

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICO-CHIRURGICHE  
GASTROENTEROLOGICHE E DEI TRAPIANTI

Ciclo XXII

**Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza:**  
MED/09

TITOLO TESI  
Ruolo del recettore CB1 nella malattia da reflusso gastro-  
esofageo erosiva e non erosiva

VALERII MARIA CHIARA

Presentata da: \_\_\_\_\_

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.mo**  
**Prof. Massimo Campieri**

**Relatore**

**Chiar.mo**  
**Prof. Massimo Campieri**

**Esame finale anno 2010**

# INDICE

**I INTRODUZIONE..... pag 3**

**II SCOPO DELLA RICERCA..... pag 27**

**III MATERIALI E METODI..... pag 28**

**IV RISULTATI..... pag. 33**

**V DISCUSSIONE..... pag. 39**

**VI REFERENCES..... pag 42**

# I. INTRODUZIONE

## *Definizione di Malattia da Reflusso Gastro-Esofagea*

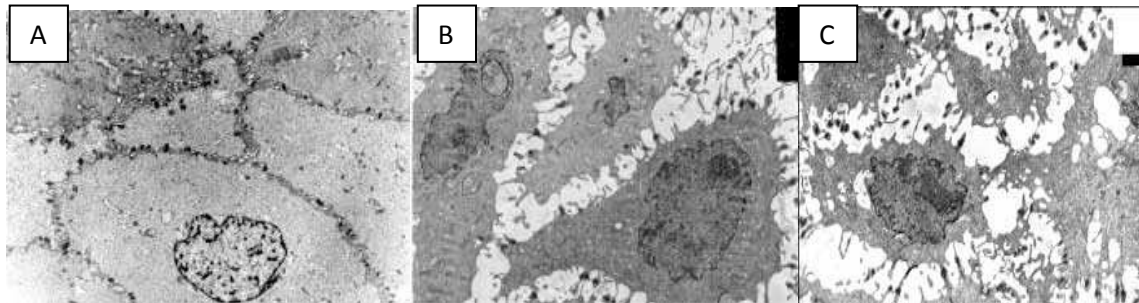
La MRGE è stata recentemente definita come la condizione che si sviluppa quando il reflusso di contenuto gastrico nell' esofago determina la comparsa di sintomi esofagei o extraesofagei e/o di complicanze ad esso legate.

La sintomatologia associata a questa patologia ed i danni strutturali all'epitelio esofageo sono causati dalla prolungata esposizione di quest'ultimo ai succhi gastrici.

Il principale sintomo associato alla malattia da reflusso è la piroisi (Nobel OT et al., 1976; Klauser AG et al., 1990), che generalmente si manifesta dopo i pasti soprattutto se ricchi di grassi (Iwakiri et al., 1996). Dal punto di vista clinico i pazienti affetti da MRGE sono suddivisi in due grandi categorie. La prima composta da coloro che soffrono di malattia da reflusso associata ad esofagite erosiva documentata all'endoscopia (ERD Erosive Reflux Disease), la seconda comprende quei soggetti che, pur riferendo i sintomi tipici della patologia, non presentano lesioni macroscopicamente rilevabili all'esofagogastroduodenoscopia (NERD Non Erosive Reflux Disease) (Orlando et al.,1999)

Nonostante l'assenza di erosioni visibili, i soggetti con malattia non erosiva possono presentare gli stessi disturbi dei pazienti con malattia non erosiva, la sintomatologia che caratterizza le MRGE potrebbe quindi essere legata non tanto alla presenza delle alterazioni macroscopiche visibili endoscopicamente quanto alla presenza di danni ultrastrutturali a livello della mucosa esofagea, a sostegno di questa ipotesi è stato dimostrato, attraverso microscopia elettronica, che i pazienti con MRGE sintomatici, sia con malattia erosiva che con malattia non erosiva,

presentano una dilatazione degli spazi intercellulari tre volte maggiore rispetto ai controlli sani (fig.1.1) (Calabrese et al., 2003)



**Fig 1.1:** Mucosa esofagea osservata tramite microscopia elettronica: gli spazi intercellulari risultano maggiormente dilatati nei pazienti con malattia da reflusso non erosiva (B) ed erosiva (C) rispetto ai controlli (A)

## ***Fisiopatologia della malattia da reflusso gastro-esofageo***

La patogenesi della malattia da reflusso gastroesofageo è multifattoriale ed è determinata da un'alterazione dell'equilibrio tra meccanismi difensivi esofagei (barriera tissutale, tono dello sfintere esofageo inferiore, peristalsi esofagea e gastrica) e fenomeni quali i rilasciamenti transitori dello sfintere esofageo inferiore (LES), che determinano la risalita degli agenti aggressivi sulla mucosa (acido cloridrico, pepsina e sali biliari).

### **MECCANISMI DI DIFESA DAL REFLUSSO ACIDO**

Il reflusso gastro-esofageo è un fenomeno che si manifesta quotidianamente ed è diffuso nella maggior parte della popolazione, anche in soggetti considerati sani perché asintomatici. In effetti solo una piccola percentuale della popolazione sviluppa la MRGE con la classica sintomatologia ed il danno (macroscopico o microscopico) alla mucosa esofagea, questo grazie alla presenza

meccanismi di difesa a il cui scopo è proteggere la mucosa dall'esposizione ai succhi gastrici. Il primo meccanismo che entra in gioco è la barriera antireflusso, che ha lo scopo di impedire meccanicamente ai succhi gastrici di refluire nell'esofago. Se questo meccanismo fallisce entra in gioco la clearance acida dell'esofago, che ha lo scopo di minimizzare il contatto tra mucosa esofagea e succhi gastrici agendo sia attraverso la peristalsi esofagea sia attraverso la neutralizzazione dei residui acidi attraverso la saliva(Orlando et al.,1999).

## **BARRIERA ANTIREFLUSSO**

Il prerequisito per lo sviluppo della MRGE è il movimento dei succhi gastrici dallo stomaco all'esofago. Normalmente questo fenomeno è impedito a livello della giunzione gastro-esofagea dalla cosiddetta barriera antireflusso, una zona anatomicamente complessa la cui integrità funzionale dipende dalla pressione intrinseca dello Sfintere Esofageo Inferiore (LES), dalla compressione del LES da parte del diaframma ,dalla posizione intra-addominale del LES, dall'integrità del legamento freno esofageo e dal mantenimento angolo di ingresso dell'esofago nello stomaco.

La struttura complessa di questa unità funzionale lascia ipotizzare tre possibili meccanismi alla base del reflusso gastro-esofageo: 1) Rilassamenti transitori dello sfintere esofageo inferiore (tLESR), 2)ipotonicità dello sfintere esofageo inferiore, 3) disfunzioni anatomiche della giunzione esofago-gastrica, tra cui ernia iatale.

Recentemente è stato ipotizzato che alla base delle forme moderate di MRGE ci siano principalmente i tLESR mentre nelle forme più severe prevalgano disfunzioni quali ernia iatale e sfintere lasso (Barham et al., 1995)

## **RILASSAMENTI TRANSITORI DELLO SFINTERE ESOFAGEO INFERIORE**

I tLES sono rilassamenti dello sfintere esofageo inferiore della durata di più di 10msecondi che, al contrario dei LES considerati “fisiologici”, non sono indotti dalla deglutizione né accompagnati dalla contrazione della faringe o dalla peristalsi esofagea. (Holloway et al., 1995).

Il rilassamento dello sfintere esofageo inferiore nei tLESR è associato alla inibizione del diaframma crurale ed alla contrazione del diaframma costale, la frequenza dei tLESR aumenta con la distensione dello stomaco indotta da gas e dal cibo (Martin et al., 1992)

E' stato osservato che i tLESR sono associati alla maggior parte degli episodi di reflusso in individui sani e nei pazienti con MRGE che hanno pressione esofagea normale (maggiore 10mmHg) al momento dell'episodio di reflusso (Mittal et al., 1995).

## **IPOTENSIONE DELLO SFINTERE ESOFAGEO INFERIORE**

Lo sfintere esofageo inferiore è un segmento di 3-4 cm costituito da muscolatura liscia tonicamente contratta. La pressione a riposo del LES varia tra gli individui da 10 a 30 mmHg in relazione alla pressione intra-gastrica, può essere modificata dalla pressione intra-addominale, dalla distensione gastrica, da peptidi, da ormoni, da particolari alimenti e farmaci.. Il meccanismo di contrazione del LES non è ancora stato chiarito, tuttavia sembra che sia una proprietà intrinseca del muscolo piuttosto che un fenomeno innescato da impulsi nervosi, infatti è stato dimostrato su modelli animali che l'inibizione dell'attività nervosa indotta da iniezione intra-arteriale di tetrodotossina influisce solo in minima parte sulla pressione del LES. (Goyal Et al., 1976).

La condizione di LES ipotonicò può portare alla manifestazione di due fenomeni, il primo è chiamato “reflusso indotto da stress”, il secondo è chiamato “reflusso libero”. Nel primo caso l'episodio di reflusso è scatenato da un brusco aumento della pressione intra –addominale (ad

esempio dalla tosse), nel secondo caso si assiste ad una diminuzione del pH intra-esofageo senza cambiamenti rilevabili nella pressione intra-gastrica o del LES. Questi due fenomeni sono molto rari, e si verificano in condizioni in cui la pressione del LES a riposo è minore di 10 mm Hg per il reflusso indotto da stress, e di 4 mmHg per il reflusso libero. (Dent J et al., 1988).

### **CLEARANCE DELL'ACIDO ESOFAGEO NELLA MRGE**

Il periodo di tempo in cui l'esofago rimane a pH minore di 4, a seguito di un episodio di reflusso, viene chiamato "tempo di clearance acida". Questa comincia con lo svuotamento dei fluidi refluiti attraverso la peristalsi e termina con la neutralizzazione degli acidi residui attraverso la saliva deglutita. (Helm et al., 1984).

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

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

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

Le disfunzioni peristaltiche sono causate dalla mancata contrazione muscolare o da contrazioni ipotensive (minori di 30 mmHg). La frequenza di queste disfunzioni aumenta con l'aumentare della severità dell'esofagite (Kahrilas et al., 1986).

