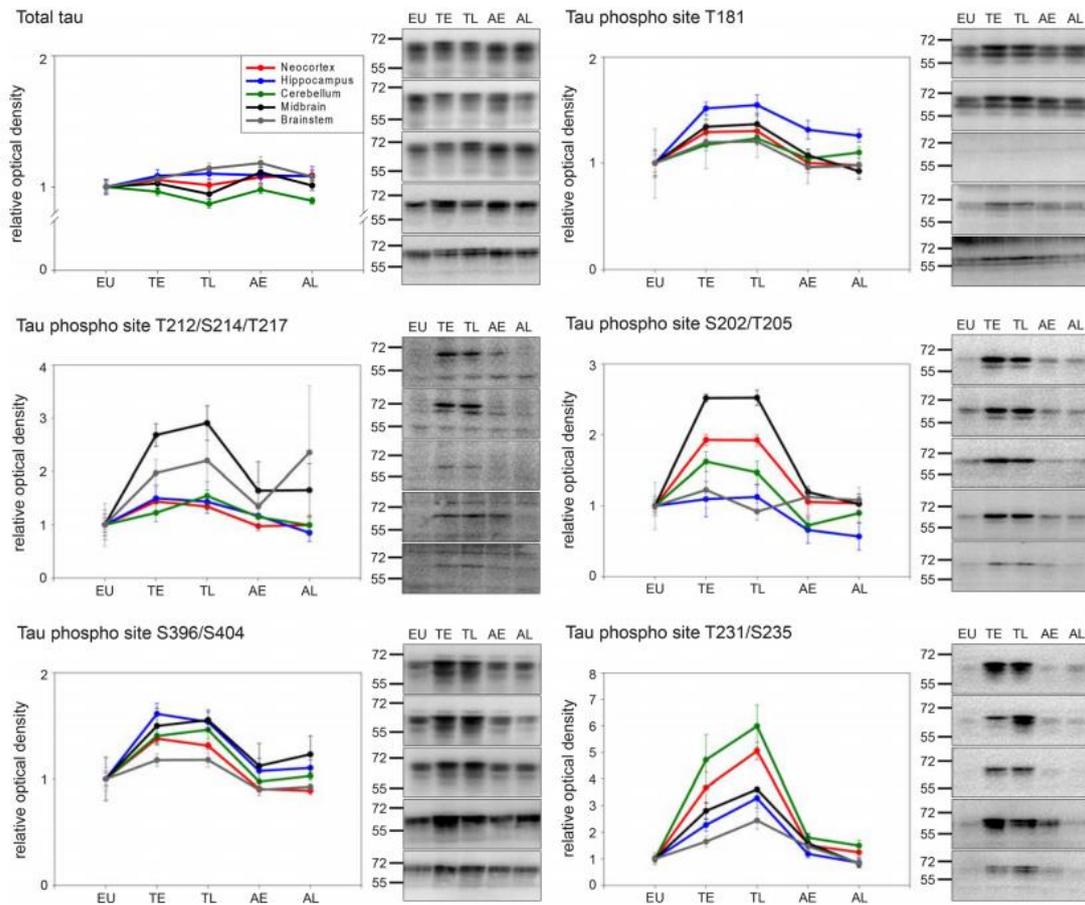


Figura 3: western blot eseguito su diverse aree cerebrali di criceto siriano indicate in legenda in differenti momenti. EU: animale eutermico; TE: torpore precoce; TL: torpore tardivo; AE: inizio fase recupero; AL: fine fase recupero. È stata valutata l'espressione della proteina Tau non fosforilata e diverse isoforme fosforilate su diversi siti. È evidente come in condizioni di eutermia e di recupero da torpore il quantitativo di proteina fosforilata sia molto più basso rispetto alle condizioni di torpore iniziale e profondo. (modificata da Arendt T et al., 2014)

Meccanismo chiave nell'innescare della fosforilazione della Tau sembra essere il calo di temperatura a seguito dell'abbassamento dell'attività metabolica. Infatti la fosforilazione della proteina Tau viene a mancare in topi mantenuti in eutermia mentre sottoposti ad anestesia generale (Xiao H et al., 2013). Il criterio con cui avviene questa fosforilazione/defosforilazione della proteina Tau è stato ampiamente studiato sia negli animali ibernanti obbligati (che vanno incontro a torpore nella stagione invernale) che facoltativi (che vanno incontro a torpore solo in condizioni di elevato stress), ma non si sa molto sui meccanismi che riguardano i non ibernanti. Infatti, come venga controllata nei non ibernanti come l'uomo la fosforilazione reversibile della proteina Tau non è ancora chiaro. Korneyev e colleghi hanno dimostrato che in ratti immersi in acqua fredda che vi è un aumento della Tau fosforilata (pTau) di due/tre volte in alcune aree encefaliche rispetto alla condizione fisiologica (Korneyev A et al., 1995). In generale si può quindi assumere che nell'encefalo adulto umano in condizioni fisiologiche non è presente proteina Tau fosforilata. Questo è in netto contrasto con quanto osservato nel topo nell'encefalo e tratto gastrointestinale (tGI) in età fetale, in cui vi è pTau. Questo suggerisce che i neuroni in degenerazione nelle Taupatie perdano questa capacità di controllare la fosforilazione, che probabilmente in età fetale costituisce un mezzo per mantenere quiescente l'attività neuronale (Anderton BH et al., 1995). In linea con quanto osservato, in culture di neuroni fetali enterici di ratto vi è un'espressione costitutiva di pTau, che durante le varie fasi di sviluppo può essere down- e up- regolata. L'ibernazione può quindi costituire un mezzo attraverso il quale studiare in vivo questo link tra plasticità neuronale/fosforilazione della Tau/formazione dei filamenti di pTau, fornendo le basi per capire cosa effettivamente venga a mancare in condizioni patologiche affinché questo evento non sia più reversibile (Arendt T et al., 2003).

1.5 Sistema Nervoso Centrale e Controllo della Termoregolazione

La termoregolazione è il processo con il quale il nostro corpo controlla e mantiene la temperatura a livelli fisiologici per favorire l'omeostasi. La termogenesi, ovvero la produzione di calore, si divide in indotta da alimenti (obbligatoria e facoltativa) e adattativa. Quella indotta da alimenti è legata alla spesa energetica/calorica a cui fa seguito l'ingestione dei diversi macronutrienti (carboidrati, proteine, grassi, alcol), ovvero i nutrienti calorici, a cui è correlato un aumento del consumo di ossigeno e quindi una maggiore dispersione di calore. La termogenesi adattativa è il processo omeostatico a cui va incontro un organismo per far fronte ad una condizione di bassa temperatura ambientale. È ormai noto che il torpore è un processo fisiologico regolato dall'SNC per favorire la sopravvivenza in una condizione di basso metabolismo basale associato a bassa temperatura centrale (TC) e per assicurare un recupero spontaneo delle normali funzioni fisiologiche al ritorno della normotermia. Durante il torpore avviene un processo di inibizione della termogenesi adattativa. Negli animali ibernanti, ma anche nell'uomo, la termogenesi adattativa avviene attraverso l'ossidazione mitocondriale prodotta dal tessuto adiposo bruno (BAT). Infatti, è proprio l'inibizione di questo processo ossidativo che permette agli animali ibernanti di entrare in letargo. La termogenesi BAT-indotta è regolata da un network del SNC che si attiva in risposta a segnali afferenti provenienti dalla cute e termocettori della TC. Tramite meccanismi a feedback i recettori sulla cute attivano neuroni termosensitivi nel SNC che a loro volta attivano il nervo simpatico diretto al BAT. Quali meccanismi vengano a mancare nei mammiferi non ibernanti non è del tutto chiaro, probabilmente è andato perso il trigger a livello del SNC. Il modello proposto in **Figura 4** mostra il circuito nervoso centrale che regola la termogenesi BAT-indotta. Recettori termici cutanei cold-sensitive trasmettono il segnale termico tramite gangli delle radici dorsali, che a loro volta inviano l'imput alle radici dorsali. I neuroni delle radici dorsali attivano neuroni nel nucleo laterale parabrachiale. I segnali termici vengono a questo punto trasmessi nell'area preottica dove attivano interneuroni GABAergici dell'area mediana, che inibiscono neuroni warm-sensitive nell'area preottica mediale. Questi neuroni warm-sensitive forniscono un controllo termoregolatorio sulla termogenesi da BAT, inibendo i neuroni simpato-eccitatori

nell'ipotalamo dorsomediale che, rilasciata l'inibizione durante il raffreddamento cutaneo, eccitano i neuroni premotori simpatici del BAT nell'RPa, che proiettano ai neuroni preganglionici simpatici del BAT (Tupone D e Morrison SF, 2014).

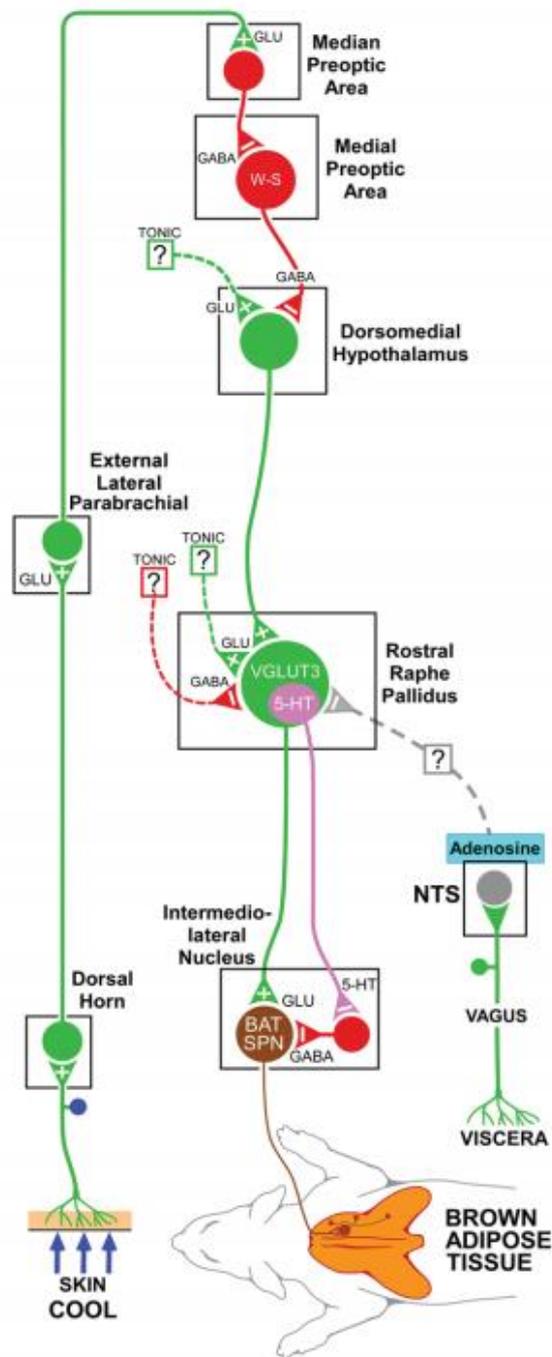


Figura 4: circuito nervoso coinvolto nella termogenesi adattativa BAT - indotta. (modificata da: Tupone D e Morrison SF, 2014)

1.6 Torpore Sintetico

I meccanismi cellulari e molecolari alla base del torpore non sono ancora del tutto stati compresi (Carey HV et al., 2013), ma si suppone che siano fondamentali nell'induzione di questo stato sia fattori di tipo umorale che l'SNC (Andrews MT 2007; Drew KL et al., 2007). Come detto in precedenza durante il letargo si ha un abbassamento della temperatura corporea che costituisce il trigger nella fosforilazione della proteina Tau. Questo fenomeno, a differenza di quello che avviene in condizione patologica, risulta essere estremamente regolato, in quanto in ipotermia la proteina Tau tende a formare filamenti a doppia elica che, al ritorno in normotermia, tendono rapidamente a disaggregare, senza causare sofferenza neuronale. La possibilità di indurre in animali non ibernanti una condizione simile al torpore naturale rappresenta allo stato attuale una scoperta interessante in campo medico, poiché getterebbe le basi per la comprensione della patogenesi delle malattie neurodegenerative. Nel 2013 Cerri et al. del laboratorio di Fisiologia del DIBINEM hanno messo a punto un modello di torpore sintetico (TS) indotto farmacologicamente, al fine di verificare se effettivamente la fosforilazione della proteina Tau fosse realmente reversibile anche in animali non ibernanti. Come visto prima, un'area fondamentale del SNC coinvolta nella termoregolazione in risposta al freddo è rappresentata dal midollo rostrale ventromediale (RVMM), una regione contenente il rafe pallido (RPa) e il rafe magno, in cui sono localizzati i neuroni motori simpatici diretti al tessuto adiposo bruno (BAT), ai vasi sanguigni cutanei e al cuore (Cano G et al., 2003). L'attivazione dei neuroni dell'RPa promuove quindi sia la termogenesi senza brivido (Morrison SF et al., 1999) che da brivido (Nakamura K e Morrison SF, 2011), la vasocostrizione cutanea (Blessing WW e Nalivaiko E, 2011) e l'aumento della frequenza cardiaca (Zaretsky DV et al., 2003). Inoltre, l'inibizione a breve termine dei neuroni dell'RVMM in ratti in free behaving causa ipotermia, attraverso un aumento della dissipazione di calore a livello cutaneo e, probabilmente, attraverso la riduzione del calore prodotto tramite BAT (Cerri M et al., 2010). Per inibire quindi il processo di produzione di calore, come verrà spiegato in maniera più dettagliata nei materiali e metodi, è stato iniettato a livello dei neuroni dell'RVMM muscimolo, agonista dell'acido γ -amminobutirrico (GABA) sui recettori GABA_A, principale

neurotrasmettitore inibitorio dell'SNC. Per verificare se effettivamente gli effetti causati dal muscimolo inducessero una condizione simile a quella osservata in natura negli ibernanti durante/dopo il torpore, sono stati controllati alcuni parametri autonomici e i relativi indici (come la frequenza cardiaca – HR), il comportamento sonno/veglia e l'EEG. L'ipotermia profonda che viene raggiunta è il risultato di un'aumentata dissipazione termica, come mostrano i cambiamenti osservati nell'indice di perdita di calore (HLI) e una diminuzione della produzione stessa di calore. Inoltre, durante la fase ipotermica si osserva un drastico calo dell'HR dovuto all'inibizione dei neuroni eccitatori dell'RVMM. I valori medi di pressione arteriosa rimangono invece costanti per tutta la fase di iniezione del muscimolo e calano solamente nell'ultima parte, esattamente come è stato osservato in topi durante il torpore (Swoap SJ e Gutilla MJ 2009), a conferma che i neuroni dell'RVMM hanno un ruolo limitato nel controllo di questo parametro. Con il calo progressivo della temperatura a livello centrale (TC) si osserva anche una diminuzione nell'attività dell'SNC su EEG, con uno spettro che si sposta a basse frequenze. All'inizio della fase di recupero gli animali vengono ad essere esposti ad un ambiente caldo ma la loro TC continua ad essere bassa. Durante questa fase sia la HR che la pressione arteriosa aumentano con un picco significativo, direttamente proporzionale all'aumento della TC. L'aumento in onde Theta che si osserva è correlato invece con l'attivazione simpatica che si ha a livello ippocampale (**Figura 5**)

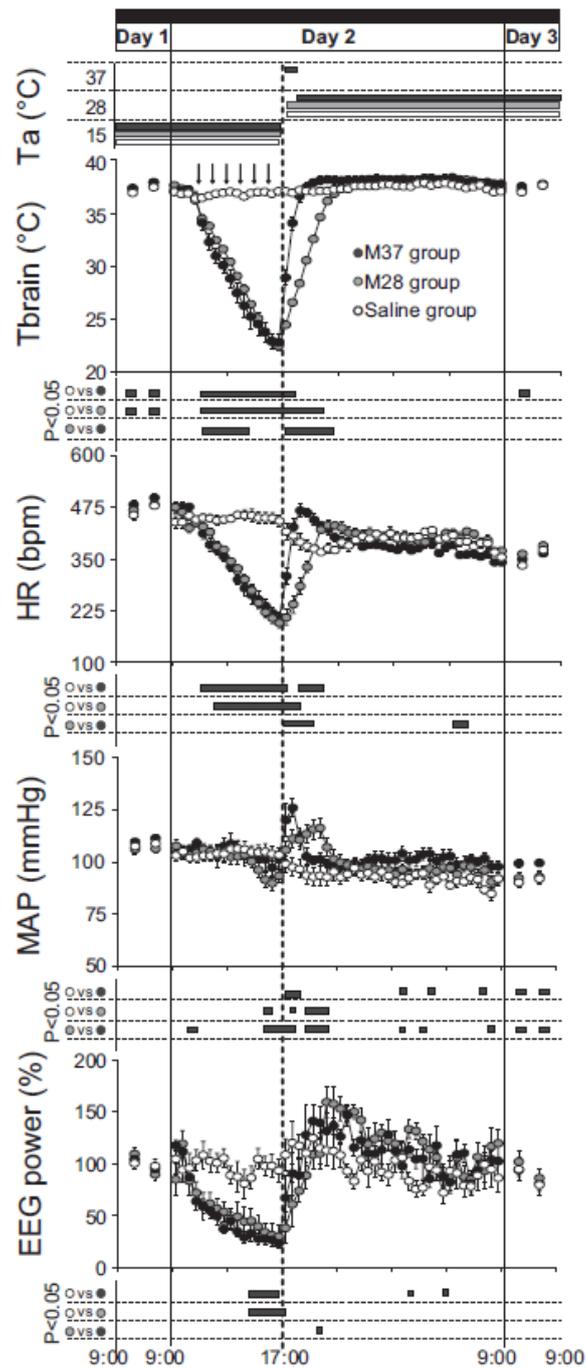


Figura 5: EEG e parametri autonomici. Animali esposti a buio costante e ad una temperatura ambientale di 15°C. Le frecce nere indicano le iniezioni ripetute di muscimolo che causano un calo della temperatura centrale (T_{brain}), HR ed EEG nel complesso, mentre la pressione arteriosa (MAP) non subisce grandi cambiamenti. Negli animali trattati con salina non si hanno effetti. Dopo 1h dall'ultima iniezione, la temperatura ambientale è stata portata da 15 a 28°C per un gruppo, 37°C per 1h e poi di nuovo 28°C per un altro gruppo. Si osserva un rapido aumento della T_{brain} , HR, EEG e MAP. (modificato da Cerri M et al., 2013)

Gli animali in TS, esattamente come quelli in letargo naturale, a seguito del ritorno alla normotermia cadono in una fase di sonno profondo, con un pattern molto diverso rispetto ad una condizione di normotermia. In generale, si osserva nei gruppi sperimentali in TS una perdita drastica di sonno REM, che costituisce la fase del sonno energeticamente più dispendiosa, ma in antitesi si ha un aumento delle onde Delta sul tracciato EEG, che costituiscono la fase più profonda del sonno (**Figura 6**). Anche questo fenomeno, è in linea con quanto osservato negli ibernanti (Trachsel L et al., 1991). Un semplice cambiamento on/off in una popolazione neuronale a livello del SNC è fondamentale e sufficiente per causare una condizione di TS. Quindi, è proprio il SNC che può iniziare il processo di abbassamento della TC, ed è proprio una bassa TC che favorisce il concomitante abbassamento del tasso metabolico (Cerri M et al., 2013).

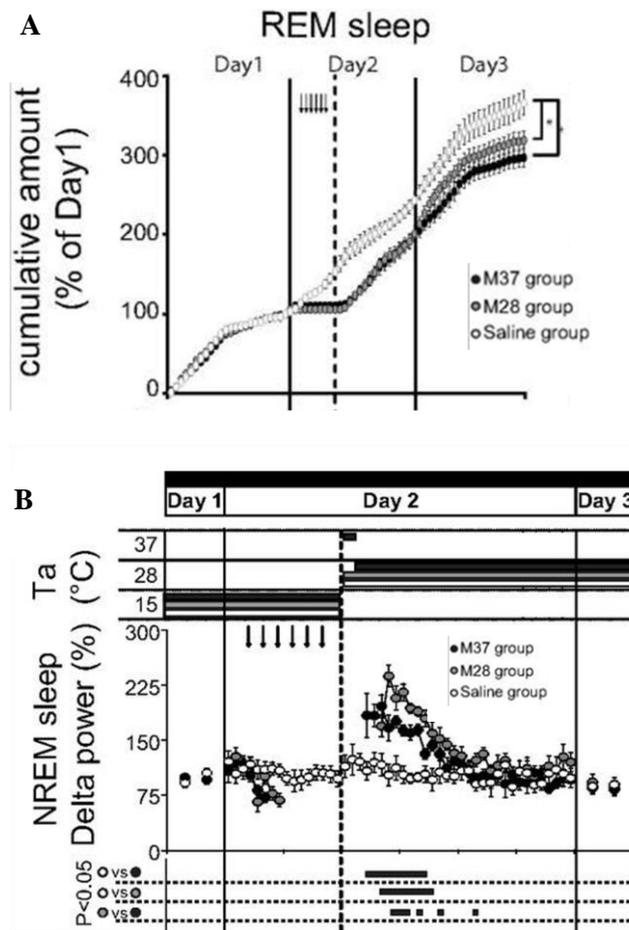


Figura 6: A) il quantitativo di sonno REM accumulato nei due gruppi in TS durante i 3 giorni sperimentali è significativamente più basso rispetto ai controlli iniettati con salina; B) aumento delle onde Delta durante il recupero dei gruppi in TS. (modificato da Cerri M et al., 2013)

2 Scopo

Durante il letargo gli animali ibernanti sono in grado di attuare meccanismi che esitano nella protezione dei neuroni da degenerazione, tra cui la fosforilazione della proteina Tau. Per questo motivo, il modello sperimentale di TS potrebbe essere molto utile al fine di studiare sia a livello del SNC che del tGI le malattie neurodegenerative. Come precedentemente detto, risulta che nell'encefalo di ratto adulto in normotermia non sia espressa pTau, in antitesi con quanto si osserva nelle malattie neurodegenerative, dove la pTau è presente e potrebbe costituire un trigger patologico. Quindi l'obiettivo del nostro studio è stato quello di verificare se a livello del SNC di ratto l'induzione del TS causi un accumulo reversibile di proteina pTau.

Invece, il lavoro che stiamo svolgendo a livello del tGI è ancora preliminare e ha come scopo verificare la presenza di neuroni a livello del plesso mienterico che esprimano pTau, tipizzandone la natura. È noto infatti, che le popolazioni neuronali a livello del SNC maggiormente colpite da Taupatie sono quelle di neuroni colinergici (Luppi M et al., 2019).

Al fine di svolgere questo studio abbiamo valutato immunochimicamente l'espressione di pTau a livello encefalico in controlli, TS e fase di recupero. Per il tGI abbiamo contato e stiamo caratterizzando i neuroni che esprimono pTau solo nei controlli e TS.

3 Materiali e Metodi

3.1 *Animali*

Sono stati utilizzati 25 ratti maschi Sprague-Dawley (201-225 g; Charles River). 6 di questi sono stati utilizzati esclusivamente per gli studi sul tGI. In seguito gli animali sono stati stabulati in laboratorio con le seguenti condizioni: temperatura ambiente (TA) di $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 12h:12h cicli light-dark (LD) (L: 09:00 h – 21:00 h; 100 – 150 lux); acqua e cibo ad libitum. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a seguito dell'approvazione da parte del Ministero della Salute (protocollo etico numero: No. 112/2018-PR) in accordo con il DL 26/2014 e la direttiva dell'unione Europea 2010/63/EU, e sotto la supervisione del servizio veterinario dell'Università di Bologna. Gli esperimenti sono stati svolti in modo da minimizzare il numero, il dolore e lo stress degli animali utilizzati.

3.2 *Procedura Chirurgica*

La procedura chirurgica è stata effettuata come da protocollo di Cerri et al., 2013. Gli animali sono stati sottoposti ad anestesia profonda (Diazepam, 5 mg/kg i.m.; Ketamina-HCl, 100 mg/kg i.p.), sono stati posizionati sull'apparato stereotassico (David Kopf Instruments) e sono stati impiantati chirurgicamente: 1) elettrodo per l'EEG; 2) un termistore (Thermometric Corporation) montato su un ago inossidabile (calibro 21) posizionato accanto all'ipotalamo anteriore sinistro per registrare la TC; 3) una cannula guida da microiniezione posizionata sul Rafe Pallido (RPa), alle seguenti coordinate dal lambda: sulla linea mediana, 3.0 mm posteriormente e 9.0 mm ventralmente sulla superficie dorsale del cervelletto (Paxinos e Watson, 2007). Dopo la chirurgia sono stati somministrati 20 ml/kg di salina sottocute e 0.25 ml di soluzione antibiotica

(PennicillinaG e streptomycin-solfato) intramuscolo. Ogni ratto ha recuperato dalla chirurgia per almeno 1 settimana. Prima della sessione sperimentale i ratti sono stati disposti in gabbie all'interno di camere termoregolate insonorizzate. Questo periodo di attenuazione pre-sperimentale è di tre giorni, durante i quali il ratto viene sottoposto a basse TA (15°C), buio costante e dieta ad alto contenuto di grassi (mucedola al 35% di grassi), condizioni che sono note favorire il torpore negli ibernanti (Cerri M et al., 2013).

3.3 Torpore Sintetico

Per indurre il TS abbiamo utilizzato il protocollo di Cerri et al. in cui una cannula per microiniezioni è stata inserita nella cannula guida posizionata sopra all'RPa. 100 nl di muscimolo 1 mM (agonista dei recettori GABA) sono stati iniettati una volta all'ora per sei volte consecutive. Dopo l'ultima iniezione la TC ha raggiunto valori attorno a 22°C, alle h 17, circa un'ora dopo l'ultima iniezione, la TA è stata impostata a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ per favorire il ritorno alla normotermia dell'animale. Al gruppo di animali di controllo è stato iniettato liquido cerebrospinale artificiale (aCSF; EcoCyte Bioscience). Durante tutto l'esperimento sia l'EEG che la TC sono state registrate dopo essere state opportunamente amplificate, filtrate e digitalizzate (Cerri M et al., 2013), allo scopo di monitorare al meglio il comportamento degli animali durante l'induzione del TS e durante il seguente periodo di recupero. Gli animali in seguito alla chirurgia sono stati assegnati casualmente a sei differenti gruppi sperimentali e sono stati sacrificati in differenti momenti a seguito dell'iniezione o di muscimolo o di aCSF (la prima iniezione viene eseguita alle 11:00 del mattino). La TC al momento del sacrificio è mostrata nella **Figura 7**, per ogni gruppo sperimentale. I gruppi sperimentali sono i seguenti:

- **C** → controllo, iniettati con aCSF (N = 5) e sacrificati attorno alle h 17:00;
- **N30** → sacrificati tra le h 12:00/13:00, tra la seconda e la terza iniezione di muscimolo, quando la TC ha raggiunto circa 30°C (N = 3);

- **N** → sacrificati un'ora dopo l'ultima iniezione, alle h 17:00, quando la Tb ha raggiunto il nadir ipotermico (N = 6; $T_b = 22.1 \pm 1.4^\circ\text{C}$);
- **ER** → early recovery. Sacrificati attorno alle h 19:00 (2h dopo che la TA viene spostata da 15 a 28°C), quando la Tb raggiunge $35,5^\circ\text{C}$ dopo il ST. A questo punto del protocollo sperimentale, gli animali cominciano a mostrare nell'EEG onde tipiche del sonno (N = 4);
- **R6** → sacrificati attorno l'h 1:00, sei ore dopo l'early recovery (N = 4);
- **R38** → sacrificati attorno alle h 9:00 del terzo giorno, 38h dopo l'early recovery (N = 3).

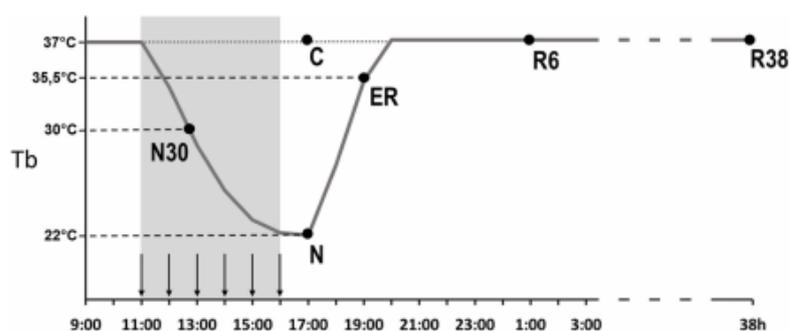


Figura 7: rappresentazione schematica della procedura sperimentale. La linea continua indica la progressione della TC durante l'esperimento. La linea punteggiata si riferisce al gruppo C. la zona grigia del grafico si riferisce al momento in cui viene indotto il TS. Le frecce indicano l'iniezione di muscimolo.

3.4 Immonoistochimica

In diversi momenti del protocollo sperimentale, animali in anestesia generale sono stati sottoposti a perfusione trans-cardiaca con 200 ml di soluzione salina (NaCl 0.9% p/v), seguito da iniezione di uguale volume di paraformaldeide al 4% diluita in PBS (p/v). Sono stati estratti encefalo, midollo spinale e post-fissati per altre 2h in paraformaldeide. In seguito i campioni sono stati messi una notte in una soluzione al 30% di saccarosio (p/v) diluito in PBS e sodio-azide 0.02% (p/v) per proteggere il tessuto al congelamento. In seguito, i tessuti sono stati inclusi in OCT – compound per il taglio al criostato (Frigocut 2800) a -20°C . I campioni prima di essere analizzati tramite tecnica immunoistochimica vengono conservati a -80°C , encefalo e midollo in cryoprotectant solution (30% saccarosio p/v, 30% etilen-glicole v/v, 1% p/v polivinilpirrolidone, il tutto diluito in PBS). È stato inoltre prelevato l'ileo di sei di questi animali che successivamente è stato lavato in PBS (PBS: 0.15 M NaCl in 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) contenente nicardipina (10^{-6} M; sc-202731, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), un bloccante dei canali del calcio di tipo-L, per inibire la contrazione tissutale. Le sezioni di ileo campionate sono state aperte lungo il margine mesenterico e risciacquate in PBS. Le sezioni sono state poi stese, opportunamente fissate tramite spilli su blocchi di balsa e immerse o/n a 4°C in formaldeide al 2% con 0.2% di acido picrico, PBS 0.1m (pH 7). Il giorno successivo, il tessuto è stato pulito dal fissativo con tre lavaggi da 10 minuti in dimetil-solfossido (DMSO) seguiti da 3 lavaggi da 10 minuti in PBS 10 mM. I tessuti vengono conservati fino alla reazione in frigorifero a 4°C in PBS contenente sodio azide 0.1%.

Per quanto riguarda l'encefalo un set intero su sei è stato utilizzato per whole immunostaining. Le sezioni di encefalo e midollo sono state lavate due volte in PBS e incubate per 2h in normal donkey serum all'1% (p/v). In seguito tutte le sezioni sono state incubate o/n con i seguenti anticorpi primari: 1) monoclonal rabbit AntiNeuN (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) marker neuronale; (2) monoclonal mouse Anti-AT8 (Thermo Fisher, Massachussets, USA), marker della proteina phospho[Ser202/Thr205]-Tau, entrambi gli anticorpi diluiti 1:400. Le sezioni sono state lavate due volte in PBS con 0.3% di Triton X-100 (v/v) e incubate con i seguenti anticorpi secondari: 1) Donkey

Anti-rabbit IgG coniugato con Alexa-488 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA); (2) Donkey Anti-mouse IgG coniugato con Alexa-594 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Entrambi gli anticorpi secondary sono stati diluiti 1:500. Questa procedura sperimentale è stata svolta su tutte le condizioni sperimentali. Infine, le sezioni di encefalo e midollo spinale sono state montate su vetrini polilisinati e coperte con mounting medium anti-fade (ProLongGoldmountant; ThermoFisher, Massachusetts, USA). Come controllo della p-Tau è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale mouse anti-Tau-1 diluito 1:400 (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), seguito dall'uso come anticorpo secondario del Donkey Anti-mouse IgG coniugato con Alexa-594 (1:500). L'anticorpo anti-Tau-1 riconosce la proteina Tau non fosforilata tra i residui 189 e 207 (Szendrei et al., 1993; Billingsley and Kincaid, 1997). Per questa procedura sperimentale sono stati analizzati solo campioni da C, N e R38. Dato che la pTau sembra essere associata solamente alla neuroinfiammazione (Davies et al., 2017; Nilson et al., 2017), abbiamo deciso di stabilire il grado di attivazione della microglia parenchimale in un sottogruppo. L'attivazione della microglia è stata valutata qualitativamente analizzando la morfologia (Orr et al., 2009) e con una specifica marcatura policlonale rabbit Anti-Iba1 (1:800 Wako) e come secondario un anticorpo Anti-rabbit IgG coniugato con un Alexa-488. L'analisi della microglia è stata fatta su un animale di ognuno dei seguenti gruppi: C, N, R6 e R38. Solo le seguenti strutture sono state analizzate: nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, area CA3 dell'ippocampo e la corteccia parietale.

Per quanto riguarda l'ileo, la mucosa sottomucosa e la muscolatura circolare sono state rimosse al fine di ottenere preparati whole mounts di plesso mienterico longitudinale. Le whole mounts di plesso mienterico di ileo sono state preincubate con soluzione di blocco contenente donkey serum 10%, Triton X-100 1% diluito in PBS 10 mM, a temperatura ambiente per un'ora. La soluzione di blocco riduce i legami non-specifici e permeabilizza i tessuti. Gli anticorpi testati su ileo sono i seguenti: mouse Anti-AT8 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) concentrazione 1:200; goat Anti-ChAT concentrazione 1:50 (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany); rabbit Anti-nNOS concentrazione 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti in antibody diluent (1.8% NaCl in PBS 0.01 M con sodio azide 0.1%). Sono state effettuate diverse combinazioni di anticorpi primari per doppia marcatura. Dopo incubazione per due notti con gli anticorpi primari a 4°C in camera umida, le preparazioni sono state sciacquate per

3 volte per 10 min con PBS 10 mM e infine incubate per 1h a TA con gli anticorpi Donkey anti-Mouse 488 1:250 (ThermoFisher); Donkey anti-Rabbit 594 1:1000 (abcam); Donkey anti-Goat 594 1:400 (abcam). Infine, i tessuti sono stati sciacquati 3 volte per 10 minuti in PBS 10 mM e montate su vetrino con buffer al glicerolo pH 8.6. i nuclei neuronali sono stati identificati con buffer fluorescente al DAPI (F6057-20ML, Sigma Aldrich, Milan, Italy, Europe).

3.5 Acquisizione Immagini e Analisi

L'acquisizione delle immagini di encefalo e midollo spinale è stata fatta con una Nikon eclipse 80i collegata ad una camera Nikon Digital DS-Vi1 color camera, ad un 100x di ingrandimento (200x per la microglia). In **Figura 8** e in **Tabella 1** sono evidenziate le 19 aree cerebrali analizzate, raggruppate in base alla localizzazione anatomica e elencate in tavola 1 in direzione rostro-caudale: nucleo ambiguo (Amb); nucleo motore dorsale del nervo vago (dMV); nucleo del tratto solitario (NTS); rafe pallido (RPa); locus caeruleus (LC); nucleo laterale parabrachiale (LPB); parte ventrolaterale del grigio periacqueoduttale (VLPAG); nucleo mediale mamillare (MM); ipotalamo laterale (LH); nucleo arcuato dell'ipotalamo (Arc); nucleo dorsomediale dell'ipotalamo (DMH); nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVH); nucleo preottico ventrolaterale (VLPO); nucleo preottico mediano dell'ipotalamo (MnPO); nucleo paraventricolare del talamo (PV); corteccia del cervelletto (Cb-Cx); area CA3 dell'ippocampo (CA3); corteccia peririnale (PRh); corteccia parietale (P-Cx). Il riconoscimento di queste aree è stato possibile osservando la marcatura con NeuN (Alexa-488) sul set completo di sezioni encefaliche comparato con l'atlante di encefalo di ratto.

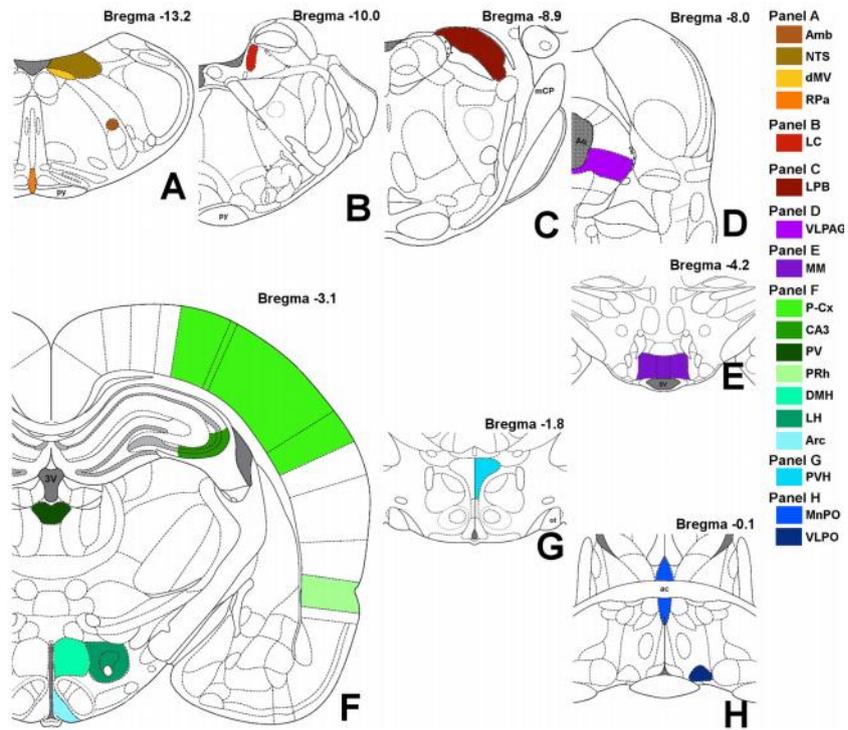


Figura 8: rappresentazione schematica delle aree encefaliche analizzate. In ogni pannello è indicata la distanza dal bregma.

Brain structure	Abbreviation	Bregma level*	Abbreviation(s) as in Paxinos and Watson (2007)*	Functional involvement	Suggested references	Panel in Figure 2	
Medulla	Nucleus ambiguus	Amb	-13/-13,5	AmbSC	Autonomic function – Parasympathetic	Brailoiu et al., 2017	A
	Dorsal motor nucleus of the vagus nerve	dMV	-13/-13,5	10N	Autonomic function – Parasympathetic	Hopkins et al., 1996	A
	Nucleus of the solitary tract	NTS	-13/-13,5	Soll; sol; SoIC; SolIM; SoCe; SoL; SoDL; SoIM; SoV; SoVL; PsoI	Visceral sensory integration – Central autonomic regulation	Zoccal et al., 2014	A
Pons	Raphe pallidus	Rpa	-13/-13,5	Rpa	Thermoregulation	Morrison and Nakamura, 2018	A
	Locus coeruleus	LC	-9,6/-10,1	LC	Behavioral state control	Benarroch, 2018	B
	Lateral parabrachial nucleus	LPB	-8,9/-9,2	LPBD; LPBC; LPBE; LPBV; LPBI; LPBC	Central autonomic regulation – Thermoregulation	Morrison and Nakamura, 2018	C
Midbrain	Ventrolateral part of the periaqueductal gray matter	VL PAG	-8,0/-8,5	VL PAG	Central autonomic regulation – Behavioral state control	Luppi, 2010	D
Hypothalamus	Medial mammillary nucleus	MM	-4,2/-4,4	MnM; MM	Memory formation and consolidation	Vann and Nelson, 2015	E
	Lateral hypothalamus	LH	-3,0/-3,4	PeFLH; PeF	Behavioral state control – Regulation of body metabolism	Luppi, 2018	F
	Arcuate nucleus	Arc	-3,0/-3,4	ArcD; ArcM; ArcL	Regulation of body metabolism	Wu et al., 2014	F
	Dorsomedial nucleus	DMH	-3,0/-3,4	DMC; DMD; DMV	Thermoregulation	Morrison and Nakamura, 2018	F
	Paraventricular nucleus	PVH	-1,6/-1,9	PaMM; PaMP; PaV; PaDC; PaLM	Central autonomic regulation – Osmoregulation- Thermoregulation	McKinley et al., 2015; Morrison and Nakamura, 2018	G
	Ventrolateral preoptic nucleus	VLPO	-0,0/-0,6	VLPO	Behavioral State Control – Thermoregulation	Luppi, 2010	H
	Median preoptic nucleus of the hypothalamus	MnPO	-0,1/-0,2	MnPO	Central autonomic regulation – Behavioral State Control – Osmoregulation- Thermoregulation	McKinley et al., 2015; Morrison and Nakamura, 2018	H
Thalamus	Paraventricular nucleus	PV	-3,0/-3,4	PVP	Central autonomic regulation	Colavito et al., 2015	F
Cerebellum	Cerebellar cortex	Cb-Cx	-11,5/-13,5	General sample picture from cortical layers	Motor functions – Learning – Lack of Tau phosphorylation in tauopathies	Hu et al., 2017	n.s.
Hippocampus	CA3 field	CA3	-3,0/-3,4	CA3; SLu; Rad	Memory formation and consolidation – Well studied for assessing Tau phosphorylation in hibernators	Arendt et al., 2003, 2015	F
Brain Cortex	Perirhinal cortex	PRh	-3,0/-3,4	PRh	Memory formation and consolidation – Recognition of environmental stimuli	Suzuki, 1996	F
	Parietal cortex	P-Cx	-3,0/-3,4	Broadly covering primary somatosensory cortex (S1T; S1DZ; S1BF; S1ULp)	Sample of neocortex – Sensory integration – Well studied for assessing Tau phosphorylation in hibernators	Arendt et al., 2003, 2015	F

Tabella 1: lista delle aree encefaliche analizzate organizzate in direzione rostro-caudale. Le strutture direttamente coinvolte nella termoregolazione sono evidenziate in grassetto.

In particolare, l'osservatore è stato in grado di discriminare al microscopio le diverse aree encefaliche riconoscendo alcune chiare strutture neuroanatomiche, come ad esempio: 1) per il tronco encefalico la forma del quarto ventricolo, i tratti piramidali, il complesso dei nuclei cocleari, il complesso inferiore dei nuclei olivari, i nuclei facciali, la tipica struttura caudo-rostrale dell'acquedotto di Silvio, la tipica forma del peduncolo cerebellare mediano; 2) per le strutture diencefaliche la forma del terzo ventricolo; l'estensione laterale e dorso-ventrale dell'ippocampo; la posizione del fornice; il chiasma ottico e la forma dei tratti ottici; la commissura anteriore. Una volta riconosciuta l'area, ogni campo di interesse è stato acquisito al microscopio in due differenti fotografie in base al fluorocromo utilizzato, in modo tale da avere per ogni immagine NeuN – Alexa-488 per l'identificazione anatomica e AT8 o Tau-1 (entrambi Alexa-594) per l'identificazione della Tau-fosforilata. Per ottenere immagini digitalizzate di buona qualità in cui poter apprezzare le variazioni di fosforilazione osservate al microscopio con marcatura Tau-1 e AT8, il tempo di esposizione della camera è stato regolato manualmente per ogni

immagine, con l'obiettivo di riprodurre nell'immagine acquisita quanto osservato direttamente attraverso gli oculari del microscopio. L'operatore ha eseguito l'analisi in cieco, senza sapere le condizioni osservate. Il tempo di esposizione per ogni immagine è stato regolato finemente al fine di evitare la compensazione automatica della camera, dovute al fondo scuro della fluorescenza. Tutti gli altri parametri della camera, come il bilancio del bianco e il *gain* (Y100-R100-B100) sono stati mantenuti costanti per tutto l'esperimento. L'analisi è stata portata avanti da due operatori che hanno lavorato nelle stesse condizioni: ogni ricercatore non era a conoscenza della condizione sperimentale osservata e ha usato lo stesso *set up* dello strumento, con una particolare luminosità e regolazione del contrasto. L'accumulo di PP-Tau è stato quantificato in ogni immagine AT8 e Tau-1, stimando l'intensità della marcatura sui file acquisiti tramite camera (Windows Photo Viewer), attribuendo uno score da “-“ (completamente assente) a “++++” (massima marcatura), come in **tabella 2**. Lo score finale è stato calcolato come media dei dati ottenuti dai differenti operatori, considerando tutti gli animali appartenenti alla stessa condizione sperimentale.

L'acquisizione delle immagini di ileo è stata fatta con microscopio Nikon Eclipse Ni. Le immagini sono state prese tramite camera Nikon DS-Qi1Nc e software NIS Elements BR 4.20.01 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands). Ulteriori modifiche dell'immagine sono state ottenute tramite Corel Photo Paint e i pannelli di immagini con Corel Draw (Corel Photo Paint and Corel Draw, Ottawa, ON, Canada).

3.6 Analisi Statistica

L'analisi statistica per l'encefalo è costituita da due steps: 1) un'analisi grossolana in cui sono stati considerati assieme tutti gli scores di tutte le strutture analizzate; 2) un'analisi specifica considerando tutte le strutture separatamente. Abbiamo utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis e solo se l'ipotesi nulla è stata rifiutata, è stato portato avanti il confronto accoppiato usando il test non parametrico di Mann-Whitney nelle

seguenti valutazioni: 1) per la marcatura con AT8 tutte le condizioni sperimentali vs C, R6 vs ER, R6 vs R38; 2) per la marcatura Tau-1: tutte le condizioni sperimentali vs C; N vs R38. Abbiamo considerato statisticamente significativi valori di $P < 0.05$ per ogni confronto. Non sono state fatte analisi statistiche sull'analisi della microglia.

L'analisi statistica per l'ileo è stata fatta contando i neuroni pTau-IR. Per ogni animale sono stati contati almeno 200 neuroni e sono stati utilizzati 3 animali per gruppo sperimentale (C e N). La percentuale di neuroni pTau-IR è stata espressa come media e \pm deviazione standard, con n che rappresenta il numero di animali considerati. Come test statistico è stato utilizzato il *t di Student* della piattaforma *Excel* in quanto abbiamo confrontato due gruppi sperimentali, C e N.

4 Risultati

4.1 Analisi complessiva delle aree encefaliche AT8-pTau-IR

Per quanto riguarda la prima parte dell'analisi immunohistochimica su encefalo abbiamo considerato uno score complessivo di marcatura dato da tutte le 19 aree cerebrali considerate. Quello che si evince è che la marcatura per AT8 è significativamente più intensa nei gruppi sperimentali N30, N ed ER rispetto ai C ($P < 0.001$ per ogni confronto). Inoltre, ER ha uno score più elevato di R6, con un valore significativo ($P < 0.001$). R6 e R38 non differiscono l'uno dall'altro, nemmeno da C (dato non mostrato). La marcatura per Tau-1 ha un pattern esattamente opposto per quanto riguarda i gruppi C e N, ma non per R38. Inoltre, i livelli di marcatura per N e R38 sono significativamente più bassi rispetto a C ($P < 0.001$). non sono state osservate sostanziali differenze tra N e R38.

4.2 Analisi delle singole aree encefaliche AT8-pTau-IR

Prendendo in considerazione la marcatura immunohistochimica per AT8, si osserva una grande variabilità a livello delle diverse aree encefaliche analizzate. Invece per quanto concerne la Tau-1 solo alcune aree presentano differenze significative. Di seguito, illustro i risultati ottenuti nelle 19 aree cerebrali considerate suddivise per gruppo sperimentale.

4.2.1 N30 (campioni ottenuti durante l'induzione del TS)

In questa condizione sperimentale, sono state riscontrate marcature significativamente più elevate per AT8 a confronto con il gruppo sperimentale C solo in 6 strutture dell'SNC, principalmente coinvolte nel controllo termoregolatorio e metabolico: LPB ($P = 0.006$),

MM (P = 0.006), Arc (P = 0.021), PVH (P = 0.008), VLPO (P=0.006) e MnPO (P = 0.046).

4.2.2 N (campioni ottenuti durante il TS, al nadir ipotermico)

In questa fase la maggioranza delle strutture analizzate presentano marcatura per AT8 significativamente più elevata rispetto al gruppo C. in particolare: Amb (P = 0.003), NTS (P = 0.008), dMV (P = 0.048), LC (P = 0.021), LPB (P = 0.006), Cb-Cx (P = 0.003), MM (P = 0.006), LH (P = 0.026), Arc (P = 0.007), DMH (P = 0.006), PVH (P = 0.006), PV (P = 0.006), VLPO (P = 0.006), MnPO (P = 0.008), CA3 (P = 0.009) e PRh (P = 0.046). Solo Rpa, VLPAG e P-Cx non hanno espressione significativamente più elevata di AT8 rispetto ai controlli. La marcatura per Tau-1 è più bassa rispetto a C per le seguenti aree: LH (P = 0.041), Arc (P = 0.038), PVH (P = 0.046), VLPO (P = 0.046), MnPO (P = 0.016), and P-Cx (P = 0.014).

