

INDICE

RIASSUNTO	p. 3
ABSTRACT	p. 5
1. INTRODUZIONE	p. 7
1.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	p. 7
- Endocannabinoidi: biosintesi, meccanismi d'azione e degradazione	p. 8
- Recettori dei cannabinoidi: CB1 e CB2	p. 13
- Polimorfismi genetici dei recettori CB1 e CB2	p. 16
1.2 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE E MALATTIE DEL FEGATO	p. 17
1.3 BASI RAZIONALI DELLO STUDIO	p. 18
2. SCOPI	p. 25
3. MATERIALI e METODI	p. 27
3.1 PAZIENTI, CONTROLLI E RELATIVI CAMPIONI	p. 27
3.2 METODI	p. 27
- Analisi immunoistochimica	p. 28
- Analisi RT-PCR semi-quantitativa	p. 30
- Sequenziamento genico	p. 30
- Analisi statistica	p. 33
4. RISULTATI	p. 35
4.1 ESPRESSIONE TISSUTALE DEI RECETTORI CB1 E CB2	p. 35
4.2 ESPRESSIONE DELL'mRNA DEI RECETTORI CB1 E CB2	p. 39
4.3 POLIMORFISMI GENICI DEI RECETTORI CB1 E CB2	p. 40
5. DISCUSSIONE	p. 46
6. BIBLIOGRAFIA	p.000

RIASSUNTO

Il sistema endocannabinoide (EC) è considerato un mediatore cruciale in molte condizioni fisiopatologiche. E' stato dimostrato che l'utilizzo di un agonista dei cannabinoidi (WIN5521-2) porta ad un aumento della soglia nocicettiva del prurito in ratti colestatici. Inoltre, in corso di colangiopatie croniche, cellule progenitrici epatiche risultano attivate, e costituiscono un compartimento con caratteristiche neuroendocrine, regolato da diverse molecole, tra cui i neuropeptidi.

Scopi: 1) Valutare se il sistema endocannabinoide è attivato nella cirrosi biliare primitiva (CBP); 2) Valutare se polimorfismi genetici (SNPs) nei geni dei recettori per i cannabinoidi (CB1 and CB2) possano causare differenti espressioni fenotipiche di malattia, in termini di associazione con il prurito.

Materiali e metodi: 1) Studio morfologico: l'espressione dei recettori CB1 and CB2 è stata esaminata in campioni di biopsie epatiche provenienti da 2 soggetti di controllo sani e 9 pazienti con CBP (stadio IV), mediante immunoistochimica. L'espressione dell'RNA messaggero di CB1 e CB2 è stata analizzata in 6 campioni di biopsie epatiche (2 fegato normale e 4 con diagnosi istologica di CBP, a diversi stadi di malattia) per mezzo di RT-PCR. 2) Studio genetico nel quale sono stati arruolati i seguenti gruppi di soggetti: 68 pazienti italiani consecutivi con CBP, 84 pazienti americani con CBP, e 70 soggetti di controllo sani confrontati per sesso, età e distribuzione geografica con i pazienti italiani con CBP. Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero con l'utilizzo di metodiche standard e successivamente le regioni codificanti dei due geni sono state amplificate e sequenziate con l'utilizzo di primers specifici.

Risultati: in campioni epatici di soggetti affetti da CBP, l'espressione tissutale di CB1 appare marcata negli epatociti, nelle cellule epiteliali dei dotti biliari e nelle cellule di Kupffer, mentre è debole nel fegato normale. Anche CB2 risulta essere attivato nella CBP ed in particolare risulta fortemente espresso a livello delle cellule parenchimali e nelle cellule dell'epitelio biliare.

La variabilità di espressione dell'mRNA dei recettori CB1 e CB2, espressi nei campioni epatici sia di CBP, sia nel fegato normale, non permette di dimostrare un'iperregolazione trascrizionale dei recettori CB1 e CB2 in fase di malattia colestatica.

Per quanto riguarda i polimorfismi genetici, CB1 SNP (1359 G/A) è presente nel 26.5% dei pz. italiani con CBP, nel 22.9% dei soggetti di controllo sani, e nel 27.4% dei pz americani con CBP ($p=ns$). CB2 SNP (188-189 AA/GG) è presente nel 24.4% vs 30.4% dei pz. con CBP, italiani ed americani rispettivamente, e nel 28% dei soggetti di controllo ($p=ns$). Stratificando i pazienti con CBP in base alla presenza o meno di prurito, non sono state trovate differenze statisticamente significative nei due sottogruppi di pazienti con CBP in associazione alla presenza di mutazione nei geni CB1 e CB2. Il polimorfismo 1359 G/A del gene CB1 correla, invece, in maniera statisticamente significativa, con la progressione di malattia (stadi istologici secondo Scheur) ($p=0,05$) e con la risposta alla terapia con acido ursodesossicolico (UDCA) ($p=0,028$), come dimostrato dall'analisi statistica multivariata.

Nella cirrosi biliare primitiva, il sistema endocannabinoide risulta essere up-regolato, come dimostrato dalla iper-espressione tissutale, rispetto al fegato sano; inoltre, la mutazione genetica a livello del gene CB1 sembra correlare con l'evoluzione della malattia, in termini di ridotta efficacia della terapia con UDCA nel rallentare il tasso di progressione della malattia stessa.

Pertanto, nella cirrosi biliare primitiva, il sistema endocannabinoide potrebbe esercitare un ruolo nella regolazione dell'omeostasi tissutale in risposta al danno epatico indotto.

ABSTRACT

Endocannabinoid system (EC) has emerged as a crucial mediator in a variety of pathophysiological conditions. A cannabinoid agonist (WIN5521-2) has been shown to increase the pruritus threshold in cholestatic rats. Moreover, in the course of chronic cholangiopathies hepatic progenitor cells are activated constituting a neuroendocrine compartment regulated by different agents including neuropeptides. Aims: 1. To evaluate whether the EC system is activated in PBC; 2. To evaluate if genetic variations in human cannabinoid-specific receptor genes (CB1 and CB2) might cause a different phenotypic expression of the disease in terms of association with pruritus. Methods: 1) Morphological study: CB1 and CB2 receptors were characterized in biopsy specimens of 2 normal human liver and 9 PBC (IV stage) by immunohistochemistry. CB1 and CB2 mRNA expression was also assayed through RT-PCR in liver samples. 2) Genetic study: the following groups of subjects have been enrolled: 68 consecutive PBC Italian pts, 84 PBC pts residents in USA; 70 controls, matched for sex, age, and geographical area with the Italian PBC pts. Genomic DNA was extracted from peripheral venous blood leucocytes with standard method. PCR was used to amplify the coding regions of the CB1 and CB2 genes with specific primers. Results: in PBC, CB1 was markedly expressed in hepatocytes, biliary epithelial cells and in Kupffer cells; conversely, in control livers was virtually absent. CB2 was markedly expressed in hepatocytes and in biliary epithelial cells, in CBP.

The variability of mRNA expression of CB1 and CB2 receptors, that are expressed in liver samples both CBP, both in normal liver, makes it impossible to prove a transcriptional over-regulation of CB1 and CB2 receptors during cholestatic disease (CBP).

CB1 polymorphism (1359 G/A) was present in 26.5% of Italian PBC pts, in 22.9% of healthy controls, and in 27.4% of an US PBC series ($p=n.s.$). CB2 polymorphism (188-189 AA/GG) was present in 24.4% vs 30.4% of Italian and US PBC respectively, and in 28% of Italian controls ($p=n.s.$) Stratifying the PBC patients according to pruritus there was no difference in either Italian and US series in the distribution of CB1 and CB2 mutation in patients with or without pruritus. CB1 SNP (1359 G/A) was correlated with CBP

histologic evolution ($p=0,05$) and with response to treatment with UDCA ($p=0,028$).

Conclusions: EC system is up-regulated in PBC and CB1 SNP (1359 G/A) seems to correlate with the evolution of the disease, in terms of reduced effectiveness of UDCA therapy in slowing the rate of progression of the disease, but this system probably exert a role regulating metabolic homeostasis.

1. INTRODUZIONE

1.1 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Numerosi studi condotti da Gaoni e Mechoulam nel 1964 sulla caratterizzazione chimica del delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), hanno individuato tale molecola come principio attivo della cannabis, permettendo così una serie di importanti chiarificazioni riguardo il suo meccanismo d'azione e, di conseguenza, le potenziali applicazioni terapeutiche del THC stesso. Un'improvvisa accelerazione in questo senso è avvenuta successivamente con la scoperta di specifici recettori per il THC (recettori dei cannabinoidi) e di ligandi endogeni (endocannabinoidi) in grado di attivarli, che simulano in gran parte i tipici effetti psicotropici (e non) della Cannabis (22). Tutte queste scoperte hanno dimostrato l'esistenza di un sistema cannabinoide endogeno propriamente detto che regola gli effetti farmacologici e comportamentali della cannabis, il cui ruolo fisiologico è ancora materia di dibattito (23).

Il sistema endocannabinoide (ECs) è stato definito come un complesso di neurotrasmissioni in grado di regolare l'eccitabilità neuronale, e svolge un ruolo centrale in numerose condizioni fisiopatologiche. E' stato dimostrato che gli endocannabinoidi vengono prodotti per proteggere l'organismo da danni causati da varie situazioni patologiche, ed esercitano un'azione anti-ossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria e, in particolare, antidolorifica (24, 25).

Inoltre, la scoperta dei recettori dei cannabinoidi nel cervello (22) ha suggerito per gli endocannabinoidi anche un ruolo fisiologico nel controllo del movimento e della percezione, nell'alterazione dei processi di apprendimento e memoria, nel rafforzamento dell'azione degli oppioidi per la modulazione del dolore, nonché nella regolazione di stati emotivi quali il piacere e l'aggressività (24).

Tale sistema è costituito da tre classi di molecole (26):

- a) endocannabinoidi, mediatori lipidici di origine endogena;
- b) enzimi, che regolano i processi di sintesi, trasporto e degradazione degli endocannabinoidi;

c) recettori dei cannabinoidi, appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G.

Endocannabinoidi: biosintesi, meccanismi d'azione e degradazione.

I cannabinoidi endogeni sono stati recentemente isolati dal cervello e dai tessuti periferici.

Nel 1992 fu isolato dal cervello di maiale il primo endocannabinoide, l'arachidonoil-etanolamide; si tratta dell'amide dell'acido arachidonico legato con l'etanolamina, per formare un componente ubiquitario delle membrane cellulari animali, che venne chiamato anandamide (AEA) (27); successivamente, nel 1995, fu identificata nei tessuti periferici un altro tipo di molecola cannabinoide endogena, appartenente alla classe degli intermedi metabolici dell'acido arachidonico noti come monoacilgliceroli, il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (28).

AEA e 2-AG sono stati i primi due endocannabinoidi ad essere identificati e sono pertanto i ligandi endogeni meglio conosciuti. Entrambe questi composti sono in grado di legare, benché con differenti affinità ed efficacia d'attivazione, i recettori per gli endocannabinoidi, CB1 e CB2: l'AEA è in grado di legare entrambi i sotto tipi recettoriali comportandosi come un agonista parziale (29); anche il 2-AG è in grado di attivare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi però come un agonista pieno (30).

Più recentemente sono stati individuati altri ligandi endogeni in grado di legare e di attivare i recettori CB1 e CB2: il 2-arachidonoilgliceriletere (2-AGE, noladin), un analogo etero del 2-AG che si comporta da agonista sia sul CB1 che sul CB2 con una maggiore affinità per il CB1 (26); la O-arachidonoiletanolamina (virodammina), una molecola dove l'acido arachidonico e l'etanolamina sono uniti da un legame di tipo estereo, che si comporta come parziale agonista /antagonista sul CB1 e agonista selettivo sul CB2 (26); infine la N-arachidonoildopamina (NADA), l'amide fra l'acido arachidonico e la dopamina che risulta essere 40 volte più selettiva per il CB1 ed è in grado di attivare il recettore dei vanilloidi (TRPV1) (26, 31). Un'altra molecola, simile all'anandamide, la N-palmitoiletanolamina (PEA) già nota come anti-infiammatorio, fu proposta come nuovo ligando per il CB2 (32). Infine, nel 1995 fu scoperta anche l'oleamide (cis-9-ottadecammide,

OEA), un fattore di induzione del sonno (33), per la cui azione cannabimimetica ci sono discordanti dati riguardo al fatto se sia o meno mediata dai recettori dei cannabinoidi (34). (Fig. 1)

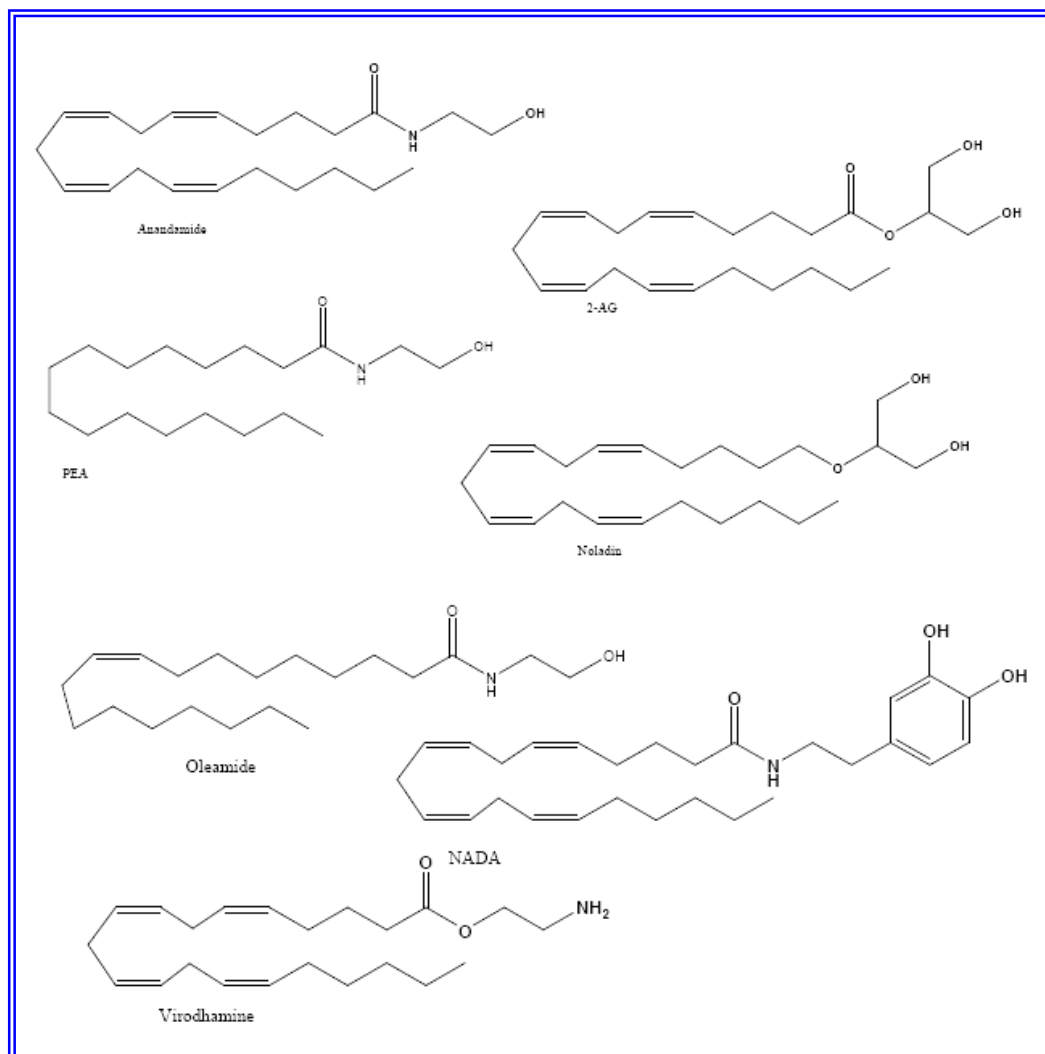


Fig. 1 Struttura chimica degli endocannabinoidi.

