

**Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca**

**in**

**Medicina Molecolare**

***Ciclo XXIII***

**Relazione 1° anno**

**Espressione del sistema degli endocannabinoidi (CB1-CB2) nel  
tessuto adiposo epicardico umano**

**Candidato: Cristiano Ariatti**

***Responsabile del progetto:* Prof. Umberto Dianzani**

## 1.1 Introduzione e razionale

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nel mondo occidentale.

Il diabete di tipo 2, l'obesità e l'insulino-resistenza rappresentano i più importanti fattori di rischio cardiovascolare.

La nozione che l'infiammazione giochi un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza e del diabete è sostenuta da molteplici linee di evidenza.

Il concetto di infiammazione associato alle malattie metaboliche, come l'obesità e l'insulino-resistenza, risale alle osservazioni fatte da Hotamisligil agli inizi degli anni Novanta, il quale dimostrò che gli adipociti esprimono costitutivamente la citochina proinfiammatoria TNF  $\alpha$  e che l'espressione di TNF $\alpha$  negli adipociti di animali obesi (topi *ob/ob*, e ratti *fa/fa* Zucker) è marcatamente aumentata. Inoltre, in questo modello sperimentale, la neutralizzazione di TNF  $\alpha$  mediante recettori solubili del TNF $\alpha$  comportava la riduzione dell'insulino-resistenza. <sup>(1)</sup>

Tali osservazioni furono la prima dimostrazione del legame esistente tra aumentata espressione di citochine, livelli di citochine proinfiammatorie ed insulino-resistenza.

Successivamente veniva dimostrato che anche il tessuto adiposo umano era capace di esprimere costitutivamente TNF $\alpha$  e che la sua espressione si riduceva dopo perdita di peso. <sup>(2)</sup> Comunque, i tentativi per ridurre l'attività del TNF $\alpha$  nell'uomo, mediante infusione di anticorpi anti-TNF $\alpha$  non hanno avuto successo nel migliorare la sensibilità insulinica. <sup>(3)</sup>

Un'altra recente acquisizione riguarda la compartimentalizzazione del tessuto adiposo. Diversi studi hanno oramai dimostrato che solo alcuni distretti di tessuto adiposo umano sono in grado di determinare insulino-resistenza e tra questi vanno ricordati quello sottocutaneo, quello omentale e quello epicardico, viceversa il tessuto adiposo gluteo-femorale sembra avere un ruolo protettivo nei confronti delle malattie cardiovascolari. <sup>(4-8)</sup>

Il tessuto adiposo epicardio viene dunque considerato come un vero e proprio organo endocrino in grado di secernere, oltre al TNF $\alpha$ , diversi mediatori tra cui la leptina, l'adiponectina, la resistina, e il PAI 1. <sup>(9-10)</sup> Queste molecole, definite adipocitochine, giocano un ruolo importante nell'omeostasi metabolica e quando la loro produzione non è correttamente regolata possono contribuire alla genesi di disordini metabolici come la sindrome metabolica, il diabete di tipo 2 e l'aterosclerosi.

Il 1994 è stato l'anno in cui venne identificata per la prima volta la leptina, un ormone prodotto principalmente, anche se non esclusivamente, dall'adipocita. Da tale scoperta si è venuta a

generare nuova luce sui meccanismi deputati al controllo dell'introito alimentare e dell'omeostasi energetica.

L'ipotalamo infatti è prepotentemente emerso come centralina di segnali circa lo stato nutrizionale percepito in periferia che qui vengono integrati e quindi nuovamente direzionati verso gli organi periferici deputati al controllo energetico.

Tra i molteplici attori di questa comunicazione centro-periferia il sistema cannabinoide endogeno si è posto recentemente in luce per l'insolita capacità d'azione di interagire a livello di bilancio energetico sia a livello centrale che periferico. <sup>(11-13)</sup>

## **1.2 Gli endocannabinoidi e i loro recettori**

I cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi sono una famiglia numerosa di mediatori lipidici. Si tratta di molecole di piccole dimensioni e con proprietà lipofile, accomunate, dal punto di vista strutturale, dal fatto di essere delle amidi di acidi grassi. I principali cannabinoidi endogeni presenti nei tessuti e nei liquidi biologici sono l'arachidonil-etanolamide (AEA), noto anche come anandamide, ed il 2-arachidonil-glicerolo (2AG). <sup>(14)</sup> Si tratta di due molecole entrambe derivate dall'acido arachidonico e che legano con diversa affinità i recettori CB1 e CB2. Numerose sono inoltre le molecole sintetiche in grado di legare i recettori CB1 e CB2 con azione agonista o antagonista e con un potenziale sviluppo farmacologico nelle diverse funzioni biologiche in cui il sistema endocannabinoide è coinvolto. <sup>(15-16)</sup>

Gli endocannabinoidi vengono sintetizzati "a domanda" per l'azione di specifiche vie enzimatiche che utilizzano, come substrato di partenza, dei fosfolipidi abbondantemente presenti nella struttura della membrana plasmatica. La fosfatidil-etanolamina è utilizzata per la sintesi dell'AEA mentre la sintesi del 2-AG utilizza il fosfatidil-inositolo.

La degradazione degli endocannabinoidi è altrettanto rapida e prevede la degradazione dell'AEA ad acido arachidonico ed etanolamina ad opera dell'enzima FAAH (fatty acids amide hydrolase) mentre la degradazione del 2-AG prevede l'idrolisi della molecola da parte dell'enzima monoacilglicerolo-lipasi (MAGL). <sup>(17)</sup> E' possibile pertanto ritenere che in condizioni normali il sistema degli endocannabinoidi non sia attivo, e che questi mediatori lipidici vengano prodotti acutamente su domanda, agiscano localmente e vengano rapidamente inattivati.

