

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

**Facoltà di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria**



**MAPPATURA DEI RECETTORI ENDOCANNABINOIDI
NELLA GENGIVA DI SOGGETTI SANI E
PARODONTOPATICI**

Relatore: Dott.ssa Claudia DELLAVIA

Correlatore: Chiar.ma Prof.ssa Chiarella SFORZA

Tesi di Laurea di:

Marilisa TOMA

Matricola n. 726767

Anno Accademico 2011-2012

Alla mia famiglia e a zietta Enza

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Anatomia del parodonto	4
1.1.1 Parodonto superficiale	5
1.1.2 Parodonto profondo	6
1.2 Istologia del tessuto gengivale	13
1.2.1 Tessuto epiteliale	13
1.2.2 Tessuto connettivo	15
1.3 Malattia parodontale	17
1.3.1 Definizione ed eziopatogenesi	17
1.3.2 Insorgenza e progressione	21
1.3.3 Interazioni tra ospite e micro-organismi patogeni	24
1.3.4 Correlazione con condizioni sistemiche	31
1.3.5 Cenni di terapia	36
1.4 Sistema endocannabinoide	38
1.4.1 Recettori cannabici	38
1.4.2 Ligandi dei recettori cannabici	40
1.4.3 Sintesi, rilascio, ricaptazione e degradazione degli endocannabinoidi	43
1.4.4 Effetti biologici legati alla modulazione del sistema endocannabinoide	45
1.5 Relazione tra malattia parodontale e sistema endocannabinoide	47
1.6 Scopo del lavoro	48
2. MATERIALI E METODI	49
2.1 Protocollo sperimentale	49
2.2 Processazione istologica dei campioni	51
2.3 Analisi immunoistochimica	54
2.4 Elaborazione dei dati e analisi statistica	56
3. RISULTATI	58
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	67
5. BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUZIONE

1.1 Anatomia del parodonto

Con il termine parodonto (dal greco peri = intorno, odontos = dente) è complessivamente definito l'insieme di formazioni che sono in rapporto con la radice e il colletto del dente e che hanno principalmente la funzione di garantire la fissazione del dente al tessuto osseo dei mascellari, nonché quelle di attutire le sollecitazioni meccaniche che il dente subisce, per esempio con la masticazione e di conservare l'integrità superficiale della mucosa masticatoria della cavità orale. Il parodonto è un'unità funzionale, di sviluppo e biologica che può variare in funzione dell'età (Riethe et al 1965, Schroeder et al 1971, Haber 1972) e delle possibili alterazioni dell'ambiente orale; è composto da quattro tessuti principali: a) la gengiva, b) il legamento parodontale, c) il cemento radicolare, d) l'osso alveolare.

Isto-topograficamente il parodonto può essere diviso in parodonto marginale (epitelio gengivale e lamina propria), di derivazione ectodermica e parodonto profondo (cemento radicolare, osso alveolare e legamento parodontale) di derivazione ecto-mesenchimale.

(Figura 1)