Il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella modulazione di funzioni fisiologiche sia a livello del sistema nervoso che in tessuti periferici è oggi confermato dalla scoperta di specifici meccanismi biosintetici e degradativi. Esistono infatti specifiche vie biosintetiche regolabili, cioè meccanismi molecolari in grado di sintetizzare tali sostanze al momento e nel luogo opportuno, e vie cataboliche anch'esse regolabili che mediano la terminazione del segnale chimico portato da tali molecole, nel momento in cui si esaurisce la sua funzione biologica.

Gli endocannabinoidi, pur essendo molecole di natura lipofila, non vengono immagazzinati in vescicole, ma vengono sintetizzati *"on demand"* a partire da precursori fosfolipidici, presumibilmente presenti nella membrana delle cellule neuronali (22, 25, 36). Il processo di biosintesi viene attivato solo in seguito a particolari stimoli cellulari, come la depolarizzazione della membrana o un aumento del Ca^{2+} 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 (35, 36).

In particolare, l'anandamide viene prodotta mediante un processo a due steps: nel primo step viene sintetizzato il precursore dell'AEA, l'*N*-arachidonil-fosfatidiletanolamina (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 (37, 38). (Fig. 2).

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-diacylglicerolo (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 diacylglicerolo lipasi (DGL) e lyso-fosfolipasi C (Lyso-PLC). (39, 40) (Fig. 3).

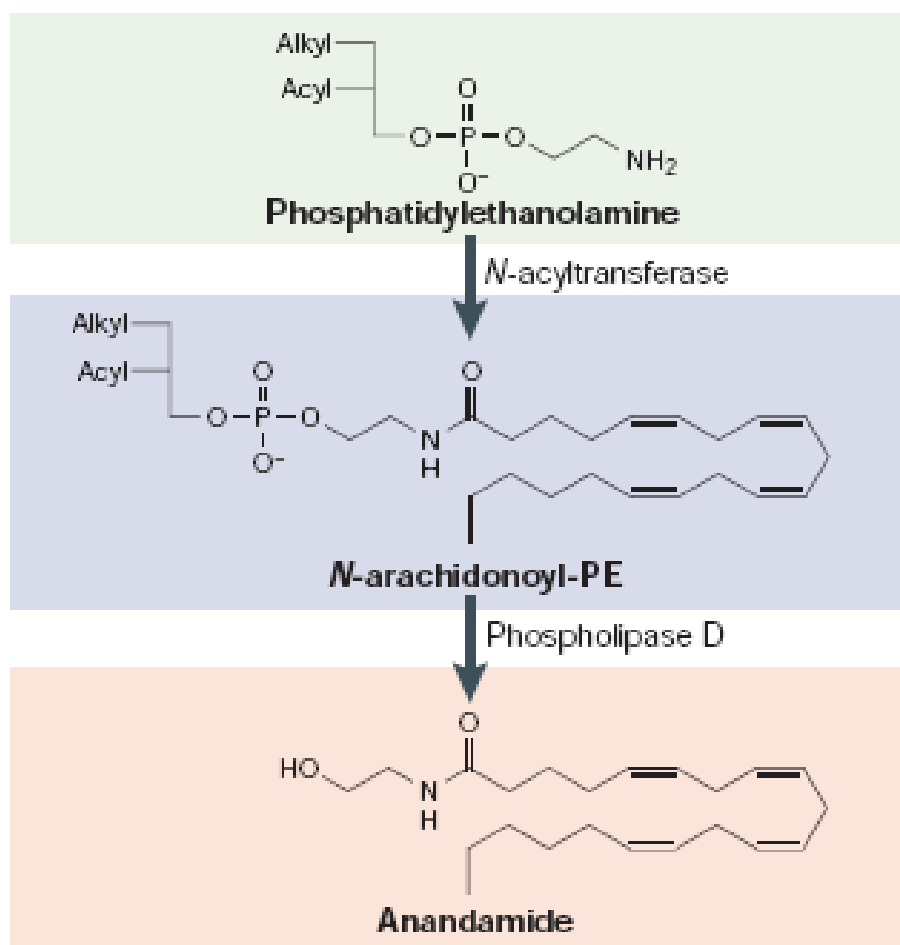


Fig. 2 Principale via biosintetica dell' anandamide.

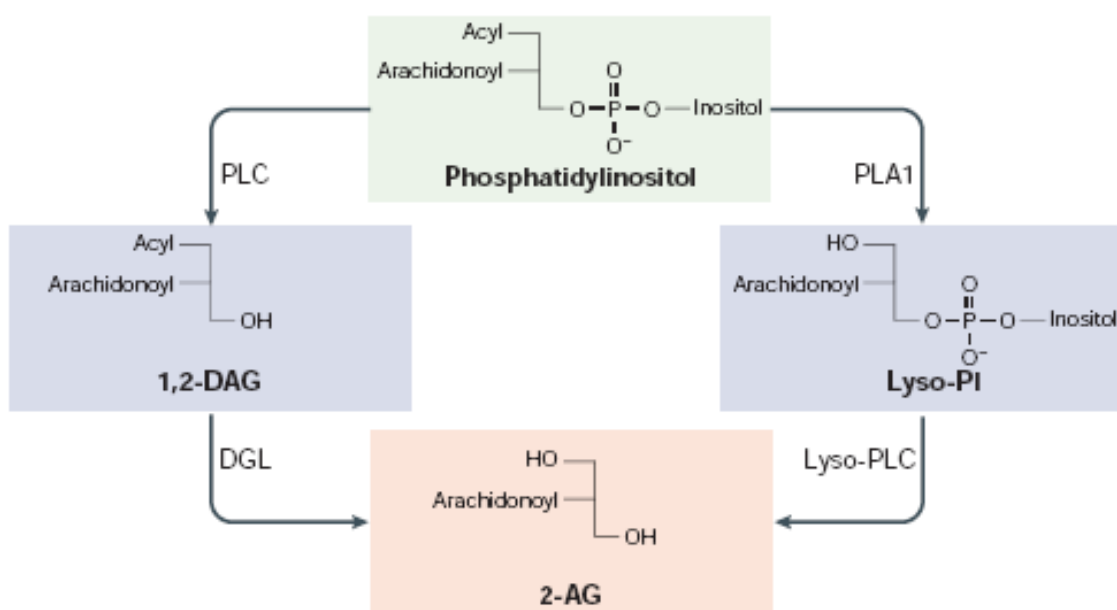


Fig. 3 Principali vie biosintetiche del 2-AG.

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 (36). 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 (35) (fig. 4).

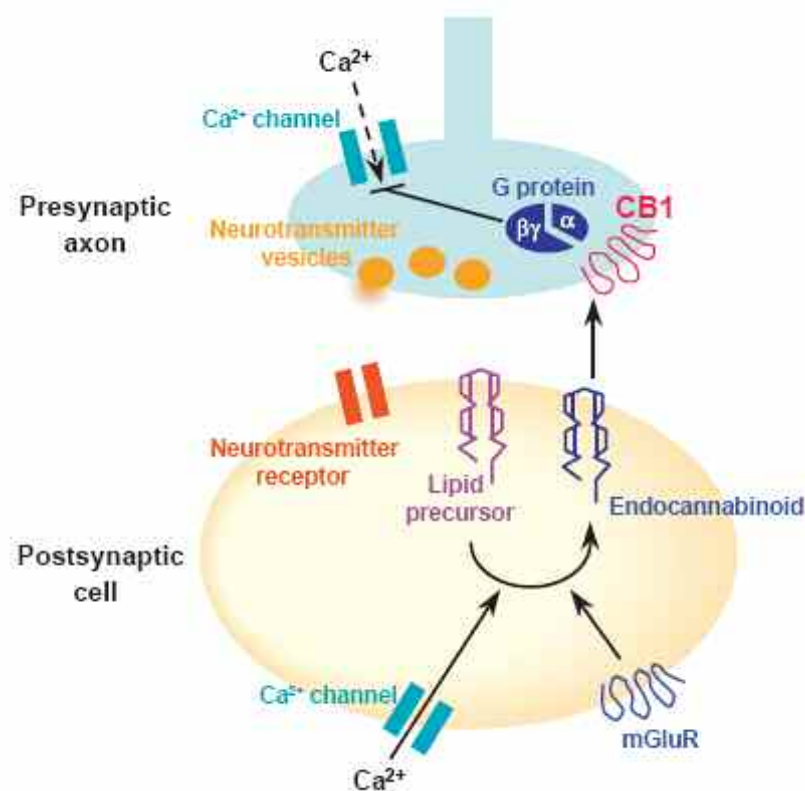


Fig. 4 Meccanismo di traduzione del segnale cannabimimetico a livello neuronale (meccanismo retrogrado).

Una volta espletato la loro funzione di signalling, gli endocannabinoidi, possono essere internalizzati nella cellula attraverso un meccanismo di trasporto ad alta affinità, denominato “trasportatore degli endocannabinoidi” (26, 41, 42). Una volta all’interno della cellula, gli endocannabinoidi vengono rimossi attraverso una sequenza di meccanismi di degradazione molecolare:

- a) ricaptazione (reuptake) 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) (36, 43, 44). (Fig. 5)

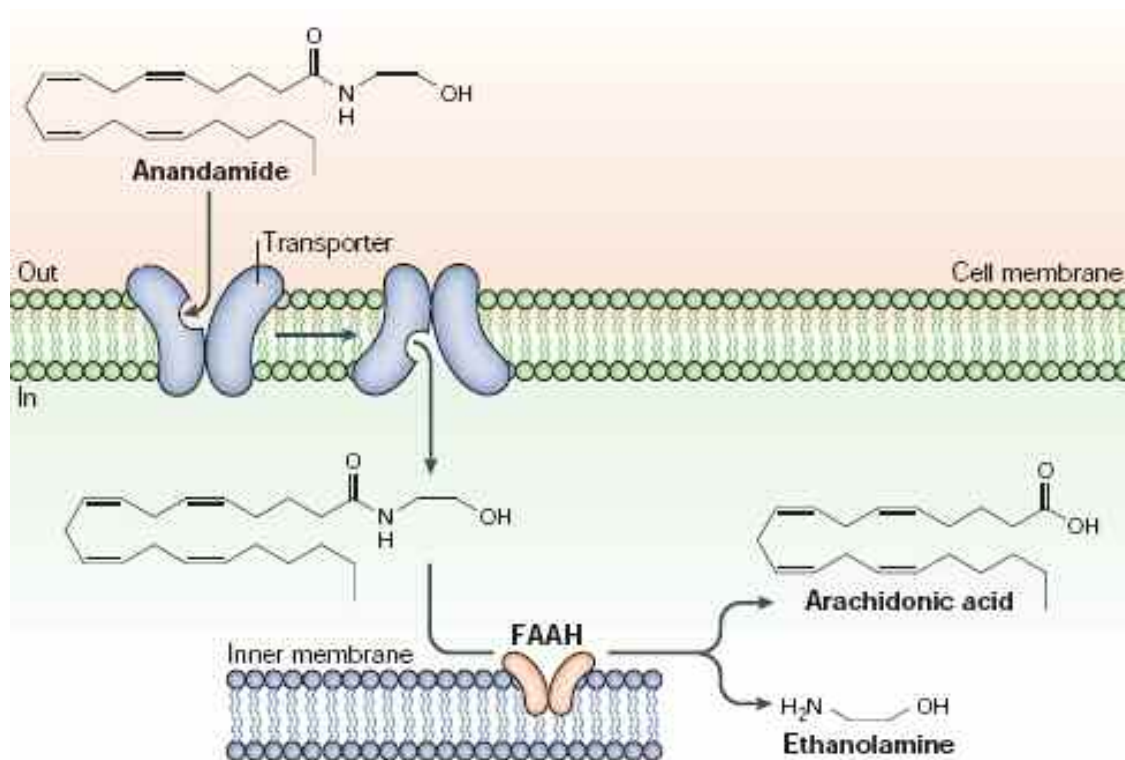


Fig. 5 Meccanismi di degradazione degli endocannabinoidi.

Recettori dei cannabinoidi: CB1 e CB2

Come già accennato in precedenza, i cannabinoidi esercitano le loro funzioni biologiche interagendo con due principali recettori, denominati recettori dei cannabinoidi, CB1 e CB2. Essi fanno parte della classe dei recettori accoppiati alle proteine G. Strutturalmente presentano un dominio extracellulare ammino-terminale (N), ed uno intracellulare carbossi-terminale (C), con 7 regioni transmembrana, formando tre "loops" intracellulari e tre extracellulari. Nel terzo loop intracellulare è presente il sito di legame della proteina G (25, 45) (Fig. 6).

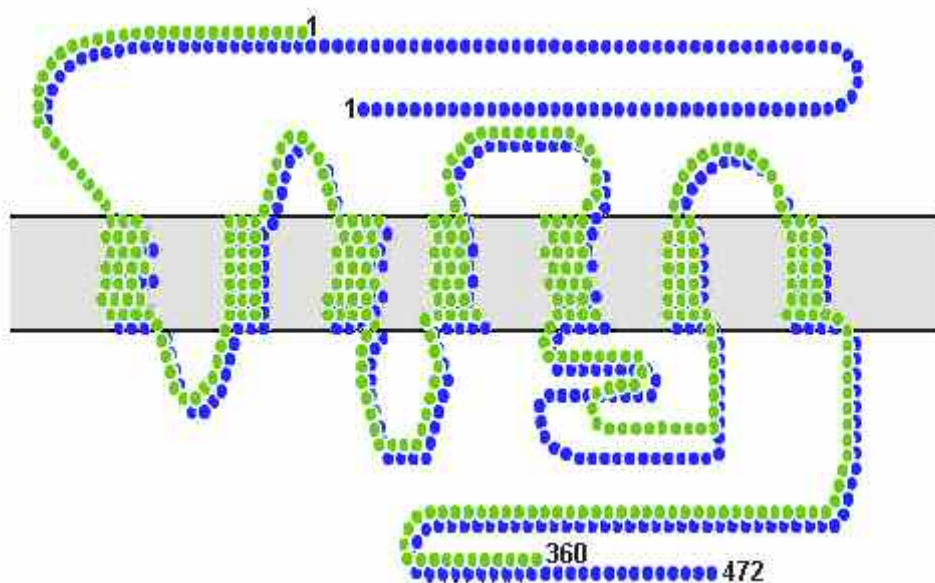


Fig. 6 Struttura molecolare dei recettori CB1 (●) e CB2 (●)

I recettori CB1 sono stati scoperti nel 1990 (46), si trovano principalmente nell'encefalo, ma sono stati individuati con minore densità, anche nei polmoni, nel fegato, nei reni e nelle cellule dell'apparato riproduttivo sia maschile che femminile.