I cannabinoidi esercitano la loro azione farmacologica attraverso le interazioni con specifici recettori CB1 e CB2, che sono stati descritti e clonati tra gli anni '80 e '90. CB1 è espresso in maniera preferenziale a livello del SNC, del tessuto adiposo, muscolare scheletrico e miocardico, nel tratto gastrointestinale, nel fegato e a livello delle cellule endoteliali. Il recettore CB2 invece, è localizzato nelle cellule del sistema linfatico e nei macrofagi periferici. <sup>(18)</sup>

I recettori per gli endocannabinoidi hanno un'elevata affinità per i due ligandi endogeni l'anandamide e il 2-AG che appartengono ad una vasta famiglia di composti lipidici (lipid mediators) con affinità variabile con i recettori CB1 e CB2.

### **1.3 Gli endocannabinoidi e la regolazione ipotalamica del bilancio energetico**

Dopo la scoperta dei recettori per i cannabinoidi e la disponibilità di molecole di sintesi ad azione agonista ed antagonista, la ricerca sugli effetti del sistema cannabinoide endogeno subì una forte accelerazione ed il ruolo di questo sistema nel controllo centrale e periferico del bilancio energetico iniziò a chiarirsi.

Nel 2001 venne chiaramente dimostrato come i livelli di anandamide e 2-AG erano aumentati nell'ipotalamo di topi *ob/ob*, *db/db* e ratti Zucker, 3 modelli di obesità animale geneticamente determinati. Inoltre il trattamento con leptina, un ormone anoressante periferico prodotto dall'organo adiposo, era in grado di ridurre i livelli di endocannabinoidi ipotalamici sia nei topi normali che nei topi *ob/ob* che sono geneticamente privi di leptina circolante.<sup>(19)</sup>

Complessivamente i risultati di questi esperimenti hanno indicato nel sistema cannabinoide ipotalamico un importante regolatore del consumo di cibo, integrato con altre vie ipotalamiche di controllo del bilancio energetico già da tempo note, in particolare con il sistema leptina-neuropeptide Y. Nei topi *knockout* per il gene CB1 si osserva una lieve, ma significativa riduzione della percentuale di peso corporeo e di massa grassa.<sup>(20)</sup>

### **1.4 Gli endocannabinoidi e la regolazione del metabolismo periferico**

Recentemente alcuni dati sperimentali, ottenuti in modelli animali ed in linee cellulari, hanno mostrato che il sistema cannabinoide è presente con i suoi recettori ed i suoi enzimi di sintesi e degradazione, a livello di numerosi tessuti periferici.<sup>(21-24)</sup> Il recettore CB1, inizialmente ritenuto espresso solo nel SNC, è presente anche negli adipociti.<sup>(25)</sup> Inoltre è stato dimostrato che ratti geneticamente obesi (Zucker *fa/fa*) hanno livelli aumentati di espressione di CB1 nel tessuto adiposo.

E' stato quindi ipotizzato che nell'obesità sia presente un'iperattivazione del sistema endocannabinoide anche nel tessuto adiposo e che questa iperattivazione sia anch'essa responsabile dell'eccessiva deposizione di tessuto adiposo. In linee cellulari di adipociti come la linea 3T3-F442A è stata evidenziata una up-regolazione del sistema cannabinoide nello stadio che precede la

differenziazione adipocitaria, responsabile probabilmente della differenziazione della cellula ad adipocita maturo. <sup>(26)</sup> Questi dati, però, non sono stati confermati nell'uomo, dove i livelli d'espressione sia del recettore CB1 che dell'enzima FAAH nel tessuto adiposo sottocutaneo sono risultati francamente down-regolati nell'obesità.

I recettori CB1 sono presenti anche nel fegato e sembrano coinvolti, almeno nel topo, nella lipogenesi e nello sviluppo della steatosi epatica. Infatti, Osei-Hyiaman et al. <sup>(27)</sup> hanno dimostrato nel modello murino che l'attivazione del recettore CB1 aumenta l'espressione epatica del fattore di trascrizione SREBP 1c e dei geni da esso regolati (acetil CoA carbossilasi, acido-grasso sintetasi). Il trattamento con un antagonista recettoriale del CB1 riduce la lipogenesi epatica.

Questi dati, anche se necessitano di dimostrazioni dirette nell'uomo, indicherebbero che il sistema endocannabinoidale è profondamente coinvolto nella lipogenesi epatica ed è potenzialmente implicato nella patogenesi del patologico accumulo di trigliceridi nella steatosi epatica associata alla sindrome metabolica.

Studi condotti su modelli animali di obesità genetica hanno dimostrato che il recettore CB1 è up-regolato nei topi. <sup>(28)</sup> Inoltre, come è noto, l'espressione nel tessuto adiposo ed i livelli circolanti di adiponectina sono ridotti nell'obesità. Il trattamento con un antagonista CB1 è in grado di up-regolare l'espressione dell'adiponectina nel tessuto adiposo degli animali obesi. <sup>(28)</sup> Questi dati suggeriscono che gli effetti benefici del trattamento con l'antagonista CB1 possa essere, almeno in parte, mediato attraverso un meccanismo dipendente dall'adiponectina.

## **2.Obiettivo dello studio**

Lo studio si pone il seguente obiettivo:

- dimostrare la presenza dei recettori CB1 e CB2 per gli endocannabinoidi nel tessuto adiposo epicardico umano. La modulazione di tale sistema mediante blocco recettoriale, potrebbe inibire localmente la secrezione di adipochine implicate nella patogenesi della malattia aterosclerotica.