4.2.3 ER (campioni ottenuti durante early recovery da TS, quando la TB raggiunge 35.5°C)

In questa condizione, la marcatura per AT8 è ancora significativamente più elevata rispetto a C nelle strutture nelle quali si era osservata una iperfosforilazione in N, ovvero: Amb (P = 0.041), LPB (P = 0.005), MM (P = 0.005), LH (P = 0.026), Arc (P = 0.006), DMH (P = 0.028), PVH (P = 0.003), VLPO (P = 0.011), MnPO (P = 0.023), and CA3 (P = 0.026).

4.2.4 R6 (campioni ottenuti 6h dopo aver raggiunto 35,5°C)

Dopo 6h dal raggiungimento dell'eutermia a seguito del TS, marcatura statisticamente significativa per AT8 rispetto al gruppo C è osservabile solo in aree limitate: NTS (P = 0.041), VLPAG (P = 0.041), LH (P = 0.041), CA3 (P = 0.041) e P-Cx (P = 0.041). Inoltre, al fine di valutare le dinamiche di defosforilazione della proteina Tau, l'intensità di marcatura per AT8 in questa fase è stata paragonata anche con la fase ER, dimostrando

che nella maggior parte di strutture la marcatura è significativamente più bassa: Amb ($P = 0.011$), NTS ($P = 0.001$), RPa ($P = 0.020$), LPB ($P < 0.001$), VLPAG ($P = 0.027$), MM ($P = 0.010$), LH ($P < 0.001$), Arc ($P = 0.006$), DMH ($P = 0.030$), PVH ($P < 0.001$), PV ($P = 0.025$), VLPO ($P = 0.009$), MnPO ($P = 0.016$), CA3 ($P < 0.001$), PRh ($P = 0.025$), and P-Cx ($P = 0.003$).

4.2.5 R38 (campioni ottenuti 38h dopo aver raggiunto 35,5°C)

Questa viene considerata una fase di late recovery, nella quale la positività per AT8 risulta essere pressochè uguale a quella del gruppo C. L'unica differenza è rappresentata per il PVH ($P = 0.046$), dove la marcatura risulta essere significativamente più intensa rispetto al gruppo C. Inoltre, i dati di marcatura ottenuti di questa condizione sperimentale sono stati confrontati con il gruppo R6. Anche in questo caso, l'unica differenza è rappresentata per il PVH ($P = 0.008$), dove la marcatura risulta essere significativamente più intensa rispetto al gruppo R6. Per quanto riguarda Tau-1, la marcatura in questo gruppo risulta significativamente più bassa rispetto a C nelle seguenti aree: RPa ($P = 0.005$), LH ($P = 0.007$), PRh ($P = 0.008$), and P-Cx ($P = 0.027$).

In **Figura 9 a,b e c** sono riportate immagini dell'immunofluorescenza per AT8 in diverse aree encefaliche, NTS + dMV; PVH; CA3 in tutti i gruppi sperimentali studiati. In **Figura 10** invece si osserva la reazione di immunofluorescenza per Tau-1 in C, N e R38. La morfologia delle strutture è messa in evidenza mediante l'uso dell'anticorpo NeuN, DNA-binding protein che lega specificatamente i nuclei dei neuroni. Infine, in **Tabella 3**, è possibile osservare gli score di positività per AT8 e Tau-1 che abbiamo attribuito singolarmente alle 19 aree cerebrali considerate.

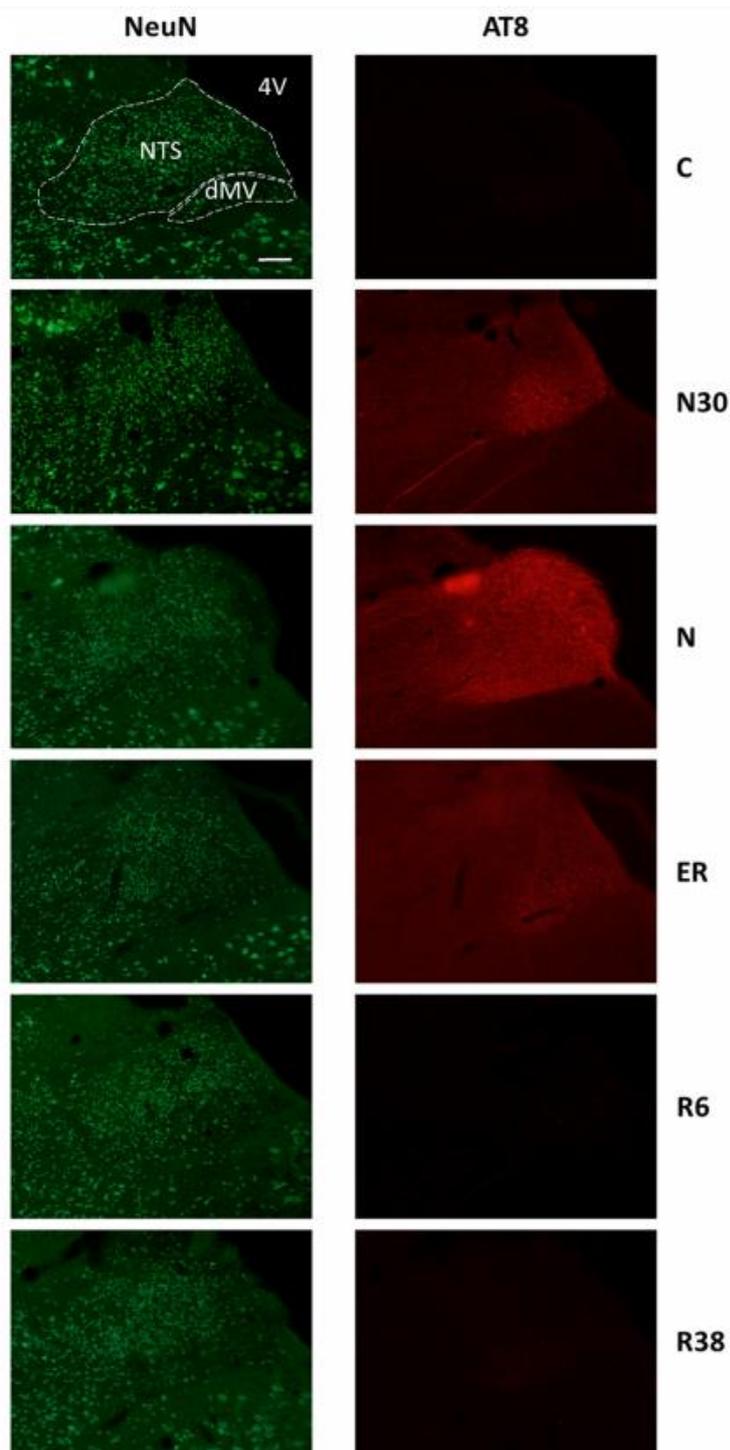


Figura 9a: immagine al microscopio che mostra il nucleo del tratto solitario (NTS) e il nucleo motore del vago (dMV). Le fotografie nella colonna a sinistra mostrano le aree marcate con NeuN (marker neuronale, anticorpo secondario coniugato con Alexa-488) per il riconoscimento delle strutture anatomiche. Solo nell'immagine in alto a sinistra le strutture anatomiche considerate sono circondate con linea tratteggiata. (scale bar: 100 μ m). La colonna di destra mostra la stessa area fotografata nelle colonne di sinistra, ma marcata con AT8 (proteina Tau fosforilata, anticorpo secondario coniugato con Alexa-594).

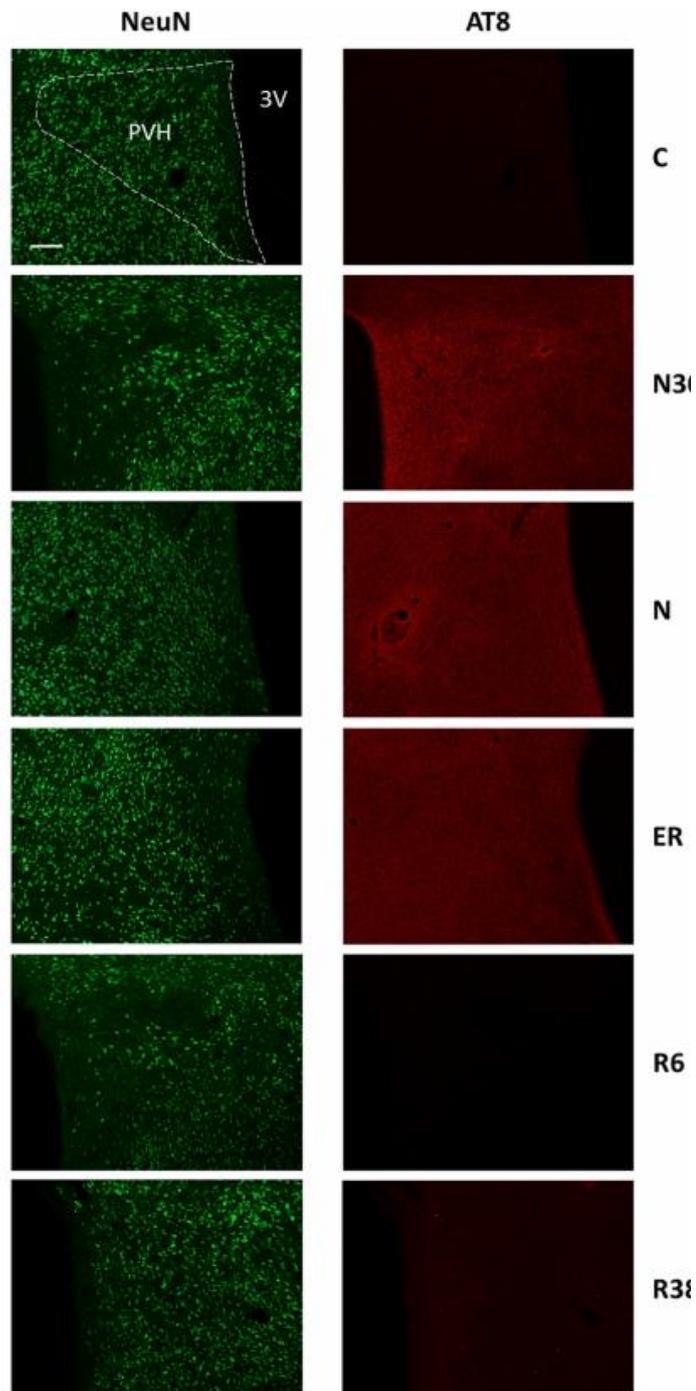


Figura 9b: immagine al microscopio che mostra il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVH). Le fotografie nella colonna a sinistra mostrano le aree marcate con NeuN (marker neuronale, anticorpo secondario coniugato con Alexa-488) per il riconoscimento delle strutture anatomiche. Solo nell'immagine in alto a sinistra le strutture anatomiche considerate sono circondate con linea tratteggiata. (scale bar: 100 μ m). La colonna di destra mostra la stessa area fotografata nella colonna di sinistra, ma marcata con AT8 (proteina Tau fosforilata, anticorpo secondario coniugato con Alexa-594).

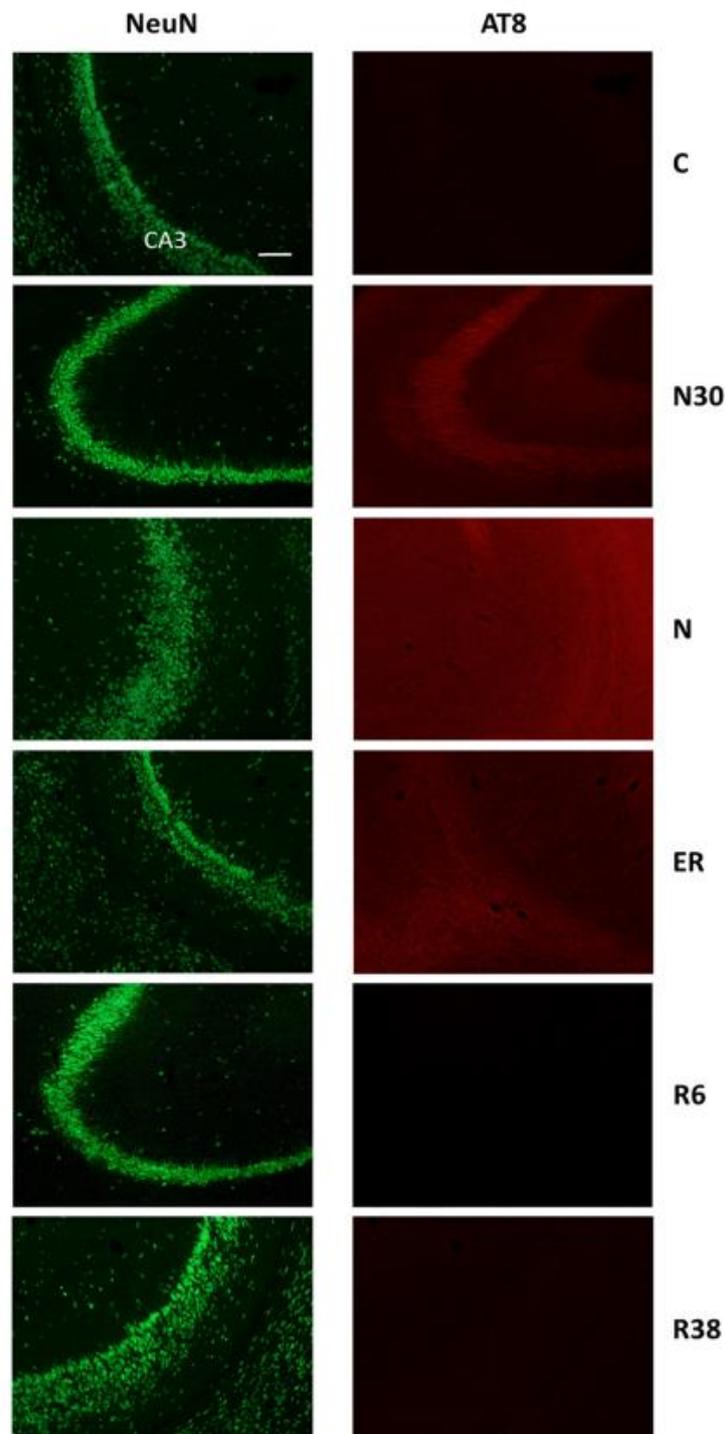


Figura 9c: immagine al microscopio che mostra l'area CA3 dell'ippocampo (CA3). Le fotografie nella colonna a sinistra mostrano le aree marcate con NeuN (marker neuronale, anticorpo secondario coniugato con Alexa-488) per il riconoscimento delle strutture anatomiche. Solo nell'immagine in alto a sinistra le strutture anatomiche considerate sono circondate con linea tratteggiata. (scale bar: 100 μ m). La colonna di destra mostra la stessa area fotografata nella colonna di sinistra, ma marcata con AT8 (proteina Tau fosforilata, anticorpo secondario coniugato con Alexa-594).

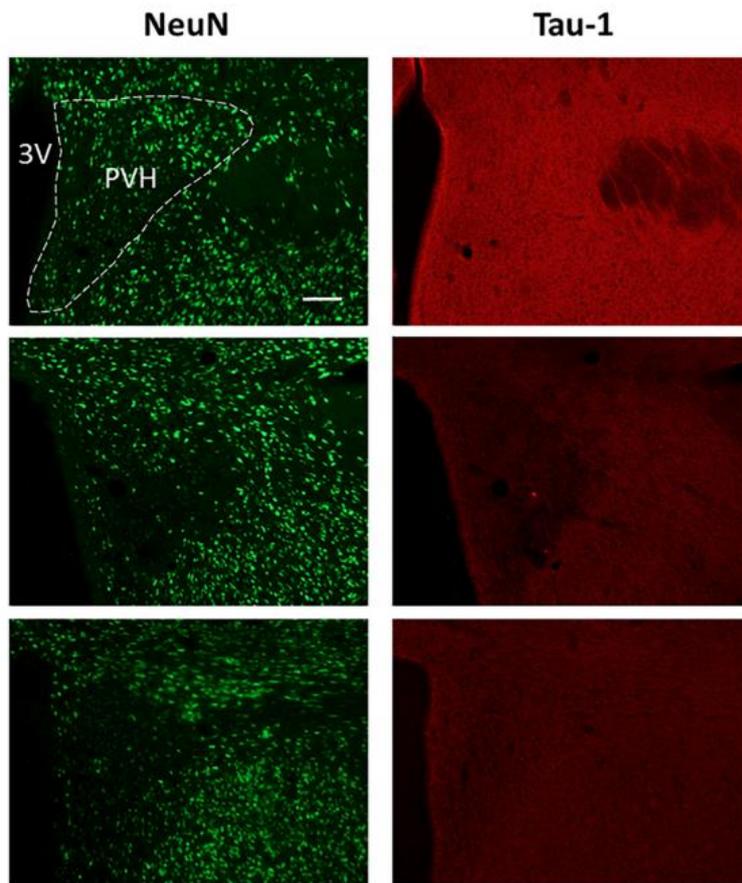


Figura 10: immagine al microscopio che mostra il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVH). Le fotografie nella colonna a sinistra mostrano le aree marcate con NeuN (marker neuronale, anticorpo secondario coniugato con Alexa-488) per il riconoscimento delle strutture anatomiche. Solo nell'immagine in alto a sinistra le strutture anatomiche considerate sono circondate con linea tratteggiata. (skill bar: 100 μ m). La colonna di destra mostra la stessa area fotografata nella colonna di sinistra, ma marcata con Tau-1 (proteina Tau non fosforilata, anticorpo secondario coniugato con Alexa-594).

	AT8						Tau-1		
	C	N30*	N*	ER*	R6 [#]	R38	C	N*	R38*
Amb	-	+++	++*	+	- [#]	-	++	++	+
NTS	+	+	++*	++	- ^{*#}	-	++	++	++
dMV	+	++	++*	++	-	-	++	++	++
Rpa	++	++	+++	++	+ [#]	++	+	+	-*
LC	-	++	+	+	-	-	++	++	++
LPB	-	+	++*	++*	- [#]	-	++	+	+
VLPAG	+	+	+	+	- ^{*#}	-	+++	++	++
Cb-Cx	-	+	+	+	-	-	++	+	+
MM	-	++*	++++*	++*	+ ^{*#}	+	++	++	++
LH	+	++	+++*	++*	- ^{*#}	-	+++	+	++*
Arc	-	++*	+++*	++*	+ [#]	+	+++	++*	++
DM	-	+	+	+	- [#]	-	+++	+	++
PVH	-	+++*	+++*	++*	- ^{#§}	+*	+++	+	++
PV	-	+	+	+	- [#]	-	+++	++	++
VLPO	-	+++*	++++*	+	- [#]	+	+++	++*	++
MnPO	-	++*	+++*	+	- [#]	-	+++	+	++
CA3	+	+	+++*	++*	- ^{*#}	-	++	+	+
PRh	-	++	+	+	- [#]	-	++++	++	++*
P-Cx	+	++	+	+	- ^{*#}	-	+++	+	++*

Tabella 3: le strutture nervose sono in ordine rostro-caudale. L'intensità di marcatura è rappresentata in una scala qualitativa, che va da "-" (no marcatura) a "++++" (massima marcatura osservata). I risultati sono una media dei dati ottenuti in doppio cieco da due sperimentatori. Differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) sono mostrate come: * vs. C; [#]R6 vs. ER; [§]R6 vs. R38.

4.3 Cellule e fibre pTau-IR nel tGI (dati preliminari)

Nei gangli del plesso mienterico di ileo, molti pirenofori nella condizione sperimentale C sono pTau-IR ($40 \pm 4\%$; 273/675 neuroni contati, $n = 3$). Mentre, per quanto riguarda la fase N, i neuroni pTau-IR sono in maggior numero ($66 \pm 6\%$, 467/708 neuroni contati, $n=3$). Il numero di neuroni pTau-IR in N è significativamente più elevato di C ($P=0.0025$) (test t di student) (**Figura 11**). La marcatura è di tipo citoplasmatico e non nucleare. Inoltre, l'intensità di questa marcatura, che appare distribuita omogeneamente nel citoplasma, varia considerevolmente da neurone a neurone all'interno del ganglio. Nel gruppo N la marcatura è particolarmente brillante a livello neuronale, ma anche nei fasci di fibre inter- e intra-gangliari (**Figura 12**). I neuroni pTau-IR hanno solitamente perimetro liscio e forma ovale, ciò li rende categorizzabili del gruppo di neuroni di Dogiel di tipo II. Non si osservano neuroni con contorno irregolare (Dogiel di tipo I) positivi per pTau. Anche le fibre che raggiungono la muscolatura longitudinale sono positive. In merito alla colocalizzazione ancora non sono state fatte conte neuronali, ma si evince colocalizzazione dei neuroni pTau con CHAT (**Figura 13**) e nNOS (**Figura 14**). I dati preliminari mostrano che quasi tutti i neuroni pTau positivi sono CHAT positivi, mentre vi sono pochi neuroni pTau-nNOS-IR.

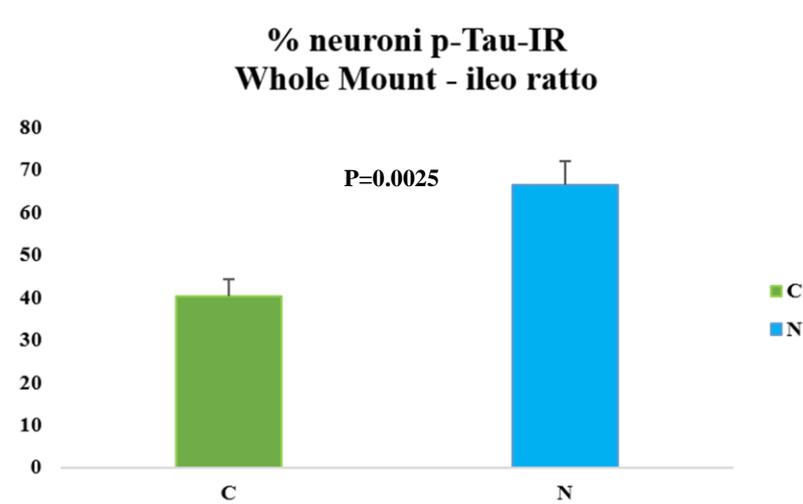


Figura 11: nel gruppo sperimentale N la % di neuroni pTau-IR è statisticamente più elevata rispetto al gruppo C (P=0.0025)

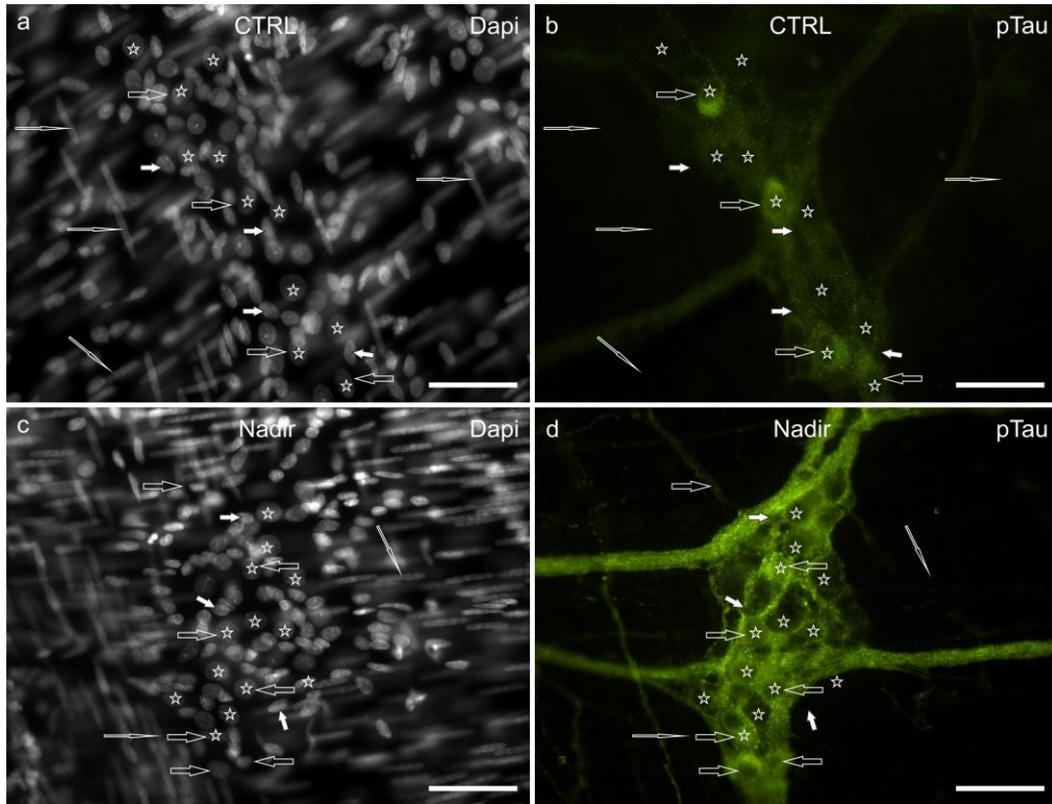


Figura 12: immagine al microscopio di plesso mienterico di ileo di ratto ottenuto con preparazione wholemout con marcatura per pTau. a) controllo DAPI, b) controllo pTau-IR; c) nadir DAPI; d) nadir pTau-IR. Le frecce aperte indicano neuroni del plesso mienterico pTau-IR. Le stelle indicano i nuclei dei neuroni marcati con DAPI, riconoscibili per la dimensione e la forma. I nuclei neuronali sono più grandi di quelli delle cellule gliali (indicati con frecce bianche). Le frecce allungate indicano i nuclei delle cellule muscolari lisce.

Scale Bar: a-d = 50 μ m

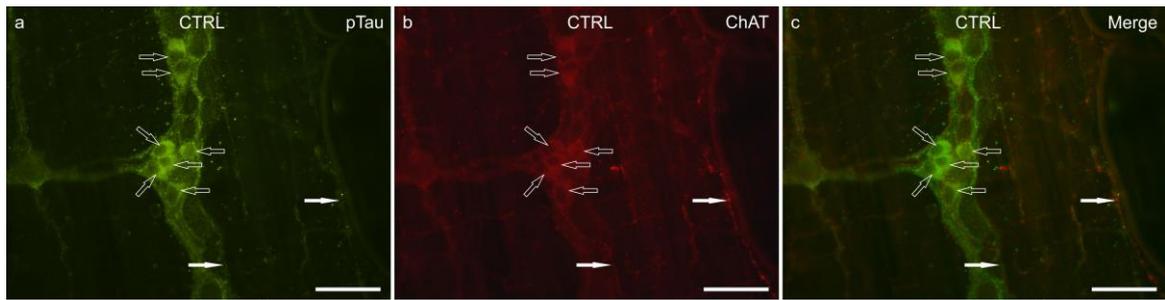


Figura 13: immagine al microscopio di plesso mienterico di ileo di ratto ottenuto con preparazione wholemout con marcatura per pTau e choline acetyltransferase (ChAT). Le frecce aperte indicano neuroni del plesso mienterico che co-esprimono pTau a) e ChAT b) –IR. Le frecce bianche indicano invece sottili fibre nervose colinergiche.

Scale Bar: a-c = 50 μ m

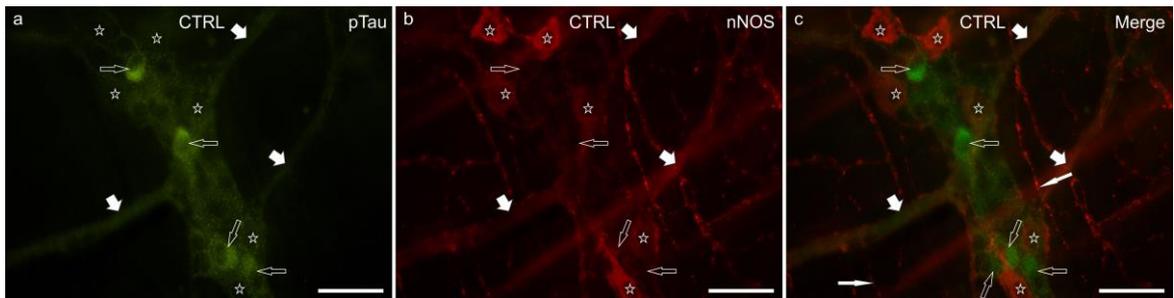


Figura 14: immagine al microscopio di plesso mienterico di ileo di ratto ottenuto con preparazione wholemout con marcatura per pTau e ossido nitrico sintasi (nNOS). Le frecce aperte indicano neuroni del plesso mienterico che co-esprimono pTau a) e nNOS b) –IR. Le stelle indicano neuroni nitregici che sono pTau-negativi. Le frecce bianche indicano prolungamenti nervosi con debole immunoreattività a pTau e nNOS.

Scale Bar: a-c = 50 μ m

5 Discussione

Si può dire che il TS induce uno stato di fosforilazione reversibile della proteina Tau a livello dell'encefalo di ratto, animale che, come l'uomo, non è in grado di andare incontro a letargo spontaneamente. Korneyev e colleghi nel 1995 hanno osservato che in ratti immersi in acqua fredda vi è un aumento neuroni pTau-IR, valore che torna a livelli fisiologici dopo 3h dall'interruzione dell'evento stressogeno. Comunque, questo modello ipotermico è molto diverso sia dal torpore fisiologico che dal nostro protocollo di torpore artificiale. I nostri risultati potrebbero gettare le basi per una nuova visione dell'ipotermia, come un modo nuovo per studiare le Taupatie (Wang Y e Mandelkov E, 2016). Infatti, la possibilità di controllare completamente il TS (Ceri M et al., 2013; Tupone D et al., 2013) permette di riprodurre in animali normalmente utilizzati in laboratorio una condizione molto simile a quella osservata negli animali ibernanti.

Durante il TS, la proteina Tau è iperfosforilata nella maggior parte delle aree encefaliche prese in esame, specialmente nei gruppi N30 e N. Il TS permette di raggiungere un grado di ipotermia che non può essere normalmente ottenuto in un animale non ibernante (Ceri M et al., 2013). Perciò, il nostro studio suggerisce che anche negli animali non ibernanti, come il ratto, sia rimasto attivo un processo ancestrale e ben conservato. L'ipotermia profonda costituisce il trigger principale per l'accumulo di pTau, come già descritto negli ibernanti (Arendt T et al., 2003, 2015) e nel topo (Planel E et al., 2004, 2007). L'accumulo di pTau in ipotermia potrebbe dipendere dalle caratteristiche fisico-chimiche dei principali enzimi coinvolti nella regolazione della fosforilazione della Tau: la glicogeno-sintasi chinasi-3- β (GSK3- β) e la proteina-fosfatasi-2A (PP2A) (Planel E et al., 2004; Gershon JE et al., 2014). Infatti, a basse temperature ambientali l'inattivazione della PP2A è più veloce ed elevata dell'inattivazione della GSK3- β , di conseguenza, l'attività della chinasi può essere per un breve periodo più elevata di quella della fosfatasi (Planel E et al., 2002; Su B et al., 2008). Specifici meccanismi regolatori possono essere attivi in questo processo: in ipotermia da anestesia l'accumulo di pTau è concomitante ad una inibizione della PP2A, mentre non si osservano radicali cambiamenti nello stato di attivazione di diverse chinasi, sebbene si è osservata un'inibizione della GSK3- β (Planel

E et al., 2007). Inoltre, studi sull'ibernazione mostrano che si ha inibizione sia della PP2A che della GSK3- β durante i picchi ipotermici (Su B et al., 2008; Stieler JT et al., 2011). Sebbene la maggior parte di aree prese in esame mostrino un accumulo di pTau durante la condizione sperimentale N (Amb, NTS, dMV, LC, LPB, Cb-Cx, MM, LH, Arc, DMH, PVH, PV, VLPO, MnPO, CA3 e PRh) alcune strutture specifiche tra cui il PV e la corteccia parietale e cerebellare mantengono bassi livelli di espressione di pTau in tutte le condizioni. Si è osservato in pazienti con AD e animali ibernanti che le aree sopra citate sono meno predisposte ad esprimere pTau (Braak H et al., 2006; Hu W et al., 2017; Furman JL et al., 2017; Stieler JT et al., 2011). L'interpretazione di questa differenziazione regionale è ancora di difficile spiegazione, ed è necessario condurre altri esperimenti di natura funzionale al fine di comprenderne la ragione. Comunque, un suggerimento arriva dagli studi di Hu e colleghi del 2017, i quali mostrano che, nel ratto, GSK3- β e PP2A hanno espressione molto bassa nel cervelletto rispetto all'ippocampo e alla corteccia cerebrale. Inoltre, in accordo con le osservazioni precedenti, nel presente lavoro l'espressione di Tau-1 era più alta nei C rispetto a tutti i gruppi in TS in tutte le strutture nervose esaminate. Possiamo quindi ipotizzare che dato il parallelismo tra TS-ibernazione naturale - AD nell'accumulo di pTau, probabilmente la genesi dell'evento fosforilativo possiede un tratto comune.

I risultati ottenuti nel recovery period che segue il TS sono di maggiore interesse. Ad oggi, la reversibilità di una forte e diffusa fosforilazione della proteina Tau era stata osservata solo negli animali ibernanti (Planel E et al., 2004, 2007; Stieler JT et al., 2011; Arendt T et al., 2015). I nostri risultati mostrano già dopo 6h dal ripristino della normotermia che tutte le strutture analizzate tornano a valori di fosforilazione molto simili a quelli osservati nel gruppo di controllo C. La defosforilazione della proteina Tau non segue in maniera evidente la cinetica temperatura-dipendente dell'attività enzimatica. Infatti, la GSK3- β , è il primo enzima a tornare attivo durante il riscaldamento corporeo. Perciò, dopo il picco di TS, mentre la TC torna a valori fisiologici, deve esserci una finestra di tempo addizionale in cui prevale l'attività chinasi della GSK3- β senza essere contrastata dalla fosfatasi PP2A (Stieler JT et al., 2011; Planel E et al., 2004), portando ad ulteriore fosforilazione della proteina Tau. Questo suggerisce che il meccanismo di defosforilazione della proteina Tau è un processo attivamente regolato, sebbene i meccanismi alla base non siano ancora noti. A parte il coinvolgimento della PP2A nella

defosforilazione della pTau sono stati descritti altri meccanismi. Infatti, i neuroni possono attivamente rilasciare nello spazio interstiziale accumuli di proteina Tau fosforilata (Serrano-Pozo A et al., 2011; Yamada K et al., 2011; Pooler AM et al., 2013), che verranno in seguito defosforilati tramite fosfatasi non-specifiche (Díaz-Hernández M et al., 2010). Infatti, è stato osservato che pazienti con AD hanno livelli più elevati di Tau che di pTau nel liquido cerebro-spinale (Tapiola T et al., 2009). L'associazione tra questa attività di secrezione della pTau dai neuroni e l'attività fosfatase della PP2A possono spiegare i meccanismi che ripristinano i livelli di pTau dopo TS. Inoltre, la % più bassa di neuroni Tau-1-IR in R38 rispetto a C prova che la defosforilazione della proteina Tau non è completa, anche se i ratti mostrano un comportamento e un pattern sonno-veglia apparentemente normali (Cerri M et al., 2013). Una situazione simile è stata osservata negli animali ibernanti (Arendt T et al., 2003; Planel E et al., 2007). Invece, valori normali di Tau-1 sono stati osservati in ratti in seguito ad esposizione ad acqua fredda (Korneyev A et al., 1995). Un'interpretazione dei dati ottenuti può essere legata alla specificità degli anticorpi utilizzati: la Tau-1 riconosce la proteina Tau solo quando non è fosforilata tra i residui 189 e 207 (Szendrei GI et al., 1993; Billingsley ML e Kincaid RL, 1997), mentre l'anticorpo AT8 riconosce la Tau fosforilata sui residui Ser202/Thr205/Ser208 (Malia TJ et al., 2016). I nostri risultati mostrano una condizione speculare solo nelle condizioni C e N: quando AT8 è elevata, Tau-1 è bassa e *vice-versa*. Comunque, in R38 entrambi gli anticorpi mostrano bassa immunoreattività. La mancanza di neuroni AT8- /Tau1-IR nel gruppo R38 può essere interpretata come una parziale defosforilazione dei monomeri di proteina Tau su specifici epitopi di AT8. Ad esempio, se questa parziale defosforilazione è indirizzata sulla Ser202, il risultato è che il TS può avere un effetto neuroprotettivo, dato che la fosforilazione su Thr205, in un modello murino di AD, si è dimostrata in grado di inibire l'accumulo di β -amiloide, e quindi di bloccare l'effetto neurotossico (Ittner LM et al., 2016). Comunque, effetti avversi a lungo termine sui neuroni non possono essere esclusi in questo modello di TS, dato che 38h di osservazione non possono essere comparabili con il lungo periodo richiesto per sviluppare neurodegenerazione in un modello animale di Taupatia (Mustroph ML et al., 2010; Zhang Q et al., 2018). Nonostante questo limite, l'analisi del comportamento sonno-veglia durante le giornate di recupero da TS (Cerri M et al., 2013), suggerisce che il TS non possa produrre reazioni avverse.

Anche la microglia potrebbe contribuire alla defosforilazione della proteina Tau: infatti, le microgliosi, neuroinfiammazioni caratterizzate da proliferazione e attivazione della microglia, sono un importante punto di partenza nelle Taupatie (Ransohoff RM 2016; Nilson AN et al., 2017). Considerando la limitazione della nostra analisi in cui è stata presa in esame la microglia di un singolo soggetto per condizione, non sono state osservate significative differenze morfologiche (segno di sofferenza gliale) in nessuna delle aree analizzate. Sebbene alcuni cambiamenti nella morfologia della microglia ippocampale siano stati osservati in criceti ibernanti (Cogut V et al., 2018; León-Espinosa G et al., 2018) si ha una normalizzazione circa 8h dopo il raggiungimento dell'eutermia (Cogut V et al., 2018). Comunque, in questo studio abbiamo osservato una microglia estremamente densa in R6 per tutte le strutture analizzate, senza differenze rilevanti in R38 rispetto a C. Questo suggerisce che in R6 si possa avere un lieve e transiente processo infiammatorio, apparentemente sovvertito al ritorno in condizioni fisiologiche. Degno di nota il fatto che si abbia un accrescimento transiente della sintesi di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-1 β) in criceti ibernanti dopo 8h dal picco ipotermico (Cogut V et al., 2018). Inoltre, la microglia viene ad essere attivata dalla proteina Tau extracellulare (Asai H et al., 2015) e nelle Taupatie la microglia sembra avere un ruolo nella dispersione dei grovigli di proteina Tau nelle differenti aree cerebrali (Asai H et al., 2015; Bussian TJ et al., 2018). In accordo con quanto detto, nel gruppo sperimentale R6, quando la Tau è quasi completamente defosforilata, una leggera microgliosi potrebbe contribuire al rallentamento della completa clearance della Tau che è stata rilasciata dai neuroni (Serrano-Pozo et al., 2011; Asai et al., 2015).

Il SNE è anche chiamato brain in the gut o little brain e può rappresentare lo specchio del SNC, sia in condizioni di salute che patologiche. Il SNE è estremamente complesso, unico e in grado di orchestrare le attività del tGI indipendentemente dal SNC. Un SNE intatto è essenziale per la compatibilità con la vita e disfunzioni di questo sistema esitano in disordini gastrointestinali. Questo aspetto è ulteriormente avvalorato dal fatto che patologie a carico del SNE sono strettamente correlate a malattie mentali. La struttura del SNE per tanti versi richiama quella del SNC, perciò, meccanismi patogenetici a carico dell'SNC possono anche sfociare in malattie a carico dell'SNE, e le strutture nervose che interconnettono questi due sistemi possono fungere da mezzo di dispersione del focolaio patologico (Rao M e Gershon MD 2016). Lionett e colleghi hanno dimostrato che in

culture fetali di neuroni di SNE di ratto, esattamente come nel SNC, è espressa pTau in maniera costitutiva, ma non vi sono studi sui livelli di pTau nel SNE di ratto adulto. Vi sono pochi studi in campo umano in merito al collegamento del SNE con la malattia di AD, e in tutti sembra non esservi perdita neuronale o Tau patologica (Han J et al., 2017). Il nostro studio quindi, seppur preliminare, attesta in primis che il SNE presenta neuroni pTau-IR anche nei ratti di controllo e, durante il torpore, il grado di fosforilazione della pTau è significativamente più elevato rispetto a quest'ultimo gruppo. Questo stato di fosforilazione sembra calare dopo 6h dall'ipotermia (dato non mostrato). Allo stato attuale non è possibile affermare che questo modello possa essere utile al fine di studiare le malattie neurodegenerative a livello del SNE, ma getta le basi per dire che anche in questa sede la proteina subisce modifiche post-traduzionali, quindi l'argomento merita di poter essere approfondito. Nell'uomo con AD si osserva una disfunzione dei neuroni colinergici del tronco encefalico. Nel SNC si è osservato che la trasmissione colinergica è di fondamentale importanza. Questo neurotrasmettitore favorisce anche la trasmissione con il sistema nervoso periferico, la comunicazione neuromuscolare e l'interazione con altri neurotrasmettitori. Infatti, la somministrazione di inibitori delle colinesterasi sembra essere molto utile nel trattamento delle prime fasi dell'AD (Nordberg A 2014). A livello del SNE la maggior componente neuronale è rappresentata dal sistema colinergico (~ 70-75%) che regola diversi meccanismi fisiologici come apprendimento, memoria, rilascio di ormoni, mentre i neuroni nNOS (~ 25-30%) sono la maggior componente inibitoria che ha un ruolo fondamentale nel potenziamento a lungo termine, in apprendimento e memoria (Feng J et al., 2018). Vista l'importanza di CHAT e nNOS nel SNE abbiamo deciso di andare a vedere se i neuroni pTau-IR colocalizzassero con uno dei due neurotrasmettitori. Allo stato attuale possiamo solamente affermare che in linea con quanto visto in letteratura la componente colinergica sembra essere maggiormente interessata. Quasi tutti i neuroni pTau colocalizzano con CHAT, solo una piccola parte invece è nNOS. Obiettivo futuro sarà quello di contare le due popolazioni neuronali nei differenti gruppi sperimentali per vedere se vi siano eventuali variazioni. Sia il lavoro pubblicato sul SNC che i dati preliminari sull'SNE mostrano che in mammiferi non ibernanti vi è la fosforilazione della proteina Tau nello stato di TS, fosforilazione completamente ripristinata a livello dell'SNC al recupero dall'ipotermia. Inoltre, questo è il primo studio che propone la ricerca della pTau nel SNE di ratto adulto, coinvolgendo

il tGI nella patogenesi delle Taupatie. Sebbene l'accumulo di pTau sembra essere dovuta più che altro ad un fenomeno psico-chimico (l'abbassamento della TC), i meccanismi di defosforilazione al ritorno in condizioni fisiologiche sembrano essere finemente regolati, e nel SNC sembra essere importante il ruolo della microglia. I macrofagi, che rappresentano una componente microgliale del tGI, presentano un pattern di distribuzione molto simile alla microglia del SNC. Infatti, i macrofagi sono spesso associati ai gangli e al connettivo del plesso mienterico e all'innervazione simpatica. È stata inoltre attestata la presenza di macrofagi a ridosso di neuriti di neuroni distrofici del plesso mienterico e nella parete della muscolatura liscia in ratti anziani, e questo fa presumere un ruolo neuroprotettivo (Phillips RJ e Powley TL 2012). Sarebbe interessante infatti andare a studiare la componente macrofagica nel nostro modello di TS per capire se in questa condizione vi siano modificazioni morfologiche.

In conclusione, la spiegazione che possiamo fornire è che i meccanismi post-traduzionali che si verificano potrebbero servire a far fronte a condizioni estreme, ma per particolari motivi, ad esempio per una maggiore intensità della modificazione, l'organismo può non far fronte a questi cambiamenti e il tutto esita in degenerazione. Sarebbe molto importante stabilire se alcune tipologie neuronali siano più predisposte all'accumulo della pTau per poter capire meglio la patogenesi delle malattie neurodegenerative. È ormai noto che la proteina Tau abbia un ruolo principale nella patogenesi delle malattie neurodegenerative e che la sua presenza sia fondamentale al fine di sviluppare la malattia. Questo modello sperimentale per la prima volta propone di osservare il meccanismo a monte: il torpore sintetico permette di spiegare cosa, in condizioni fisiologiche, l'organismo sia in grado di fare per prevenire la formazione degli aggregati di proteina Tau patologici. Inoltre, il parallelismo con il tGI potrebbe essere molto utile; è noto infatti che molte malattie neurodegenerative causino grave compromissione di tutto il sistema digerente e la possibilità con la tecnica whole mount di isolare il plesso mienterico permette di studiare al meglio la componente neuronale.

