

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche

Scuola di Dottorato in

**Scienze fisiopatologiche, neuropsicobiologiche e assistenziali del ciclo della
vita XXVIII ciclo**

**ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA E FUNZIONALE DEL SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE NELLA MALATTIA PARODONTALE**

Dott.ssa Marilisa TOMA

Matr. R09975

Relatore: Prof.ssa Claudia DELLAVIA

Coordinatore: Prof. Roberto WEINSTEIN

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

3.INTRODUZIONE

1. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE ENDOGENO

1. RECETTORI CANNABINOIDI
2. LIGANDI DEI RECETTORI CANNABINOIDI
3. SINTESI, RILASCIO, RICAPTAZIONE E DEGRADAZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI
4. EFFETTI BIOLOGICI LEGATI ALLA MODULAZIONE DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
5. ENDOCANNABINOIDI, CANNABINOIDI E SISTEMA IMMUNITARIO

2. RELAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

3. SCOPO DEL LAVORO

3.MATERIALI E METODI

1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

1. SELEZIONE DEI SOGGETTI
2. PRELIEVO BIOPTICO
- 1.3. PROCESSAZIONE ISTOLOGICA DEI CAMPIONI
- 2.3. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA
- 2.4. DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI AEA NELLA GENGIVA
- 2.5. ANALISI DI ACCOPPIAMENTO LIGANDO-RECETTORE
- 2.6. ELABORAZIONE DEI DATI E ANALISI STATISTICA

3. RISULTATI

- 3.1. ANALISI ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA
- 3.2. ANALISI QUANTITATIVA DEI LIVELLI DI AEA
- 3.3. ANALISI DI ACCOPPIAMENTO LIGANDO-RECETTORE

3. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

3. BIBLIOGRAFIA

1.1. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE ENDOGENO

Con il termine cannabinoidi si intendono tutti i ligandi dei recettori cannabinoidi, che comprendono ligandi di origine vegetale (fitocannabinoidi), ma anche quelli di origine sintetica e le molecole endogene (Pertwee et al 2006). Il nostro organismo produce infatti diverse sostanze, derivate dagli acidi grassi, in grado di interagire attivamente con i recettori cannabinoidi; queste sostanze vengono definite endocannabinoidi (EC) (Di Marzo et al 1998).

I recettori cannabinoidi (CB) insieme agli endocannabinoidi costituiscono il sistema cannabinoide endogeno (ECS). Questo è stato definito come un complesso di neurotrasmettitori in grado di regolare l'eccitabilità neuronale e svolgere un ruolo centrale in numerose condizioni

fisiopatologiche. Tale sistema, infatti, riveste grande importanza nel funzionamento dell'organismo, con implicazioni in svariati ambiti fisiologici tra cui integrazione e modulazione del dolore, funzioni mnestiche e cognitive, controllo della funzione motoria, regolazione del sistema immunitario e della risposta infiammatoria e modulazione del metabolismo osseo (Cota et al 1998, Di Marzo et al 2005).

1. I RECETTORI CANNABICI

I recettori cannabinoidi (CB) sono proteine di membrana appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (G protein-coupled receptors, GPCR). Sono costituiti da un'unica catena polipeptidica caratterizzata da sette tratti transmembrana, un dominio N-terminale extracellulare e un dominio C-terminale intracellulare (Howlett et al 2002).

Fino a oggi sono stati identificati e clonati due sottotipi di recettori dei cannabinoidi, i CB1 e i CB2 . In realtà, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di altri bersagli molecolari in grado di mediare effetti simili a quelli prodotti dall'attivazione dei recettori CB1 e CB2, denominati nell'insieme recettori cannabinoidi nonCB1 , non-CB2 (Devane et al 1988, Munro et al 1993).

1. RECETTORI CB1

I recettori CB1 sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo, e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali. Aree particolarmente ricche di recettori CB1 sono i gangli della base (substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare e caudato-putamen laterale), il cervelletto, l'ippocampo e la corteccia (Herkenam et al 1991). Sebbene in minor densità, i recettori CB1 sono rilevabili anche in aree limbiche quali l'accumbens e l'amigdala, nell'ipotalamo, nel mesencefalo, nel midollo allungato e nel midollo spinale. L'assenza di recettori CB1 nel tronco cerebrale dove sono localizzati i centri regolatori della funzione

respiratoria e cardiaca (Millhorn & Eldridge 1986) ben si accorda con la bassa letalità legata all'overdose di cannabis. Nell'insieme la localizzazione dei recettori CB1 è facilmente correlabile con gli effetti psicotropi dei cannabinoidi.

Sebbene i recettori CB1 siano localizzati prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale, basse densità recettoriali sono state identificate anche in tessuti periferici quali la milza, il cuore, i testicoli, il timo, il midollo osseo e le tonsille (Amery 1998).

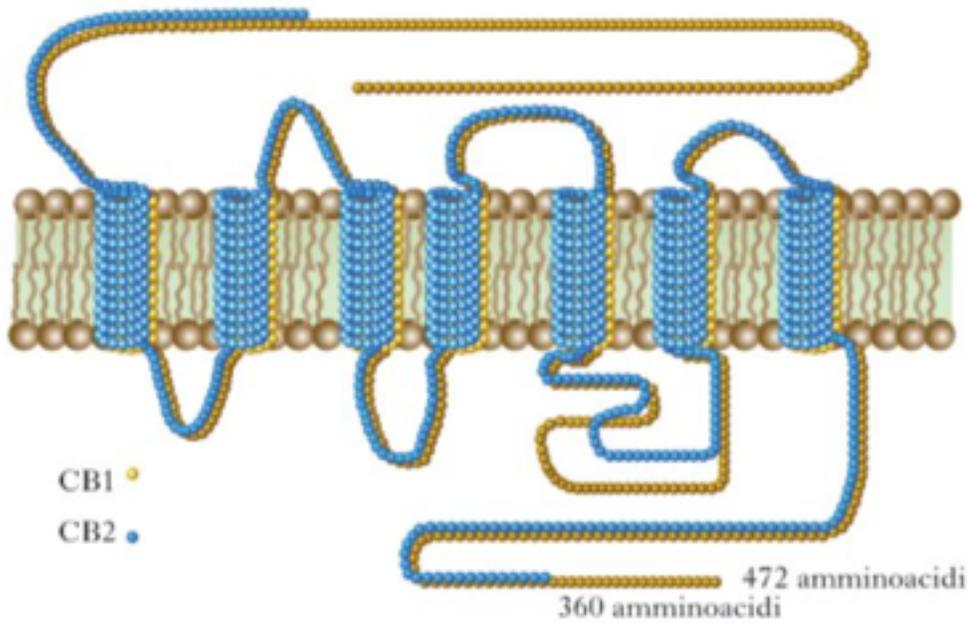
Nel sistema nervoso centrale i recettori CB1 sono prevalentemente presinaptici, suggerendo un loro ruolo generalmente inibitorio nella modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori (Tsou et al 1998). I recettori CB1 appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle G proteine, con i sette domini transmembrana, la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare (Howlett et al 1991). (**Figura 1**) Attraverso le G proteine di tipo inibitorio (Gi/Go), i recettori CB1 transducono il segnale agendo su diversi effettori intracellulari. In particolare i cannabinoidi inibiscono l'adenilato ciclasi (Felder et al 1992, Gerard et al 1991), modulano alcuni canali ionici inducendo la chiusura dei canali del calcio voltaggio dipendenti e l'apertura di quelli del potassio rettificanti entranti e modulano l'attivazione di diverse proteine chinasi intracellulari: MAP (mitogen activated protein) kinasi (Amery 1998), specificatamente della famiglia di ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases type 1 and 2) e di JNK (c-jun N-terminalkinase), PKB (protein kinase B), FAK (Focal Adesion inase) e PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Howlett et al 2002).

2. RECETTORI CB2

Il recettore CB2 possiede un'omologia del 48% con il recettore CB1 (Munro et al.,1993) ed è principalmente localizzato nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti (Klein et al 1995, Schatz et al 1997). Anche il recettore CB2 transduce il segnale mediante G proteine, ma conosce effettori solo

parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1. In particolare, il recettore CB2 non è in grado di modulare i canali ionici, mentre, come il recettore centrale, è negativamente accoppiato all'adenilato ciclasi ed è in grado di attivare le MAP kinasi (Amery 1998). Recenti studi hanno rilevato l'espressione di mRNA del recettore CB2 anche a livello di alcune aree cerebrali come il cervelletto ed il midollo allungato. In quest'ultimo, l'immunoreattività del recettore CB2 è stata trovata nei neuroni all'interno del nucleo motorio dorsale del vago, nel nucleus ambiguus e nel nucleo trigemino spinale. Tramite l'uso di antagonisti selettivi del recettore CB2, i recettori del midollo allungato sono funzionalmente accoppiati all'inibizione dell'emesi quando costimolati con i recettori CB1 da cannabinoidi endogeni in grado di attivare entrambi i recettori (Van Sickle et al 2005). Diverse evidenze scientifiche assegnano ai recettori CB2 capacità di ridurre sia l'infiammazione indotta sperimentalmente sia l'iperalgia di origine flogistica; inoltre, questi recettori identificati a livello delle cellule sia osteoblastiche che osteoclastiche, sembrano avere un ruolo rilevante nella regolazione endocrina del metabolismo osseo (Zimmer et al 2008). Esistono preliminari evidenze farmacologiche dell'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali (recettore non-CB1 o CB3) per i cannabinoidi a livello del sistema nervoso centrale la

cui caratterizzazione molecolare non è ancora stata definita (Breivogel et al 2001, Calignano et al 1998, 2001, Di Marzo et al 2000).



Di Marzo, 2010

Figura 1 Struttura dei recettori CB1 e CB2

1.1.1.3. RECETTORI CB1 E CB2 A LIVELLO CUTANEO

In letteratura è stata dimostrata la presenza di recettori CB1 a livello dei cheratinociti dello strato spinoso e granuloso, dei macrofagi a livello citoplasmatico, dei mastociti ed infine a livello degli assoni nervosi in prelievi di cute umana di diverse parti corporee (gambe, braccia, collo, faccia) (Ständer et al., 2004). I recettori CB2 sono stati invece detectati a livello dei cheratinociti dello strato basale dell'epidermide, non in tutti i macrofagi, a livello dei mastociti e degli assoni nervosi. Entrambi i recettori risultano localizzati a livello della membrana plasmatica ed in particolar modo a livello di vescicole intracellulari (Leterrier et al., 2004). Roelandt et al 2012 ha dimostrato che i recettori CB1 svolgono un'attività stimolatoria nella differenziazione cellulare mentre i CB2 svolgono un'azione inibitoria nell'epidermide dei topi; questa tesi risulta avvallata dal fatto che i recettori i CB2 sono distribuiti soprattutto negli strati basali mentre i CB1 anche negli strati soprastanti dell'epidermide. **(Tabella 1)**

ECS member	Epidermis	Dermis	Nerve fibers	Adnexal structures
CB ₁	Suprabasal keratinocytes; primary melanocytes	Fibroblasts; mast cells, macrophages	Single epidermal nerve fibers, small unmyelinated subepidermal nerves, large dermal myelinated nerves	Differentiated sebocytes, differentiated epithelial cells of the infundibulum and inner root sheath of hair follicles, myoepithelial cells of eccrine sweat glands, sweat gland duct
CB ₂	Basal keratinocytes; primary melanocytes	Fibroblasts, mast cells; vascular smooth muscle cells	Single epidermal nerve fibers, small unmyelinated subepidermal nerves, large dermal myelinated nerves	Undifferentiated sebocytes, undifferentiated infundibular hair follicle cells, myoepithelial cells of eccrine sweat glands, sweat gland duct, mast cells, macrophages
AEA	Primary keratinocytes and melanocytes	Macrophages		Human sebocytes SZ95
2-AG	Primary keratinocytes and melanocytes	Macrophages		Human sebocytes SZ95

Tabella 1
Espressione

dei recettori CB a livello cutaneo. Tratta da “Handbook of cannabis” a cura di Roger G. Pertwee

2. LIGANDI DEI RECETTORI CANNABICI

1.1. AGONISTI

La conoscenza della struttura primaria delle proteine recettoriali ha permesso nell'ultimo decennio lo sviluppo di numerosi composti agonisti per i due recettori cannabinici a partire da modifiche strutturali nella molecola del THC (delta-9-tetraidrocannabinolo). In base alla struttura chimica gli agonisti cannabinici vengono divisi in quattro gruppi: 1) i derivati benzopiranic, come alcuni costituenti naturali della cannabis; 2) i composti biciclici il cui principale esponente è il CP-55940; 3) gli aminoalchilindoli; 4) i ligandi endogeni per i recettori cannabinici; identificati nel 1992 da estratti di cervello porcino essi comprendono amidi ed esteri degli acidi grassi di cui i più studiati e caratterizzati sono l'anandamide e il 2-arachidonoilglicerolo (Devane et al 1992; Mechoulam et al 1995; Sugiura et al 1995).

1.1. ANTAGONISTI

La ricerca nel campo dei cannabinoidi è progredita ulteriormente grazie alla sintesi di composti antagonisti selettivi per i due tipi di recettori cannabinici CB1 e CB2. Il primo composto disponibile è stato l'SR141716A (rimonabant) (Rinaldi-Carmona et al 1992), antagonista ad alta affinità per il recettore centrale CB1. Nei test comportamentali l'SR141716A antagonizza pienamente i classici effetti indotti dai cannabinoidi, ma alcuni studi riportano una sua capacità di indurre effetti opposti a quelli degli agonisti cannabinici, suggerendo un comportamento da

agonista inverso (Bouaboua et al 1995). L'SR144528 è invece un antagonista selettivo ad altissima affinità per il recettore CB2. Un antagonista del recettore CB1, analogo all'SR141716A perché contenente un gruppo 4-iodiofenile al posto del 4-clorofenile, è l'AM251: esso mostra una più alta affinità per il recettore CB1 (Haller et al 2004, Pistis et al 2004, Rodgers et al 2005).