### **2.1 Disegno dello studio**

Sono stati prelevati campioni di tessuto adiposo epicardico in due gruppi distinti di pazienti, un primo gruppo è rappresentato da malati affetti da cardiopatia ischemica in attesa di rivascularizzazione miocardica mediante by-pass aortocoronarico e un secondo gruppo di pazienti senza fattori di rischio cardiovascolare da sottoporre a cardiochirurgia valvolare.

Il prelievo è stato eseguito con le seguenti modalità.

Alcuni di tessuto adiposo è stato prelevato in prossimità del tratto prossimale della coronaria destra prima di iniziare la circolazione extracorporea.

Il campione è stato in parte conservato in soluzione fisiologica e in parte congelato in azoto liquido ad una temperatura di -80°C.

1. Sul materiale congelato verranno eseguite le seguenti valutazioni:
  - Ricerca dei recettori CB1 e CB2 per gli endocannabinoidi nei due gruppi di pazienti. Tali analisi verranno eseguite mediante RT PCR e Western Blot.
2. Su materiale fresco e fissato verranno eseguite le seguenti valutazioni:
  - Documentare quali cellule esprimono i recettori per gli endocannabinoidi mediante immunisto chimica .

### **3. Materiali e metodi**

#### **3.1 *Prelievo dei campioni di tessuto adiposo***

Il tessuto adiposo epicardio è stato prelevato in due gruppi distinti di pazienti, un primo gruppo rappresentato da malati affetti da cardiopatia ischemica in attesa di rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass aortocoronarico e un secondo gruppo rappresentato da pazienti senza fattori di rischio cardiovascolare sottoposti a cardiocirurgia valvolare.

Il prelievo è stato eseguito con le seguenti modalità:

un frammento di tessuto adiposo di circa 2-3 grammi è stato biopsiato in prossimità del tratto prossimale della coronaria destra prima di iniziare la circolazione extracorporea.

Il campione è stato conservato in soluzione fisiologica e congelato in azoto liquido ad una temperatura di -80°C nel corso della prima ora dal prelievo.

L'analisi immunocistochimica è stata eseguita su materiale fresco, fissato in formalina.

#### **3.2 *Estrazione dell'RNA e reazione di retrotrascrizione (RT-PCR)***

Il campione di tessuto adiposo epicardico è stato disgregato manualmente e l'RNA è stato successivamente estratto utilizzando il kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany) seguendo le istruzioni fornite dal costruttore. 500 ng di tale RNA sono stati utilizzati come stampo per generare la prima elica di cDNA, tramite impiego del ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen). Questa metodica consiste in una prima fase di denaturazione delle strutture secondarie dell'RNA condotta a 65°C per 5'. I random primers presenti nella miscela vengono utilizzati come innesco della reazione di retrotrascrizione. Il campione viene quindi trasferito in ghiaccio, che permette l'appaiamento tra l'oligonucleotide e il suo stampo. Al campione vengono poi aggiunti: il Buffer di reazione 5X (compreso nel kit), il ditiotraitolo (DTT), un inibitore delle Rnasi, RNaseOUT™, e 1U di trascrittasi inversa ThermoScript™RT. L'acqua utilizzata durante la manipolazione dell'RNA è stata trattata con DietilPirocarbonato (DEPC). Il ciclo di reazione prevede 25°C' a 10', 50°C a 5' ed infine 5' a 85°C per eliminare l'RNA.

### 3.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

I geni CB1, CB2 e GAPDH [numeri di accesso presenti nella banca dati curata dall'NCBI: CB1 (NM\_016083); CB2 (NM\_001841); GAPDH (AF261085)] sono stati amplificati mediante PCR con i primers mostrati in tabella 1. La reazione di PCR è stata allestita con 1 µl di cDNA in volume finale di 25 µl contenente il tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0.5 µM di ciascun oligonucleotide, 0.2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi e 1U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le concentrazioni di MgCl<sub>2</sub> impiegate per l'amplificazione sono: 1mM (CB1 e CB2) e 1.5 mM (GAPDH).

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

CB1: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 30'', una di appaiamento a 52°C per 30'', e una di sintesi a 72°C per 40'. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 10'.

CB2: il programma è sovrapponibile a quello utilizzato per CB1 con l'unica differenza che la fase di appaiamento avviene a 54°C .

GAPDH: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 20'', una di appaiamento a 57°C per 20'', e una di sintesi a 72°C per 40''. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 10'.



**Tabella 1. Sequenze dei primers impiegati per l'amplificazione dell' mRNA di *CB1*, *CB2* e *GAPDH***

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Dimensioni amplificato(bp)</b>
<b><i>CB1</i></b>	Forward GAGCTCAGCCTAATCAAA G	676
	Reverse TATGTACCTGTCGATGGC	
<b><i>CB2</i></b>	Forward ACAAGCTCAGTGGAAATCT G	378
	Reverse ATAGTCACGCTGCCAATC	
<b><i>GAPDH</i></b>	Forward ACCACAGTCCATGCCATC	500
	Reverse TCCACCACCCTGTTGCTGT A	

### **3.4 Elettroforesi su gel d'agarosio**

Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio in Tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1% contenente gel red (10,000X). L'esposizione agli UV del gel permette il rilevamento del DNA grazie alla fluorescenza emessa dal gel red incorporato dal campione.

### **3.5 Estrazione delle proteine e Western Blot**

I campioni di tessuto adiposo epicardico sono stati omogeneizzati usando il sonicatore (3 pulse 10 secondi) in ghiaccio fino a completa disgregazione del pezzo. Gli adipociti sono stati lisati per estrarne le proteine totali, in volume di 100-150 µl di buffer RIPA (Tris Hcl pH 7.2 20mM, Na-desossicolato 0.5%, Triton-X-100 1%, SDS 0.1%, NaCL 150 MM, EDTA 5mM). Dopo un'incubazione di 30' in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 12000 rpm a 4°C per 15'.