6 Bibliografia

- Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Kahn J. (1982). Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature*, 298(5869), 84
- Andreadis A. (2006). Misregulation of Tau alternative splicing in neurodegeneration and dementia. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 44, 89–107
- Andrews MT. (2007) Advances in molecular biology of hibernation in mammals. *Bioessays* 29:431–440. CrossRef Medline
- Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W. (2003) Reversible paired helical filament-like phosphorylation of Tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* 23:6972–6981
- Arendt, T., Stieler, J., and Holzer, M. (2015). Brain hypometabolism triggers PHF-like phosphorylation of Tau, a major hallmark of Alzheimer's disease pathology. *J. Neural. Transm.* 122, 531–539. doi: 10.1007/s00702-014-1342-8
- Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt Tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593. doi: 10.1038/nn.4132
- Barghorn S. et al. (2000). Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by Tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* 39, 11714–11721
- Billingsley ML, Kincaid RL. (1997). Regulated phosphorylation and dephosphorylation of Tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J.* 323, 577–591. doi: 10.1042/bj3230577
- Blessing WW, Nalivaiko E. (2001). Raphe magnus/pallidus neurons regulate tail but not mesenteric arterial blood flow in rats. *Neuroscience* 105:923–929. CrossRef Medline
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112, 389–404. doi: 10.1007/s00401-006-0127-z
- Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents Tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578–582. doi: 10.1038/s41586-018-0543-y
- Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. (2003) Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* 460: 303–326. CrossRef Medline

- Carey HV, Andrews MT, Martin SL. (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* 83:1153–1181. Medline
- Cerri M, Mastrotto M, Tupone D, Martelli D, Luppi M, Perez E et al. (2013). The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defence induces a suspended animation state in rat. *J neurosci.* 33, 2984-2993. doi:10.1523/JNEUROSCI.3596-12.2013
- Clavaguera F. et al. (2009). Transmission and spreading of Tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 11, 909–913
- Cogut V, Bruintjes JJ, Eggen BJL, van der Zee EA, Henning RH. (2018). Brain inflammatory cytokines and microglia morphology changes throughout hibernation phases in Syrian hamster. *Brain. Behav. Immun.* 68, 17–22. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.009
- Coppola G, et al. (2012). Evidence for a role of the rare p. A152T variant in MAPT in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer’s diseases. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3500–3512
- Daan S, Barnes BM, Strijkstra AM. (1991) Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci Lett* 128:265–268
- Díaz-Hernández M, Gómez-Ramos A, Rubio A, Gómez-Villafuertes, R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT, et al. (2010). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular Tau. *J. Biol. Chem.* 285, 32539–32548. doi: 10.1074/jbc.M110.145003
- Dickson DW, Kouri N, Murray M, Josephs KA. (2011). Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-Tau (FTLD-Tau). *J.Mol. Neurosci.* 45, 384–389
- Drew KL, Buck CL, Barnes BM, Christian SL, Rasley BT, Harris MB. (2007) Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J Neurochem* 102:1713–1726. CrossRef Medline
- Feng J, Dong L, Zhang J, Han X, Tang S, Song L, et al. (2018). Unique expression pattern of KIBRA in the enteric nervous system of APP/PS1 mice. *Neuroscience letters*, 675, 41-47
- Frandemiche M L, et al. (2014). Activity-dependent Tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid- β oligomers. *J. Neurosci.* 34, 6084–6097
- Furman JL, Vaquer-Alicea J, White CL III, Cairns NJ, Nelson PT, Diamond MI. (2017). Widespread Tau seeding activity at early Braak stages. *Acta Neuropathol.* 133, 91–100. doi: 10.1007/s00401-016-1644-z
- Geiser F. (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66:239–274
- Gerson JE, Castillo-Carranza DL, Kaye R. (2014). Advances in therapeutics for neurodegenerative Tauopathies: moving toward the specific targeting of the most toxic Tau species. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 752–769. doi: 10.1021/cn500143n
- Goedert M. et al. (1996). Assembly of microtubule-associated protein Tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383, 550–553
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927

- Gruning CS, et al. (2014). Alternative conformations of the Tau repeat domain in complex with an engineered binding protein. *J. Biol. Chem.* 289, 23209–23218
- Han J, Lee HJ, Kim KY, Lee SJC, Suh JM, Cho J., et al. (2017). Tuning structures and properties for developing novel chemical tools toward distinct pathogenic elements in Alzheimer's disease. *ACS chemical neuroscience*, 9(4), 800-808
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 15, 112–119
- Hong M, et al. (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct Tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914–1917
- Hong XP, et al. (2010). Essential role of Tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20, 1339–1349
- Hu W, Wu F, Zhang Y, Gong CX, Iqbal K, Liu F. (2017). Expression of Tau pathology-related proteins in different brain regions: a molecular basis of Tau pathogenesis. *Front. Aging Neurosci.* 9:311. doi: 10.3389/fnagi.2017. 00311
- Igelmund P, Heinemann U, Klussmann FW. (1993). Hibernation-related modification of activity-dependent properties of synaptic transmission in hamster hippocampus. *Neurosci Res Commun* 13:167–173
- Ittner LM, et al. (2010). Dendritic function of Tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397
- Ittner LM, Ke YD, Gotz J. (2009). Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 284, 20909–20916
- Jacobs LF. (1996). The economy of winter: phenotypic plasticity in behavior and brain structure. *Biol Bull* 191:92–100
- Jeganathan S., von Bergen M, Brutlach H, Steinhoff HJ, Mandelkow E. (2006). Global hairpin folding of Tau in solution. *Biochemistry* 45, 2283–2293
- Kadavath H, et al. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 7501–7506
- Kimura T, et al. (2014). Microtubule-associated protein Tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130144
- Kimura T, et al. (2014). Microtubule-associated protein Tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130144
- Knops J, et al. (1991). Overexpression of Tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* 114, 725–733
- Köpke E, et al. (1993). Microtubule-associated protein Tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 268, 24374–24384
- Korneyev A, Binder L, Bernardis J. (1995). Rapid reversible phosphorylation of rat brain Tau proteins in response to cold water stress. *Neurosci. Lett.* 191, 19–22. doi:10.1016/0304-3940(95)11546-3

- Kouri N, et al. (2014). Novel mutation in MAPT exon 13 (p. N410H) causes corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 127, 271–282
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. (1998). Tau interacts with src-family nonreceptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 111, 3167–3177 32
- Lei P, et al. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat. Med.* 18, 291–295
- León-Espinosa G, Regalado-Reyes M, DeFelipe, J, Muñoz A. (2018). Changes in neocortical and hippocampal microglial cells during hibernation. *Brain Struct. Funct.* 223, 1881–1895. doi: 10.1007/s00429-017-1596-7
- LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein Tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 10369–10373
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated Tau protein. *Nature* 399, 784–788
- Malia TJ, Teplyakov A, Ernst R, Wu SJ, Lacy ER, Liu X, et al. (2016). Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated Tau by the anti-Tau antibody AT8. *Proteins* 84, 427–434. doi: 10.1002/prot. 24988
- Morrison SF. (1999). RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276:R962– R973. Medline
- Mustroph ML, King MA, Klein RL, Ramirez JJ. (2012). Adult-onset focal expression of mutated human Tau in the hippocampus impairs spatial working memory of rats. *Behav. Brain Res.* 233, 141–148. doi: 10.1016/j.bbr. 2012.04.034
- Nakamura K, Morrison SF. (2011). Central efferent pathways for colddefensive and febrile shivering. *J Physiol* 589:3641–3658. CrossRef Medline
- Nilson AN, English KC, Gerson JE, Barton Whittle T, Nicolas Crain C, Xue J, et al. (2017). Tau oligomers associate with inflammation in the brain and retina of Tauopathy mice and in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 55, 1083–1099. doi: 10.3233/JAD-160912
- Nordberg A. (2014). Molecular imaging in sporadic Alzheimer's disease populations and those genetically at risk. *Neurodegenerative Diseases*, 13(2-3), 160-162
- Phillips RJ, Powley TL. (2012). Macrophages associated with the intrinsic and extrinsic autonomic innervation of the rat gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience*, 169(1), 12-27
- Planel E, et al. (2004). Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to Tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 2401–2411
- Planel E, et al. (2007). Anesthesia leads to Tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J. Neurosci.* 27, 3090–3097

- Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, Hanger DP. (2013). Physiological release of endogenous Tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* 14, 389–394. doi: 10.1038/embor.2013.15
- Ransohoff RM. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 353, 777–783. doi: 10.1126/science.aag2590
- Rao M, Gershon MD. (2016). The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 13(9), 517
- Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yamamori H, Nessa BN, Morihara T, Takeda M. (2009). Phosphorylation of Tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: implications for the mechanism of Tau aggregation. *J Neurochem* 108:33–43
- Santacruz K, et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481
- Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. (1999). Phosphorylation that detaches Tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38, 3549–3558
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch, MP, et al. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer’s disease. *Am. J. Pathol.* 179, 1373–1384. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.047
- Stieler JT, Bullmann T, Kohl F, Tøien Ø, Brückner MK, Härtig W, et al. (2011). The physiological link between metabolic rate depression and Tau phosphorylation in mammalian hibernation. *PLoS One* 6:e14530. doi: 10.1371/journal.pone.0014530
- Stieler JT, Bullmann T, Kohl F, Tøien Ø, Brückner MK, Härtig W, et al. (2011). The physiological link between metabolic rate depression and Tau phosphorylation in mammalian hibernation. *PLoS One* 6:e14530. doi: 10.1371/journal.pone.0014530
- Su B, Wang X, Drew KL, Perry G, Smith MA, Zhu X. (2008). Physiological regulation of Tau phosphorylation during hibernation. *J. Neurochem.* 105, 2098–2108. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05294.x
- Sultan A, et al. (2011). Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575
- Szendrei GI, Lee VM, Otvos L Jr. (1993). Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. *J. Neurosci. Res.* 34, 243–249. doi: 10.1002/jnr.490340212
- Tai HC, et al. (2014). Frequent and symmetric deposition of misfolded Tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer inverted question marks disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 146
- Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. (2009). Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and Tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch. Neurol.* 66, 382–389. doi: 10.1001/archneurol.2008.596

- Tupone D, Madden CJ, Morrison SF. (2013). Central activation of the A1 adenosine receptor (A1AR) induces a hypothermic, torpor-like state in the rat. *J. Neurosci.* 33, 14512–14525. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1980-13.2013
- Walaas SI, Greengard P. (1991). Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol Rev* 43:299–349
- Wang Y, Mandelkow E. (2012). Degradation of Tau protein by autophagy and proteasomal pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 644–652
- Wang Y, Mandelkow E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 5–21. doi:10.1038/nrn.2015.1
- Watanabe A, et al. (2004). Molecular aging of Tau: disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 90, 1302–1311
- Wegmann S, Medalsy ID, Mandelkow E, Muller DJ. (2013). The fuzzy coat of pathological human Tau fibrils is a two-layered polyelectrolyte brush. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, E313–E321
- Xiao H, Run X, Cao X, Su Y, Sun Z, Tian C, et al. (2013). Temperature control can abolish anesthesia-induced Tau hyperphosphorylation and partly reverse anesthesia-induced cognitive impairment in old mice. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 67, 493–500. doi: 10.1111/pcn.12091

Prefazione terzo argomento

Questo argomento rappresenta uno studio ex vivo con lo scopo di investigare tramite immunistochemica, nel (tGI) di gatto, la distribuzione dei seguenti recettori dei cannabinoidi: CB1R, CB2R, GPR55, PPAR α , PPAR γ , TRPA1 e 5-HT1aR. In particolare, questo studio fa parte di un progetto più ampio di caratterizzazione della distribuzione del sistema endocannabinoide (ECs) nel tGI di cane, nei gangli cervicali delle radici dorsali di cane (DRG) e nel tGI di cavallo. Da questo progetto abbiamo già ottenuto una pubblicazione su *Histochemistry and Cell Biology* per quanto riguarda la distribuzione dell'ECs nel tGI di cane, invece, il lavoro sul gatto, nel quale sarò autore primo nome, è in fase di pubblicazione (submitted) su *Histochemistry and Cell Biology* ed è già stato presentato tramite abstract al congresso NeuroGASTRO 2019 a Lisbona. Questi dati sono già stati oggetto di una tesi magistrale.

Abstract Lavoro

Localization of cannabinoid receptors in the cat gastrointestinal tract

Agnese Stanzani, Giorgia Galiazzo, Fiorella Giancola, Claudio Tagliavia, Margherita De Silva, Marco Pietra, Federico Fracassi, Roberto Chiocchetti

Department of Veterinary Medical Sciences (UNI EN ISO 9001:2008), University of Bologna, Italy.

Objectives A growing body of literature indicates that activation of cannabinoid receptors may exert beneficial effects on gastrointestinal inflammation and visceral hypersensitivity. The present *ex vivo* study was aimed to investigate immunohistochemically the distribution of the canonical cannabinoid receptors CB₁ (CB1R) and CB₂ (CB2R), and the putative cannabinoid receptors G protein-coupled receptor 55 (GPR55), nuclear peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α) and gamma (PPAR γ), transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), and serotonin receptor 5-HT1a (5-HT1a) in the gastrointestinal tract of the cat. **Results** - CB1R-immunoreactivity (CB1R-IR) was observed in gastric epithelial cells, intestinal enteroendocrine cells (EECs) and goblet cells, lamina propria mast cells (MCs), and myenteric plexus (MP) neurons. CB2R-IR was expressed by EECs, enterocytes, and macrophages. GPR55-IR was expressed by EECs, macrophages, immunocytes, and MP neurons. PPAR α -IR was expressed by parietal cells, immunocytes, smooth muscle cells, and enterogial cells. PPAR γ -IR was expressed by the nucleus of MP neurons. TRPA1-IR was expressed by enteric neurons and intestinal goblet cells. 5-HT1a receptor-IR was expressed by gastrointestinal epithelial cells and gastric smooth muscle cells. **Conclusions and relevance** - Cannabinoid receptors showed a wide distribution in the feline GIT layers. Although not yet supported by functional evidences, the present research might represent an anatomical substrate that might be useful to support, in feline species, the

therapeutic use of cannabinoids during gastrointestinal inflammatory diseases. Keywords
– CB1, CB2, GPR55, PPAR α , PPAR γ , TRPA1, 5-HT1a.

Abbreviazioni:

- **ECs:** Sistema Endocannabinoide
- **tGI:** Tratto Gastrointestinale
- **CBD:** Cannabidiolo
- **Δ 9-THC:** Δ 9-tetraidrocannabinolo
- **CB1R:** recettore cannabinoidi di tipo I
- **CB2R:** recettore cannabinoidi di tipo II
- **GPCRs:** proteine G associate a recettore
- **AEA:** anandamide
- **2AG:** 2-arachidoinoilglicerolo
- **cAMP:** adenosina monofosfato ciclico
- **MAPK:** proteina chinasi mitogeno-attivata
- **AC:** adenilato ciclasi
- **LSI:** lisofosfatidilinositolo
- **EECs:** cellule enteroendocrine
- **PPARs:** recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi
- **CBG:** Cannabigerolo
- **CBC:** Cannabicromene
- **Δ 9-THCV:** Δ -9-Cannabivarina
- **CBL:** Cannabiciclolo
- **CBN:** Cannabinolo
- **AJA:** acido aiulemico
- **NO:** ossido nitrico
- **NADA:** N-arachidonoil-dopamina
- **SNE:** Sistema Nervoso Enterico

1 Introduzione

1.1 La Cannabis nell'antichità

La Cannabis è stata ampiamente sfruttata fin dall'antichità per i suoi innumerevoli usi, come la produzione di fibra, olio, cibo, medicinali, usi ricreativi e religiosi. Esistono due specie che possono essere sia selvatiche che coltivate: *C. sativa*, alta e fibrosa e la *C. indica*, più bassa e con elevate proprietà psicoattive. Ne esiste anche una terza specie, la *C. ruderalis*, esclusivamente selvatica. (Piluzza G et al., 2013; Pisanti S e Bifulco M, 2018). Si ipotizza che le sue origini risalgano al pleistocene in eurasia settentrionale, dove, nel periodo di glaciazione, le popolazioni di Cannabis si distribuirono in nicchie climatiche favorevoli spargendosi in Europa meridionale e sud-est asiatico, portando alla differenziazione della pianta nelle varie specie. Solo con il riscaldamento terrestre la pianta ha iniziato a diffondersi in tutto il mondo (Clarke R e Merlin M, 2013).

La prima testimonianza sull'utilizzo della Cannabis da parte dell'uomo risale a più di 10000 anni fa in Giappone, dove sono stati ritrovati macrofossili di frutti e semi di canapa risalenti a quel periodo. In Cina sono stati fatti ritrovamenti del 4000 a.C. che provano che la Cannabis veniva utilizzata come fibra per abiti, scrittura, cibo e ai fini medicali e religiosi. I rimedi medicali, tramandati oralmente per oltre 2000 anni, sono entrati a far parte nel I secolo a.C. dell'antica Farmacopea cinese. Infatti, nella medicina cinese, la *C. sativa* viene prescritta come rimedio contro fatica, reumatismi e malaria. L'uso della Cannabis come sostanza psicoattiva, essendo principalmente limitato agli shamani, cominciò a spostarsi dalla Cina a causa delle restrizioni dell'impero cinese, approdando in India. In India la Cannabis era principalmente considerata fondamentale per i riti religiosi, e solo nel 1000 a.C. venne introdotta come rimedio contro l'ansia, analgesico, antispastico e diuretico (Pisanti S e Bifulco M, 2018). La Cannabis si affacciò nel Mediterraneo solo 3500 anni fa grazie alla migrazione degli Sciti dall'Asia centrale (Sorenson JL e Johannesse CL, 2009), che la utilizzavano durante rituali per favorire

visioni e stati di trance, ma anche per il trattamento topico di contusioni, per la depressione, le artriti e patologie ginecologiche (Mechoulam R, 1986). Vi sono testimonianze sull'uso della Cannabis anche nell'antico Egitto risalenti a circa 3000 anni fa, dove il suo uso medicinale è riportato nel papiro di Ebers (**Figura 1**) (Epstein HA 2010).

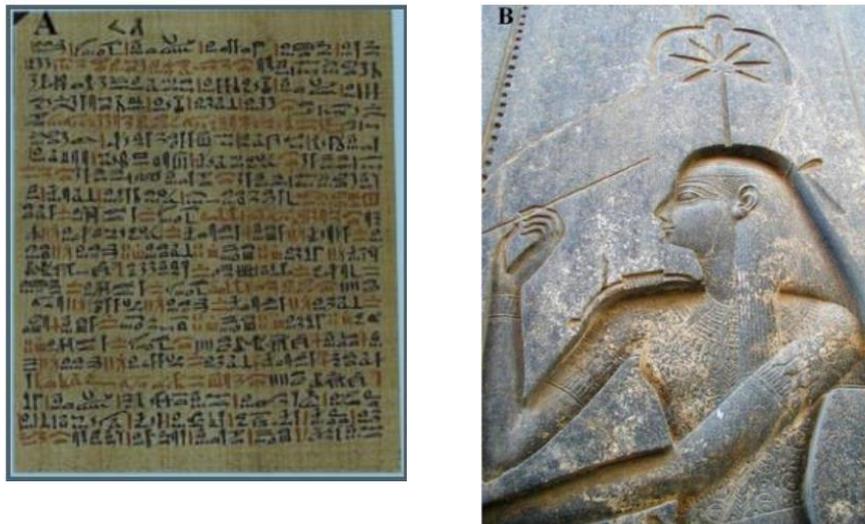


Figura 1: A – Papiro di Ebers; B – Seshat, dea della saggezza e conoscenza raffigurata con foglia di canapa come copricapo. (modificata da : Bonini SA et al., 2018)

Nel mondo arabo la Cannabis è considerata medicina sacra, dai poteri inebrianti, come riportato ne “Le mille e una notte” (Pisanti S e Bifulco M, 2018). In Africa la Cannabis era utilizzata per trattare febbre, malaria, asma, morso di serpenti, avvelenamenti ma anche per facilitare il parto. È proprio grazie al commercio di schiavi in Africa che la Cannabis si diffuse in Sud America, dove anche qui era utilizzata come medicinale e per i riti religiosi (Sorenson JL e Johannesse CL, 2009) (**Figura 2**).



Figura 2: Diffusione della Cannabis nel mondo. (modificata da: Pisanti M e Bifulco S, 2018)

Per greci e romani era di uso molto importante la canapa e solo attorno al I secolo d.C. iniziarono a sfruttare la pianta come medicinale (Pisanti S e Bifulco M, 2018). Nel medioevo, con la bolla papale di Papa Innocenzo VIII del 1484, ne venne vietato l'uso ai fedeli a causa degli effetti inebrianti, ma nel Rinascimento l'uso della fibra per la produzione di carta e tele tornò ad essere elevato (Frankhauser M, 2002; Clarke R e Merlin M, 2013).

1.2 La Cannabis nella storia moderna

William Brooke O'Shaughnessy fu un medico che nel XIX secolo condusse diversi studi in India, dove scoprì la variante in uso in questo paese, la *C. sativa*, che utilizzò (previa sperimentazione animale) per produrre tinture alcoliche per pazienti affetti da reumatismi, colera o tetano e bambini con convulsioni. Inoltre, durante il regno della regina Vittoria diversi medici prescrissero la Cannabis per il trattamento di molte patologie, come convulsioni e reumatismi. Molto presto l'uso della Cannabis in Europa però andò ben

oltre lo scopo medico e molti artisti vollero provarla. A Parigi, nel Club des Hashischins, frequentato da grandi scrittori come Victor Hugo, Alexandre Dumas, Charles Baudelaire, veniva fatto normale consumo di Cannabis. In Italia invece si devono i progressi a Carlo Erba e al fisico Giovanni Polli. Nel 1847 a Milano, Polli assieme a Viganò e Mordaret decisero di prestarsi come volontari per mostrare gli effetti della Cannabis ad un gruppo di fisici e scienziati (Pisanti S e Bifulco M, 2018). Carlo Erba fu il primo a tentare di isolare i principi attivi della Cannabis con insuccesso, ma nel frattempo creò un laboratorio per la produzione di formulazioni galeniche per il trattamento di emicrania, nausea e artriti che ebbe molto successo. Alla fine del XIX secolo diversi laboratori nel mondo lanciarono in commercio differenti formulazioni di Cannabis (e.g. pillole ed estratti) con proprietà analgesiche, antiinfiammatorie e antispastiche. Data la spiccata variabilità di efficacia e dosaggio necessari, l'utilizzo di Cannabis cominciò a crollare nel XX secolo, anche perché nello stesso periodo divennero disponibili a livello commerciale i primi farmaci antidolorifici non psicoattivi come l'aspirina (Pisanti S e Bifulco M, 2018). Nel 1925 con la Seconda Convenzione Internazionale dell'Oppio redatta a Ginevra tra Stati Uniti, Germania, Cina, Giappone, UK, Francia, Italia, Portogallo, Russia, Persia, Olanda e Siam venne regolato e controllato il commercio e l'utilizzo dell'oppio, della cocaina e di altre droghe. Si stabilì che canapa indiana e derivati da essa potessero essere utilizzati solo a scopo medico e che le formulazioni adibite ad altri usi dovessero essere tolte dal commercio. Il crollo definitivo arrivò nel 1937 negli Stati Uniti con il "Marijuana Tax Act", che consisteva nel pagamento di una tassa per il commercio di Cannabis. Nonostante tutto, la ricerca sulla cannabis venne portata avanti ad Israele, dove nel 1962 Gaoni e Mechoulam identificarono la struttura dei fitocannabinoidi, le sostanze attive della Cannabis, ed in particolare del Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), principale responsabile dell'effetto psicoattivo (Ashurst PR et al., 1967). Solo agli inizi degli anni '90 venne scoperto il sistema endocannabinoide, i recettori e le molecole endogene attive. Fu una scoperta sensazionale, un sistema fisiologico endogeno, che se stimolato può essere coinvolto in numerose patologie. Da qui nacque nuovamente un interesse scientifico verso la Cannabis (Pisanti S e Bifulco M, 2018). Negli ultimi decenni si sta cercando di creare medicinali che hanno come target il sistema endocannabinoide. Un esempio è il Rimonabant per il trattamento dell'obesità, che però fu un grande insuccesso poiché scaturiva comportamenti depressivi nei pazienti (Pisanti S et al., 2009). I

cannabinoidi hanno un effetto antidolorifico e a differenza degli oppioidi creano meno dipendenza. Un esempio di molecola sintetizzata dalla Cannabis è il cannabidiolo (CBD) con potere terapeutico e privo di effetti psicoattivi. Nel 2018 è stato approvato l'Epidiolex (farmaco a base di CBD) dal Food and Drug Administration (FDA) per patologie convulsive nell'uomo (Pisanti S e Bifulco M, 2018). Molti paesi di recente ne stanno nuovamente consentendo un utilizzo medico e la legalizzazione a scopi ricreativi (Pisanti S et al., 2015).

1.3 Il Sistema Endocannabinoide: un quadro molecolare

Il componente fondamentale della C.sativa in grado di causare effetti psicoattivi è il Δ^9 -THC, isolato nel 1964. Per molti anni dopo la sua estrazione, i target d'azione potenziali di questa molecola rimasero sconosciuti. Nel 1980 venne scoperto il recettore dei cannabinoidi di tipo 1 (CB1R), una proteina G associata a recettore (GPCRs), molto abbondante nell'encefalo umano e in porzioni minori nelle cellule del sistema immunitario (Bauaboula M et al., 1993; Galiègue S et al., 1995 Sugamura K et al., 2009). Successivamente venne isolato nella linea cellulare leucemica HL60 il recettore per i cannabinoidi di tipo 2 (CB2R), con un 44% di omologia con il CB1R. Il CB2R è stato identificato principalmente nelle cellule del sistema immunitario umano a differenziamento mieloide. Dopo la scoperta di CB1R e CB2R sono stati identificati molti altri recettori per i cannabinoidi con GPR18, GPR55 e il GPR119, TRPVs e PPARs (**Figura 3**).

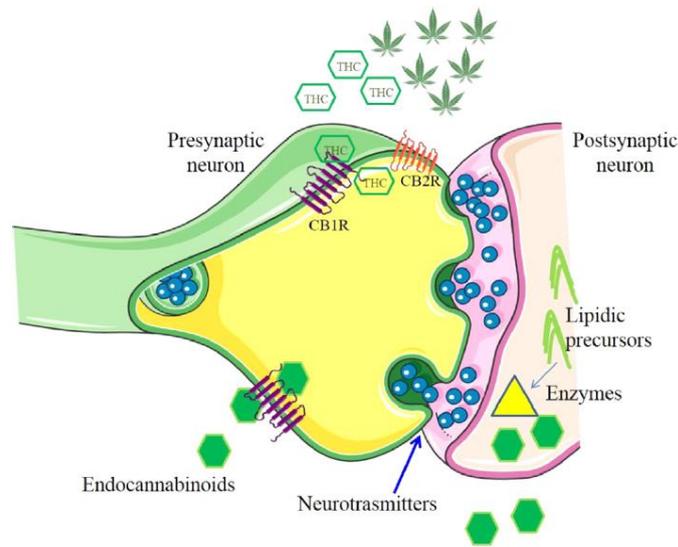


Figura 3: organizzazione dell'ECs. (modificata da: Bonini SA et al., 2018)

Il Δ^9 -THC è una molecola lipofila, per questo motivo si ipotizzava che anche i cannabinoidi endogeni lo fossero, infatti, fu possibile identificare il primo endocannabinoide tramite separazione dei lipidi (Devane WA et al., 1992). Il primo fu l'anandamide (AEA) che è un agonista parziale di CB1R e CB2R; in seguito 2-arachidonoilglicerolo (2AG), un monoacilglicerolo agonista completo di entrambi i recettori ma con maggior affinità per il CB1R. Sono stati scoperti nell'encefalo e a livello periferico anche altri lipidi bioattivi come le N-acil-etanolammine (palmitoiletanolamina – PEA) o altri monoacilgliceroli (2-palmitoilglicerolo – 2PG) in grado di legarsi a cannabinoid-like receptor, esplicando la stessa azione dell'AEA ma con meccanismi ancora sconosciuti. L'ECs è stato trovato nei mammiferi, negli uccelli, negli anfibi, nei pesci, echinodermi e mitili e in animali primitivi provvisti di una rete nervosa come l'hydra, ma non in altri invertebrati terrestri (Bonini SA et al., 2018). È noto che nei mammiferi l'ECs eserciti un effetto neuromodulatore, infatti, il knock-out del recettore CB1R in topi causa risposte nocicettive alterate con deficit motori e alto tasso di mortalità (Zimmer A et al., 1999).

Agonisti dei recettori dei cannabinoidi e inibitori degli enzimi che ne regolano la biosintesi causano effetti antinocicettivi e potrebbero costituire una alternativa valida agli oppioidi nel trattamento del dolore infiammatorio e neuropatico. Studi clinici emergenti mostrano come la Cannabis sia in grado di alleviare il dolore in patologie nell'uomo come ad esempio il cancro, sclerosi multipla e fibromialgia, ma mancano tuttavia studi clinici sull'efficacia analgesica della pianta (Donvito G et al., 2018). Essendo l'ECs un sistema di segnalazione coinvolto in numerosi aspetti fisiopatologici è ormai chiaro che questo sistema rappresenti un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci target (Iannotti FA et al., 2016).

1.3.1 Recettori associati a proteine G: CB1R, CB2R, GPR55

CB1R, CB2R e GPR55 sono recettori che appartengono alla superfamiglia dei recettori associati a proteine G – GPCRs. Questi recettori presentano sette domini transmembrana interconnessi tra loro da tre loop intra ed extra-cellulari (**Figura 4**).

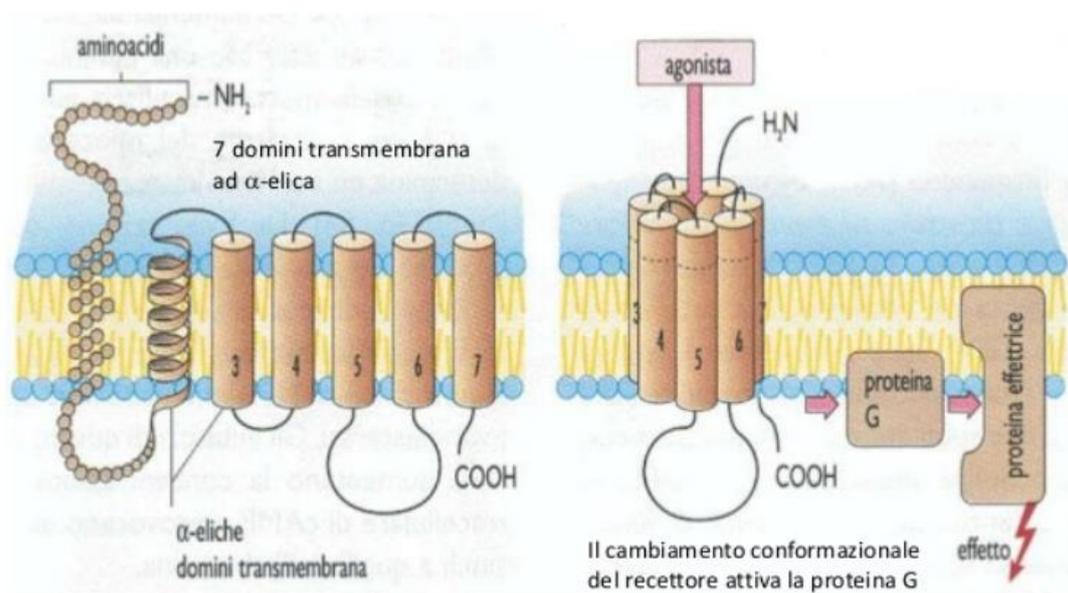


Figura 4: Rappresentazione schematica di un recettore GPCR. Il recettore è costituito da un N-terminale extracellulare, 3 anelli extracellulari, 7 domini transmembrana, 3 anelli intracellulari e un dominio C-terminale intracellulare, che è coinvolto nella trasduzione del segnale. (fonte: <https://www.google.it/imghp?hl=it&tab=wi&ogbl>)

Il CB1R e il CB2R vengono attivati tramite i ligandi principali: 1) cannabinoidi (Δ^9 -THC e con minore affinità il cannabinoide) e alcuni dei ligandi sintetici; 2) eicosanoidi con AEA e 2-AG. Sono comunque stati progettati composti sintetici in grado di legare questi due recettori e di agire come agonisti, agonisti inversi, antagonisti o modulatori del sito di legame (questi ultimi solo per il CB1) (Pertwee RG 2010).

Il CB1R è espresso principalmente in molte strutture nervose, come nei bulbi olfattori, nel cervelletto, nell'ippocampo, nei gangli basali, nella corteccia, nell'amigdala, nell'ipotalamo, nel talamo e nel tronco encefalico. Inoltre, il CB1R è il GPCR più abbondante nell'encefalo umano ed è per questo motivo che viene anche chiamato recettore cannabinoide encefalico (Turu G 2010). Nella maggior parte delle aree encefaliche il CB1R è espresso nei terminali presinaptici di neuroni glutammatergici e GABA-ergici, in strutture omo ed etero-trimeriche (Elphick MR et al., 2001). Comunque il CB1R è espresso anche a livello post-sinaptico e alcuni studi provano che questo recettore può formare eterodimeri con altri GPCRs, come ad esempio i recettori per l'adenosina A2 e per la dopamina D2. Allo stato attuale però non è completamente nota la relazione che si instaura tra i ligandi e questi recettori eterodimerici, quindi la funzione esercitata da queste strutture non è del tutto chiara (Przybyla JA e Watts WJ, 2010; Ferrè S et al., 2010; Ward RJ et al., 2011). Il CB1R comunque è stato osservato anche in cellule non neuronali dell'encefalo come ad esempio negli astrociti, dove la sua attivazione causa il rilascio di neurotrasmettitori (Stella N 2010; Oliveira de la Cruz JF et al, 2015). Una volta attivato, il recettore induce un aumento intracellulare di Ca^{2+} , che causa il rilascio di glutammato e la conseguente attivazione dei recettori presinaptici metabotropi per il glutammato (Navarrete M et al., 2010). La porzione intracellulare del CB1R è frequentemente accoppiata con proteine Gi/Go. Perciò, la stimolazione del CB1R tramite ligandi esogeni o endogeni inibisce l'attività dell'adenilato ciclasi (AC) con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di adenosina monofosfato ciclica (cAMP) o promuove l'attività della proteina chinasi mitogeno-attivata (MAPK) (Turu G 2010). Alcuni studi hanno mostrato che il CB1R in alcuni tipi cellulari può controllare l'attività della AC tramite proteine Gs o Gq, o può essere accoppiato, tramite Gi/o o Gq₁, ad altri tipi di segnale intracellulare, come la proteina chinasi B (Akt/PKB), la fosfatidilinositolo 3-

chinasi (PI3K) e nel pathway della fosfolipasi C/inositolo 1,4,5-trifosfato/proteina chinasi C (PLC β /IP3/PKC) (Navarrete M et al., 2010; Gomez del Pulgar T et al., 2000). La cascata intracellulare AC/cAMP è un meccanismo chiave nel controllo di attività che coinvolgono la funzionalità cellulare e la sopravvivenza, differenziazione, proliferazione. Inoltre, il cAMP regola l'attività di molte classi di canali ionici, come i canali per il K⁺ e il Ca²⁺ voltaggio-dipendenti, nei neuroni, l'attivazione da parte del CB1 di Gi/o può inibire l'attivazione di questi canali Ca²⁺ voltaggio-dipendenti. È quindi chiaro che il recettore per il CB1 possa controllare in generale il destino cellulare, e in particolare l'attività elettrica neuronale e il conseguente rilascio di neurotrasmettitori (Sanchez MG et al., 2003; Witkowski G et al., 2012; Pertwee RG 1997; Howlett AC et al., 2000). In particolare, è stato dimostrato che dopo la depolarizzazione neuronale, la sintesi di endocannabinoidi nei terminali postsinaptici viene rapidamente innescata, una volta sintetizzati, AEA e in particolare 2AG vanno ai terminali presinaptici e legano i recettori per il CB1, per poi essere inattivati tramite enzimi idrolitici. Perciò esiste una produzione di endocannabinoidi su richiesta che agiscono come segnale retrogrado, assieme all'attivazione da parte del CB1 dei canali voltaggio-dipendenti del K⁺ e all'inibizione dei canali Ca²⁺, controllando il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori e inibitori. Tutto questo porta ad orchestrare finemente la durata dell'attività sinaptica e conseguente la plasticità sinaptica a breve e lungo termine (Mu J et al., 1999; Wilson RI et al., 2001; Di marzo V e Petrocellis I 2012) (**Figura 5**).

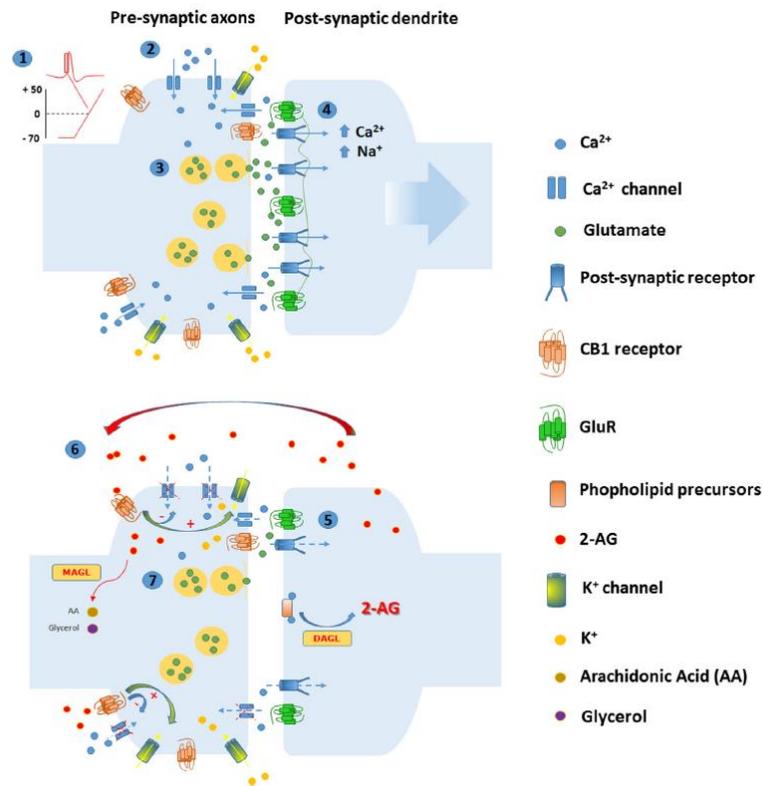


Figura 5: meccanismo di azione retrogrado del 2-AG sulle sinapsi neuronali. Dopo depolarizzazione neuronale 1) si ha il rilascio Ca^{2+} dipendente del glutammato dai terminali presinaptici 2) 3) che attiva i recettori NMDA sui terminali postsinaptici 4) creando delle correnti postsinaptiche eccitatorie. Questo cambiamento nell'eccitabilità di membrana causa l'innescio della sintesi di AEA e 2-AG 5). Il 2-AG torna in maniera retrograda ai terminali presinaptici e si lega ai recettori per il CB1, che attivano i canali K^+ e inibiscono i Ca^{2+} e questo inibisce il rilascio di neurotrasmettitori. (modificata da: Iannotti FA et al., 2016)

Il CB1R è anche espresso a livello del sistema nervoso periferico e in molti tessuti e organi nei mammiferi, come ad esempio: tratto gastrointestinale in particolare sui neuroni enterici di diversi mammiferi (Kulkarni-Narla A e Brown DR, 2000; Van Sickle et al., 2001; Coutts AA et al., 2002; Galiazzo G et al., 2018), oltre che sulle cellule enteroendocrine (EECs) e sulle cellule della lamina propria (Adami M et al., 2002; Hornby PJ e Prouty SM, 2004; Galiazzo G et al., 2018). È espresso anche a livello di diversi organi come cuore, polmoni, muscolo liscio e scheletrico, apparato riproduttivo maschile e femminile, tessuto adiposo, fegato, ossa e pelle (Parolaro D e Rubino T, 2012; Matias I e Di Marzo V, 2006; Talwar R e Potluri VK, 2011; Alger BE, 2012; Iannotti FA et al., 2013; Iannotti FA et al., 2014; Galiazzo G et al., 2018). Il ruolo cruciale di questo recettore nel mantenimento dell'omeostasi nei mammiferi è stato dimostrato usando strumenti sia di tipo farmacologico che genetici. Molti studi riportano che la perdita di CB1R sia associata a disordini che colpiscono sia a livello centrale che organi periferici (Iannotti FA et al., 2016). Il CB1R è anche responsabile degli effetti psicoattivi del Δ^9 -THC, il quale stimolando il recettore ha un ruolo nella regolazione del dolore, nelle funzioni immunitarie, nella risposta allo stress, nella regolazione energetica e nella lipogenesi (Cabral GA et al., 2015).

Il CB2R ha un'omologia del 44% con il CB1R e esattamente come quest'ultimo è collegato con subunità α di proteine Gi/o. Perciò, la sua stimolazione inibisce la AC e attiva la MAPK (Jin K et al., 2004). A differenza del CB1R i livelli del CB2R sono molto più bassi a livello encefalico, e diversi studi mostrano che la sua espressione è ristretta solamente ad alcuni tipi neuronali ed è abbondante nella microglia e negli astrociti attivati (Stella N 2010; Demuth DG e Dolleman A, 2006). L'over-espressione del CB2R nei neuroni e la conseguente attivazione da parte di agonisti causa l'inibizione di canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, infatti topi CB2R^{-/-} mostrano fenotipo tipico in risposta a stimoli di stress e al consumo di sostanze di abuso (Atwood BK e Mackie K, 2010; Onaivi ES et al., 2008a e b). Infatti, Xi e colleghi hanno dimostrato usando topi CB2R^{-/-} che la stimolazione encefalica dei recettori CB2R usando dopamina ha un ruolo chiave nei meccanismi di gratifica post assunzione di cocaina e in tutti gli effetti psicomotori (Xi ZX et al., 2011). Comunque rimane necessario approfondire il ruolo del CB2R nell'encefalo, e se effettivamente questo recettore partecipi nei meccanismi di cambiamento dell'umore resta ancora da stabilire.

Di contro, è chiaro che il CB2R sia abbondantemente espresso in cellule che appartengono al sistema immunitario come ad esempio i monociti, macrofagi e cellule B e T (Matia I e Di Marzo V, 2007; Staiano RI et al., 2015). In queste cellule il CB2 riduce il rilascio di citochine proinfiammatorie e fattori linfoangiogenici (Pertwee RG 2006; Staiano RI et al., 2015). Inoltre, i recettori per il CB2 sono presenti in altri organi periferici e tipi cellulari che hanno un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria, come milza, tonsille, timo, mastociti e cheratinociti (Galiègue S et al., 1995; Campora I et al., 2012), come anche nel tGI. Nel tGI è espresso da plasmacellule, mastociti, cellule dendritiche, linfociti, cellule epiteliali e cellule gliali enteriche (Facci L et al., 1995; Wright K et al., 2005; Wright KL et al., 2008; Duncan M et al., 2008; Svensson M et al., 2010; Ke P et al., 2016; Galiazzo G et al., 2018). Il CB2R è in grado di controllare l'attivazione e la migrazione delle cellule del sistema immunitario e per questo rappresenta un regolatore chiave delle risposte infiammatorie e nocicettive (Malan Jr JT et al., 2003; Whiteside CT et al., 2007).

Anche il GPR55 appartiene alla famiglia dei recettori associati a proteine G ed è considerato anch'esso un recettore per i cannabinoidi. Il ligando endogeno per questo recettore è il lisofosfatidilinositolo (LSI), ma il GPR55 sembra essere attivato anche dal Δ^9 -THC come anche da alcuni agonisti inversi sintetici del CB1R. La sua attività sembra essere inibita da fitocannabinoidi ad effetto non psicotropo come il CBD. Si pensa che basse concentrazioni di AEA, 2AG e PEA possono attivare questo recettore (Oka S et al., 2007; Henstridge CM et al., 2009; Sharir H et al., 2012; Pertwee RG 2006), ma a causa della variabilità tra tipi cellulari, le condizioni sperimentali e la possibile formazione di eterodimeri CB1-GPR55 non è ancora del tutto certo (Kargl J et al., 2012; Martínez-Pinilla E et al., 2014). Nell'encefalo di topo il GPR55 è espresso nello striato, ippocampo, tronco encefalico, corteccia e cervelletto, mentre nell'uomo a livello di ippocampo, di corpo striato, di ipotalamo, di cervelletto, di talamo e ponte (Yang H et al., 2016). Il GPR55 è espresso anche a livello periferico, in cellule endoteliali, ghiandole surrenali e nel tGI (Sawzdargo M et al., 1999; Ryberg E et al., 2007; Galiazzo G et al., 2018), oltre che sui linfociti, sulla milza e su numerose cellule tumorali, infatti può influenzarne la proliferazione (Henstridge CM et al., 2011; Ross RA et al., 2011). È presente anche a livello di osteoblasti e osteoclasti, dove può regolare la plasticità della massa ossea e in cellule metabolicamente attive come gli adipociti (Whyte LS et al., 2009; Moreno-

Navarrete JM et al., 2012). Comunque, l'esatta funzione di questo recettore non è ancora completamente stata chiarita, uno dei motivi è sicuramente che il fenotipo di topi GPR55^{-/-} non risulta essere particolarmente evidente. Studi recenti mostrano che l'attivazione del GPR55 potrebbe avere un ruolo esattamente opposto all'attivazione del CB1R. Nell'obesità sembra essere coinvolto in un aumento della sintesi di proteine che stimolano la lipogenesi nel tessuto adiposo viscerale (Wu CS et al., 2013). Inoltre, mentre la stimolazione farmacologica del recettore CB1R e del CB2R da parte di endocannabinoidi o cannabinoidi sintetici attenua l'aggressività di alcuni tipi di tumori come quello della pelle e linfomi, il GPR55 sembra promuovere la proliferazione delle cellule tumorali (Hu G et al., 2011). Inoltre, il GPR55 sembra avere anche un ruolo di tipo pro-infiammatorio, perché grazie alla sua interazione con il CB2R negli stati infiammatori è in grado di aumentare l'efficienza della migrazione dei neutrofili, annullandone la degranulazione e la formazione di ROS (Balenga NA et al., 2011). Il GPR55 è stato riscontrato anche nei mastociti, dove esercita un effetto anti-infiammatorio, rilasciando il fattore di crescita nervoso da parte del mastocita e attenuando l'angiogenesi (Cantarella G et al., 2011). La sua attivazione su monociti e cellule NK provoca l'aumento di citochine pro-infiammatorie, dell'attività citolitica delle NK e diminuzione dell'attività di endocitosi dei monociti (Chiurchiù V et al., 2015). Si può dire che il GPR55 abbia un ruolo fondamentale nell'immunità innata e nelle infiammazioni (Yang H et al, 2016).

1.3.2 Recettori canale che determinano variazioni transitorie di potenziale TRP: TRPV1 e TRPA1

Questi recettori sono un gruppo di proteine di membrana coinvolte nella trasduzione di un ampio numero di segnali sia chimici che fisici. Questi canali modulano l'entrata di ioni mediante trasduzione di segnali di tipo nervoso. Sono coinvolti in numerose funzioni fisiologiche come la percezione della temperatura, l'odore, il gusto e la percezione di dolore (Wu L et al., 2010; Moran M et al., 2011). I fitocannabinoidi legano tre differenti famiglie di canali TRP: TRPV (Vanilloide), TRPA (Ankirina) e TRPM (Melastatina). Questi recettori sono formati da sei eliche transmembrana, un poro catione-permeabile tra la quinta e la sesta elica, e domini C- ed N- terminali intracellulari (**Figura 6**). La differenza di queste tre famiglie di recettori sta nel numero di ripetizioni di domini-

Ankirina che si trovano all’N-terminale del recettore. I TRPA hanno un numero molto elevato di ripetizioni Ankirina mentre i TRPM mancano di questo dominio. I TRPV invece presentano un numero variabile di domini Ankirina a seconda del recettore (Morales P 2017).

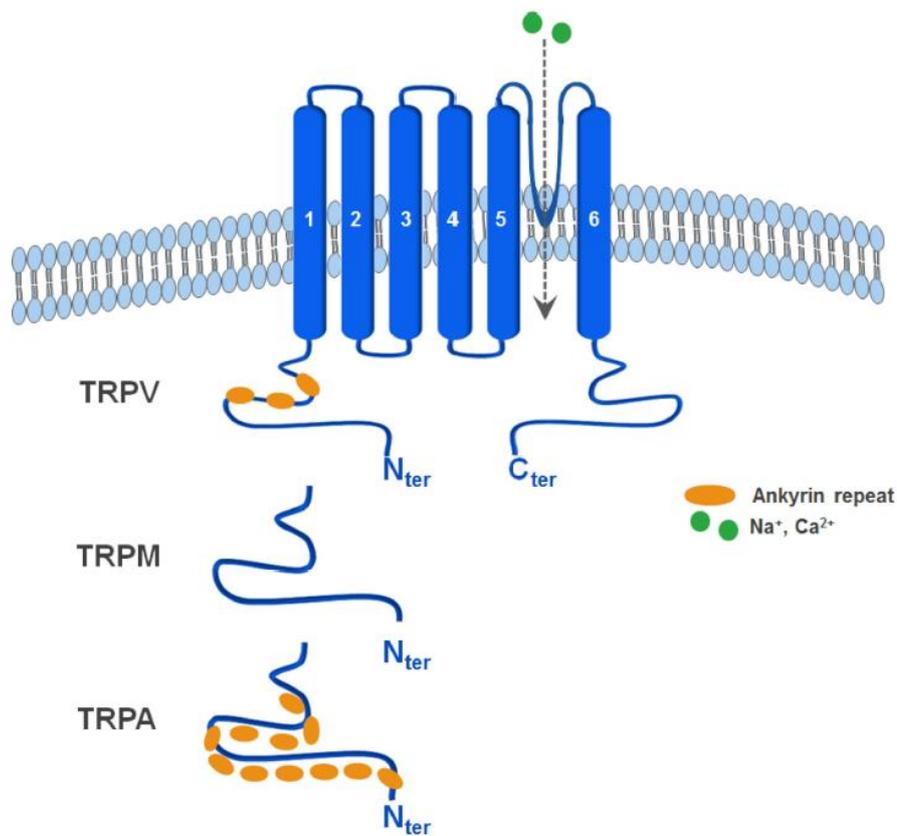


Figura 6: Struttura dei canali TRPs. (modificata da Morales P et al., 2017)

Sei tipi di canali TRP sono coinvolti nella modulazione dei fitocannabinoidi: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1. Dato il crescente numero di dati che mostrano una interazione con il sistema cannabinoide e questa famiglia di recettori viene anche chiamata recettori cannabinoide ionotropici (De Petrocellis L et al., 2008; Di Marzo V e De Petrocellis L 2010; Akopian AN et al., 2009). Perciò, questi recettori

rappresentano un potenziale target per l'uso terapeutico dei fitocannabinoidi per malattie sensoriali, infiammatorie e dermatologiche (Caterina MJ 2014).

Il recettore TRPV1 è stato clonato per la prima volta nel 1997 come recettore di un prodotto naturale, la capsaicina. I canali TRPV1 sono attivati da una pletera di ligandi chimici sia esogeni che endogeni come fitocannabinoidi, PEA, AEA e l'N-arachidonoil-dopamina (NADA). Anche stimoli meccanici e fisici come alte temperature (<43°C), basso pH e cambiamenti osmotici possono attivare questo recettore (van der Stelt M et al., 2005; Cesare P et al., 1999; Nagy I et al., 2014). La funzionalità dei recettori TRPV1 è dipendente dal legame di una proteina regolatrice che induce cambiamenti nello stato di fosforilazione. Infatti, per l'attivazione del recettore è richiesta la fosforilazione ad esempio da parte di adenosina trifosfato (ATP), proteina kinasi A (PKA), proteina kinasi C (PKC), fosfatidil-inositolo-bisfosfato (PIP2). L'attivazione del recettore TRPV1 contribuisce alla trasmissione di segnali dolorifici, infiammazione neurogenica, plasticità sinaptica, over-eccitabilità neuronale e neurotossicità (Cesare P et al., 1999; Nagy I et al., 2014). Dall'altra parte, l'aumento di Ca^{2+} indotto dall'attivazione di TRPV1 è in grado di attivare: 1) proteine come la calmodulina che stabilizzano i canali in una conformazione chiusa; 2) fosfatasi Ca^{2+} -dipendenti come la calcineurina, che defosforilano TRPV1 e lo inattivano. Questo veloce processo di inattivazione del TRPV1 è noto come desensitizzazione e si pensa che sia alla base del paradosso degli effetti analgesici, antinfiammatori ed anti-convulsivi degli agonisti del TRPV1 (Brederson JD et al., 2013; Iwaoka E et al., 2015). I recettori TRPV1 sono espressi a livello dell'encefalo e dei neuroni sensoriali (principalmente nelle radici dorsali e nel ganglio trigemino) e come già detto sono coinvolti nella percezione del dolore, della temperatura e nella percezione sensoriale in generale in condizioni patologiche e non. TRPV1 co-localizza con il recettore CB1R e con il CB2R in neuroni sensitivi e del sistema nervoso centrale. Questo recettore è espresso anche sui terminali delle fibre estrinseche primarie afferenti del tGI e in elementi immunitari della mucosa. Il plesso mienterico e le fibre nervose intergangliari sono positivi al TRPV1 (Ward SM et al., 2003). Anche i nervi che decorrono all'interno degli strati muscolari e lungo i vasi sanguigni della sottomucosa del tratto gastroenterico sono immunoreattivi (Ward SM et al., 2003, MacNaughton WK et al., 2004). Nell'intestino prossimale ci sono alcune afferenze vagali che esprimono il TRPV1 (Ward SM et al., 2003). È presente anche in cellule non neuronali e in tessuti

come i cheratinociti e il muscolo scheletrico (Edwards JG 2014; Iannotti FA et al., 2014; Nagy I et al., 2014).