La distribuzione dei recettori dei cannabinoidi nel cervello suggerisce per gli endocannabinoidi un ruolo fisiologico nel controllo del movimento e della percezione, dei processi di apprendimento e memoria, nonché nella regolazione di stati emotivi quali il piacere e l'aggressività (47).

Oltre a queste azioni dirette, è possibile ipotizzare per tali molecole endogene anche una funzione indiretta 'anti-stress', simile e complementare a quella esercitata dalle endorfine sia a livello 'centrale' che periferico. Infatti, la stimolazione dei recettori CB1 da parte degli endocannabinoidi può determinare un' azione antiemetica, antiossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria, analgesica, antispastica e stimolante dell'appetito (24).

La distribuzione dei recettori CB1 nel cervello è varia, (Fig 7), e le aree più scure sono quelle in cui si ha la maggiore densità di tali recettori. Le regioni primarie nelle quali i cannabinoidi si legano preferenzialmente sono i cosiddetti gangli basali, centri preposti al controllo della motilità involontaria. Essi comprendono: Substantia Nigra (SN), Globus Pallidus (GP), Nucleo Caudato (Caud), Putamen (Pu) (47).

Un'altra area ricca di recettori per i cannabinoidi è il cosiddetto sistema limbico. Tale sistema è coinvolto nei processi di memorizzazione e nel controllo di stati emozionali. Esso è composto da: Ippocampo (Hip), sede di importanti processi legati alla memoria, Amigdala (Am), area coinvolta nel controllo degli stati emozionali e Ipotalamo (Hy), area che svolge funzioni di controllo neuroendocrino (48, 49).

I recettori CB1 sono ben rappresentati anche nel cervelletto (Cer), la parte del sistema nervoso che controlla l'equilibrio e la coordinazione dei movimenti volontari (49). Per finire, esiste una bassa densità di recettori per i cannabinoidi in varie aree della corteccia cerebrale (50).

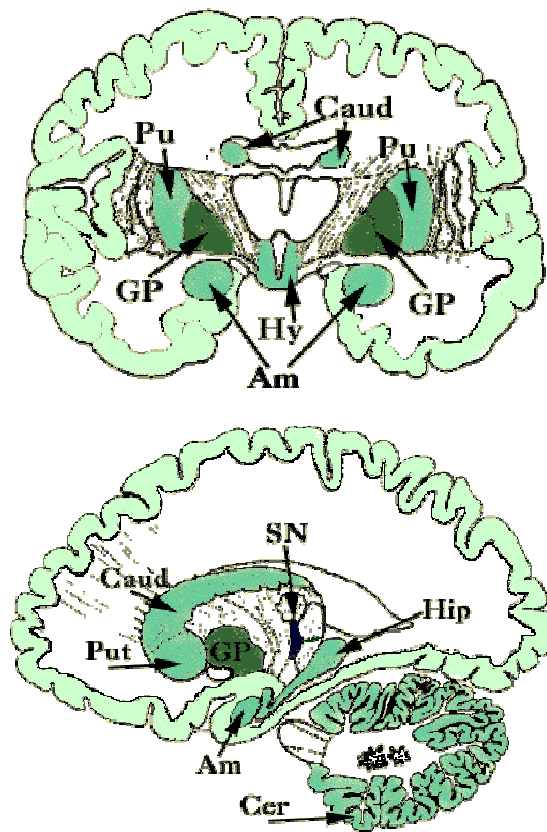


Fig. 7 Localizzazione dei recettori CB1 nel cervello.

I recettori dei cannabinoidi di tipo 1 sono presenti sui neuroni colinergici enterici e nelle cellule gangliari della sottomucosa intestinale. L'attivazione dei recettori CB1 rilassa la muscolatura liscia gastrointestinale, riduce le secrezioni e la motilità gastrointestinale (51)

I recettori CB2 sono stati scoperti nel 1993 (52), presentano una struttura molto simile a quella dei CB1, e sono anch'essi accoppiati ad una proteina G. Sono stati individuati nei macrofagi della zona marginale della milza e nelle cellule del sistema immunitario, dove sono presenti in concentrazione variabile, massima nei leucociti, che diminuisce passando attraverso le cellule B, cellule NK, monociti, neutrofili, fino ai linfociti T CD4+ e CD8+ (53). Sono espressi anche in molti altri tessuti periferici, quali: tonsille, timo, midollo osseo, pancreas, retina, reni, pelle, utero.

La stimolazione dei recettori CB2 sembra essere responsabile principalmente della azione antinfiammatoria e immunomodulatrice dei cannabinoidi (54).

Recentemente, in letteratura sono stati descritti altri recettori a cui si legano gli endocannabinoidi. GRP55 è considerato un nuovo recettore dei cannabinoidi, che agisce in maniera distinta dai recettori CB1 e CB2, presentando con loro solo il 13.5% and 14.4% di omologia, rispettivamente (55).

Anche i recettori vanilloidi agiscono come recettori per i cannabinoidi; sono un sottogruppo distinto di canali cationici non selettivi (Transient Receptor Potential Vanilloid 1 e 2: TRPV1 e TRPV2), di natura eccitatoria, coinvolti nell'interazione molecolare degli stimoli nocicettivi, e in particolare giocano un ruolo molto importante nella percezione del dolore (56).

Polimorfismi dei recettori CB1 e CB2

L'azione del sistema endocannabinoide su molteplici condizioni fisiopatologiche è, almeno in parte, determinata geneticamente. In letteratura, sono stati descritti diversi polimorfismi (SNPs) genetici a livello del sistema endocannabinoide, associati ad una varietà di condizioni fisiopatologiche umane, quali ad esempio l'abuso di droga e alcol, la schizofrenia, altri disordini mentali, ed il metabolismo energetico. In particolare, il recettore CB1 presenta diversi SNPs, tra cui il più comune è il polimorfismo 1359G→A. Questo SNP rappresenta una mutazione silente-sinonima in posizione 1359 della regione codificante del gene (esone 1), in cui una Guanina viene sostituita da una Adenina, ma tale modificazione non causa variazioni aminoacidiche, nel codone thr453Thr della sequenza

proteica del recettore CB1. E' stato dimostrato che tale polimorfismo è frequente in una coorte di soggetti tedeschi con dipendenza da alcol (57) e in pazienti schizofrenici di razza caucasica con anamnesi positiva per abuso alcolico o per sostanze stupefacenti (58).

Attualmente, il recettore CB2 presenta un solo polimorfismo genetico studiato, in posizione 188-189 AA/AA →GG/GG, che rappresenta una mutazione non sinonima nella regione codificante del gene (esone 2), in cui due Adenine adiacenti vengono sostituite da due Guanine. Tale mutazione comporta una variazione aminoacidica nel codone 63 della proteina CB2, con sostituzione di una Glutamina con una Arginina. E' stato dimostrato che tale polimorfismo è correlato ad una ridotta inibizione della proliferazione dei linfociti T indotta dagli endocannabinoidi. Pertanto, tale alterazione genetica del ruolo immunomodulatorio del sistema endocannabinoide risulta essere associata ad un maggior sviluppo di patologie autoimmuni (59).

1.2 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE E MALATTIE DEL FEGATO

Il crescente interesse per il ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione del metabolismo energetico coinvolge anche il fegato, in particolare in due campi di interesse. Il primo riguarda il ruolo dell' ECs nella sintesi epatica degli acidi grassi, considerando anche le nuove frontiere terapeutiche delle steatoepatiti non alcoliche (NASH). E' noto che CB1 promuove la lipogenesi epatica in topi obesi, con conseguente sviluppo di ipertensione portale, e quindi l'utilizzo di antagonisti selettivi di CB1 (rimonabant) può risultare efficace non solo come agente antiobesità, ma anche nella prevenzione della steatosi epatica (60). Inoltre, nelle NASH è stata dimostrata un'iper-espressione epatocellulare del recettore CB2 nei diversi stadi di malattia, rappresentando un potenziale fattore di regolazione della deposizione dei grassi, dell'infiammazione e dello sviluppo di fibrosi, durante le varie fasi di progressione della malattia (61).

Il secondo campo di interesse considera l'attivazione dell' ECs nel processo di fibrogenesi epatica. E' stato dimostrato che nel fegato sano l'espressione dei recettori CB1 e CB2 è praticamente nulla, nei diversi tipi cellulari. In fase di cirrosi, invece, si assiste ad una iper-regolazione del sistema endocannabinoide, che include sia l'aumento dei livelli degli

endocannabinoidi, sia dei relativi recettori epatici. Durante il processo di fibrogenesi epatica associata a danno epatico cronico, i miofibroblasti epatici, all'interno dei setti fibrosi, esprimono entrambe i recettori CB1 e CB2: in particolare CB1 sembra agire da mediatore pro-fibrogenico, stimolando la sintesi di TGF- β 1, citochina pro-fibrogenica, e l'accumulo di cellule α -SMA positive; mentre CB2 presenta proprietà anti-infiammatorie e anti-fibrogeniche, inducendo un ridotto accumulo di cellule fibrogeniche epatiche. Inoltre, l'espressione del recettore CB1 risulta up-regolata in un modello animale di fibrosi epatica indotta da legatura del dotto biliare (62, 63). L'uso combinato di agonisti di CB2 e antagonisti di CB1 potrebbe aprire nuovi orizzonti terapeutici per il trattamento delle malattie epatiche croniche, come già dimostrato in modelli animali di fibrosi epatica (64, 65).

1.3 BASI RAZIONALI DELLO STUDIO

La cirrosi biliare primitiva può rappresentare un buon modello sperimentale per studiare il ruolo del sistema endocannabinoide nella sua patogenesi, essendo una patologia colestatica cronica, di natura autoimmune ma ad eziologia sconosciuta.

La cirrosi biliare primitiva (CBP) è una malattia colestatica cronica del fegato, caratterizzata da infiammazione portale, distruzione progressiva immuno-mediata dei piccoli dotti biliari interlobulari, e successiva fibrosi dei dotti stessi, che sfocia nell'insufficienza epatica, rappresentando lo 0.5 -2% delle cause di cirrosi (1, 2).

La CBP è molto diffusa nel Nord Europa, con tassi di prevalenza che variano a seconda dell'area geografica considerata, con range di 19-151 casi per milione, mentre l'incidenza varia tra i 5-16 casi per milione l'anno (1, 3).

Tale malattia non è mai stata riscontrata in età pediatrica, essendo rara al di sotto dei 30 anni, tranne aneddotici casi descritti in adolescenti da Dahalan e Floreani (4, 5). La CBP colpisce prevalentemente le donne di mezza età (40-60 anni) di tutte le razze, con un rapporto medio di 10:1 a favore delle donne. Si ritiene che questa predominanza sia dovuta all'azione degli ormoni sessuali femminili, che influenzano l'esordio e la severità della malattia, con effetto modulatore sull'attività delle cellule linfocitarie (1).

Secondo alcuni studi epidemiologici, esistono dei fattori di rischio per lo sviluppo della CBP: fumo di sigaretta, infezioni urinarie, vaginali, presenza di altre malattie autoimmuni, psoriasi, tonsillectomia (3, 6).

Eziopatogenesi

La CBP è considerata una patologia immuno-mediata, ma l'eziologia e la patogenesi sono ancora sconosciute. Verosimilmente la malattia è il risultato dell'interazione tra diversi fattori, genetici ed ambientali, che intervengono nei seguenti meccanismi patogenetici (7):

a) Meccanismi immunologici. Nel 95% dei casi con CBP è riscontrabile la presenza di anticorpi antimitocondrio (AMA+), probabilmente dovuti al riconoscimento aberrante di autoantigeni mitocondriali da parte del sistema immunitario. La risposta immunitaria caratteristica della CBP è di tipo cellulo-mediata e l'infiltrato linfocitario è rappresentato da cellule T CD4+ e CD8+ attivate, con una risposta prevalentemente di tipo Th1.

Tale risposta autoimmunitaria infine provoca il danno tissutale, diretto soprattutto contro le cellule dell'epitelio biliare intraepatico (7, 8).

Gli anticorpi antimitocondrio (AMA) sono considerati non organo e non specie-specifici, ma la loro ricerca con la tecnica dell'immunofluorescenza presenta un'alta sensibilità nella cirrosi biliare primitiva (AMA positività nel 90-95% dei casi di CBP). In particolare, gli anticorpi AMA sono rivolti contro la subunità E2 del complesso piruvato deidrogenasi mitocondriale di ogni tipo cellulare, ma solo i colangiociti risultano danneggiati. Questo evento potrebbe essere dovuto ad un particolare rimaneggiamento della subunità E2 nei colangiociti durante il danno apoptotico, oppure dalle modificazioni strutturali indotte su E2 da parte di un agente esterno (infettivo o tossico) (9).

b) Predisposizione genetica. L'osservazione di un'aumentata prevalenza di autoanticorpi di vario tipo tra i parenti di pazienti con CBP e di una diversa prevalenza di questa malattia in aree geografiche differenti, ha sottolineato l'importanza di un background genetico. Infatti, sono stati osservati un'elevata prevalenza di CBP nel Nord Europa, la familiarità della malattia presente nell'1-6% dei familiari di primo grado, e l'elevata concordanza di malattia tra gemelli monozigoti (63%) (10). Inoltre, nel 70% dei parenti di pazienti con CBP è stata rilevata una disfunzione, di vario grado, del sistema

immunitario (1) in particolare, secondo Manns, la presenza di DRw8 (HLA di classe II) è un importante fattore di rischio per lo sviluppo della malattia (11), anche se non è stata dimostrata nessuna associazione con particolari alleli del sistema maggiore di istocompatibilità.