Il surnatante così ottenuto rappresenta l'estratto proteico che viene dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad), una variante del metodo Braedford.

50 µg di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10% secondo protocollo standard (*current protocols in molecular biology*).

I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) per 1,5 ore a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (Sigma Aldrich) e poi lavata con TBS (Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l pH 7,6) 1% Tween-20. La nitrocellulosa viene quindi saturata con una soluzione di 5% latte in polvere sciolto in TBS-T, e quindi incubata 2 ore a temperatura ambiente oppure 16 ore a +4°C con anticorpo primario specifico diluito in TBS-T 5% latte o BSA. Successivamente il filtro di nitrocellulosa è stato incubato con anticorpo secondario coniugato ad HRP (perossidasi di rafano) per 1 ora. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro viene incubato con i substrati specifici per chemiluminescenza (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences), ed il segnale luminoso emesso dalla reazione viene utilizzato per impressionare i film da autoradiografia. Il segnale ottenuto sulle lastre impressionate rappresenta quindi le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo primario specifico. Gli anticorpi impiegati nell'analisi delle proteine sono:  $\alpha$ -CB1 (Santa Cruz, policlonale),  $\alpha$ -CB2 (Cayman, monoclonale) e  $\alpha$ -tubulina (Sigma, monoclonale).

Per la rivelazione degli anticorpi primari, sono stati utilizzati un anticorpo anti-rabbit (CB2) anti-mouse (tubulina) e un anticorpo anti-goat (CB1 e FAAH) (Sigma Aldrich), coniugati ad HRP.

### **3.6 Immunoistochimica**

Il tessuto adiposo epicardico e omentale fissato in formalina è stato sezionato su un microtomo (7 micron) ed in seguito i vetrini ottenuti sono stati deparaffinati. Successivamente è stato eseguito il trattamento con calore in un buffer di sodio citrato (10 mM) a 95 °C per 15' (CB1) e 30' (CB2). I vetrini sono stati pre-incubati in acqua ossigenata per 8' e poi lavati in acqua. Le sezioni sono state esposte agli anticorpi primari 1:50  $\alpha$ -CB1 (Affinity Bioreagents),  $\alpha$ -CB2 (Affinity Bioreagents) per 1h. Dopo aver effettuato lavaggi brevi in PBS (Phosphate Buffered Saline), le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario (Dako) per 30'. Si è poi proceduto all'aggiunta del substrato cromogeno DAB per 4'; dopo lavaggi in acqua corrente è stata effettuata la controcolorazione in ematossilina di Meyer. Infine, le sezioni sono state disidratate in una scala

di alcoli crescente e montate in Eukitt (Balsamo Canada) e xilene. Le immagini sono state acquisite con macchina digitale (Nikon).

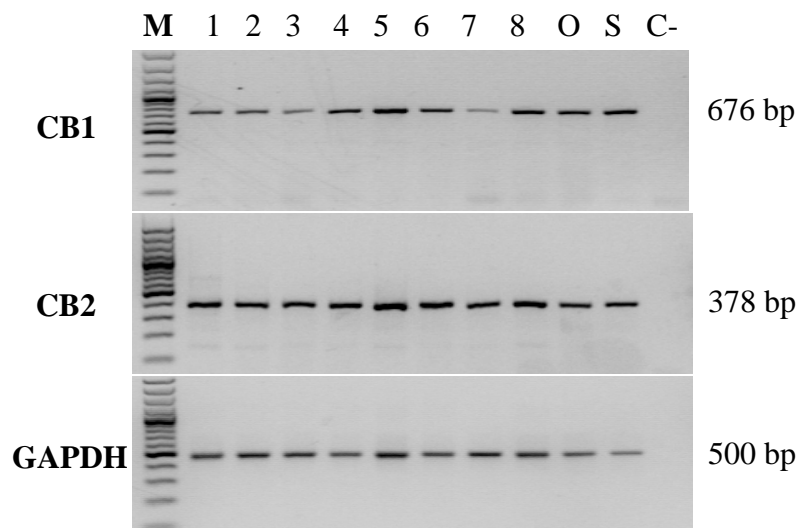
## 4. RISULTATI

### 4.1 *Espressione dei geni CB1 e CB2 nel tessuto adiposo epicardico*

Il tessuto adiposo omentale e sottocutaneo esprime il sistema degli endocannabinoidi (CB1 e CB2), funzionalmente attivo sia a livello di messaggero che di proteina <sup>(25)</sup>.

Per investigare la presenza di tale sistema nel distretto adiposo epicardico, abbiamo estratto da biopsie di 8 pazienti l'RNA e successivamente amplificato il corrispettivo cDNA con i primers riportati nei Materiali & Metodi. Sono stati usati come controlli positivi il tessuto adiposo omentale e quello sottocutaneo. In tutti i campioni di tessuto abbiamo osservato l'amplificazione dei relativi messaggeri.

Abbiamo dimostrato che anche il tessuto adiposo epicardico esprime i messaggeri per CB1 e CB2 (figura 4.1).