TRPA1, ovvero il recettore a potenziale transiente per l'Ankirina 1, è stato clonato per la prima volta nel 1999 e costituisce l'unico membro della superfamiglia dei TRPA (Jacquemar D et al. 1999; Corey 2003). Caratteristica distintiva sono i domini di Ankirina all'N-terminale, e può presentarsi sia come recettore omo- che etero-tetrameric, fenomeno molto comune nei canali TRPs (Meents JE et al., 2018). L'espressione di questo recettore varia ampiamente in differenti studi, nelle diverse specie, in base all'età dell'animale, il tipo cellulare, le condizioni sperimentali e le tecniche utilizzate. TRPA1 è principalmente espresso nelle fibre C di piccolo diametro o nelle A δ dei gangli sensoriali, inclusi i gangli delle radici dorsali, il trigemino e i gangli nodosi (Barabas ME et al., 2012; Kobayashi K et al., 2005; Nagata K et al., 2005; Story GM et al., 2003). Nel tGI è presente nella mucosa duodenale, ileale e nel colon oltre che nelle EECs che secernono colecistochinina e serotonina, sia nell'uomo che nel topo (Nozawa K et al., 2009; Cho HJ et al., 2014). Anche i neuroni intrinseci del sistema nervoso enterico (SNE) sono positivi al TRPA1, sembra infatti che in questa sede l'attivazione da parte di agonisti esogeni inibisca contrattilità e transito dei contenuti nel colon tramite meccanismo nitrergico (Poole DP et al., 2011). Anche nei gangli del plesso mienterico nello stomaco, nel piccolo e grosso intestino si osserva positività al TRPA1. Nel duodeno l'immunoreattività al TRPA1 è stata rilevata nelle fibre nervose nella tonaca muscolare esterna (Poole DP et al., 2011). È stato identificato nell'orecchio interno del topo (Stepanyan RS et al., 2011), nelle cellule endoteliali vascolari del ratto (Earley S et al., 2009), nelle isole pancreatiche di Langerhans del topo (Cao DS et al., 2012), in tutto il sistema respiratorio (Caceres AI et al., 2009), nei cheratinociti e nei melanociti umani (Atoyán R et al., 2009), nei sinoviociti umani (Kochukov MY et al., 2006) e nei fibroblasti della polpa dentale umani (El Karim IA et al., 2011; López-González MJ et al. 2017). Il TRPA1 viene ad essere attivato tramite diversi composti chimici che si trovano nell'ambiente quotidiano e che possono indurre una sensazione pungente di bruciore. Generalmente gli agonisti di questo recettore possono essere categorizzati come elettrofili reattivi al tiolo che possono modificare il canale e un gruppo di composti non elettrofili che possono attivare il canale tramite legame non covalente. Al primo gruppo appartengono erbe e spezie e.g. l'isotiocinato e l'allicina, chimici industriali e irritanti

volatili, perossido di idrogeno, anestetici, chimici da laboratorio, ed anche attivatori endogeni dello stress ossidativo (Meents JE et al., 2018). Questi agonisti dopo il legame modificano covalentemente il recettore, e sembrano essere fondamentali tre residui di cisteina e uno di lisina per questo legame. Il secondo gruppo comprende dei composti non reattivi, che non essendo elettrofili, non sono in grado di modificare covalentemente i residui di cisteina. A questo gruppo appartengono erbe e piante, come ad esempio il mentolo, il carvacrolo, la nicotina, il Δ^9 -THC, farmaci come il cotrimazolo, nifedipina e farmaci non steroidei. Un aumento intracellulare ed extracellulare dei livelli di Ca^{2+} è in grado di attivare questo recettore e potenziarne la risposta verso gli agonisti con una conseguente prolungata inattivazione del canale. Tuttavia, il meccanismo esatto e specialmente il sito del potenziamento e dell'inattivazione del Ca^{2+} sono ancora dibattuti (Meents JE et al., 2018).

1.3.3 Recettori attivati dai proliferatori perossisomiali: PPAR α e PPAR γ

Recentemente è stata avanzata l'ipotesi di una modulazione della famiglia dei recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (PPARs) da parte dei cannabinoidi. Alcune delle risposte fisiologiche scatenate dai fitocannabinoidi sono mediate da questi recettori nucleari di ormoni, che come risultato finale controllano la trascrizione di geni target. L'attivazione di PPAR α e PPAR γ da parte dei cannabinoidi innesca risposte di tipo neuroprotettivo, antinocicettivo, antiproliferativo, antiinfiammatorio e metabolico. Perciò, si può dire che l'attività dei fitocannabinoidi su questi recettori è strettamente correlata ad una risposta potenzialmente terapeutica in patologie come ad esempio cancro, diabete, obesità e disordini cardiovascolari o neurodegenerativi (Morales P et al., 2017). Vi sono studi che mostrano che alcuni fitocannabinoidi, come ad esempio il Δ^9 -THC e il CBD, sono in grado di attivare l'attività trascrizionale dei PPARs, e questo effetto può essere bloccato tramite antagonisti di questi recettori. Comunque, il meccanismo di innesco di questa attività trascrizionale resta ancora da comprendere a pieno (O'Sullivan SE 2016, O'Sullivan SE 2013). Comunque, è stato recentemente proposto come meccanismo d'azione un legame diretto (Sun Y et al., 2006; Ambrosio ALB et al., 2007). I PPARs hanno una struttura secondaria estesa composta da 13 alfa eliche-transmembrana

e un foglietto beta. A livello cristallografico è evidente che i cannabinoidi non occupano completamente la tasca di legame sul recettore, e questo potrebbe spiegare il basso grado di attivazione dei recettori PPARs in seguito ad esposizione a questo tipo di molecole. Tra i meccanismi di attivazione del PPAR da parte dei cannabinoidi vi sono, oltre al legame diretto, l'attivazione di questi recettori nucleari da parte di un metabolita; il trasporto all'interno del nucleo del cannabinoide tramite proteina legante gli acidi grassi (FABPs); la stimolazione di un recettore CB1R/CB2R che a sua volta innesca un pathway intracellulare che porta all'attivazione dei PPARs (**Figura 7**).

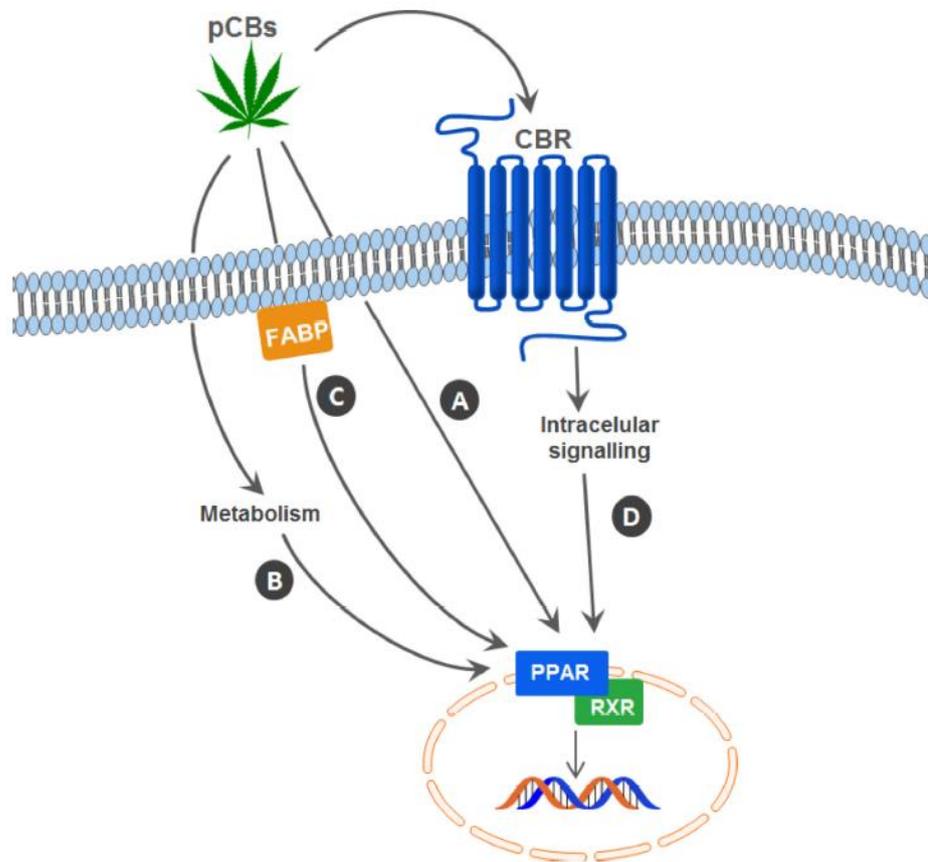


Figura 7: meccanismo d'azione proposto come modello di interazione PPARs-cannabinoidi. A) legame diretto del fitocannabinoide al recettore nucleare B) possibile conversione del fitocannabinoide in un metabolita che attiva il PPAR C) Trasporto del fitocannabinoide tramite cofattore FABP D) possibile stimolazione di un recettore di membrana CBR1/CBR2 che a sua volta scatena un pathway intracellulare che porta all'attivazione dei PPAR nucleari (modificata da: Morales P et al., 2016)

I recettori PPARs formano eterodimeri con il recettore intracellulare X per i retinoidi e, dopo attivazione, possono interagire con cofattori specifici che innescano la trascrizione genica (Burstein S, 2005) (**Figura 8**).

L'effetto dei fitocannabinoidi sui recettori PPARs potrebbe essere il risultato di una combinazione di questi meccanismi d'azione in base al tipo cellulare e al livello di espressione di questi pathway. Effettivamente resta da chiarire se diverse isoforme di

PPARs prediligano un determinato meccanismo di attivazione dei fattori di trascrizione o se l'attivazione selettiva dipenda dal fitocannabinoide (Morales P et al., 2017).

Il PPAR α è espresso principalmente a livello di fegato, cuore, muscolo e tessuto adiposo. Perciò, l'attivazione di questo recettore da parte dei cannabinoidi a livello centrale innesca meccanismi legati alla memoria, ricompensa, metabolismo lipidico e assunzione di cibo. Questo recettore risulta essere localizzato sugli enterociti in intestino tenue e neuroni del plesso mienterico e sottomucoso del tGI di ratto (Cluny NL et al., 2009), sulla glia del plesso mienterico di cane (Galiazzo G et al., 2018) e sulle fibre vagali afferenti del tGI (Izzo e Sharkey, 2010).

Il PPAR γ è principalmente espresso nel cuore, muscolo, colon, reni, pancreas e milza. Questo fattore di trascrizione risulta essere implicato principalmente nella regolazione delle riserve di acidi grassi, nel metabolismo del glucosio, nella crescita e differenziazione cellulare. L'attivazione di questo recettore da parte dei cannabinoidi induce effetti apoptotici (Burnstein S, 2005). Il Δ^9 -THC e il CBD e anche cannabinoidi sintetici come il CBD sono in grado di legare questo recettore e di innescare i meccanismi di trascrizione e questi effetti vengono ad essere inibiti attraverso antagonisti del recettore. Questo recettore risulta essere fondamentale nelle risposte di tipo infiammatorio. Recenti studi hanno mostrato che il cannabinoide sintetico acido aiulemico (AJA) lega il recettore PPAR γ su uno specifico dominio di legame idrofobico (**Figura 8**) regolando processi cellulari sopra citati. Si suppone che l'attivazione del recettore da parte di ligandi endogeni come ad esempio gli eicosanoidi possa indurre un'attivazione indiretta dei meccanismi di trasduzione attivati dall'AJA, stimolando la cascata dell'acido arachidonico portando ad un aumento della sintesi di prostaglandine (Burnstein S, 2005).

1.3.4 Recettori per la serotonina (5-HT)

La serotonina, o 5-idrossitriptamina, è un neurotrasmettitore cruciale nella regolazione di differenti funzioni a livello di sistema nervoso centrale, periferico e sistema nervoso enterico. Circa il 95% della sintesi della serotonina avviene a livello delle EECs localizzate nel tGI e una minore quantità viene sintetizzata a livello dei neuroni del plesso mienterico (Gershon MD e Liu MT, 2008; Spiller R 2008; Denes V et al., 2009; Keating

DJ et al., 2013). L'importanza di questa molecola nella fisiologia del tGI è dovuta alla sua duplice azione come messaggero della mucosa e neurotrasmettitore. Stimoli chimici e meccanici nel lume del tGI inducono il rilascio da parte delle EECs di serotonina a livello della lamina propria, che va a legarsi a specifici recettori posti su proiezioni di neuroni afferenti estrinseci primari (IPANs), che inducono la trasmissione di segnali di nausea, vomito e dolore a livello del sistema nervoso centrale. La serotonina perciò ha un effetto diretto sull'innervazione intramurale, infatti, i neuroni del tGI (sia IPANs che neuroni del plesso mienterico) rispondono in presenza di serotonina iniziando riflessi peristaltici e secretori. Inoltre, la serotonina prodotta dai neuroni del plesso mienterico è coinvolta nella regolazione dei *pattern* motori del tGI controllando la neurotrasmissione lenta e veloce (Giancola F et al., 2017). I recettori per la serotonina sono classificati in sette famiglie all'interno delle quali sono presenti altri sottotipi di recettori, sei di queste famiglie sono rappresentate da recettori associati a proteina G, solo la famiglia 5-HT₃ sono recettori associati a canali ionici, localizzati principalmente nel tratto gastroenterico (Katzung BG 2007). I recettori responsabili del controllo della peristalsi sono però i 5-HT₂, presenti lungo tutta la muscolatura liscia (circolare e longitudinale) del tGI. I recettori 5-HT_{1d} e 5-HT₄ controllano invece attività del sistema nervoso enterico (Katzung BG 2007; Giancola G et al., 2017). Su questi recettori agiscono i fitocannabinoidi in particolare il Δ^9 -THC agisce come antagonista del recettore della serotonina 5HT_{3A} (Barann M et al., 2002), mentre i suoi effetti sulla memoria, ansiolitici e sull'interazione sociale sono dovuti al suo legame con il recettore 5-HT_{2A} (Viñals X et al., 2015). Il CBD, il Δ^9 -THCV agiscono sul recettore 5-HT_{1A} attivandolo (Russo EB et al., 2005; Cascio MG *et al.*, 2010; Cascio MG *et al.*, 2015). Esiste uno studio che mostra che il CBD, legandosi al suo recettore per la serotonina a livello del grigio periacqueduttale agisce come ansiolitico (Campos AC e Guimarães FS, 2008). La co-localizzazione tra i recettori 5-HT_{3a} e CB_{1R} a livello di corteccia, dell'ippocampo e dell'amigdala in presenza del neurotrasmettitore GABA, fa pensare ad un possibile interazione tra il sistema cannabinoide e quello serotoninergico a livello della neurotrasmissione del GABA nelle aree del cervello coinvolte nella cognizione, nella memoria e nell'emozione (Morales M et al., 2004).

1.4 I Fitocannabinoidi

Allo stato attuale sono stati identificati 538 composti naturali derivanti dalla *C. sativa*, di questi, circa 100 prendono il nome di fitocannabinoidi perché condividono con quest'ultima la struttura chimica. Dal punto di vista chimico i fitocannabinoidi hanno una struttura lipidica collegata a frazioni di alchilresorcinolo e monoterpeni (Hanus LE et al., 2014; Hill AJ et al., 2013) (**Figura 9**).

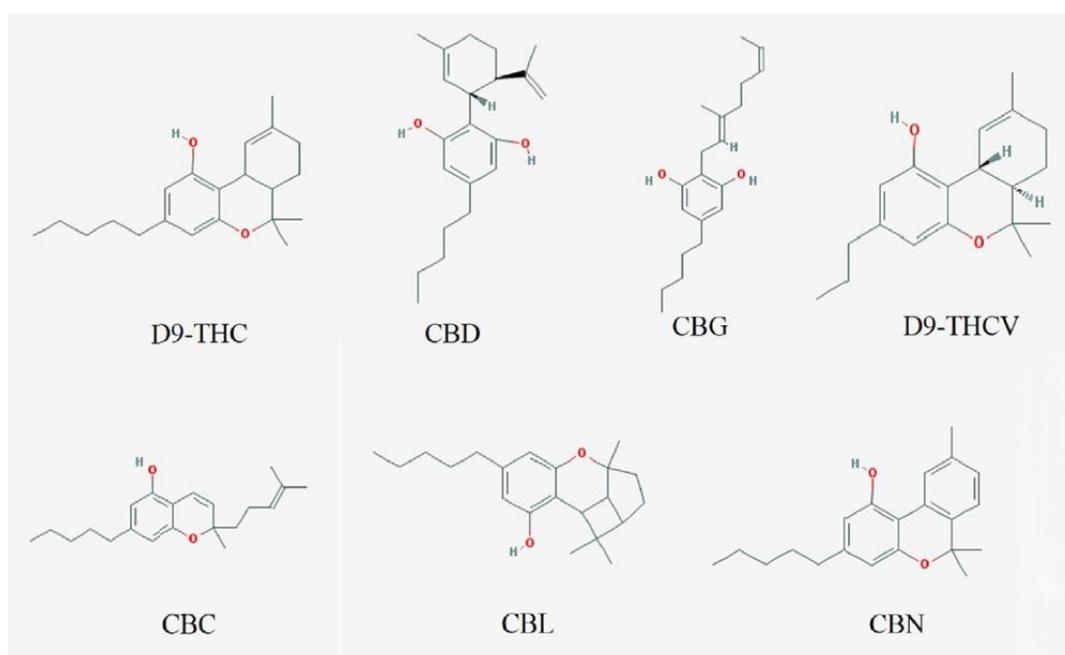


Figura 9: struttura chimica dei principali fitocannabinoidi. (modificata da Morales P et al., 2017)

I fitocannabinoidi sono presenti principalmente nella resina rilasciata dai tricomi delle piante femmine, mentre le foglie di *C. sativa* delle piante maschio hanno pochi tricomi ghiandolari che producono piccole quantità di molecole psicoattive. I fitocannabinoidi sono classificati come neutri (senza gruppo carbossibile), e acidi (con gruppo carbossibile). Nella *C. sativa*, tutti i cannabinoidi sono biosintetizzati e accumulati come cannabinoidi acidi e successivamente decarbossilati nella forma neutra (Hanus LO et al., 2016). I fitocannabinoidi mostrano diverse affinità per i recettori CB1R, CB2R, GPR55, e altri

ben noti GPCRs (oppioidi e serotoninergici), recettori nucleari, canali ionici ligando-dipendenti o canali TRP (Morales P et al., 2017).

Studi clinici hanno dimostrato che alcuni effetti dei cannabinoidi possono essere terapeuticamente utili. L'uso medico negli Stati Uniti è consentito ed è attualmente sfruttato per il trattamento di diversi disturbi tra cui il cancro, l'HIV/AIDS e le patologie autoimmuni, per il trattamento del dolore, della nausea e del vomito (Greydanus DE et al., 2013, Malfitano AM et al., 2014). Di seguito sono elencati alcuni dei principali fitocannabinoidi con le loro caratteristiche:

- Cannabigerolo (CBG) questo fitocannabinoide ha una struttura chimica eterogenea e non produce effetti psicoattivi mediante legame con il recettore CB1R (Izzo AA et al., 2009). Dall'altra parte sembra che estratti di *C. sativa* con grandi concentrazioni di CBG senza Δ^9 -THC causino un aumento del consumo di cibo da parte di ratti (Brierly DI et al., 2017). Il CBG mostra una scarsa affinità di legame per il recettore 5-HT_{1a}, inoltre, è un agonista di recettori α -adrenergici in grado di inibire il rilascio di catecolamine, causando una sensazione di sedazione, rilassamento muscolare e analgesia (Cascio MG et al., 2010). Il CBG inoltre diminuisce nell'uomo le contrazioni acetilcolina-dipendenti della vescica, indipendentemente dalla presenza di antagonisti del recettore CB1R e CB2R. (Pagano E et al., 2015). Smeriglio e colleghi hanno osservato che estratti di *C. sativa* contenenti CBG inibiscono l'attività dell'aldoso reduttasi e potrebbero essere utili per la prevenzione e terapia di complicazioni da diabete (Smeriglio A et al., 2018).
- Cannabicromene (CBC) da un punto di vista strutturale rappresenta il fitocannabinoide con la struttura più stabile. La quantità di CBC è strettamente correlata alla quantità di Δ^9 -THC, suggerendo una relazione chimica tra le ossidasi coinvolte nella formazione di questi due composti a partire dal precursore comune CBG (Izzo AA et al., 2009). Il CBC non mostra capacità psicoattive mediate dal recettore CB1R, ma è un potente attivatore del recettore TRPA1 negli stati infiammatori. CBC sembra ridurre l'ossido nitrico (NO), l'IL-10 e l'interferone- γ nei macrofagi peritoneali attivati tramite LPS (Romano B et al., 2013). La capacità di ridurre i livelli di NO conferisce al CBC effetti curativi sulla

famiglia di malattie note come inflammatory bowel diseases (sindrome dell'intestino irritabile). Infine, sembra che il CBC potenzi l'attività delle cellule staminali neurali nell'encefalo di uomo adulto. In particolare, CBC influenza positivamente la vitalità delle cellule staminali nestina-positiva nel differenziamento delle cellule neurali staminali pluripotenti, aumentando la fosforilazione di ERK tramite i recettori A1 per l'adenosina (Shinjko N e Di Marzo V, 2013).

- Cannabidiolo (CBD) è uno dei fitocannabinoidi più abbondanti nelle specie di Cannabis ad uso tessile (Izzo AA et al., 2009). Nonostante la struttura molto simile al Δ^9 -THC, il CBD ha una bassa affinità di legame per i recettori dei cannabinoidi. È considerato un modulatore negativo allosterico dei recettori CB1R e CB2R (Pertwee RG 2008). In ambiente acido il CBD può essere ciclizzato a Δ^9 -THC. Questo aspetto spiega la produzione di Δ^9 -THC in sigarette contenenti tabacco e CBD. Studi recenti mostrano che il CBD ha effetti terapeutici agendo sui recettori per l'adenosina, della glicina, degli oppioidi, della serotonina, su GPCRs non endocannabinoidi, recettori per l'acetilcolina nicotinici, PPARs (Ibeas Bth C et al., 2015). Il CBD ha effetti anticonvulsivanti, ansiolitici, anti-nausea, anti-artrite reumatoide e proprietà neuroprotettive (Pertwee RG 2008).
- Delta 9 – tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) è il componente chiave della C. sativa con maggiori effetti psicoattivi. I principali precursori del Δ^9 -THC, senza effetti psicoattivi, sono Δ^9 -THC acido A e B. Alcuni degli stereoisomeri, prodotti di degradazione o prodotti generati enzimaticamente sono i minori costituenti di questa classe di cannabinoidi. Questo è dovuto al fatto che Δ^9 -THC estratto o purificato dalla C. sativa ha la consistenza di una gomma amorfa che vira rapidamente di colore in seguito all'estrazione (Hanus LE et al., 2016). Tra i metaboliti più stabili vi sono il Δ^8 -Tetraidrocannabinolo, derivante dall'isomerizzazione acida del Δ^9 -THC. Il cis- Δ^9 -THC rappresenta un artefatto chimico, il Δ^6 a e il Δ^{10} -Tetraidrocannabinolo sono sintetizzati tramite l'aromatizzazione ossidativa del Δ^9 -THC (Hanus LO et al., 2016). Dal punto di vista farmacologico il Δ^9 -THC è un agonista parziale sia del CB1R che del CB2R: sul CB1R modula effetti psicoattivi; sul CB2R modula effetti immunologici e anti-infiammatori. Gli effetti psicoattivi del Δ^9 -THC includono ansia, paranoia,

alterazioni perpetue e deficit cognitivi. Tutti questi effetti sono innescati dal legame del Δ^9 -THC al recettore CB1R, che porta ad una alterazione della neurotrasmissione GABA/glutammatergica e del rilascio di dopamina, ma tutti gli effetti sopra citati solitamente rappresentano fenomeni acuti e limitati nel tempo. È stata osservata inoltre tossicità acuta al Δ^9 -THC in un modello murino. Infine, dopo somministrazione di Δ^9 -THC, sono stati osservati sempre in modelli murini deficit locomotori, ipotermia, analgesia, catalessi e aumento del food intake (Pertwee RG 2008). Non è ancora del tutto chiaro se questa sostanza sia in grado di modulare l'attività del recettore GPR55, ma è un forte agonista del PPAR α , attraverso il quale esercita degli effetti antitumorali (Vara D et al., 2013; Morales P et al., 2017). È agonista del (Qin N et al., 2008).

- Δ^9 -Cannabivarina (Δ^9 -THCV) fa sempre parte della famiglia THC ma è stata identificata principalmente nell'hashish, prodotto in Pakistan dalla C. sativa (Tayyab M and Shahwar D, 2015). Questa molecola è considerata antagonista del recettore CB1 a basse dosi (< 3 mg/kg) inibendo l'aumento del food intake in topi a cui è stato somministrato Δ^9 -THC. Al contrario, alte dosi di questa molecola (> 10 mg/kg) hanno effetto agonista, agendo in sinergia al Δ^9 -THC. (Pertwee RG 2008). Infine, Δ^9 -THCV può attivare i recettori CB2 (Bolognini B et al., 2010) e inisce a livello dei macrofagi la produzione di ossido nitrico LPS-indotta (Romano B et al., 2016).
- Cannabiciclolo (CBL) è un composto racemico di fitocannabinoidi che si forma a partire dalla C. sativa in presenza di luce ma non sono ancora chiare le proprietà biologiche (Hanus LO et al., 2016).
- Cannabinolo (CBN) la quantità di CBN nella C. sativa dipende dall'età della pianta e dallo stato di conservazione. È un composto molto stabile che non viene ad essere particolarmente intaccato dalla degradazione ossidativa. Molti dei composti liberati dall'ossidazione del CBN sono gli stessi che si ottengono dall'ossidazione del Δ^9 -THC. Il CBN ha bassa affinità per i recettori CB1R e CB2R (Hanus LO et al., 2016).

1.5 Gli Endocannabinoidi

La scoperta dei recettori CB1R e CB2R ha fatto sì che venissero avanzate ipotesi sull'esistenza di ligandi endogeni per queste molecole, successivamente chiamati endocannabinoidi. Fu così che nel 1992 fu isolato dal cervello di maiale il primo ligando endogeno in grado di attivare entrambi i recettori, soprannominato N-arachidonoil-etanolamina (AEA), successivamente poi rinominato anandamide (AEA) dal Sanscrito ananda, che significa beatitudine (Devane WA et al., 1992). Tre anni dopo, è stato isolato dal tGI di cane un secondo ligando in grado di interagire con entrambi i recettori, il 2-arachidonoil-glicerolo (2AG), che solo successivamente si scoprì essere un intermedio comune del metabolismo dei fosfolipidi e trigliceridi (Mechoulam R et al., 1995; Sugiura T et al., 1995). Nonostante queste molecole siano dei neurotrasmettitori questi non vengono accumulati in vescicole perchè essendo lipidi potrebbero attraversare senza problemi la membrana, quindi queste molecole vengono sintetizzate al bisogno, on demand (Meyer JS e Quenzer LF, 2010). Solamente le cellule microgliali sono in grado di secernere endocannabinoidi accumulati all'interno di esosomi (Parolaro D e Rubino T, 2012). Gli endocannabinoidi e il sistema endocannabinoide esteso (cannabinoidome) possono essere raggruppati in: a) i due principali endocannabinoidi a base di arachidonato, AEA e 2AG, e altri ligandi endogeni dei recettori CB1R e CB2R, come il 2-arachidonoil-44 gliceril-etero o noladin-etero (2-AGE), l'O-arachidonoyl-etanolamina (virodamina), il NADA e l'oleamide (OA); b) i GPCRs, come il CB1R, CB2R e GPR55, e anche altri target per gli endocannabinoidi, come i recettori appartenenti ai TRPs e PPARs; c) enzimi coinvolti nella biosintesi e degradazione degli endocannabinoidi (Iannotti FA et al., 2016). Anche la N-oleiletanolamina (OEA) e la PEA fanno parte di questo sistema di endocannabinoidi. Sebbene queste due molecole manchino di forte affinità per i recettori CB1R e CB2R, queste vengono sintetizzate dalla stessa classe di enzimi coinvolti nella sintesi di AEA. Sono stati scoperti recentemente anche alcuni mediatori lipidici appartenenti al sistema endocannabinoide, ad esempio a) i lipoaminoacidi, una via di mezzo tra acidi grassi e alcuni aminoacidi (rispettivamente glicina e serina); b) metaboliti derivanti dall'ossidazione di 2AG e AEA mediata dalla cicloossigenasi-2 (COX-2) chiamati prostaglandina-etanolamidi (o prostamidi) e diversi

esteri delle gliceril-prostaglandine; 3) l’N-acil-dopamina e l’N-acil-serotonina (Iannotti FA et al., 2016).

1.5.1 Anandamide e 2-arachidonoil-glicerolo

Queste due molecole sono considerate i maggiori endocannabinoidi poiché sono le uniche per cui è perfettamente noto sia il metabolismo che la farmacologia. La biosintesi dell’AEA, come quella delle N-acetil-etanolamine a lunga catena, avviene almeno in 3 modalità: a) attraverso l’idrolisi della N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamina (NArPE) tramite l’azione della fosfolipasi NAPE-PLD; b) in tre passaggi che comprendono la deacilazione della NArPE ad opera della ABHD4 e l’idrolisi della glicerofosfoetanolamina tramite l’enzima GDE1; c) in due passaggi, tramite idrolisi mediata dal PLC del NArPE che porta ad avere la fosfo-anandamide, che può desfosforilare ad AEA tramite la fosfatasi PTPN22 (Di Marzo V, 2011). Recenti studi suggeriscono che la via scelta di sintesi dipende dalla disponibilità di precursori in quel momento nel determinato tessuto/tipo cellulare (Muccioli GG 2010). Il 2AG invece viene sintetizzato dall’idrolisi del 2-arachidonoil-glicerolo (DAG) da due idrolasi la DAGL α e β . Topi knock-out per una delle due idrolasi mostrano che l’isoforma α è più importante della β per la sintesi di 2AG a livello encefalico, a livello periferico invece sembra essere più importante l’isoforma β (Bisogno T et al., 2003; Gao Y et al., 2010; Tanimura A et al., 2010) (**Figura 10**).

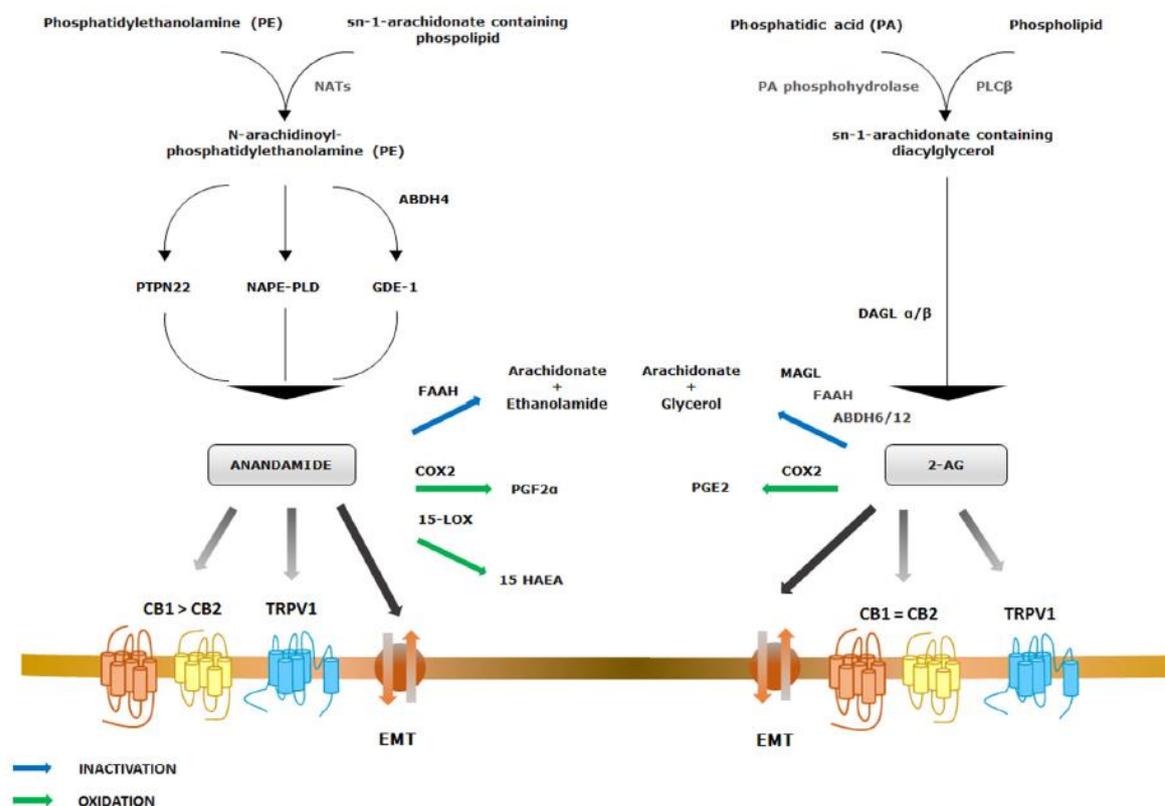


Figura 10: sintesi, inattivazione e ossidazione di AEA e 2-AG. Le frecce più spesse mettono in evidenza le reazioni che dal precursore di membrana portano alla formazione di AEA e 2-AG.

Abbreviazioni: ABDH6 / 12: αβ-idrolasi 4/6/12; CB 1/2: recettore dei cannabinoidi 1/2; COX2: cicloossigenasi 2; DAG: diacilglicerolo; EMT: trasportatore di membrana endocannabinoide; FAAH: acido grasso ammidici idrolasi; GDE1: glicerofosfodiesterasi 1; MAGL: monoacilglicerolo lipasi; NAPE-PLD: N-acil-fosfatidiletanolamina-fosfolipasi D specifica; NAT: N-aciltransferasi; PA: acido fosfatidico; PLCβ: fosfolipasi Cβ; PLD: fosfolipasi D; 15-LOX: 15-lipossigenasi; PTPN22: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22; PGF2α: prostaglandina F2α-etanolammide; 15 HAEA: 15(S)-HETE Etanolammide; PGE2: Prostaglandina E2; TRPV1: transient receptor potential vanilloid type 1. (Modificata da: Iannotti FA et al., 2016)

L'idrolisi di AEA e 2-AG avviene principalmente tramite le due serina idrolasi FAAH e MAGL rispettivamente. Il ruolo cruciale di queste due idrolasi nella degradazione di AEA e 2-AG è stato confermato in diversi studi in cui sono stati utilizzati inibitori selettivi di FAAH e MAGL o topi knock-out per questi due enzimi (Ueda N 2002; Iannotti FA et al., 2016). Negli ultimi anni sono stati studiati diversi inibitori della FAAH e della MAGL che mostrano effetti benefici nel trattamento del dolore, dell'infiammazione,

dell'analgesia, del cancro e disturbi del sonno (Lichtman AH et al., 2004; Mor H et al., 2004; Ghosh S et al., 2013). Nonostante siano ben noti i meccanismi di sintesi e degradazione di queste due molecole, non è ancora chiaro come queste si spostino attraverso la membrana plasmatica. Per l'AEA è stato proposto: a) un meccanismo di diffusione semplice seguito da idrolisi intracellulare di AEA ad opera della FAAH o legame con intracellular binding protein a livello del citoplasma; b) trasporto attraverso specifiche proteine carrier che può coinvolgere anche il 2AG. L'ipotesi più accreditata allo stato attuale è che esistano specifici endocannabinoid membrane transporters (EMT) in grado di mediare il trasporto degli endocannabinoidi attraverso la membrana plasmatica (Nicolussi S e Gertsch J 2015). AEA e 2AG sono entrambi agonisti di CB1R e CB2R, ma il 2AG ha meno affinità per questi recettori nell'uomo (Pertwee RG et al., 2010; Steffens M et al., 2005). AEA ma non 2AG attiva il TRPV1 ed entrambi sono ligandi di PPAR α (Bouaboula M et al., 2005; Rockwell CE et al., 2006). Infine, entrambi attivano il GPR55 che risulta essere implicato in diversi processi biologici (Malfitano AM et al., 2014).

1.5.2 Palmitoiletanolamide (PEA)

La PEA come gli altri endocannabinoidi è un lipide bioattivo endogeno, più specificatamente, è l'etanamide dell'acido palmitico, che viene prodotta on demand dal doppio strato fosfolipidico delle membrane, considerata dal 1950 importantissima in molti processi anti-infiammatori, attività analgesiche e neuroprotettive (Aloe L et al., 1993; Re G et al., 2007; Esposito E e Cuzzocrea S 2013a; Mattace Raso G et al., 2014; Esposito E e Cuzzocrea S 2013b). Inizialmente fu considerata un composto di origini naturali: si osservarono potenti effetti anti-infiammatori e anti-allergici in bambini alimentati con dieta arricchita di germogli di soia, tuorlo d'uovo e arachidi, per cui la PEA venne isolata dalla frazione lipidica di questi alimenti (Coburn AF et al., 1954). Successivamente la PEA è stata definita un mediatore endogeno in quanto venne identificata in molti tipi cellulari, tessuti e liquidi corporei sia negli animali che nell'uomo. In particolare, a livello periferico la PEA è prodotta dal fegato e dal muscolo, dal cuore, dalla pelle, dal midollo spinale, dal tGI, dagli occhi, dal tessuto adiposo subcutaneo e dal sangue. La PEA è abbondante anche a livello encefalico, in particolare

nei neuroni, astrociti e microglia. La PEA può essere classificata nel gruppo delle endocannabinoid – like - molecules, perché, sebbene appartenga alla stessa classe dell'AEA condividendo lo stesso pathway metabolico, il suo meccanismo d'azione è in parte differente (Iannotti FA et al., 2016). La PEA viene sintetizzata a partire da precursori fosfolipidici, le N-palmitoil-fosfatidil-etanolamine (NAPE) tramite l'azione catalitica della fosfolipasi NAPE-PLD e inattivata tramite due differenti enzimi idrolitici: a) l'idrolasi FAAH b) l'idrolasi NAAA, che metabolizzano la PEA ad acido palmitico ed etanolamina. La PEA è prodotta dalle cellule di mammifero e durante le condizioni patologiche la sua quantità a livello tissutale risulta essere alterata, in particolare in presenza di stati infiammatori e di dolore (Re G et al., 2007). Perciò, la presenza di un enzima specifico per la sua inattivazione, l'NAAA, espresso nei macrofagi polmonari e in svariati tessuti di ratto, encefalo incluso, può permettere lo sviluppo di inibitori selettivi per questa idrolasi che possono portare quindi ad un aumento di PEA a livello tissutale, innescando così fenomeni anti-infiammatori e analgesici (Tsuboi K et al., 2005; Tsuboi K et al., 2007) (**Figura 11**).

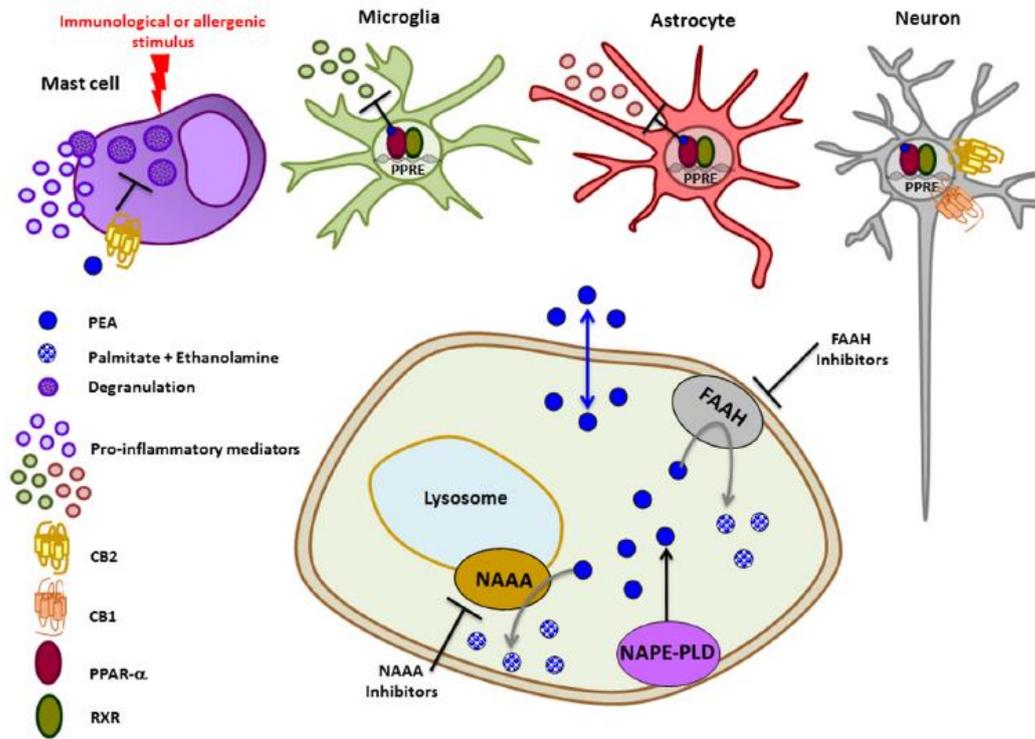


Figura 11: Biosintesi, degradazione e bersagli cellulari della PEA. Abbreviazioni: PEA: palmitoiletanolamide; CB 1/2: recettore dei cannabinoidi 1/2; PPAR α : nuclear peroxisome proliferator-activated receptor alpha; RXR: recettore retinoide X; PPRE: response element; FAAH: acido grasso amide idrolasi; NAPE-PLD: N-acil-fosfatidiletanolamina-fosfolipasi D specifica; NAAA: N-acyl ethanolamine acid amidase. (modificato da Iannotti FA et al., 2016)

La PEA a livello neuronale ha effetto neuroprotettivo tramite recettore PPAR α (Esposito E et al., 2012), e degli effetti antiepilettici e anti-convulsivanti attraverso attivazione indiretta dei recettori CB1R e CB2R (Citraro R et al., 2013; Aghaei I et al., 2015). La PEA tramite meccanismi definiti entourage effect, con inibizione dell'idrolasi FAAH, enzima responsabile della degradazione dell'AEA, o attraverso la stimolazione dell'espressione della DAGL, enzima responsabile della biosintesi dell'endocannabinoide 2AG, può indirettamente attivare i recettori CB2R, CB1R e TRPV1 (Petrosino S et al., 2015; Zygmunt PM et al., 2013). Allo stesso modo, la PEA può anche aumentare l'attivazione/desensitizzazione di TRPV1 indotte da AEA e 2AG (Petrosino S et al., 2015). Tramite i recettori PPAR α la PEA può inoltre attivare

direttamente i recettori TRPV1 e il CB2 (Petrosino S e Di Marzo V, 2016) e attivare indirettamente il recettore GPR55 (Ryberg E et al., 2007; Godlewski G et al., 2009).

1.6 Cannabinoidi Sintetici

I benefici legati all'uso di endocannabinoidi e fitocannabinoidi hanno portato allo sviluppo di composti sintetici selettivi per determinati recettori. I cannabinoidi sintetici hanno un miglior potenziale farmacoterapeutico e una limitata tossicità rispetto agli altri composti. Queste molecole non sono altro che agonisti e antagonisti dei recettori per i cannabinoidi oppure sono in grado di aumentare la sintesi o ridurre il reuptake e la degradazione dei cannabinoidi. In base alla loro struttura chimica possono essere classificati in cannabinoidi classici, cannabinoidi non classici, aminoalchilindoli e eicosanoidi (Pertwee RG 2006). I cannabinoidi classici comprendono i derivati tricyclici del dibenzopirano, questo gruppo include composti che sono presenti naturalmente nella cannabis sativa o analoghi sintetici come ad esempio l'11-diidrossi- Δ^8 -THC-dimetileptile (HU-210), un composto sintetico che mostra massima affinità e efficacia sul recettore CB1 (Pertwee RG 2006; Mechoulam R et al., 1988; Howlett AC et al., 1990). I cannabinoidi non classici comprendono analoghi biciclici e tricyclici del THC che mancano dell'anello di diidropirano. Il composto più rappresentativo di questo gruppo è rappresentato dal CP-55940, un potente agonista completo sia del recettore CB1R che del CB2R (Pertwee RG 2006; Mechoulam R et al., 1998; Thomas BF et al., 1988; Fouda HG et al., 1987). Gli aminoalchilindoli rappresentano un gruppo di agonisti del recettore con struttura marcatamente differente dai cannabinoidi classici e non classici, si tratta di sostanze con attività mimetica, ovvero, sebbene con struttura diversa, sono in grado di comportarsi sui relativi recettori esattamente come i ligandi cannabinoidi (Pertwee RG 2006; Pacheco M et al., 1991). Il composto più rappresentativo è l'R-(+)-WIN-55,212-2, completo agonista sia del CB1R che del CB2R, anche se in alcuni studi è stato dimostrato che ha maggiore affinità per il CB2R (Pertwee RG 2006). Tra gli eicosanoidi gli endocannabinoidi più rappresentativi sono la AEA e il 2AG. Gli eicosanoidi sintetici

maggiormente noti si basano sulla struttura della AEA, sono agonisti del CB1R e prendono il nome di R(+)-metanandamide e arachidonil-2'-cloroetilamide (ACEA) (Pertwee RG 2006; Hillard CJ et al., 1999). Cambiamenti nella struttura del THC portano alla sintesi di agonisti selettivi per il CB2R, come l'HU-308, un cannabinoide non classico molto utilizzato come strumento farmacologico; JWH-133, un cannabinoide classico e JWH-015 e AM124, due amino-alchilindoli (Pertwee RG 2006; Hanus L et al., 1999; Howlett AC 2002). È stata recentemente descritta una serie di composti che includono diaril-etere sulfonil-esteri e pirroli con proprietà neuroprotettive (Tarzia G et al., 2003), naptiridina e derivati dei chinoli con proprietà immuno-modulatorie (Malfitano AM et al., 2013a; Malfitano AM et al., 2013b). Gli agonisti sintetici più utilizzati e studiati sono l'SR144528 e l'AM639. Questi due cannabinoidi hanno affinità maggiore per il recettore CB2R e bloccano l'attivazione del recettore da parte di agonisti in maniera competitiva (Ross RA et al., 1999; Rinaldi-Carmona L et al., 1998; Malfitano AM et al., 2014). Di recente il Cesamet® (Nabilone), analogo del Δ^9 -THC è stato approvato dall'FDA nel trattamento di nausea e vomito in chemioterapia; il Sativex® è uno spray da applicare a livello sublinguale, contenente Δ^9 -THC e CBD, che allevia spasticità nei pazienti con SLA infine, Δ^9 -THC e Dronabinolo vengono usati per stimolare l'appetito nei pazienti con AIDS (Ware MA et al., 2008; Dejesus E et al., 2007; Syed YY et al., 2014).

1.7 Anatomia Microscopica del tGI

L'apparato gastroenterico risulta costituito da una tonaca mucosa, tonaca sottomucosa, tonaca muscolare e tonaca sierosa/avventizia. La tonaca sierosa prende il nome di avventizia laddove non è coperta da mesotelio. Di seguito una breve descrizione delle differenti tonache:

- la tonaca mucosa costituisce il rivestimento più interno ed è formata da epitelio, lamina propria e *muscularis mucosae*. L'epitelio svolge il compito di assorbire l'acqua, aminoacidi, acidi grassi, glucosio, vitamine e elettroliti. È adibito alla produzione di muco, fondamentale per la protezione dell'apparato digerente dai succhi gastrici. A livello istologico l'epitelio è semplice e cilindrico. La lamina propria invece è fondamentale in quanto contiene al suo interno i principali elementi del sistema immunitario, tra cui linfociti B e T, macrofagi, cellule dendritiche e mastociti. Principalmente è formata da tessuto connettivo lasso ricco di fibre collagene, elastiche, reticolari, muscolatura liscia e fibre nervose. La *muscularis mucosae* è costituita da due strati di cellule muscolari lisce, quello interno è circolare e quello esterno longitudinale (Frappier BL et al., 2010; Liebig HG 2012);
- la tonaca sottomucosa è costituita da tessuto connettivo lasso con fibre collagene lamellari. Nella tonaca sottomucosa è presente il plesso di Meissner o plesso sottomucoso. A questo livello sono presenti vasi linfatici, sanguigni e ghiandole sottomucose. Dal plesso di Meissner partono una serie di fibre che vanno ad innervare la lamina propria formando una rete sottoepiteliale, connesse con il plesso mienterico, innervando anche ghiandole e cellule muscolari lisce della tonaca muscolare. Sono inoltre presenti molti elementi del sistema immunitario come linfociti, macrofagi, mastociti e plasmacellule che fanno sì che la tonaca sottomucosa assieme alla lamina propria costituisca un meccanismo di difesa contro i microrganismi che provengono dal lume intestinale (Liebig HG 2012);
- la tonaca muscolare è formata da due fasci di cellule muscolari lisce, uno interno in cui i fasci sono disposti in senso circolare o a spirali strette e uno esterno in cui sono disposti in senso longitudinale o a spirali ampie. Tra i due fasci muscolari è contenuto il plesso mienterico o di Auerbach. Questo plesso è attivato da stimoli

meccanici e chimici che arrivano direttamente dal tGI. Dal plesso si avviano impulsi efferenti che condizionano l'attività delle cellule muscolari, cellule delle pareti dei vasi e cellule ghiandolari. Questa muscolatura è fondamentale per i movimenti peristaltici (Frappier BL et al., 2010; Liebich HG 2012);

- la tonaca sierosa è costituita da tessuto connettivo ed è ricoperta da un epitelio pavimentoso semplice (mesotelio). La sierosa è ricoperta da mesotelio solo nei tratti all'interno di cavità sierose, come mediastino, addome e cavità pelvica. Al di fuori delle cavità sierose (tratto cervicale dell'esofago e porzione retroperitoneale del retto) abbiamo al posto della sierosa l'avventizia (Frappier BL et al., 2010; Liebich HG 2012).