1.1. ENDOCANNABINOIDI

Gli endocannabinoidi sono delle molecole endogene, derivate dell'acido arachidonico coniugate con etanolammmina o glicerolo, in grado di legarsi ai recettori dei cannabinoidi e attivarli funzionalmente (Bisogno et al 2002). Le molecole finora identificate sono le seguenti: l'*N-arachidonoiletanolamina* (AEA, denominata anche anandamide, dal sanscrito "ananda" che significa "beatitudine"), scoperta all'inizio degli anni '90 da William Devane tramite studi su estratti di cervello porcino; il *2-arachidonoilglicerolo* (2-AG), scoperto da Mechoulaum nel 1995, il *2-arachidonoilgliceriletere* (2-AGE), l'*O-arachidonoiletanolamide* (virodamina) e l'*N-arachidonoil-dopamina* (NADA). (**Figura 2**) Tra questi gli endocannabinoidi meglio caratterizzati sono l' AEA e il 2-AG. Entrambi questi composti sono in grado di legare, benché con differenti affinità ed efficacia d'attivazione, i recettori per gli endocannabinoidi, CB1 e CB2 in particolare l'AEA è in grado di legare entrambi i sotto tipi recettoriali comportandosi come un *agonista parziale* (Di Marzo et al 1995), mentre il 2-AG è in grado di attivare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi come un *agonista puro*.

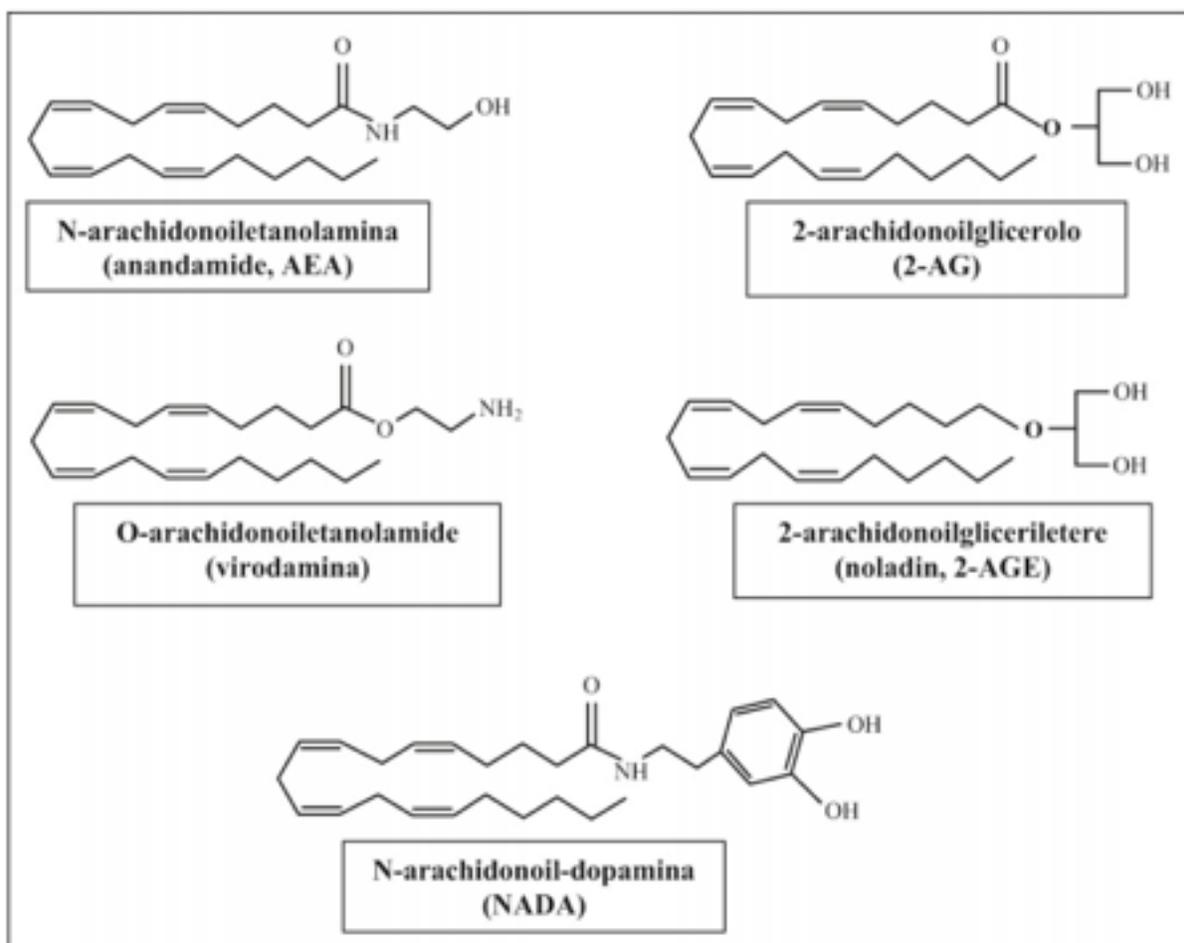


Figura 2 Schema rappresentativo dei principali endocannabinoidi

ANANDAMIDE

L'AEA è ampiamente distribuita sia a livello cerebrale che periferico (Piomelli 2003). All'interno del cervello, i livelli di AEA, equivalenti a quelli della dopamina e della serotonina, ben si correlano con la distribuzione del recettore CB1. La presenza di discreti livelli di AEA anche in aree cerebrali e tessuti periferici poveri di recettori cannabici, quali ad esempio il talamo ed il cuore, ha indotto ad ipotizzare l'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali per l'AEA.

Studi recenti dimostrano che l'AEA, oltre ad essere agonista parziale per CB1 e CB2, è anche in grado di agire come agonista puro per i recettori vanilloidi VR1, una classe di recettori-canale aventi il sito di legame localizzato nella porzione intracellulare.

2-ARACHIDONOILGLICEROLO

Sebbene sia stato inizialmente isolato da tessuti periferici, il 2-AG è soprattutto presente a livello del sistema nervoso centrale (Sugiura et al 1995) dove si trova in concentrazioni molto più elevate di quelle dell'AEA. Il 2-AG è stato il secondo ligando endogeno ad essere scoperto.

3. SINTESI, RILASCIO, RICAPTAZIONE E DEGRADAZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI

Sintesi:

Gli endocannabinoidi, pur essendo molecole di natura lipofila, non vengono immagazzinati in vescicole, ma sintetizzati "on demand" a partire da precursori fosfolipidici, presumibilmente presenti nella membrana delle cellule neuronali (Ameri et al 1999, Piomelli 2003, Cota et al 2005). Il processo di biosintesi viene attivato solo in seguito a particolari stimoli cellulari, come la depolarizzazione della membrana o l'aumento del calcio intracellulare, permettendo il successivo rilascio degli endocannabinoidi all'esterno della cellula. Tale meccanismo rende i cannabinoidi endogeni simili ad altri derivati bioattivi dell'acido arachidonico, quali le prostaglandine (Wilson et al 2002, Piomelli 2003).

In particolare, l'anandamide viene prodotta mediante un processo a due steps: nel primo step viene sintetizzato il precursore dell'AEA, l'N-arachidonilfosfatidiletanolamina (NArPE); tale

molecola deriva dalla N-trans-acilazione della fosfatidiletanolamina, catalizzata dall'enzima N-acyl-transferasi e attivata dagli ioni calcio; nel secondo step, avviene l'idrolisi del NArPE che porta alla formazione dell'anandamide, processo catalizzato da una fosfolipasi di tipo D (PLD) (Di Marzo 1994, Cadas et al 1997) (**Figura 3**). Anche il 2-AG viene prodotto con un meccanismo a due steps. La prima reazione prevede l'idrolisi del fosfatidilinositolo (PI) in due diacilgliceroli, intermedi di reazione, utilizzati come precursori biosintetici del 2-AG: il 2-arachidonoil-lyso-fosfolipide (Lyso-PI) idrolizzato dall'enzima fosfolipasi A1 (PLA1) e l'1,2-diacilglicerolo (1,2-DAG) idrolizzato dalla fosfolipasi C (PLC). Il secondo step di reazione prevede la formazione finale del 2-AG, a partire dai suoi precursori (1,2-DAG e Lyso-PI), mediante idrolisi enzimatica da parte degli enzimi diacil-glicerolo lipasi (DGL) e lyso-fosfolipasi C (Lyso-PLC) (Higgs et al 1994, Pete et al 1994).

Rilascio:

Una volta sintetizzati, gli endocannabinoidi si legano ai recettori cannabinoidi presenti su cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, comportandosi così come mediatori paracrini o autocrini (Piomelli 2003). La loro natura chimica estremamente poco idrosolubile ne impedisce infatti la facile diffusione nella matrice extracellulare o nel sangue. Dopo il legame con i recettori, si innescano eventi di trasduzione del segnale cannabimimetico, quali, ad es., l'inibizione della formazione di AMP ciclico o dell'ingresso di ioni calcio nella cellula, che sono alla base dell'azione biologica degli endocannabinoidi (Wilson & Nicoll 2002).

Reuptake e degradazione:

Una volta espletata la loro funzione, gli endocannabinoidi possono essere internalizzati nelle cellule attraverso un meccanismo di trasporto ad alta affinità, denominato "trasportatore degli endocannabinoidi" (De Petrocellis et al 1997, Beltramo et al 2004, Hillard et al 2004).

Una volta all'interno della cellula, gli endocannabinoidi vengono rimossi attraverso una sequenza di meccanismi di degradazione molecolare: a) ricaptazione per diffusione attraverso la membrana cellulare, che nel caso dell'anandamide viene facilitata da trasportatori di membrana; b) idrolisi enzimatica e/o esterificazione; c) riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana. L'enzima che catalizza l'idrolisi dell'anandamide è stato caratterizzato e denominato "fatty acid amide hydrolase" (FAAH), mentre l'idrolisi del 2-AG è catalizzata dall'enzima monogliceride lipasi (MGL) (Yamamoto et al 2002, Matias et al 2006).

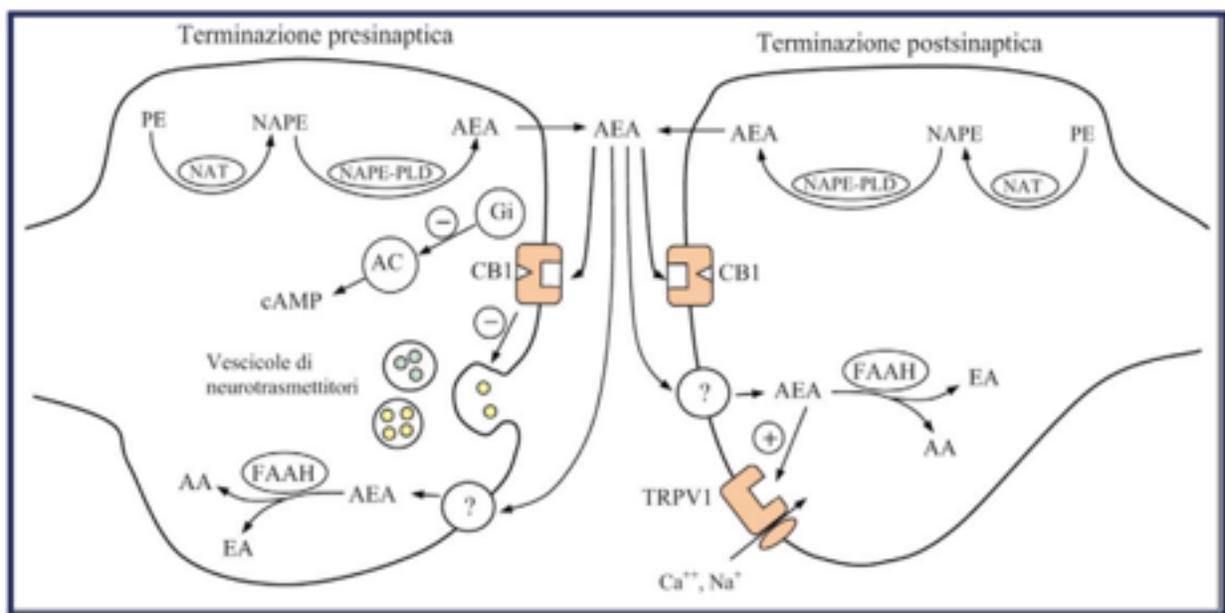


Figura 3 Rappresentazione schematica della sintesi, azione e degradazione dell'anandamide a livello sinaptico

4. EFFETTI BIOLOGICI LEGATI ALLA MODULAZIONE DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

L'attivazione dei recettori cannabinoidi produce numerosi effetti biologici a livello di diversi apparati. I primi ad essere studiati sono stati quelli legati al consumo di fitocannabinoidi, ovvero i derivati della *Cannabis sativa*, da cui deriva il nome degli stessi cannabinoidi (Howlett et al 2002). L'assunzione di fitocannabinoidi induce rinomati effetti psicotropi, quali euforia, rilassamento, sedazione, ansia, paranoia, crisi di panico, disfunzioni cognitive, distorsione della percezione temporale e limitazioni della memoria a breve termine e della capacità di movimento, nonché tachicardia, ipotensione posturale, xerostomia, atassia e immunosoppressione (Ashton et al 1999, Felder et al 2006). Tuttavia, sono state dimostrate diverse potenzialità terapeutiche per queste sostanze, come ad esempio l'azione antiemetica (Kwiatkowska et al 2004), la stimolazione dell'appetito (Mechoulam et al 2001), l'analgesia (Walker et al 1999), l'ansiolisi (Zuardi et al 2006) e l'attività antispastica in modelli animali di sclerosi multipla (Baker et al 2000). Il principale ostacolo legato all'impiego terapeutico dei fitocannabinoidi è la presenza di effetti indesiderati conseguenti, correlati alla loro assunzione (Ashton et al 1999, Felder et al 2006).