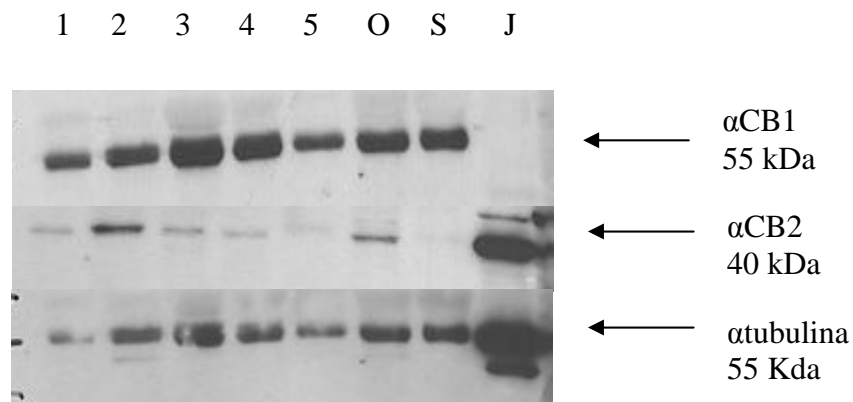
**Figura 4.1. RT-PCR su campioni di tessuti adiposo epicardio.** 1-8: campioni di tessuto adiposo ottenuto da biopsie di 8 pazienti; O: tessuto adiposo omentale; S: tessuto adiposo sottocutaneo o viscerale; C-: controllo negativo (no DNA); M: marcatore di peso molecolare (100bp).

#### 4.2 *Espressione proteica dei recettori CB1 e CB2 nel distretto adiposo epicardio*

Per valutare se nelle membrane degli adipociti maturi erano presenti le corrispettive proteine, abbiamo allestito un esperimento di Western Blot partendo da differenti concentrazioni di proteine estratte. La concentrazione ottimale è risultata essere di 50 microgrammi, in quanto concentrazioni superiori non permettevano la discriminazione delle bande attese.

Le bande dal peso atteso (55 KDa per CB1 e di 40 KDa per CB2) sono state rilevate usando gli anticorpi primari descritti in Materiali & Metodi (**figura 4.2**).

Al fine di verificare la specificità degli anticorpi primari utilizzati abbiamo usato come controllo negativo per CB1 la linea cellulare Jurkat, poiché in letteratura è descritto che tali cellule non esprimono (se si, a bassi livelli) il messaggero e la corrispettiva proteina. Tale dato è stato da noi confermato sia in Western Blot sia in RT-PCR (dato non mostrato). Invece, come controlli positivi (sia per CB1 che CB2) sono stati utilizzati i lisati proteici estratti dai distretti adiposi omentale e sottocutaneo.

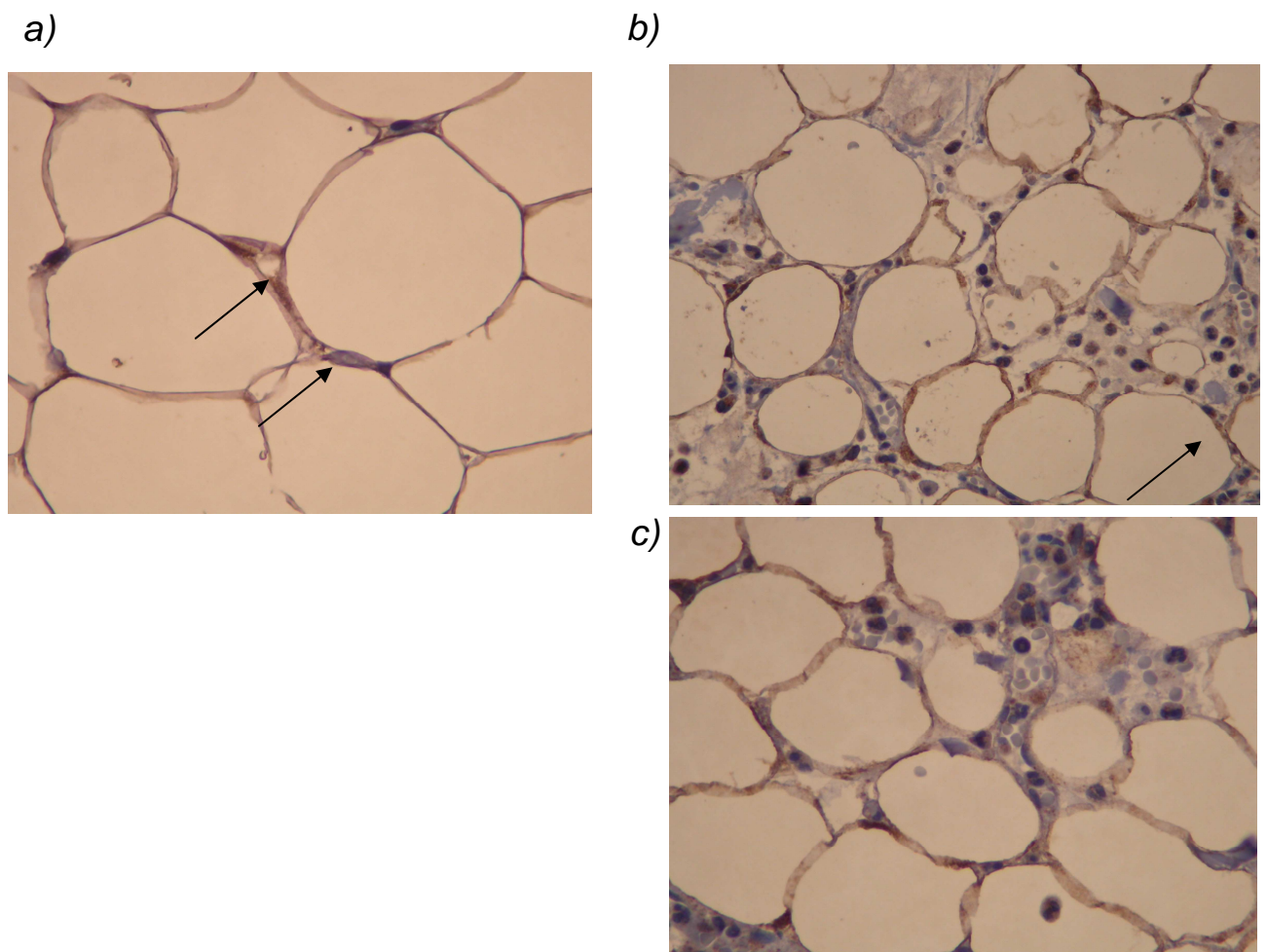


**Figura 4.2. Western Blot su lisati di tessuto adiposo epicardio.** 1-5: campioni di tessuto adiposo ottenuto da biopsie di 5 pazienti; O: tessuto adiposo omentale; S: tessuto adiposo sottocutaneo o viscerale; J: proeetine estratte dalla linea cellulare Jurkat.