1.7.1 Stomaco

In questa sede la tonaca mucosa e la sottomucosa risultano essere unite innalzandosi a formare delle pieghe che prendono il nome di pliche gastriche, che scompaiono alla distensione dell'organo (Barone R 2006). All'interno di piccole zone irregolari chiamate fossette gastriche l'epitelio della mucosa diventa muco-secerne e contiene le cosiddette ghiandole gastriche. Queste ghiandole sono accolte nella lamina propria, che con la sua rete di capillari e fibre nervose è la diretta responsabile della secrezione da parte di queste ghiandole. Nella mucosa troviamo ghiandole tubulari classificate in cardiache, gastriche propriamente dette e piloriche. Vi sono anche delle cellule ghiandolari endocrine che fanno parte del sistema neuroendocrino del tGI in grado di sintetizzare svariati ormoni, tra cui la serotonina. A livello della tonaca mucosa è presente un epitelio formato da cellule batiprismatiche che si rinnovano ogni 3/4 giorni circa, solo nei carnivori al di sotto delle ghiandole gastriche è presente uno strato compatto che le divide dalla *muscularis mucosae*, al fine di far sì che frammenti acuminati di alimento non penetrino nella parete (Frappier BL et al., 2010; Liebich HG 2012). Nella porzione muscolare dello stomaco sono presenti a livello di fondo e corpo due strati disposti obliquamente alle due muscolature. La sierosa è principalmente formata da peritoneo viscerale. È presente una grande quantità di connettivo sottoperitoneale laddove si hanno

le inserzioni omentali, che favorisce le variazioni di volume dello stomaco (Barone R 2006).

1.7.2 Intestino tenue

Suddiviso in duodeno, digiuno e ileo. Tonaca mucosa e tonaca muscolare in questa sede si occupano della digestione del contenuto intestinale per poi favorire in sede successiva l'assorbimento. Al fine di aumentare la superficie di assorbimento la tonaca mucosa è sollevata in pieghe, le pliche circolari, disposte trasversalmente rispetto all'asse maggiore dell'intestino. A livello dell'intestino medio la lamina propria si solleva a formare i villi intestinali, che aumentano ulteriormente la superficie di assorbimento (Liebich HG 2012). A livello della mucosa abbiamo come epitelio di rivestimento dei villi un epitelio cilindrico semplice costituito da diverse tipologie cellulari: gli enterociti (cellule cilindriche con orletto a spazzola); le goblet cells (cellule caliciformi mucipare); le cellule di Paneth; le cellule staminali; le tuft cells e cellule M (Liebich HG 2012) (**Figura 12**).

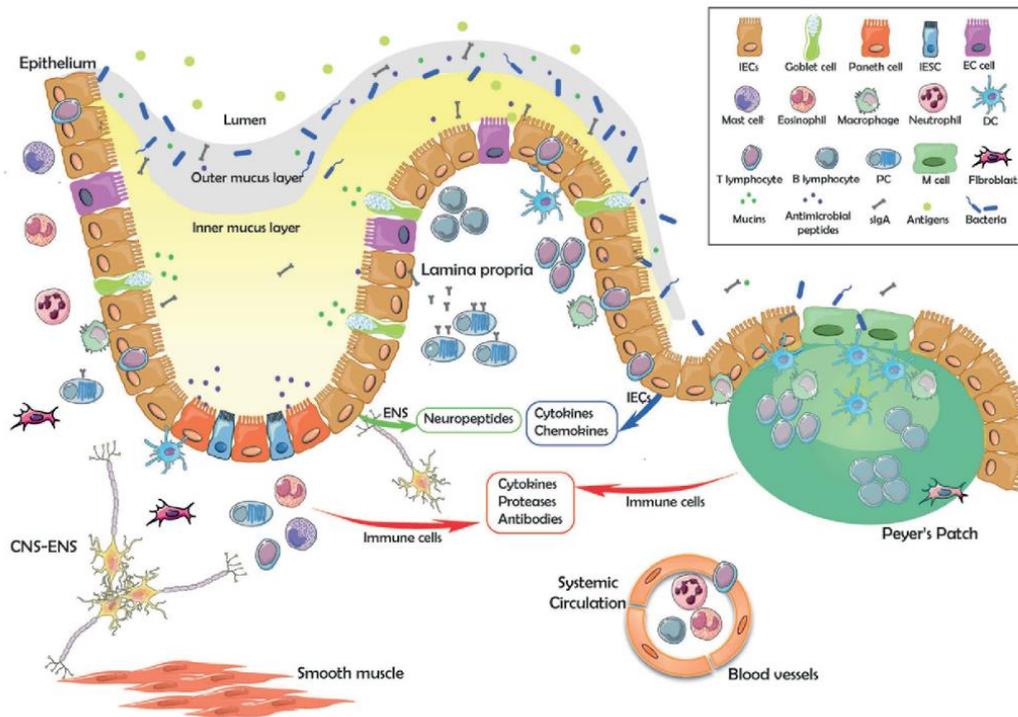


Figura 12: rappresentazione schematica delle cellule dell'epitelio intestinale e delle cellule immunitarie che lo caratterizzano. (modificato da: Romero ES et al., 2015)

Alla base delle cripte sono presenti cellule staminali che, differenziandosi, risalgono i vari strati dell'epitelio dando origine a queste diverse categorie cellulari (Clevers H 2013).

- Gli Enterociti favoriscono l'assorbimento e sono la categoria più ampia di cellule della mucosa intestinale. Sul versante apicale di queste cellule sono presenti filamenti di actina a formare i microvilli. Tutti insieme, i microvilli degli enterociti, si uniscono a formare l'orletto a spazzola. Fondamentale per l'assorbimento dei prodotti finali della digestione. L'assorbimento avviene tramite il movimento dei microfilamenti di actina, collegati a filamenti di miosina del citoscheletro tramite una trama trasversale (Liebich HG 2012). Queste cellule risultano connesse tra loro per mezzo di giunzioni occludenti e desmosomi, gli emidesmosomi uniscono gli enterociti alla membrana basale. È proprio l'orletto a spazzola che protegge da possibili infezioni microbiche, lesioni da autodigestione

- oltre che essere sede di elementi enzimatici adibiti al trasporto (Samuelson DA 2007).
- Le cellule caliciformi mucipare aumentano in quantità andando verso il grosso intestino. Sono ghiandole unicellulari che secernono muco glicoproteico e ricco di glicolipidi che viene rilasciato mediante via merocrina sulla superficie della mucosa. Il muco secreto dalle ghiandole favorisce la progressione del materiale che non viene assorbito lungo il tGI, contiene lisozima quindi ha proprietà antimicrobiche e lega le tossine impedendo l'attacco dell'epitelio (Leibich HG 2012).
 - Le cellule enteroendocrine (EECs) sono distribuite lungo l'epitelio intestinale e molte di loro hanno morfologia aperta, ovvero mostrano microvilli sulla superficie apicale che permette loro di estroflettersi a livello luminale e di entrare in contatto con il contenuto intestinale (Gribble FM e Reimann F, 2016). Le EECs di tipo chiuso, come le cellule D, non entrano in contatto con il lume (Ku SK et al., 2003). Le EECs sintetizzano una grande varietà di ormoni proteici che possono influenzare appetito, motilità del tGI, il rilascio di insulina e di enzimi digestivi (Gribble FM e Reimann F, 2016). Con le cellule endocrine dello stomaco e pancreas, le EEC formano il sistema gastro-entero-pancreatico, rilasciando il loro secreto a livello della rete capillare sottoepiteliale. Le EECs originano dalle cellule staminali intestinali, migrando dalle cripte alla punta del villo, in cui si differenziano definitivamente (Gribble FM e Reimann F, 2016). Le EECs sono divise in diversi sottotipi che esprimono numerose combinazioni di ormoni. L'espressione di questi ormoni varia moltissimo da specie a specie nei diversi tratti, inoltre le EECs possono produrre più di una tipologia ormonale. Tra questi ormoni vi sono colecistochinina (CCK), serotonina (5-HT), peptide inibitorio gastrico (GIP), glucagon-like peptide 1 (GLP-1), peptide YY (PYY) (Fothergill LJ e Furness JB, 2018). Questi ormoni sono espressi a livello basale durante il digiuno, eccezione fatta ad esempio per grelina e serotonina, che promuovono l'assunzione di cibo e sopprimono la secrezione acida gastrica (Gribble FM e Reimann F, 2016).
 - Le cellule enterocromaffini sono cellule endocrine che secernono serotonina e costituiscono i principali chemosensori epiteliali. Queste cellule percepiscono

stimoli dietetici, infiammatori e microbici dal lume intestinale e inviano l'informazione al sistema nervoso. Il 90% della serotonina presente nell'organismo viene prodotta da questa categoria di cellule, infatti, sembra che le cellule enterocromaffini possano influenzare la fisiopatologia del tGI, in quanto coinvolte nel controllo di motilità, secrezioni, nausea e ipersensibilità viscerale (Bellono NW et al., 2017; Mawe GM e Hoffmann JM, 2013). Queste cellule esprimono specifici recettori che se stimolati favoriscono il rilascio di 5-HT che favorisce la contrattilità dell'intestino. Le cellule enterocromaffini esprimono anche canali voltaggio-dipendenti Na^+ e Ca^{2+} per modulare fibre afferenti primarie che sono sensibili alla serotonina tramite sinapsi. Questo permette alle cellule enterocromaffini di captare informazioni ambientali, omeostatiche e metaboliche direttamente nel tGI e di trasdurle al sistema nervoso (Bellono NW et al., 2017). Queste cellule presentano anche recettori specifici come il TRPA1, che capta sostanze irritanti nel lume e il recettore $\alpha 2\text{A}$ adrenergico (Ad $\alpha 2\text{A}$)-TRPC4 che rileva catecolamine normalmente rilasciate in risposta allo stress come la norepinefrina, fondamentale per la proliferazione, virulenza e adesione dei patogeni (Everest P 2007). La stimolazione da parte di norepinefrina può anche essere protettiva, perché l'attivazione delle vie neurali può promuovere la motilità gastrointestinale, portando all'espulsione dei microrganismi che causano infezione, ma una stimolazione prolungata di queste afferenze può causare ipersensibilità viscerale cronica (Bellono NW et al., 2017). La trasduzione sensoriale stimola i canali del Ca^{2+} che controllano il rilascio di serotonina sulle fibre nervose afferenti primarie che esprimono il recettore 5-HT₃, che estendendosi nei villi intestinali si impegnano nei contatti sinaptici con le altre cellule enterocromaffini. Alcune cellule enterocromaffini sono in contatto con alcuni tipo di gangli delle radici dorsali (DRG) o nervi sensoriali vagali (Williams EK et al., 2016). La serotonina che viene prodotta dalle cellule enterocromaffini agisce sui neuroni enterici, sulle cellule immunitarie e infine può essere assorbita dalle piastrine circolanti mediando anche azioni esterne all'intestino (Gershon MD 2013).

- Le cellule di Paneth sono cellule che migrano verso il fondo della cripta, dove influenzano la flora microbica grazie ai granuli di lisozima contenuti al loro

interno, che favorisce la lisi delle pareti batteriche. Sono cellule con vita lunga in quanto possono sopravvivere fino a 3 mesi (Liebich HG 2012) (**Figura 13**).



Figura 13: cripta intestinale con Cellule di Paneth caratterizzate da granuli acidofili ricchi di lisozima. (fonte: <https://www.google.it/imghp?hl=it&tab=wi&ogb> l)

- Le cellule M sono presenti all'interno delle placche del Peyer. Probabilmente fanno parte del sistema dei fagociti mononucleati, svolgendo un ruolo di protezione contro antigeni di tipo virale, batterico e alimentare. Le cellule M trasportano gli antigeni dal lume ai linfociti che attivano la risposta immunitaria più idonea al fine di neutralizzarli (Samuelson DA 2007).
- Le cellule staminali dell'intestino non sono altro che cellule staminali multipotenti (ISC), localizzate sul fondo della cripta intestinale (3/4 per ogni cripta) ed esprimono il recettore Lgr5 (Gerbe F e Jay P, 2016). Le ISC sono state suddivise in due tipologie: le CBC che si dividono ogni giorno con un turnover molto elevato e costituiscono i motori proliferativi; le 4+ che sono delle cellule di riserva quiescenti che si dividono in condizioni omeostatiche ma in risposta a stimoli o lesioni possono essere indotte a produrre nuove CBC (Goodell MA et al., 2015).

- Le Tuft Cells, o cellule a ciuffo, sono sviluppate nei dotti salivari, trachea, bronchi, cistifellea, dotti biliari, pancreas e intestino, ma il loro ruolo non è ancora stato completamente compreso. Sembrano avere un ruolo importante nell'attivazione dell'immunità di tipo 2 (indotta da protozoi o elminti). L'immunità di tipo 2 richiede il reclutamento di cellule T helper di tipo 2 (Th2), cellule linfoidi (ILC2s), citochine derivate da cellule epiteliali, IL-25, IL-33 e linfopietina stromale timica (Hoover B et al., 2017; Fallon PG et al., 2006; Neill DR et al., 2010).

La tonaca sottomucosa invece è costituita da connettivo, vasi, plesso di Meissner, noduli linfatici secondari e placche di Peyer. Nella sottomucosa del duodeno sono presenti anche molte ghiandole mucose (Liebich HG 2012).

1.7.3 Intestino Crasso

Composto da cieco, colon e retto. In questa sede i batteri intestinali tramite fermentazione formano acidi grassi a corta catena che vengono poi assorbiti dall'epitelio. L'intestino crasso si occupa principalmente del riassorbimento di acqua e di elettroliti. A livello dell'intestino crasso avviene il riassorbimento delle proteine. Non vi sono villi nella mucosa, mentre nel crasso vi è un epitelio cilindrico semplice con microvilli e ghiandole. È proprio grazie ai microvilli che avviene il riassorbimento di acqua ed elettroliti. A livello di grosso intestino vengono prodotti dalle cellule enteroendocrine L GLP-1, GLP-2 e peptide insulino-simile. Sono presenti cellule enterocromaffini, mancano le cellule di Paneth, ma vi è una categoria simili chiamata cellule secretorie a cripta profonda (Liebich HG 2012; Meneses AMC et al., 2016).

1.8 Ruolo fisiologico dei cannabinoidi nel tGI

La Cannabis ha una lunga storia come agente terapeutico per il trattamento di dolore addominale e disfunzioni del tGI. Questo è possibile perché il tGI è dotato di recettori per i cannabinoidi e dei loro ligandi endogeni, che insieme contribuiscono a controllare l'omeostasi del tGI. Il tGI è in grado di produrre localmente i suoi ligandi per questi recettori in base ai bisogni fisiologici e può rapidamente innescare la produzione qualora vi siano disturbi che possono perturbare l'omeostasi. Il tGI è una delle regioni del nostro organismo il cui il pathway innescato dai recettori CBs è coinvolto in fenomeni fisiologici e patofisiologici. Negli anni passati il limite nell'uso di questi composti per il trattamento di disturbi del tGI era limitato a causa dei gravi effetti psicotropi. La soluzione è ricreare molecole agoniste/antagoniste del pathway molecolare del sistema endocannabinoide con pochi effetti a livello centrale, come ad esempio creare degli inibitori degli enzimi degradativi FAAH e MAGL, o agonisti neutrali/ligandi del recettore CB2, che per antonomasia è maggiormente espresso a livello periferico (Lo Verme J et al., 2009; Izzo AA e Sharkey KA 2010; Janero DR e Makriyannis A 2009; Hasenoehrl C et al., 2016). I maggiori bersagli del sistema endocannabinoide a livello del tGI sono i recettori dei cannabinoidi CB1R e CB2R e i recettori TRPV1, PPAR α , PPAR γ , GPR55 (Izzo AA e Sharkey KA, 2010).

1.8.1 Food Intake

Il sistema endocannabinoide controlla il bilancio energetico e l'approvvigionamento di cibo a diversi livelli funzionali, sia nell'encefalo che a livello periferico, incluso il tGI (Bellocchio L et al., 2008). In numerose specie, incluso l'uomo, il Δ^9 -THC aumenta il *food intake* e promuove l'aumento di peso attraverso l'attivazione dei recettori CB1 (Kunos G 2007; Matias I e Di Marzo V 2007), mentre antagonisti del CB1 hanno esattamente effetto contrario (Di Marzo V 2008). Nonostante il successo nei trial clinici, il Rimonabant, antagonista dei recettori del CB1, venne ritirato dal commercio nell'ottobre 2008 proprio a causa dell'aumento del rischio di depressione in pazienti in cura, nonostante fosse un ottimo farmaco per la perdita di peso (van Gaal L et al., 2008). Il sistema endocannabinoide va incontro a cambiamenti adattativi in risposta ad un

cambio di dieta. Ad esempio, la deprivazione di cibo causa un aumento nei livelli di anandamide e un aumento dell'espressione dei recettori CB1 nei neuroni vagali afferenti che hanno proiezioni nel tGI (Gomez R et al., 2002; Burdyga G et al., 2004). Studi recenti hanno dimostrato che i recettori CB1 localizzati sui neuroni vagali afferenti sono coinvolti nella modulazione dell'appetito e l'anandamide ha un ruolo di "segnale di fame" a livello dell'intestino (Storr MA e Sharkey KA 2007; Borrelli F e Izzo AA 2009). Recentemente Lo Verme e colleghi hanno sviluppato un nuovo antagonista periferico del recettore CB1 (URB447) che si è mostrato efficace nella riduzione del food intake e della massa corporea in topi geneticamente obesi ob/ob. Farmaci come questo sono molto promettenti nel trattamento di queste disfunzioni metaboliche in quanto non sembrano causare effetti collaterali a livello centrale (Izzo AA e Sharkey KA 2010).

1.8.2 Vomito e nausea

Il sistema endocannabinoide è anche in grado di sopprimere la sensazione di nausea e vomito (Izzo AA e Sharkey KA 2010). Il Nabilone, derivato sintetico del Δ^9 -THC, è utilizzato come antiemetico in chemioterapia, ma questo farmaco non risulta essere una prima scelta in quanto in grado di indurre effetti collaterali psicotropi. Il meccanismo d'azione di questo farmaco si basa sull'attivazione dei recettori CB1R e CB2R portando alla soppressione del riflesso del vomito. Essendo AEA e 2AG i principali ligandi di questi due recettori, sono stati proposti farmaci antiemetici antagonisti degli enzimi che degradano l'AEA e il 2AG (Taschler U et al., 2017). L'URB597 è in grado di ridurre l'emesi indotta sperimentalmente attivando i recettori CB1R e CB2R (Van Sickle MD et al., 2005) il JZL184, tramite il recettore CB1R (Sticht MA et al., 2012). Sebbene il blocco di FAAH e MAGL sia efficace anche nel trattamento della nausea, ad oggi i meccanismi e le aree cerebrali coinvolte nella nausea non sono ancora del tutto chiare (Taschler U et al., 2017). Il CBD si è mostrato efficace nei modelli animali di nausea e vomito, risultando così una potenziale molecola nel trattamento della nausea indotta dalla chemioterapia (Izzo AA e Sharkey KA, 2010).

1.8.3 Secrezione gastrica e intestinale

Nei roditori, l'attivazione del sistema endocannabinoide tramite recettore CB1R porta ad una diminuzione della produzione acida gastrica (Adami M et al., 2002; Coruzzi G et al., 2006). Il sito d'azione si trova su pathway vagali efferenti che arrivano alla mucosa, ma non su cellule parietali. Infatti, il sistema endocannabinoide diminuisce la secrezione acida prodotta da 2-deossi-D-glucosio e pentagastrina (che aumenta la secrezione acida tramite rilascio di acetilcolina), ma non quella causata da istamina, che attiva i recettori H2 sulle cellule parietali e porta ad un aumento della secrezione acida (Adami et al., 2002). L'attivazione del recettore CB1R è protettiva in un modello animale con ulcere gastriche indotte da aspirina (Rutkowska M e Fereniec-Goltbiewska L, 2006), immersione in acqua e stress moderato (Dembinski A et al., 2006) e freddo e stress moderato (Germanò MP et al., 2001). Naidu e colleghi inoltre hanno dimostrato che topi con deficit dell'enzima FAAH mostrano una ridotta infiammazione della parete gastrica causata dal farmaco Diclofenac, un FANS, dimostrando la gastroprotettività dei cannabinoidi. Si può concludere che l'attivazione del recettore CB1R ha un ruolo fondamentale nella gastroprotezione.

1.8.4 Motilità del tGI

È ormai noto che gli agonisti dei recettori CBs sono in grado di ridurre la contrattilità della muscolatura liscia in differenti regioni del tGI (di diverse specie animali e dell'uomo) attivando il recettore CB1R (Izzo AA e Camilleri M 2008). Questo fenomeno è stato osservato nel topo (Mulè F et al., 2007), nello stomaco di ratto (Storr M et al., 2002), nella cavia (Abalo R et al., 2005), nell'ileo e colon di uomo (Manara L et al., 2002; Guagnini F et al., 2006). Entrambe le muscolature, circolare e longitudinale, sono responsive all'inibizione indotta dagli agonisti dei recettori CBs. Si suppone che il meccanismo principale di inibizione della contrattilità si basi su una diminuzione del rilascio di acetilcolina dai terminali presinaptici. Tra gli altri meccanismi proposti si ha un'inibizione di una trasmissione eccitatoria e inibitoria non adrenergica e non colinergica (Mulè F et al., 2007; Storr M et al., 2004), la modulazione del sistema purinergico per mezzo dei recettori P2X (Baldassano S et al., 2009) e l'attivazione dei recettori CB2R (Mulè F et al., 2007). Vi sono studi inoltre che mostrano che il 2AG può

inibire la contrazione delle due muscolature tramite meccanismi CB-indipendenti (Smid SD et al., 2007). Si può dire che questa azione anti-propulsiva causata dall'attivazione del sistema endocannabinoide sia il risultato di un'inibizione di tutti i componenti del riflesso peristaltico a livello del colon di ratto. Infatti l'attivazione dei recettori CB1R porta a) all'inibizione della contrazione del colon ascendente e del concomitante rilascio di sostanza P; b) all'inibizione del rilassamento del colon discendente e del concomitante rilascio di VIP; c) all'inibizione degli stimoli sensoriali e del concomitante rilascio del calcitonin gene-related peptide (CGRP) (**Figura 14**)

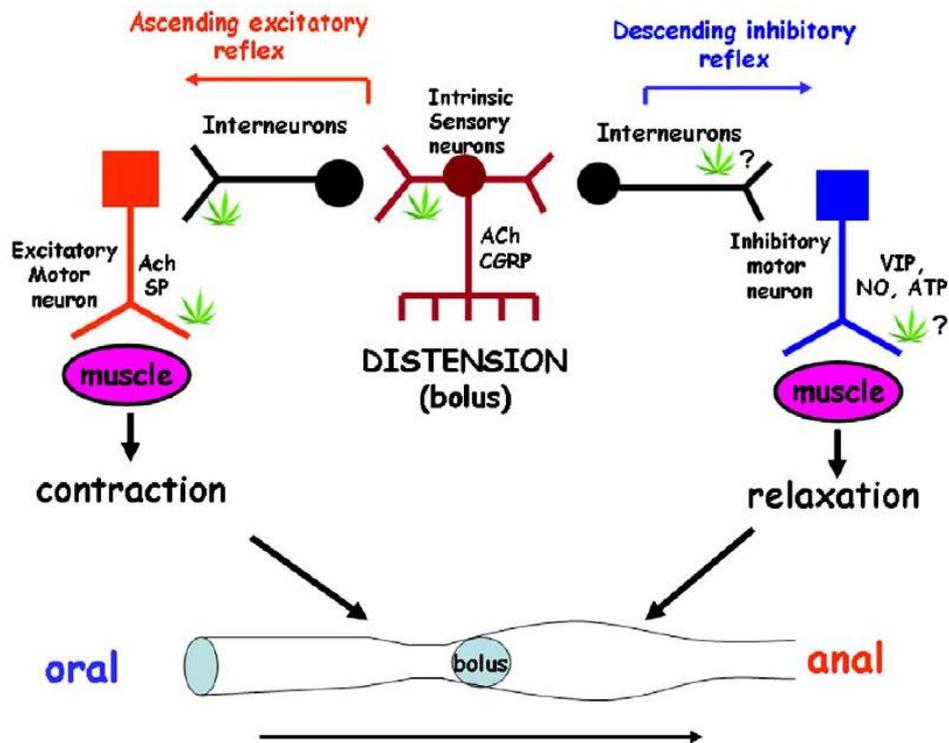


Figura 14: siti di azione dei cannabinoidi nel sistema nervoso enterico. I meccanismi che permettono la peristalsi coinvolgono neuroni sensoriali intrinseci e interneuroni, motoneuroni eccitatori e inibitori. L'acetilcolina (ACh) agisce sui recettori muscarinici e nicotinici comportandosi come neurotrasmettitori eccitatorio nella peristalsi, invece VIP, ossido nitrico (NO) e ATP si comportano da neurotrasmettitori inibitori. L'immunoreattività al CBI (indicato con la foglia di Marijuana) è stata identificata sui neuroni sensoriali intrinseci, neuroni ascendenti e neuroni motori eccitatori che proiettano alla muscolatura longitudinale e circolare. Tramite studi farmacologici si è osservato che i cannabinoidi inibiscono sia la contrazione ascendente (e il concomitante rilascio di ACh e sostanza P) e il rilassamento della componente discendente (e il concomitante rilascio di VIP). I cannabinoidi inibiscono anche il rilascio del CGRP dai neuroni sensoriali intrinseci. I punti interrogativi derivano dalla mancanza di prove immunostochimiche della presenza dei recettori CB1 in quel tratto, provato solo a livello farmacologico. (modificato da: Smid SD et al., 2007)

Studi di Boesmans e colleghi mostrano che l'attivazione del recettore CB1R nelle fibre dei nervi enterici altera il *re-uptake* delle vescicole contenenti i neurotrasmettitori e il trasporto mitocondriale. Questo aspetto permette di ipotizzare che i recettori CB1 regolano la probabilità di rilascio delle vescicole a livello dei terminali dei nervi enterici. I fitocannabinoidi, gli endocannabinoidi e i composti sintetici sono in grado di ridurre lo svuotamento gastrico, il transito nella parte alta del tGI e la propulsione a livello del colon in modelli roditori (Izzo AA e Sharkey KA 2010). L'effetto inibitorio sulla motilità indotto dagli agonisti dei recettori CBs viene completamente sovvertito da antagonisti del recettore CB1R, ma non da antagonisti del CB2R o del TRPV1, suggerendo che i recettori CB1R hanno un ruolo fondamentale nel controllo della motilità. Inibitori della FAAH sono anch'essi in grado di inibire la motilità del tGI, effetto completamente abolito in presenza di antagonisti del recettore CB1R o in topi knock-out per il recettore CB1R (Di Marzo V et al., 2008; Duncan M et al., 2008). Nell'insieme queste scoperte dimostrano che gli endocannabinoidi sono fisiologicamente coinvolti nella regolazione della motilità gastrica e intestinale. In linea con questi studi si è osservato che la somministrazione di dronabinolo (Δ^9 -THC) diminuisce la capacità di svuotamento gastrico nell'uomo (Esfandyari T et al., 2006). Anche i cannabinoidi che agiscono sull'asse *brain-gut* possono controllare la motilità intestinale. WIN 55,212-2, agonista dei recettori cannabinoidi, attenua il transito in topi in cui viene iniettato intracerebro-ventricolare (Izzo AA e Sharkey KA 2010). Delezione del CB1R nei nervi vagali causa un'accelerazione della motilità del tGI nei topi (Vianna CR et al. 2012). È sempre più evidente la possibilità di studiare trattamenti a base di cannabinoidi per la regolazione della motilità del tGI (Taschler U et al., 2017).

1.8.5 Secrezione di fluidi

La secrezione di fluidi è un elemento fondamentale della digestione, come anche nella difesa da patogeni. Un'adeguata secrezione di fluidi è richiesta per il normale transito dei contenuti lungo il tGI. Un deficit nell'assorbimento dell'acqua nel tGI o un'eccessiva secrezione porta come conseguenza ad una condizione di diarrea. L'importanza dei cannabinoidi nel controllo delle secrezioni è stata provata dal fatto che ratti trattati con

un antagonista del CB1R, il Rimonabant, mostrano un'elevata perdita di liquidi a livello fecale (Izzo AA et al., 1999). Inoltre, dati sperimentali mostrano che i recettori CBs e gli endocannabinoidi inibiscono le ipersecrezioni indotte dalla tossina colerica nel piccolo intestino di topo attivando i recettori CB1R (Izzo AA e Capasso F 2006).

1.8.6 Sensibilità viscerale

Sia agonisti del CB1R che del CB2R sono in grado di ridurre in condizioni basali la sensibilità viscerale associata a distensione colon-rettale (Sanson M et al., 2006; Fioramonti J e Bueno L, 2008), e questo effetto è molto più evidente se l'ipersensibilità addominale è causata da stimolo di tipo infiammatorio. L'effetto analgesico indotto dal recettore CB2R potrebbe essere dovuto a inibizione degli effetti sensibilizzanti di proinfiammatori/algesici sulle terminazioni periferiche dei nervi afferenti viscerali. Il Δ^9 -THC e il cannabinolo sono in grado tramite attivazione del CB1R di innescare effetti antinocicettivi in un modello di dolore viscerale causato per mezzo di acido acetico (l'acido acetico induce stiramento addominale) (Booker L et al. 2009). Inoltre, la delezione della FAAH causa effetti anti-nocicettivi (Naidu PS et al., 2009). L'iperalgia viscerale in risposta a stress psicologico è associata a cambiamenti reciproci nell'espressione e funzione del CB1R (diminuita) e del TRPV1 (aumentata) a livello dei neuroni dei gangli delle radici dorsali (Hong S et al., 2009). Si può dire che l'attivazione diretta o indiretta dei recettori CB1R e CB2R inibisce la sensibilità viscerale e il dolore viscerale in modelli roditori. Gli effetti analgesici mediati dal CB1R sono associati ad una down-regolazione del TRPV1 (Izzo AA e Sharkey KA 2010).

1.8.7 Infiammazione

Di Marzo e Izzo hanno mostrato nel loro studio che pazienti con Irritable Bowel Syndrome (IBD) mostrano un miglioramento in seguito all'uso del fumo di Marijuana. In pazienti con patologie infiammatorie (morbo di Crohn, celiachia, coliti ulcerative, etc...) a carico

del tGI si è osservato inoltre un aumento dell'espressione dei recettori CBs e degli endocannabinoidi (D'Argenio G et al., 2007). Studi su modelli sperimentali di IBD in roditori (IBD indotto ad esempio con acido sulfonico di/tri-nitrobenzene) indicano che gli endocannabinoidi possono limitare l'infiammazione intestinale tramite attivazione dei recettori CB1R e CB2R (Di Marzo V e Izzo AA 2006). In particolare, CB1R e CB2R sono stati rinvenuti sui linfociti B, NK e sui mastociti coinvolti nella sorveglianza immune a livello del tGI (Klein TW e Cabral GA 2006). Macrofagi, cellule mononucleate e cellule dendritiche stimolate mostrano un aumento dei livelli degli endocannabinoidi e LPS, che nei macrofagi porta alla produzione di AEA (Liu et al., 2003). I cannabinoidi inoltre possono inibire direttamente la soppressione di macrofagi e mastociti attivati e la soppressione di citochine con il TNF- α (Small-Howard AL et al., 2005).

1.8.8 Cancro

Il sistema endocannabinoide, tramite attivazione del recettore CB1R e probabilmente del CB2R, ha azione apoptotica su alcune linee cellulari di cancro colon-rettale come ad esempio SW480, HCT-15 e CaCo-2 (Izzo AA e Camilleri M 2009). I meccanismi apoptotici attivati tramite il recettore CB1R comprendono: a) inibizione dei pathways RAS-MAPK e PI3K-AKT; b) downregolazione del fattore anti-apoptotico survivina; c) stimolazione della sintesi de novo di fattori pro-apoptotici come la ceramide, meccanismo che avviene anche in seguito ad attivazione del recettore CB2R (Greehough A et al., 2007; Wang D et al., 2008; Cianchi F et al., 2008). Il sistema endocannabinoide è anche in grado di inibire la migrazione delle cellule tumorali, che è un prerequisito per l'invasione delle cellule tumorali e lo sviluppo di metastasi (Joseph J et al., 2004). Inoltre, si è scoperto che anche l'inibizione degli enzimi degradativi degli endocannabinoidi come ad esempio la FAAH favorisce eventi pro-apoptotici che inibiscono la tumorigenesi. Cambiamenti adattativi del sistema endocannabinoide sono stati osservati in biopsie di pazienti con cancro al colon. Un esempio è il cambiamento nello stato di metilazione e le modificazioni istoniche che si osservano nel gene *cnr 1* che codifica per il CB1: queste modificazioni portano al silenziamento epigenetico, che si pensa induca tumore al colon

tramite perdita della trascrizione del recettore e così alla progressione della malattia (Wang D et al., 2008).

2 Scopo

È ormai noto che i cannabinoidi abbiano effetti antinocicettivi (Donvito G et al., 2018), infatti vi sono una serie di studi che suggeriscono che il CB1R e/o il CB2R abbiano effetto anti-infiammatorio in presenza di IBD e si pensa che l'utilizzo di fitocannabinoidi o agonisti sintetici per il trattamento di queste malattie possa essere di grande supporto. A tal proposito una delle molecole meglio studiate è la PEA, che come detto prima ha effetti anti-infiammatori e anti-iperalgesci e l'AEA. Entrambe queste molecole sembrano interagire (direttamente e indirettamente) su differenti recettori per cannabinoidi o cannabinoid-like receptors senza produrre effetti indesiderati a livello centrale (Skaper SD et al., 2015). Allo stato attuale però vi sono in letteratura scarse informazioni sulla distribuzione del sistema endocannabinoide nel tGI di gatto, quindi è difficile fare speculazione sul meccanismo d'azione di queste molecole su questo tratto anatomico.

Al fine di fare chiarezza a riguardo, questo studio *ex vivo* ha come obiettivo quello di investigare la distribuzione dei recettori per i cannabinoidi e i dei cannabinoid-like receptors lungo il tGI di gatto. In particolare, ci siamo focalizzati su CB1R, CB2R, PPAR α , PPAR γ , TRPA1 e 5-HT1a.

3 Materiali e metodi

3.1 Reclutamento degli animali

È stato prelevato *ex-vivo* il tratto gastrointestinale di cinque gatti europei (#1 maschio, giovane età; #2 maschio di 12 anni; #3 maschio di 12 anni; #4 femmina giovane età; #5 maschio, giovane età). I gatti all'esame clinico *post-mortem* non presentavano grosse alterazioni della parete gastrointestinale e non avevano storia di pregresse patologie gastrointestinali. Gli animali sono morti o per cause naturali o con eutanasia per patologie non a carico del tratto gastrointestinale e i loro tessuti sono stati prelevati dopo aver ottenuto il consenso dai proprietari. Conformemente alla direttiva europea 2010/63/EU e con il Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali a scopo di ricerca scientifica, per la legislazione italiana (D. Lgs. n. 26/2014) non è richiesta nessuna approvazione dall'autorità competente o dal comitato etico, perché questo tipo di ricerca non ha influenzato nessun tipo di scelta terapeutica.

3.2 Raccolta dei tessuti

Entro un'ora dalla morte dell'animale sono stati prelevati campioni di tGI, sono stati raccolti dei campioni del tratto gastrointestinale (piloro, duodeno discendente e colon distale). È stata effettuata un'incisione e in seguito il tessuto è stato aperto lungo la piccola curvatura gastrica (per il piloro), e a livello dell'intestino lungo il bordo mesenterico. Questi sono stati incisi e aperti longitudinalmente lungo la piccola curvatura gastrica, per quanto riguarda il piloro, e lungo il bordo mesenterico, a livello di intestino. Il lavaggio dei tessuti è stato eseguito in tampone fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS 1X), successivamente i tessuti sono stati fissati in liquido Zamboni e processati per il congelamento al fine di ottenere criosezioni (2,0 cm x 0,5 cm) sulle quali svolgere reazioni di immunohistochimica.

3.3 Reazione di Immunofluorescenza (IF)

Le criosezioni sono state idratate in PBS e processate per la reazione di colorazione. Per evitare legami aspecifici le sezioni sono state incubate in una soluzione di blocco contenente il 20% di normal goat serum o normal donkey serum (NGS, NDS) (Colorado Serum Co., Denver, CO, USA), 0.5% Triton X-100 (Sigma Aldrich, Milan, Italy, Europe), albumina di siero bovino (BSA) (1%) e a volume con PBS, per un'ora a temperatura ambiente (TA). Le criosezioni sono state incubate per una notte in camera umida a TA con diversi anticorpi primari (**tabella 1**) diluiti in soluzione di blocco. Il giorno successivo, dopo lavaggio in PBS (3 x 10 min), le sezioni vengono incubate per un'ora a TA con gli anticorpi secondari (**tabella 2**). Le sezioni sono state poi lavate con PBS (3 x 10 min) e coperte con buffer al glicerolo a pH 8.6 con 4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI- (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Per identificare i tipi cellulari che esprimono i recettori cannabinoidi, abbiamo utilizzato specifici anticorpi. Per identificare le cellule gliali, abbiamo co-localizzato i recettori anti-cannabinoidi con l'anticorpo anti-proteina fibrillare acida (GFAP); per identificare i mastociti (MCs), abbiamo utilizzato anticorpi anti-triptasi (MCs proteasi); per identificare i macrofagi abbiamo utilizzato anticorpi diretti contro la proteina legante ioni calcio 1 (IBA1). Le plasma cellule sono state identificate con anticorpi anti-IgA; per identificare le EECs, sono stati usati anticorpi anti cromograninaA (CGA); -serotonina (5-HT), -colecistochinina (CCK).

Anticorpo Primario	Origine	Codice	Diluizione	Fornitore
CB1	<i>Rabbit</i>	Orb10430	1:200	<i>Biorbyt</i>
CB1	<i>Rabbit</i>	ab23703	1:100	<i>abcam</i>
CB2	<i>Rabbit</i>	ab45942	1:200	<i>abcam</i>
GAS/CCK	<i>Mouse</i>	CURE/CCD	1:1000	<i>CURE/CCD</i>
Cromogranina A	<i>Mouse</i>	MON9014	1:200	<i>Monosan</i>
GFAP	<i>Chicken</i>	Ab4674	1:800	<i>abcam</i>
GPR55	<i>Rabbit</i>	NB110-55498	1:200	<i>Novus Biol.</i>
IBA1	<i>Goat</i>	NB100-1028	1:80	<i>Novus Biol.</i>
IgA	<i>Rabbit</i>	A80-103A	1:1000	<i>Bethyl Lab.</i>
IgA	<i>Goat</i>	NB724	1:1000	<i>Novus Biol.</i>
PPAR α	<i>Rabbit</i>	NB600-636	1:200	<i>Novus Biol.</i>
PPAR γ	<i>Rabbit</i>	ab45036	1:300	<i>abcam</i>
Serotonina	<i>Mouse</i>	ab16007; # 5HT-H209	1:500	<i>abcam</i>
Recettore serotonina 5-HT1a	<i>Rabbit</i>	ab85615	1:100	<i>abcam</i>
TRPA1	<i>Rabbit</i>	ab58844	1:100	<i>abcam</i>
Triptasi	<i>Mouse</i>	M 7052; #AA1	1:200	<i>Dako</i>

Tabella 1: Anticorpi Primari utilizzati nello studio

Anticorpo secondario	Origine	Codice	Diluizione	Fornitore
Anti-mouse F(ab') ₂ fragment TRITC	<i>Goat</i>	Ab51379	1:50	<i>abcam</i>
Anti-rabbit F(ab') ₂ fragment FITC	<i>Goat</i>	98430	1:300	<i>abcam</i>
Anti-goat IgG 594	<i>Donkey</i>	AB150132	1:600	<i>abcam</i>
Anti-chicken TRITC	<i>Donkey</i>	703-025-155	1:200	<i>Jackson</i>

Tabella 2: Anticorpi Secondari utilizzati nello studio

3.4 Specificità degli anticorpi primari

La specificità dell'anticorpo anti-CB1R (Abcam, ab23703), -CB2R, e -PPAR α utilizzati nella presente ricerca è stata testata con Western Blot (WB) su tessuto di gatto da Miragliotta et al. (2018). Nel presente studio abbiamo utilizzato un altro anticorpo anti-CB1R (Byorbit, Orb10430) (immunogeno: KLH conjugated synthetic peptide derived between 411-462 amino acids of human CB1R). L'allineamento dell'immunogeno con la proteina target nel gatto è pari all'88,5%, ma la specificità di questo anticorpo non è ancora stata testata su tessuto di gatto tramite western blot.

Abbiamo utilizzato l'anticorpo PPAR α (NB600-636; Novus Biol) (Galiazzo et al., 2018); lo stesso anticorpo testato con WB da Miragliotta et al. (2018) che ora è disponibile con un altro codice (NBP1-03288; Novus Biol.)

L'anticorpo anti-TRPA1 è stato ottenuto utilizzando, come immunogeno, un peptide sintetico, CEKQHELIKLIQKME corrispondente agli aminoacidi 1060-1075 di TRPA1 di ratto. L'allineamento della sequenza dell'immunogeno con la proteina target di gatto è del 100% (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), perciò, l'anticorpo commerciale anti-rat TRPA1 dovrebbe riconoscere lo stesso recettore anche nel gatto.

L'anticorpo anti- PPAR γ è stato ottenuto utilizzando come immunogeno un peptide sintetico, MGETLGDSPIDPESDSC, corrispondente agli aminoacidi 1-16 del PPAR γ di uomo. L'allineamento della sequenza dell'immunogeno con la proteina target di gatto è del 93% (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), perciò, potrebbe esserci una cross-reattività nei tessuti di gatto. Non è ancora stato effettuato il test di WB.

L'anticorpo anti-5-HT1A (abcam, ab85615) è stato ideato utilizzando un peptide sintetico corrispondente agli amminoacidi 100-200 del 5-HT1a di ratto. In questo caso il grado di conservazione della sequenza dell'immunogeno, rispetto a quello della proteina bersaglio del gatto è solo del 36% (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tale dato suggerisce che, durante la valutazione dei risultati dello studio di immunoistochimica, si debba tenere in considerazione che potrebbe esserci qualche grado di non specificità dell'anticorpo.

L'anticorpo anti-triptasi umana (Dako, M 7052 - Clone AA1) è stato già utilizzato su tessuti di gatto da Kleinschmidt et al. (2010).

L'anticorpo IgA di capra specifico per le IgA di suino (Novus Biol., NB100-1028), utilizzato per rilevare le plasmacellule, è stato co-localizzato con l'anticorpo IgA di coniglio specifico per le IgA di uomo (Bethyl Lab., A80-103A). Dal momento che i due anticorpi si sono co-localizzati perfettamente nelle stesse plasmacellule feline (dati non mostrati), nel presente studio è stato impiegato l'anticorpo anti-IgA di capra per identificare gli immunociti esprimenti i recettori dei cannabinoidi.

La specificità dell'anticorpo di capra anti-IBA1 (Novus Biol., NB100-1028), un marcatore per i macrofagi e le cellule microgliali del SNC (Pierezan F et al., 2014), non è mai stata testata sui tessuti di gatto. Questo anticorpo, tuttavia, dovrebbe riconoscere i macrofagi del tratto gastrointestinale anche nel gatto, dato il grado di conservazione delle sequenze proteiche (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La specificità degli anticorpi GPR55, TRPA1 e 5-HT1a è stata testata con analisi di WB (vedi prossimo paragrafo).

Al fine di non avere dei falsi positivi creati dalla presenza di recettori della porzione Fc degli anticorpi secondari su immunociti e cellule del sistema infiammatorio, sono stati utilizzati come anticorpi secondari anticorpi anti-framment F(ab')₂ anti-*Rabbit* (FITC) e *Goat* F(ab)₂ anti-*Mouse* (TRITC).

3.5 Analisi di Western Blot

Duodeno e colon di gatto sono stati prelevati, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al processamento. Come controllo positivo è stato utilizzato l'intestino di topo (dato non mostrato). 50 mg di tessuto sono stati omogenizzati in 500 µl di buffer SDS (Tris-HCl, 62.5 mM; pH 6.8; SDS, 2%; and glycerol, 20%) arricchito con un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma-Aldrich, Co, St. Louis, MO, USA). Il contenuto proteico totale è stato calcolato tramite kit tramite il metodo di Peterson (modifica della curva di Lowry). Aliquote da 20 µg di proteina totale sono state separate su Bolt 4–12% bis-Tris Plus (Life Technologies Ltd, Paisley, UK) per 45 minuti a 165 V. le proteine sono state poi trasferite tramite elettroforesi su una membrana di nitrocellulosa con un sistema semi-

asciutto (Trans Turbo Blot Bio-Rad). Legami aspecifici sulla membrana di nitrocellulosa sono stati bloccati con latte in polvere al 5% in PBS-T20 (Phosphate Buffer Saline-0.1% Tween-20) per un'ora a temperatura ambiente. Dopo il blocco, le membrane sono state incubate a 4°C con gli anticorpi primari della tabella 1 diluiti in Tris-buffered saline-T20 (TBS-T20 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.1% T-20). Dopo i lavaggi, le membrane sono state incubate con anticorpo goat anti rabbit biotina coniugato (diluizione 1:50000 in TBS-T20, 1 h at RT) e con anticorpo anti-biotina horseradish peroxidase (HRP)-linked (diluizione 1:1000) per 40 minuti a temperatura ambiente. Le bande immunoreattive sono state visualizzate tramite substrato chemoluminescente (Clarity Western ECL Substrate Bio Rad) sulla base delle istruzioni fornite dalla ditta. L'intensità del segnale è stata acquisita tramite Chemidoc Instrument e il peso molecolare della banda risultante è stato analizzato Quantity One Software (Bio-Rad). L'analisi di WB su colon di gatto ha mostrato una banda di 38 kDa (teoricamente il peso molecolare del GPR55 felino). Il WB è stato eseguito anche per il recettore TRPA1 e 5-HT1a ottenendo le bande al peso molecolare desiderato, pertanto si suppone che questi anticorpi considerati siano specifici (**Figura 15**).

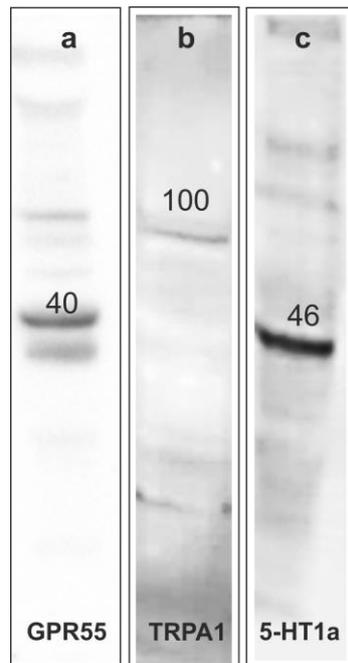


Figura 15: WB su colon di gatto per dimostrare la specificità degli anticorpi. A) GPR55 B) TRPA1 C) 5-HT1a

4 Risultati

4.1 CB1R

Sono presenti differenti tipologie cellulari immunoreattive (-IR) al CB1R nella mucosa, come ad esempio le cellule della mucosa gastrica (**Figura 16 a-c**), le cellule EECs (**Figura 16 d-f**), cellule EECs CCK-IR e cellule goblet (**Figura 16 g-l**), mastociti (MCs) triptasi-IR della lamina propria (**Figura 17 a-c**). Si osserva anche CB1R-IR debole a livello della muscolatura liscia della *tunica muscularis*. In particolare le cellule goblet, riconoscibili per la loro forma e per la presenza di nuclei confinati nella parte profonda della cellula, mostrano reattività al CB1R molto evidente a livello della membrana, ma risulta totalmente assente nel citoplasma. Negli altri tipi cellulari la marcatura è altamente diffusa nel citoplasma mentre quella sulla membrana è meno apprezzabile. Degno di nota è il fatto che, sebbene i due anticorpi che abbiamo utilizzato diretti contro il CB1R siano diretti verso due epitopi contigui del CB1R umano (411-462 Byorbit; 461-472 Abcam), le EECs vengono marcate solo dal CB1R della Byorbit, mentre le MCs solo con il CB1R Abcam. Si osserva anche CB1R-IR debole dei neuroni del plesso mienterico (**Figura 17 d-f**), delle cellule muscolari lisce e della *muscularis mucosae*.