Per quanto riguarda le sostanze endogene attive sui recettori cannabinoidi, gli EC, l'AEA è certamente la molecola più studiata. L'AEA, come già accennato, è un agonista parziale a livello di entrambi i recettori CB1 e CB2, con un'attività intrinseca maggiore nei confronti dei primi rispetto ai secondi (Howlett et al 2002). Esperimenti condotti su modelli animali hanno dimostrato che l'AEA è in grado di indurre la cosiddetta tetraide di effetti comportamentali inducibile dal THC (A-9-tetraidrocannabinolo) e suoi derivati, ossia ipotermia, ipoattività, antinocicezione e catalessia (Smith et al 1994); i suoi effetti, però, sono di durata inferiore rispetto ai fitocannabinoidi. All'AEA, inoltre, sono riconducibili l'azione antinocicettiva, antinfiammatoria e immunosoppressiva (Calignao et al 1998, Costa et al 2002, Klein et al 2005), la stimolazione all'assunzione di cibo (Monteleone et al 2005, Di Marzo et al 2011), la vasodilatazione e la riduzione della pressione arteriosa (Harvey et al 2004, Zygmunt et al 1999).

Tuttavia, come già discusso in precedenza, l'AEA è risultata una molecola biologicamente attiva anche a livello di altri sistemi recettoriali, quali ad esempio i TRPV1 (recettori vanilloidi) (Smart et al 2000, Ross et al 2001), che quindi potrebbero avere un ruolo centrale in alcuni degli effetti prodotti in vivo dall'AEA. L'interazione AEA/TRPV1 sembra contribuire alla regolazione di numerosi processi fisiologici e patologici: è stato infatti dimostrato, già da tempo, che i TRPV1 possono mediare l'azione vasodilatatrice dell'AEA (Zygmunt et al 1999). In uno studio recente condotto su ratti ipertesi, l'effetto ipotensivo dell'AEA non è stato bloccato dall'AM251, antagonista del recettore CB1, e quindi tale effetto non poteva essere attribuito alla mediazione di CB1 (O'Sullivan et al 2004), è probabile che in alcuni casi i due sistemi agiscano sinergicamente (Ho et al 2009). Inoltre, come già detto, i recettori TRPV1 sembrano prendere parte alla modulazione della nocicezione esercitata dall'AEA.

L'AEA ha dimostrato di influire sul rilascio del CGRP (calcitonin gene-related peptide), un potente peptide vasodilatatore prodotto dai neuroni centrali e periferici, coinvolto anche nella regolazione della trasmissione del dolore (Ahluwalia et al 2003). A seconda della sua concentrazione, l'azione dell'AEA può produrre risultati opposti: a basse concentrazioni riduce il rilascio di CGRP basale, mentre a livelli più elevati determina un aumento del rilascio di CGRP. Si ritiene che l'effetto inibitorio sia mediato da recettori CB1, mentre l'induzione al rilascio di CGRP è attribuita al coinvolgimento dei TRPV1. In questo caso, quindi, i recettori CB1 e TRPV1 mostrano di mediare effetti biologici opposti (Starowicz et al 2007).

Due recenti revisioni della letteratura (Hiley 2009, Pacher et al 2009) hanno approfonditamente discusso il ruolo del sistema endocannabinoide nelle MCV. Il sistema endocannabinoide (ECS) in corso di numerose condizioni patologiche, come modelli sperimentali di shock emorragici e settici e infarto miocardico acuto, sembra essere iper-attivato e sembra contribuire ad importanti meccanismi di difesa, come ad esempio ipotensione e bradicardia, attraverso l'attivazione dei recettori CB1 (Kunos et al 2005, Pacher et al 2006, Mukhopadhyay et al 2008). Questa ipotesi è

stata confermata da altri studi in cui è stato dimostrato che AEA e 2-AG vengono prodotte, rispettivamente da macrofagi e piastrine, durante stati ipotensivi seguenti a shock emorragico e settico (Wagner et al 1997, Varga et al 1998). Gli EC, quindi, vengono attivati in risposta a situazioni stressanti, a livello cardiocircolatorio, svolgendo un importante ruolo di difesa nei confronti del nostro organismo.

Altri studi hanno dimostrato che la somministrazione di PEA e 2-AG diminuisce drasticamente i danni cardiaci a livello di modelli animali, mentre gli antagonisti dei recettori CB2 come SR144528 annullano gli effetti benefici mediati da PEA e 2-AG (Lepicier et al 2003). Il rimonabant, antagonista del recettore CB1, invece blocca solo parzialmente gli effetti del 2-AG. Inoltre altri studi sperimentali in vivo su modelli di danno da ischemia/riperfusion, dimostrano una diminuzione dell'incidenza di aritmie ventricolari, spesso conseguenti al fenomeno di ischemia/riperfusion, a seguito dell'attivazione dei recettori CB2 (Krylatov et al 2001).

Dopo qualche anno Di Filippo et al (2004) dimostrarono, in modelli animali in vivo, una significativa riduzione dell'estensione dell'infarto a seguito di un trattamento preventivo con agonisti non selettivi dei recettori CB1 e CB2.

Recenti evidenze suggeriscono che il sistema endocannabinoide svolge un ruolo cruciale in importanti meccanismi coinvolti nella patogenesi del diabete tipo 2, come la regolazione del profilo lipidico, l'omeostasi del glucosio e la sensibilità all'insulina (Scheen et al 2006). In uno studio clinico su 278 pazienti con diabete mellito tipo 2, è stato dimostrato l'abbassamento dei livelli di glucosio a seguito del blocco dei recettori CB1 tramite il trattamento con rimonabant (20mg al giorno per un anno). È stato inoltre riscontrato un significativo controllo glicemico e una riduzione del peso corporeo (Rosenstock et al 2008).

1. ENDOCANNABINOIDI, CANNABINOIDI E SISTEMA IMMUNITARIO

Gli effetti antinfiammatori che fanno seguito all'attivazione dei recettori CB2 in molte condizioni patologiche quali dolore infiammatorio, infarto miocardico, ictus, disordini infiammatori gastrointestinali (Massa et al., 2004, Marquez et al., 2008), aterosclerosi (Montecucco et al., 2009) e danni epatici (Pacher et al., 2008), chiariscono e supportano il ruolo degli stessi nella modulazione del sistema immunitario. Recenti studi hanno infatti dimostrato il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nell'omeostasi del sistema immunitario e nel controllo di alcune sue funzioni.

Le cellule immunitarie esprimono sia recettori CB1 che CB2, producono 2-AG e AEA e sono coinvolte nei meccanismi di trasporto e degradazione chimica di queste molecole (Pestonjamas et al., 1998, Bisogno et al., 1997). Inoltre è stato dimostrato che i recettori CB2 sono maggiormente concentrati, da 10 a 100 volte rispetto ai recettori CB1, a livello del sistema immunitario (Lynn et al., 1994) e che l'espressione di questi recettori nelle cellule immunitarie risulta nel seguente ordine decrescente: linfociti B > cellule NK > monociti > granulociti neutrofili polimorfonucleati > linfociti CD8 > linfociti CD4 (Galiegue et al 1995).

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che i meccanismi di biosintesi, uptake e degradazione delle molecole endocannabinoidi si svolgono prevalentemente a livello dei macrofagi e dei leucociti (Pestonjamas et al., 1998, Bisogno et al., 1997, Di Marzo et al., 1996). Questi risultati avvallano la tesi di un possibile coinvolgimento sia a livello immunitario che infiammatorio del sistema stesso.

Malgrado in letteratura siano riportate alcune funzioni stimolatorie, gli effetti degli endocannabinoidi sul sistema immunitario sono prevalentemente di tipo inibitorio. AEA, legandosi ai recettori CB2, sembra inibire l'azione dei macrofagi (Cabral et al., 1995) e l'espressione, LPS indotta, di mediatori proinfiammatori (Ross et al., 2000); sia AEA che 2-AG, inoltre, inibiscono la produzione di IL-6. Schwartz et al nel 1994 ha dimostrato l'effetto

immunosoppressivo, dose dipendente, di AEA sulla proliferazione dei linfociti T e B; l'anandamide sembra infatti agire sulla sintesi del DNA di queste linee cellulari determinandone l'inibizione proliferativa e la morte cellulare tramite apoptosi. (**Tabella 2**)

Riassumendo i recettori EC a livello immunitario determinano:

- apoptosi ed inibizione della proliferazione di linfociti T e B (Schwarz et al., 1994, Lee et al., 1995, Rockwell et al., 2008, Berdyshev et al., 1997);
- inibizione della produzione di anticorpi da parte dei linfociti B (Kaminsky et al., 1994, Titishov et al., 1989, Carayon et al., 1998)
- diminuzione della migrazione ed relativa azione fagocitaria dei macrofagi nonché della produzione dei mediatori proinfiammatori (Cabral et al., 1995, Ross et al., 2000, Chang et al., 2001, Sugamura et al., 2009)
- inibizione della produzione di chemochine e citochine (IL8, IFNgamma) da parte delle cellule NK e dei granulociti neutrofili e della loro azione citolitica (Patel et al., 1995, Klein et al., 1987, Specter et al., 1986).

Immune cells	Functions affected	Receptor involved
T-lymphocytes	Proliferation; cell death by apoptosis; Th1/Th2 cytokine secretion, polarization; cell number	CB2
B-lymphocytes	Inhibition of antibody formation; Ig production; Ig isotype switching; proliferation; cell number	CB1 and CB2
Haematopoietic cell line	Cell growth	Non-CB1, CB2
Macrophages	Decreased Inflammatory mediators; antigen presentation; migration; phagocytosis; increased adhesion	CB2
Mast cells	Down modulate mast cell activation; decreased TNF- α ; decreased mast cell-dependent angiogenesis	Non-CB1, CB2 CB1, CB2
Dendritic cells	Growth and maturation; apoptosis; recruitment during innate immune response	CB1, CB2
Natural killer cells and neutrophils	Cytolytic activity; chemokines; cytokines	Non-CB1, CB2

Tabella 2 Gli effetti degli endocannabinoidi sulle funzioni delle cellule immunitarie. Tratta da “Endocannabinoids and immune regulation” di Pandey et al 2009

Cannabinoid	Receptor	Cell/tissue/serum	Effect
THC	ND	Macrophage cell line (RAW264.7)	Decreases TNF- α
THC	ND	Peritoneal macrophages	Increases IL-1 α and IL-1 β
THC	ND	Human cell lines	Decreases TNF- α , GM-CSF and IFN- γ , IL-10 Increases IL-8
THC	CB1 and CB2 independent	Rat microglial cells	Decreases TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and IL-6
<i>In vivo</i> WIN55,212-2 and HU-210	CB1 dependent	Serum	Decreases TNF- α , IL-12 Increases IL-10
Ajulemic acid	ND	Human synovial monocyte-derived macrophage	Decreases IL-6 and IL-1 β
HU-308	CB2 dependent	Serum and liver homogenates	Decreases TNF- α , MIP-1 α and MIP-2
CP55,940 WIN55,212-2	CB1 and CB2 independent	Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes	IL-6 and IL-8
2-AG	CB2 dependent	Promyelocytic leukemia cell line (HL-60)	Increases IL-8, CXCL8 and CCL2

Per quanto riguarda invece le azioni dei cannabinoidi esogeni sul sistema immunitario sembrano essere transitorie e mediate prevalentemente dai recettori CB2 tramite l'inibizione del pathway cAMP/protein kinaseA (PKA) (Pandey et al., 2009). (**Tabella 3**)

Tabella 3 Gli effetti dei cannabinoidi sulla produzione di citochine e chemochine. Tratto da “Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs” Prakash Nagarkatti 2009

Uno dei possibili meccanismi di controllo immunitario da parte dei cannabinoidi durante i processi infiammatori è la dis-regolazione della produzione di citochine da parte delle cellule immunitarie (Klein et al., 2000). I cannabinoidi possono infatti influenzare la risposta immunitaria e la resistenza dell'ospite perturbando l'equilibrio tra le citochine prodotte da sottoinsiemi T-helper, Th1 e Th2. Sono stati effettuati degli studi in vitro per confrontare l'effetto del THC e del cannabinoide sulla produzione di citochine da parte di linfociti T, B, CD8 +, NK e

linee cellulari eosinofile. Alcuni risultati erano contrastanti e variavano in base alla linea cellulare e alla concentrazione di cannabinoidi utilizzata (Srivastava et al., 1998). In uno di questi studi sono stati dimostrati sia effetti pro-infiammatori che anti-infiammatori da parte del THC, suggerendo che non tutte le popolazioni cellulari hanno le stesse soglie di risposta ai cannabinoidi. In generale i livelli di TNF- α , GM-CSF (fattore di crescita stimolante la formazione di colonie granulocitiche macrofagiche) e di IFN- γ sono diminuiti dopo il trattamento farmacologico, si è assistito ad una diminuzione dei livelli di citochina antinfiammatoria IL-10 e ad un concomitante aumento di quelli di citochina proinfiammatoria IL-8.

Recenti studi in vitro hanno invece mostrato il potente effetto anti-infiammatorio di cannabinoidi sintetici (CP55,940 e WIN55,212-2) tramite l'inibizione della produzione di IL-6 e IL-8 da parte dei sinoviociti simil fibroblasti (Selvi et al., 2008). È stato osservato, inoltre, che l'agonista CB2 HU-308 attenua il danno epatico da ischemia/riperfusionazione diminuendo i livelli di TNF- α , MIP-1 α e MIP-2 nel siero e in omogenati di fegato (Rajesh et al., 2007).

Durante i processi infiammatori cronici l'inibizione di IL-6 riduce il danno tissutale (Smolen et al., 2006). L'acido ajulemico, derivato da un metabolita non psicoattivo del THC, sembra evitare lesioni a livello articolare in modelli animali di artrite indotta da adiuvanti (Zurier et al., 1998). Recenti studi in vitro hanno inoltre mostrato che l'aggiunta di acido ajulemico ai macrofagi di derivazione monocitaria riduce la secrezione di IL-6 da parte delle cellule attivate, conferendo a questo metabolita un valore nel trattamento di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide e osteoartrite (Parker et al., 2008).