### 4.3 Espressione dei recettori CB1 e CB2 negli adipociti maturi

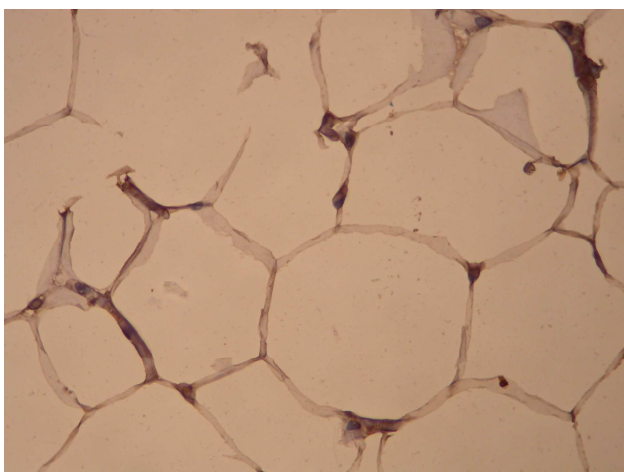
Il tessuto adiposo epicardico fresco è stato fissato in formalina e su sezioni è stato allestito un esperimento di immunohistochimica, al fine di verificare l'esistenza di tali recettori negli adipociti maturi. Parallelamente, l'esperimento è stato effettuato su tessuto adiposo omentale che rappresenta il nostro controllo positivo. Sia per CB1 che per CB2 è stata ottenuta una colorazione positiva sulle membrane degli adipociti maturi (**Figure 4.3 e 4.4**).

Inoltre, si nota nel tessuto adiposo epicardico la presenza di un forte infiltrato verosimilmente linfocitario, indice di infiammazione adiposa importante nella malattia aterosclerotica (**Figura 4.3**).

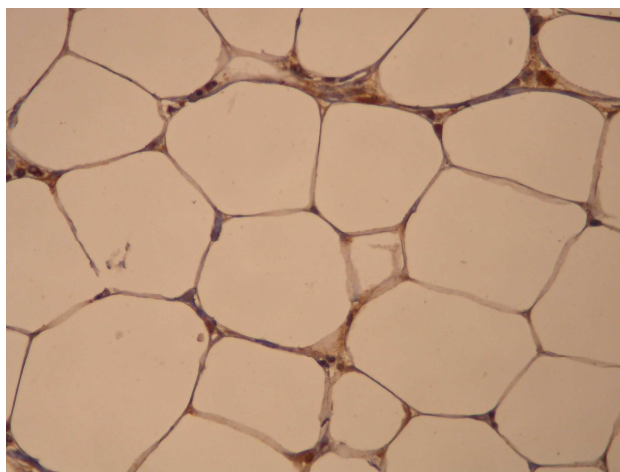


**Figura 4.3. Espressione del recettore CB1 nelle membrane adipocitarie del tessuto epicardio.** a) tessuto adiposo omentale (controllo positivo); b) tessuto adiposo epicardio; c) particolare dell'infiltrato verosimilmente linfocitario. Le frecce indicano la positività del segnale nelle membrane adipocitarie.

a)



b)



**Figura 4.4. Espressione del recettore CB2 nelle membrane adipocitarie del tessuto epicardio.** *a)* tessuto adiposo omentale (controllo positivo); *b)* tessuto adiposo epicardio. Le frecce indicano la positività del segnale nelle membrane adipocitarie.

## 5. Discussione

I dati sperimentali ottenuti dimostrano che il tessuto adiposo epicardico umano esprime il sistema degli endocannabinoidi sia come RNA messaggero che come proteina.

L'immunoistochimica ha inoltre permesso di chiarire che i recettori CB1 e CB2 sono espressi dagli adipociti maturi.

Il recettore CB1 e gli endocannabinoidi sono componenti integrati del network che controlla l'appetito e l'introito calorico<sup>(19)</sup>. La presenza di CB1 in organi chiave del metabolismo energetico quali il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico, il pancreas endocrino e il fegato<sup>(21-24)</sup>, pone il sistema endocannabinoide come uno dei target farmacologici più interessanti, suggerendo che i CB1 antagonisti possano sia dirigersi a livello centrale regolando l'introduzione del cibo, sia agire in periferia bloccando la lipogenesi e promuovendo processi metabolici in grado di eliminare l'eccesso energetico accumulato.

L'adipocita che costituisce il tessuto adiposo epicardico presenta le medesime caratteristiche di quello sottocutaneo e viscerale e dunque, la sua modulazione farmacologica mediante blocco recettoriale di CB1, potrebbe inibire localmente la secrezione di adipochine implicate nella patogenesi della malattia aterosclerotica.