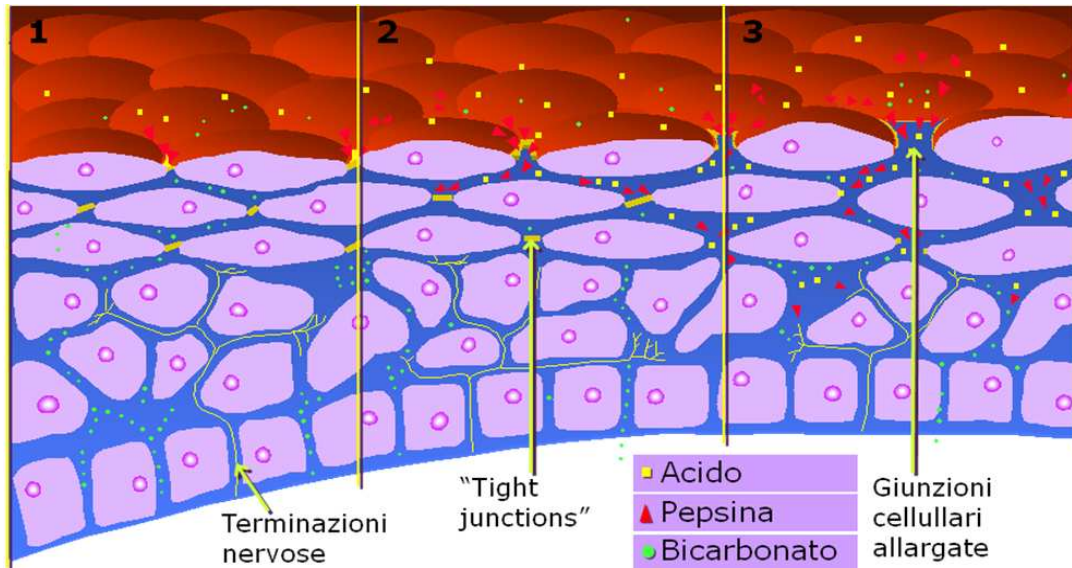
### **FUNZIONE SALIVARE NELLE MRGE**

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

### **RESISTENZA TISSUTALE NELLA MALATTIA DA REFLUSSO**

La mucosa esofagea, per quanto strutturalmente esile e sprovvista di uno strato di muco, è fisiologicamente adatta a proteggere tale organo dalla componente acida del reflusso; è stato dimostrato che la sinergia tra acido gastrico e pepsina (ed eventualmente sali biliari) determina, a parità di concentrazione, un danno maggiore di quanto il solo acido sarebbe in grado di causare, producendo una lesione a carico dell'apparato giunzionale dell'epitelio risultante nell'aumento della permeabilità parietale alle sostanze refluite (Orlando et al., 1999). (fig1.2)





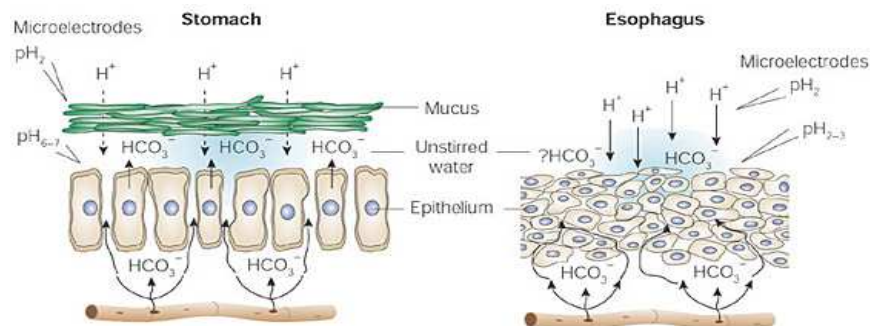
**Figura 1.2:** Ruolo dell'acido nella patogenesi del sintomo. L'insulto acido peptico (1) lede le giunzioni cellulari (2) che a loro volta favoriscono l'ulteriore penetrazione dell'acido (3).

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

### Componente Pre-epiteliale

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

compongono la mucina non hanno la capacità di formare legami crociati, quindi non riescono a formare un vero strato viscoso come avviene invece nello stomaco e nel duodeno. Questo, pur potenzialmente esponendo le cellule ad un maggior insulto, consente di rimuovere i residui parietali di materiale acido refluito, facendoli defluire nuovamente verso il LES, inoltre, mantenendo la superficie a pH ~ 3, limita al minimo l'attività della pepsina .(Orlando et al., 1999). (Fig. 1.3)



**Figura 1.3:** Confronto tra le difese pre-epiteliali gastriche ed esofagee

### Componente epiteliale:

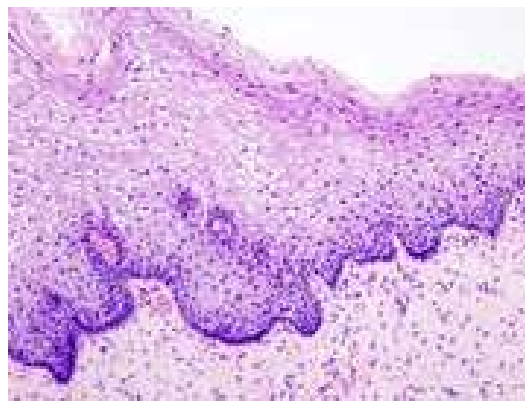
L'epitelio esofageo è di tipo squamoso pluristratificato non cheratinizzato. I circa 30 strati di cellule che lo compongono sono funzionalmente suddivisibili in tre zone: strato corneo, spinoso e germinativo. (Fig. 1.4)

Lo strato corneo è costituito da 5-10 strati di cellule pavimentose in degenerazione e formano una barriera di protezione da insulti sia meccanici che chimici (Elias et al., 1977). Lo strato spinoso è costituito da circa 20 strati di cellule mature metabolicamente attive e responsabili del

trasporto di sodio dal lume al sangue. Queste cellule migrano verso gli strati più esterni per andare a sostituire quelle dello strato corneo.

Lo strato germinativo è costituito da 1 o due strati di cellule cubiche incolonnate, attaccate alla membrana basale attraverso emidesmosomi e capaci di effettuare mitosi.

,



**Figura 1.4:** Epitelio esofageo normale

La componente difensiva “strutturale” dell’epitelio esofageo impedisce la penetrazione della pepsina attraverso l’epitelio esofageo ed è data recinzione formata dalle membrane cellulari, dalle tight junction e dalla matrice glicoproteica che si trova interposta ad esse (Elias et al., 1977)

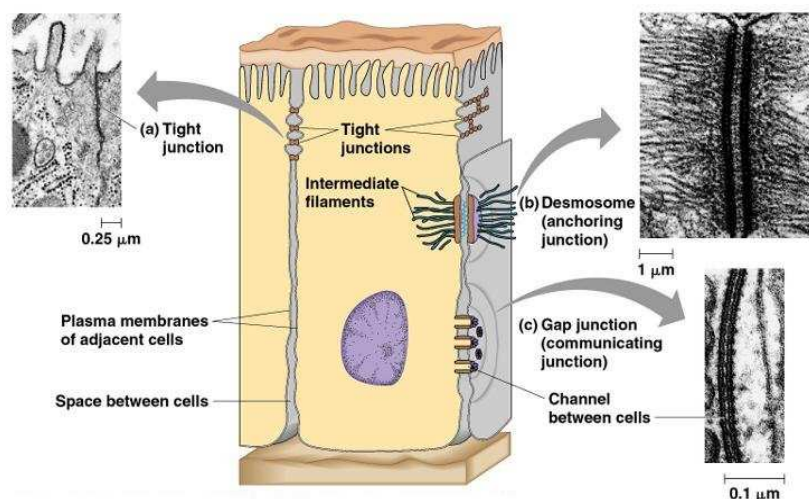
Sulla membrana apicale cellulare sono presenti canali cationici non selettivi pH-dipendenti, a pH luminale  $< 2$  essi sono inibiti ed ogni scambio ionico è impedito (Elias et al., 1977).

Le tight junctions sono ponti proteici intercellulari collegati a tonofilamenti intracellulari, le principali componenti proteiche di queste giunzioni sono occludina, e-caderina e claudina. La presenza delle tight junction è in grado di limitare il passaggio di acido tra gli spazi intercellulari. In condizioni fisiologiche la loro carica negativa tende a renderle selettive per i cationi, quindi

anche per gli ioni  $H^+$ , tuttavia quando il pH lumenale si abbassa diventano selettive per gli anioni, limitando così la diffusione di ioni  $H^+$  (Orlando et al., 1999)

(Fig. 1.5)

Le glicoproteine presenti negli spazi intercellulari sono di natura poco chiara, sembra che queste vengano secrete sotto forma di granuli dalle cellule dello strato spinoso per formare un rivestimento protettivo. A livello degli spazi intercellulari queste glicoproteine agiscono in sinergia con le tight junctions per impedire il passaggio degli ioni idrogeno (Elias et al., 1977)



**Figura 1.5:** Tight Junction, schematizzazione grafica e ultrastruttura microscopica

La componente “funzionale” della resistenza epiteliale entra in gioco quando la rottura delle tight junctions espone la membrana basolaterale ad elevate concentrazioni di ioni idrogeno ed ha lo scopo di ristabilire il pH fisiologico a livello della mucosa e di rigenerare il tessuto danneggiato.

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

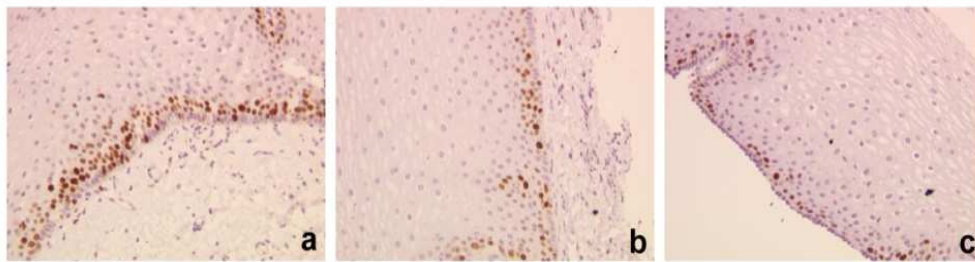
All'interno della cellula la produzione di bicarbonato avviene a partire da acqua e diossido di carbonio con l'intervento delle anidresi carboniche, mentre il bicarbonato extracellulare arriva per diffusione dal circolo sanguigno. (Orlando C., 1999)

Quando la capacità tamponante citosolica diventa insufficiente la neutralizzazione degli ioni idrogeno avviene attraverso il loro trasporto negli spazi intercellulari tramite la pompa  $\text{Na}/\text{H}^+$ , ed attraverso la captazione di bicarbonato attraverso la pompa  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ , la diminuzione di pH a livello degli spazi intercellulari viene a sua volta tamponata dagli ioni bicarbonato provenienti dal circolo sanguigno. (Orlando C., 1999). La rigenerazione fisiologica dell'epitelio è in un ciclo che si svolge normalmente in 5-8 giorni. In presenza di una necrosi, le cellule germinative possono riparare il danno in due modi: il primo è la migrazione di cellule sane adiacenti alla lesione stessa, questo avviene sotto stimolo di fattori di crescita quali: EGF (Epithelial Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) e HGF (Hepatocytes Growth Factor); avviene in breve tempo, non richiedendo neosintesi di acidi nucleici e di proteine, ma può provvedere alla sostituzione delle sole cellule profonde, prossime alla membrana basale, perché inibito ai pH superficiali compresi tra 3.0 e 6.5 (Orlando C., 1999).