Concludendo possiamo affermare che sia gli effetti degli endocannabinoidi che dei cannabinoidi sulla produzione di citochine, chemochine, molecole di adesione cellulare e molecole costimolatorie necessitano di maggiori approfondimenti.

Ad oggi possiamo dire però che il sistema endocannabinoide sembra svolgere delle interessanti modulazioni sulle funzioni fisiologiche del sistema immunitario, soprattutto a livello dei tessuti periferici, e potrebbe essere considerato, in futuro, un potenziale target terapeutico.

1.3.RELAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Per malattia parodontale si intende un gruppo di patologie infiammatorie aberranti che colpiscono i tessuti di supporto del dente derivanti da un accumulo di placca; all'interno di questo gruppo si distinguono generalmente due forme di malattia: la gengivite e la parodontite. La prima è un'infiammazione reversibile che si limita ai tessuti gengivali parodontali, quindi, non determina una perdita di attacco, mentre per parodontite si intende un gruppo di patologie infiammatorie che determinano l'irreversibile distruzione dei tessuti di supporto del dente.

La parodontite rappresenta la prima causa di perdita dei denti nella popolazione adulta dei paesi industrializzati e in quanto tale provoca significativi disturbi di vita relazionale ed estetica del sorriso, nonché la più grave perdita o deficit delle funzioni masticatoria e fonatoria.

La prevalenza della malattia parodontale nella popolazione sembra variare in base alla razza, all'area geografica e alle fasce di età colpite (meno dell'1% in età pediatrica e circa il 30% nella popolazione adulta).

La classificazione delle malattie parodontali ad oggi riconosciuta è quella proposta nel 1993 dalla European Federation of Periodontology, modificata nel 1999 in occasione del Workshop internazionale in collaborazione con l' American Academy of Periodontology (AAP) (Armitage 1999).

Tale classificazione riconosce cinque tipi di infezioni parodontali:

TIPO I	Malattie gengivali	Indotte da placca
		Non indotte da placca
TIPO II	Parodontite cronica	Localizzata
		Generalizzata
TIPO III	Parodontite aggressiva	Localizzata
		Generalizzata
TIPO IV	Parodontite manifestazione di malattie sistemiche	Associate a malattie ematologiche
		Associate a disordini genetici
		Non altrimenti specificato
TIPO V	Infezioni parodontali necrotizzanti	Gengivite Ulcerativa Necrotizzante (NUG)
		Parodontite Ulcerativa Necrotizzante (NUP)

L'AAP definisce la parodontite cronica come un'inflammazione della gengiva che si estende all'adiacente apparato di supporto del dente. Essa è caratterizzata dalla perdita di attacco clinico (misurata tramite il CAL) dovuto alla distruzione del legamento parodontale e dell'osso di supporto adiacente.

La parodontite cronica si sviluppa nell'individuo, in modo graduale, da una gengivite a partire dal 30-40esimo anno di età. Entrambe le arcate dentarie possono essere colpite se si tratta di una forma generalizzata, ma più frequentemente si ha una diffusione irregolare e localizzata con

interessamento prima dei molari e poi degli incisivi. Clinicamente la gengiva mostra un'infiammazione disomogenea, talvolta si nota una riduzione mentre altre volte un ispessimento fibroso, edema, eritema, sanguinamento al sondaggio e si può notare alle volte suppurazione.

L'AAP (2000) divide la parodontite cronica in due sottotipi e ne definisce i parametri clinici per la diagnosi. Tali sottotipi sono:

- parodontite cronica con perdita di supporto parodontale da lieve a moderato;
- parodontite cronica con perdita di supporto parodontale grave.

I parametri clinici vengono riportati nella tabella sottostante:

Parodontite Cronica	LIEVE/MODERATA	GRAVE
Perdita Supporto Parodontale	Fino ad un terzo	Oltre un terzo
PPD	Fino a 6 mm	Oltre i 6 mm
CAL	Fino a 4 mm	Oltre i 4 mm

Tabella 4 Parametri clinici per la diagnosi di parodontite cronica forma lieve/moderata e forma grave

Il riassorbimento osseo può essere riscontrabile a livello radiografico e clinicamente può presentarsi mobilità dentale accentuata. Le riacutizzazioni si manifestano a grandi intervalli di tempo e i fattori di rischio possono accentuarne il decorso. Di norma la parodontite cronica provoca la parziale perdita dei denti in soggetti in età avanzata, ma ciò si può verificare anche in soggetti più giovani, ma con difese immunitarie ridotte.

Gli obiettivi principali della terapia parodontale sono:

- 1) eliminare la placca batterica sopra e sottogengivale e i fattori di rischio correlati alla malattia;

- 2) arrestare la progressione della malattia;
- 3) ottenere uno stato di salute, comfort, funzione ed estetica dell'apparato masticatorio;
- 4) prevenire la riacutizzazione della malattia (AAP 2000).

L'esito della terapia parodontale dipende in larga misura dalla capacità dell'operatore di rimuovere la placca sottogengivale e dalla motivazione e capacità del paziente di praticare un'adeguata igiene domiciliare. Un'altra variabile è rappresentata dalla suscettibilità innata del paziente che è correlata alle modalità con cui i suoi sistemi congeniti, infiammatorio ed immunitario, agiscono in risposta alla stimolazione batterica (Lindhe et al 1972).

In letteratura vi sono prove convincenti a sostegno del concetto che il trattamento della parodontite cronica sia efficace e numerosi studi a lungo termine mostrano percentuali basse ($\leq 0,1$ denti persi/anno) di perdita dei denti nei pazienti affetti da parodontite cronica e sottoposti a terapia e a un buon mantenimento (Lindhe & Nyman 1984, Nabers et al 1988). I pazienti che dopo la terapia non praticano cure di mantenimento presentano una percentuale doppia di denti persi ogni anno (0,2 denti/anno) (Becker et al 1984), mentre i pazienti non trattati hanno una perdita di circa 0,6 denti/anno (Becker et al 1979).

L'iter terapeutico consigliato dall'American Academy of Periodontology (2000) prevede diverse fasi di intervento:

una prima fase chiamata *Terapia causale*, atta a rimuovere l'agente microbico, seguita da vari *trattamenti chirurgici* al fine di ripristinare una corretta architettura dei tessuti parodontali.

La terapia causale comprende: istruzioni di igiene orale, motivazione del paziente e rilevazione dell'indice di placca e di sanguinamento dello stesso. Successivamente si procede rimuovendo quanto più possibile il sistema chiuso del biofilm batterico presente sulle superfici radicolari. Questo trattamento può avvenire con strumenti meccanici, ad ultrasuoni, o manuali così come a "cielo coperto" o "aperto". Il tradizionale trattamento meccanico a cielo coperto viene praticato oggi con successo come levigatura radicolare in più sedute o tramite la "Full Mouth

Therapy” (Quirynen et al 1995, De Sote et al 2001, Saxer 2002). Durante la levigatura le tasche parodontali vengono deterse con soluzioni disinfettanti come la Clorexidina.

È indispensabile rimuovere i fattori locali che contribuiscono alla progressione della parodontite cronica come otturazioni debordanti, restauri protesici incongrui, traumi occlusali, lesioni cariose e ripristinare i punti di contatto interdentali per evitare l’”impacchettamento” del cibo. La terapia causale comprende inoltre la rivalutazione del caso. Se le condizioni parodontali risultano migliorate a seguito della terapia causale è necessario programmare una terapia di mantenimento con sedute di igiene professionale ad intervalli di tempo opportuni. In alcuni casi però il mantenimento dell’igiene orale da parte del paziente risulta ostacolato da una sfavorevole architettura dei tessuti di supporto parodontali; diviene quindi necessario un intervento chirurgico al fine di arrestare la progressione della malattia e correggere la morfologia dei difetti ossei. In altri casi, invece, nonostante le manovre di igiene orale domiciliari siano ottimali, il paziente abbia una buona *compliance*, e i livelli di placca ed infiammazione alla rivalutazione rientrino in un range di normalità, il paziente non risponde alla terapia parodontale convenzionale in modo efficace e continua a presentare perdita di attacco clinico (AL) ai richiami. Tra i vari fattori che possono essere alla base di questa resistenza dell’ospite alla terapia possiamo annoverare aspetti clinici, microbiologici, come l’esistenza di microrganismi inusuali resistenti alla terapia ed immunologici, ad esempio delle situazioni di immunodeficienza o delle compromissioni del sistema immunitario

(Magnusson et al 1991). Il meccanismo alla base della resistenza dell’ospite alla terapia parodontale in questi pazienti rimane ad oggi poco chiaro.

In base alle numerose evidenze scientifiche, alcune delle quali trattate in precedenza, appare chiaro il coinvolgimento degli endocannabinoidi nei processi infiammatori a livello sistemico; tuttavia rimangono poco chiari gli effetti del ECS a livello della malattia parodontale.

Da questo punto di vista alcune delucidazioni vengono fornite da uno studio effettuato da Nakajima et al (2006). Gli autori hanno dimostrato la presenza in fibroblasti gengivali umani (HGFs) dei recettori cannabinoidi di tipo 1 e 2; sono stati inoltre rilevati livelli endogeni di AEA nel fluido crevicolare gengivale (GCF), i quali, aumentano in caso di infezione dei tessuti parodontali da parte di microrganismi Gram-negativi. Uno studio in vitro ha dimostrato che la stimolazione da parte della LPS batterica stimola la produzione di AEA e 2-AG tramite l'azione dei macrofagi e di altre cellule immunitarie (Liu et al 2003). L'AEA, legandosi ai recettori cannabinoidi, riduce in maniera significativa la produzione di citochine (IL-6, IL-8 and MCP-1) indotte dall'azione batterica in HGFs. Questo effetto è stato spiegato tramite l'inibizione da parte dell'AEA di NF-kB all'interno dei fibroblasti, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo centrale nei processi infiammatori, aumentando l'espressione dei geni che codificano per i mediatori pro-infiammatori.

Gli autori hanno dimostrato infine che l'AEA e i suoi recettori sono presenti nei tessuti parodontali e hanno ipotizzato che il sistema endocannabinoide possa essere coinvolto nella fisiologica protezione dei tessuti contro l'eccessiva risposta infiammatoria regolando i pathways cellulari del sistema immunitario.

Recentemente è stato riconosciuto agli endocannabinoidi anche un ruolo nella regolazione del metabolismo osseo. L'attivazione dei recettori CB2, infatti, contribuisce al mantenimento della massa ossea stimolando l'apposizione ossea e inibendo il riassorbimento (Ofek et al 2006, Scutt et al 2007). In uno studio di Quien et al (2010) è stata dimostrata, a livello delle cellule del legamento parodontale, l'espressione dei recettori CB2, e sono stati studiati gli effetti della loro attivazione sulla differenziazione osteogenica. L'attivazione dei recettori CB2 stimola la differenziazione osteogenica delle cellule del legamento parodontale tramite l'accumulo di matrice mineralizzata e l'aumento dell'espressione dei geni osteogenici. Queste evidenze

implicano che il sistema endocannabinoide gioca un importante ruolo nel metabolismo dell'osso alveolare.

1.3. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo studio è di chiarire il ruolo del sistema endocannabinoide nella malattia parodontale e nei meccanismi che sono alla base della sua guarigione, confrontando l'espressione e la distribuzione dei recettori CB1 e CB2, la produzione di AEA e l'efficienza del sistema endocannabinoide nella gengiva di soggetti affetti da parodontite cronica, pazienti "non-responders" alla terapia parodontale e pazienti sani.

2. MATERIALI E METODI

2.1. PROTOCOLLO SPERIMENTALE

1. SELEZIONE DEI SOGGETTI

In questo studio sono stati reclutati 29 pazienti, di età compresa tra i 40 e i 60 anni, sani dal punto di vista sistemico (autoriferiti), senza patologie gravi negli ultimi 3 mesi, senza impianti adiacenti ai denti interessati da prelievo.

I soggetti per poter essere coinvolti nel progetto di ricerca dovevano rispondere a determinati requisiti. L'esclusione è avvenuta per soggetti in gravidanza e allattamento, per la presenza di malattie sistemiche (malattie cardiovascolari, disordini del metabolismo osseo, forme gravi di diabete ed anemia), per terapie con particolari farmaci (immunosoppressori, anti-epilettici,

bifosfonati, antinfiammatori a base oppiacea), per la pregressa o presente radioterapia o chemioterapia ed infine per i fumatori di sigari e sigarette (>10) e cannabis.

I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi così distinti:

Gruppo test 1

11 pazienti affetti da parodontite cronica associata a placca con almeno 4 *siti attivi* (tasche parodontali con sondaggio ≥ 5 mm e sanguinamento), presenza visibile di tartaro e depositi di placca (FMPS $\geq 25\%$) e con sanguinamento generalizzato (FMBS $\geq 25\%$).

Gruppo test 2

8 pazienti “non-responders” alla terapia parodontale convenzionale con almeno 4 *siti attivi* (tasche parodontali con sondaggio ≥ 5 mm e sanguinamento) ma FMPS $< 25\%$ e FMBS $< 25\%$.

Gruppo controllo

10 pazienti sani con FMPS $< 25\%$ e FMBS $< 25\%$, senza problemi pregressi di malattia parodontale, con un numero di denti superiore a 24 e candidati all'estrazione di un terzo molare.

2.1. PRELIEVO BIOPTICO

Al momento della visita iniziale è stato effettuato un charting parodontale per elaborare il piano di trattamento. Nei pazienti con parodontite cronica associata a placca e nei pazienti “non-responders”, durante le consuete manovre terapeutiche (scaling e root planning), è stato eseguito il prelievo di gengiva libera (epitelio pluristratificato corneificato) dal lato palatale di un sito attivo; nel gruppo controllo sano, invece, il prelievo gengivale è stato eseguito contestualmente all'avulsione del terzo molare sul lato disto-palatale del secondo molare corrispondente, durante l'adattamento del lembo per la sutura. Il prelievo è stato isolato mediante tre incisioni, effettuate con lama 15C, in regione interprossimale del sito d'interesse: un'incisione longitudinale alla base della papilla e due convergenti, una mesiale e una distale, perpendicolari ad essa.