Dal punto di vista genetico, sono stati studiati altri geni, non correlati al sistema HLA, ed in particolare sono stati analizzati i polimorfismi di singoli nucleotidi dei seguenti geni (12):

- CTLA-4: marcatore espresso sulla superficie delle cellule T CD4+ e CD8+ attivate; legandosi al suo ligando CD28, CTLA4 agisce come fattore co-stimolante DELLA risposta immunitaria T mediata; suoi polimorfismi genetici sono già stati documentati per l'epatite autoimmune e per il diabete di tipo 1, e sembrano essere associati anche con la CBP (13)
- Recettore di IL-1 (IL-1 R): esistono in alcune aree geografiche varianti alleliche associate con la diversa severità della malattia (13)
- IL-10: citochina chiave nella regolazione della risposta autoreattiva delle cellule T; è stata osservata una maggiore frequenza di sue varianti alleliche nei pazienti con CBP (13)
- Recettore per la vitamina D (VDR): suoi polimorfismi sono collegati per lo più con il peggioramento della demineralizzazione ossea (osteoporosi) che di norma avviene in corso di CBP (14).

c) Tossicità degli acidi biliari. E' stato dimostrato che l'accumulo intracellulare di sali biliari conduce a colestasi, apoptosi epatocitaria e danno parenchimale. Tale fenomeno potrebbe essere la conseguenza di un'aggressione immunologica o di un alterato trasporto dei sali biliari geneticamente determinato.

d) Fattori ambientali. Diversi candidati sono stati proposti come agenti eziologici della malattia. Essi, mimando il meccanismo molecolare di risposta autoimmune caratteristica della CBP, generano alti titoli di AMA, avendo elevata omologia strutturale con gli autoantigeni mitocondriali. Tra questi fattori, ci sono:

- batteri, tra cui E. Coli, Mycobacterium tuberculosis, Borrelia Burgdorferi, Klebsiella Pneumoniae
- virus, quali MMTV e HTLV-I.

- farmaci ed agenti chimici (idrocarburi alogenati di pesticidi e detergenti), come prodotti del metabolismo epatico (9).

Clinica

E' raro un esordio acuto della malattia (15) e, al momento della diagnosi, il 50-60% dei pazienti è asintomatico (16). Le manifestazioni cliniche della malattia si sviluppano di solito tra i 35 e i 60 anni; astenia profusa e prurito sono considerati i principali sintomi associati a CBP, e appaiono come primo segno della malattia in circa il 35% dei pazienti.

Il prurito è presente nel 20-70% dei pazienti e può alterare la qualità di vita. E' localizzato o diffuso e generalmente inizia a livello della regione perianale e genitale e delle superfici palmari e plantari. Peggiora verso sera e durante la notte; è più intenso nella stagione invernale, ed è associato a secchezza cutanea. Inoltre, può causare alterazioni del ritmo sonno-veglia e disturbi psicologici, fino al desiderio di suicidio (15, 16).

La causa del prurito è ancora sconosciuta; l'osservazione della scomparsa del prurito dopo trapianto epatico ed in fase avanzata di malattia quando c'è insufficienza epatica, ha fatto presupporre l'esistenza di sostanze "pruritogene" prodotte a livello epatico.

In questo senso, sono sicuramente coinvolti i sali biliari, ma non sono gli unici responsabili. Non tutti i pazienti con colestasi sperimentano il prurito. Questo, inoltre, segue un ritmo circadiano mentre le concentrazioni dei sali biliari sono costanti. L'ipotesi più probabile al momento attuale consiste nell'aumentato tono oppioidergico, osservato nei pazienti con CBP, che causa prurito e conseguentemente stimolo al trattamento.

Questa ipotesi è supportata dall'evidenza dell'efficacia terapeutica degli antagonisti degli oppioidi, come il naloxone e il nalmefene. Gli oppioidi, in particolare le encefaline, sarebbero prodotte dalle cellule epatiche in corso di colestasi e attraverserebbero la barriera ematoencefalica mediante alcuni trasportatori come OATP (17, 18).

L'astenia: è presente nel 20-80% dei pazienti con CBP; può essere valutata con il Fisk Fatigue Severity Score (FFSS) che ha la funzione di quantificare il suo impatto sulla qualità di vita. L'ipotesi patogenetica di detto sintomo è ancora sconosciuta, ed è noto, però, che non esiste correlazione con la

severità dell'epatopatia, con lo stadio istologico, con l'età del paziente, né con l'attività fisica quotidiana o l'assunzione di acido ursodesossicolico (19).

Altri sintomi possono caratterizzare la CBP con frequenza minore:

- ittero: caratterizza in genere la fase tardiva della malattia, ma raramente può rappresentarne l'esordio, soprattutto in seguito all'assunzione di farmaci estroprogestinici o in gravidanza.
- il malassorbimento delle vitamine liposolubili,
- gli xantomi e xantelasmi,
- saltuariamente il dolore addominale.

La CBP spesso si associa ad altre patologie autoimmuni, con frequenza variabile, tra cui: sclerodermia, sindrome di Sjogren (75%), sindrome di Raynaud (25%), tiroiditi autoimmuni (45%), malattia celiaca (6%), artrite reumatoide.

Diagnosi

La diagnosi di CBP è attualmente basata su tre criteri fondamentali:

- 1) aumento degli indici di colestasi, in particolare la fosfatasi alcalina (FA),
- 2) presenza di anticorpi anti-mitocondrio (AMA+) nel siero (titolo > 1:40),
- 3) istologia epatica tipica.

La biopsia epatica si rende necessaria nei casi dubbi, per la stadiazione della malattia e per la eventuale valutazione istologica di risposta alla terapia. Le lesioni vengono classificate secondo la classificazione di Scheuer (16) che prevede quattro distinti stadi istologici, che si susseguono nel tempo con la progressione della malattia stessa, a partire dalla flogosi portale con minime lesioni biliari fino alla completa cirrosi:

- 1) *stadio I (stadio portale o delle lesioni floride)*: infiammazione del solo spazio portale con presenza di infiltrati linfoplasmocitari (granulomi o lesioni floride), costituiti da linfociti, istiociti, plasmacellule, eosinofili e cellule giganti, che infiltrano i dotti biliari interlobulari.
- 2) *stadio II (stadio peri-portale o della proliferazione duttulare)*: estensione dell'infiammazione nel parenchima peri-portale, scomparsa dei dotti biliari interlobulari, e proliferazione atipica dei piccoli dotti biliari, che diventando tortuosi e senza lume, oltrepassano la triade portale.
- 3) *stadio III (stadio settale o della fibrosi)*: predomina la fibrosi a livello

peri-portale e porto-portale, con la formazione di setti fibrosi (eventi cicatriziali connettivali) che congiungono le triadi portalì adiacenti.

4) *Stadio IV (stadio della cirrosi biliare)*: franca cirrosi con formazione di micro e macro noduli rigenerativi

Terapia

Al momento l'unico farmaco approvato dalla Food and Drugs Administration è l'acido ursodesossicolico (UDCA). Esso agisce a diversi livelli:

1. protezione dei colangiociti danneggiati dagli effetti tossici degli acidi biliari.
Tra l'altro lo UDCA stimola la trascrizione, l'inserzione e l'attivazione di alcuni trasportatori dei sali biliari, tra i quali BSEP e MRP2 (20).
2. stimolazione della detossificazione degli acidi biliari idrofobici: UDCA stimola il metabolismo di farmaci, steroidi e acidi biliari tossici.
3. protezione dell'apoptosi indotta dagli acidi biliari: inibisce il sistema Fas e induce una
MAP chinasi che avvia un segnale di sopravvivenza cellulare (21).

Diversi studi controllati hanno dimostrato l'efficacia della terapia con UDCA in termini di miglioramento dei test di laboratorio e del quadro istologico.

La frontiera di originale interesse è la patogenesi del prurito, associato a CBP: dalla letteratura è noto che l'utilizzo di antagonisti selettivi degli oppioidi migliora il prurito associato a colestasi, come dimostrato in studi clinici controllati. Tale risultato supporta l'ipotesi che gli oppioidi endogeni siano coinvolti nell'insorgenza del prurito, con un meccanismo mediato dai loro recettori (66).

Recentemente è stato dimostrato anche un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella modulazione del prurito: la somministrazione periferica di un agonista selettivo di CB1 (HU210) riduce il prurito indotto da istamina, attenuando l'eccitazione delle fibre nervose cutanee (67).

Inoltre, l'utilizzo di un agonista sintetico dei cannabinoidi, selettivo per CB2 (WIN 55, 212-2) è stato visto svolgere un'azione antinocicettiva sul prurito, aumentando la soglia di percezione del prurito stesso, come dimostrato in ratti con colestasi indotta; tale dato supporta la possibilità di un nuovo

approccio al trattamento del prurito in pazienti con patologie epatiche di tipo colestatico (68).

In corso di colangiopatie, la perdita dei dotti biliari è controbilanciata da un meccanismo di proliferazione compensatoria dei colangiociti, che cerca di rallentare il decorso della malattia. In queste condizioni patologiche, i colangiociti proliferanti mostrano un'aumentata attività secretoria, producendo e secernendo diverse citochine, fattori di crescita, neuropeptidi ed ormoni, attraverso i quali si instaura un cross-talk tra i colangiociti e le altre cellule parenchimali e mesenchimali epatiche (69).

Recentemente infatti, è stato dimostrato che, in corso di colangiopatie croniche, i colangiociti proliferanti acquisiscono il fenotipo di cellule "neuroendocrine" e secernendo numerose sostanze (citochine, fattori di crescita, ormoni, neuropeptidi), costituiscono all'interno del fegato un vero e proprio "compartimento neuroendocrino".

E' noto che gli oppioidi endogeni modulano i meccanismi di crescita cellulare, e di recente è stata dimostrata un' attivazione del sistema oppioidergico in corso di colestasi. In queste condizioni, i colangiociti dell'epitelio biliare mostrano una maggiore espressione dell'mRNA per i peptidi oppioidi, a testimonianza dell'aumentata sintesi di tali neuropeptidi da parte di colangiociti stessi. E' stato pertanto ipotizzato che il sistema oppioidergico intervenga nell'omeostasi cellulare dell'epitelio biliare, per limitare l'eccessiva proliferazione colangiocitaria in risposta al danno colestatico (70).

2. SCOPI

Gli obiettivi del presente studio sono stati:

- 1) valutare se il sistema endocannabinoide è attivato nella cirrosi biliare primitiva.
- 2) valutare se mutazioni genetiche puntiformi (polimorfismi), presenti sui geni per i recettori dei cannabinoidi, possano determinare differenti fenotipi di malattia, in termini di associazione con il prurito o con la risposta alla terapia con UDCA.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI, CONTROLLI E RELATIVI CAMPIONI

Per lo studio dell'espressione tissutale dei recettori dei cannabinoidi sono stati considerati i seguenti campioni bioptici, tagliati in sezioni di 5 µm di spessore:

- campioni paraffinati di fegato appartenenti a 9 pazienti con CBP (stadio IV)
- campioni paraffinati di fegato sano (con architettura preservata e assenza di colestasi, statosi, epatite, fibrosi e cirrosi) provenienti da 2 soggetti di controllo.
- campioni di tessuto paraffinato utilizzati come controlli positivi per l'analisi della localizzazione dei recettori CB1 e CB2: 3 campioni di cervelletto umano per CB1 e 3 campioni di milza umana per CB2.

La ricerca dell'mRNA dei recettori CB1 e CB2 è stata effettuata su:

- campioni di fegato, ciascuno proveniente da pazienti con diagnosi di CBP a diversi stadi istologici di malattia (1 pz stadio I, 2 pz stadio II, 1 pz stadio IV).
- campioni di tessuto epatico proveniente da 2 soggetti di controllo.
- linee cellulari utilizzate come controlli positivi: SPACT (linea cellulare di neuroblastoma umano) per CB1, e Jurkat (linea cellulare di linfoma umano) per CB2.

Tutti i campioni di tessuto epatico sono stati congelati in azoto liquido al momento del prelievo e conservati a -80°C.

Per lo studio del sequenziamento genico di CB1 e CB2 è stata reclutata la seguente casistica:

- 68 pazienti con CBP appartenenti ad una casistica italiana (afferenti all'ambulatorio epatologico, Università degli studi di Padova). Le caratteristiche clinico-demografiche di suddetti pazienti erano le seguenti: 63 femmine e 5 maschi; età media $63,6 \pm 11,5$ anni; BMI $24,15 \pm 4,6$; stadio istologico di malattia: stadio I 4 pz., stadio II 19 pz., stadio III 26 pz., stadio IV 19 pz.
- 70 controlli sani (donatori di sangue) comparabili per età, sesso ed area geografica alle CBP italiane.

- 84 pazienti con CBP residenti negli Stati Uniti.

I dati relativi alla presenza del sintomo prurito derivano dall'intervista al paziente, in sede di visita ambulatoriale, e sono stati disponibili sia per la popolazione di studio italiana che statunitense.

Tale studio è stato approvato dal Comitato Etico locale e dal Western Institutional Review Board negli Stati Uniti.

La diagnosi di CBP è stata posta secondo i criteri clinici, immunologici ed istologici. In particolare tutti i pazienti hanno soddisfatto i criteri standard per CBP: 1) positività di anticorpi anti-mitocondrio (AMA>1:40) con metodica di immunofluorescenza; 2) istologia diagnostica o compatibile con CBP secondo la classificazione di Scheuer; 3) aumento della fosfatasi alcalina almeno 1.5 volte la norma.

I dati clinici sono stati raccolti in una banca dati.

Per ogni paziente e soggetto di controllo sono stati raccolti mediante prelievo venoso 15 ml di sangue intero e conservati a -20°C.

3.2 METODI

Analisi immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata eseguita nel laboratorio di Anatomia Microscopica del Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana su sezioni di tessuto paraffinate, di 5 µm di spessore, secondo la metodica standard riportata brevemente di seguito:

- Deparaffinatura delle sezioni attraverso lavaggi successivi con Xilene (15 minuti) e scala decrescente degli alcoli (alcool 100%, alcool 95%, alcool 80%), 5 minuti ciascuno
- Smascheramento dell'antigene con tampone citrato (pH 6), 30 minuti a 96°C, e successivo raffreddamento delle sezioni
- Incubazione con 0.3% H₂O₂, 10 minuti a temperatura ambiente
- Incubazione con 5% normal blocking serum, 30 minuti a temperatura ambiente in camera umida
- Incubazione con anticorpi primari, monoclonali, un'ora a 37°C, diretti contro gli antigeni CB1 e CB2:
 - CB1 Receptor C-term Polyclonal Antibody, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA): diluizione 1:200 in normal blocking serum

- CB2 Receptor C-term Polyclonal Antibody, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA): diluizione 1:50 in normal blocking serum
- Incubazione con anticorpi secondari biotinilati coniugati con polimeri di perossidasi (ImmPRESS Universal Antibody (anti-mouse Ig/anti-rabbit Ig, peroxidase) Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 30 minuti a temperatura ambiente.
- Incubazione con 3-3' diaminobenzidina (DAB, Dako, Glostrup Denmark), 1 minuto a temperatura ambiente
- Controcolorazione con ematossilina per 1 minuto a temperatura ambiente, per evidenziare i nuclei cellulari
- Disidratazione tramite lavaggi successivi con la scala crescente degli alcoli (alcool 80%, alcool 95%, alcool 100%), 5 minuti ciascuno, Xilene 15 minuti e successivo montaggio del vetrino coprioggetto.