Il secondo meccanismo, la replicazione cellulare, è il quello maggiormente attivo in condizioni di MRGE in cui l'insulto acido-peptico è ripetuto e prolungato. Essa viene promossa da EGF, contenuto nella saliva che deterge il lume esofageo, e può quindi addentrarsi nelle zone lese venendo a contatto con i recettori specifici. Il processo è in grado di iniziare in soli 30 minuti ma richiede poi un tempo prolungato, di 2-4 giorni, e l'assenza di agenti lesivi per la completa riparazione delle aree epiteliali necrotiche. La proliferazione dell'epitelio esofageo è aumentata nella malattia da reflusso, in particolare nella NERD, segno di un aumentato turn-over cellulare, espressione del tentativo di riparazione del danno (Calabrese et al., 2007). (Fig. 1.6)

### Post-Epiteliale:

L'afflusso sanguigno garantisce all'epitelio esofageo l'apporto di ossigeno, nutrienti e la rimozione di sostanze tossiche; importante, in presenza di alte concentrazioni di ioni idrogeno, è l'apporto di  $\text{HCO}_3^-$  dal letto vascolare attraverso un processo dinamico mediato, ad esempio, da Istamina, NO (ossido nitrico) e CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) che consente un aumento dell'afflusso sanguigno parallelamente ad una elevazione dell'acidità luminale (Orlando C., 1999)



**Figura 1.6:** Marcatura con Ki-67 delle cellule in proliferazione dello strato germinativo (colorazione in rosso): normale (a), NERD (b), ERD (c)

# *Il sistema endocannabinoide nella fisiologia e nella fisiopatologia del tratto gastrointestinale*

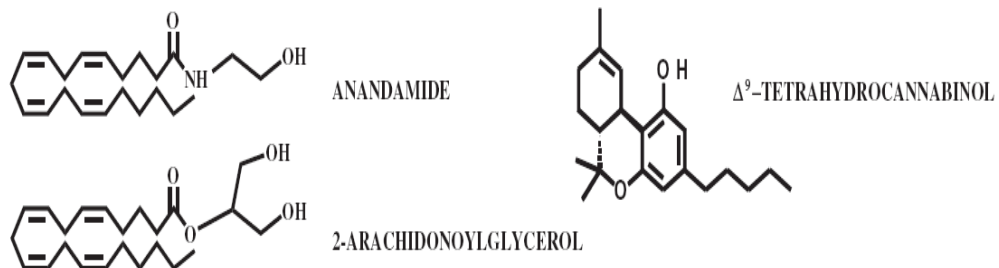
## IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Il  $\Delta^9$  tetraidrocannabinolo è il costituente psicotropo della pianta “Cannabis sativa” e della marijuana. Questa sostanza esercita la sua azione farmacologica interagendo principalmente con due recettori associati a proteina G, il recettore CB1 ed il recettore CB2 (Di Marzio et al., 2006)

Le sostanze endogene in grado di attivare questi recettore sono derivati dell'acido arachidonico coniugati con etanolammmina o glicerolo (fig.1.7), tra queste le più efficaci sono l'anandamide (Devane et al., 1992) ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Mechoulaum et al, 1995)

L'anandamide viene sintetizzata “on demand” a partire dal precursore N-Arachodonoil-fosatidil etanolammmina (NAPE) attraverso l'azione di una fosfolipasi-D specifica (PLD) (Okamoto et al., 2004)

Il 2-AG è un prodotto del metabolismo del triacilglicerolo e la sua sintesi è catalizzata dalla fosfolipasi C (PLC) (Stella et al, 1997).



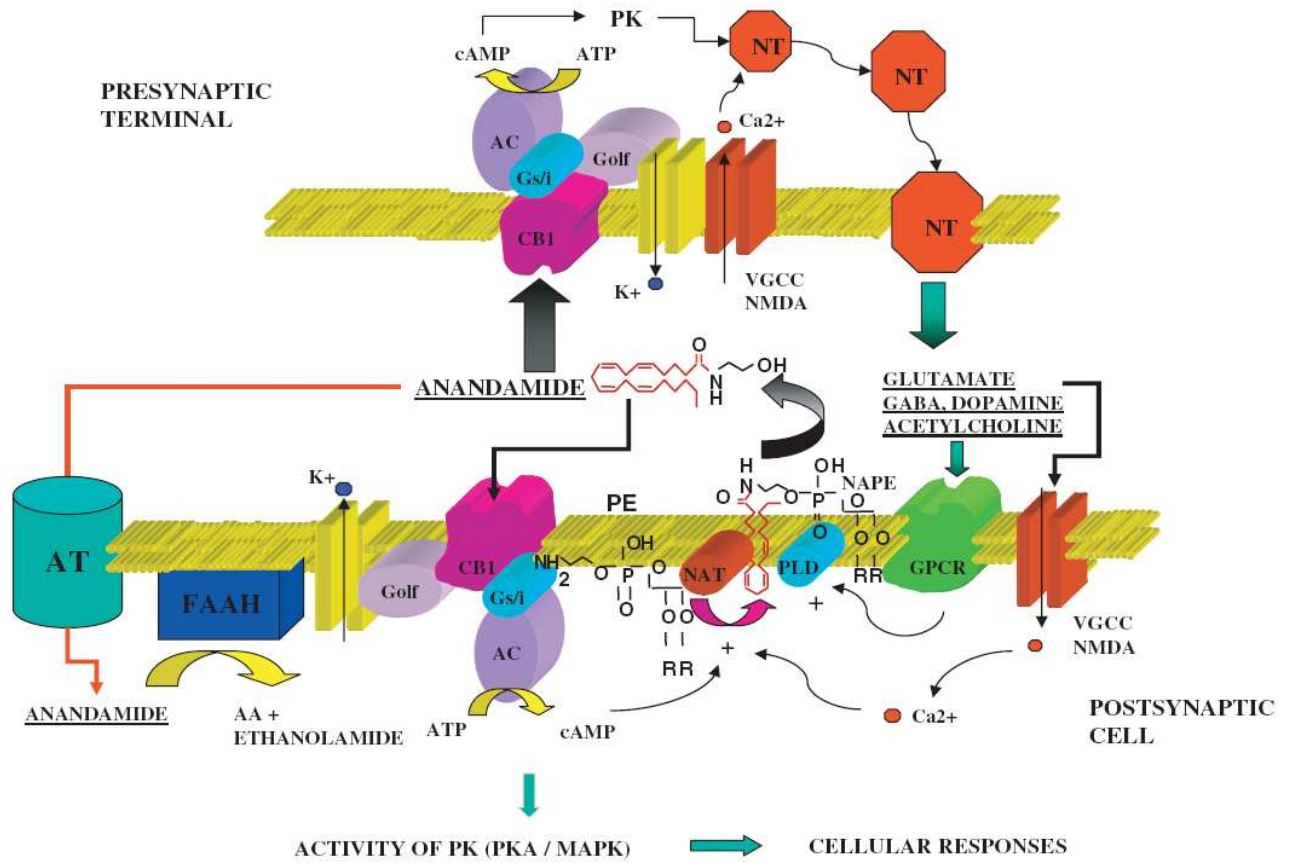
**Fig1.7:** Struttura dei principali agonisti dei recettori CB1 e CB2

Dopo la sintesi i due agonisti raggiungono i recettori CB1 per diffusione attraverso il plasma lemma o possono essere rilasciati nei fluidi extracellulari per raggiungere target più distanti, probabilmente aiutati da carriers come l'albumina (Piomelli, 2003).

La segnalazione endocannabinoide è strettamente controllata e è terminata attraverso un processo che prevede due step, il primo è la ricaptazione dell'Anandamide e del 2-AG all'interno delle cellule, il secondo step prevede la loro degradazione attraverso due specifici sistemi enzimatici.

L'uptake degli endocannabinoidi è mediato da un carrier lipidico con elevata specificità (Beltramo et al, 1997), all'interno della cellula l'anandamide viene degradata dall'enzima fatty acid amide idrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996) mentre il 2-AG viene degradato dall'enzima monoacylglyceride lipase (MAGL) (Dinh et al., 2002) (fig.1.8)

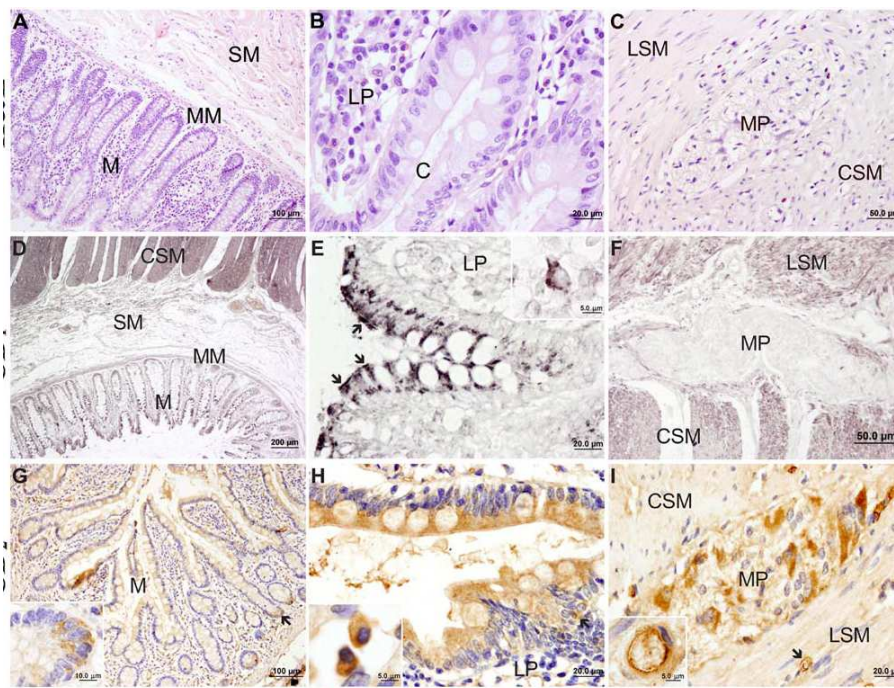




**Fig 1.8:** L'anandamide è rilasciata a partire dal suo precursore, (*N*-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine, NAPE), grazie all'azione della fosfolipasi D (PLD) attivata dalla depolarizzazione mediata da un recettore accoppiato a proteina G. La sintesi di NAPE è catalizzata dall'enzima N-aciltransferasi (NAT) attivato da ioni calcio. E dal cAMP. L'azione dell'anandamide viene terminata attraverso due step, il primo prevede la sua ricaptazione mediata da un carrier, l'anandamide transporter (AT), il secondo prevede l'intervento dell'enzima enzima fatty acid amidohydrolase (FAAH).

## IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLA FISILOGIA DEL TRATTO GASTROINTESTINALE

I recettori CB1 localizzati lungo tutto il tratto gastrointestinale (Casu MA et al., 2006), principalmente a livello dei neuroni enterici estrinseci ed intrinseci (Duncan M et al., 2005), sui corpi cellulari dei neuroni sensitivi, sulle radici dorsali dei gangli, sui gangli nodosi e sulle fibre vagali efferenti (Derbenev et al., 2004; Storr M, 2004). Sulla mucosa intestinale i recettori CB1 sono localizzati a livello delle cripte, in alcune plasmacellule della lamina propria, sulla muscolaris mucosae, e sulla muscolatura liscia. I recettori CB2 sono espressi principalmente nelle plasmacellule della lamina propria, nei macrofagi attivati e nelle cellule epiteliali (sia assorbenti che goblet cells) (Fig 1.9 ( Marquez L. et al., 2009)).