2.6. PROCESSAZIONE ISTOLOGICA DEI CAMPIONI

Il protocollo utilizzato ha previsto le seguenti fasi:

1. *Fissazione*

Tutti i campioni sono stati fissati, in formalina/0.1M al 4% per 24h per ridurre e arrestare l'attività biologica.

2. *Disidratazione*

Dopo lavaggio in PBS (pH 7.4) per eliminare l'eccesso di formalina, ciascun prelievo biotico è stato disidratato in scala alcolica crescente per permetterne l'inclusione in paraffina. Il campione è stato immerso nella seguente scala degli alcoli:

- Alcool 70% (overnight)
- Alcool 80% (un passaggio della durata di 1 ora)
- Alcool 96% (un passaggio della durata di 1 ora)
- Alcool 100% (un passaggio della durata 1 ora)
- Xilolo (3 passaggi da 30 minuti ciascuno in modo tale da effettuare la chiarificazione dei campioni grazie all'immersione in un agente che sia miscibile con il mezzo di inclusione).

3. *Inclusione*

- Il campione è stato immerso in una soluzione di xilolo: paraffina (rapporto xilolo: paraffina liquida 3:1,1:1,1:3) ed infine lasciato in paraffina liquida in forno a $56^{\circ} + 6-7^{\circ}\text{C}$ per 12 ore, così da permettere l'infiltrazione del campione; la paraffina (Paraplast Plus)

era stata precedentemente messa in un beaker e fatta sciogliere in forno, con temperatura superiore alla temperatura di fusione della paraffina di 6-7°C;

- prima dell'inclusione, il Bio-Mold (vaschetta in acciaio della misura scelta) è stato posto in forno a scaldare per evitare che la paraffina si raffreddasse rapidamente senza riuscire ad inglobare il pezzo. Anche la pinzetta è stata preriscaldata in forno perché non si attaccasse alla paraffina;
- è stato versato un filo di paraffina nel Bio-Mold;
- il campione è stato estratto dal beaker (con ausilio della pinzetta preriscaldata) e posto nel Bio-Mold nel senso di orientamento prescelto per il taglio;
- sul Bio-Mold è stato appoggiato l'anello ring e riempito con la paraffina;
- il tutto è stato lasciato a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente posto nel congelatore.

4. *Taglio del campione*

- Preparazione del bagno (H₂O distillata) stendifette ad una temperatura di 37°C;
- estrazione dal freezer del blocchetto;
- distacco del Bio-Mold con una spatola;
- delimitazione con un bisturi di tutti i margini della paraffina (sparaffinamento);
- montaggio del pezzo sul microtomo;
- azzeramento della lama (l'angolazione/ inclinazione della lama è di 6°);

- con velocità regolare sono state iniziate le sezioni seriate con spessore delle fette di 4-5 μm ;
- con una pinzetta è stata tirata la striscia dei campioni e immersa in acqua distillata;
- il blocchetto di inclusione è stato rimesso in freezer dopo 20-30 tagli per evitare il surriscaldamento.

5. *Posizionamento sui vetrini*

- La striscia dei campioni è stata tagliata in modo da ottenere sezioni della dimensione del vetrino;
- il vetrino è stato immerso nel bagno;
- la striscia è stata appoggiata sul vetrino (seguendo il senso di orientamento e quindi del taglio);
- il vetrino è stato posizionato sulla piastra per 2-3 ore fino alla completa asciugatura.

6. *Preparazione per la colorazione*

- Il vetrino è stato posto nel forno a 38°C overnight per sciogliere tutta la paraffina (deparaffinare);
- i vetrini sono stati passati nella scala degli alcoli decrescente per reidratarli dopo aver fatto due passaggi in xilolo da 10 minuti ciascuno:

1. Alcool 100% 5 minuti

2. Alcool 96% 5 minuti

3. Alcool 70% 5 minuti

4. Alcool 50% 5 minuti

5. acqua distillata fino alla colorazione.

7. *Colorazione dei vetrini*

E' stata eseguita una colorazione con Ematossilina-Eosina di Carrazzi per l'analisi della struttura morfologica dei campioni. La colorazione Ematossilina/Eosina è una della più comunemente usate e permette di valutare, nella gengiva in questo caso, sia l'epitelio che il connettivo. L'ematossilina è un colorante naturale estratto dal legno di una leguminacea, è una tintura basica e pertanto si lega alle componenti cellulari acide mettendo in particolare evidenza i nuclei che assumono una colorazione blu-violetto; l'eosina è un colorante artificiale con caratteristiche acide che si lega alle strutture subcellulari aventi un pH alcalino come ad esempio il citoplasma e la sostanza fondamentale. Questa colorazione viene definita tricromia o combinata, in quanto dapprima si immergono i vetrini nella soluzione di ematossilina, colorando i nuclei, successivamente dopo il lavaggio e il viraggio della tintura nucleare in acqua di font, le sezioni vengono inserite in una soluzione di eosina dove il citoplasma e la matrice extracellulare si tingono di rosa.

I campioni sono stati valutati morfologicamente al microscopio ottico a luce trasmessa (Eclipse E600, Nikon).

Ematossilina-Eosina

La procedura ha previsto:

1. bagno in Ematossilina di Carrazzi (Bio-optica) per 15 minuti

2. viraggio sotto H₂O di fonte per 15 minuti;

3. immersione in H₂O distillata

4. passaggio nel bagno di Eosina (Bio-optica) per 1 minuto;
5. reidratazione in scala alcolica crescente (da alcool 50% a alcool 100%)
6. immersione nel bagno di Xilolo per 10 minuti;
7. protezione dei preparati con vetrino copri-oggetto montati con colla Entellan (Bio-optica, Milano).

2.6. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

La tecnica immunocistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in aggiunta con sistemi di rivelazione (enzimatici o fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio. Esistono metodiche dirette o indirette. Nelle metodiche dirette si utilizza un unico anticorpo diretto contro la molecola da ricercare e lo stesso anticorpo lega una sostanza colorata che ne permette la visualizzazione. Nelle metodiche indirette si utilizzano due anticorpi: il primo diretto contro la molecola da ricercare, il secondo, coniugato con la sostanza colorata, andrà a legarsi al primo anticorpo.

In questo studio è stata effettuata la metodica indiretta seguendo il protocollo che ha previsto le seguenti fasi:

1. *Sparaffinatura e reidratazione*

Le sezioni sono state sparaffinate e reidratate come sopra, nella colorazione dei campioni;

2. *Smascheramento dell'antigene*

Per smascherare l'antigene i campioni sono stati incubati in Proteasi K a 37° per 20 minuti;

3. *Blocco degli enzimi endogeni*

La perossidasi endogena è stata bloccata per 10 minuti con perossido di idrogeno al 30% diluito al 3 % in acqua bi distillata;

4. Blocco delle proteine sieriche

È stato aggiunto il bloccante Ultra V e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente per bloccare la colorazione di fondo aspecifica (UltraVision Quanto Large Volume Detection System HRP Polymer);

5. Incubazione con anticorpo primario

Le sezioni sono state incubate con anticorpo primario, anti uomo in topo, contro i recettori CB1 e CB2, in diluizione 1:200 (Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a temperatura ambiente per 60 minuti;

6. Intensificazione dell'anticorpo primario

È stato aggiunto l'intensificatore dell'anticorpo primario (enhancer) per 10 minuti a temperatura ambiente (UltraVision Quanto Large Volume Detection System HRP Polymer). L'enhancer rappresenta l'anticorpo secondario marcato con Biotina;

7. Incubazione con polimero quanto HRP

È stato aggiunto il polimero HRP per 15 minuti a temperatura ambiente. Questo polimero è rappresentato dall'Avidina che reagisce con la Biotina. L'Avidina è una glicoproteina presente nell'albume dell'uovo che si lega saldamente alla biotina e forma il complesso avidina- biotina amplificando così il segnale. Essa presenta quattro siti di legame tre dei quali impegnati dell'enzima perossidasi e uno impegnato dalla biotina;

8. Incubazione con cromogeno compatibile con la perossidasi (DAB)

La reazione è stata evidenziata grazie all'aggiunta del cromogeno DAB (3,3-diaminobenzidine) in copresenza del substrato rappresentato dal perossido d'idrogeno (H₂O₂). La reazione della perossidasi, presente sull'avidina, con il perossido d'idrogeno porta alla formazione di radicali liberi la cui funzione è ossidare la DAB conferendole così il caratteristico colore marrone;

9. Contro-colorazione con Ematossilina di Mayer

I campioni sono stati immersi per 5 secondi nel colorante e subito dopo in acqua distillata. La contro-colazione è un passaggio importante per visualizzare i nuclei cellulari e meglio evidenziare la morfologia tissutale all'osservazione al microscopio;

10. Disidratazione

Seguono i passaggi di disidratazione in scala alcolica crescente come sopra descritto;

11. Passaggio in Xilolo e montaggio

I campioni sono stati immersi in Xilolo per circa 10 minuti per renderli idrofobi e quindi compatibili con il mezzo di montaggio rappresentato dall'Entellan. Infine è stato posizionato un vetrino copri-oggetto per proteggere la sezione.

2.5. DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI AEA NELLA GENGIVA

Il protocollo ha previsto la conservazione dei campioni appena prelevati all'interno di celle frigorifere alla temperatura di -70°C al fine di evitare la possibile biosintesi di AEA a partire dal substrato fosfolipidico delle membrane cellulari ed inficiare i risultati dell'analisi. Il protocollo è composto da due fasi principali: estrazione e derivatizzazione della molecola e fase di rivelazione della stessa tramite gascromatografia e spettrometria.

Nella fase di estrazione e derivatizzazione della molecola sono state seguite le seguenti procedure:

1. *Omogeneizzazione*

L'omogeneizzazione, avvenuta tramite l'utilizzo di una smerigliatrice di tessuto, è stata eseguita sul campione ancora ghiacciato. Ai campioni sono stati aggiunti 20 ml di tampone tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (o TRIS-HCl) ghiacciato, costituito dal sale dell'acido cloridrico e di un amminoalcol;

2. *Aggiunta dello standard interno*

I campioni omogeneizzati sono stati diluiti con 5 ml di una soluzione 1 µg/ml di d8-AEA in etanolo fino ad avere nel campione 5ng di D8-AEA (Anandamide deuterata). La D8-AEA è stata acquistata da Cayman Chemical (Ann Arbor , MI , USA). L'Anandamide deuterata costituisce lo standard interno per questa analisi ossia la sostanza chimica che viene aggiunta ai campioni in quantità nota. Nel corso della preparazione del campione lo standard interno deve comportarsi in maniera simile alla molecola ricercata. Questo espediente permette di compensare gli errori derivanti da perdita di analita durante le fasi di trattamento del campione e di analisi: essendo infatti nota la quantità di D8-AEA aggiunta al campione e quella finale risultata dalle analisi è possibile, dal valore finale di AEA risalire al valore iniziale presente nel campione;

3. *Estrazione di AEA*

L'estrazione con solvente è una tecnica utilizzata per separare da una miscela acquosa un soluto, purché poco solubile in acqua. A tal fine, si sceglie un solvente insolubile in acqua, ma capace di sciogliere il soluto. La miscela acquosa e il solvente vengono agitati insieme e successivamente lasciati riposare per breve tempo. Si ottengono due strati: lo strato superiore, a minor densità, costituito in genere dal solvente, in cui è dissolta la maggior parte del prodotto; lo strato inferiore, a maggior densità, costituito dalla miscela acquosa, da cui il

solvente ha estratto il prodotto. Per ogni campione è stata effettuata l'estrazione con un solvente a base di toluene (200 µl) per 15 minuti su un agitatore rotante (Falc, Treviglio, Italia) al fine di avere una maggior diffusione del toluene nel campione;

4. *Centrifugazione*

La centrifugazione è stata effettuata con Fisher Scientific Bioblock Sigma (14500rpm × min, 10 min, 10 ° C). Questa operazione permette di eliminare la parte solida del campione ed isolare la fase toluenica surnatante contenente AEA che risulta essere chiara e incolore;

5. *Evaporazione Toluene*

Al fine di eliminare il toluene il campione è stato sottoposto a un flusso di azoto nobile ottenendo così un'evaporazione a secco del solvente;

6. *Derivatizzazione*

La derivatizzazione è il processo tramite cui, mediante reazioni chimiche, vengono sostituiti gruppi funzionali, che spesso possono essere labili come gli ossidrili (-OH) con altri gruppi funzionali più stabili, come il gruppo trimetilsilile. Questo passaggio permette di rendere il composto meno labile ed adatto ai fini analitici. Al campione residuo sono stati aggiunti 50µl di BSTFA, N,O Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. La derivatizzazione in questo caso specifico prende il nome di sililazione. Il campione è stato incubato a 25 ° C per 30 min;

7. *Evaporazione solvente*

Infine il solvente è stato fatto evaporare e il residuo sciolto in esano (50 µl).

La fase di rilevazione si avvale della tecnica gascromatografia-spettrometria di massa, indicata con la sigla GC-MS o GC/MS (dall'inglese gas chromatography-mass spectrometry) ovvero la tecnica analitica basata sull'utilizzo di un gascromatografo accoppiato a uno spettrometro di massa. Il primo separa i composti presenti nel campione mentre il secondo funziona da rivelatore.

Nello studio sono stati utilizzati un gascromatografo serie 7890A dotato di un campionatore automatico, direttamente collegato a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Agilent 7000B (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA).

Il termine cromatografia deriva dal greco "Khrômatos" (colore) e deve il suo nome al fatto che fu utilizzata, per la prima volta, dal chimico russo Mikhail Tswett per separare i pigmenti colorati contenuti nelle foglie dei vegetali.

Si tratta di una tecnica di separazione delle componenti di un composto basata sulla diversa affinità dei suoi componenti a stratificarsi tra due fasi, una stazionaria e una mobile. Nella gascromatografia la fase mobile è rappresentata da un gas.