Osei-Hyiaman e coll. hanno recentemente dimostrato il ruolo del sistema cannabinoide e di CB1 nella patogenesi della steatosi epatica in un modello murino knockout per CB1 a livello epatico<sup>(29)</sup>. Gli autori concludono sottolineando che un blocco selettivo di CB1 epatico potrebbe rappresentare una potenziale opzione terapeutica della steatosi epatica, oggi considerata una patologia che predispone alla cirrosi epatica.

L'eccessivo accumulo di lipidi nel tessuto miocardico (lipotossicità cardiaca) rappresenta una causa importante di cardiomiopatia dilatativa non ischemica<sup>(30)</sup>. Sia la lipotossicità cardiaca che la steatosi epatica spesso si associano all'obesità, al diabete mellito tipo 2 e all'insulino-resistenza. La presenza di CB1 nel tessuto adiposo epicardico e la possibilità di una sua inibizione farmacologica potrebbe avere un ruolo importante nella protezione cardiaca da accumulo di lipidi e preservare la normale contrattilità e la normale volumetria del muscolo cardiaco.

Il recettore CB2 è espresso nei linfociti B splenici, nei macrofagi, nei linfociti T e nelle cellule dendritiche<sup>(18)</sup> ed è stato ipotizzato che sia gli eso- che gli endocannabinoidi possano influenzare l'attività delle cellule immunitarie attraverso tale recettore e possano avere un ruolo immunomodulatorio.

Diversi lavori scientifici hanno recentemente dimostrato che l'infiammazione del tessuto adiposo riveste un ruolo importante nella patogenesi dell'insulino-resistenza, che a sua volta

rappresenta un fattore di rischio importante per lo sviluppo di aterosclerosi e malattie cardiovascolari. <sup>(31-35)</sup>

I macrofagi sono reclutati nel tessuto adiposo da MCP-1 e, grazie all'interazione con CCR2, localmente contribuiscono a generare infiammazione mediante il rilascio di mediatori dell'infiammazione come il TNF $\alpha$ . <sup>(31-34)</sup>

Kintscher e coll. hanno recentemente dimostrato che i linfociti T sono le prime cellule del sistema immunitario che determinano infiammazione localmente nel tessuto adiposo giocando un ruolo fondamentale nell'innescare e mantenere lo stato infiammatorio e la conseguente insulino-resistenza. <sup>(35)</sup>

Anche il tessuto adiposo epicardico di pazienti affetti da cardiopatia ischemica, presenta un importante infiltrato infiammatorio che è stato correlato all'insulino resistenza e dunque potenzialmente modulabile attraverso il recettore CB2.

Alla luce dei dati ottenuti, gli obiettivi futuri saranno i seguenti:

1. Isolare da materiale fresco gli adipociti maturi e stimolarli con i mediatori endogeni al fine di valutare se sono funzionalmente attivi;
2. Isolare da materiale fresco i pre-adipociti e valutare se esprimono i recettori per gli endocannabinoidi e stimolarli con i mediatori endogeni al fine di valutare se questi sono in grado di farli o meno differenziare in adipociti maturi. Valuteremo se la stimolazione con i mediatori endogeni può determinare effetti differenti, ad esempio un diverso pattern di citochine infiammatorie, in pazienti affetti da aterosclerosi e in pazienti di controllo;
3. Isolare e caratterizzare le cellule immunitarie che costituiscono l'infiltrato infiammatorio e valutare, se la stimolazione con i mediatori endogeni, stimola il rilascio di citochine infiammatorie;
4. Valutare se viene modificato lo spessore del grasso epicardico in pazienti in terapia con Rimonabant (antagonista di CB1) prima del trattamento e a distanza di 3-6 mesi dalla terapia. Tale misura verrà eseguita mediante ecocardiografia e il dato verrà correlato con parametri biochimici di insulino-resistenza. L'ipotesi è trovare una correlazione significativa tra riduzione dello spessore del grasso epicardico ed un miglioramento degli indici di insulino-resistenza.



## Bibliografia

- 1 Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
- 2 Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95: 2111-2119.
- 3 Ofei F, Hurel S, Newkirk J, et al. Effects of an engineered human anti-TNF  $\alpha$  antibody (CDP571), on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 881-885.
- 4 Tai ES, Lau TN, Ho SC, Folk AC, Tan CE Body fat distribution and cardiovascular risk in normal weight women. Associations with insulin resistance, lipids and plasma leptin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000; 24: 751-757.
- 5 Messerli FH. Obesity and essential hypertension. Hemodynamics, intravascular volume, sodium excretion, and plasma renin activity. *Arch. Intern. Med.* 1981; 141: 81-85.
- 6 Liuzzi A Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors. 1999; *J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999; 23: 1066-1073.
- 7 Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, Di Mario U, Leonetti F Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 5163-5168.
- 8 Iacobellis G, Leonetti F Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 6300-6302.

- 9 Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion J, Diehl J, Arafat h, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper E, Johnson A, Martin J, Goldstein B, Shi Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003; 108: 2460-2466.
- 10 Iacobellis G, Pistilli D, Gucciardo M, Leonetti F, Miraldi F, Brancaccio G, Gallo P, Di Gioia C. Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2005; 29: 251-255.
- 11 Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its yherapeutgic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 771-784.
- 12 Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy bilance. *Nat Neurosi* 2005; 8: 585-589.
- 13 Vickers SP, Kennett GA. Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Drug Targets* 2005; 6: 215-223.
- 14 Piomelli D The molecular logico f endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci* 2003; 4: 873-884.
- 15 Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain *Science*; 2002; 296 (5568): 678-682.
- 16 Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 147-85.
- 17 Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug. Discov* 2004; 3: 771-784.
- 18 Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *PharmacolRev* 2002; 54: 161-2002.