**Fig 1.9:** ematossilina-eosina (A-C), distribuzione di CB1 (D-F) e CB2 (G-I) nella mucosa di colon

Nel tratto gastrointestinale il recettore CB1 è coinvolto principalmente nella regolazione della motilità intestinale, nello svuotamento gastrico, nella secrezione gastrica e nel comportamento alimentare.

### **MOTILITA'**

Esperimenti condotti sui guinea pig dimostrano che agonisti CB1 sono in grado di inibire le contrazioni della muscolatura liscia intestinale (Pertwee et al., 1995; Coutts et al., 1998) attraverso l'inibizione del rilascio di acetilcolina (Mang CF et al., 2001), inoltre è stato dimostrato che nei casi di ipomotilità intestinale associata ad ileo paralitico sono presenti elevate concentrazioni di anandamide ed un'elevata espressione di CB1 (Mascolo N. et al., 2001); il recettore CB2 sembra invece che intervenga nel controllo della motilità intestinale nei casi di ipermotilità indotta da lipopolisaccaridi (Mathison et al., 2004) suggerendo un ruolo specifico nel ripristino della motilità fisiologica alterata da stimoli infiammatori

### **SVUOTAMENTO GASTRICO**

È stato osservato che la somministrazione intravenosa di il  $\Delta$ -9 tetraidrocannabinolo causa una diminuzione dello svuotamento dello stomaco e dell'intestino tenue sia nei roditori (Shook et al., 1989) che nell'uomo (McCallum et al., 1999), l'effetto è mediato direttamente dal recettore CB1, infatti può essere mimato utilizzando agonisti CB1 (WIN 55,212-2) ed inibito da antagonisti CB1 (SR141716) (Landi M et al., 2002; Izzo AA et al., 1999)

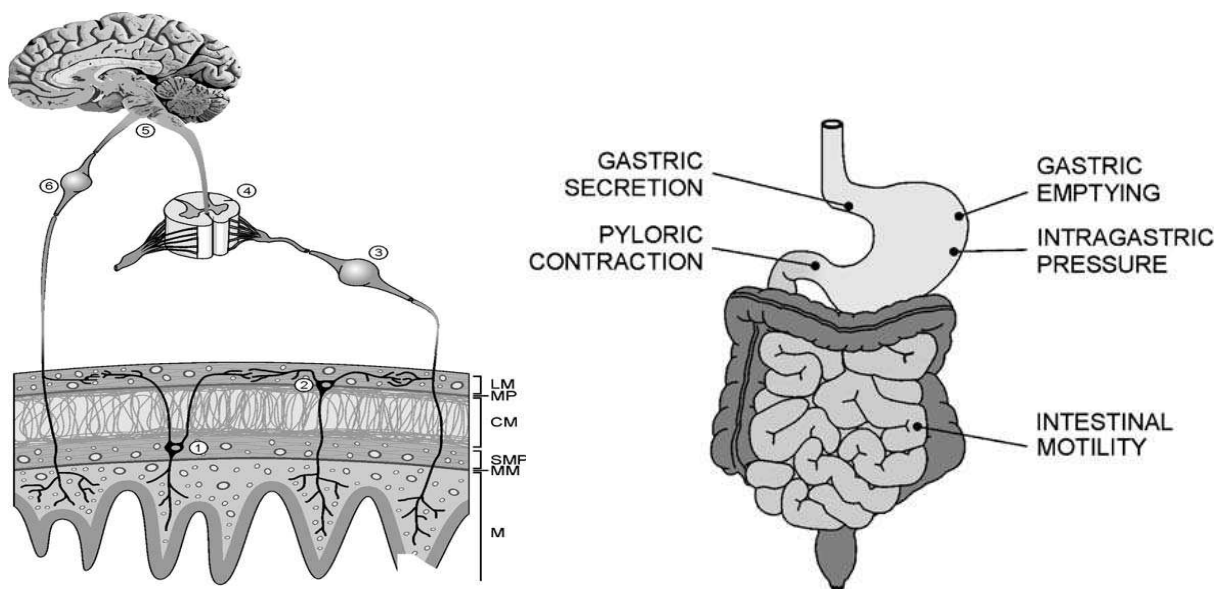
### **SECREZIONE GASTRICA**

A livello della mucosa gastrica il recettore CB1 è espresso dalle cellule parietali (responsabili della secrezione acida) (Pazos et al., 2008), è stato dimostrato che nei topi il  $\Delta$ -9 tetraidrocannabinolo è in grado di inibire la secrezione indotta da istamina (Riva et al., 1980) e che gli agonisti CB1 WIN-55,212-2 e HU210 sono in grado di inibire la secrezione gastrica

attraverso meccanismi periferici, questo effetto viene bloccato da antagonisti CB1, cosa che conferma il coinvolgimento diretto di questo recettore nella regolazione della secrezione gastrica (Pertwee RG, 2001; Corzzi G. et al., 1999; Adami et al., 2002).

## COMPORAMENTO ALIMENTARE

Oltre ai numerosi studi che dimostrano che il sistema endocannabinoide possa regolare l'assunzione del cibo attraverso effetti diretti sul sistema nervoso centrale e periferico (Cota D et al., 2003), è stato anche dimostrato (Gomez R et al., 2002) un meccanismo di azione mediato dai recettori della capsaicina a livello intestinale.(fig.1.10)

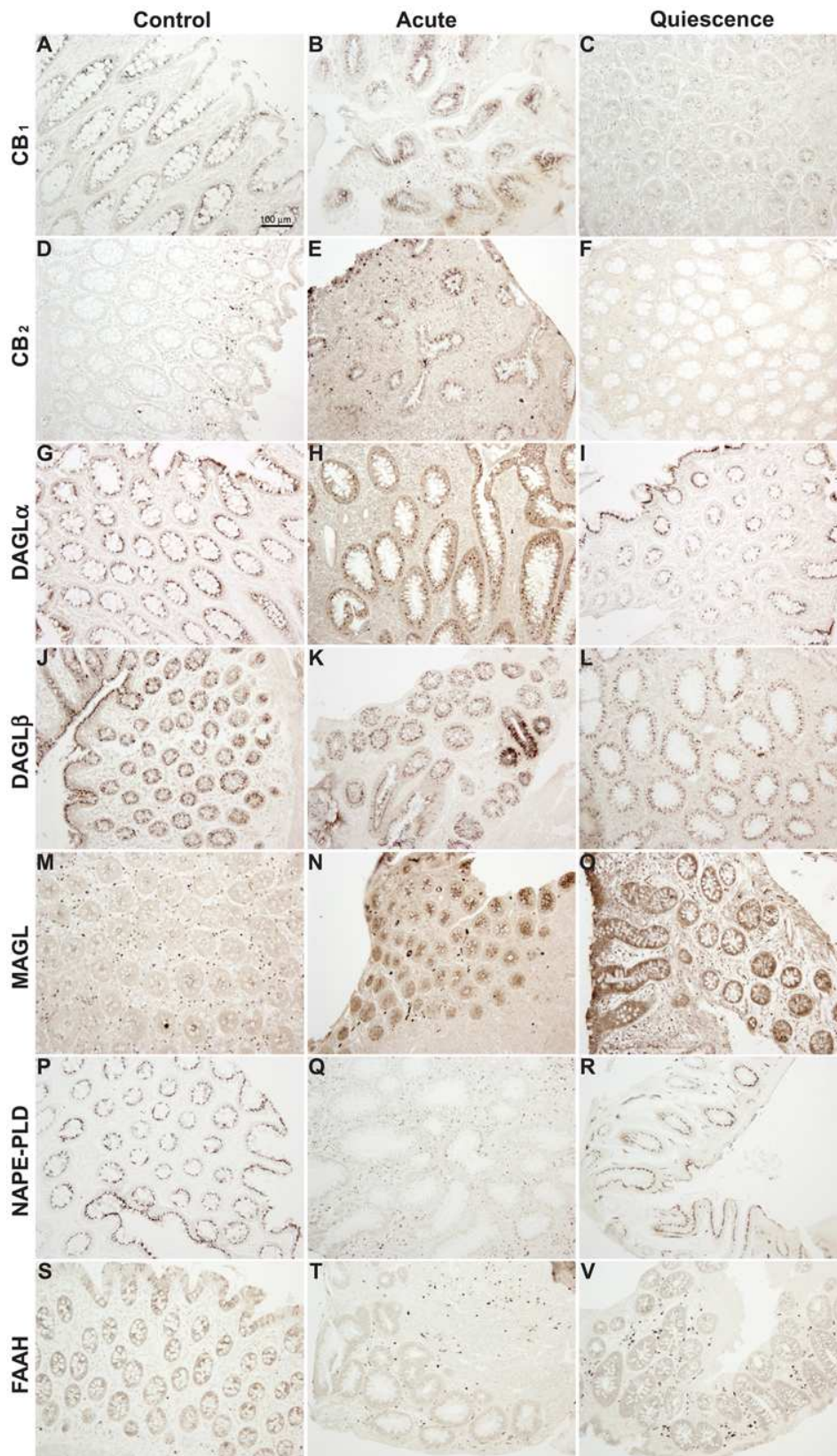


**Fig. 1.10:** localizzazione del sistema endocannabinoide nel sistema nervoso enterico e principali siti d'azione

## *Il sistema endocannabinoide nella fisiopatologia del tratto gastrointestinale*

### **IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLE IBD**

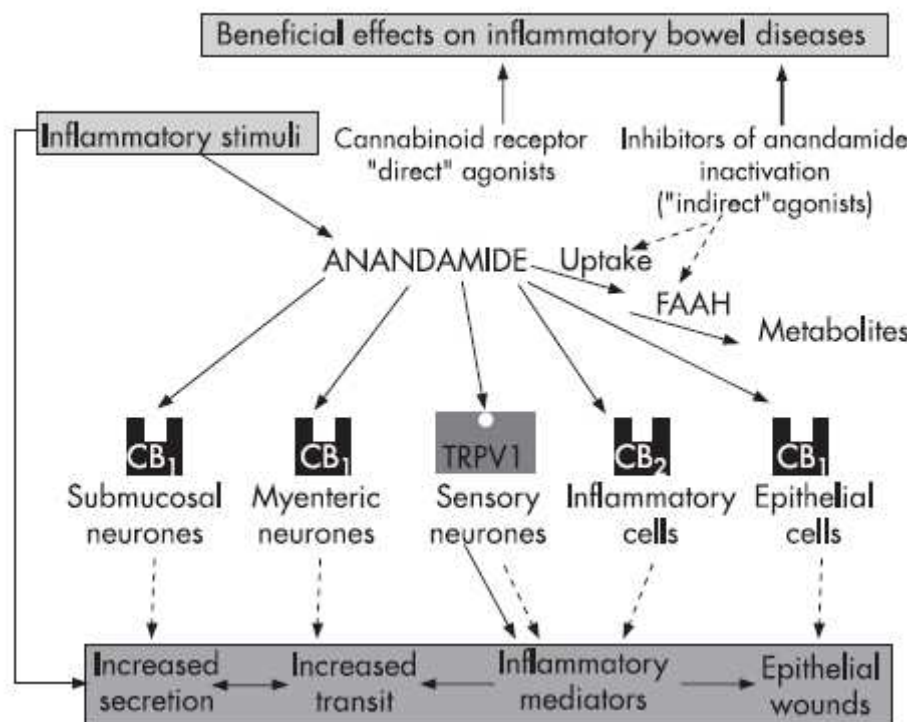
Le malattie infiammatorie croniche intestinali (morbo di Crohn e colite ulcerosa) sono disordini infiammatori cronici di eziologia sconosciuta (D'argenio et al., 2006), caratterizzate da infiltrazione di neutrofili a livello della mucosa, ulcerazioni e necrosi epiteliale. Studi condotti su pazienti con colite ulcerosa hanno dimostrato che nelle forme moderate di pancolite si ha un aumento dell'espressione del recettore CB2 ed una diminuzione di NAPE-PLD, nelle forme in remissione si ha una diminuzione di DAGL-alfa ed un aumento di NAPE-PLD, soprattutto nei pazienti trattati con 5-ASA corticosteroidi. MAGL e FAAH aumentano nella pancolite e diminuiscono dopo il trattamento (Marquez et al., 2009)(fig.1.11).