Le sostanze del miscuglio vengono trasportate da un carrier detto eluente e si stratificano in posizioni differenti sul supporto. In base al tipo di supporto utilizzato si distinguono:

- cromatografia su carta;
- cromatografia su strato sottile;
- cromatografia su colonna.

In questo studio è stata utilizzata la tecnica su colonna: essa prevede l'introduzione del campione tramite l'iniettore, un dispositivo posto immediatamente prima della colonna. Nella colonna l'eluente viene fatto passare fino a quando le sostanze non escono una dopo l'altra, per poi venire raccolte separatamente ed essere analizzate. Il gascromatografo serie 7890A, utilizzato nello studio, è dotato di un vaporizzatore che trasforma il campione in un gas. Esso agisce alla temperatura di 100°C per 1 minuto. La temperatura è in seguito aumentata fino a 300 (con incrementi di 25°C/min) mantenendola per 3 minuti. Quantitativi di campione pari a 1 µl vengono premiscelati con un gas carrier, in questo caso Elio a 250°C, e introdotti in una colonna Phenomenex Zebron per "semivolatili" (20m×0,18mm di diametro, 0,18µm di spessore) attraverso un iniettore Agilent con un flusso di 1,0ml/min.

Una volta separati, i gas vengono ionizzati positivamente, facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota (200 eV) e analizzati sfruttando il principio dell'analizzatore di massa a quadrupolo, impiegato nella spettrometria di massa. Quest'ultimo è in grado di convogliare gli ioni del campione in esame verso il rivelatore sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z).

Nella configurazione a "triplo quadrupolo" il primo ed il terzo quadrupolo agiscono da filtri di massa, mentre il quadrupolo centrale, riempito con un gas inerte (in questo caso argon a 0,2 Pa di pressione), come cella di collisione tra i diversi gas. La collisione porta così alla separazione di AEA e AEA deuterata. Questa procedura consente di aumentare la sensibilità e specificità del sistema di rilevazione. Attraverso il software mass-hunter viene analizzato il grafico spettrometrico e individuate le quantità di AEA e D8-AEA. Il limite di rilevazione (LOD) di questo test era di 0,02 ng/mg, determinato come la quantità di standard interno iniettato che ha prodotto un picco superiore a tre volte la deviazione standard del rumore di fondo. Le curve di calibrazione per le analisi quantitative sono state costruite con l'aggiunta di quantità crescenti (0-0,1-0,2-0,5-1-2,5-5-10-25 ng) di AEA.

2.5.ANALISI DI ACCOPPIAMENTO LIGANDO RECETTORE

L'analisi di accoppiamento ligando-recettore è stata effettuata seguendo il protocollo descritto da Zamberletti et al 2012.

I vetrini dei tre gruppi sperimentali (test1, test 2 e controllo) sono stati incubati in tampone (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, NaCl 100 mM, 0,1% BSA, pH 7,4) a 25°C per 10 min e poi in tampone (3 mM GDP) a 25°C per 15 min. I vetrini sono stati trasferiti successivamente in un tampone contenente 3 mM GDP e 0.04 nM [³⁵S]GTPγS (Perkin Elmer

Life Sciences, Milano, Italia) con (stato stimolato) o senza (stato basale) 5 μ M di agonista di CB1/CB2, CP-55940 (Tocris, UK) e incubati a 25°C per 2 ore. Tutte le sezioni sono state poi sciacquate a freddo per due volte nel tampone Tris salino 50mM (TBS) e una volta in acqua deionizzata, successivamente essiccate ed esposte ai film Kodak Biomax MR (Perkin Elmer Life Sciences, Milano, Italia) per 48 ore.

2.6. ELABORAZIONE DEI DATI E ANALISI STATISTICA

Analisi istologica

Tutte le sezioni sono state valutate al microscopio ottico a luce trasmessa in campo chiaro (Eclipse E600, Nikon) tramite diversi obiettivi: 2x, 20x,40x. Il primo obiettivo permette di avere una visione d'insieme del campione, mentre gli altri due consentono una valutazione più approfondita e accurata. Il microscopio è collegato ad una macchina fotografica digitale (DXM1200, Nikon, Tokyo, Japan) che permette di effettuare fotografie digitali. Per ogni campione sono state analizzate tre sezioni su ciascuna delle quali sono state effettuate 10 fotografie digitali tramite una mappatura randomizzata utilizzando l'obiettivo 20x. La scelta delle fotografie deve essere casuale in modo da non essere influenzata dall'operatore.

La colorazione Ematossilina Eosina ha permesso la valutazione qualitativa dei preparati dei campioni. Si è accertata l'integrità strutturale dei tessuti, la presenza/assenza e localizzazione dell' infiltrato infiammatorio e di fenomeni di acantosi.

Le immagini digitali acquisite dai campioni processati per l'analisi immunoistochimica sono state in primis valutate al microscopio ottico con diversi obiettivi (20x,40, e 60x) al fine di determinare la precisa localizzazione dei recettori cannabinoidi a livello intra ed extracellulare e

poi analizzate mediante l'utilizzo di un programma di immagine (Photo Shop, Ps5), per quantificare la presenza di questi recettori nel tessuto gengivale.

È stato determinato un range di colori che indicasse l'avvenuta marcatura al fine di quantificarla come frazione del numero di pixel marcati su pixel totali dell'immagine ed è stata quindi calcolata la percentuale di marcatura per ogni singola immagine. È stato escluso dal range di colori di marcatura il colore di fondo presente sulle immagini dovuto alle perossidasi presenti (marroncino tenue). Al fine di valutare la *presenza* dei recettori è stata quantificata la marcatura su tutta l'immagine senza fare distinzione tra epitelio e connettivo; per valutare la *distribuzione* dei recettori nel tessuto e verificare eventuali differenze di concentrazione tra epitelio e connettivo, si è isolato l'epitelio dal connettivo in modo da effettuare delle quantificazioni sulle singole componenti epiteliale e connettivale. Si sono potute così valutare non solo le differenze di distribuzione dei recettori tra epitelio e connettivo all'interno di uno stesso campione ma anche le differenze tra campione sano e campione malato.

Su ognuna delle tre sezioni di ogni campione sono state effettuate due mappature costituite ognuna da un set di 10 fotografie randomizzate: una sulle sezioni in cui era stato utilizzato l'anticorpo per i recettori CB1 e l'altra sulle sezioni in cui era stato utilizzato l'anticorpo per i recettori CB2. Quindi su ogni mappatura sono state effettuate due quantificazioni: una relativa al connettivo e l'altra relativa all'epitelio.

Analisi funzionale dell'efficienza del ECS

Successivamente al test di accoppiamento si è proceduto con l'analisi delle immagini; è stata valutata l'intensità del film autoradiografico misurando i livelli di grigio con uno scanner duale (ArtixScan 1800F) collegato ad un PC che esegue il software di Image-Pro Plus v.5.0 (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD, USA). Successivamente è stato stabilito il livello di grigio delle misurazioni densitometriche, calcolato dopo aver sottratto la densità dello sfondo all'interno del range lineare determinato utilizzando gli ^{35}S standard di laboratorio.

Quindi una volta calcolata l'intensità di grigio della marcatura viene sottratto il grigio di fondo sulle immagini acquisite sia dai campioni incubati con buffer e agonista che da quelli incubati con il solo buffer senza agonista. Si considera la quantità non stimolata tolto il fondo come riferimento messo a 100 e si procede con il rapporto tra la quantità stimolata tolto il fondo ed il riferimento ottenendo così la variazione dovuta al legame con l'agonista. Il riferimento, ovvero la quantità di recettori non stimolati, identifica l'attività G costitutiva del tessuto che è indipendente dal ligando e quindi può essere considerata aspecifica.

Analisi statistica

L'analisi statistica si compone di due parti:

- *Analisi descrittiva*

In ogni campione sono stati calcolati Media e Deviazione standard delle percentuali di marcatura delle tre sezioni per entrambi gli anticorpi e per ognuno dei due parametri (epitelio e connettivo). In un secondo momento sono state calcolate Media e Deviazione standard separatamente per i gruppi test1, test2 e controllo.

- *Analisi inferenziale*

Per quanto riguarda l'analisi inferenziale le percentuali di espressione di CB1 e CB2 nei pazienti con parodontite cronica, "non responders" e sani, sono stati analizzati con il programma

Statistical Package for Social Sciences (SPSS V.15.0- IBM) utilizzando il test di Kruskal–Wallis (non parametrico) con un livello di significatività di $p < 0.05$; sono state inoltre confrontate a coppie fra i tre gruppi tutte percentuali di espressione di CB1 e CB2 nel tessuto connettivo e nell'epitelio tramite il test di Wilcoxon-Mann-Whitney (non parametrico) con un livello di significatività $p < 0.05$ nel seguente modo:

- marcatura CB1 e CB2 del tessuto connettivo dei campioni parodontopatici vs campioni sani;
- marcatura CB1 e CB2 del tessuto epiteliale dei campioni parodontopatici vs campioni sani;
- marcatura CB1 e CB2 del tessuto connettivo dei campioni “non responders” vs campioni sani;
- marcatura CB1 e CB2 del tessuto epiteliale dei campioni “non responders” vs campioni sani;
- marcatura CB1 e CB2 del tessuto connettivo dei campioni “non responders” vs campioni parodontopatici;
- marcatura CB1 e CB2 del tessuto epiteliale dei campioni “non responders” vs campioni parodontopatici.

Per quanto riguarda la quantificazione di AEA gengivale sono stati effettuati invece i seguenti confronti statistici:

- AEA a livello del sito attivo dei pazienti parodontopatici vs sito sano dello stesso paziente, mediante test Wilcoxon-Mann-Whitney per campioni appaiati con un livello di significatività di $p < 0,05$;

- AEA a livello del sito sano di pazienti parodontopatici vs pazienti sani mediante test Wilcoxon-Mann-Whitney per campioni indipendenti con un livello di significatività di $p < 0,05$, al fine di includere nel gruppo controllo anche il sito sano dei pazienti parodontopatici;
- AEA a livello di pazienti parodontopatici vs “non responders” vs sani totali mediante il test di Kruskal–Wallis con un livello di significatività di $p < 0,05$

I risultati dell'analisi di accoppiamento ligando-recettore ottenuti dai tre gruppi sperimentali sono stati invece confrontati tramite ANOVA one-way con Turkey's post hoc test con un livello di significatività di $p < 0,05$.

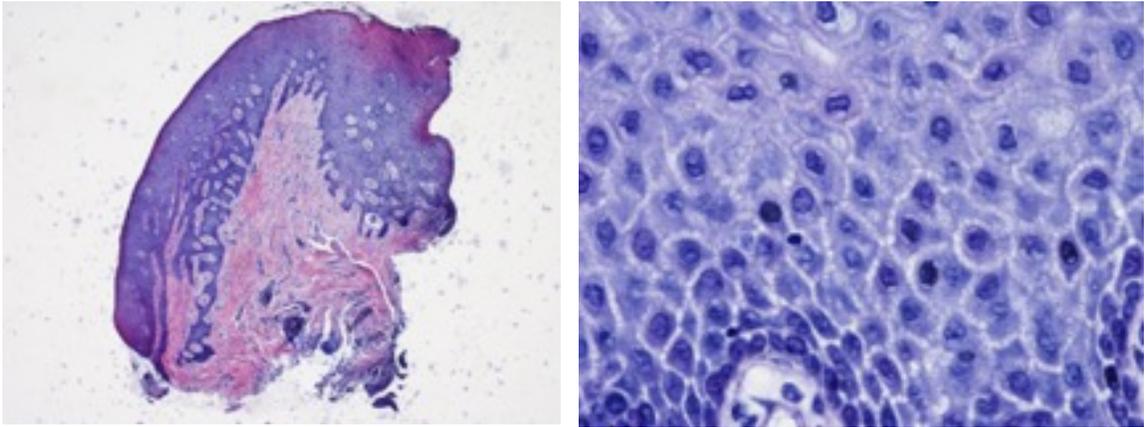
3. RISULTATI

3.1. ANALISI ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA

Gruppo controllo:

L'osservazione al microscopio ottico ha dimostrato che i campioni del gruppo controllo, analizzati dopo colorazione con ematossilina-eosina, si presentavano sani e senza la presenza di

cellule infiammatorie. I campioni risultavano ben conservati e integri nella loro morfologia nonostante la processazione istologica. **(Figura 4)**



Figura

4 Papilla gengivale di un soggetto sano. Si osserva in rosa il connettivo e in viola/blu la porzione epiteliale. Colorazione Ematossilina Mayer/Eosina ingrandimento totale 25x.. (Immagine personale)

Aumentando l'ingrandimento (10x, 20x) è stata osservata la struttura microscopica del campione, anch'essa ben conservata. L'epitelio presentava un'architettura normale in cui erano visibili lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granulare e lo strato corneo. **(Figura 5 A-B)**

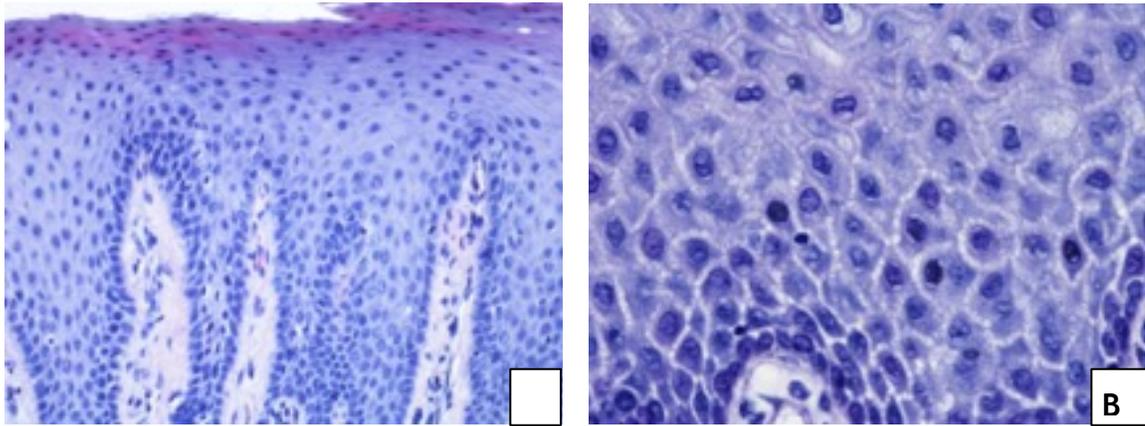


Figura 5 A e B. A Epitelio gengivale. Si nota la presenza delle papille che si invaginano nella porzione connettivale. Le cellule dei vari strati che costituiscono l'epitelio, colorati in blu, sono ben distinguibili. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 200x. B Particolare che mostra, dal basso verso l'alto, lo strato basale, poi spinoso e l'inizio del granuloso. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 400x. (Immagine personale)