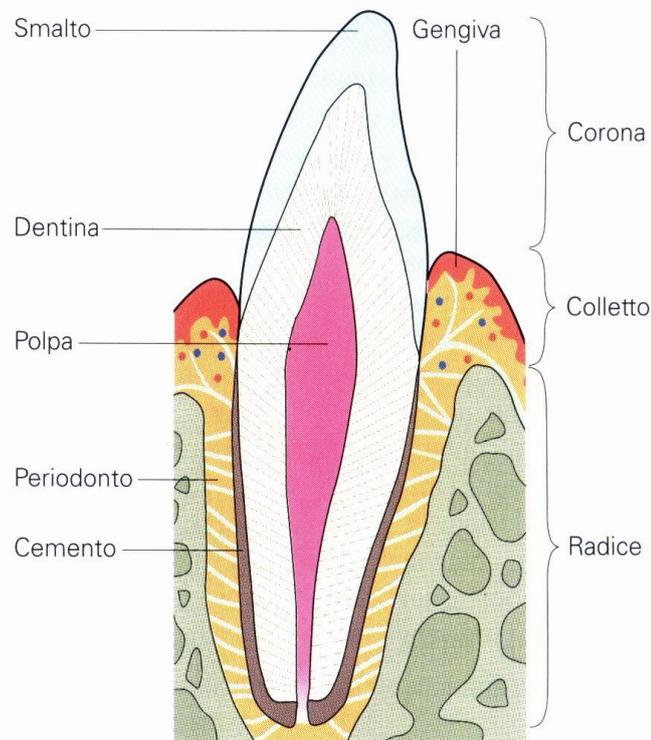


Figura 1 Sezione sagittale di un incisivo con struttura del parodonto.

(Immagine tratta da Schwegler JS. Anatomia e fisiologia dell'uomo. Edi-Ermes II ed., Milano 1999).

1.1.1 Parodonto superficiale: GENGIVA

La gengiva è quella parte di mucosa masticatoria, di derivazione ectodermica, che ricopre il processo alveolare e circonda il colletto dei denti (Schroeder et al 1997). In direzione coronale appare di colore rosa corallo, caratterizzata da un contorno festonato e termina con il margine gengivale libero, mentre in direzione apicale la gengiva continua con la mucosa alveolare, dall'aspetto lasso e dal colore più scuro. La linea di confine tra le due aree precedentemente descritte è ben visibile e riconoscibile ed è definita giunzione muco-gengivale. Nel palato non è presente una linea mucogengivale poiché il palato duro e il processo alveolare mascellare sono ricoperti dallo stesso strato di gengiva aderente.

In base alle sue caratteristiche istologiche e morfologiche la gengiva è suddivisa in: gengiva libera (marginale e interdentale) e gengiva aderente.

La *gengiva libera*, di colore rosa corallo, ha superficie opaca, consistenza compatta e comprende il tessuto gengivale nei versanti vestibolari e linguali/palatali dei denti e la gengiva interdentale. Nelle facce vestibolari e linguali dei denti si estende dal margine gengivale in direzione apicale fino alla depressione gengivale libera situata allo stesso livello della giunzione amelo-cementizia. Il margine gengivale libero è spesso arrotondato in modo tale che fra dente e gengiva, in stretto contatto tra loro, si formi una leggera invaginazione che dopo l'eruzione dentaria, in condizioni fisiologiche, ha una profondità compresa tra 0,5-2 mm ed è clinicamente sondabile con una sonda parodontale millimetrata. La gengiva interdentale forma le papille interdentali e la sua forma è determinata dal decorso della giunzione amelo-cementizia, dai punti di contatto fra i denti e dall'ampiezza delle loro superfici approssimali. Per la presenza delle papille interdentali, il margine gengivale libero decorre sulla dentatura con un andamento festonato più o meno accentuato.

La *gengiva aderente* è delimitata in direzione coronale dalla depressione del solco gengivale libero e si estende in direzione apicale fino alla linea muco-gengivale, dove continua con la mucosa di rivestimento alveolare. Mostra un colore rosa corallo che dipende dal grado di cheratinizzazione, dallo spessore dell'epitelio e dalla presenza di pigmentazioni, ha consistenza compatta grazie al ricco contenuto di fibre collagene e mostra spesso una superficie punteggiata che le conferisce l'aspetto a buccia d'arancia causata dalle inflessioni epiteliali nel connettivo sottostante (Schroeder et al 1992); la punteggiatura può essere ben rappresentata, spessa e fitta (*biotipo spesso*) o meno rappresentata, sottile e scarsa (*biotipo sottile*) (Müller & Eger 1996, Müller et al 2000). La gengiva è saldamente adesa all'osso alveolare e al cemento sottostante mediante l'inserzione d'innomerevoli fibre connettivali. **(Figura 2)**