**Fig 1.11:** Espressione delle componenti del sistema endocannabinoide in soggetti sani (A-S), con colite acuta (B-T) ed in remissione (C-V)

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

Effetti protettivi contro l'infiammazione sono associati anche alla stimolazione dei recettori CB2 (Storr MA et al., 2009) su modelli animali di colite indotta con DNBS e TNBS, inoltre è stato dimostrato che il 2-AG è in grado di diminuire la produzione di TNF-alfa in modelli di colite indotta con LPS (Gallily et al., 2000) (fig.1.12)



**Fig 1.12:** Lo stimolo infiammatorio causa un aumento dei livelli di anandamide e di espressione dei recettori CB1 e CB2 a livello intestinale, l'effetto finale è quello di minimizzare tutte quelle alterazioni caratteristiche dello stato infiammatorio. Questo rende l'attivazione del sistema endocannabinoide una strategia terapeutica potenzialmente efficace nelle malattie infiammatorie intestinali.

## IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLE IBS

La sindrome da colon irritabile (IBS) è un disordine caratterizzato da disturbi addominali, dolore, irregolarità intestinale (Longstreth GF et al., 2006; Drossman DA et al., 2006). I più recenti criteri diagnostici definiscono la sindrome come tale solo se questi sintomi si manifestano almeno per 3 giorni in un mese e per almeno 3 mesi e solo se la sintomatologia migliora con la defecazione, o se è associata con una variazione nella frequenza della defecazione e nella consistenza delle feci. La sintomatologia può variare tra i pazienti, tanto che la sindrome da colon irritabile può presentarsi in due forme, nella prima il sintomo predominante è la diarrea (D-IBS), nella seconda prevale la costipazione (C-IBS), in alcuni casi le due forme possono alternarsi in una patologia definita mista (M-IBS) (Drossman DA et al., 2006). Nella D-IBS il



transito il transito a livello del colon appare aumentato (Vassallo M et al., 1992 ) mentre sembra diminuire nella C-IBS. Il sistema endocannabinoide è coinvolto nella regolazione di molti dei fattori che sono associati alla patogenesi delle IBS (fig.2), infatti è noto che la stimolazione dei recettori CB1 è in grado di diminuire la motilità intestinale mentre l'utilizzo di antagonisti causa un aumento della motilità (Pertwee RG et al., 2007; Pinto L et al., 2002). I recettori CB2 non hanno lo stesso effetto in condizioni fisiologiche, tuttavia sembrano essere in gradi di regolare la motilità intestinale quando questa è alterata da uno stato infiammatorio. Un altro sintomo caratteristico delle IBS è il dolore addominale che sembra essere legato ad un fenomeno di ipersensibilità viscerale (Anand P et al., 2007; Aziz Q et al., 2006) ed è stato dimostrato che il sistema endocannabinoide è coinvolto nella trasmissione e modulazione del dolore viscerale (Jhaveri et al., 2007). E' ancora oggetto di dibattito il ruolo della secrezione intestinale nelle IBS, è stato ipotizzato che anomalie nel riassorbimento dei liquidi a livello dell'ileo distale o del colon potrebbero essere la causa della diarrea. Il recettore CB1 è presente a livello del plesso sottomucosale a livello del quale Il sistema endocannabinoide interviene nella regolazione di secrezione mediata dall'innervazione colinergica (MacNaughton WK et al., 2004) , è stato osservato nei topi che la somministrazione di il Rimonabant (un inibitore dei recettori CB1) provoca un aumento della quantità di acqua presente nelle feci. Nonostante l'implicazione del sistema endocannabinoide nella patogenesi delle IBS non sia stata dimostrata, il potenziale terapeutico di agonisti ed antagonisti dei recettori CB1 in questa patologia sembra essere è elevato.

## **IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NELLA MALATTIA DA REFLUSSO**

I rilassamenti transitori dello sfintere esofageo sono responsabili del reflusso del contenuto gastrico nell'esofago, sono mediati dall'innervazione vagale e modulati dal sistema endocannabinoide: il recettore CB1 è stato localizzato a livello del complesso vagale dorsale,

sia la somministrazione di D9-THC che la somministrazione dell'agonista CB1 WIN 55,212-2 causa nei roditori (Partosiedarso ER et al., 2003) e nei cani (Lehmann 3t al., 2002) una diminuzione dei tLESR indotti dalla distensione gastrica ed una diminuzione del reflusso, tale effetto viene bloccato dalla somministrazione dell'antagonista CB1 SR141716A.

## II. Scopo della ricerca

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

E' stato dimostrato che i pazienti con MRGE hanno una capacità proliferativa epiteliale ridotta rispetto agli individui sani, in particolare è stato osservato che l'attività proliferativa è diminuita del 50% nei pazienti con NERD e del 75% nei pazienti con ERD (Calabrese et al., 2007). I meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno rimangono sconosciuti.

I recettori degli endocannabinoidi CB sono recettori accoppiati a proteina G che a livello del tratto gastrointestinale sembra siano coinvolti nella modulazione della contrazione della muscolatura liscia, della secrezione, dell'infiammazione e della riparazione del danno tissutale. (Massaet al, 2005; Croci et al., 2003;)

Nella MRGE l'attivazione dei recettori CB1 in modelli animali si è rivelata efficace nel diminuire i rilassamenti dello sfintere esofageo inferiore alla base degli episodi di reflusso gastro-esofageo. La distribuzione dei recettori CB1 è stata ampiamente studiata a livello della mucosa gastro-intestinale mentre non ci sono studi che abbiano valutato l'espressione di questo recettore a livello esofageo. Lo scopo di questo studio è quello di valutare la presenza del recettore CB1 nella mucosa esofagea di pazienti con NERD, ERD ed in soggetti sani.

# III. Materiali e metodi

## *Soggetti Studiati*

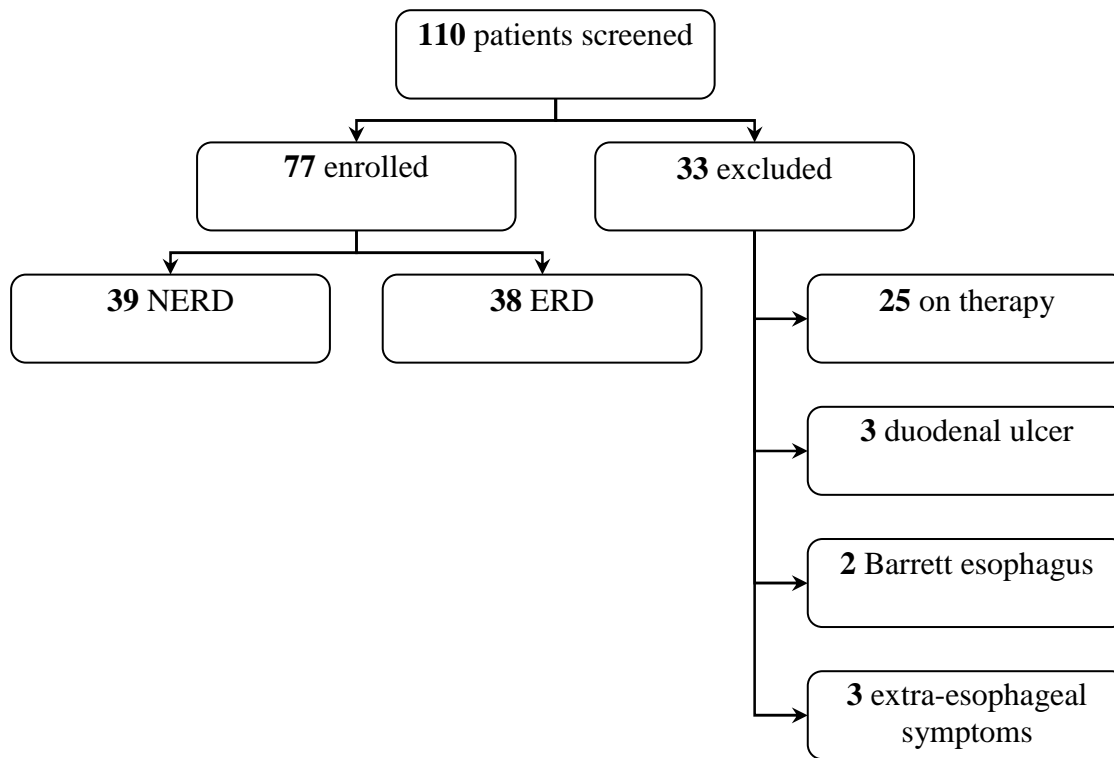
Per questo studio sono stati valutati 110 pazienti. I criteri di inclusione sono stati la presenza da almeno un anno sintomi riconducibili alla malattia da reflusso gastro-esofageo (pirosi e/o episodi di rigurgito), presenza di pH esofageo alterato durante 24 ore di monitoraggio e probabilità basata sull'associazione dei sintomi (SAP). I criteri di esclusione sono stati la presenza di tumori maligni nell'esofago o nello stomaco, esofago di Barrett istologicamente evidente, ulcera gastrica o duodenale, operazione chirurgiche all'esofago o allo stomaco, sintomi extraesofagei, assunzione di inibitori della secrezione o farmaci procinetici rispettivamente 30 e 15 giorni prima dell'arruolamento. Dei 110 pazienti, 77 (età media 45+/- 13.4 anni, range 21-80, 35 uomini) sono risultati idonei per partecipare allo studio (fig.3.1).

Tutti questi pazienti sono stati sottoposti ad endoscopia, sono stati effettuati prelievi biotipici per la valutazione istologica della patologia.