Lo strato basale, posto immediatamente a contatto con la membrana basale, si presentava costituito da cheratinociti di forma cubica o colonnare con nucleo ovale voluminoso. Quest'ultimo, essendo formato da componenti acide, si presentava di colore blu intenso, dovuto alla colorazione con ematossilina, mentre il citoplasma basofilo si presentava colorato di rosa. Procedendo verso la superficie i cheratinociti assumevano diverse forme: ellissoidale, rotondeggiante e poliedrica con nuclei più piccoli. Lo strato basale e lo strato spinoso costituivano circa i due terzi dell'intero spessore dell'epitelio. Lo strato granulare era costituito da cellule più grandi, appiattite e basofile. I cheratinociti dello strato corneo si presentavano radicalmente trasformati nel loro aspetto: molto appiattiti, eosinofili, intensamente colorati di rosa per l'eosina e privi di nucleo. La membrana basale presentava la normale struttura a creste epiteliali. **(Figura 6)**

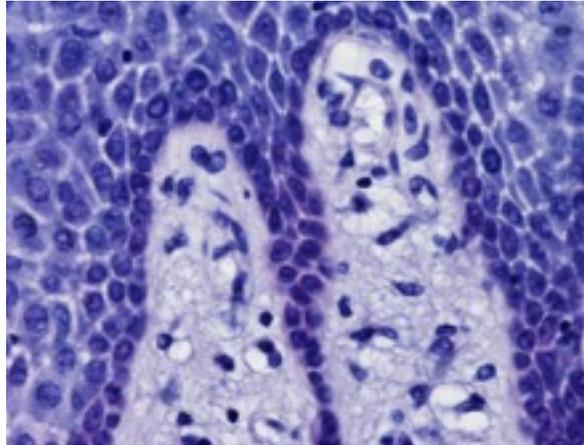


Figura 6 Creste epiteliali che si invaginano nel tessuto connettivo. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 400x.(Immagine personale)

All'osservazione non si sono riscontrati fenomeni di acantosi. A livello connettivale sono stati osservati fasci di fibre collagene normalmente organizzati: alcuni avevano andamento parallelo rispetto alla superficie epiteliale, altri invece si dirigevano ortogonalmente. Non si notavano addensamenti di cellule infiammatorie né un incremento del numero dei vasi. Il tessuto si presentava sempre compatto e organizzato in modo normale. **(Figura 7)**

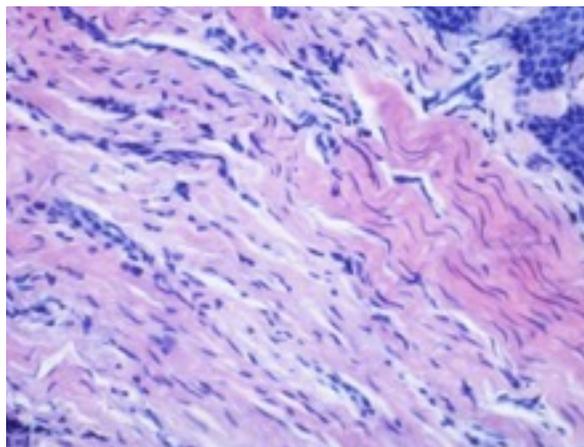


Figura 7 Tessuto connettivo di gengiva. Si nota la presenza delle fibre che costituiscono la matrice. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 200x.(Immagine personale)

Gruppi test 1 e 2

I campioni dei due gruppi test presentavano delle alterazioni strutturali: l'epitelio appariva ispessito e le creste epiteliali più accentuate, il connettivo si presentava più lasso, con una morfologia meno compatta rispetto al connettivo dei campioni sani. **(Figura 8)**

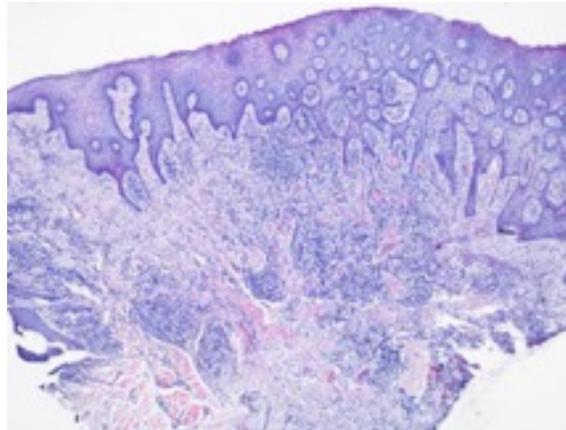
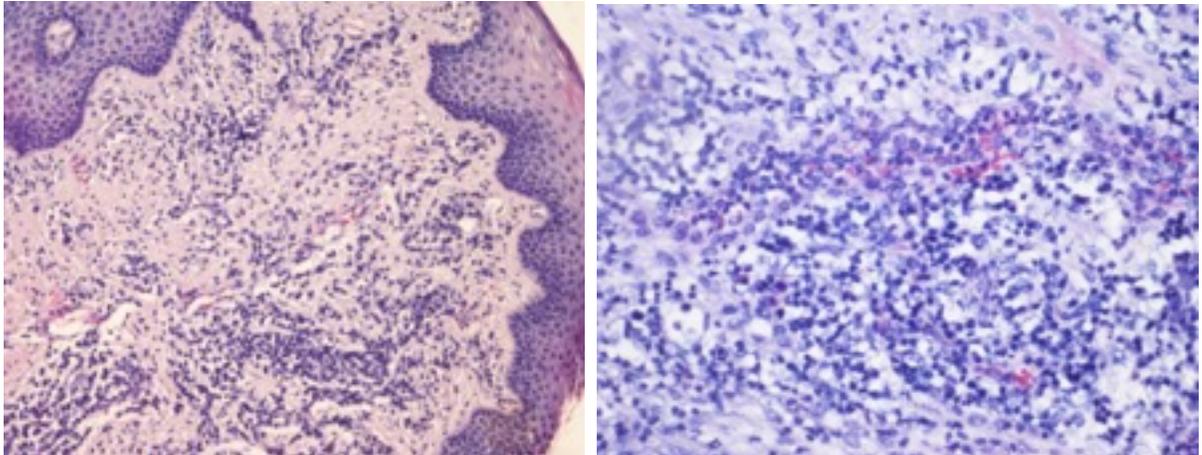


Figura 8 Papilla gengivale di un soggetto parodontopatico . Si osserva il notevole infiltrato infiammatorio ben diffuso nel campione. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 25x. (Immagine personale)

A piccolo ingrandimento si apprezzava una struttura meno compatta e più disgregata dell'intero campione. L'epitelio giunzionale non era ben delineato, le cellule si presentavano più distanziate

e meno compatte. È stato riscontrato un marcato infiltrato infiammatorio e un aumento numerico degli



elementi vascolari. (**Figura 9, 10, 11**)

L'infiltrato infiammatorio era maggiormente rappresentato a livello perivascolare (**Figura 11 A-B**) e a livello dell'epitelio giunzionale essendo questo la zona di minor resistenza all'invasione batterica. Le fibre collagene erano orientate in fasci più lassi. In alcuni campioni le cellule infiammatorie erano confinate al tessuto connettivo subepiteliale mentre in altri si estendevano in profondità fino alle fibre collagene dell'attacco connettivale.

Figura 9 Particolare della figura 8 che mostra la presenza di infiltrato infiammatorio nella porzione subepiteliale. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 100x. (Immagine personale)

Figura 10 Particolare dell'infiltrato infiammatorio nella porzione connettivale del campione. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 200x. (Immagine personale)

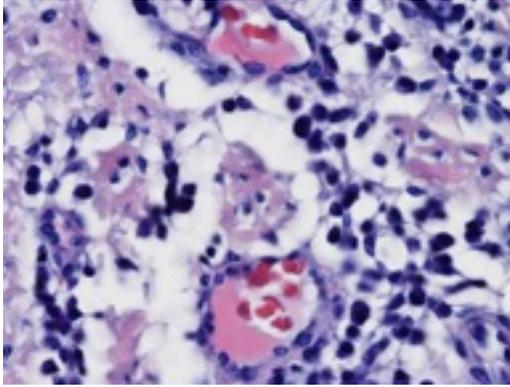
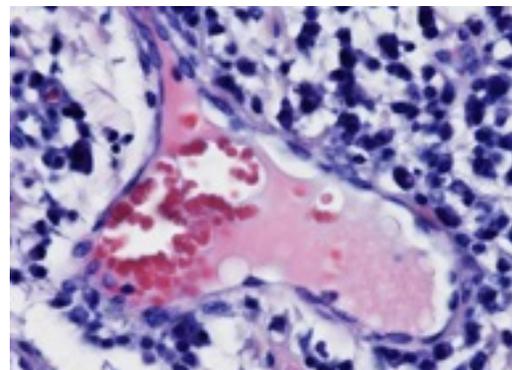


Figura 11 A e B Infiltrato infiammatorio perivascolare. Le cellule infiammatorie sono colorate con ematossilina in blu, mentre le particelle sono colorate con eosina in rosso; si evidenziano le emazie presenti nel vaso sanguigno. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 400x. (Immagine personale)

Nella tabella sottostante sono stati riportati i risultati delle analisi effettuate sui campioni dei gruppi test e controllo.



	Campio ne	CB1 connettivo		CB1 epiteliio		CB2 connettivo		CB2 epiteliio	
		Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.	Media	Dev.Std
SANI TOT	EC 23	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01	0,05	0,02
	EC 24	0,82	1,08	0,02	0,01	0,04	0,03	0,06	0,01
	EC 25	0,02	0,04	0,01	0,01	0,32	0,12	0,03	0,01
	EC 26	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
	EC 43	0,01	0,01	0,35	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02
	EC 44	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,07	0,01
	EC 45	0,04	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,01
	EC 46	0,01	0,5	0,03	0,01	0,3	0,01	0,02	0,03
	EC 47	0,02	0,06	0,1	0,01	0,01	0,04	0,01	0,02
	EC 49	0,30	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
MEDIA		0,13	0,18	0,06	0,02	0,08	0,03	0,03	0,02
CRONI CI MALATI	EC 9	2,65	0,3	3,02	0,89	3,45	0,5	2,51	0,65
	EC 12	2,56	1,2	2,89	0,75	2,02	0,64	2,79	0,47
	EC 13	2,5	0,5	2,05	0,05	1,89	0,03	3,56	0,99
	EC 14	2,26	1,06	2,26	1,06	2,46	1,11	2,68	1,03
	EC 15	2,34	0,93	2,34	0,93	2,11	1,08	3,12	1,12
	EC 16	1,08	0,61	2,08	0,61	1,65	0,72	4,12	1,10
	EC 18	2,41	0,79	2,41	0,79	1,86	0,75	6,35	0,35
	EC 43	2,21	0,22	3,02	1,05	2,03	0,02	4,24	0,43
	EC 44	2,05	0,89	1,98	0,65	1,98	1,4	2,97	0,62
	EC 45	1,6	1,03	2,65	0,53	1,09	0,67	3,98	1,02
EC 46	2,45	0,82	3,45	1,45	1,88	0,55	4,03	0,23	
MEDIA		2,19	0,76	2,56	0,80	2,04	0,68	3,67	0,73
	EC 2	4,28	1,40	20,54	5,70	3,55	0,98	10,91	2,35

	Campione	CB1 connettivo		CB1 epitelio		CB2 connettivo		CB2 epitelio	
		Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.
NON RESPONDERS	EC 3	4,25	2,02	12,36	2,65	2,45	0,03	9,17	0,85
	EC 4	3,39	0,91	6,75	2,67	4,02	0,54	22,34	4,50
	EC 5	4,65	1,93	6,44	1,03	3,27	1,23	18,30	3,30
	EC 6	3,05	1,12	23,09	1,53	3,17	1,12	12,34	1,86
	EC 7	2,84	2,01	18,09	3,42	3,86	0,89	11,67	2,45
	EC 8	5,29	0,72	7,34	1,67	6,48	0,17	7,89	3,0
	EC 10	5,43	1,03	6,54	2,56	3,98	0,84	13,02	2,31
MEDIA		4,15	1,39	12,64	2,65	3,85	0,73	13,21	2,58

Tabella 5 Risultati ottenuti dalle

quantificazioni dei campioni sani, parodontopatici cronici e “non responders” in percentuale

Gruppo controllo

Dall’osservazione delle mappature dei campioni sani si notava un’esigua presenza di marcatura per i recettori CB1 e CB2. La distribuzione di questi recettori nell’epitelio si concentrava nella zona compresa tra lo strato granulare e lo strato corneo mentre nel connettivo si notava una marcatura scarsa senza privilegiare nessuna area in particolare. **(Figura 12, 13)**