Sono stati utilizzati controlli positivi e negativi per riconoscere colorazioni aspecifiche e artefatti in ogni seduta di immunoistochimica: i controlli negativi sono stati processati omettendo l'incubazione con l'anticorpo primario, per identificare i falsi positivi (controllo di specificità).

La valutazione semi-quantitativa della immuno-reattività per CB1 e CB2 è stata effettuata analizzando una sezione per ogni campione di tessuto epatico processato, in maniera indipendente e casuale da parte di due operatori, mediante l'utilizzo di un microscopio ottico (LEICA DM 4500 B), collegato ad una telecamera (LEICA DFC 320).

Il grado di positività cellulare alla reazione immunoistochimica è stato stabilito, esaminando 10 campi ottici per ogni sezione e osservando tutti i diversi tipi cellulari presenti nei campioni di tessuti epatici, comprendenti cellule di natura parenchimale e cellule di origine non parenchimale.

I risultati sono stati espressi in termini di immuno-reattività, mediante uno score semiquantitativo per i seguenti parametri:

- numero di cellule positive
- pattern di espressione subcellulare (nucleare, citoplasmatica, nucleocitoplasmatica)
- intensità del segnale (-- = assente, + = debole, ++ = marcata).

Analisi RT-PCR semiquantitativa

L'analisi dell'RNA messaggero (m-RNA) dei recettori CB1 e CB2 è stata effettuata in collaborazione con l'Istituto di ricerca Research & Innovation S.p.A di Padova, mediante le seguenti procedure:

1- Estrazione dell'RNA totale:

l'RNA totale è stato estratto dai campioni utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen, Milano, Italia). L'integrità dell'RNA è stata esaminata mediante elettroforesi su gel di agarosio (1%) contenente bromuro di etidio.

2- Retrotrascrizione e amplificazione del c-DNA:

L'espressione dell'RNA messaggero per PBGD umana (human porphobilinogen deaminase, house keeping gene) e per i recettori CB1 e CB2 è stata analizzata mediante retrotrascrizione e successiva amplificazione dei campioni di c-DNA (RT-PCR). L'mRNA è stato retrotrascritto usando oligo dT come primers.

3- Amplificazione del c-DNA mediante PCR:

E' stato utilizzato il kit Real Time Fluo Probe della Star Tech secondo le istruzioni fornite dal fornitore (dUTP buffer 1X, 1U taq polimerasi, 10U Uracil-N-Glicosilasi, primer/probe 90/10 nM volume finale di reazione 25ul). La termociclazione consta in 2min 50°C (1X); 15min 95°C (1X); 15sec 95°C e 1min 59°C (45X). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

4- Primers utilizzati

Per l'amplificazione delle regioni codificanti dei geni CB1 e CB2 e dell'house keeping gene sono state utilizzate coppie di primers specifici, le cui sequenze sono state fornite dall'Istituto "Research & Innovation".

Sequenziamento genico

La ricerca dei polimorfismi genetici (SNPs: 1359G/A per CB1; 188-189 AA/GG per CB2) è stata eseguita mediante le seguenti procedure:

1- Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata a partire da 2 ml di sangue intero conservato in EDTA. Si è proceduto all'estrazione del DNA dai leucociti periferici con metodica Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega ,Milano, Italia) in accordo al protocollo fornito dal produttore.

Il DNA estratto è stato sottoposto a controllo quantitativo e qualitativo. La concentrazione del DNA estratto è stata determinata mediante la misura della densità ottica (D.O) alla lunghezza d'onda di 260 nm applicando la legge di Lambert-Beer ($D.O.260 \times 50 \mu g/ml \times 50$). Indicativamente da 2 ml di sangue si possono ottenere concentrazioni di DNA comprese tra 50 e 250 $\mu g/ml$. Il controllo qualitativo serve, invece, per valutare il grado di contaminazione proteica del DNA. A tal fine si esegue la misura della densità ottica anche

a 280nm. Affinché il DNA estratto abbia un buon grado di purezza, il rapporto $D.O.260/D.O.280$ deve essere compreso tra 1.7 e 1.9.

2- Amplificazione del DNA mediante PCR.

La polymerase chain reaction (PCR) consente di utilizzare un numero elevato di copie di una determinata sequenza nucleotidica a partire da una doppia elica di DNA che funge da stampo.

Le soluzioni di PCR per l'amplificazione delle regioni codificanti dei geni CB1 e CB2 sono state preparate secondo il seguente schema:

PCR MIX:

Gene CB1		Gene CB2	
<i>Componenti</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Componenti</i>	<i>Volume (μl)</i>
Master Mix	25	Master Mix	25
H ₂ O	22	H ₂ O	23
Primer Forward (10 μM)	1	Primer Forward (10 μM)	0.5
Primer Reverse (10 μM)	1	Primer Reverse (10 μM)	0.5
DNA	1	DNA	1
Final Volume	50	Final Volume	50

I campioni così preparati sono stati sottoposti a numerosi cicli di amplificazione grazie all'utilizzo di un termociclatore (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer Inc; Boston, Massachusetts, USA).

Le temperature di denaturazione, annealing ed estensione ed i relativi cicli sono stati i seguenti:

Gene CB1			Gene CB2		
<i>N° cicli</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>N° cicli</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>
1	95	10	1	94	5
40	95	0.30	40	94	0.30
	61	0.30		55	0.30
	72	0.30		72	0.30
1	72	10	1	72	7

3- Primers utilizzati

Per l'amplificazione delle regioni codificanti dei geni CB1 e CB2 sono state utilizzate le due seguenti coppie di primers:

Gene CB1: F: 5'- CTGAGGAGTAAGGACCTGCG -3'

R: 5'- TCTTTTCCTGTGCTGCCAG -3'

Gene CB2: F: 5'- CTGAGGAGTAAGGACCTGCG -3'

R: 5'- CTGAGGAGTAAGGACCTGCG - 3''

I primers utilizzati sono stati ottenuti dalla letteratura, desunti da studi precedenti. Hanno tutti una lunghezza compresa tra i 20 e i 30 nucleotidi, Si è evitato di utilizzare primers più corti per ridurre al minimo il rischio di appaiamenti spuri con regioni di DNA ad omologia parziale.

Per verificare se l'amplificazione dei geni CB1 e CB2 è avvenuta correttamente, gli amplificati di DNA sono stati separati mediante elettroforesi, utilizzando la tecnologia Lab-on-a-Chip (2100-Bioanalyzer, Agilent Technology Italia S.p.a., Milano , Italia).

Successivamente i prodotti di DNA sono stati purificati utilizzando microfiltri (Microcon, Millipore S.p.a., Milano, Italia).

4- Sequenziamento degli ampliconi

L'amplificazione delle sequenze geniche di interesse è stata eseguita con metodiche standard (ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) secondo le condizioni indicate di seguito.

PCR MIX :

Gene CB1 – Gene CB2	
<i>Componenti</i>	<i>Volume (μl)</i>
H ₂ O millipore	2.5
Buffer 5x	1.5
Primer Forward (1 μ M)	1.0
Big Dye Terminator v3.1	1.0
DNA (purificato)	4.0
Volume finale	10

Condizioni di amplificazione:

Gene CB1 – Gene CB2		
<i>N° cicli</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>
1	94	4
35	96	0.10
	50	0.05
	60	4
1	4	7

I prodotti finali della seconda amplificazione sono stati denaturati secondo procedure standard, prima di procedere alla lettura delle sequenze geniche amplificate mediante sequenziatore automatico (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando i software SPSS 13.0 (Microsoft, Chicago, IL, USA) ed EPI 6.04 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).

Per i pazienti italiani con CBP sono stati analizzati i seguenti parametri con l'analisi univariata: presenza di prurito, risposta alla terapia con UDCA, età, stadio istologico di malattia, Mayo Score, BMI, presenza astenia, sindrome secca, patologie autoimmuni associate, AMA, AST/ALT, γ GT, FA, bilirubina, colesterolo, albumina, tempo di protrombina (PT), IgG, IgA, IgM.

Risposta positiva alla terapia con UDCA è stata considerata quando veniva ottenuta una riduzione del 40% della fosfatasi alcalina, entro 12 mesi dall'inizio della terapia.

L'analisi delle associazioni tra variabili è stata condotta mediante l'utilizzo del test del χ -quadro (χ^2) con le correzioni di Mantel-Haenszel e l'analisi della varianza ad una via (ANOVA ONE WAY).

Il possibile effetto confondente delle diverse caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei soggetti arruolati per lo studio genetico è stato rimosso mediante analisi multivariata, nella quale la variabile dipendente è rappresentata dalla presenza di mutazione per i geni CB1 o CB2.

I risultati riguardanti l'analisi immunoistochimica dell'espressione tissutale sono stati elaborati mediante il test del χ -quadro (χ^2).

Le differenze sono state considerate significative per valori di $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 ESPRESSIONE TISSUTALE DEI RECETTORI CB1 E CB2

Per quanto riguarda l'espressione tissutale del recettore CB1 (Tab.1):

- nei campioni con CBP è stata riscontrata un'elevata densità recettoriale, testimoniata da una intensa immunoreattività citoplasmatica a livello degli epatociti del parenchima (+: 2/9, 22%; ++: 7/9, 78%) e una moderata positività nei colangiociti proliferanti dell'epitelio biliare (biliary epithelial cells o BECs) (+: 4/9, 44%; ++: 5/9, 56%). Inoltre, sono risultate positive alla reazione anticorpale, le cellule di Kupffer (+: 4/9, 44%; ++: 5/9, 56%), presenti sia nei sinusoidi epatici, sia all'interno dei tralci fibrosi, in particolare a livello delle aree di infiammazione. L'endotelio dei vasi, presenti a livello portale, non ha mostrato nessuna immunoreattività (--: 9/9, 100%). I tralci fibrosi, costituiti dalle altre cellule di tipo non-parenchimale, sono risultati complessivamente negativi (--: 9/9, 100%) alla reazione anticorpale (Fig.8).
- i campioni di fegato sano hanno mostrato debole positività epatocitaria (+: 2/2, 100%) di tipo citoplasmatico, diffusa a tutto il parenchima. A livello degli spazi portalì l'endotelio dell'arteriole e venule sono risultati negativi (--: 2/2, 100%), mentre i dotti biliari di grosso e piccolo calibro, presenti a livello portale, apparivano negativi o debolmente positivi (--: 1/2, 50%; +: 1/2, 50%), con immunoreattività citoplasmatica dei colangiociti. Non è stata trovata nessuna positività nucleare. Le altre cellule di origine non-parenchimale non presentavano reattività all'anticorpo anti CB1 (--: 2/2, 100%) (Fig.8).

CB1	Localizzazione istologica				
	epatociti	colangiociti	cell. Kupffer	cell. stellate/ miofibroblasti	cell. endoteliali
CBP (n°9)	+: 22%	+: 44%	+: 44%	--: 100%	--: 100%
	++: 78%	++: 56%	++: 56%		
Fegato sano (n°2)	+: 100%	--: 50% +: 50%	--: 100%	--: 100%	--: 100%

Tab. 1 Espressione epatica del recettore CB1 nei diversi distretti cellulari, in campioni di CBP e di fegato sano.

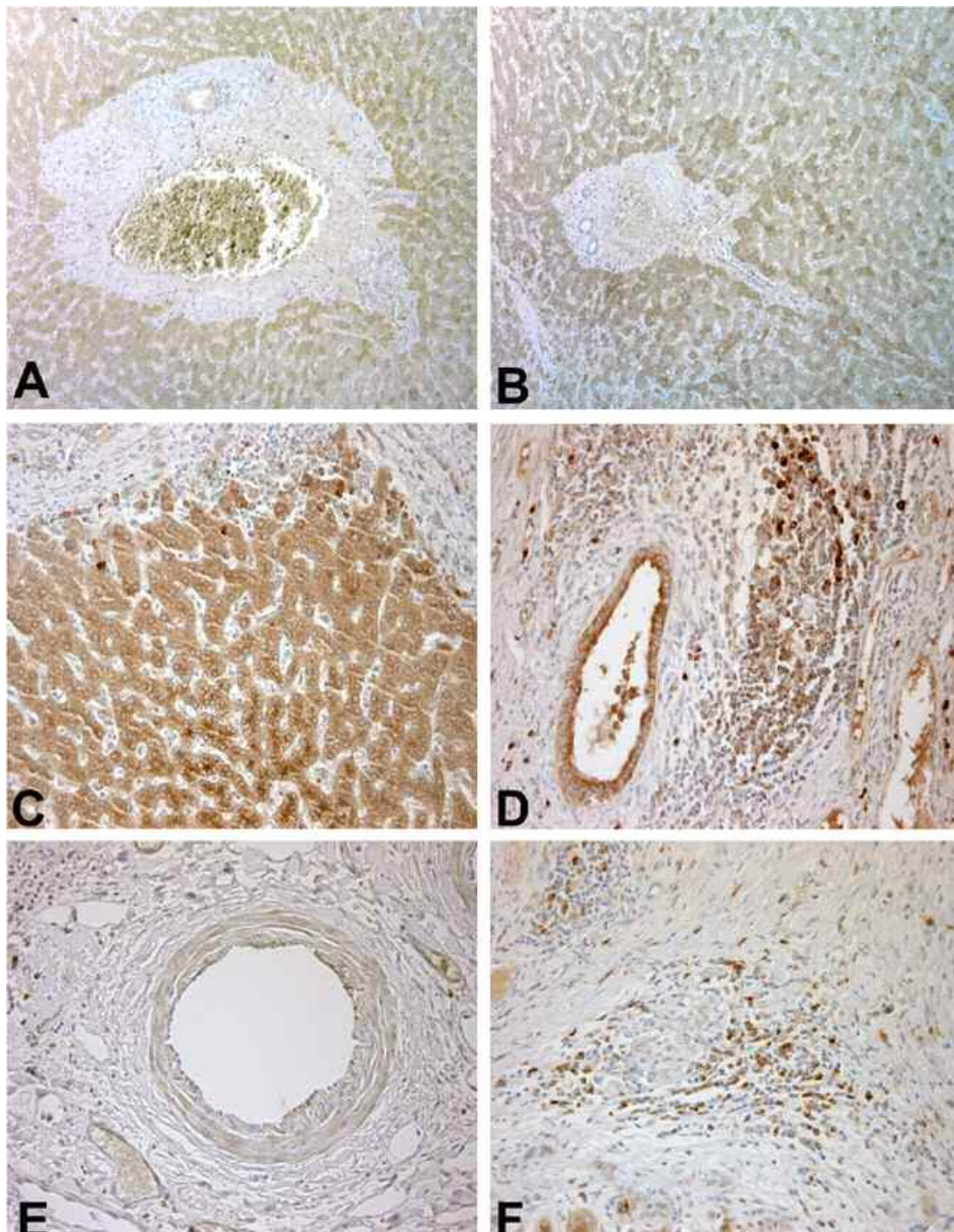


Fig.8 Espressione epatica del recettore CB1. L'immunoreattività cellulare per CB1 è presente a livello citoplasmatico, nei diversi distretti cellulari. Fegato sano: **(a, b)** epatociti (parenchima) e spazio portale (colangiociti dei dotti biliari, endotelio dei vasi) (10X). Cirrosi biliare primitiva: **(b)** epatociti (parenchima) (20X), **(d)** colangiociti (dotti biliari) (20X), **(e)** cellule endoteliali (vasi sanguigni) (20X), **(f)** cellule Kupffer (sinusoidi e tralci fibrosi), (20X).