Dei 77 pazienti 39 avevano la mucosa apparentemente illesa (NERD), 38 avevano esofagite erosiva (ERD) (tab.3.1)

Questa popolazione è stata comparata con 10 volontari sani (età media 38.2+/-17,6 anni, range 25-63, uomini). I volontari sani non presentavano i tipici sintomi né le tipiche manifestazioni della MRGE, non presentavano lesioni visibili alla mucosa né alterazioni di esposizione agli acidi. (la media del reflusso acido totale è 1,1%+/-0,4%)

Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato approvato dal comitato etico locale



**Fig.3.1:** profilo dello studio

## ***MONITORAGGIO DEL pH PER 24 ORE***

Tutti i pazienti sono stati sottoposti per 24 ore al monitoraggio del pH in accordo con il nostro protocollo (Calabrese et al., 2007). Durante il test la composizione e l'orario dei pasti sono stati standardizzati. I parametri di reflusso sono stati valutati in accordo con Jihnsen e DeMesteer). E' stata tenuta in considerazione solo la percentuale di tempo in cui il pH era <di 4.0. Il pH è stato considerato anomalo solo se presente per più del 5% delle 24 ore. Il SAP è stato calcolato in accordo con Weusten et al., ed è stato considerato positivo solo con percentuale maggiore di 95%.

## ***VALUTAZIONE ENDOSCOPICA***

I pazienti sono stati sottoposti a gastroscopia (videogastroscopio Olympus GIF 140) dopo sedazione con midazolam i.v. (2,5 mg) per valutare la presenza di esofagite erosiva.

Il grado di esofagite è stato valutato in accordo con la classificazione di Los Angeles (Armstrong et al., 1996). In ogni soggetto sono stati effettuati 8 prelievi biotici con pinza standardizzata (Olympus FB 24K). Da ognuno dei quattro quadranti è stato effettuato un prelievo doppio, 5 cm sopra la giunzione squamo-colonnare (SCJ), da mucosa macroscopicamente intatta. La SCJ (o linea Z) è stata definita come il bordo tra le ghiandole gastriche e l'epitelio esofageo.

Degli 8 prelievi effettuati, 5 sono state orientate in supporto di cellulosa acetata (Endofilters Bioptica, Milan, Italy), fissate in formalina al 4% ed incluse in paraffina per l'esame istologico e per la valutazione di MIB1 e CB1; 3 biopsie sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C per l'estrazione di RNA e proteine.

## ***IMMUNOISTOCHIMICA***

Le biopsie sono state fissate in formalina al 4% ed incluse in paraffina. Sezioni di tessuto di 3 µm sono state montate su vetro portaoggetto, deparaffinate con xilene e reidratate attraverso una scala di alcool. Il tessuto è stato bloccato in Albumina di siero bovino (BSA) al 5 % in buffer fosfato (PBS) per 1 h ed incubate overnight a 4°C con anticorpo CB1 (Cayman Chemicals, USA) diluito 1:500 in PBS. Il controllo negativo è stato effettuato bloccando l'anticorpo con blocking peptide come suggerito dalla ditta produttrice (Cayman Chemicals, USA). Le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario anti-rabbit a temperatura ambiente per 30 minuti con 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO) per 4 minuti. Le sezioni sono state colorate in ematossilina.

## ***VALUTAZIONE DI MIB1***

L'espressione di MIB 1 è stata valutata utilizzando un anticorpo anti.Ki-67 (MoAbs) (clone MIB-1; BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA). I tessuti sono stati sottoposti a smascheramento antigenico con buffer di sodio citrato 10 mM (pH 6.0) per 20 minuti. La reazione è stata sviluppata in 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride e le sezioni sono state in seguito colorate con ematossilina. La valutazione quantitativa di MIB1 è stata effettuata su campi contigui utilizzando un Pentium III OC dotato di 3 CCD (charged couple device) e fotocamera (KY F55B, JVC, Pinebrook NJ, USA) connessa ad un microscopio ottico (Leitz DIAPLAN).

Per ogni caso è stata effettuata la valutazione dell'intera sezione longitudinale del tessuto al di sopra delle papille connettivali, per circa 100 µm dallo strato basale. L'indice di positività

(MIB1-LI) è stato calcolato dal rapporto tra numero di cellule positive e numero di cellule totali, ed espresso in percentuali.

## ***ESTRAZIONE DELL'RNA E REAL-TIME PCR***

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

L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando la formula  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  values ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene} - \text{Ct hk}$ ). I primers utilizzati per il CB1 sono 5'- TATGCTCTGCCTGCTGAAC-3' and 5'- TGACCGTGCTCTTGATGC-3' (215 bp), i primer utilizzati per GUSB sono 5'- TGGTATAAGAAGTATCAGAAGCC-3' and 5'-GTATCTCTCTCGCAAAGGAAC-3' (297 bp)

## ***WESTERN BLOTTING***

Le biopsie sono state omogeneizzate in buffer di lisi (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 ed inibitori delle proteasi). I lisati sono stato incubati in



ghiaccio per un'ora e centrifugati a 12000g. Ai surnatanti raccolti è stato aggiunto SDS-PAGE sample buffer, i campioni sono stati fatti bollire. 50 µg di proteine sono state separate in SDS-PAGE al 12% e trasferite su membrana in PVDF. Dopo il trasferimento le membrane sono state incubate con anticorpo policlonale anti CB1 (Sigma, USA) e con anticorpo anti-β-actina (Sigma, USA). Gli anticorpi secondari (Cy3-coniugati) sono stati acquistati dalla GE, USA. La rivelazione immunologica è stata effettuata utilizzando il protocollo ECL-plex, in accordo con le istruzioni della ditta produttrice (GE, USA) ed uno specifico scanner (Pharos FX, BioRad, USA). Le bande sono state quantificate attraverso densitometria utilizzando il software Quantity One, Bio-Rad, USA).

L'espressione di CB1 è stata normalizzata contro la β-actina.

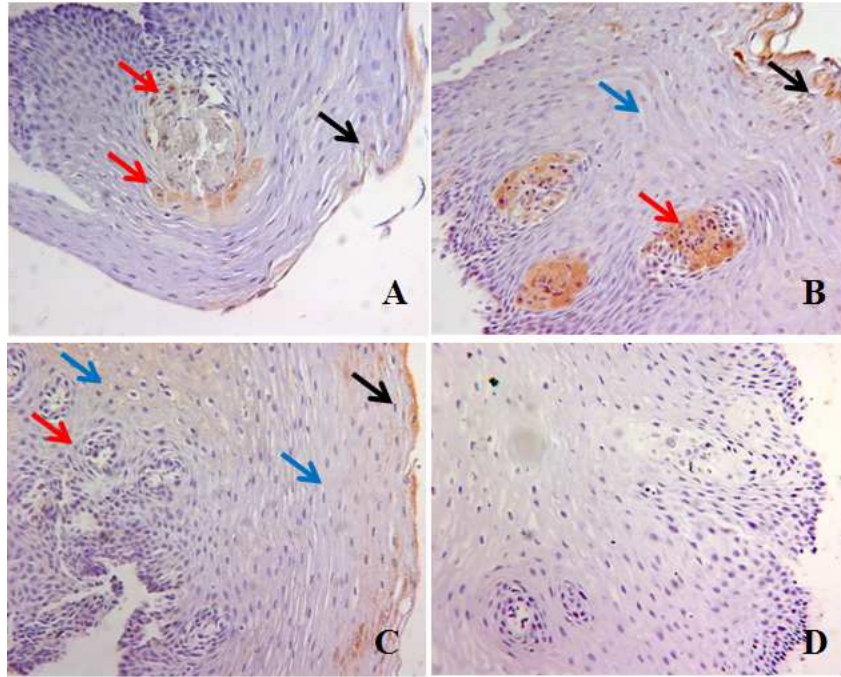
## ***ANALISI STATISTICHE***

Il test di Student è stato effettuato per entrambe le variabili indipendenti. Il test di Mann-Whitney è stato effettuato per comparare i dati di cinetica di ogni gruppo di soggetti. Una  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. I dati sono stati analizzati con il software SPSS (SPSS, Chicago, IL).

# IV. RISULTATI

## *IMMUNOISTOCHEMICA DEL RECETTORE CB1*

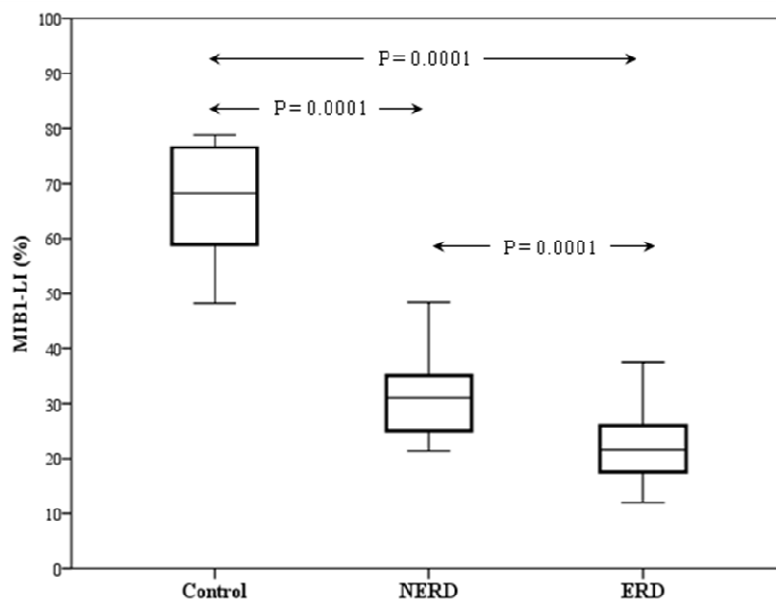
L'immunoistochimica effettuata con anticorpo anti-CB1 mostra la presenza di questo recettore nella mucosa esofagea sia di pazienti con MRGE che di pazienti sani. Una positività debole è stata trovata nelle cellule squamose mature ( Fig4.1 A freccia nera) e nelle papille connettivali (fig.4.1 B frecce rosse) della mucosa dei pazienti sani. Nei pazienti con esofagite non erosiva è si evidenzia una forte colorazione a livello delle cellule squamose mature (fig. 4.1 B, freccia nera), nelle cellule squamose ( figura 4.1 B freccia blu) ed a livello delle papille connettivali (fig.4.1 B freccia rossa). Nei pazienti con malattia da reflusso erosiva è stata trovata positività nelle cellule squamose mature (fig.4.1 C freccia nera) e nelle cellule squamose (fig.4.1 C frecce blu), mentre le papille connettivali sembrano essere negative.