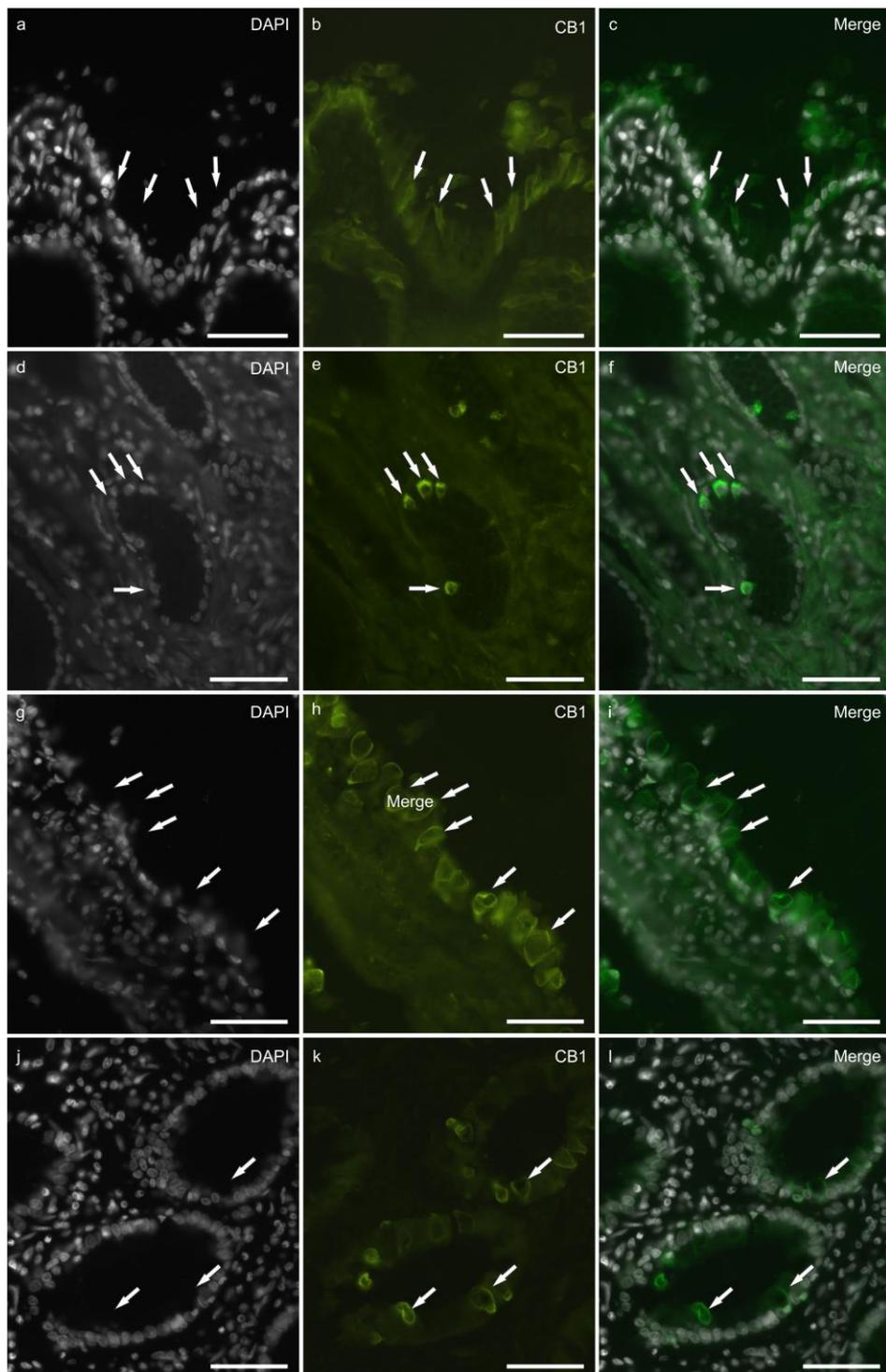


Figura 16: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per il CB1R. a-c) le frecce indicano elementi -IR nella mucosa pilorica; d-f) Le frecce indicano cellule enteroendocrine del piloro; g-l) le frecce indicano cellule caliciformi della mucosa dell'intestino tenue; (g-i) cellule caliciformi dell'intestino crasso; (j-l) cellule caliciformi che esprimono forte marcatura a livello di membrana citoplasmatica.

Scale bar: a-l, 50 μ m.

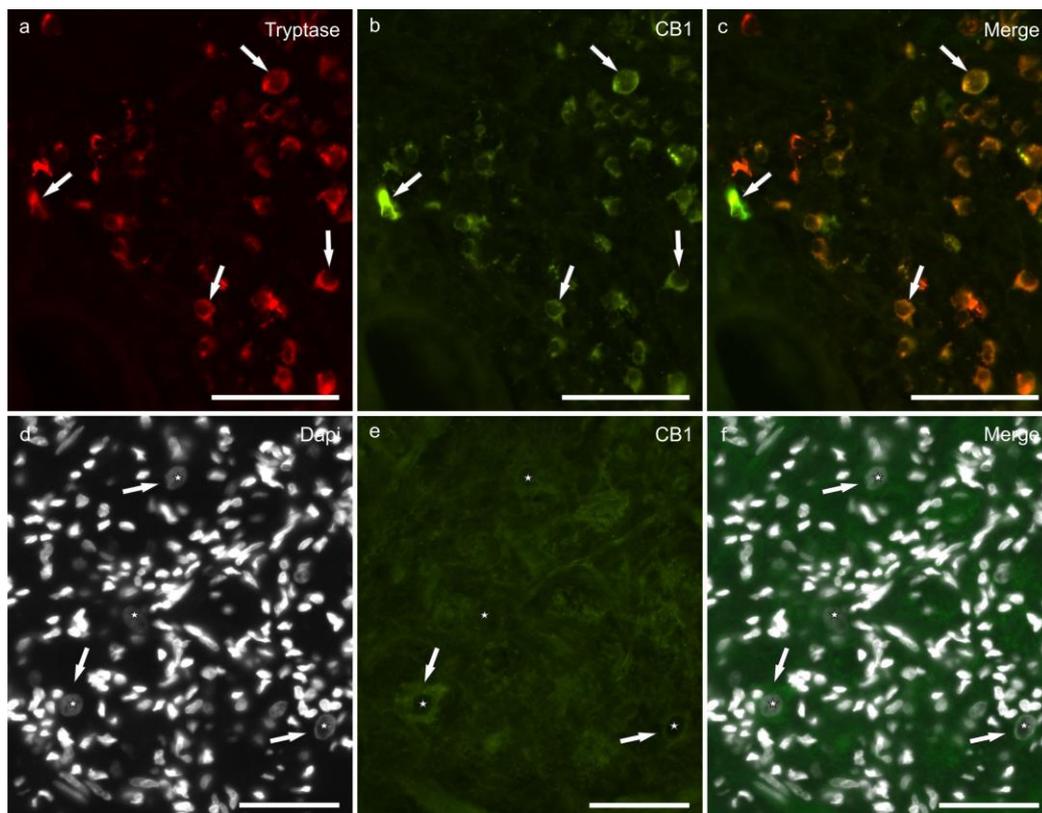


Figura 17: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per il CB1R. Nuclei messi in evidenza con marcatore DAPI. a-c) Le frecce indicano mastociti della lamina propria triptasi- CB1R-positivi (a) e CB1R positivi (b); (c) merge; d-f) neuroni del plesso mienterico lievemente positivi al CB1R.

Scale bar: a-f, 50 μ m.

4.2 CB2R

Le cellule enteroendocrine del tratto gastrico, gli enterociti e i macrofagi della lamina propria sono positivi al recettore CB2. Solo poche plasmacellule IgA-IR mostrano una debole sovrapposizione con il CB2R (dato non mostrato). A livello di piloro e intestino, le cellule enteroendocrine cromogranina- (**Figura 18a a-c**) e 5-HT-positive colocalizzano con il CB2R (**Figura 18a d-f**). Gli enterociti del piccolo e grande intestino mostrano evidente immunoreattività al CB2R, ma la distribuzione epiteliale lungo il tGI risulta non seguire un pattern ed essere molto diversa nelle specie che abbiamo preso in esame (Galiazzo G et al., 2018). Nel piccolo intestino del soggetto #2 una marcatura molto evidente è espressa a livello della superficie degli enterociti della parte più interna dei villi e nella parte intermedia (**Figura 18a g, h**). A livello del colon le cellule CB2R positive sono evidenti nelle cellule epiteliali della porzione interna delle cripte (**Figura 18a i**). Solo le cellule goblet del grande intestino sono positive (**Figura 18a i**). Le cellule enteroendocrine del grande intestino, in particolare di ileo e colon, mostrano granulazione citoplasmatica positiva al CB2R (**Figura 18b j, l**). I macrofagi della lamina propria IBA1 positivi sono anche CB2R positivi (**Figura 18b m-o**). La muscolatura liscia è anch'essa CB2R-IR (dato non mostrato). La glia e i neuroni del Sistema Nervoso Enterico non sembrano essere positivi.

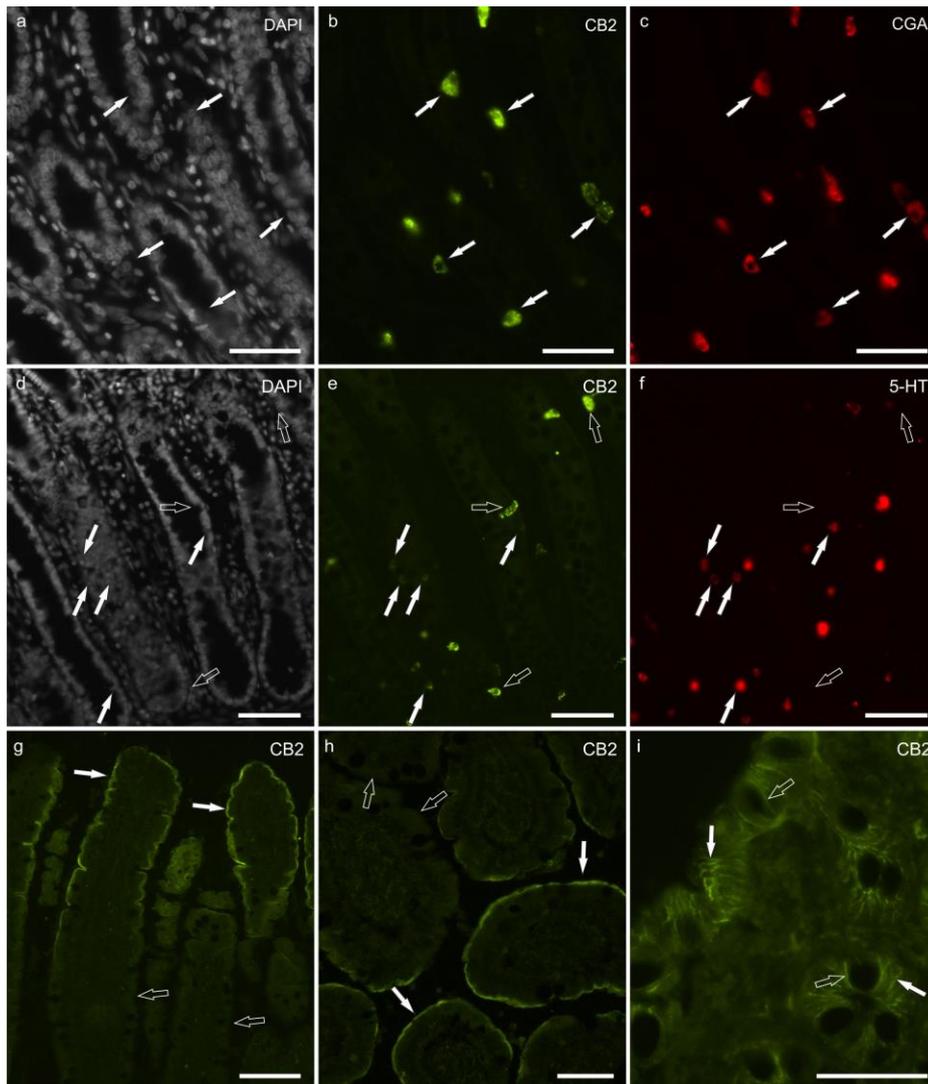


Figura 18a: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per il CB2R. Nuclei messi in evidenza con marcatore DAPI. a,b) le frecce indicano cellule enteroendocrine CB2R-IR; c) che coesprimono cromogranina-A (CGA); d, f) le frecce indicano cellule enteroendocrine CB2R-5-HT positive; g, h) intestino tenue #2: CB2R-IR sulla superficie luminale degli enterociti distribuiti lungo la porzione apicale dei villi (frecce bianche), mentre nella metà basale le cellule epiteliali sono CB2R negative (frecce vuote); i) colon, CB2R-IR membrane cellulari delle cellule ghiandolari (frecce bianche) e caliciformi (frecce vuote).

Scale bar: a-f, h-o 50 μ m;

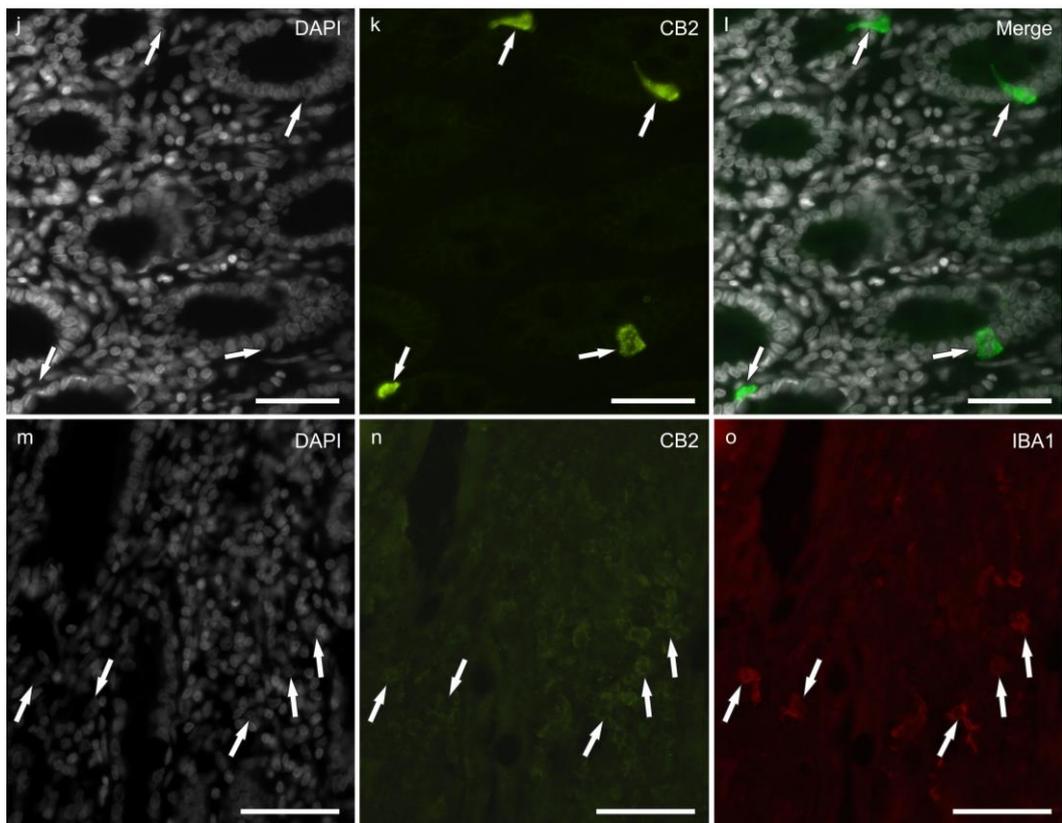


Figura 18b: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per il CB2R. Nuclei messi in evidenza con marcatore DAPI. j-l) le frecce indicano cellule enteroendocrine del colon positive al CB2R; m-o) macrofagi della lamina propria che coesprimono marcatura con CB2R (frecce)

Scale bar: j-o 50 μm ; g, 100 μm .

4.3 GPR55

L'immunoreattività al GPR55 è evidente principalmente a livello delle cellule epiteliali, delle cellule enteroendocrine, immunociti e neuroni enterici. In particolare si osserva positività con aspetto granulare nel citoplasma delle cellule enteroendocrine distribuite lungo il piloro, piccolo e grande intestino (**Figura 19 a-c**); nel grande intestino le cellule enteroendocrine risultano essere più grandi rispetto al piccolo intestino. Le cellule delle cripte del grande intestino mostrano un segnale positivo per il GPR55 nel citoplasma, debole e granulare (**Figura 19 b, c**). Gli immunociti della lamina propria e sopra la placca del Peyer risultano GPR55-IR (**Figura 19 d, e**). Non vi è colocalizzazione tra plasmacellule IgA-IR e GPR55-IR a livello della lamina propria (**Figura 19 f**). Sia il plesso mienterico che sottomucoso sono lievemente positivi al GPR55 (**Figura 19 g-i**).

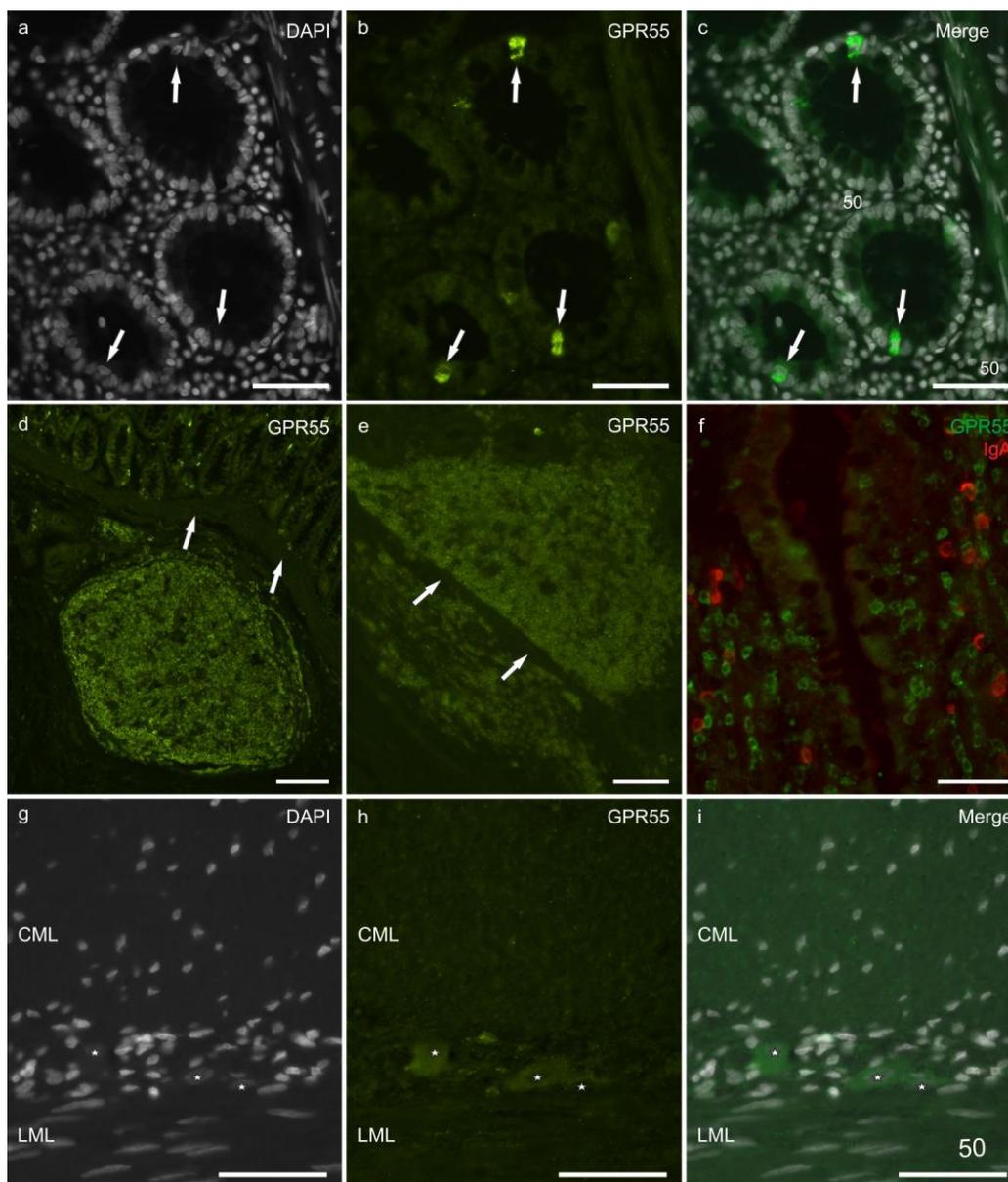


Figura 19: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per il GPR55. Nuclei messi in evidenza con marcatore DAPI. a-c) le frecce indicano positività al GPR55 su cellule enteroendocrine di colon (b); d-e) noduli linfatici intestinali GPR55-IR. Le frecce indicano la muscolaris mucosae; f) le cellule della lamina propria IgA-IR non sono GPR55-IR; g-i) plesso mienterico con nuclei positivi (stelle bianche) al GPR55. Abbreviazioni: LMC: circular muscle layer, strato muscolare circolare; LML: longitudinal muscle layer, strato muscolare longitudinale.

Scale bar: a-d, e-i 50 μ m; d, 100 μ m.

4.4 *PPAR α*

Il *PPAR α* è espresso principalmente dalle cellule parietali putative delle ghiandole piloriche (**Figura 20 a-c**), dagli immunociti intestinali (**Figura 20 d, e**), le cellule muscolari lisce (**Figura 20 f**) e, soprattutto, le cellule gliali enteriche (**Figura 20 g-i**). solo a livello dello stomaco le cellule gliali enteriche sono state osservate anche nella tunica muscolaris.

4.5 *PPAR γ*

Il *PPAR γ* è principalmente espresso nei nuclei dei neuroni del plesso mienterico (**Figura 20 j-m**). Inoltre, anche alcune cellule della lamina propria sono *PPAR γ* -IR (dato non mostrato).

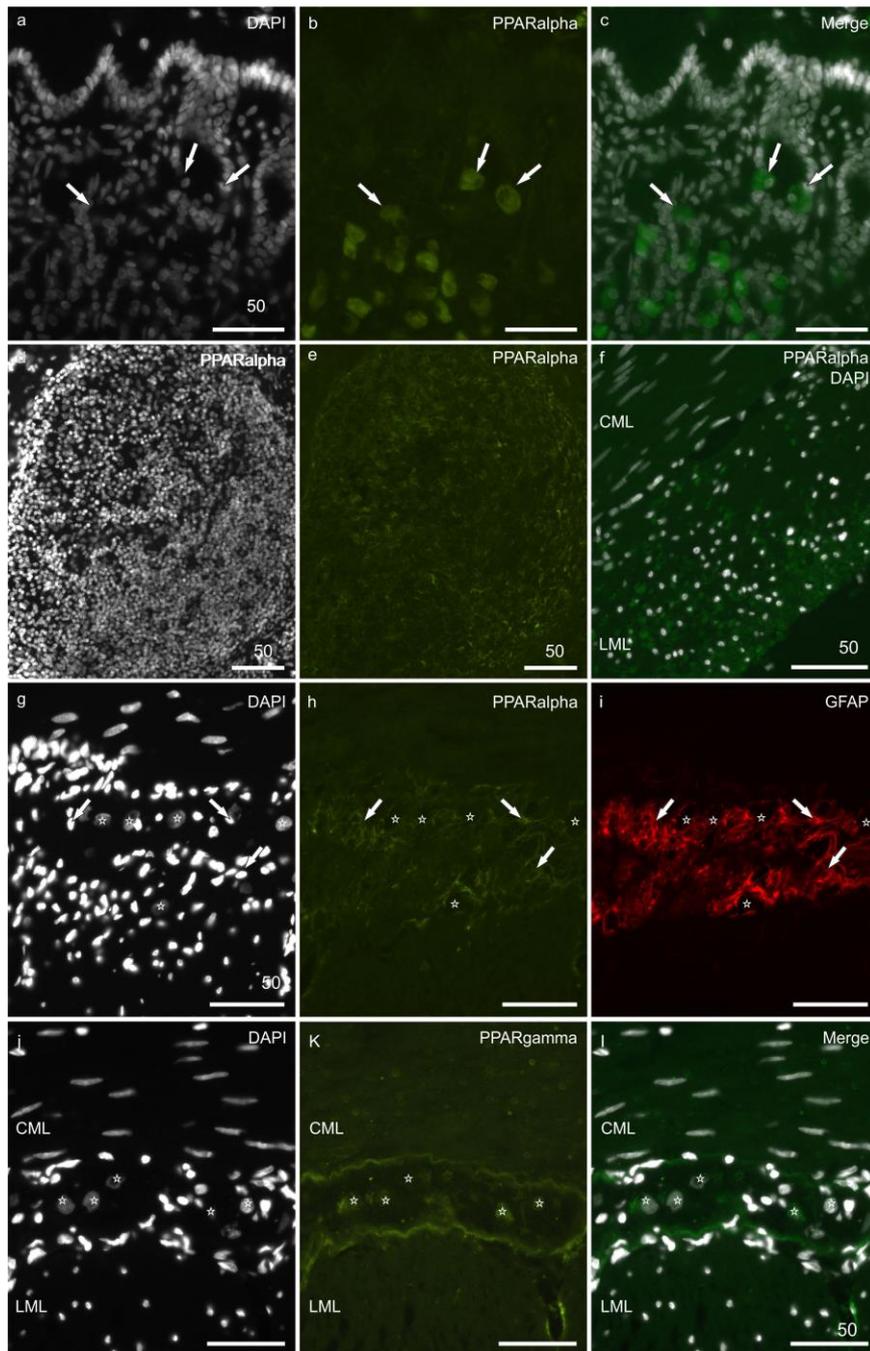


Figura 20: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per il PPAR α (a-i) e PPAR γ (j-l). I nuclei cellulari sono stati evidenziati con il marcatore nucleare DAPI. a-b) le frecce indicano tre ghiandole piloriche (probabilmente ghiandole parietali) che esprimono positività al PPAR α ; d-e) linfonodo intestinale con molti immunociti positivi al PPAR α ; f) cellule muscolari lisce dello strato muscolare longitudinale (LML) positive al PPAR α ; g-i) le stelle indicano il nucleo di alcuni neuroni del plesso mienterico. Le frecce indicano i nuclei di tre cellule gliali immunopositive al GFAP (anticorpo anti-proteina fibrillare acida della glia) (i) che co-esprimevano l'immunoreattività per il PPAR α ; j-l) Le stelle indicano i nuclei di alcuni neuroni del plesso mienterico, con debole positività per il PPAR γ . Abbreviazioni: LMC: circular muscle layer, strato muscolare circolare; LML: longitudinal muscle layer, strato muscolare longitudinale.

4.6 TRPA1

Sono stati osservati neuroni del plesso mienterico gastrico (**Figura 21 a, b**) e intestinale (**Figura 21 c**) e del plesso sottomucoso TRPA1-IR, ma la morfologia non è ancora stata investigata. Nella glia enterica è possibile anche osservare fasci di nervi TRPA1-IR. Nel piccolo e grande intestino, il TRPA1 è espresso dalle cellule goblet (**Figura 21 d-f**).

4.7 5-HT_{1a}R

Apparentemente, tutte le membrane cellulari delle cellule epiteliali del tGI sono positive al recettore 5-HT_{1a} (**Figura 21 g-i**). Anche la muscolatura liscia della tunica muscolaris, la *muscolaris mucosae* e i vasi sanguigni della sottomucosa sono positivi (dato non mostrato).

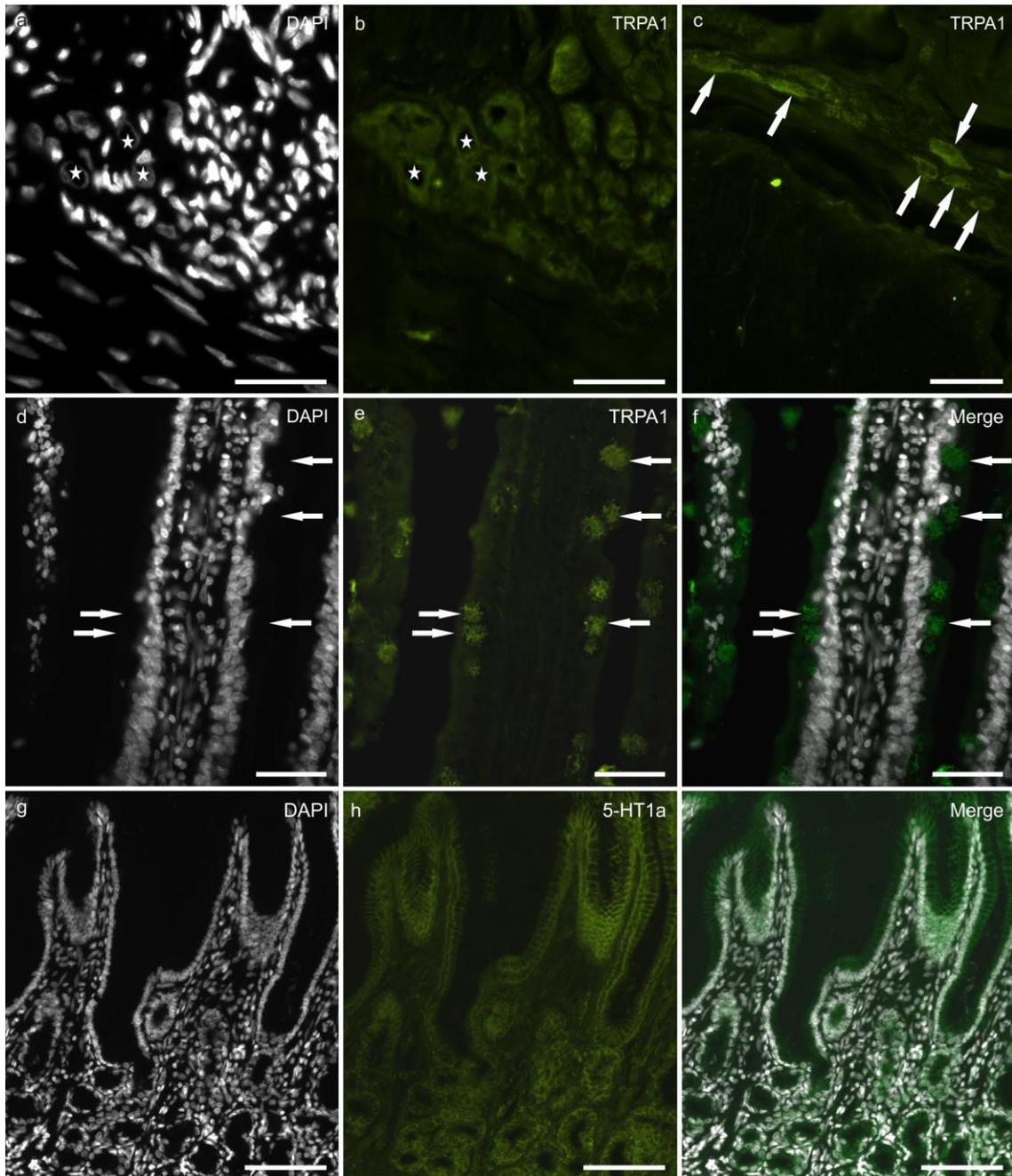


Figura 21: immagini di immunofluorescenza su criosezioni del tGI di gatto, marcatura per i ricettori TRPA1 (a-f) e 5-HT1a (g-i). I nuclei cellulari sono stati evidenziati con il marcatore nucleare DAPI. a, b) le stelle indicano nuclei di neuroni del plesso mienterico pilorico positivi al TRPA1; c) le frecce indicano neuroni del plesso mienterico duodenale positivi al TRPA1; d-f) cellule caliciformi intestinali positive al TRPA1; g-i) Mucosa pilorica in cui le cellule mucose e ghiandolari esprimevano una positività per il recettore 5-HT1a.

Scale bar: a-i, 50 μ m.

5 Discussione

Abbiamo osservato una debole reattività al CB1R a livello dei neuroni del plesso mienterico di gatto, questo dato è in linea con quanto osservato nelle altre specie come roditori, il furetto, cane e uomo (Kulkarni-Narla A and Brown DR 2000; Van Sickle MD et al. 2001; Coutts AA et al. 2002; Storr M et al. 2004; Duncan M et al. 2005a; Wright K et al. 2005; Marquez L et al. 2008; Galiazzo G et al., 2018; Grill M et al., 2019). Nei roditori la positività al CB1R è principalmente espressa a livello dei motoneuroni eccitatori colinergici, ma questo studio non ha avuto tuttavia come obiettivo l'analisi del fenotipo dei neuroni. Differenti tipi di cellule epiteliali nel gatto sono positive al CB1R, come le cellule della mucosa pilorica secernenti muco, le cellule goblet e le cellule enteroendocrine. Questo è in linea con quanto osservato sulla mucosa del tGI di uomo, dove CB1R-IR è evidente a livello di cellule gastriche parietali, cellule epiteliali del colon, cellule goblet e cellule enteroendocrine (Wright K et al., 2005; Pazos MR et al., 2008; Marquez L et al., 2008; Ligresti A et al., 2016). La presenza di queste cellule epiteliali positive al CB1R sembra essere cruciale per la loro rigenerazione e per la regolazione della permeabilità intestinale (Wright K et al., 2005; Karwad MA et al., 2017). L'espressione del CB1R su cellule epiteliali secernenti muco nel gatto indica che i cannabinoidi potrebbero influire/ridurre le secrezioni di muco lungo il tGI. Nell'uomo anche le cellule parietali sono positive al CB1R (Pazos MR et al., 2008); nel gatto ed anche nel cane (Galiazzo G et al., 2018) non abbiamo identificato positività per questo recettore a livello delle cellule parietali, ma l'abbiamo identificata sulle cellule enteroendocrine gastriche e intestinali. È noto che in condizioni fisiologiche l'attivazione del recettore CB1R riduce la secrezione di acidi gastrici e regola il rilascio di peptidi enteroendocrini, come la CCK, rilasciata dalle EECs del piccolo intestino (Sykaras AG et al., 2012). La riduzione delle secrezioni acide da parte delle cellule parietali potrebbe essere dovuta all'effetto dei cannabinoidi sulla secrezione di gastrina e istamina da parte delle cellule enteroendocrine gastriche (Adami M et al., 2002; Schubert ML 2016). L'ormone intestinale CCK agendo sulle terminazioni vagali induce uno stato di sazietà (Owyang C e Heldsinger A, 2011) anche nel gatto (Bado A et al., 1991); perciò, è plausibile considerare che i cannabinoidi possano ridurre la secrezione di CCK e

accrescere il senso di fame. Moss e colleghi hanno evidenziato che nei roditori le cellule enteroendocrine intestinali esprimono il CB1R e che la sua stimolazione sopprime la secrezione del polipeptide insulintropico glucosio-dipendente (GIP), un ormone enteroendocrino rilasciato dalla popolazione K di cellule enteroendocrine intestinali, e questo permette l'accumulo di glucosio e grasso. L'attivazione del CB1R non modifica la secrezione del GLP-1, perciò l'ipotesi che i cannabinoidi riducano la secrezione di CCK deve essere ulteriormente approfondita. I mastociti di gatto sono CB1R-IR. Storicamente, i mastociti occupano un ruolo chiave nelle reazioni allergiche e sono una delle maggiori riserve di istamina. Di solito i mastociti sono associati a condizioni patologiche come asma (Wouters MM et al., 2017) o giocano un ruolo chiave nell'interazione con i patogeni, specialmente se parassiti (Marshall JS 2004). I mastociti sono ampiamente coinvolti in condizioni patologiche non allergiche come ad esempio infezioni, IBD, intolleranze alimentari (Shea-Donohue T et al., 2010; Boeckxstaens G, 2015; Zhang L et al., 2016; Wouters MM et al., 2017; Bednarska O et al., 2017). Diversi studi dimostrano che il CB1R e il CB2R hanno un ruolo nella regolazione del sistema immunitario in generale e dei mastociti in particolare. È emerso da diversi studi che questi recettori sono in grado di inibire l'attivazione dei mastociti e perciò contribuiscono alla soppressione della risposta secretoria (Samson MT et al., 2003; Harvima IT et al., 2014). I mastociti hanno differenti ruoli nel tGI: regolano la permeabilità vascolare ed epiteliale, la secrezione di ioni, l'angiogenesi, la peristalsi, la fibrosi e la riparazione tissutale, l'immunità innata e adattativa, la difesa da batteri, la chemotassi e la nocicezione. Se si ha un'attivazione non controllata di mastociti, questo può rompere l'omeostasi intestinale e contribuire allo sviluppo di patologie del tGI come l'IBD (Bischoff SC 2007). Allo stesso tempo, i mastociti sono una difesa fondamentale contro le infezioni e per la regolazione della risposta immune innata e adattativa (Abraham SN et al., 2010).

Le cellule epiteliali del piccolo e grande intestino mostrano positività al CB2R. Vi sono evidenze che supportano l'idea che il CB2R sia in grado di preservare l'integrità della mucosa intestinale (Harvey BS et al., 2013; Yang H et al., 2016). Vi è uno studio che dimostra che l'attivazione di questo recettore inibisce il rilascio di IL-8 indotto da TNF- α da parte delle cellule epiteliali del colon (Ihenetu K et al., 2003). Era prevista l'espressione del CB2R a livello della lamina propria, visto che vi sono numerosi lavori in cui si attesta la presenza di questo recettore a livello di immunociti e cellule

infiammatorie (Wright K et al., 2008; Izzo AA and Sharkey KA, 2010; Gyires K and Zádori ZS, 2016; Lee Y et al., 2016; Grill M et al., 2019). Molti macrofagi IBA1-IR sono positivi anche al CB2R. Il sistema endocannabinoide funziona come regolatore della risposta immune del tGI (Acharya N et al., 2017), modulando tramite macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B il rilascio di citochine e la responsività (Ziring D et al., 2006). Recentemente Acharya et al. hanno dimostrato che nel topo l'attivazione del recettore CB2 aumenta il numero e le capacità soppressive dei macrofagi CX3CR1^{hi}. L'espressione di questo recettore sulle cellule enteroendocrine suggerisce che gli endocannabinoidi e gli agonisti di questi recettori abbiano un ruolo chiave nella produzione di ormoni e secrezione, svolgendo un ruolo di controllo dell'omeostasi. A livello del pancreas gli agonisti del recettore CB2 regolano le funzioni delle cellule β del Pancreas (Li C et al., 2010; Gruden G et al., 2016). Allo stato attuale resta da investigare se gli agonisti di questo recettore abbiano un ruolo nel controllo della secrezione di ormoni enteroendocrini.

Vi sono numerosi studi che dimostrano la presenza del recettore GPR55 nel sistema nervoso enterico di uomo e roditori, quindi non stupisce il fatto che via sia una positività anche nel gatto (Lin XH et al., 2011; Ross RA et al., 2012; Li K et al., 2013; Goyal H et al., 2017). Gli agonisti di questo recettore nei roditori rallentano il transito intestinale e riducono la contrattilità della muscolatura del colon indotta da LPS. Dato che l'attivazione di questo recettore non causa effetti sedativi a livello centrale, il GPR55 potrebbe essere considerato un target futuro per il trattamento di disordini della motilità a livello del colon (Li K et al., 2013). Dato che la PEA mostra forte affinità per il GPR55 (Petrosino S e Di Marzo V 2016), è plausibile pensare che questo cannabinoide potrebbe influenzare le dismotilità del tGI durante infiammazioni acute e croniche dell'intestino. Al contrario della PEA il CBD agisce come antagonista del GPR55 (Ligresti A et al., 2017); comunque Capasso e colleghi hanno evidenziato che anche il CBD inibisce selettivamente l'iperomotilità infiammatoria del tGI in un modello murino. Gli immunociti delle placche del Peyer della lamina propria di gatto sono reattivi a questo recettore. In altre specie, il GPR55 è stato già identificato in un gran numero di tipologie cellulari, come macrofagi, plasmacellule, neutrofili, NK, monociti e linfociti T (Balenga NA et al., 2011; Stancic A et al., 2015; Chiurchiù V et al., 2015; Taylor L et al., 2015; Lanuti M et al., 2015; Galiazzo G et al., 2018; Grill M et al., 2019). Il ruolo del GPR55 durante stati

infiammatori rimane controverso, è stato anche ipotizzato un ruolo pro-infiammatorio, dato che la somministrazione di antagonisti di questo recettore o agonisti inversi riduce l'infiammazione intestinale e diminuisce le citochine pro-infiammatorie e il richiamo di leucociti (Stancic A et al., 2015; Tuduri E et al., 2017; Grill M et al., 2019). Le cellule enteroendocrine sono positive al GPR55, suggerendo un ruolo di modulazione della funzione secretoria di queste cellule. È stato dimostrato che l'attivazione di particolari proteine G sulle cellule enteroendocrine (e.g. GPR41, GPR43, GPR119 e TGR5) innesca la secrezione di GLP-1 e 2 e PYY, peptidi del tGI conosciuti per regolare l'omeostasi energetica, il metabolismo del glucosio, la funzionalità della barriera intestinale e l'infiammazione metabolica (Cani PD et al., 2013). Il GPR55 nel topo e nell'uomo controlla la fisiologia delle isole del Langherhans (Liu B et al., 2016) perciò è plausibile che sulle cellule enteroendocrine favorisca la secrezione di ormoni. Infine, le cellule delle cripte del colon mostrano marcatura debole e granulare nel citoplasma, in linea con le scoperte di Grill et al. nel topo.

Il PPAR α appartiene ad una superfamiglia di recettori che si trovano a livello nucleare e una volta attivati da ligando innescano la trascrizione dei loro target che controllano il metabolismo del glucosio, dei lipidi e del colesterolo. Il PPAR α può essere attivato da acidi grassi introdotti con la dieta come la PEA (Petrosino V e Di Marzo S 2016) o da agonisti (Rigano D et al., 2017). L'attivazione di questo recettore nel tGI porta a effetti anti-nocicettivi e anti-infiammatori (Escher P et al., 2001; Azuma YT et al., 2010; Petrosino V and Di Marzo S, 2016). Quando il recettore viene attivato dalla PEA, il PPAR α sembra reagire biochimicamente con i canali TRPV1 (i.e. il recettore per la capsaicina dei neuroni nocicettivi), e l'interazione, che come detto prima prende il nome di *entourage effect* (Ambrosino P et al., 2013) sembra desensitizzare il recettore TRPV1. Come abbiamo già visto nel cane (Galiazzo G et al., 2018), anche nel gatto il PPAR α si localizza a livello della glia enterica (Liu YA et al., 2013; Sharkey KA 2015), che è comparabile agli astrociti presenti a livello centrale. La glia a questo livello rilascia fattori solubili che fungono da fattori chemotattici durante l'infiammazione; l'attivazione della glia amplifica l'infiammazione intestinale, rilasciando IL-6, la proteina chemotattica 1 dei monociti e S100B, che attivano una cascata biochimica che porta alla trascrizione di diverse citochine e induce l'attivazione dell'ossido nitrico sintasi (Cirillo C et al., 2011; Ochoa-Cortes F et al., 2016). Esposito e colleghi hanno dimostrato che la proteina S100B

richiama macrofagi nella mucosa e amplifica l'infiammazione del tGI e la PEA tramite PPAR α mitiga l'infiammazione intestinale riducendo l'espressione di S100 e *toll like receptor 4* da parte della glia. Cellule positive a PPAR α sono cellule morfologicamente simili a cellule parietali trovate a livello gastrico, in linea con la scoperta di Pazos che nell'uomo si hanno cellule parietali positive al CB1R. L'azione inibitoria dei cannabinoidi sulla secrezione acida gastrica è ben appurato (Pertwee RG 2001). Questo aspetto potrebbe essere causato da un effetto che hanno i cannabinoidi a livello centrale, i.e. i recettori cannabinoidi localizzati sulle terminazioni vagali gastriche, oppure un effetto a livello periferico, i.e. i recettori cannabinoidi localizzati sulle cellule parietali secernenti acidi. Non a caso, agonisti del PPAR α hanno azione antisecretoria a livello gastrico (Saha L 2015). Un altro effetto inibitorio periferico sulle secrezioni acide gastriche potrebbe essere legato all'espressione del PPAR α su cellule enteroendocrine che secernono gastrina o istamina, che normalmente stimolano la secrezione acida delle cellule parietali (Schubert ML 2016). L'ipergastrinemia indotta da agonisti del PPAR α è accompagnata da una diminuzione del numero di granuli in ogni cellula e ad un aumento relativo di granuli elettron-densi. Questi effetti sono simili a quelli indotti da pantoprazolo, un inibitore di pompe protoniche (Pathak R et al., 2007). Abbiamo notato diversi tipi di recettori per i cannabinoidi delle cellule enteroendocrine gastriche (CB1R, CB2R, PPAR α e GPR55), ma il PPAR α non è mai stato colocalizzato con istamina e gastrina sulle cellule enteroendocrine, perciò questa ipotesi rimane puramente speculativa, almeno nello stomaco dei felini. La localizzazione del PPAR α sulla muscolatura liscia del foglietto longitudinale suggerisce un ruolo di questo recettore nella motilità del tGI dei felini. Abbiamo osservato un pattern muscolare simile nel cane (Galiazzo G et al., 2018). Azuma ha dimostrato che il clofibrato, un agonista del PPAR α , rilassa la muscolatura longitudinale del colon di topo in una maniera PPAR α -indipendente.

Anche il PPAR γ appartiene alla stessa superfamiglia del PPAR α . In questo studio abbiamo osservato una debole marcatura al PPAR γ dei nuclei del plesso mienterico. Questo recettore ha un ruolo fondamentale nella neuroprotezione a livello centrale in disordini neurodegenerativi (Hung TY et al., 2019), ma allo stato attuale non ci sono studi sulla sua importanza a livello del sistema nervoso enterico. Il PPAR γ è un target del CBD,

una volta attivato riduce l'infiammazione intestinale principalmente attraverso la modulazione dell'asse neuro-immune (De Filippis D et al., 2011; Cough DG et al., 2017).

Il TRPA1 è un canale ionico in grado di captare specifiche sostanze chimiche nel cibo e in grado di trasdurre stimoli meccanici, di freddo e chimici. La sua presenza è attestata nei neuroni sensoriali anche nel gatto (dati non pubblicati), e in alcune cellule enteriche (principalmente neuroni inibitori) (Poole DP et al., 2011) e cellule enteroendocrine del tGI (Cho HJ et al., 2014). In questo studio abbiamo osservato neuroni enterici TRPA1-IR, ma non ne abbiamo caratterizzato ancora il fenotipo. Inoltre, anche le cellule goblet sono TRPA1 positive, probabilmente questo recettore ne influenza l'attività secretoria.

Il recettore per la serotonina 5-HT_{1a} è espresso da vari neuroni del sistema nervoso centrale e enterici (Kichgessner AL et al., 1996). In questo studio non abbiamo osservato neuroni enterici positivi a questo recettore, comunque, le cellule epiteliali del tGI sono marcate. La serotonina ha un ruolo chiave nella regolazione della motilità del tGI, nella sensibilità viscerale e nella secrezione di fluidi tramite specifici recettori. Tra questi recettori, è probabile che nel gatto il 5-HT_{1a} svolga un ruolo nell'omeostasi cellulare e secrezione. Comunque, non abbiamo trovato studi in letteratura che attestino questa ipotesi, eccetto alcuni su cellule epiteliali di rene trasfettate (Langlois X et al., 1996; Darmon M et al., 1988).

Il concetto di Sistema endocannabinoide è stato formulato da Di Marzo e Fontana nel 1995. Da allora, enormi progressi sono stati fatti nel definire gli elementi che compongono questo sistema e come questi adattino il tGI in varie condizioni. Il sistema endocannabinoide è un importante sistema regolatorio nel tGI, che lavora nel controllo sia della digestione che nella difesa da patogeni, due delle più importanti funzioni del tGI. Quindi, i cannabinoidi hanno un ruolo fondamentale nelle patologie del tGI. L'obiettivo è quello di trovare farmaci che siano in grado di riconoscere selettivamente recettori a livello periferico, che quindi non vadano ad intaccare le attività centrali, come purtroppo è successo in passato con il rimonabant.