Per quanto riguarda l'espressione tissutale del recettore CB2 (Tab. 2):

- tutti i campioni di CBP presentavano invece una intensa immunoreattività citoplasmatica (+: 2/9, 22%; ++: 7/9, 78%) a livello degli epatociti del parenchima e nelle BECs. I tralci fibrosi che delimitano gli spazi di parenchima sono risultati complessivamente negativi (--: 100%) alla reazione anticorpale, come anche l'endotelio dei vasi (--: 100%), e tutte le cellule di tipo non parenchimale presenti nelle sezioni (--: 100%) (Fig.9).

- i campioni di fegato sano hanno mostrato debole (+: 2/2, 100%) positività epatocitaria citoplasmatica, diffusa a tutto il parenchima. Negli spazi portali, l'endotelio dei vasi è risultato negativo (--: 2/2, 100%), mentre i dotti biliari di grosso e piccolo calibro, presenti a livello portale, apparivano negativi o debolmente positivi (--: 1/2, 50%; +: 1/2, 50%), con immunoreattività citoplasmatica dei colangiociti. Non è stata trovata nessuna positività nucleare. Le cellule di origine non-parenchimale non presentavano reattività all'anticorpo anti CB1 (--: 2/2, 100%) (Fig.9).

CB2	<i>Localizzazione istologica</i>				
	epatociti	colangiociti	cell. Kupffer	cell. stellate/ miofibroblasti	cell. endoteliali
<i>CBP</i> <i>(n°9)</i>	+: 22% ++: 78%	+: 22% ++: 78%	--: 100%	--: 100%	--: 100%
<i>Fegato</i> <i>sano (n°2)</i>	+: 100%	--: 50% +: 50%	--: 100%	--: 100%	--: 100%

Tab. 2 Espressione epatica del recettore CB2 nei diversi distretti cellulari, in campioni di CBP e di fegato sano.

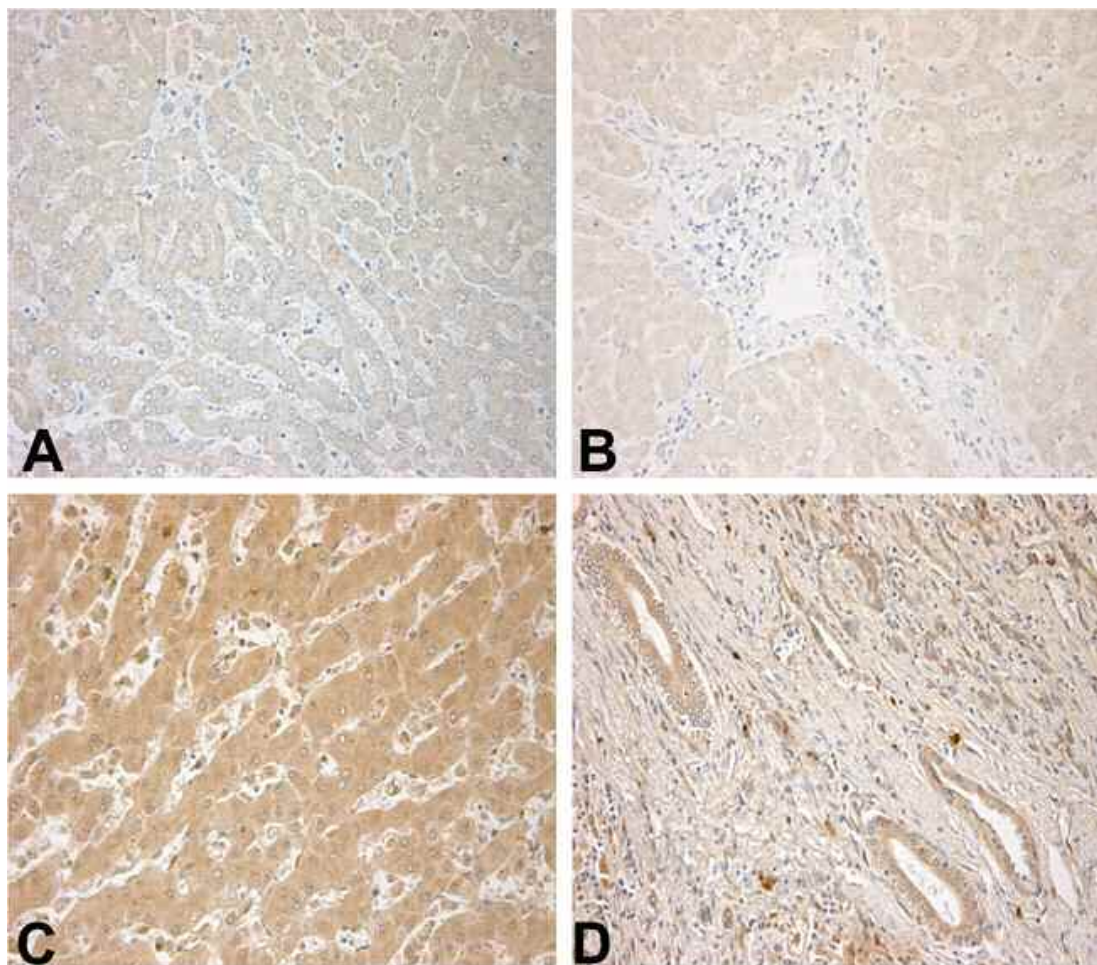


Fig.9 Espressione epatica del recettore CB2. L'immunoreattività cellulare per CB2 è presente a livello citoplasmatico, nei diversi distretti cellulari. Fegato sano: **(a)** epatociti (parenchima) (10X), **(b)** spazio portale (colangiociti dei dotti biliari, endotelio dei vasi) (20X). Cirrosi biliare primitiva: **(b)** epatociti (parenchima) (20X), **(d)** colangiociti (dotti biliari) (20X).

4.2 ESPRESSIONE DELL'mRNA DEI RECETTORI CB1 E CB2

L'analisi dell'espressione dell'mRNA dei recettori CB1 e CB2, mediante RT-PCR, ha permesso di ottenere la quantità relativa dell' RNA messaggero calcolando la quantità di ampliconi formati nel corso della reazione, dopo aver effettuato la normalizzazione rispetto al segnale dell'house keeping gene.

La variabilità di espressione dell'mRNA dei recettori CB1 e CB2, espressi nei campioni epatici sia di CBP, sia nel fegato normale, non permette di dimostrare un'iperregolazione trascrizionale dei recettori CB1 e CB2 in fase di malattia col estatica (Fig.10).

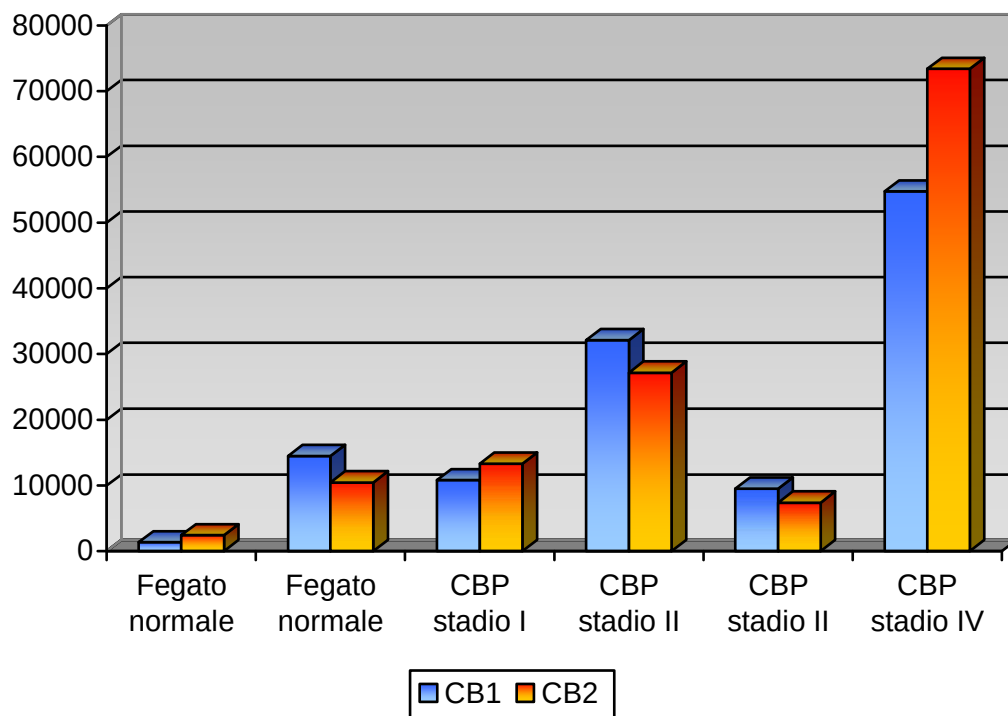


Fig. 10. Quantità relativa di espressione dell'mRNA dei recettori CB1 e CB2 (asse Y), nei diversi campioni epatici di cirrosi biliare primitiva (diversi stadi di malattia) e di fegato normale.

4.3 POLIMORFISMI GENICI DEI RECETTORI CB1 E CB2

L'analisi del polimorfismo 1359 G/A del gene CB1 è stata effettuata su 68 pazienti italiani affetti da CBP, 70 controlli comparabili per età e sesso ai precedenti, e 84 pazienti statunitensi affetti da CBP.

La distribuzione del polimorfismo nel gruppo di pazienti con CBP, italiani e statunitensi, è risultata sovrapponibile a quella stabilita nel gruppo di controllo. CB1 SNP (1359 G/A) è presente nel 26.5% dei pz. italiani con CBP, nel 22.9% dei soggetti di controllo sani, e nel 27.4% dei pz americani con CBP ($p=n.s.$) (Fig.11).

E' stata valutata anche la possibile correlazione tra il polimorfismo 1359G/A e il sintomo prurito: i pazienti con CBP, italiani ed americani, sono stati stratificati in base alla presenza o meno di prurito e per questi è stata determinata la frequenza della mutazione puntiforme del gene CB1 nei due gruppi. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella distribuzione del polimorfismo in associazione con il prurito, come di seguito illustrato (Fig. 12, 13).

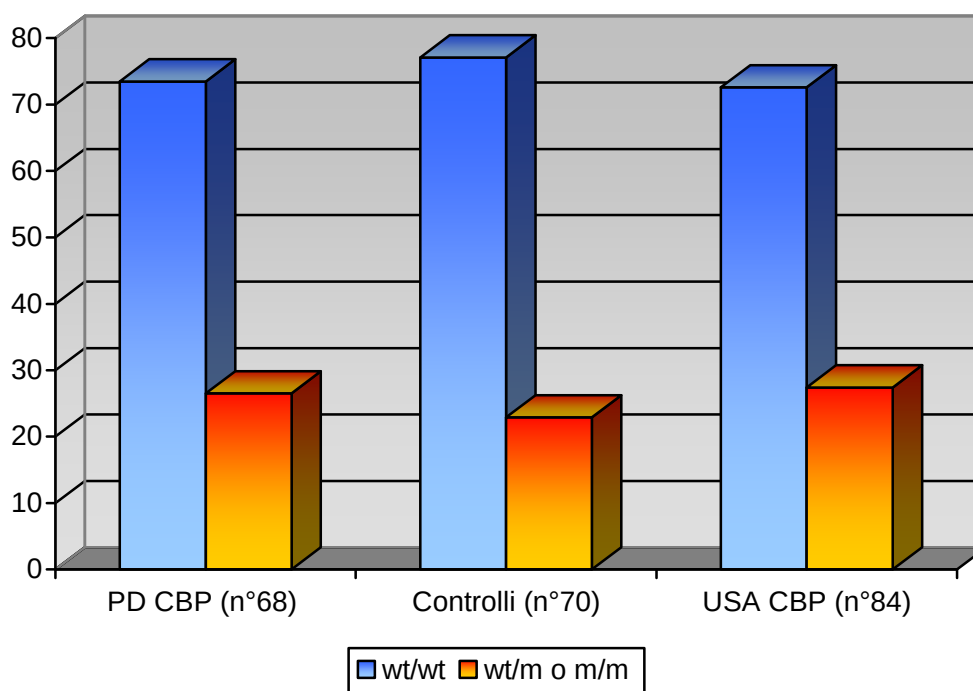


Fig. 11 Frequenza (%) del polimorfismo 1359G/A nei pazienti con CBP italiani (PD) e statunitensi (USA) e nei controlli (wt/wt=wild type, wt/m=eterozigote, m/m=omozigote mutato) ($p=ns$).

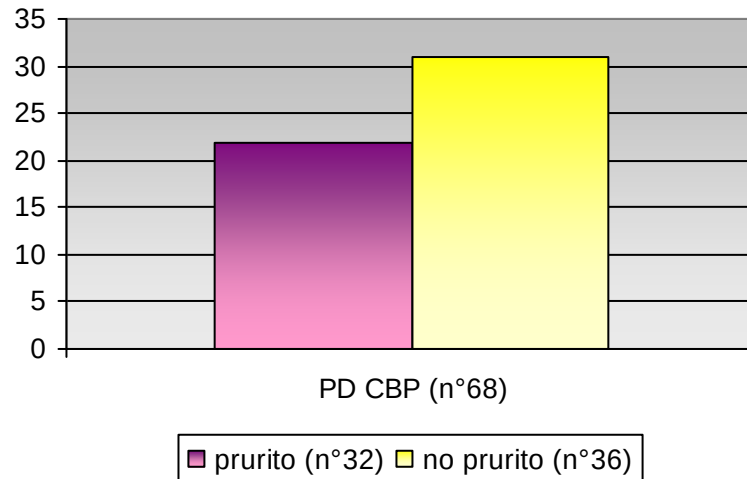


Fig. 12 Frequenza (%) del polimorfismo 1359G/A (wt/m o m/m) nei pazienti con CBP italiani (PD) con e senza prurito (p=ns).