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

## ***QUANTIFICAZIONE DI MIB1***

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



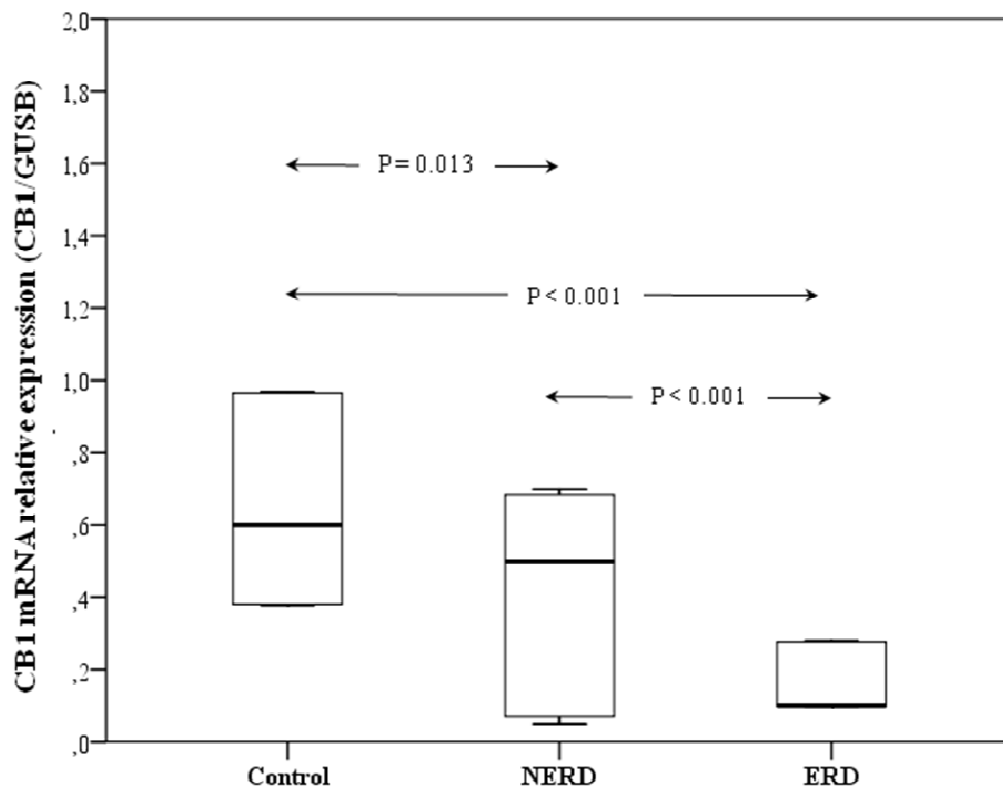
**Fig 4.2:** Box plots del MIB-1 label index (LI), mediana (linea nel box), e range interquartile line superiori ed inferiori ) nella mucosa esofagea di pazienti sani, NERD ed ERD

## ***ESTRAZIONE DELL’RNA E REAL-TIME PCR***

Nei pazienti con malattia erosiva l’espressione relativa dell’ mRNA di CB1 è fortemente diminuita rispetto ai pazienti con malattia non erosiva, in particolare l’espressione relativa nei NERD è tre volte superiore rispetto agli ERD, con una elevata variabilità tra i soggetti.

Nei pazienti sani l’espressione relativa del messaggero di CB1 è significativamente differente rispetto ai NERD. L’espressione relativa di CB1/GUSB varia da 0.5 tra 0.968 in tutti i pazienti, con un valore medio di 0.32 ( $\pm$  0.28). La media di CB<sub>1</sub>mRNA/GUSB mRNA nei soggetti sani

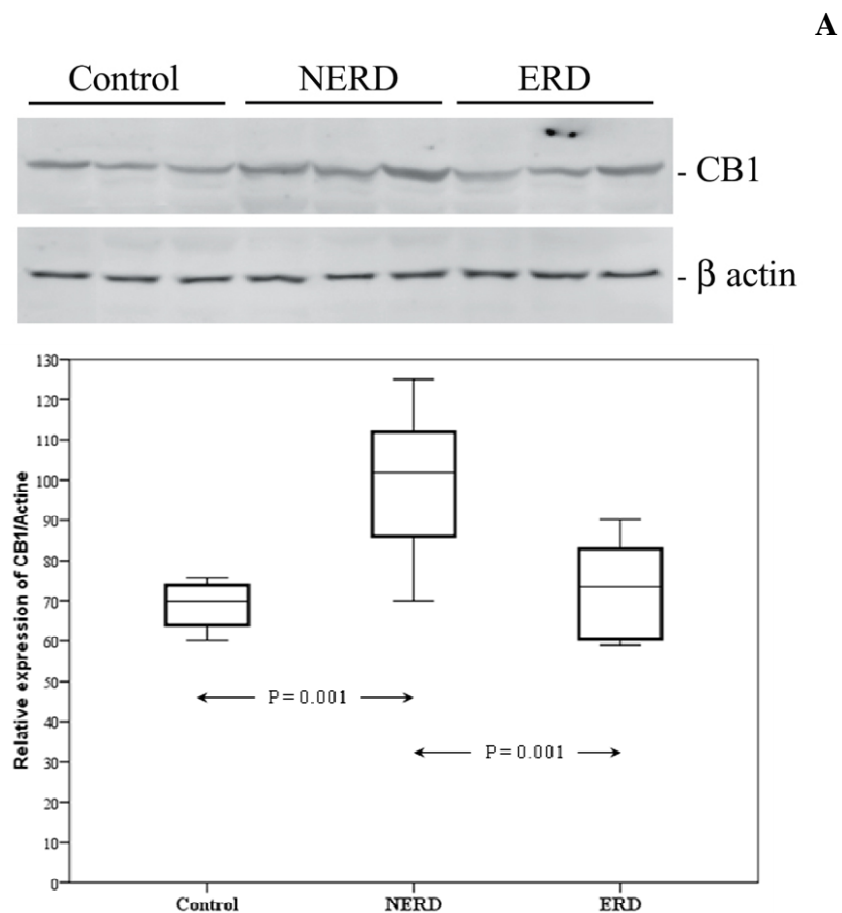
era di  $0.66 (\pm 0.28)$  mentre nei pazienti con MRGE era  $0.28 (\pm 0.24)$ . Nei pazienti NERD e ERD la media dei valori di  $CB_1/GUSB$  era  $0.38 (\pm 0.3)$  and  $0.17 (\pm 0.09)$ , rispettivamente, con differenze significative tra il gruppo NERD ed il gruppo ERD ( $p < 0.001$ ) (fig. 4.3).



**Figura 4.3:** Box plots dell'espressione relativa  $CB_1/GUSB$ , nella mucosa esofagea di controlli sani, pazienti NERD ed ERD .

## WESTERN BLOT

L'analisi dell'espressione proteica mostra una differenza tra pazienti erosivi e non erosivi, in particolare i pazienti NERD mostrano un'espressione maggiore di CB1 rispetto agli ERD. (fig.4.5 A). L'espressione relativa CB1/ $\beta$ -actina variava da 59 a 95 tra tutti i soggetti, con valori medi di 84,7 ( $\pm$  18.8) ed un valore mediano di 82,7. Nei pazienti NERD ed ERD la media di CB<sub>1</sub>/ $\beta$ -actina era rispettivamente 99.9 ( $\pm$  15.8) e 73.3 ( $\pm$  10.5), con una differenza significativa tra i NERD rispetto ai controlli ed i pazienti ERD ( $p < 0.001$ ) (fig. 4.5 B).



**Figura 4.5:** A: Analisi WB dell'espressione del recettore CB1 nella mucosa esofagea di controlli sani, pazienti NERD ed ERD. La figura è rappresentativa di almeno 3 esperimenti B:Box plots dell'espressione relativa di CB<sub>1</sub>/ $\beta$ -actin, nella mucosa esofagea di controlli sani, pazienti NERD ed ERD.

# V. DISCUSSIONE

Il presente studio dimostra per la prima volta la presenza del recettore CB1 nell'epitelio esofageo umano.

Inoltre dimostra che il recettore CB1 è espresso in maniera differenziale tra i pazienti con malattia da reflusso erosiva e malattia da reflusso non erosiva.

Nell'ambito della MRGE diventa sempre più evidente che il reflusso è il risultato di un disequilibrio tra meccanismi protettivi e fattori aggressivi (Shindlbeck et al, 2007;). Dal momento che i fattori aggressivi sembrano operare nello stesso modo tra i pazienti NERD ed ERD, è ragionevole ipotizzare che i meccanismi difensivi giochino un ruolo principale nel determinare la presenza o meno di danni istologici. E' stato già dimostrato che la mucosa esofagea dei pazienti con sintomi del reflusso e con esofagite erosiva presenta una capacità proliferativa diminuita rispetto alla mucosa di pazienti con malattia non erosiva (Calabrese et al., 2007). In tutti i pazienti arruolati l'epitelio esofageo esposto cronicamente al reflusso mostra un numero di cellule proliferanti più basso rispetto ai controlli sani, anche in presenza di mucosa macroscopicamente normale. In particolare la media del valore MIB1-LI è 31% e 22% rispettivamente nei pazienti NERD ed ERD contro il 68% nei pazienti sani. Recentemente è stato dimostrato che il trattamento con inibitori di pompa protonica riducono l'entità dell'insulto acido e stimolano la proliferazione cellulare, e che il trattamento con questi farmaci è efficace, a lungo termine, nell'incrementare la proliferazione epiteliale nelle MRGE (Calabrese et al., 2009).

La ridotta attività proliferativa osservata nei pazienti con MRGE potrebbe essere causata dal danneggiamento cellulare cronico o da una bassa capacità proliferativa costitutiva, che rende più suscettibili ai danni tissutali causati dal reflusso.

Il recettore CB1 ed il sistema endocannabinoide sono sovraregolati durante l'infiammazione intestinale (Izzo et al., 2006), oltre ad avere un effetto antinfiammatorio, l'attivazione del CB1 può promuovere la riparazione tissutale (Wright et al., 2005).



I nostri dati mostrano un aumento dell'espressione CB1 nella mucosa esofagea di pazienti NERD rispetto ai pazienti ERD. La RT-PCR mostra una diminuzione del mRNA CB1 nei pazienti con MRGE rispetto ai pazienti sani ed un'espressione nei NERD due volte maggiore rispetto agli ERD.

L'analisi effettuata con western blotting conferma una maggiore espressione del CB1 nei pazienti NERD rispetto agli ERD, e tra NERD rispetto ai controlli sani, tuttavia mostra che non ci sono differenze tra pazienti ERD e pazienti sani, al contrario di quanto succede a livello di RNA messaggero.

Questo dato rafforza l'ipotesi che nei pazienti MRGE può entrare in gioco una diversa regolazione post-trascrizionale che potrebbe essere alla base delle differenze fenotipiche osservate ed è possibile che l'infiammazione a livello della mucosa causi un'alterazione dell'espressione del gene cb1 mediata da micro-RNA, come è stato suggerito recentemente (Sanchez et al., 2010).

Il ruolo del recettore CB1 a livello della mucosa esofagea potrebbe rappresentare un meccanismo di difesa epiteliale contro l'insulto del reflussato, anche se non si può escludere che possa avere un ruolo immunomodulante. Ulteriori studi saranno necessari per capire il ruolo del sistema endocannabinoide nei meccanismi di difesa della mucosa esofagea.