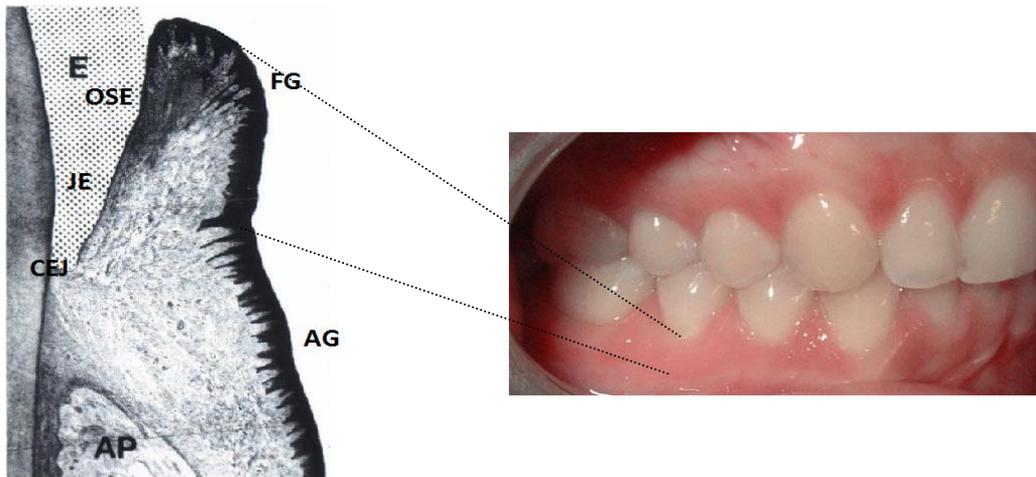


Figura 2 Struttura della gengiva: sezione vestibolo-linguale passante per il colletto dentale che illustra le caratteristiche del rapporto gengivo-dentale. AG: gengiva aderente; FG: gengiva libera; OSE: epitelio orale del solco; JE: epitelio giunzionale; E: smalto dentale; AP: processo alveolare; CEJ: giunzione amelocementizia.

(A sinistra immagine tratta da Berkovitz B.K. The periodontal ligament in health and disease. Pergamon Press, Oxford 1982; a destra immagine personale).

1.1.2 Parodonto profondo:

- **LEGAMENTO PARODONTALE**

Il legamento parodontale è una struttura connettivale, che collega il cemento radicolare all'osso alveolare, composta da un complesso di cellule, fibre nervose e vasi sanguigni e linfatici, immersi in una matrice extracellulare prevalentemente formata da fasci di fibre connettivali. È situato tra l'osso alveolare proprio e il cemento radicolare e lo spazio in cui si dispone ha un'ampiezza di circa 0,25 mm e una forma di clessidra con un restringimento situato a circa metà radice. **(Figura 3)**