- 19 Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Bãtkai S, Jàrai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; 410 (6830): 763-765.
- 20 Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat Metab. Disord* 2004; 28: 640-648.
- 21 Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *British Journal of Pharmacology* 1998; 125: 1393-1395.
- 22 Pertwee RG Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48: 859-867.
- 23 Szabo B, Nordheim U, Niederhoffer N. Effects of cannabinoids on symphatetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001; 297; 819-826.
- 24 Wagner JA, Jarai Z, Batkai S, Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid (CB (1) receptors. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 423: 203-210.
- 25 Roche R, Hoareau L, Houtmann SB, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006; 126 (2): 177-87.
- 26 Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin. Metab.* 2006; 91 (8): 3171-80.
- 27 Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubriè P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in

- adipose tissue of obese fa/fa rats in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003; 63 (4): 908-14.
- 28 Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bòtkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertàler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005; 115 (5): 1298-305.
- 29 Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-white J, Jeong W, Batkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118 (9): 3160-169.
- 30 Montani JP, Carroll JF, Dwyer TM, Antic V, Yang Z, Dulloo AG. Ectopic fat storage in heart, blood vessels and kidneys in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Int. J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28 suppl 4:S 58-65.
- 31 Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Totani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The journal of Clinical Investigation* 2006; 116:1494-1505.
- 32 Weisberg s, Hunter D, Huber r, lemieux J, slaymaker S, Vaddi K, Charo i, Leibel R, Ferrante A. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The journal of Clinical Investigation* 2006; 116:115-124.
- 33 Neels J, Olefsky J. Inflamed fat: what start the fire?. *The journal of Clinical Investigation* 2006; 116:33-35.
- 34 Kintscher U, Hartge M, Hess K, Forist-ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fisher-Posovszky P, Barth T, dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluer M, Unger T, Wolf A-M, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 1304-1310.

35 Apovian C, Bigornia S, Mott M, Meyers M, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 1654-1659.

CORSI DOTTORATO I anno:

**Corso di Inglese:** Docente: Prof. Irving Bell.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**Anno Accademico 2007/08**

Human Papilloma Viruses loads and its association with non melanoma skin cancer

Dott. S. Weissenbrau

19-12-2007

Biologia molecolare e genetica in ambito forense, principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche

Dott. G. Portera

14/1/2008

K<sup>+</sup> channels in the heart: in and out of control

Dr. R. Radicke

21-1-2008

Integrin traffickng and tumor cells invasiveness

Dott. J. Norman

23/1/2008

La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni

Prof. M. Ruspanti

24-1- 2008

Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo

Dott. G. De Bellis

6/2/2008

La proteina HMGB1 e un segnale di danno tissutale

Prof. ME. Bianchi

7/2/2008

New treatment strategies for multiple mieloma

Prof. A. Palumbo

21/2/2008

Caratterizzazione molecolare della leukemia linfatica cronica

Prof. V. Gattei

28/2/2008

Analytic vaccinology and human cytomegalovirus human monoclonal antibodies as tool to identify novel antigens for protective vaccination

Dott. A. Maccagno

5/3/2008

Applications of gene expression profile to cancer research

Prof. E. Medico

6/3/2008

Fatty liver preservation against ischemia reperfusion injury

Dott. JR. Catafau

7/3/2008

Il sistema Ghrelin aspetti endocrini e metabolici

Prof. F. Broglio e Prof. C. Gauna

13/3/2008

To repress gene expression just take out vinegar role of the class 2 histone deacetylase HDAC4

Prof. C. Brancolini

13/3/2008

Immunologia della psoriasi

Prof. G. Girolomoni

20/3/2008

Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile un nuovo esempio da malattia da misfoding

Prof. F. Barbetti

3/4/2008

Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria

Prof. G. Cairo

9/4/2008

Interazione tra tumori e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica il ruolo della via metabolica del mevalonato

Prof. M. Massaia

14/4/2008

The herpesvirus DNA polymerases a model for new antiviral drug discovery

Prof. G. Palu

16/4/2008

Epidemiologia dell'infezione HPV e del cancro della cervice uterina un modello dinamico

Dr. J. Baussano

17/4/2008

Ghrelin e pancreas endocrine

Prof. R. Granata

24/4/2008

The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions

Prof. A. Budkowska

15/5/2008

La ricerca farmacologica, dal laboratorio alla clinica

Dott. D. Valle

22/5/2008

Sistema degli endocannabinoidi nuovo target terapeutico per l' obesita' e le sue complicanze cardio-metaboliche

Prof. U. Pagotto

23/5/2008

Copy number variations non solo ritardo mentale

Prof. O. Zuffardi

26/5/2008

Cap Analyses Gene Expression Analyses of trascrptional complexity and regulation

Dr. P. Carninci

5/6/2008

Mechanical ventilation and multiple organ failure

Dr. Fraus B Plotz

12/6/2008

Problem solving in epatologia epatica

Prof. G. Faa

13/6/2008

Tecniche FISH nello studio di linfomi non-Hodgkin

Drssa. MG. Tibiletti

26/6/2008

From mekacaryocytes to platelets regulation, microenvironment and patholssa. ogy

Drssa. A. Balduini

30/6/2008

Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate

Prof. F. Scolari

3/7/2008

Recombinant protein expression

1/7/2008

Recombinant antibodies and other affinity reagents

2/7/2008

Display technologies phage,yeast,bacteria and ribosoma

16/7/2008



Fluorescent protein  
18/7/2008  
Prof. A. Bradbury

**CONGRESSI FREQUENTATI:**

1. SALO' 23-24 maggio 2008: Esperienze sull'uso delle statine ad alto dosaggio".
2. ARONA 28 giugno 2008: Progetto GAME ON: gestione ambulatoriale delle malattie endoteliali ossido nitrico correlate (RELATORE).