## VI. REFERENCES

- Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, De Caro G, Coruzzi G, Soldani G (2002) Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 135:1598–1606
- Allen A, Garner A. Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut*, 1980; 21:249
- Anand P, Aziz Q, Willert R, Van Oudenhove L. Peripheral and central mechanisms of visceral sensitization in man. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 29–46
- Armstrong D, Bennett JR, Blum LA, et al. The endoscopic assessment of esophagitis: a progress report on observer agreement. *Gastroenterology* 1996; 111: 85–92
- Aziz Q. Visceral hypersensitivity: fact or fiction. *Gastroenterology* 2006; 131: 661–4.
- Barham CP, Gotley DC, Alderson D. Precipitating causes of acid reflux episodes in ambulant patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* 1995; 36:505-510
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A. and Piomelli, D. (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**, 1094–1097
- Calabrese C, Trere D, Fabbri A, et al. Endoscopic appearance of GERD: putative role of cell proliferation. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 713-19
- Calabrese C, Trere D, Liguori G, et al. Esophageal cell proliferation in Gastroesophageal reflux disease: Clinical-morphological data before and after pantoprazole. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 936-41
- Calabrese C., Fabbri A., Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 525–532.
- Casu MA, Porcella A, Ruiu S, et al. Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol* 2003;459:97–105.
- Coruzzi G, Adami M, Coppelli G, Frati P, Soldani G (1999) Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anaesthetized rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360:715–718

Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U (2003) Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 289–301

Coutts AA, Pertwee RG (1998) Evidence that cannabinoid-induced inhibition of electrically evoked contractions of the myenteric plexus—longitudinal muscle preparation of guinea pig small intestine can be modulated by Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Can J Physiol Pharmacol* 76:340–346

Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., and Gilula, N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**, 83–87.

Croci T, Landi M, Galzin AM, et al. Role of cannabinoid CB1 receptors and tumor necrosis factor-alpha in the gut and systemic anti-inflammatory activity of SR 141716 (rimonabant) in rodents. *Br J Pharmacol*. 2003; 140:115-22

De Fonseca FR, Del Arco I, Francisco Javier Bermudez S, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol & Alcoholism* Vol. 40, No. 1, pp. 2–14, 2005. Massa F, Storr M, Lutz B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med*. 2005; 83:944-54.

Dent J., Dodds WJ., Hogan WJ., Toouli J. Factors that influence induction of gastro-esophageal reflux in normal human subjects. *Dig Dis Sci* 1988; 33:270-275

Derbenev AV, Stuart TC, Smith BN. Cannabinoids suppress synaptic input to neurones of the rat dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *J Physiol* 2004;559:923–38.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A. *et al.* (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–1949

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Disc* 2004;3:771–84.

Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S. and Piomelli, D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10819–10824.

Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377–90

Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377–90

Duncan M, Davison JS, Sharkey KA. Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:667–83

Duncan M, Davison JS, Sharkey Ka. Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:667–83.

E. R. Partosoedarso, T. P. Abrahams, R. T. Scullion, J. M. Moerschbaecher and P. J. Hornby Cannabinoid1 receptor in the dorsal vagal complex modulates lower oesophageal sphincter relaxation in ferrets *J Physiol* (2003), 550.1, pp. 149–158.

Elias PM, McNutt NS, Friend DS. ; Membrane alterations during codification of mammalian squamous epithelia: a freeze fracture, tracer and thin section study. *Anat Rec* 1977; 189:577

Federico Massa, Martin Storr, Beat Lutz. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med* (2005) 83: 944–954

Giuseppe D'Argenio, Marta Valenti, Giuseppe Scaglione, Vittorio Cosenza, Italo Sorrentini, and Vincenzo Di Marzo. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *The FASEB journal* , 2006. 10.1096/fj.05-4943fje.

Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2002) A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci* 22:9612–9617

Goyal RK., Rattan S. Genesis of basal sphincter pressure: effect of tetrodotoxin on lower esophageal sphincter pressure in opossum in vivo. *Gastroenterology* 1976; 71:62-67

Helm JF, Dodds WJ, Pelc LR, Palmer DW, Hogan WJ, Teeter BC. Effect of esophageal emptying and saliva on clearance of acid from esophagus. *N Eng J med* 1984; 310:284-288

Holloway RH, Penagini R., Ireland AC. Criteria for objective definition of transient lower esophageal relaxations. *Am. J. Physiolol.*; 1995, 268:G128-G133.

Human Gastric Mucosa. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Volume 56(5): 511–516, 2008

Iwakiri K, Kobayashi M, Kotoyori M, Yamada H, Sugiura T, Nakagawa Y. Relationship between postprandial esophageal acid exposure and meal volume and fat content. *Dig. Dis. Sci* 1996; 41:926-930

Izzo AA, Fezza F, Capasso R, et al. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 563-70

Izzo AA, Mascolo N, Capasso R, Germano MP, De Pasquale R, Capasso F (1999) Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360:221–223

Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 624–32

Johnson LF, DeMeester TR. Twenty-four hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 1974; 62: 325–32

Johnson LF. 24-hour pH monitoring in the study of gastroesophageal reflux. *J Clin Gastroenterol* 1980; 4:73-80

Juan José Gorgojo, Manuel Nevado, Mariano Álvarez, Francisco Arias, Francisca Almodovar,  
Kahrilas PJ, Gupta RR. The effect of cigarette smoking on salivation and esophageal acid clearance. *J Lab Clin Med* 1989; 114:431-438

Karen Wright, Nicholas Rooney, Mark Feeney, Jeremy Tate, Duncan Robertson, Melanie Welham, Stephen Ward. Differential expression of Cannabinoid Receptor in the Human Colon: Cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 2005;129:437-453.

KL Wright<sup>1</sup>, M Duncan and KA Sharkey. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *British Journal of Pharmacology* (2008) 153, 263–270

Klauser AG, Schindlebeck NE, Muller-Lissner SA. Symptomatic gastro-oesophageal disease. *Lancet* 1990; 335:205-208

Konturek SJ, Radecki T., Brzozowski R., Piastucki I, Dembniski A, Gastric cytoprotection by epidermal growth factor, role of endogenous prostaglandins and DNA synthesis. *Gastroenterology* 1981; 81:438-443

Landi M, Croci T, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Manara L (2002) Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 450:77–83

Lehmann Anders, Blackshaw L.A., Branden L, Carllson A, Jensen J, Nygren E, Smid SD. Cannabinoid receptor agonism inhibits transient lower esophageal relaxation and reflux in dogs. *GASTROENTEROLOGY* 2002;123:1129–1134

Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480–91.

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

Mang CF, Erbelding D, Kilbinger H (2001) Differential effects of anandamide on acetylcholine release in the guinea-pig ileum mediated via vanilloid and non-CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 134:161–167

Mari´a Ruth Pazos, Rosa Mari´a Tolo´n, Cristina Benito, Conrado Fern´andez Rodr´ıguez, Mari´a Teresa Pe´rez Fern´andez, Jose´ Luis Lledo´, Sara Gonz´alez, Jose´ Javier Fern´andez-Ruiz, and Julia´n Romero. Cannabinoid CB1 Receptors Are Expressed by Parietal Cells of the

Marquez L., Suarez J, Iglesias M, Bermudez-Silva FJ, Rodriguez de Fonseca F., Andreu M. Ulcerative Colitis change the expression the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS ONE* 2009; 4:9 e6893

Martin A Storr, Catherine M. Keenan, Hong Zhang, Kamala D. Patel, Alexandros Makriyannis, Keith A. Sharkey. Activation of the Cannabinoid 2 Receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2009. 15:1678-1685

Martin C., Dodds Wj, Liem H., Dantas R., Layman R., Dent J.. Diaphragmatic contribution to gastroesophageal competence and reflux in dogs. *Am J. Physiology* 1992; 263:G551-G557

Mascolo N, Izzo AA, Ligresti A, Costagliola A, Pinto L, Cascio MG, Maffia P, Cecio A, Capasso F, Di Marzo V (2002) The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *FASEB J* 16:1973–1975

Mathison R, Ho W, Pittman QJ, Davison JS, Sharkey KA (2004) Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* 142:1247–1254

McCallum RW, Soykan I, Sridhar KR, Ricci DA, Lange RC, Plankey MW (1999) Delta-9-tetrahydrocannabinol delays the gastric emptying of solid food in humans: a double-blind, randomized study. *Aliment Pharmacol Ther* 13:77–80

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

Mittal RK., Holloway RH., Penagini R., Blackshaw LA., Dent J. Transient lower esophageal relaxation. *Gastroenterology* 1995; 109:601-610

Myers RL, Orlando RC. In vivo bicarbonate secretion by human esophagus. *Gastroenterology* 1992; 103:1174-1178

Nebel OT, Fornes MF, Castell DO. Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and precipitating factors. *Am J Dig. Dis.* 1976; 21:953-956

Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T. and Ueda, N. (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 5298–5305

Orlando RC, Reflux esophagitis. In: Yamada T, Alpers DH, Laine L., Owyang C., Powell DW, eds. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott Williams & wilkins, 1999; 1235-1263

Pertwee RG (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 48:859–867

Pertwee RG, Fernando SR, Griffin G, Abadji V, Makriyannis A (1995) Effect of phenylmethylsulphonyl fluoride on the potency of anandamide as an inhibitor of electrically evoked contractions in two isolated tissue preparations. *Eur J Pharmacol* 272:73–78

- Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48: 859–67.
- Pinto L, Capasso R, Di Carlo G, Izzo AA. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 333–41.
- Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 873–884
- Rivas V, Garcia R (1980) Inhibition of histamine-stimulated gastric acid secretion by delta 9-tetrahydrocannabinol in rat isolated stomach. *Eur J Pharmacol* 65:317–318
- Ruth Gallily , Aviva Breuer , Raphael Mechoulam . Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine macrophages and mice *European Journal of Pharmacology* 406\_2000.R5–R7
- Sanchez Freire V, Burkhard FC, Kessler TM, et al. Micro RNAs May Mediate the Down-Regulation of Neurokinin-1 Receptor in Chronic Bladder Pain Syndrome. *AJP* 2010; 176: 288-303
- Sarosiek J, Feng T, McCallum R. The interrelationship between salivary epidermal growth factor and functional integrity of the esophageal mucosa. *Am J Med Sci* 1991; 302:359-362
- Shindlbeck NE, Wiebeck B, Klauser AG, et al. Diagnostic value of histology in non erosive gastroesophageal reflux disease. *Gut* 1996; 39: 151-4.
- Shook JE, Burks TF (1989) Psychoactive cannabinoids reduce gastrointestinal propulsion and motility in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 249:444–449
- Singh S, Bradley LA, Richter JE. Determinants of oesophageal “alkaline” pH environment in controls and patients with gastro.oesophageal reflux disease. *Gut* 1993; 34:309-316
- Stella, N., Schweitzer, P. and Piomelli, D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773–778
- Storr M, Sibae A, Marsicano G, et al. Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G110–7.
- Vassallo M, Camilleri M, Phillips SF, Brown ML, Chapman NJ, Thomforde GM. Transit through the proximal colon influences stool weight in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1992; 102: 102–8.
- Weusten BL, Roelofs JM, Akkermans LM, et al. The symptom-association probability: an improved method for symptom analysis of 24-hour esophageal pH data. *Gastroenterology* 1994; 107: 1741–5.