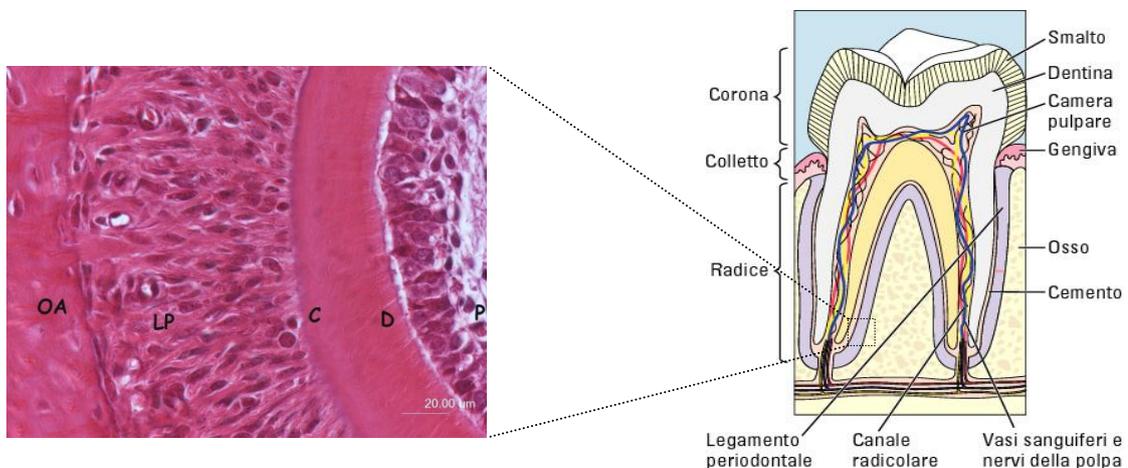


Figura 3 Elemento dentario con relativo apparato di supporto e particolare raffigurante la struttura del legamento parodontale: OA: osso alveolare, LP: legamento parodontale, C: cemento; D: dentina; P: polpa. (A sinistra immagine personale; a destra immagine tratta da Marieb EN. Elementi di anatomia e fisiologia dell'uomo. Zanichelli, Bologna 2001).

Il dente è unito all'osso mediante fasci di fibre collagene che possono essere divisi in quattro gruppi principali in base alla loro disposizione (Ciancio et al 1967):

- 1) Fibre della cresta alveolare: decorrono dalla porzione sopracrestale della radice fino alla cresta alveolare;
- 2) Fibre orizzontali: situate nella porzione più coronale del legamento;
- 3) Fibre oblique: decorrono dalla radice in direzione coronale fino all'osso alveolare;
- 4) Fibre apicali: decorrono dall'apice della radice fino al fondo dell'alveolo con vari orientamenti. **(Figura 4)**

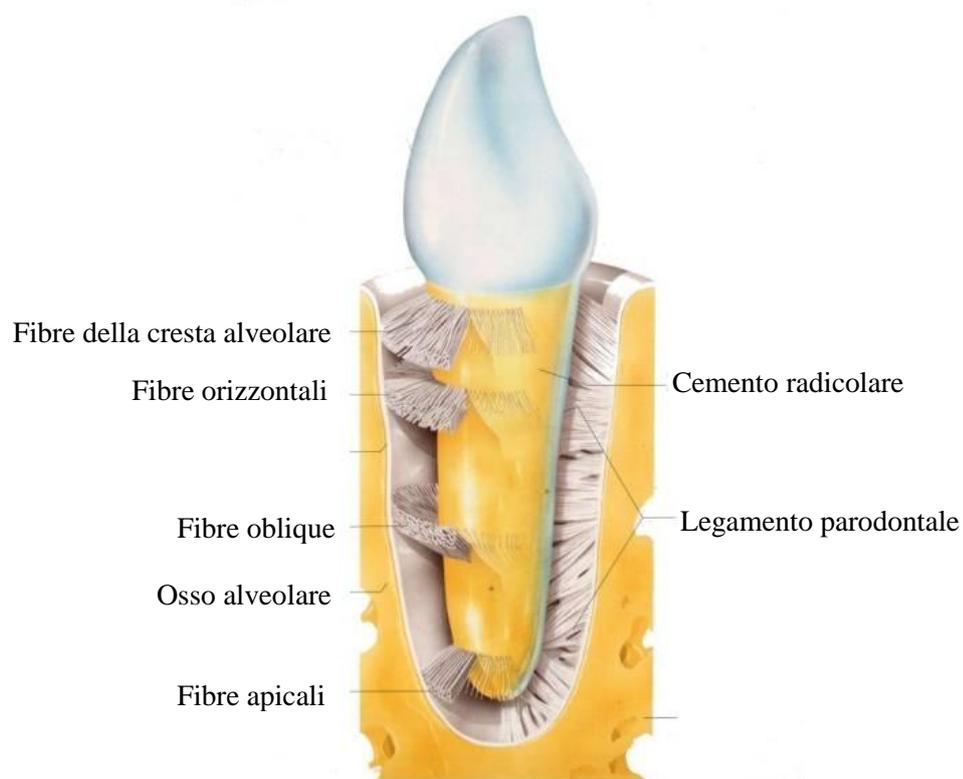


Figura 4 Rappresentazione delle fibre collagene che costituiscono il legamento parodontale.
(Immagine tratta da Cattaneo L, Baratta L. La bocca. Novartis 1985).