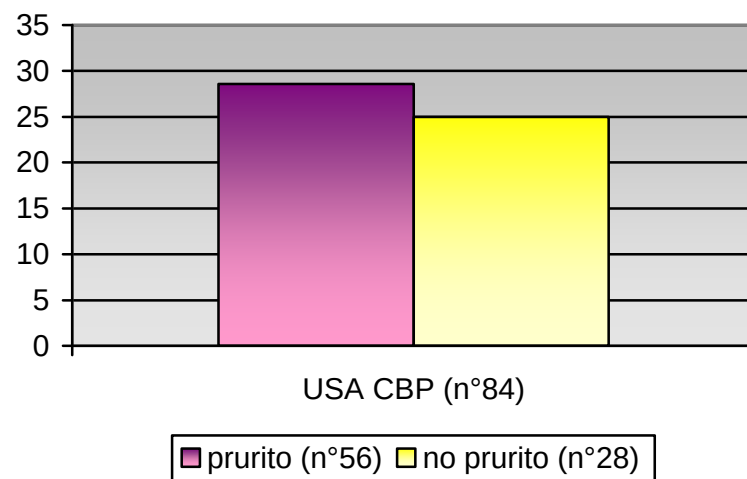


Fig. 13 Frequenza (%) del polimorfismo 1359G/A (wt/m o m/m) nei pazienti con CBP statunitensi (USA) con e senza prurito (p=ns).

L'analisi statistica delle associazioni tra le caratteristiche epidemiologiche-cliniche dei pazienti italiani con CBP e la presenza del polimorfismo 1359G/A, ha messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa tra la presenza della mutazione del gene CB1 (wt/m o m/m) e:

1) lo stage di malattia, evidenziato da un trend di progressione del danno istologico (stage istologico I = 0%, II = 10,5%, III = 30,8%, IV = 42,1%) nei soggetti portatori del polimorfismo (p=0,01) (Fig.14);

2) la risposta alla terapia con UDCA, in cui la frequenza dei pazienti “non responders” è maggiore (34,9%) rispetto a quella dei soggetti “responders” (12%), nel gruppo di soggetti portatori della mutazione ($p=0,04$). (Fig 15)

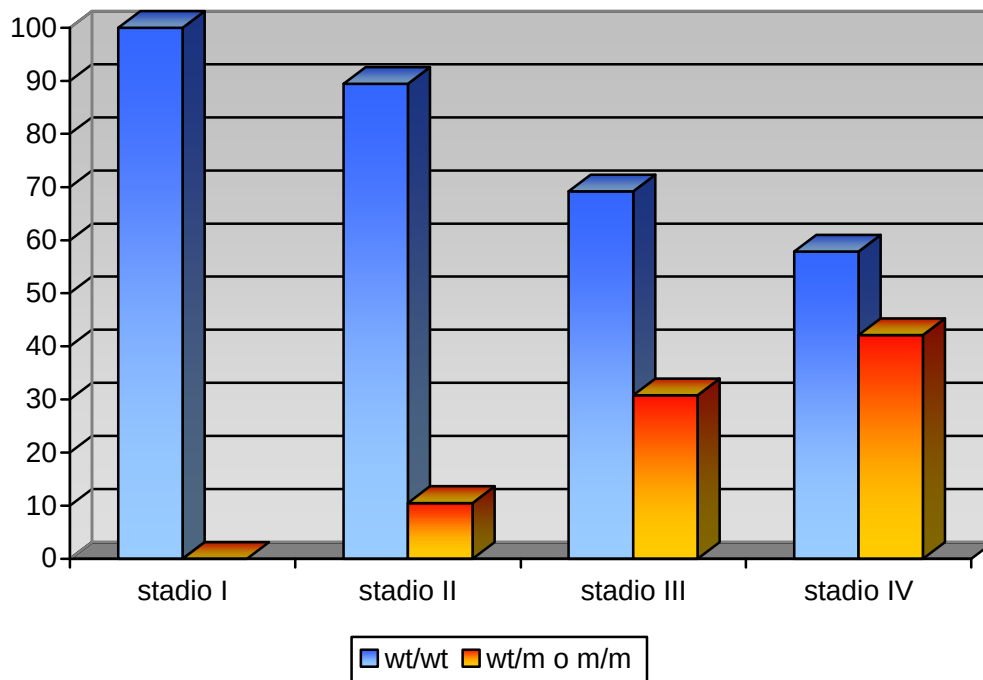


Fig. 14 Trend di progressione del danno istologico (%) nei pazienti italiani con CBP, associato alla presenza di mutazione (wt/m o m/m) ($p=0,05$)

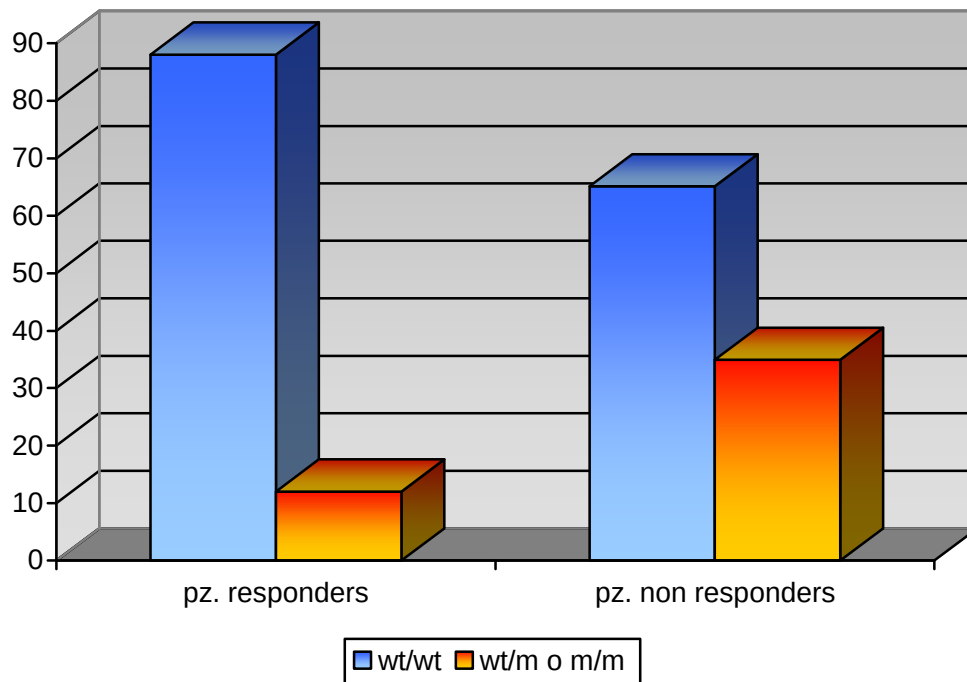


Fig. 15 Risposta alla terapia con UDCA, nei pazienti italiani con CBP, in associazione alla presenza di mutazione (wt/m o m/m) ($p=0,039$).

Tutte le altre variabili esaminate non sono risultate correlate in maniera statisticamente significativa con la presenza della mutazione del gene CB1 ($p=ns$)

L'analisi multivariata ha confermato che tra le caratteristiche indipendentemente associate alla presenza della mutazione (wt/m o m/m) del gene CB1 sono risultate essere:

- 1) direttamente correlate, lo stage istologico di malattia, con un aumento del rischio pari a 6,25 volte ogni incremento di un grado di danno istologico (adjusted OR = 6,25; 95% CI= 0,997-39,288; $p=0,05$);
- 2) inversamente correlate, la risposta al trattamento con UDCA, dimostrando una ridotta efficacia della terapia nel rallentare la progressione della malattia stessa (adjusted OR = 0,04; 95% CI= 0,002-0,708; $p=0,028$).

L'analisi del polimorfismo 188-189 AA/GG del gene CB2 è stata effettuata su 49 pazienti italiani affetti da CBP, 50 controlli comparabili per età e sesso ai precedenti, e 56 pazienti statunitensi affetti da CBP.

La distribuzione del polimorfismo nel gruppo di pazienti con CBP, italiani e statunitensi, è risultata sovrapponibile a quella definita nel gruppo di controllo. CB2 SNP (188-189 AA/GG) è presente nel 24.4% vs 30.4% dei pz. con CBP italiani ed americani, rispettivamente, e nel 28% dei soggetti di controllo ($p=n.s.$) (Fig. 16).

Nel gruppo di pazienti italiani con CBP, l'analisi statistica (univariata e multivariata) non ha messo in evidenza differenze statisticamente significative nella distribuzione del polimorfismo 188-189 AA/GG del gene CB2 in associazione con il prurito (Fig. 17, 18) e con le altre caratteristiche cliniche ($p=ns$).

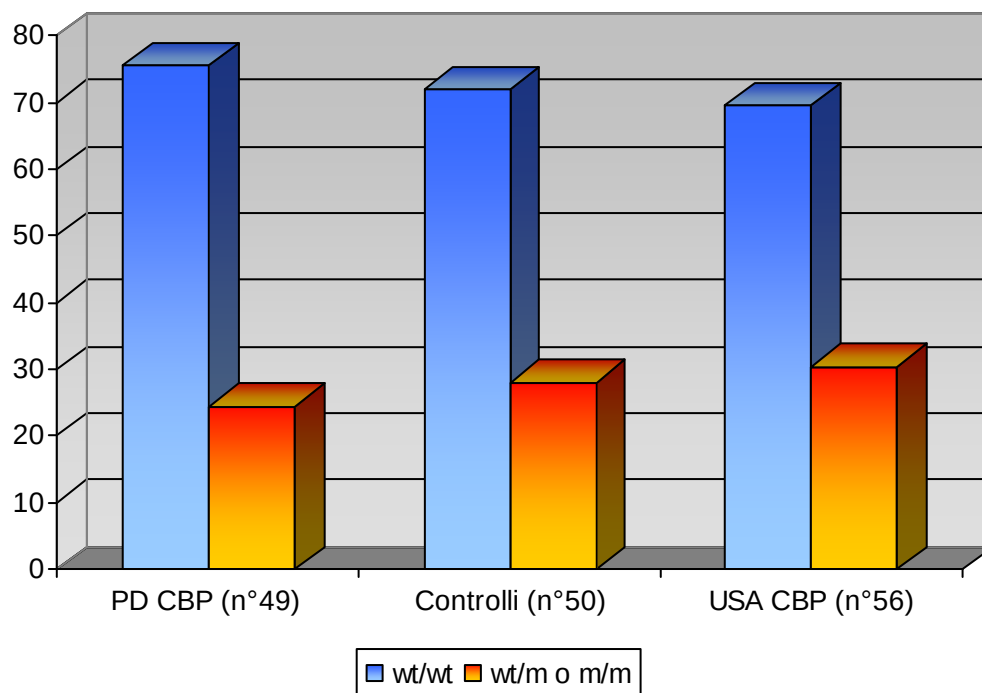


Fig.16 Frequenza (%) del polimorfismo 188-189 AA/GG nei pazienti con CBP italiani (PD) e statunitensi (USA) e nei controlli (wt/wt=wild type, wt/m=eterozigote, m/m=omozigote mutato) ($p=ns$).

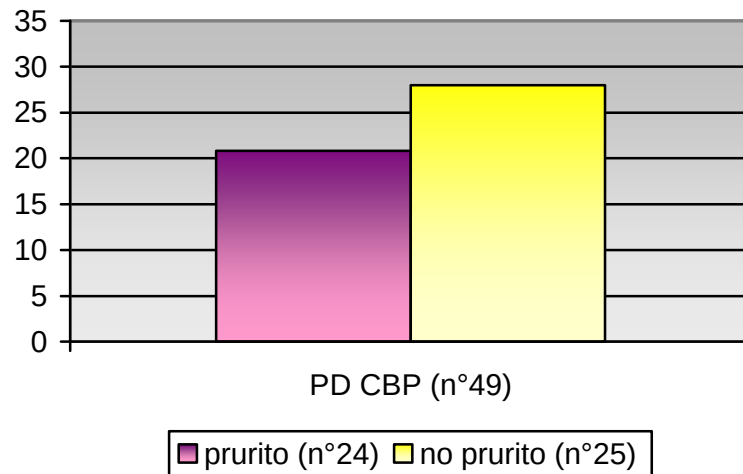


Fig.17 Frequenza (%) del polimorfismo 188-189 AA/GG (wt/m o m/m) nei pazienti con CBP italiani (PD) con e senza prurito (p=ns).

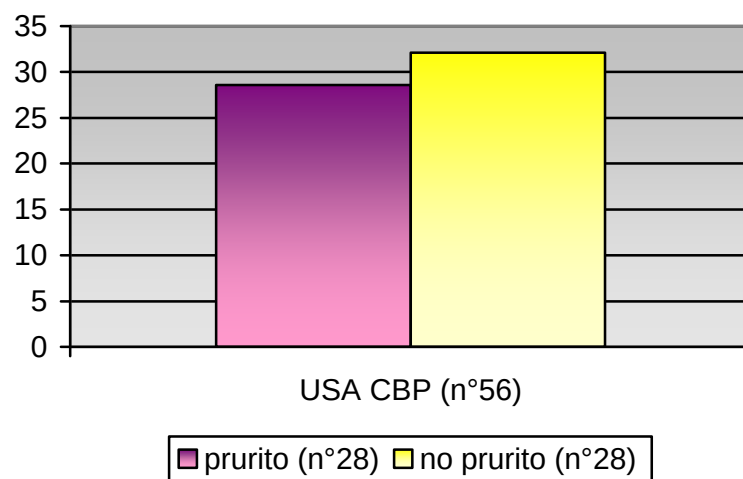


Fig. 18 Frequenza (%) del polimorfismo 188-189 AA/GG (wt/m o m/m) nei pazienti con CBP italiani (PD) e statunitensi (USA) con e senza prurito (p=ns).

5. DISCUSSIONE

L'interesse per lo studio del sistema endocannabinoide (ECs) come mediatore delle malattie epatiche, è di recente introduzione, spaziando dalle steatoepatiti non alcoliche (NAFLD), alla patogenesi della fibrosi epatica, fino all'ipertensione portale.

Finora nessuno studio ha preso in considerazione il ruolo del sistema endocannabinoide nelle colestasi. La cirrosi biliare primitiva (CBP) è una malattia colestatica cronica del fegato, caratterizzata da infiammazione portale, distruzione progressiva immuno-mediata dei piccoli dotti biliari interlobulari, e successiva fibrosi dei dotti stessi, che sfocia nell'insufficienza epatica, rappresentando lo 0.5-2% delle cause di cirrosi (1).

Inoltre, la CBP molto spesso si associa al prurito, un sintomo nocicettivo, la cui patogenesi è tuttora sconosciuta. E' ormai noto che sostanze pruritogene, prodotte dal fegato ed escrete nella bile, in condizioni colestatiche possano accumularsi nei tessuti. Tra tali sostanze, i primi ad essere considerati sono stati i sali biliari, ma un aumentato tono oppioidergico, presumibilmente dovuto da un'aumentata disponibilità di oppioidi endogeni che legano i loro recettori, potrebbe anche essere ipotizzato (71). L'osservazione che gli antagonisti degli oppioidi come il naloxone sono in grado di far regredire il prurito, ha portato a proporre come sostanze pruritogene gli oppioidi endogeni (72). Recentemente, è stato dimostrato anche un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella modulazione del prurito: l'utilizzo di agonisti sintetici dei cannabinoidi svolge un'azione antinocicettiva sul prurito, aumentando la soglia di percezione del prurito stesso, come dimostrato in ratti con colestasi indotta.