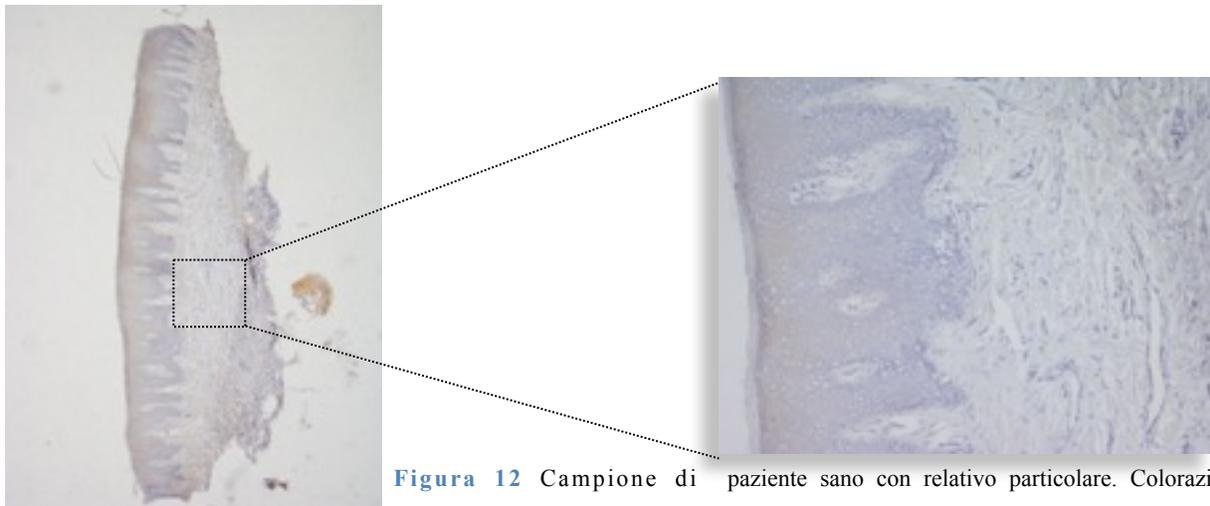
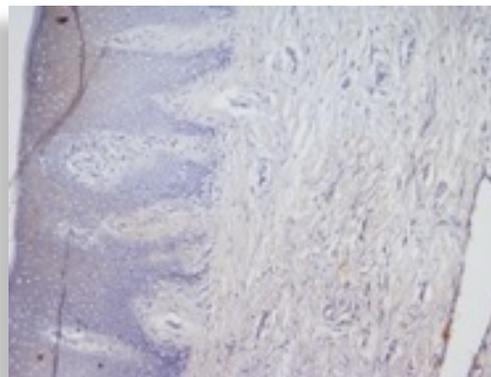


Figura 12 Campione di paziente sano con relativo particolare. Colorazione immunohistochimica anti CB1, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare.

(Immagine personale)



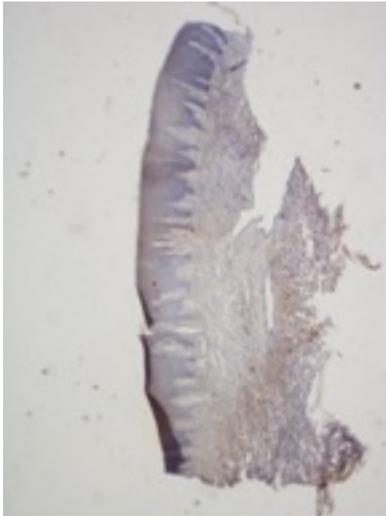
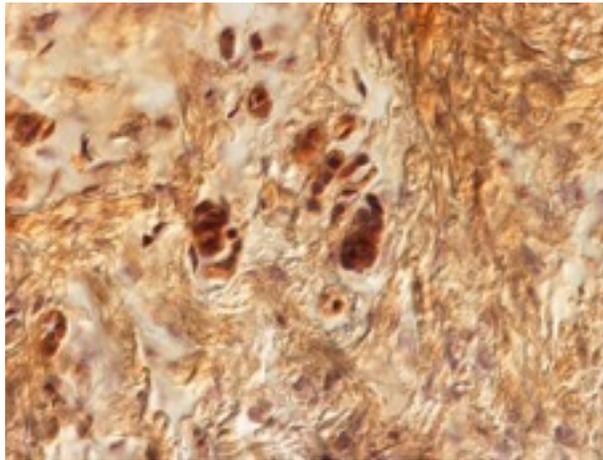


Figura 13 Campione di paziente sano con relativo particolare. Colorazione immunohistochimica anti CB2, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (Immagine personale)

La media e la deviazione standard, calcolate sui dati ottenuti dalle quantificazioni anti-CB1 sul tessuto connettivo, sono risultate di $0,13\% \pm 0,18\%$ mentre sul tessuto epiteliale è stato ottenuto un valore di $0,06\% \pm 0,02\%$; dalle quantificazioni anti-CB2 invece la media e la deviazione standard sono risultate $0,08\% \pm 0,03\%$ sul tessuto connettivo e $0,03\% \pm 0,02\%$ sul tessuto epiteliale.

Gruppo test 1

Nella valutazione delle mappature dei campioni parodontopatici è stata osservata la distribuzione del recettore CB1, che a livello connettivale risultava diffusa mentre a livello epiteliale risultava



maggiormente concentrata nella zona compresa tra lo strato granulare e lo strato corneo. I recettori CB1 risultavano diffusi prevalentemente a livello intracellulare; in particolare modo si osservavano recettori, sia CB1 che CB2, esposti da parte di *cheratinociti* dell'epitelio, *macrofagi*, con un nucleo grande reniforme o a ferro di cavallo, in certi casi anche bilobato, citoplasma trasparente e ad aspetto di "vetro smerigliato" (**Figura 14**), di *granulociti neutrofili* sia intervasali che extravasali con nucleo suddiviso in 2-5 lobi, collegati da un sottile filamento di materiale nucleico (**Figura 15**), ed infine di *plasmacellule* di forma ovoidale con nucleo eccentrico ed esteso citoplasma basofilo; questi ultimi durante i processi infettivi migrano dai vasi verso il tessuto connettivo lasso. La distribuzione recettoriale nei campioni anti-CB2 è risultata comparabile a quella osservata nei campioni anti-CB1, con quanto riguarda il tessuto connettivo mentre nei campioni anti-CB2 la distribuzione è estesa anche a livello degli strati basali. (**Figura**

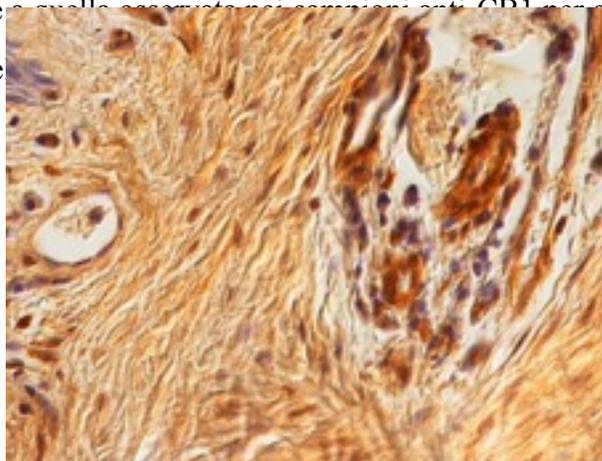


Figura 14 Particolare in cui si evidenziano i macrofagi marcati; ingrandimento totale 600x. (Immagine personale)

Figura 15 Particolare in cui si evidenziano i granulociti neutrofilici marcati; ingrandimento 600x (Immagine personale)

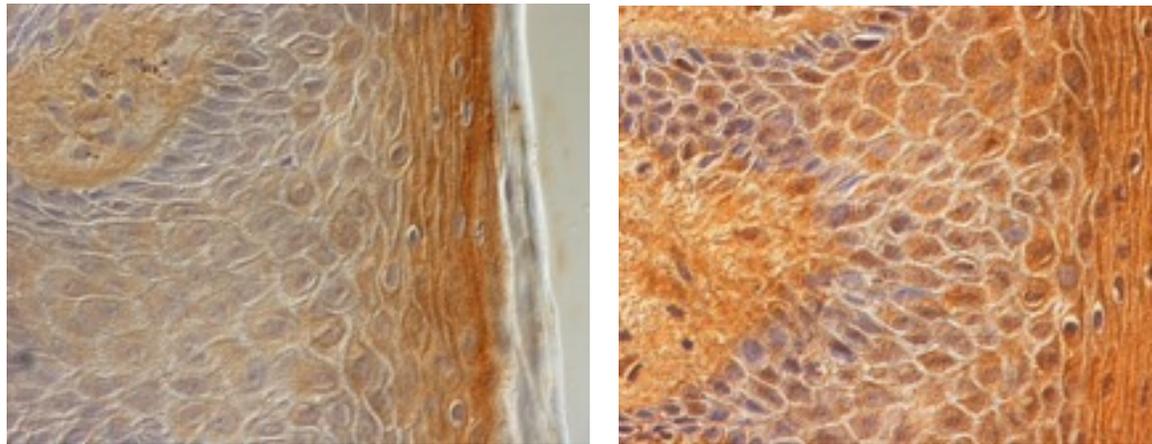


Figura 16, 17 Distribuzione dei recettori CB1a livello degli strati soprabasali, granuloso e corneo a sinistra; diffusamente nell'epitelio per i CB2 a destra; ingrandimento totale 600x. (Immagini personali)

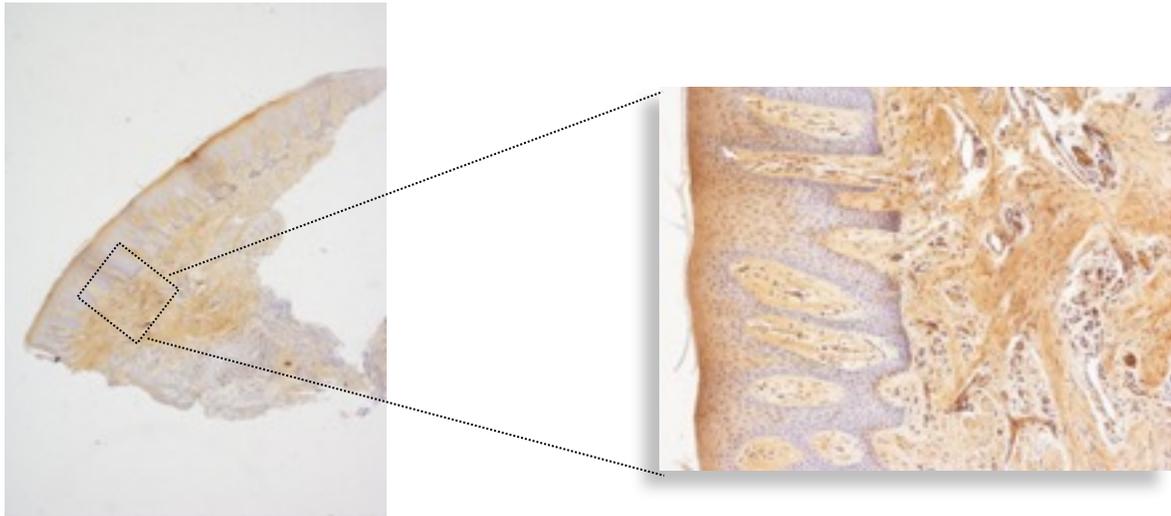
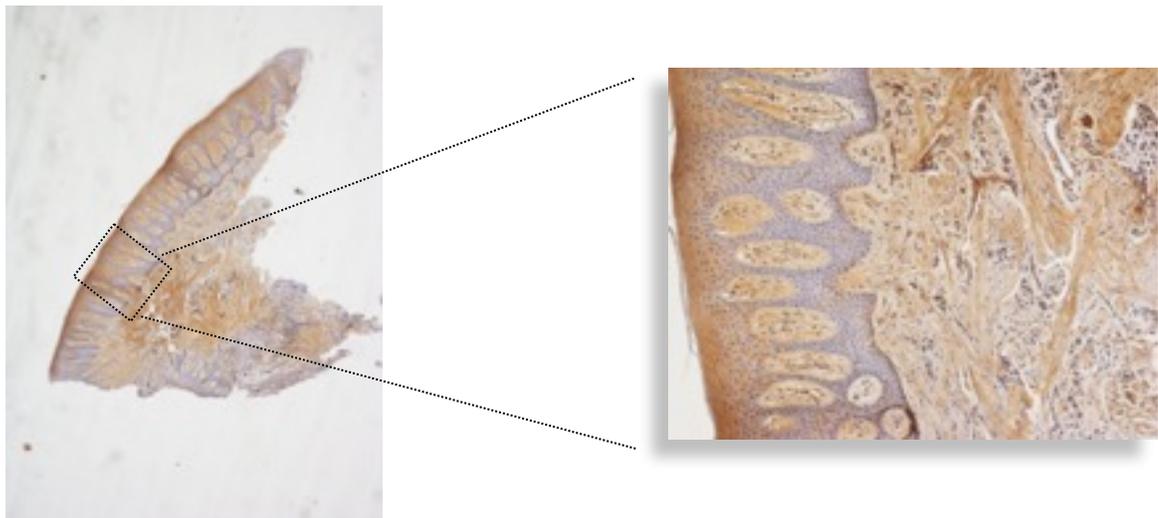


Figura 18 Campione di paziente parodontopatico con relativo particolare. Colorazione immunistochimica anti CB1, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (Immagine personale)

Figura 19 campione di paziente parodontopatico con relativo particolare. Colorazione immunistochimica anti cb2,



ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (immagine personale)

La media e la deviazione standard, calcolate sui dati ottenuti dalle quantificazioni anti-CB1 sul tessuto connettivo, sono risultate di $2,19\% \pm 0,76\%$, mentre sul tessuto epiteliale $2,56\% \pm 0,80\%$; dai dati ottenuti dalle quantificazioni anti-CB2 invece, la media e la deviazione standard sono risultate $2,04\% \pm 0,68\%$ sul tessuto connettivo mentre $3,67\% \pm 0,73\%$ sul tessuto epiteliale.

Gruppo test 2

Dall'osservazione delle mappature dei campioni "*non responders*" la distribuzione recettoriale nei campioni anti-CB2 è risultata comparabile a quella osservata nei campioni anti-CB1 sia per quanto riguarda il tessuto connettivo che l'epitelio; le linee cellulari marcate erano sovrapponibili a quelle dei campioni parodontopatici (cheratinociti, macrofagi, granulociti neutrofili e plasmacellule) ma la marcatura è risultata più intensa (**Figura 20, 21**).