Queste fibre, dette anche fibre principali, si sviluppano contemporaneamente all'eruzione del dente e il loro orientamento varia continuamente durante tutta la fase di eruzione; solo quando il dente ha raggiunto il contatto in occlusione ed è realmente funzionante, queste fibre si associano in gruppi ben orientati nello spazio (Marks & Schroeder 1996). Queste strutture vanno infine incontro a un rimodellamento costante cioè al riassorbimento delle fibre vecchie e alla formazione delle nuove. Le fibre principali che penetrano nel cemento e nell'osso alveolare proprio vengono chiamate fibre di Sharpey (Feneis et al 1952). **(Figura 5)**

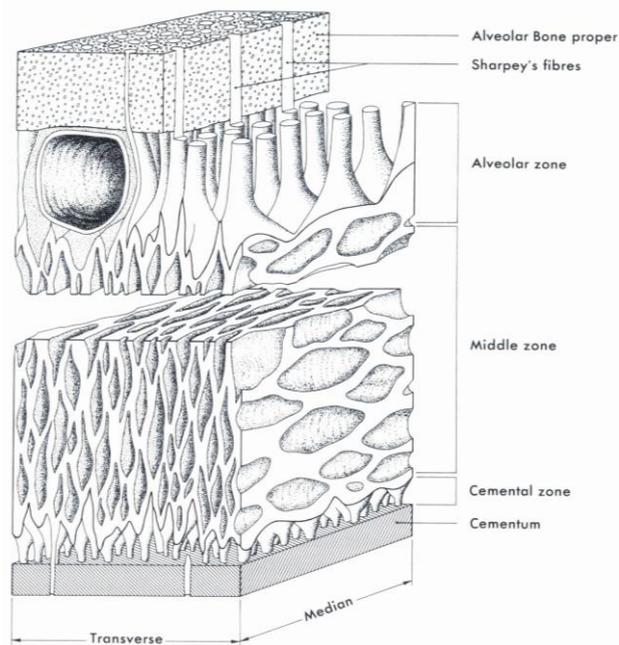


Figura 5 Fibre di Sharpey che si inseriscono nell'osso alveolare e nel cemento.

(Immagine tratta da Berkovitz B.K. The periodontal ligament in health and disease. Pergamon Press, Oxford 1982).

Inoltre il legamento parodontale contiene alcune fibre elastiche associate a vasi sanguigni e fibre ossitalaniche (Carmichael et al 1966, Fullmer et al 1974). La funzione delle fibre principali è quella di resistere alle forze di masticazione: la pressione esercitata sul dente porta ad uno stiramento dei fasci di fibre convertendo la pressione masticatoria in un'azione di trazione sul cemento e sull'osso. Questa proprietà è fondamentale per consentire l'apposizione di nuovo osso durante lo sviluppo e il rimodellamento dinamico.

La popolazione cellulare del legamento parodontale è principalmente rappresentata da fibroblasti, osteoblasti, cementoblasti, cellule epiteliali (residui del Malassez), fibre nervose, cellule endoteliali, macrofagi, eosinofili e mastocellule.

Le principali funzioni svolte dal legamento parodontale sono la distribuzione e assorbimento, da parte del processo alveolare, delle forze sviluppate durante la masticazione e i contatti fra i denti e rendere possibile i movimenti dentali fisiologici (Georgescu et al 1974).

In uno studio condotto da Berkovitz et al (1982) sugli incisivi inferiori di ratto, erotti e non erotti, in base alla quantificazione di alcune strutture del legamento parodontale quali fibroblasti, fibre ossitalaniche e fibre collagene, si notò un aumento del numero dei microtubuli nei fibroblasti, dei desmosmomi e una diminuzione della sostanza amorfa della matrice extracellulare nei denti non erotti. Gli autori conclusero che il legamento parodontale può andare incontro a importanti cambiamenti di funzione, turnover e di proprietà biomeccaniche senza subire considerevoli modificazioni strutturali.