Ad oggi l'unico tipo di Cannabis terapeutica ammessa in Italia si trova nello Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare di Firenze. Per "olio di canapa" si intende l'olio di semi di canapa che si ottiene dalla pressatura a freddo dei semini di canapa industriale, con

contenuto in fitocannabinoidi complessivamente nullo, ma ricco in terpenoidi. I terpenoidi hanno un precursore in comune con i fitocannabinoidi e sono ritenuti sicuri dalla Food and Drug Administration (FDA). Questi composti sembra agiscano in sinergia con i fitocannabinoidi in relazione al trattamento di dolore, infiammazione, depressione, ansia, epilessia, cancro, infezioni fungine e batteriche (Russo EB 2011). Il CBD ad oggi è uno dei cannabinoidi più studiati e il suo utilizzo si sta diffondendo nella pratica clinica sia in medicina umana che veterinaria. Avendo natura lipidica il suo assorbimento è difficoltoso e irregolare a livello del tGI, è generalmente ben tollerato e non dà dipendenza, inoltre sembra che antagonizzi l'effetto psicoattivo del Δ^9 -THC (Pre-Review Report. Cannabidiol. Expert Committee on Drug Dependence. 39th Meeting. Genova, 2017). Viene somministrato solitamente per via orale e ha un buon profilo di sicurezza, non è tossico o mutagenico, non induce catalessia, variazioni di frequenza cardiaca, pressione sanguigna o temperatura corporea, non altera l'assorbimento del cibo, la velocità di transito intestinale, le funzioni psicomotorie e psicologiche. I suoi effetti collaterali sono l'inibizione del metabolismo epatico di alcuni principi attivi farmaceutici, la riduzione dell'attività di alcuni loro sistemi *carrier*, la riduzione della fertilità e della vitalità cellulare in vitro (Bergamaschi MM et al., 2011). Ha proprietà antiinfiammatorie, analgesiche, ansiolitiche, anti-tumorali e antibatteriche (Zuardi AW et al., 1995; Malfait AM et al., 2000; Mechoulam R et al., 2007; Appendino G et al., 2008; Crippa JA et al., 2011; Serpell MP et al., 2013; Ligresti A et al., 2016; Morales P et al., 2017; Russo EB et al., 2018). La PEA invece è un nutraceutico presente in numerose fonti animali e vegetali, è anche un endocannabinoide prodotto da diversi tessuti in condizioni di stress. Il trattamento sistemico con PEA associata ad antiossidanti come luteolina e polidatina ha effetti antiinfiammatori, analgesici, neuroprotettivi e antipruriginosi. Ha un profilo di sicurezza molto elevato (Petrosino V e Di Marzo S, 2017; Britti D et al., 2017).

I nostri dati mostrano che i recettori classici e nuovi per i cannabinoidi sono ampiamente distribuiti nel tGI di felino, come abbiamo recentemente visto nel cane (Galiazzo G et al., 2018) e nel cavallo (progetto ongoing). Data la localizzazione, sembra plausibile considerare anche nel gatto che il sistema endocannabinoide è molto importante nel controllo delle funzioni gastrointestinali, come il mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale, l'attività sensoriale e motoria, l'appetito, la nausea, il vomito e il corretto microambiente cellulare (Pertwee RG 2001; Uranga JA et al., 2018). Questi

cambiamenti morfologici, che dovrebbero essere supportati da evidenze fisiologiche e farmacologiche, suggeriscono che gli agonisti per i recettori dei cannabinoidi sopra citati potrebbero avere un potenziale terapeutico nel controllo di condizioni infiammatorie a carico del tGI e sensibilità iperviscerale in queste specie studiate. Come discusso prima, queste ipotesi sono supportate dai buoni effetti protettivi a carico dell'intestino che hanno i due ligandi più studiati per questi recettori: la PEA e il CBD (Borrelli F et al., 2015; Couch DG et al., 2017).

6 Bibliografia

- Abalo R, Rivera AJ, Vera G, Suardíaz M, Martín MI. (2005). Evaluation of the effect of age on cannabinoid receptor functionality and expression in guinea-pig ileum longitudinal muscle-myenteric plexus preparations. *Neurosci Lett* 383, 176–181
- Abraham SN, St John AL. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 10: 440-452
- Acharya N, Penukonda S, Shcheglova T, Hagymasi AT, Basu S, Srivastava PK. (2017). Endocannabinoid system acts as a regulator of immune homeostasis in the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(19):5005-5010. doi: 10.1073/pnas.1612177114
- Adami M, Frati P, Bertini S, et al. (2002). Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol.* 135: 1598-1606
- Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, de Caro G, et al. (2002). Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 135, 1598–1606.
- Aghaei I, Rostampour M, Shabani M, Naderi N, Motamedi F, Babaei P, et al. (2015). Palmitoylethanolamide attenuates PTZ-induced seizures through CB1 and CB2 receptors. *Epilepsy Res*;117:23–8
- Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves M. (2009) Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci*; 30:79. [PubMed: 19070372]
- Alger BE (2012). Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *The Journal of Physiology.* 590: 2203-2212
- Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R. (1993). A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions*; 39:145–7.
- Appendino G, Gibbons S, Giana A. (2008). Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A Structure-Activity Study. *J. Nat. Prod.* 71: 1427-1430.
- Ashurst PR, Bohlmann F, Farkas L, Gaoni Y, Kling H, Mechoulam R, Gaoni Y et al. (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe.* 25: 175-213
- Atoyán R, Shander D, Botchkareva NV. (2009). Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 129: 2312-2315
- Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 2010;160:467–79

- Azuma YT, Nishiyama K, Matsuo Y, Kuwamura M, Morioka A, Nakajima H, Takeuchi T. (2010). PPAR α contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis. *Int Immunopharmacol.* 10(10):1261-7. doi: 10.1016/j.sukaintimp.2010.07.007
- Bado A, Durieux C, Moizo L, Roques B. P., Lewin M. J. (1991). Cholecystokinin-A receptor mediation of food intake in cats. *Am J Physiol.* 260: 693-697
- Baldassano S, Zizzo MG, Serio R, Mulè F. (2009). Interaction between cannabinoid CB(1) receptors and endogenous ATP in the control of spontaneous mechanical activity in mouse ileum. *Br J Pharmacol* 158, 243–251
- Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, et al. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* 21: 1452-1469
- Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, et al. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* 21: 1452-1469
- Barabas ME, Kossyрева EA, Stucky CL. (2012). TRPA1 Is Functionally Expressed Primarily by 586 IB4-Binding, Non-Peptidergic Mouse and Rat Sensory Neurons. *PLoS ONE.* 7: e47988
- Barann M, Molderings G, Brüß M, Bönisch H, Urban BW, Göthert M. (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol.* 137: 589-596
- Barone R. (2006). Stomaco. In Barone R. *Anatomia comparata dei mammiferi domestici.* Vol 3. 253-329
- Bednarska O, Walter SA, Casado-Bedmar M, Ström M, Salvo-Romero E, Vicario M, Mayer EA, Keita ÅV. (2017). Vasoactive Intestinal Polypeptide and Mast Cells Regulate Increased Passage of Colonic Bacteria in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology.* 5085: 35868-7
- Bellocchio L, Cervino C., Pasquali R., Pagotto U. (2008). The endocannabinoid system and energy metabolism. *Journal of Neuroendocrinology.* 20: 850-857
- Bellono NW, Bayrer JR, Leitch DB, et al. (2017). Enterochromaffin cells are gut chemosensors that couple to sensory neural pathways. *Cell.* 170: 185-198
- Bischoff SC, Krämer S. (2007). Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunol Rev.* 217: 329-337. Review
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, et al. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol;*163:463–8
- Boeckxstaens G. (2015). Mast cells and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Pharmacol.* 25:45-49
- Bolognini D, Costa B, Maione S, Comelli F, Marini P, Di Marzo V, Parolaro D, Ross RA, Gauson LA, Cascio MG, Pertwee RG. (2010). The plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *Br. J. Pharmacol.* 160, 677–687. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00756.x>

- Booker L, Naidu PS, Razdan RK, Mahadevan A, Lichtman AH. (2009). Evaluation of prevalent phytocannabinoids in the acetic acid model of visceral nociception. *Drug Alcohol Depend* 105, 42–47
- Borrelli F, Izzo AA. (2009). Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23, 33–49
- Borrelli F, Romano B, Petrosino S, et al. (2015). Palmitoylethanolamide, a naturally occurring lipid, is an orally effective intestinal anti-inflammatory agent. *Br J Pharmacol*. 172: 142-158
- Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. (2005). Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *European Journal of Pharmacology*. 517: 174-181
- Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. (2013) Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol*;716:61–76
- Brierley, DI, Samuels, J, Duncan, M, Whalley, BJ, Williams, CM, 2017. A cannabigerol- rich Cannabis sativa extract, devoid of [INCREMENT]9-tetrahydrocannabinol, elicits hyperphagia in rats. *Behav. Pharmacol.* 28, 280–284. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000285>
- Britti D, Crupi R, Impellizzeri D. (2017). A novel composite formulation of palmitoylethanolamide and quercetin decreases inflammation and relieves pain in inflammatory and osteoarthritic pain models. *Veterinary Research*. 13: 229
- Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. (2004). Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* 24, 2708–2715
- Cabral GA, Rogers TJ, Aron H Lichtman AH. (2015). Turning Over a New Leaf: Cannabinoid and Endocannabinoid Modulation of Immune Function. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 10: 193-203
- Caceres AI, Brackmann M, Elia MD, et al. (2009). A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 9099-9104
- Campos AC e Guimarães FS.(2008) .Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats.*Psychopharmacology*. 199: 223-230
- Cantarella G, Scollo M, Lempereur L, Saccani-Jotti G, Basile F, Bernardini R. (2011). Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells. *Biochem Pharmacol*. 82: 380-388
- Cao DS, Zhong L, Hsieh T, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, Premkumar LS. (2012). Expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Its Role in Insulin Release from Rat Pancreatic Beta Cells. *PLoS ONE*. 7. e38005
- Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG. (2010). Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent a 2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT 1A receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 159. 129-141

- Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG. (2010). Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT1A receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 159, 129–141. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00515.x>
- Cascio MG, Zamberletti E, Marini P, Parolaro D, Pertwee RG. (2015). The phytocannabinoid, 9-Tetrahydrocannabivarin, can act through 5-HT1a receptors to produce antipsychotic effects. *Br J Pharmacol.* 172. 1305-1318
- Caterina MJ. (2014) TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. *ACS Chem Neurosci*; 5:1107. [PubMed: 24915599]
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. (1999). Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*; 23:617–24.
- Chiurchiù V, Lanuti M, De Bardi M, Battistini L, Maccarrone M. (2015). The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells. *Int Immunol.* 27: 153-60
- Cho HJ, Callaghan B, Bron R, Bravo DM, Furness JB. (2014). Identification of enteroendocrine cells that express TRPA1 channels in the mouse intestine. *Cell and Tissue Research.* 356: 77-82
- Cho HJ, Callaghan B, Bron R, Bravo DM, Furness JB. (2014). Identification of enteroendocrine cells that express TRPA1 channels in the mouse intestine. *Cell and Tissue Research.* 356: 77-82.
- Cianchi F, Papucci L, Schiavone N, Lulli M, Magnelli L, Vinci MC, et al. (2008). Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 14, 7691–7700
- Cirillo C, Sarnelli G, Turco F, Mango A, Grosso M, Aprea G, et al. (2011). Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(9), e372-e382
- Citraro R, Russo E, Scicchitano F, van Rijn CM, Cosco D, Avagliano C, et al. (2013). Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*; 69:115–26
- Clarke R e Merlin M. (2013). *Cannabis: Evolution and Ethnobotany*. Berkeley. University of California Press
- Clevers H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* 154: 274-284
- Coburn AF, Graham CE, Haninger J. (1954). The effect of egg yolk in diets on anaphylactic arthritis (passive Arthus phenomenon) in the guinea pig. *J Exp Med*;100: 425–35
- Corey DP. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* 39: 585–588, 2003. doi:10.1016/S0896-6273(03)00505-1

- Coruzzi G, Adami M, Guaita E, Menozzi A, Bertini S, Giovannini E, et al. (2006). Effects of cannabinoid receptor agonists on rat gastric acid secretion: discrepancy between in vitro and in vivo data. *Dig Dis Sci* 51, 310–317
- Couch DG, Tasker C, Theophilidou E, Lund JN, O'Sullivan SE. (2017). Cannabidiol and palmitoylethanolamide are anti-inflammatory in the acutely inflamed human colon. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Oct 25;131(21):2611-2626. doi: 10.1042/CS20171288. Print 2017 Nov 1.
- Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S. (2002). Localization of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol*. 448: 410-422
- Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S. (2002). Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J Comp Neurol*. 448: 410–22
- Crippa JA, Derenusson GN, Ferrari TB, et al. (2011). Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *Journal of Psychopharmacology*. 25: 121-130
- D'Argenio G, Petrosino S, Gianfrani C, Valenti M, Scaglione G, Grandone I, et al. (2007). Overactivity of the intestinal endocannabinoid system in celiac disease and in methotrexate-treated rats. *J Mol Med* 85, 523–530
- Darmon M, Langlois X, Suffisseau L, Fattaccini CM, Hamon M. (1998). Differential membrane targeting and pharmacological characterization of chimeras of rat serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors expressed in epithelial LLC-PK1 cells. *J Neurochem*. 71: 2294-2303
- De Filippis D, Esposito G, Cirillo C, Cipriano M, De Winter BY, Scuderi C, Sarnelli G, Cuomo R, Steardo L, De Man JG, Iuvone T. Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One*. 2011;6(12):e28159. doi: 10.1371/journal.pone.0028159
- De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, Di Marzo V. (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther*; 325:1007. [PubMed: 18354058]
- Dejesus E, Rodwick BM, Bowers D, Cohen CJ, Pearce D. (2007). Use of dronabinol improves appetite and reverses weight loss in HIV/AIDS-infected patients. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*. 6: 95-100
- Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Pawlik WW, et al. (2006). Cannabinoids in acute gastric damage and pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 57(suppl 5), 137–154
- Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 2006;78:549–63.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1949

- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1949
- Di Marzo V, De Petrocellis L. (2010). Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr Med Chem*; 17:1430. [PubMed: 20166923]
- Di Marzo V, De Petrocellis L. (2012) Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci*;367:3216–28
- Di Marzo V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7, 438–455
- Di Marzo V. (2011). Endocannabinoids: an appetite for fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12567-8. doi: 10.1073/pnas.1109567108. Epub 2011 Jul 21.
- Donvito G, Nass SR, Wilkerson JL, Curry ZA, Schurman LD, Kinsey SG, Lichtman AH. (2018). The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology REVIEWS*. 43: 52-79
- Duncan M, Thomas AD, Cluny NL, et al. (2008). Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295: 1255-1265
- Duncan M, Thomas AD, Cluny NL, Patel A, Patel KD, Lutz B, et al. (2008). Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G1255–G1265.
- Earley S, Gonzales AL, Crnich R. (2009). Endothelium-Dependent Cerebral Artery Dilation Mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circulation Research*. 104: 987-994
- Edwards JG. (2014). TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Progress in Drug Research*. 68: 77-104
- El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Killough SA, Lundy FT. (2011). Human Dental Pulp Fibroblasts Express the “Cold-sensing” Transient Receptor Potential Channels TRPA1 and TRPM8. *Journal of Endodontics*. 37: 473–478
- Elphick MR, Egertová M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 356: 381-408
- Epstein HA. (2010). A natural approach to soothing atopic skin. *Skinmed*. 8: 95-97
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. (2001). Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 142:4195–202
- Esfandyari T, Camilleri M, Ferber I, Burton D, Baxter K, Zinsmeister AR. (2006). Effect of a cannabinoid agonist on gastrointestinal transit and postprandial satiation in healthy human subjects: a randomized, placebo-controlled study. *Neurogastroenterol Motil* 18, 831–838.

- Esposito E, Cuzzocrea S. Palmitoylethanolamide in homeostatic and traumatic central nervous system injuries. (2013). *CNS Neurol Disord Drug Targets*;12:55–61.
- Esposito E, Cuzzocrea S. Palmitoylethanolamide is a new possible pharmacological treatment for the inflammation associated with trauma. (2013). *Mini-Rev Med Chem*;13(2):237–55.
- Esposito E, Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Cuzzocrea S. (2012). Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One*;7, e41880
- Everest P. (2007). Stress and bacteria: microbial endocrinology. *Gut*. 56: 1037-1038
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 3376-3380
- Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, et al. (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *The Journal of Experimental Medicine*. 203: 1105-1116.
- Ferrè S, Lluís C, Justinova Z, Quiroz C, Orru M, Navarro G et al. Adenosine cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal functions. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 443-53
- Fioramonti J e Bueno L. (2008). Role of cannabinoid receptors in the control of gastrointestinal motility and perception. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2, 385–397
- Fothergill LJ e Furness JB. (2018). Diversity of enteroendocrine cells investigated at cellular and subcellular levels: the need for a new classification scheme. *Histochemistry and Cell Biology*. 150:693-702
- Fouda HG, Lukaszewicz J, Luther EW. Selected ion monitoring analysis of CP-55,940, a cannabinoid derived analgetic agent. *Biomedical & environmental mass spectrometry*. 1987; 14:599–602. [PubMed: 2962662]
- Frankhauser M. (2002). History of Cannabis in western medicine. In Grotenherman F, e Russo E. *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential*. 37-49. New York: Haworth
- Frappier BL. (2000). Apparato digerente. In Dellmann H. D. e Eurell J. A. *Anatomia microscopica veterinaria*. II ed. 223-274
- Galiazzo G, Giancola F, Stanzani A, Fracassi F, Bernardini C, Forni M, Pietra M, Chiocchetti R. (2018). Localization of cannabinoid receptors CB1, CB2, GPR55 and PPARα in the canine gastrointestinal tract. *Histochemistry and Cell Biology*. doi: 10.1007/s00418-018-1684-7
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, et al. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*;232:54–61
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, et al. (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*;30:2017–24.

- Gerbe F e Jay P. (2016). Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunology*. 9: 1353-1359
- Germanò MP, D'Angelo V, Mondello MR, Pergolizzi S, Capasso F, Capasso R, et al. (2001). Cannabinoid CB1-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363, 241–244
- Gershon MD. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 20: 14-21
- Ghosh S, Wise LE, Chen Y, Gujjar R, Mahadevan A, Cravatt BF, et al. (2013). The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. *Life Sci*;92:498–505
- Giancola F, Rambaldi AM, Bianco F, Iusco S, Romagnoli N, Tagliavia C, Bombardi C, Clavenzani P, De Giorgio R, Chiocchetti R. (2017). Localization of the 5-hydroxytryptamine 4 receptor in equine enteric neurons and extrinsic sensory fibers. *Neurogastroenterology and Motility*. 29. doi: 10.1111/nmo.13045
- Godlewski G, Offertaler L, Wagner JA, Kunos G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 89: 105-111
- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J*;347:369–73
- Gómez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J. Neurosci* 22, 9612–9617
- Goodell MA, Nguyen H, Shroyer N. (2015). Somatic stem cell heterogeneity: Diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16. 299-309
- Goyal H, Singla U, Gupta U, May E. (2017). Role of cannabis in digestive disorders. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 29: 135-143
- Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. (2007). 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* 121, 2172–2180.
- Greydanus DE, Hawver EK, Greydanus MM, Merrick J. (2013). Marijuana: current concepts. *Frontiers in Public Health*. 1: 42
- Gribble FM e Reimann F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*. 78: 277-299
- Grill M, Hasenoehrl C, Kienzl M, Kargl J, Schicho R. (2019). Cellular localization and regulation of receptors and enzymes of the endocannabinoid system in intestinal and systemic inflammation. *Histochem Cell Biol*. 151: 5-20
- Gruden G, Barutta F, Kunos G, Pacher P. (2016). Role of the endocannabinoid system in diabetes and diabetic complications. *Br J Pharmacol*. 173:1116-1127

- Guagnini F, Valenti M, Mukenge S, Matias I, Bianchetti A, Di Palo S, et al. (2006). Neural contractions in colonic strips from patients with diverticular disease: role of endocannabinoids and substance P. *Gut* 55, 946–953
- Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Shiloah S, Goldenberg D, Horowitz M, et al. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:14228–14233. [PubMed: 10588688]
- Hanus LE, Shohami E, Bab I, Mechoulam R. (2014). N-Acyl amino acids and their impact on biological processes. *Biofactors*. 40: 381-388
- Hanus LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliatalata-Scafati O, Appendino G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1357–1392 <https://doi.org/10.1039/c6np00074f>
- Harvey BS, Nicotra LL, Vu M, Smid SD. (2013). Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates cytokine-evoked mucosal damage in a human colonic explant model without changing epithelial permeability. *Cytokine*. 63: 209-217
- Hasenoehrl C, Storr M, Schicho R. (2017). Cannabinoids for treating inflammatory bowel diseases: where are we and where do we go? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 11: 329-337
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *The FASEB Journal*. 23: 183-193
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *The FASEB Journal*. 23: 183-193
- Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol. Ther.* 133, 79–97. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.09.002>
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, et al. (1999) Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 289:1427–1433. [PubMed: 10336536]
- Hong S, Fan J, Kemmerer ES, Evans S, Li Y, Wiley JW. (2009). Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. *Gut* 58, 202–210
- Hoover B, Baena V, Kaelberer MM, Getaneh F, Chinchilla S, Bohórquez DV. (2017). The intestinal tuft cell nanostructure in 3D. *Scientific reports*. 7: 1652
- Hornby PJ, Prouty SM. (2004). Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception. *Br J Pharmacol*. 141: 1335-1345
- Howlett AC, Champion TM, Wilken GH, Mechoulam R. Stereochemical effects of 11-OH-delta 8- tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology*. 1990; 29:161–165. [PubMed: 2158635] 83

- Howlett AC, Mukhopadhyay S. (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids*;108:53–70
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002; 68–69:619– 631
- Hu G, Ren G, Shi Y. (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation. *Oncogene*. 30: 139-141
- Hung TY, Chu FL, Wu DC, Wu SN, Huang CW. (2019). The Protective Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma in Seizure and Neuronal Excitotoxicity. *Mol Neurobiol*. 2019 Jan 8. doi: 10.1007/s12035-018-1457-2. [Epub ahead of print].
- Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*. 62: 107-128
- Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research* 62: 107–128
- Iannotti FA, DiMarzo V, Petrosino S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*. 62: 107-128
- Iannotti FA, Piscitelli F, Martella A, et al. (2013). Analysis of the “endocannabinoidome” in peripheral tissues of obese Zucker rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 89: 127-13
- Iannotti FA, Silvestri C, Mazzarella E, et al. (2014). The endocannabinoid 2-AG controls skeletal muscle cell differentiation via CB1 receptor-dependent inhibition of Kv7 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111: 2472-2481
- Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AV, Bazet M, Dallas M, Whalley BJ. (2015). Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics* 12, 699–730 <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0377-3>
- Iwaoka E, Wang S, Matsuyoshi N, Kogure Y, Aoki S, Yamamoto S, et al. (2015). Evodiamine suppresses capsaicin-induced thermal hyperalgesia through activation and subsequent desensitization of the transient receptor potential V1 channels. *J Nat Med*
- Izzo AA e Capasso F. (2006). Marijuana for cholera therapy. *Trends Pharmacol Sci* 27, 7–8.
- Izzo AA e Sharkey KA. (2010). Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. *Pharmacology & Therapeutics*. 126: 21-38
- Izzo AA, Camilleri M. (2009). Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacol Res*. 60, 117–125
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. 2009. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci*. 30, 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.006>

- Izzo AA, Mascolo N, Capasso R, Germanò MP, De Pasquale R, Capasso F. (1999). Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 221–223
- Janero DR e Makriyannis A. (2009). Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 14: 43-65
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. (1999). An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 7325-7333
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, et al. (2004) Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*; 66:204–8
- Joseph J, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. (2004). Anandamide is an endogenous inhibitor for the migration of tumor cells and T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 53, 723–728
- Karwad MA, Couch DG, Theophilidou E, Sarmad S, Barrett DA, Larvin M, Wright KL, Lund JN, O'Sullivan SE. (2017). The role of CB1 in intestinal permeability and inflammation. *FASEB J*. 31(8):3267-3277. doi: 10.1096/fj.201601346R
- Katzung BG. (2007). Istamina, serotonina ed alcaloidi della segale cornuta. In Katzung B. G. *Farmacologia generale e clinica*. VII ed.: 254-275
- Ke P, Shao BZ, Xu ZQ, Wei W, Han BZ, Chen XW, Su DF, Liu C. (2016). Activation of Cannabinoid Receptor 2 Ameliorates DSS-Induced Colitis through Inhibiting NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *PLoS One*. 11: e0155076
- Kirchgessner AL, Liu MT, Raymond JR, Gershon MD.(1996). Identification of cells that express 5-hydroxytryptamine1A receptors in the nervous systems of the bowel and pancreas. *J Comp Neurol*. 1996 Jan 15;364(3):439-455
- Klein TW, Cabral GA. (2006). Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 50–64
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A delta/C-fibers and colocalization with trk receptors. *Journal of Comparative Neurology*. 493: 596-606
- Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN. (2006). Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 291: C424–C432
- Ku SK, Lee HS, Lee JH. (2003). An immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the C57BL/6 mice. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 32: 21-28
- Kulkarni-Narla A e Brown DR. (2000). Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res*. 302: 73-80

- Kunos G. (2007). Understanding metabolic homeostasis and imbalance: what is the role of the endocannabinoid system? *Am J Med* 120(9 Suppl 1), S18–S24
- Langlois X, el Mestikawy S, Arpin M, Triller A, Hamon M, Darmon M. (1996). Differential addressing of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in transfected LLC-PK1 epithelial cells: a model of receptor targeting in neurons. *Neuroscience*. 74: 297-302.
- Lanuti M, Talamonti E, Maccarrone M, Chiurchiù V. (2015). Correction: activation of GPR55 receptors exacerbates oxLDL-induced lipid accumulation and inflammatory responses, while reducing cholesterol efflux from human macrophages. *PLoS One*. 10
- Lee Y, Jo J, Chung HY, Pothoulakis C, Im E. (2016). Endocannabinoids in the gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 311: G655–G666.
- Li C, Bowe JE, Jones PM, Persaud SJ. (2010). Expression and function of cannabinoid receptors in mouse islets. *Islets*. 2: 293-302
- Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, Zimmer A, Göke B, Sharkey KA, Storr M. (2013). A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology*. 71:255–263
- Lichtman AH, Leung D, Shelton CC, Saghatelian A, Hardouin C, Boger DL, et al. (2004). Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther*;311:441–8
- Liebich HG. (2012). Apparato digerente. In Liebich H.-G. *Istologia e anatomia microscopica dei mammiferi domestici e degli uccelli*. I ed. italiana. 191-248
- Ligresti A, De Petrocellis L, Di Marzo V. (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol Rev*. 96(4):1593-1659
- Lin XH, Yuece B, Li YY, Feng YJ, Feng J Y, Yu LY, Li K, Li YN, Storr, M. (2011). A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. *Neurogastroenterology & Motility*. 23(9):862-e342
- Liu YA, Chung YC, Pan ST, Shen MY, Hou YC, Peng SJ, Pasricha PJ, Tang SC. (2013). 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol Motil*. 25(5):e324-38. doi: 10.1111/nmo.12115
- Lo Verme J, Duranti A, Tontini A, et al. (2009). Synthesis and characterization of a peripherally restricted CB1 cannabinoid antagonist, URB447, that reduces feeding and body-weight gain in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19: 639-643
- López-González MJ, Luis E, Fajardo O, Meseguer V, Gers-Barlag K, Niñerola S, Viana F. (2017). TRPA1 Channels Mediate Human Gingival Fibroblast Response to Phenytoin. *Journal of Dental Research*. 96: 832-839.

- MacNaughton WK, Van Sickle MD, Keenan CM, Cushing K, Mackie K, Sharkey KA. (2004). Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286: 863-871
- Malan TP, Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. (2003). CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol*. 3: 62-67
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 9561-9566
- Malfitano AM, Basu S, Maresz K, Maurizio Bifulco M, Dittel B. N. (2014). What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Seminars in Immunology*. 26: 369-379
- Malfitano AM, Laezza C, D'Alessandro A, Procaccini C, Saccomanni G, Tuccinardi T, et al. Effects on immune cells of a new 1,8-naphthyridin-2-one derivative and its analogues as selective CB2 agonists: implications in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013; 8:62511
- Malfitano AM, Laezza C, Saccomanni G, Tuccinardi T, Manera C, Martinelli A, et al. Immunomodulation and properties of absorption and blood brain barrier permeability of 1,8-naphthyridine derivatives. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8:1077–1086. [PubMed: 24081326]
- Manara L, Croci T, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, et al. (2002). Functional assessment of neuronal cannabinoid receptors in the muscular layers of human ileum and colon. *Dig Liver Dis* 34, 262–269
- Márquez L, Abanades S, Andreu M. (2008). Endocannabinoid system and bowel inflammation. *Med Clin (Barc)*. 2008 Oct 18;131(13):513-7. (2008,
- Marshall JS. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 4: 787-799
- Martínez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Oñatibia-Astibia A, Zamarbide M, Ricobaraza A, Navarro G, et al. (2014) CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp Neurol*;261:44–52
- Matias I e Di Marzo V. (2006). Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *Journal of Endocrinological Investigation*. 29: 15-26
- Matias I e Di Marzo V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 18, 27–37
- Mattace Raso G, Russo R, Calignano A, Meli R. Palmitoylethanolamide in CNS health and disease. (2014). *Pharmacol Res*;86:32–41.
- Mawe GM e Hoffman JM. (2013). Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 10: 473-486
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50: 83-90

- Mechoulam R, Feigenbaum JJ, Lander N, Segal M, Jarbe TU, Hiltunen AJ, et al. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*. 1988; 44:762–764. [PubMed: 3416993]
- Mechoulam R. (1986). The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. In Mechoulam, R. *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. 1-19. Boca Raton: CRC
- Meents JE, Ciotu C, Fischer MJM. (2018). TRPA1—a molecular view. *Journal of Neurophysiology*. 121: 427-443
- Meneses AMC, Schneeberger K, Kruitwagen HS, Penning LC, van Steenbeek FG, Burgener IA, Spee B. (2016). Intestinal Organoids—Current and Future Applications. *Veterinary Sciences*. 3: pii: E31
- Meyer JS e Quenzer LF. (2010). Marijuana e cannabinoidi. In Meyer J. S. e Quenzer L. F. *Psicofarmacologia. Farmaci, cervello e comportamento*. 381-404
- Mor M, Rivara S, Lodola A, Plazzi PV, Tarzia G, Duranti A, et al. (2004). Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure–activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem*;47:4998–5008.
- Morales M, Wang SD, Diaz-Ruiz O, Jho DHJ. (2004). Cannabinoid CB1 Receptor and Serotonin 3 Receptor Subunit A (5-HT3A) Are Co-expressed in GABA Neurons in the Rat Telencephalon. *Journal of Comparative Neurology*. 468: 205-216
- Morales P, Hurst DP, Reggio PH. (2017). Molecular Targets of the Phytocannabinoids—A Complex Picture. *Progress in the chemistry of organic natural products*. 103: 103-131
- Moran M, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. (2011) Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 10:601. [PubMed: 21804597]
- Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Whyte L, Díaz-Arteaga A, Vázquez-Martínez R, Rotellar F, et al. (2012) The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes*;61:281–91
- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. (1999). Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther*;291:893–902
- Muccioli GG e Stella N. (2008) Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacology*. 54: 16-22
- Mulè F, Amato A, Baldassano S, Serio R. (2007). Evidence for a modulatory role of cannabinoids on the excitatory NANC neurotransmission in mouse colon. *Pharmacol Res* 56, 132–139
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Journal of Neuroscience*. 25: 4052-4061
- Nagy I, Friston D, Valente JS, Torres Perez JV, Andreou AP. (2014). Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Prog Drug Res*;68:39–76

- Nagy I, Friston D, Valente JS, Torres Perez JV, Andreou AP. (2014). Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Progress in Drug Research*. 68: 39-76
- Naidu PS, Booker L, Cravatt BF, Lichtman AH. (2009). Synergy between enzyme inhibitors of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase in visceral nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 48–56
- Navarrete M, Araque A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*; 68(1):113–26
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 464: 1367-1370
- Nicolussi S, Gertsch J. (2015). Endocannabinoid transport revisited. *Vitam Horm*;98: 441–85.
- Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, et al. (2009). TRPA 1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 3408-3413
- Ochoa-Cortes F, Turco F, Linan-Rico A, Soghomonyan S, Whitaker E, Wehner S, Cuomo R, Christofi FL. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 22: 433-449
- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362: 928-934
- Oliveira da Cruz JF, Robin LM, Drago F, Marsicano G, Metna-Laurent M. (2015). Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): a new player in the tripartite synapse. *Neuroscience*. 323: 35-42
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, et al. (2008b) Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. *Ann N Y Acad Sci* ;1139:434–49
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, et al. (2008a) Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One*;20(3), e1640
- Owyang C e Heldsinger A. (2011). Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *J Neurogastroenterol Motil*. 17: 338-348
- Pacheco M, Childers SR, Arnold R, Casiano F, Ward SJ. Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991; 257:170–183. [PubMed: 1902257]
- Pagano, E, Montanaro, V, Di Girolamo, A, Pistone, A, Altieri, V, Zjawiony, JK, Izzo, AA, Capasso, R. (2015). Effect of non-psychotropic plant-derived cannabinoids on bladder contractility: focus on cannabigerol. *Nat. Prod. Commun*. 10, 1009–1012
- Parolaro D e Rubino T. (2012). Il sistema endocannabinoide. In Clementi F. e Fumagalli G., *Farmacologia generale e molecolare*. 4: 569-576

- Parolaro D e Rubino T. (2012). Il sistema endocannabinoide. In Clementi F. e Fumagalli G., *Farmacologia generale e molecolare*. 4: 569-576
- Pazos MR, Tolón RM, Benito C, et al. (2008). Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem*. 56: 511-516
- Pertwee RG 2006. Cannabinoid receptor ligands. *Tocris Bioscience Scientific Review*. 27: 1-16
- Pertwee RG. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* ;74:129–80
- Pertwee RG. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol*. 153, 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>.
- Pertwee RG. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Current Medicinal Chemistry*. 17: 1360-1381
- Petrosino S e Di Marzo V. (2016). The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *Br J Pharmacol*. 174: 1349-1365
- Petrosino S, Schiano Moriello A, Cerrato S, Fusco M, Puigdemont A, De Petrocellis L, Di Marzo V. (2015).The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels. *Br J Pharmacol*
- Pierezan F, Mansell J, Ambrus A, Rodrigues Hoffmann A (2014) Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *J Comp Pathol* 151:347-351. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.003>
- Piluzza G, Delogu, G, Cabras, A., Marceddu, S, Bullitta, S. (2013). Genetic Resources and Crop Evolution. 60: 2331-2342
- Pisanti S e Bifulco M. (2018). Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen. *Journal of Cellular Physiology*. 1-10
- Pisanti S, Borselli C, Oliviero O, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. (2007). Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: Correlation to its tumor-suppressor efficacy. *Journal of Cellular Physiology*. 211: 495-503
- Pisanti S, Malfitano AM, Grimaldi C, Santoro A, Gazzero P, Laezza C, Bifulco M. (2009). Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 23: 117-131
- Poole DP, Pelayo JC, Cattaruzza F, Kuo YM, Gai G, Chiu JV, Bron R, Furness JB, Grady EF, Bunnett NW. (2011). Transient receptor potential Ankyrin 1 is expressed by inhibitory motoneurons of the mouse intestine. *Gastroenterology*. 141: 565-575
- Poole DP, Pelayo JC, Cattaruzza F, Kuo YM, Gai G, Chiu JV, Bron R, Furness JB, Grady EF, Bunnett NW. (2011). Transient receptor potential Ankyrin 1 is expressed by inhibitory motoneurons of the mouse intestine. *Gastroenterology*. 141: 565-575

- Przybyla JA, Watts VJ. Lingand-induced regulation and localization of cannabinoid CB1 and dopamine D2L receptor heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332:710-9
- Qin N, Neepser MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin M, Flores CM. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*. 28: 6231-6238
- Re G, Barbero R, Miolo A Di Marzo V. (2007). Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. *Veterinary Journal*.173: 21-30
- Re G, Barbero R, Miolo A, Di Marzo V. (2007). Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. *Vet J*;173:21–30.
- Rigano D, Sirignano C, Tagliatela-Scafati O. (2017). The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharm Sin B*. 7(4):427-438. doi: 10.1016/j.apsb.2017.05.005
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, et al. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284:644–650. [PubMed: 9454810]
- Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Molecular Pharmacology*. 70: 101-111
- Romano B, Borrelli F, Fasolino I, Capasso R, Piscitelli F, Cascio M, Pertwee R, Coppola D, Vassallo L, Orlando P, Di Marzo V, Izzo A. (2013). The cannabinoid TRPA1 agonist cannabichromene inhibits nitric oxide production in macrophages and ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol*. 169, 213–229. <https://doi.org/10.1111/bph.12120>
- Romano B, Pagano E, Orlando P, Capasso R, Cascio MG, Pertwee R, Marzo VD, Izzo AA, Borrelli F. (2016). Pure $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin and a *Cannabis sativa* extract with high content in $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin inhibit nitrite production in murine peritoneal macrophages. *Pharmacol. Res.* 113(Pt A), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.045>
- Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, et al. Agonistinverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol*. 1999; 126:665–672. [PubMed: 10188977]
- Ross RA. (2011). L- α -lysophosphatidylinositol meets GPR55: a deadly relationship. *Trends Pharmacol Sci*. 32: 265-269
- Ross RA. (2011). L- α -lysophosphatidylinositol meets GPR55: a deadly relationship. *Trends Pharmacol Sci*. 32: 265-269
- Russo EB. (2018). Cannabis Therapeutics and the Future of Neurology. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 12: 51

- Rutkowska M, Fereniec-Goltbiewska L. (2006). ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective cannabinoid CB1 receptor agonist, protects against aspirin-induced gastric ulceration. *Pharmazie* 61, 341–342
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, et al. (2007). The orphan receptor gpr55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 152: 1092-1101
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*;152:1092–101
- Samson MT, Small-Howard A, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, Stokes AJ, Turner H. (2003). Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. *J Immunol.* 170: 4953-4962
- Samuelson DA. (2007). Digestive System I: Oral Cavity and Alimentary Canal. In Samuelson D. A. *Textbook of veterinary histology.* 303-352
- Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Díaz-Laviada I. (2003). Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal*;15:851–9
- Sanson M, Bueno L, Fioramonti J. (2006). Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol Motil* 18, 949–956
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, et al. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol Brain Res.* 64: 193-198
- Schubert ML. (2016). Gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol.* 32: 452-460
- Serpell MG, Notcutt W, Collin C. (2013). Sativex long-term use: an open-label trial in patients with spasticity due to multiple sclerosis. *Journal of Neurology.* 260: 285-295
- Sharir H, Console-Bram L, Mundy C, Popoff SN, Kapur A, Abood ME. (2012). The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. *Journal of NeuroImmune Pharmacology.* 7: 856-865
- Sharkey KA. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *J. Clin. Invest.* 125(3):918-25. doi: 10.1172/JCI76303
- Shea-Donohue T, Stiltz J, Zhao A, and Notari L. (2010). Mast cells. *Curr Gastroenterol Rep.* 12(5): 349–357. doi:10.1007/s11894-010-0132-1
- Shinjyo N e Di Marzo V. (2013). The effect of cannabichromene on adult neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Int.* 63, 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.08.002>
- Skaper SD, Facci L, Barbierato M, Zusso M, Bruschetta G, Impellizzeri D, et al. (2015). N-Palmitoylethanolamine and neuroinflammation: a novel therapeutic strategy of resolution. *Molecular neurobiology,* 52(2), 1034-1042
- Small-Howard AL, Shimoda LM, Adra CN, Turner H. (2005). Antiinflammatory potential of CB1-mediated cAMP elevation in mast cells. *Biochem J* 388, 465–473

- Smeriglio A, Giofrè SV, Galati EM, Monforte MT, Cicero N, D'Angelo V, Grassi, G, Circosta C. (2018). Inhibition of aldose reductase activity by Cannabis sativa chemotypes extracts with high content of cannabidiol or cannabigerol. *Fitoterapia* 127, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.002>
- Smid SD, Bjorklund CK, Svensson KM, Heigis S, Revesz A. (2007). The endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol inhibit cholinergic contractility in the human colon. *Eur J Pharmacol* 575, 168–176
- Sorenson JL e Johannesse CL. (2009). *World trade and biological exchanges before 1492*. Bloomington
- Staiano RI, Loffredo S, Borriello F, et al. (2005). Human lung-resident macrophages express CB1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *Journal of Leukocyte Biology*. 99: 531-540
- Stancic A, Jandl K, Hasenoehrl C, et al. (2015). The GPR55 antagonist CID16020046 protects against intestinal inflammation. *Neurogastroenterology & Motility*. 27: 1432-1445
- Steffens M, Zentner J, Honegger J, Feuerstein TJ. (2005). Binding affinity and agonist activity of putative endogenous cannabinoids at the human neocortical CB1 receptor. *Biochemistry Pharmacology*. 69:169-178
- Stella N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*. 58: 1017-1030
- Stepanyan RS, Indzhukulian AA, Vélez-Ortega AC, Boger ET, Steyger PS, Friedman TB, Frolenkov GI. (2011). TRPA1-Mediated Accumulation of Aminoglycosides in Mouse Cochlear 891 Outer Hair Cells. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 12: 729-740
- Sticht MA, Long JZ, Rock EM, et al. (2012). Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates vomiting in *Suncus murinus* and 2-arachidonoyl glycerol attenuates nausea in rats. *Br J Pharmacol*. 165: 2425-2435
- Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD. (2002). Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 67–76
- Storr M, Sibaev A, Marsicano G, Lutz B, Schusdziarra V, Timmermans JP, et al. (2004). Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G110–G117.
- Storr MA, Sharkey KA. (2007). The endocannabinoid system and gut–brain signalling. *Curr Opin Pharmacol* 7, 575–582.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 112: 819-829

- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 215: 89-97
- Svensson M, Chen P, Hammarfjord O. (2010). Dendritic Cell Regulation by Cannabinoid-Based Drugs. *Pharmaceuticals*. 3: 2733-2750
- Syed YY, McKeage K, Scott LJ. (2014). Delta-9-tetrahydrocannabinol/ cannabidiol (Sativex(R)): a review of its use in patients with moderate to severe spasticity due to multiple sclerosis. *Drugs* 74: 563-578
- Sykaras AG, Demenis C, Case RM, McLaughlin JT, Smith CP. (2012). Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. *PLoS One*. 7(8):e42373. doi: 10.1371/journal.pone.0042373
- Talwar R e Potluri VK. (2011). Cannabinoid 1 (CB1) receptor—pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonists. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 10: 536-544
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, et al. (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron*, 65(3), 320-327
- Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Spadoni G, Mor M, Rivara S, et al. Synthesis and structureactivity relationships of a series of pyrrole cannabinoid receptor agonists. *Bioorg Med Chem*. 2003; 11:3965–3973
- Taschler U, Hasenoehrl C, Storr M, Schicho R. (2017). Cannabinoid Receptors in Regulating the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 239: 343-362
- Taylor L, Christou I, Kapellos TS. (2015). Primary Macrophage Chemotaxis Induced by Cannabinoid Receptor 2 Agonists Occurs Independently of the CB2 Receptor. *Sci Rep*. 5
- Tayyab M, Shahwar D. (2015). GCMS analysis of Cannabis sativa L. from four different areas of Pakistan. *Egypt. J. Forensic Sci*. 5, 114–125 <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2014.07.008>
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 150: 613-623
- Tsuboi K, Sun YX, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. (2005). Molecular characterization of N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the cholesteryl glycerol hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem*;280:11082–92
- Tsuboi K, Zhao LY, Okamoto Y, Araki N, Ueno M, Sakamoto H, et al. (2007). Predominant expression of lysosomal N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase in macrophages revealed by immunochemical studies. *Biochim Biophys Acta* 1771:623–32
- Tuduri E, Imbernon M, Bautista R, Tojo M, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R. (2017). GPR55: a new promising target for metabolism? *Journal of Molecular Endocrinology*. 58(3):R191-R202

- Ueda N. (2002). Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*;68-69:521–34
- Uranga JA, Vera G, Abalo R. (2018). Cannabinoid pharmacology and therapy in gut disorders. *Biochem Pharmacol.* 157: 134-147
- van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Campi B, McNaughton P, Geppetti P, Di Marzo V. (2005). Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J*;24:3517–8
- Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després JP, McCarthy C, Scheen A. (2008). Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 31(Suppl 2), S229–S240
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329–332
- Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. (2001). Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology.* 121: 767-774
- Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I. (2013). Involvement of PPAR. in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease.* 4: e618
- Vianna CR, Donato J, Rossi J et al. (2012). Cannabinoid receptor 1 in the vagus nerve is dispensable for body weight homeostasis but required for normal gastrointestinal motility. *Journal of Neuroscience.* 32: 10331-10337
- Viñals X, Moreno E, Lanfumey L, et al. (2015). Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol occurs through heteromers between cannabinoid CB1 and serotonin 5-HT_{2A} receptors. *PLOS Biology.* 13: e1002194
- Wang D, Wang H, Ning W, Backlund MG, Dey SK, DuBois RN. (2008). Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. *Cancer Res* 68, 6468–6476
- Ward RJ, Pediani JD, Milligan G. Heteromultimerization of cannabinoid CB(1) receptor and orexin (OX)1 receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J Biol Chem* 2011; 286: 37414-28
- Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR. (2003). Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *Journal of Comparative Neurology.* 465: 121-135
- Ware MA, Daeninck P, Maida V. (2008). A review of nabilone in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Therapeutics and Clinical Risk Management.* 4: 99-107
- Whiteside GT, Lee GP, Valenzano KJ. (2007). The role of the cannabinoid CB2 receptor in pain transmission and therapeutic potential of small molecule CB2 receptor agonists. *Current Medicinal Chemistry.* 14: 917-936

- Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, et al. (2009) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*;106:16511–6
- Williams EK, Chang RB, Strohlic DE, Umans BD, Lowell BB, Liberles SD. (2016). Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. *Cell*. 166: 209-221
- Wilson RI, Nicoll RA. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*;410:588–92
- Witkowski G, Rola R, Szulczyk P. (2012). Effect of cyclic adenosine monophosphate on the G protein-dependent inward rectifier K(+)-like channel current in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Physiol Pharmacol*;63:457–62
- Wouters MM, Vicario M, Santos J. (2016). The role of mast cells in functional GI disorders. *Gut*. 65: 155-168
- Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, Welham M, Ward S. (2005). Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology*. 129: 437-453
- Wright K. L., Duncan M., Sharkey K. A. (2008). Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol*. 153: 263-270
- Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, et al. (2013) GPR55, a G-protein-coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*;8, e60314
- Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, et al. (2013) GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*;8(4), e60314
- Wu L, Sweet T, Clapham DE. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol Rev*. 62:381
- Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL. (2011). Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci*;14(9):1160–6
- Yang H, Zhou J, Lehmann C. (2016). GPR55—a putative “type 3” cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 27: 297-302
- Zhang L, Song J, Hou X. (2016). Mast Cells and Irritable Bowel Syndrome: From the Bench to the Bedside. *J Neurogastroenterol Motil*.22(2):181-92. doi: 10.5056/jnm15137
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 5780-5785
- Zuardi AW, Morais SL, Guimaraes FS, Mechoulam R. (1995). Antipsychotic effect of cannabidiol. *Journal of Clinical Psychiatry*. 56: 485-486
- Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, et al. (2013). Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*;8, e81618

Questo progetto, svolto in collaborazione con il DIBINEM, ha esitato in una pubblicazione sull'International Journal of Molecular Sciences (2019).

1 Hibernation and Radioprotection: Gene Expression in the Liver and testicle of Rats Irradiated under Syntethic Torpor

Tinganelli W, Hitrec T, Romani F, Simoniello P, Squarcio F, **Stanzani A**, Piscitiello E, Marchesano V, Luppi M, Sioli M, Helm A, Compagnone G, Morganti AG, Amici R, Negrini M, Zoccoli A, Durante M, Cerri M

Introduction

Torpor is a peculiar state characterized by a drastic reduction in metabolic rate that leads to a decrease in body temperature proportional to the temperature gradient between the body and the environment (Heildmaier G et al., 2004). Torpor is used by mammals as an energy saving strategy and can last from the few hours of an episode of daily torpor to many months during hibernation (Geiser F 2004). In terms of evolution, it is highly likely that torpor was a trait of the proto-mammal; therefore the gene set required to survive such state should reasonably be common among mammals (Geiser F 2008; Malan A 2014). Mimicking torpor in non-hibernators has always been an ambitious goal (Lee CC 2008; Bouma HR et al., 2012). Indeed, such possibility would open interesting opportunity and could be very valuable in many clinical settings (Cerri M 2017) but could also lead to applications in the field of space exploration (Cerri M et al., 2016). To this last end, it is noteworthy that the European Space Agency (ESA) has a research group specifically focused on hibernation research for space exploration (ESA Advanced Concept Team 2018; Petit G et al., 2018; Gemignani J et al., 2015). Besides the reduced

need of energetic supply, torpor can in fact be extremely valuable for space exploration in virtue of the increased radioprotection that provides (Musacchia XJ e Barr RE 1968). Biological damage from radiation is probably the most serious challenge that limits the ability for humans to engage in long term mission, because of the exposure to galactic cosmic radiation (Durante M e Cucinotta FA, 2008). At the moment, shielding is not too effective against these kind of radiation, since mass constraints limits its use (Durante M 2014). The Mars Science Laboratory measurements showed that the average dose-rate in deep space is about 1.8 mSv/day (Zeitlin C et al., 2013). Therefore, a mission to Mars would exceed the career dose limit of 1 Sv of ESA astronauts and the gender- and age-specific limits for National Aeronautics and Space Administration (NASA) astronauts. Hibernation would therefore be an effective solution for long term mission and was proposed to this end many years ago (Hock RJ 1960; Cocket TK e Beehler CC, 1962). In fact, it was shown that hibernators are able to survive higher doses of radiation during torpor compared to the euthermic period (Jaroslow BN et al., 1969). This finding was confirmed for squirrels (Barr RE e Musacchia XJ, 1969), hamsters (Musacchia XJ et al., 1971) and mice (Ghosh S et al., 2017). The mechanism that mediates such enhanced radioprotection is not known; whereas earlier works were pointing out at the halt of cell replication, recent data suggest that the mechanism may lay in a different dynamics of the DNA damage and repair pathway (Baird BJ et al., 2011). Recently, a phenotype very much resembling torpor was induced in non-hibernators such as the rat by inhibiting the neurons within the region of the Raphe Pallidus (RPa) (Cerri M et al., 2013), a key brainstem region in the control of body temperature and energy expenditure in mammals (Morrison SF et al., 2014). It was proposed to call this peculiar state with the term “Synthetic Torpor” (Cerri M 2017). While the induction of synthetic torpor in humans has yet to be proven viable, such state was suggested as an effective way to transport animals in space both for scientific reason (i.e., experiments on the International Space Station or yet to come further permanent space stations) and for support a human colony (Groko Y et al., 2018). However, so far, there is no evidence for the torpor-induced radioprotection to be active also during synthetic torpor induced in non-hibernators. In this paper, we present preliminary data analysing gene expression in the liver and in the testis of rats which were irradiated during synthetic torpor compared with normothermic controls, showing that radioprotection is also induced during synthetic torpor and

supporting the idea of using this state to preserve the health of humans and animals during long term space travels.