Nello studio da noi condotto è stato messo in evidenza, per la prima volta, una iper-regolazione del sistema endocannabinoide nella cirrosi biliare primitiva. Tale risultato è originato dall'analisi, mediante immunoistochimica, dell'espressione tissutale dei recettori dei cannabinoidi (CB1 e CB2), in campioni di fegato di pazienti con cirrosi biliare primitiva (IV stadio istologico di malattia) e nel fegato normale. In fase di cirrosi biliare primitiva, l'espressione di CB1 e CB2 appare altamente indotta ed i due recettori risultano marcatamente espressi a livello di epatociti (CB1 e CB2), delle cellule dell'epitelio biliare (CB1 e CB2) e nelle cellule di Kupffer (CB1).

Mentre, CB1 e CB2 non risultano espressi nel fegato normale. Tali risultati in parte sono in accordo con la recente letteratura, relativamente all'espressione tissutale dei recettori dei cannabinoidi in varie patologie croniche del fegato. Nelle NASH è stata dimostrata un'iper-espressione del recettore CB2, al livello del citoplasma degli epatociti, dei colangiociti e delle cellule stellate (61). Durante il processo di fibrogenesi epatica associata a danno epatico cronico, i miofibroblasti epatici, all'interno dei setti fibrosi, esprimono entrambe i recettori CB1 e CB2: in particolare CB1 sembra agire da mediatore pro-fibrogenico, mentre CB2 presenta proprietà anti-infiammatorie e anti-fibrogeniche (63). Inoltre, l'espressione del recettore CB1 risulta up-regolata in un modello animale di fibrosi epatica indotta da legatura del dotto biliare (62).

L'analisi dell'espressione dell'mRNA, mediante RT-PCR, ha permesso di ottenere la quantità relativa dell' RNA messaggero dei recettori CB1 e CB2, mostrando una variabilità di espressione, nei campioni epatici studiati. Tale risultato non permette di confermare l'ipotesi di una un'iper-regolazione trascrizionale dei recettori CB1 e CB2 in fase di malattia col estatica, che potrebbe accompagnare l'aumentata espressione tissutale dei recettori stessi dimostrata nella cirrosi biliare primitiva.

L'indagine dei polimorfismi genetici (SNPs) dei geni CB1 and CB2, nella cirrosi biliare primitiva, è stata effettuata per determinare se tali mutazioni possono definire differenti fenotipi di malattia, in particolare in termini di associazione con il prurito o con la risposta alla terapia con UDCA.

La frequenza di questi SNPs è stata calcolata nella seguente casistica: 68 pazienti italiani con CBP (68 per CB1 e 49 per CB2), 70 controlli sani (donatori di sangue) comparabili per età, sesso ed area geografica alle CBP italiane, e 84 pazienti con CBP residenti negli Stati Uniti.

CB1 SNP (1359 G/A) è risultato essere presente nel 26.5% dei pz. italiani con CBP, nel 22.9% dei soggetti di controllo sani, e nel 27.4% dei pz americani con CBP ($p=n.s.$). CB2 SNP (188-189 AA/GG) è stato trovato nel 24.4% vs 30.4% dei pz. con CBP italiani ed americani, rispettivamente, e nel 28% dei soggetti di controllo ($p=n.s.$)

Nella nostra casistica di CBP (italiane e USA) il prurito era presente in 88/152 (57,9%) dei pazienti con CBP, valore che non si discosta molto dalla

frequenza del 50-60% riportata in letteratura (73). In particolare il prurito è stato rilevato in 32/68 (47%) italiani e in 56/84 (66%) statunitensi. Stratificando i pazienti con CBP in base alla presenza o meno di prurito, non sono state trovate differenze statisticamente significative nei due gruppi, e per entrambe i geni studiati.

La successiva analisi statistica (univariata e multivariata) delle associazioni tra le caratteristiche epidemiologiche-cliniche dei pazienti italiani con CBP e la presenza del polimorfismo 1359G/A del gene CB1, ha messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa tra la presenza della mutazione del gene CB1 (wt/m o m/m) e:

1) lo stage istologico di malattia, in maniera direttamente proporzionale, indicando un trend di progressione di malattia (stage istologico I = 0%, II = 10,5%, III = 30,8%, IV = 42,1%) nei soggetti portatori del polimorfismo ($p=0,01$) (Fig.14); è stato infatti dimostrato un aumento del rischio pari a 6,25 volte ogni incremento di un grado di danno istologico (adjusted OR = 6,25; 95% CI= 0,997-39,288; $p=0,05$);

2) la risposta al trattamento con UDCA, in modo inversamente proporzionale, dimostrando una ridotta efficacia della terapia nel rallentare la progressione della malattia stessa (adjusted OR = 0,04; 95% CI= 0,002-0,708; $p=0,028$). Infatti, la frequenza dei pazienti “non responders” è maggiore (34,9%) rispetto a quella dei soggetti “responders” (12%), nel gruppo di soggetti portatori della mutazione ($p=0,04$).

Per quanto riguarda la distribuzione del polimorfismo 188-189 AA/GG del gene CB2, nel gruppo di pazienti italiani con CBP, l'analisi statistica (univariata e multivariata) non ha messo in evidenza differenze statisticamente significative in associazione con il prurito e con le altre caratteristiche cliniche ($p=ns$).

Il ruolo dell'attivazione dei recettori CB1 e CB2 nella cirrosi biliare primitiva rimane oscuro, ma si può ipotizzare che il sistema endocannabinoide, in corso di malattia colestatica, eserciti un ruolo nella regolazione dell'omeostasi tissutale in risposta al danno epatico. L'espressione epatocellulare dei recettori dei cannabinoidi sembra essere associata con la progressione della malattia, intervenendo nei processi di infiammazione,

proliferazione cellulare, secrezione neuroendocrina e fibrosi che caratterizzano i diversi stadi della malattia colestatica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Selmi C, Invernizzi P, keeffe E, Coppel R, Podda M, Rossaro L, Ansari A, Gershwin E. Epidemiology and pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38:264-71.
2. Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;335:1570-80.
3. Howel D, Fischbacher CM, Bhopal RS, Gray J, Metcalf JV, James OF. An exploratory population-based case-control study of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:1055-60.
4. Dahlan Y, Smith L, Simmonds D, Jewell LD, Wanless I, Heathcote EJ, Bain VG. Pediatric onset primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003;125:1476-79.
5. Floreani A, Ostuni PA, Ferrara F, Guido M. Primary biliary cirrhosis:when and whydoes the disease develop? *Dig Liv Dis* 2006;38: 272-75.
6. Parikh-Patel A, Gold EB, Worman H, Krivy KE, Gershwin ME. Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from yhe United States. *Hepatology* 2001;33:16-21.
7. Pauli-Magnus C, Kerb R, Fattinger K, Lang T, Anwald B, Kullak-Ublick GA, Beuers U and Meier PT et al. BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004; 39:779-791.
8. Kita H, Nalbandian G, Keefe E, Coppel R, Gershwin E. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003;7:821-39.
9. Kaplan MM and Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005 Sep 22;353(12):1261-73. Review. No abstract available. Erratum in: *N Engl Med*. 2006 Jan 19;354(3):313.
10. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, invernizzi P, Gish RG, Gordon SC, Wright HI, Zwieban B, Podda M, Gershwin ME,.Orimary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins:genetics, epigenetics and environment. *Gastroenterology* 2004;127:485-92.
11. Invernizzi P, Battezzati PM, Crosignani A, Perego F, Morabito A, Fe Arias AE, Scalamogna M, Zuin M, Podda M. Peculial HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:401-6.

12. Tanaka A, Borchers AT, Ishibashi H, ansari AA, Keen CL, Gershwin ME. Genetic and familial considerations of primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:8-15.
13. Invernizzi P, Selmi C; Mackay IR, Podda M, Gershwin ME. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:401-10.
14. Springer JE, Cole DE, Rubin LA, Cauch-Dudek K, Harewood L, Evrovski J, Peltekova VD, Heathcote EJ. Vitamin D-receptor genotypes as independent genetic predictors of decreased bone mineral density in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2000;118:145-151.
15. Leuschner U. Primary biliary cirrhosis: presentation and diagnosis. *Clin Liver Dis* 2003;7:741-58.
16. Heathcote EJ. Management of Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:1005-13.
17. Bergasa NV. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003;7:879-900.
18. Bergasa NV, Jones EA. The pruritus of cholestasis. *Clin Liver Dis.* 1998;2:391-403.
19. Goldblatt J, James OFW, Jones DEJ. Grip strength and subjective fatigue in patient with primary biliary cirrhosis. *JAMA* 2001;285:2196-7.
20. Serviddio G, Pereda J, pallardò FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vandemiale G, Poli G, Vina J, Sastre J. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 2004;39:711-720.
21. Paumgartner G, Beuers U. Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:67-81.
22. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol.* 1999;58:315-348.
23. Mechoulam R, Gaoni Y. A total synthesis of dl- Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.* 65;87:3274-3275.
24. Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 1998;21:521-528.

25. Cota D, Woods SC. The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 2005;12:338-351.
26. De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*. 2004;141:765-774.
27. Devane WA, Hanus L, Breuer A et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258:1-4.
28. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptor. *Biochem Pharmacol*. 1995; 50:83-90.
29. Di Marzo V, Fontana A. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Jul 1995;53(1):1-11.
30. Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, et al. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J Biol Chem*. Jan 29 1999;274(5):2794-2801.
31. Huang SM, Bisogno T, Marcello T, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, and Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 8400–8405, 2002.
32. Facci L., Dal Toso R., Romanello S., Buriani A., Skaper S.D. & Leon, A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 394: 277–281.
33. B.F. Cravatt, O. Prospero-Garcia, G. Siuzdak, N.B. Gilula, S.J. Henriksen, D.L. Boger and R.A. Lerner, Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* 268 (1995), pp. 1506–1509.
34. Heather B Bradshaw and J Michael Walker. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br J Pharmacol*. 2005 February; 144(4): 459–465.
35. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002;96:678-682.

36. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nature Rev.* 2003;4:873-884
37. Di Marzo, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686–691 (1994).
38. Cadas, H., di Tomaso, E. & Piomelli, D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 1226–1242 (1997).
39. Higgs, H. N. & Glomset, J. A. Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 9574–9578 (1994).
40. Pete, M. J., Ross, A. H. & Exton, J. H. Purification and properties of phospholipase A1 from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 269, 19494–19500 (1994).
41. Beltramo, M. et al. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277, 1094–1097 (1997).
42. Hillard, C. J., Edgemond, W. S., Jarrahian, A. & Campbell, W. B. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* 69, 631–638 (1997).
43. Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66:201-210.
44. Matias I, Bisogno T, Di Marzo V. Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obesity.* 2006;30:S7-S12.
45. Baldwin J.M., Schertler G.F. and Unger V.M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.* 1997; 272:144–164.
46. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346:561-564.
47. Huang, C. C., Lo, S. W. & Hsu, K. S. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J. Physiol.* 532, 731–748 (2001).

48. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 2006;27:73-100.
49. Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T et al. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci.* 2006;26:2991-3001.
50. Marsicano, G. & Lutz, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4213–4225 (1999).
51. Izzo AA, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, Iuvone T, Esposito G, Mascolo N, Di Marzo V, Capasso F. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol*, 2001; 134(3):563-70
52. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 1993;365:61-64.
53. Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signaling. *Life Sci.* 2006;78:549-563.
54. Felder CC, Glass M (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:179–200
55. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 2007;152: 1092–1101
56. Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G. The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain*, (2008), Vol. 134, No. 3. pp. 277-284.
57. Gadzicki D, Müller-Vahl K, Stuhmann M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Molec Cell Probes* 1999;13:321-3.
58. Schmidt LG, Samochowiec J, Finckh U, Fiszler-Piosik E, Horodnicki J, Wendel B, Rommelspacher H & Hoehe MR. Association of a CB1 cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism with severe alcohol dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 2002: 65.
59. Jack C. Sipe,¹ Nathalie Arbour,² Alexandra Gerber, and Ernest Beutler. Reduced endocannabinoid immune modulation by a common

- cannabinoid 2 (CB2) receptor gene polymorphism: possible risk for autoimmune disorders. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 78, July 2005
60. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005;1298-1305.
 61. N Mendez-Sanchez , D Zamora-Valdes , R Pichardo-Bahena , B Barredo-Prieto , G Ponciano-Rodriguez , L Bermejo-Martínez , N C Chavez-Tapia , H A Baptista-González , M Uribe. Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2007 Mar ;27 (2):215-9 17311616
 62. Grenard P, Julien B, Tran-Van-Nhieu J, Li L, Ledent C, Mallat A, et al. Reduced liver fibrosis in CB1 receptor knockout mice. *J Hepatol* 2004; 40(Suppl 1):8.
 63. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005; 128: 742–55.
 64. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveau V, Li L, Serriere Lanneau V, Ledent C, Mallat A, Lotersztajn S. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-676.
 65. Mallat A, Teixeira-Clerc F, Deveau V, Lotersztajn S .Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, March 2007, Vol. 11, No. 3, Pages 403-409
 66. Bergasa Nora V. The pruritus of cholestasis. *Journal of Hepatology* Volume 43, Issue 6, December 2005, Pages 1078-1088
 67. Dvorak M, Watkinson A, McGlone F. and Rukwied R. Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. *Inflamm. res.* 52 (2003) 238–245.
 68. Gingold A.R.; Bergasa N.V. The cannabinoid agonist WIN 55, 212-2 increases nociception threshold in cholestatic rats: implications for the treatment of the pruritus of cholestasis. *Life Sciences*, Volume 73, Number 21, 10 October 2003 , pp. 2741-2747(7).

69. Alvaro D., Mancino M., Glaser S., Gaudio E., Marzioni M., Francis H., Alpini G. Proliferating Cholangiocytes: A Neuroendocrine Compartment in the Diseased Liver. *Gastroenterology*, 2007: Volume 132, Issue 1, Pages 415-431
70. Marzioni M., Alpini G., Saccomanno S., De Minicis S., Glaser S., Francis H., Trozzi L., Venter J., Orlando F., Fava G.. Endogenous Opioids Modulate the Growth of the Biliary Tree in the Course of Cholestasis. *Gastroenterology*, 2006, Volume 130, Issue 6, Pages 1831-1847.
71. Jones EA, Bergasa NV. The pruritus of cholestasis: from bile acids to opiate agonists. *Hepatology* 1990;11:884-87.
72. Bergasa NV, Jones EA. The pruritus of cholestasis. *Clin Liver Dis.* 1998;2:391-403
73. Leuschner U. Primary biliary cirrhosis: presentation and diagnosis. *Clin Liver Dis* 2003;7:741-58