Results

Rats induced into synthetic torpor showed a regular decrease in brain temperature (Tbr), which reached a nadir just before the irradiation (**Figure 1**) (Hypothermia, Tbr: 22.2 ± 1.1 ; Control, Tbr: 37.54 ± 0.24).

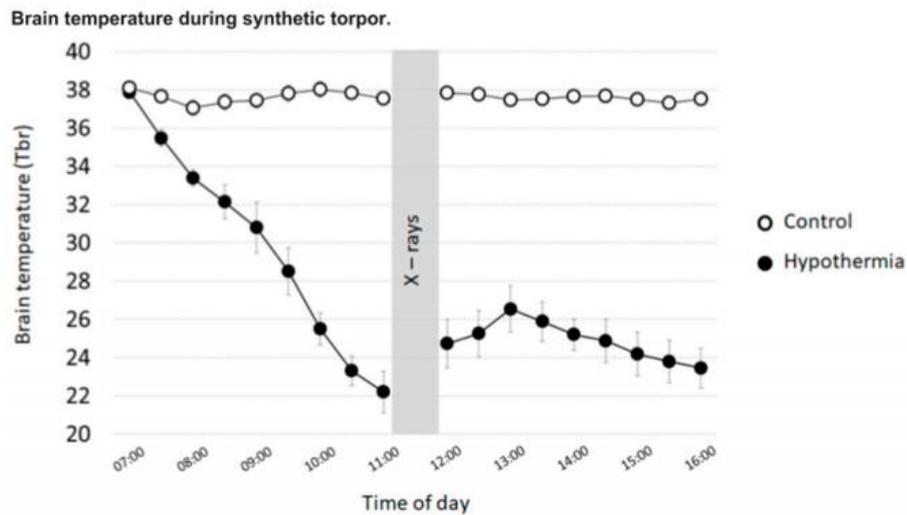


Figure 1: Thirty-min mean value \pm SEM of the brain temperature (Tbr), recorded during the experimental day. Tbr was recorded by means of a thermistor, surgically implanted in the Lateral Hypothalamus. Empty dots: Control ($n = 5$), filled dots: Hypothermia ($n = 5$).

Of the 12 genes analysed, three genes were significantly downregulated in the Hypothermic group compared with the Control group: ATM (Fold regulation: -2.90 ; $p = 0.02$), Pfkfb (Fold regulation: -2.73 ; $p = 0.02$) and Pdfe1 α (Fold regulation: -2.80 ; $p = 0.01$) (**Figure 2**). ATM is of particular interest, since it is involved in repairing DNA

double strand breaks. The lower expression of ATM in the group induced into synthetic torpor suggest that less damage was induced by radiation in the cell of the animals induced into synthetic torpor or that, for other reason, other DNA repair pathways become activated in such conditions.

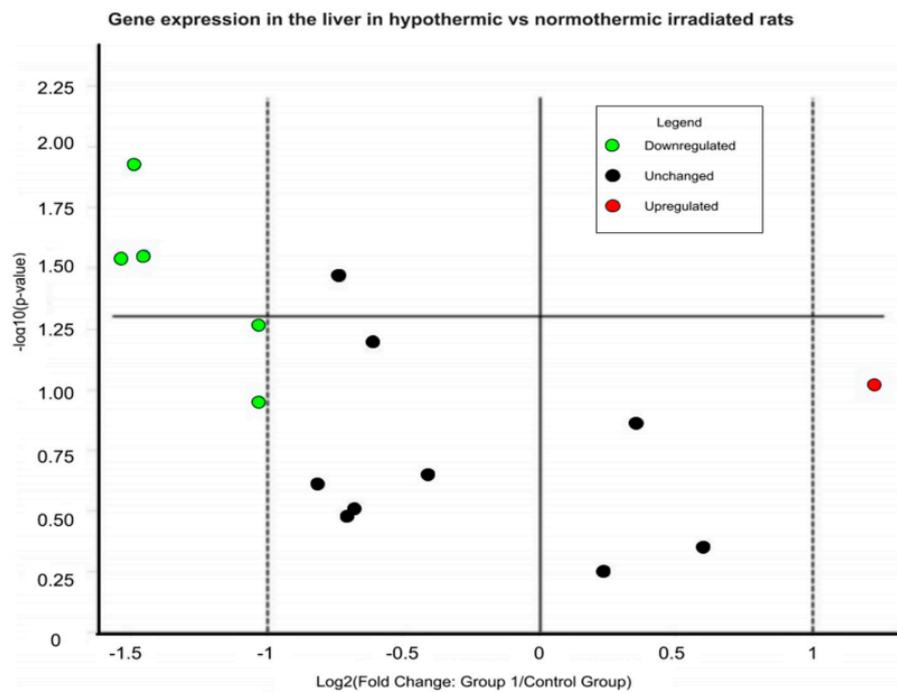


Figure 2: Volcano plot representing the expression of the analysed genes in the liver (normothermic vs hypothermic animals) 4 h after a total body irradiation (X-rays, 3Gy) expressed as normalized fold change. In green: genes downregulated (to the left of the left dashed line). In red: genes upregulated (to the right of the right dashed line). Dots above the solid horizontal line are significantly different between the two groups.

Qualitative analysis following the histological observation shows that hepatic tissues of normothermic rats were affected by the irradiation, whereas the hypometabolic-hypothermic state of synthetic torpor provide in the liver a protection to radiation damage. Normothermic rats showed altered morphology of the hepatocytes. At the light microscope level, their cytoplasm was low dense and markedly vacuolated, as well the nuclei appeared shrunken with irregular shape and chromatin condensation (**Figure 3A, B**, arrows). Such effects were not present in the hepatic tissue of the rats induced into synthetic torpor, hepatocytes possessed a dense cytoplasm and regular and round nucleus in which dispersed chromatin and nucleoli were detectable (**Figure 3C, D**). An abundance of red blood cells is also observable in the synthetic torpor group (**Figure 3C, D**, arrows).

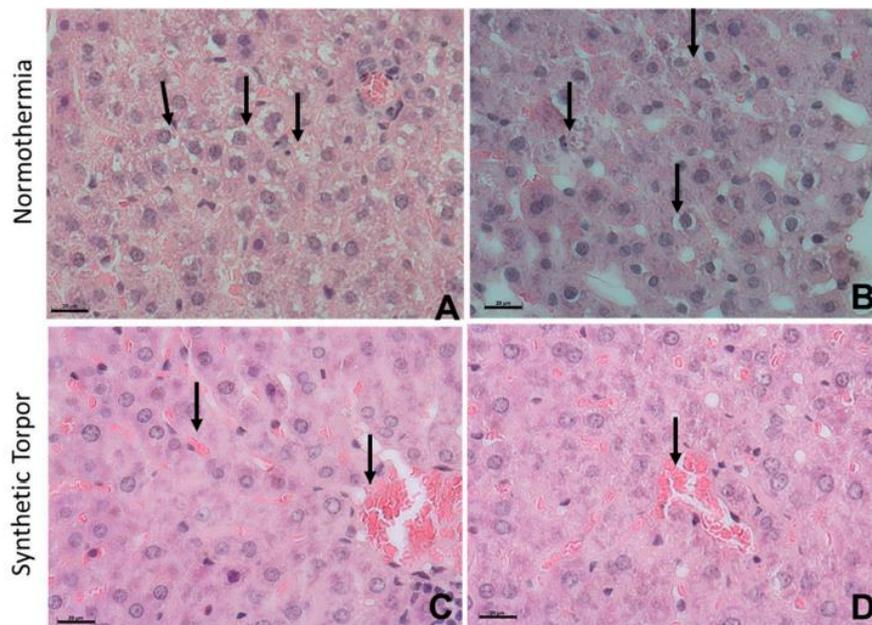


Figure 3: Morphology of the hepatic tissue after hematoxylin-eosin staining in irradiated normothermic liver (A, B) and in irradiated liver during synthetic torpor (C–D). The effects of irradiation at normothermia are pronounced compared to the effects detected after irradiation in synthetic torpor. Alteration and disorganization in the hepatic parenchyma were observed in A, B vacuolization and shrunken nuclei with irregular shape and chromatin condensation (A, B arrows) were identified in the hepatocytes. The morphology and the organization of hepatic parenchyma irradiated during synthetic torpor (C, D) seems comparable to the normal organization of the liver tissue. Hepatocytes show a dense cytoplasm, round nuclei with dispersed chromatin. An abundance of red blood cells is also observable (C, D arrows). Scale bars = 20 μ m

A more extensive analysis of gene expression was performed on the testicles. Rats induced into synthetic torpor showed a downregulation of many of the genes involved in the DNA Damage Signaling. Of the 84 genes analyzed, 7 genes were significantly downregulated in the Hypothermic group: Bbc3 (fold regulation: - 5.49; $p = 0.01$), Fancg (fold regulation: - 1.58; $p = 0.04$), Mbd4 (fold regulation: - 1.79; $p = 0.04$), Mgmt (fold regulation: - 1.84; $p = 0.04$), Pcna (fold regulation: - 1.74; $p = 0.02$), Ppm1d (fold regulation: - 1.67; $p = 0.003$), Rad18 (fold regulation: - 1.66; $p = 0.03$) (**Figure 4**).

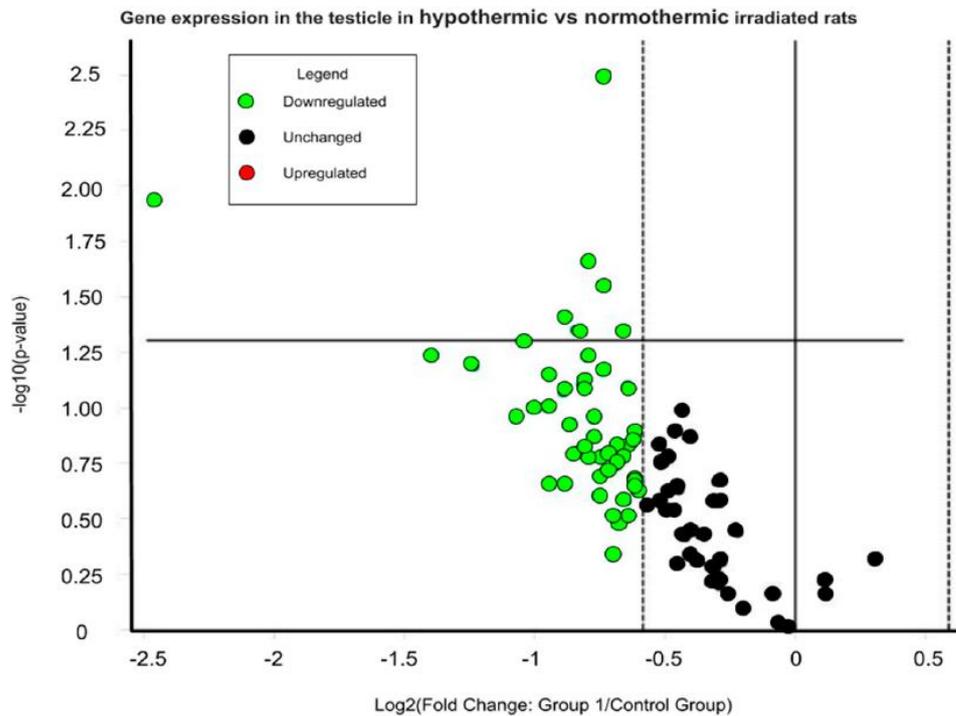


Figure 4. Volcano plot of the representing the expression of the analysed genes in the testicle (normothermic rat testis vs hypothermic rat testis) 4 h after a total body irradiation (X-rays, 3Gy) expressed as normalized fold change. In green: genes downregulated (to the left of the dashed line). Dots above the solid horizontal line are significantly different between the two groups.

Histological analysis performed on cross sections of seminiferous tubules of testis shows alteration on the differentiation and cells stratification in the testis of normothermic rats (**Figure 5A, B**), in particular disorganization of the germinal cells and on their junctions were detected. These effects were not found in the testis tissue of the rats induced into synthetic torpor, in which the structures could be almost comparable to the normal organization (**Figure 5C, D**).

Testicle exemplificative histological sections in normothermic and hypothermic irradiated rats

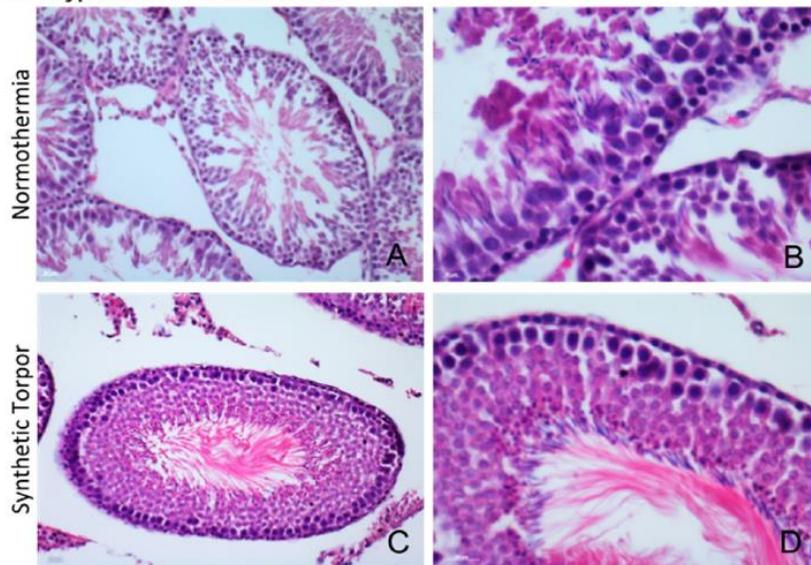


Figure 5: Morphology of cross sections of seminiferous tubules, after hematoxylin-eosin staining, in irradiated normothermic testis (A, B) and in irradiated testis during synthetic torpor (C, D). Alteration on the differentiation and cells stratification were found in the testis of normothermic rats (A, B), in particular disorganization of the germinal cells and of their junctions was present. These effects were not detected in the testis tissue of the rats induced into synthetic torpor, in which the structures could be comparable to the normal organization (C, D).

Discussion

The main finding reported in this paper is the significant protection to ionizing radiation damage induced by synthetic torpor in non-hibernating analysis. Histological analysis of liver and rats exposed to 3 Gy X-rays (see **Figures 3** and **5**) show a reduced toxicity compared in animals artificially in torpor compared to controls irradiated at normal temperature and metabolic activity. This protection is consistent with old data in hibernating animals. We have then investigated the molecular mechanisms underlying the increased radioresistance and found downregulation of ATM and several other genes involved in the DNA damage signalling. ATM expression was reported to be affected by deep hypothermia (0.8 °C) in cell culture (Lisowska H et al., 2018; Herzog KH et al., 1998) and we show here that synthetic torpor leads to similar effect in vivo. ATM is a key gene in activating the repair process of DNA double strand breaks. The reduced expression of such gene suggest that the hepatocytes of the hypothermic group received less damage from the irradiation compared with the control group or that their DNA damage response is reduced. Several papers suggested that the enhanced radioprotection that is observed during hypothermia both in vivo (Ghosh S et al., 2017) or in vitro (Baird BJ et al., 2011), may be caused by some change in the activation of the DNA repair pathways. In particular, data from Gosh and co-workers (Ghosh S et al., 2017) show that the radioprotective effect can be induced by hypothermia within three hours after the irradiation. Such results apparently rules out other hypothesis that torpor-induced radioprotection could be caused by stopping cell proliferation or by reducing the oxygenation of tissues, even if these factors may certainly still play a role. ATM and the DNA damage signaling genes are less activated either because cells in the hypothermic tissue received less DNA double strand breaks or because the reduced signaling cascade is part of the protective effect. It is however unlikely that the effect can simply be explained by hypothermia. In fact, the observed protection in genetic damage at low temperature has been associated to enhanced ATM activation (Lisowska H et al., 2018), while we found a downregulation. On the other hand, ATM is the first post-irradiation protein to activate programmed cell death pathway (Herzog KH et al., 1998). In fact,

pharmacological inhibition of ATM significantly reduces the radiosensitivity of unstimulated human lymphocytes (Heylmann D et al., 2018). The effect of synthetic torpor seems to be more similar to the pharmacological inhibition of ATM than to the simple hypothermia. Histologically, liver cell of hypothermic rats appear normal, unlike the ones of the normothermic ones, suggesting that the radiation dosage was high enough to induce damage visible after a short time (4 h). Liver cells are extensively vacuolised, a sign that was reported to be a response to a stress agent (Chen N et al., 2018; Abdelhalim MA et al., 2012). Testicles also appear to be damaged by the irradiation in the normothermic group. In the present experiments only early normal tissue toxicity was evaluated. It is likely that late toxicity will also be strongly modified. ATM is involved in cell cycle progression post-irradiation (Khoronenkova SV e Dianov GL 2015) and the impact of irradiation during synthetic torpor on replication and late toxicity remain to be evaluated. The reduction in metabolism in the synthetic torpor group did not suppress gene expression in general. In the liver, the gene Nfil3, for instance, results upregulated in this group. Such upregulation could be related to the involvement of Nfil3 in the negative feedback to the expression of the clock gene Per2, possibly adapting the clock to the reduced metabolism. The main finding reported in this paper is the significant protection to ionizing radiation damage induced by synthetic torpor in non-hibernating analysis. Histological analysis of liver and rats exposed to 3 Gy X-rays (see **Figures 3 and 5**) show a reduced toxicity compared in animals artificially in torpor compared to controls irradiated at normal temperature and metabolic activity. This protection is consistent with old data in hibernating animals.

We have then investigated the molecular mechanisms underlying the increased radioresistance and found downregulation of ATM and several other genes involved in the DNA damage signalling. ATM expression was reported to be affected by deep hypothermia (0.8 °C) in cell culture (Dang L et al., 2012; Lisowska H et al., 2018) and we show here that synthetic torpor leads to similar effect in vivo. ATM is a key gene in activating the repair process of DNA double strand breaks. The reduced expression of such gene suggest that the hepatocytes of the hypothermic group received less damage from the irradiation compared with the control group or that their DNA damage response is reduced. Several papers suggested that the enhanced radioprotection that is observed during hypothermia both in vivo (Ghosh S et al., 2017) or in vitro (Baird BJ et al., 2011),

may be caused by some change in the activation of the DNA repair pathways. In particular, data from Gosh and co-workers (Ghosh S et al., 2017) show that the radioprotective effect can be induced by hypothermia within three hours after the irradiation. Such results apparently rules out other hypothesis that torpor-induced radioprotection could be caused by stopping cell proliferation or by reducing the oxygenation of tissues, even if these factors may certainly still play a role. ATM and the DNA damage signaling genes are less activated either because cells in the hypothermic tissue received less DNA double strand breaks or because the reduced signaling cascade is part of the protective effect. It is however unlikely that the effect can simply be explained by hypothermia. In fact, the observed protection in genetic damage at low temperature has been associated to enhanced ATM activation (Lisowska H et al., 2018), while we found a downregulation. On the other hand, ATM is the first post-irradiation protein to activate programmed cell death pathway (Herzog KH et al., 1998). In fact, pharmacological inhibition of ATM significantly reduces the radiosensitivity of unstimulated human lymphocytes (Heylemann D et al., 2018). The effect of synthetic torpor seems to be more similar to the pharmacological inhibition of ATM than to the simple hypothermia. Histologically, liver cell of hypothermic rats appear normal, unlike the ones of the normothermic ones, suggesting that the radiation dosage was high enough to induce damage visible after a short time (4 h). Liver cells are extensively vacuolised, a sign that was reported to be a response to a stress agent (Chen N et al., 2018; Abdelhalim MA e Jarrar BM 2012). Testicles also appear to be damaged by the irradiation in the normothermic group. In the present experiments only early normal tissue toxicity was evaluated. It is likely that late toxicity will also be strongly modified. ATM is involved in cell cycle progression post-irradiation (Khoronenkova SV e Dianov DL, 2013) and the impact of irradiation during synthetic torpor on replication and late toxicity remain to be evaluated. The reduction in metabolism in the synthetic torpor group did not suppress gene expression in general. In the liver, the gene Nfil3, for instance, results upregulated in this group. Such upregulation could be related to the involvement of Nfil3 in the negative feedback to the expression of the clock gene Per2, possibly adapting the clock to the reduced metabolism.

Methods

All the experiments were performed in accordance with the DL 26/2014 and the European Union Directive 2010/63/EU under the supervision of the Central Veterinary Service of the University of Bologna, under the approval of the Italian National Health Authority (decree 779/2017-PR, 16 October 2017).

Animal Housing

Experiments were conducted on 10 male Sprague-Dawley rats (Charles River), weighing 250–300 g. After their arrival, animals were housed for one week at standard laboratory conditions: light-dark (LD) cycle 12 h:12 h (L 09:00 h–21:00 h) with ad libitum access to food (4RF21 diet, Mucedola) and water, at an ambient temperature (T_a) of 24.0 ± 1.0 °C. During the adaptation, animals were housed in pairs in Plexiglas cages (Techniplast) containing dust-free wood shavings and the bedding was changed every two days.

Surgery

After one week of adaptation, rats underwent surgery under general anaesthesia (Ketamine-HCl, Imalgene 1000, Merial, 100 mg/Kg, intraperitoneally). After assessing the adequacy of the surgical plane of anaesthesia, animals were implanted with a thermistor probe in the right anterior hypothalamus to record deep brain temperature and with a microinjection guide cannula (C315G-SPC; Plastics One; internal cannula extension below guide: +3.5 mm) stereotactically implanted within the brainstem region of the Raphe Pallidus (RPa) (coordinates (mm) -3.4 posterior from the interaural, 0.0 Lateral, -9.5 from the brain surface, following the stereotactic map in reference [33]). To assess the correct positioning of the guide cannula, a functional intraoperative test was carried out: the GABA-A agonist muscimol (1 mM) was dissolved in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) and injected (100nL) within the RPa and tail temperature was monitored through a temperature probe positioned on the tail. Previous reports showed

that the inhibition of Raphe Pallidus neurons causes vasodilation. The position of the cannula was then assumed correct if a consistent increase in tail surface temperature was observed within 5 min from muscimol injection. Lastly, four stainless steel screws were implanted, to ensure all the inserted probes in place; everything was then secured with dental resin (ResPal, Salmoiraghi Produzione Dentaria), covering the whole surgical field, incorporating the cannula, the thermistor and the screws. Rats were then administered with antibiotic (benzathine benzylpenicillin, 12.500.000 U.I., dihydrostreptomycin sulphate 5 g/100 mL, Rubrocillina Veterinaria, Intervet—1 mL/kg), analgesics (Carprofen—Rimadyl, Pfizer—5 mg/kg) and rehydrated with 5 mL saline solution. Animals were constantly monitored until regaining of consciousness and then left to recover for 1 week under standard laboratory conditions. The animal's pain, distress or suffering symptoms were constantly evaluated using the Humane End Point (HEP) criteria. After at least one week of recovery from surgery, rats were moved to the experimental cages. The cage containing the animal was placed inside a thermoregulated, sound-attenuated box, equipped with a ventilation system. The cage was instrumented with a rotating swivel, connected to the external amplifiers. Forty-eight hours prior to the experiment, the animals' thermistors were wired to the swivels, in order to acquire baseline deep brain temperature (T_{br}) and animals were exposed to T_a 15 °C and constant darkness. T_{br} was amplified (mod. Grass 7P511L, Astronova, West Warwick, RI, USA) and filtered at 0.5 Hz (high-pass), analogue to digital converted to 12 bit (CED Micro MK 1401 II), acquired (50Hz sample rate) and stored on a digital hard disk.

Experimental Protocol

Animals were divided in two groups: (1) Hypothermia (n = 5): After a 7-day recovery from surgery, animals were injected with the GABA-A agonist muscimol (1 mmol) within the Raphe Pallidus (RPa). Each animal received, starting from 07:00 h, one injection/hour (100 nL). All animals entered synthetic torpor shortly after the first injection and maintained such condition until the end of the experiment. (2) Control (n = 5): After a 7-day recovery from surgery, animals were injected with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) within the RPa. Each animal received, starting from 07:00 h, one injection/hour (100 nL). To minimize any environmental difference, animals

underwent experiment in couples: each animal from the Hypothermia group underwent the procedure on the same experimental day as its corresponding Control. At 11:00 h, animals were moved to a portable thermoregulated and sound attenuated radiotransparent custom-made box, at Ta 15 °C. When inside the box, animals were transported to the Department of Nuclear Medicine, S.Orsola Hospital, to be X-rays irradiated. After receiving the radiation dose, animals were returned to the experimental cage. Four hours after the irradiation, animals were given a lethal dose of anaesthetic and several organs were extracted for histological and molecular assays (**Figure 6**).

Experimental protocol

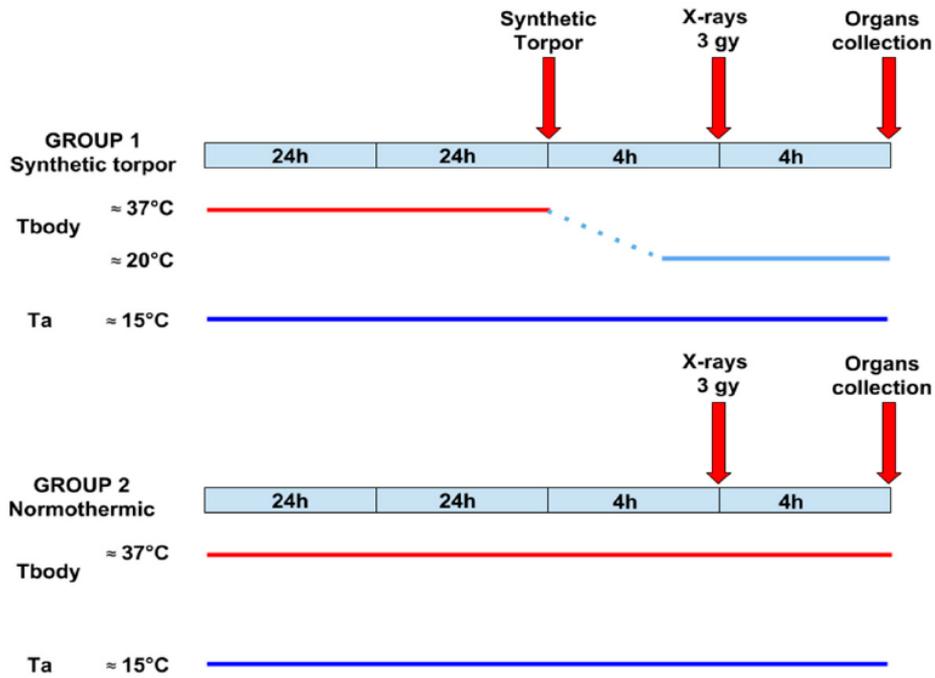


Figure 6: Experimental protocol. After at least one week of recovery from surgery, rats were moved to the experimental cage and exposed to a lower ambient temperature (15 °C) 48 h prior to the experiment. At 07:00 of the experimental day, rats were randomly assigned to one of the experimental groups: Hypothermia ($n = 5$) (Group 1), animals underwent multiple microinjections (1/h, 100 nL) of the GABA-A agonist muscimol (1mM) within the RPa, whereas Control ($n = 5$) (Group 2) were injected with artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Four hours after the onset of synthetic torpor in the Hypothermia group, animals underwent a 3 Gy X-rays radiation exposure and were returned to the experimental cage for additional four hours. At 16:00, all animals were euthanized and organs were collected.

Radiation Data

Exposure to radiation was accomplished by irradiating the thermoregulated transportable box from above, using an X-ray tube operating at 180 kV, producing a uniform radiation field in the whole region where the animal resides. Animals were irradiated with a dose of 3 Gy total body, at a dose rate of 23 cGy/min (**Figure 7**).

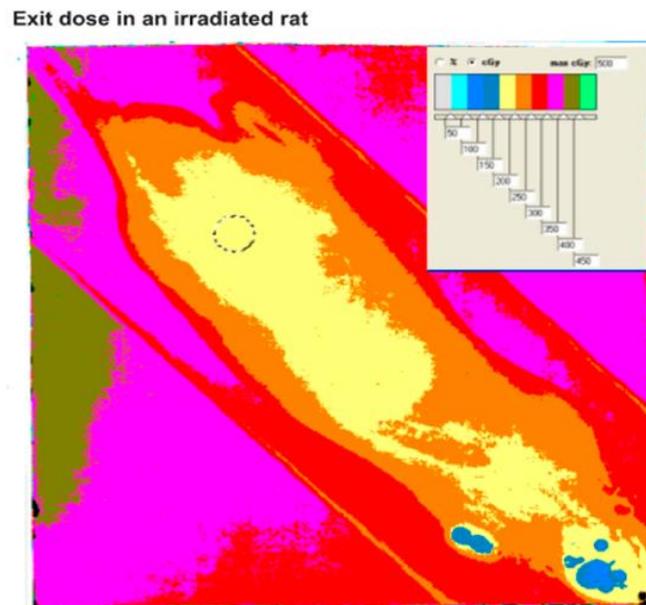


Figure 7: Exit dose measured with a radiochromic film under the irradiated animal. Entrance dose can be evaluated from the percentage depth dose curves and the animal thickness.

Gene Expression and Analysis

Liver: Gene expression was assessed by a Custom RT2 Profiler PCR Arrays from Qiagen. In this analysis, 13 genes were profiled on 1 array in a biological triplicate. Each array also contains a panel of controls to monitor genomic DNA contamination (GDC) as well as controls for the first strand synthesis (RTC) and the real-time PCR efficiency (PPC). As a preliminary analysis, we analysed the expression of several genes involved in different pathways, from cell metabolism, to regulation of clock genes to the DNA damage pathway in order to have an overview of the cell functions.

Testicle: Gene expression was assessed by a DNA Damage Signaling RT2 Profiler PCR Arrays from Qiagen. In this analysis, 89 genes were profiled (Figure S2) on 3 array in a biological triplicate. The array contains also a panel of controls to monitor genomic DNA contamination (GDC) as well as controls for the first strand synthesis (RTC) and the real-time PCR efficiency (PPC).

The protocol used was the following: The mature RNA was isolated from tissue (liver and testicles) using an RNA extraction kit (Qiagen RNeasy Plus Micro Kit, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, and its quality was determined using a nanodrop (NanoDrop. 2000 Spectrophotometers, Thermofisher). 1000 ng of RNA was used for the reverse transcription. It was reverse transcribed using a cDNA conversion kit (Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit, Hilden, Germany). For the liver analysis, the cDNA in combination with RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix was used on a Custom RT2 Profiler PCR Array, while for the Rat testicles the gene expression was assessed using a real-time RT2 Profiler PCR Array (QIAGEN, Cat. no. PARN-029Z) in combination with RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix (Cat. no. 330529). A CFX96 Biorad machine was used with the following cycles: Cycle 1; 10 min duration, 95 °C temperature; Cycle 40; 15 s duration and 95 °C temperature; 1 min duration, 60 °C temperature. CT values were exported to an Excel file to create a table of CT values. This table was then uploaded to the data analysis web portal at <http://www.qiagen.com/geneglobe>. Samples extracted from rats irradiated and not-hibernated, were assigned to the control group, whereas samples extracted from rats irradiated and hibernated were assigned to the test group. CT values were normalized based on a manual selection of reference genes. The data analysis web portal calculated

the fold change using the delta-delta CT method, in which the delta CT is calculated between gene of interest (GOI) and an average of housekeeping genes (HKG), followed by delta-delta CT calculations (delta CT (experiment)—delta CT (control)). The fold change is then calculated using the $2^{(\text{delta-delta CT})}$ formula. The p values were calculated based on a Student's t-test of the replicate $2^{(-\text{Delta CT})}$ values for each gene in the control group and treatment groups. Gene expression data are presented with a Volcano Plot scheme. The volcano plot helps quickly identify significant gene expression changes. The volcano plot displays statistical significance versus fold-change on the y- and x-axes, respectively. The volcano plot combines a p-value statistical test with the fold regulation change enabling identification of genes with both large and small expression changes that are statistically significant.

Histology

Liver and testicle samples were processed for histological investigations. Briefly, tissue samples were fixed in 4% PFA at 4 °C overnight, dehydrated in an ascending graded ethanol series, cleared with xylene for 30 min and embedded in paraffin at 58 °C. Sections (7 µm thick) were stained with haematoxylin–eosin to show general morphology.

Conclusions

This is the first experimental measurement of toxicity and gene expression in animals exposed to ionizing radiation under synthetic torpor. We have demonstrated that synthetic torpor increases radioresistance in non-hibernating animals (rats). The results indicate that synthetic torpor is a potential tool to enhance radioprotection in living organism during long term space mission.

References

- Baird BJ; Dickey JS; Nakamura AJ; Redon CE; Parekh P; Griko YV; Aziz K; Georgakilas AG; Bonner WM; Martin OA. (2017). Hypothermia postpones DNA damage repair in irradiated cells and protects against cell killing. *Mutat. Res.* 711, 142–149
- Barr RE; Musacchia XJ. (1969). The effect of body temperature and postirradiation cold exposure on the radiation response of the hibernator *Citellus tridecemlineatus*. *Radiat. Res.* 38, 437–448
- Bouma HR; Verhaag EM; Otis JP; Heldmaier G; Swoap SJ; Strijkstra AM; Henning RH; Carey HV. (2012). Induction of torpor: Mimicking natural metabolic suppression for biomedical applications. *J. Cell. Physiol.* 227, 1285–1290
- Cerri M. (2017). The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 167–186
- Cerri M; Mastrotto M; Tupone D; Martelli D; Luppi M; Perez E; Zamboni G; Amici R. (2013). The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defense induces a suspended animation state in the rat. *J. Neurosci.* 33, 2984–2993
- Cerri M; Tinganelli W; Negrini M; Helm A; Scifoni E; Tommasino F; Sioli M; Zoccoli A; Durante M. Hibernation for space travel: Impact on radioprotection. *Life Sci. Space Res. (Amst.)* **2016**, 11, 1–9
- Cockett TK; Beehler CC. (1982). Protective effects of hypothermia in exploration of space. *JAMA* 182, 977–979
- Dang L; Lisowska H; Manesh SS; Sollazzo A; Deperas-Kaminska M; Staaf E; Haghdoost S; Brehwens K; Wojcik A. (2012). Effect of hypothermia on cells—A multiparametric approach to delineate the mechanisms. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 507–514
- Durante M. (2014) Space radiation protection: Destination Mars. *Life Sci. Space Res. (Amst.)* 1, 2–9
- Durante M; Cucinotta FA. (2008). Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nat. Rev. Cancer* 8, 465–472
- ESA Advanced Concept Team. Available online: <https://www.esa.int/gsp/ACT/projects/hibernation.html> (accessed on 14 November 2018)
- Geiser F. (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 239–274
- Geiser F. (2008). Ontogeny and phylogeny of endothermy and torpor in mammals and birds. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 150, 176–180
- Gemignani J; Gheysens T; Summerer L. (2015). Beyond astronaut’s capabilities: The current state of the art. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2015, 3615–3618

- Ghosh S; Indracanti N; Joshi J; Ray J; Indraganti PK. (2017). Pharmacologically induced reversible hypometabolic state mitigates radiation induced lethality in mice. *Sci. Rep.* 7, 14900
- Griko Y; Regan MD. (2018). Synthetic torpor: A method for safely and practically transporting experimental animals aboard spaceflight missions to deep space. *Life Sci. Space Res. (Amst.)* 16, 101–107
- Heldmaier G; Ortmann S; Elvert R. (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 317–329
- Herzog KH; Chong MJ; Kapsetaki M; Morgan JI; McKinnon PJ. (1998). Requirement for ATM in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science*, 280, 1089–1091
- Hock RJ. (1960). The potential application of hibernation to space travel. *Aerosp. Med.* 31, 485–489
- Jaroslow BN; Smith, D.E.; Williams, M.; Tyler, S.A. (1969). Survival of hibernating ground squirrels (*Citellus tridecemlineatus*) after single and fractionated doses of cobalt-60 gamma radiation. *Radiat. Res.* 38, 379–388
- Lee CC. (2008) Is human hibernation possible? *Annu. Rev. Med.* 59, 177–186
- Lisowska H; Cheng L; Sollazzo A; Lundholm L; Wegierek-Ciuk A; Sommer S; Lankoff A; Wojcik A. (2018). Hypothermia modulates the DNA damage response to ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 94, 551–557
- Malan A. (2014). The evolution of mammalian hibernation: Lessons from comparative acid-base physiology. *Integr. Comp. Biol.* 54, 484–496
- Morrison SF; Madden CJ; Tupone D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* 19, 741–756
- Musacchia XJ; Barr RE. (1968). Survival of whole-body-irradiated hibernating and active ground squirrels; *Citellus tridecemlineatus*. *Radiat. Res.* 33, 348–356.
- Musacchia XJ; Volkert WA; Barr RE. (1971). Radioresistance in hamsters during hypothermic depressed metabolism induced with helium and low temperatures. *Radiat. Res.* 46, 353–361
- Petit G; Koller D; Summerer L; Heldmaier G; Vyazovskiy VV; Cerri M; Henning RH. (2018) Hibernation and Torpor: Prospects for Human Spaceflight. In *Handbook of Life Support Systems for Spacecraft and Extraterrestrial Habitats*; Seedhouse, E., Shayler, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland. ; pp. 1–15, ISBN 978-3-319-09575-2.
- Zeitlin C; Hassler DM; Cucinotta FA; Ehresmann B; Wimmer-Schweingruber RF; Brinza DE; Kang, S; Weigle G; Bottcher S; Bohm E; et al. (2013). Measurements of energetic particle radiation in transit to Mars on the Mars Science Laboratory. *Science* 340, 1080–1084

Il progetto di cui mi sono occupata negli Stati Uniti è stato presentato come poster al congresso Neuroscience – SFN 2019 (Chicago, IL, Usa). Tramite iniezione di pseudorabies virus (PRV) coniugato con Green Fluorescent Protein (GFP) o Red Fluorescent Protein (RFP) siamo andati a valutare i neuropeptidi ipotalamici che sono coinvolti nell'attivazione del tessuto adiposo Bruno (BAT), che regola la produzione di calore e il mantenimento della temperatura corporea, e il tessuto adiposo bianco (WAT) che funge da riserva energetica.

2 Neuropeptidergic profile of hypothalamic neurons involved in the control of brown and white adipose tissue in normal rats and obese rats fed with high energy diet from early age

G Cano, SL Hernan, AG Richie, A Stanzani, H Allen, D Tupone, AF Sved

Abstract: Brown adipose tissue (BAT) regulates heat production to maintain body temperature, whereas white adipose tissue (WAT) functions as an energy reserve. Complex brain circuitry controls BAT thermogenesis and WAT lipolysis via direct sympathetic innervation. Obesity is associated with dramatic changes in BAT and WAT body distribution and decreases BAT thermogenic activity. In a previous study, we used a diet induced obesity (DIO) model in rats to examine the effect of early life obesity on the central circuitry controlling BAT and WAT activity. We found subtle changes in few brainstem areas. Here, we focus on the effect of early life DIO on hypothalamic nuclei that contain neuropeptides involved in the regulation of energy expenditure and thermogenesis, such as MCH, CART, POMC, and Urocortin. Preadolescent rats (28 days-old; n =24) were fed with high fat diet (HFD, 31.8% kcal from fat; 25.2% kcal from sucrose) for 8 weeks, whereas control rats were fed with chow (n=12). HFD and chow rats weighed 573 + 17 g and 491 + 15 g, respectively. Each rat was injected with a pseudorabies virus (PRV) that expresses RFP into inguinal WAT and a PRV expressing

GFP into interscapular BAT. Rats were perfused at different survival times (96-124 hrs), and brains were processed. At early survival, WAT and BAT infected neurons were found in brain regions involved in central sympathetic control. At longer survival, the infection progressed to hypothalamic areas involved in metabolic control such as the lateral hypothalamus (LH), Arcuate (Arc), and Edinger-Westphal (EW) nuclei. In EW, the % of WAT-infected neurons that were Urocortin-ir was decreased in HFD rats compared to chow rats (from $64.1 \pm 3.8\%$ to $47.3 \pm 3.4\%$; $p < 0.05$). Similarly, the % of WAT infected neurons that were CART-ir was decreased in HFD rats (from $72.4 \pm 2.5\%$ to $49.9 \pm 6.4\%$; $p < 0.05$) in EW. No differences were observed in BAT-infected neurons in EW. Scarce BAT or WAT infected neurons were POMC-ir in Arc in both groups. BAT and WAT MCH-ir infected neurons in the LH in chow rats were $21.1 \pm 1.5\%$ and $29.6 \pm 3.4\%$, respectively, and $23.5 \pm 3.1\%$ and $35.1 \pm 2.1\%$ in HFD rats. Though CART colocalizes with POMC in Arc, MCH in LH, and Urocortin in EW, infected CART-ir neurons were observed mainly in EW, where 12% were double-infected. Dense CART-ir fibers and terminals were observed in apposition to BAT and WAT infected neurons in numerous brain regions. These observations support a relevant role of EW CART-Urocortin neurons in the control of BAT and WAT activity. Our results suggest involved in the control that early life HFD can induce subtle anatomic changes in neuropeptidergic neurons of metabolism and energy expenditure that are anatomically linked to BAT and WAT.

Presso il DIMEC ho preso parte ad un progetto nel quale tramite whole exome sequencing sono state identificate nuove varianti di pseudo-ostruzione intestinale cronica (CIPO). Il lavoro ha portato alla pubblicazione di un abstract su Gastroenterology nel 2017.

3 Novel mutations in neurogenic chronic intestinal pseudoobstruction identified by high-throughput sequencing

Elena Bonora, Francesca Bianco, **Agnese Stanzani**, Chiara Diquigiovanni, Rita Rinaldi, Roberto D'Angelo, Rosanna Cogliandro, Joshua D. Smith, Deborah Nickerson, Mike Bamshad, Ghazaleh Assadi, Paolo Clavenzani, Greger Lindberg, Mauro D'Amato, Claudio Graziano, Vincenzo Stanghellini, Marco Seri, Roberto De Giorgio

Introduction Chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO) is a severe gut dysmotility with recurrent sub-occlusive episodes without demonstrable mechanical causes. We have previously identified RAD21 as the gene mutated in a recessive form of CIPO (1). In this study we aimed to identify other mutated genes in a subset of CIPO cases, including those associated to small fiber neuropathy (SFN), a peripheral neuropathy involving the autonomic nervous system. **Methods** Whole exome sequencing (WES) was performed on genomic DNA of 7 patients (4 trios, i.e. affected individual-mother-father, and 3 sporadic cases) with clinical, radiological and manometric evidence of neurogenic CIPO and neurologically characterized SFN (4F, 2M). Only in one male patient gut histopathology revealed clear-cut evidence of hypoganglionosis. Genomic libraries were enriched using the Nimblegen SeqCapEZ v3.0 exome enrichment and libraries were sequenced on HiSeq2000. Exome variants were annotated with a flexible framework for exploring genome variation Gemini (GENome MINIng). Sporadic CIPO patients (n= 75; 18M / 57F; age: 7-70 yrs) were analyzed with a custom TruSeq Amplicon Low Input kit designed with DesignStudio and sequenced with MiSeq. Data analysis was performed with VariantStudio. **Results** We identified novel de novo missense variants in B3GAT2 and SMC3 in two trios, and a missense variant in SCN11A in one sporadic patient with CIPO and SFN and severe abdominal pain. Notably, the patient with SMC3 mutation was that

showing a histopathological phenotype characterized by enteric hypoganglionosis. Target sequencing panel showed a premature stop codon in B3GAT2, and different rare/novel missense variants in SCN5A, SCN9A, SCN10A, SCN11A, TRPA1 in 10.7% of the 75 CIPO patients. Conclusions We identified novel gene defects, including B3GAT2, a glucuronyl transferase implicated in neuronal adhesion/migration, and SCN5A, SCN9A, SCN10A, SCN11A, TRPA1 genes encoding for sodium channel subunits implicated in pain and gut motility control. These latter aspects suggest that a channelopathy may occur at least in a subset of CIPO patients. Since SMC3 is a RAD21-binding protein, we postulate that SMC3 de novo mutation can contribute to a histopathological phenotype, i.e. enteric hypoganglionosis, as that observed in patients with the RAD21 mutation (2). WES may help deciphering genetic mechanisms contributing to enteric neuronal abnormalities underlying severe gut dysmotility and visceral pain, such as CIPO.

(1) Bonora E, Bianco F, Cordeddu L, Bamshad M, Francescatto L, Dowless D, ... & Cefle, K. (2015). Mutations in RAD21 disrupt regulation of APOB in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology*, 148(4), 771-782

(2) Deglincerti A, De Giorgio R, Cefle K, Devoto M, Pippucci T, Castegnaro G, ... & Palanduz S. (2007). A novel locus for syndromic chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction maps to chromosome 8q23–q24. *European Journal of Human Genetics*, 15(8), 889

Questo progetto rappresenta un lavoro preliminare che sto svolgendo in collaborazione con il DIBINEM ed è finalizzato alla valutazione dell'espressione dei recettori del gusto nel tratto gastrointestinale dei ratti in torpore artificiale.

4 Taste receptors expression in the gastrointestinal tract in an animal model of artificial torpor

The gastrointestinal tract has an important role in food digestion, absorption and nutrients metabolism (i.e. amino acids, sugars and fatty acids). These nutrients are detected by chemoreceptors localized in gastrointestinal mucosa, mainly located on enteroendocrine cells and the pathway activated controls food intake. The chemoceptive responses are transmitted to the enteric nervous system and to the central nervous system to control the metabolic and the gastrointestinal tract functions (1). There are two different types of taste receptors: type 1 (T1Rs, for sweet and umami taste) and type 2 (T2Rs, for bitter taste) and their expression is largely regulated by diet. For example, mouse fed with high fat diet, have an upregulation of the bitter taste receptor T2R138 in the gastric compartment (2). Similar observations have been done in pigs fed with hyper proteic diet and in human obese subject (3). Thus, taste receptors can be helpful to study gastrointestinal pathologies. Starvation that occurs during physiological hibernation, is an extreme alimentary and metabolic condition. During torpor, gastrointestinal tract villi becomes atrophic, mucosa structural proteins are reduced, permeability is augmented and microbiota modified (4). We decided to evaluate in rat in these conditions 1) artificial torpor; 2) rewarming; 3) controls, if there are some modifications in the taste receptors expression pattern, and other molecules involved in this molecular pathway in the gastrointestinal tract. The study aims to investigate if in our artificial torpor model there is an altered expression of the TRs superfamily, in order to evaluate if, not only the diet, but also hypothermia could influence this system. It could be interesting because it might be in line with the evidence that gastrointestinal mucosa is atrophic in physiological torpor (4). There are emerging data about the presence of taste receptors in the central nervous system, but the meaning is still largely unknown. Noteworthy, the brainstem (where there

are vagal afferents) has a key role in autonomic regulations like temperature and metabolism, so, it might be important to investigate taste receptors expressions in this area (5). Preliminary immunofluorescence results shown that, in our artificial torpor model made by injecting muscimol in Raphe Pallidus, there aren't significant differences in T2Rs (T2R16 and T2R38 isoforms), chromograninA (neuroendocrine marker) and ghrelin expression in rat stomach and duodenum. This is a preliminary study only, made in a small number of cases for each conditions (n=7), but in the future we would like to implement the casistic and we would like to test the expression of some peptide involved in food intake like CCK, GLP-1 and GLP-2.

- (1) Sternini C et al., Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008 Feb;15(1):73-8;
- (2) Vegezzi G et al., Diet-induced regulation of bitter taste receptor subtypes in the mouse gastrointestinal tract. *PLoS One.* 2014 Sep 19;9(9):e107732;
- (3) Latorre R et al., Expression of the Bitter Taste Receptor, T2R38, in Enteroendocrine Cells of the Colonic Mucosa of Overweight/Obese vs. Lean Subjects. *PLoS One.* 2016 Feb 11;11(2):e0147468;
- (4) Carey HV. Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *Am J Physiol.* 1990 Aug;259 (2 Pt 2):R385-92;
- (5) Singh N et al., Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2011, 406(1), 146-151.