- **CEMENTO RADICOLARE**

Il cemento è un tessuto calcificato specializzato che ricopre le superfici della radice dei denti e, occasionalmente, piccole porzioni della corona. Esso non contiene vasi sanguigni o linfatici, non ha innervazione, ma è caratterizzato da una continua deposizione lungo l'arco della vita. Come altri tessuti mineralizzati è costituito da fibre collagene contenute in una matrice organica. La sua composizione prevede una componente organica, una inorganica e acqua; la componente organica è formata da collagene, prodotto dai fibroblasti del legamento, proteine ossee, glicoproteine, e fosfatasi alcalina (enzima che regola la mineralizzazione); la componente inorganica è per il 65% idrossiapatite, sono presenti anche tracce di fluoruri, zolfo, rame, zinco e sodio (Selvig et al 1997).

Si distinguono principalmente quattro tipi di cemento (Bosshardt & Schroeder 1991, 1992, Bosshardt & Selvig 1997): acellulare a fibre estrinseche, cellulare a stratificazione mista, cellulare a fibre intrinseche e cemento acellulare afibrillare.

- *Cemento acellulare a fibre estrinseche (CAFE)*. Si trova nelle porzioni coronali e intermedie della radice e contiene principalmente fasci di fibre di Sharpey. Si forma in concomitanza della formazione della radice e dell'eruzione del dente; è il primo strato che viene depositato sulla superficie della dentina durante la cementogenesi e consiste essenzialmente di strati di fibre collagene immerse in una sostanza amorfa (Bosshardt et al 1991). Rappresenta una parte importante dell'apparato di attacco e connette il dente all'osso alveolare proprio.

- *Cemento cellulare a fibre miste (CCFM)*. Si forma dopo l'eruzione del dente e in risposta alle domande funzionali; viene depositato sopra il cemento primario durante il periodo funzionale del dente e ricopre normalmente il terzo apicale della radice apponendosi sul cemento acellulare. Contiene fibre estrinseche ed intrinseche e cementociti.

- *Cemento cellulare a fibre intrinseche (CCFI)*. Si riscontra soprattutto nelle lacune di riassorbimento e contiene fibre intrinseche e cementociti.

- *Cemento acellulare afibrillare (CAA)*. Si forma sul bordo cervicale dello smalto, si sviluppa dopo il termine della maturazione pre-eruttiva dello smalto a volte ancora durante l'eruzione del dente. È composto principalmente da cementoblasti.

Il cemento diversamente dall'epitelio non è sottoposto a continuo turnover ma si ispessisce nell'arco di tutta la vita, a diverse velocità, mediante l'apposizione. A seguito di un trauma per trazioni ortodontiche o quant'altro si può, però, assistere ad una diminuzione focalizzata sottoforma di lacune di riassorbimento; queste carenze vengono riparate, spesso solo parzialmente, grazie al CCFI.

Il cemento permette l'inserzione delle fibre del legamento parodontale alla superficie del dente, consentendo quindi la funzionalità di questo sofisticato sistema di distribuzione delle forze che agiscono sul dente. La neoapposizione di cemento nelle zone apicali e apico-distali compensa i fisiologici movimenti dentali legati all'usura del punto di contatto e della superficie occlusale.

- **OSSO ALVEOLARE**

Struttura:

È quella parte delle ossa mascellari che forma e sostiene l'alveolo dentario.

È formato per i 2/3 da parte inorganica, strutturale e di sostegno, composta in massima parte da idrossiapatite di calcio; la restante parte è costituita da parte organica ossia fibre collagene tipo I immerse in una sostanza amorfa di glicoproteine e proteoglicani.

Le pareti degli alveoli sono rivestite da *osso compatto* (osso alveolare proprio), spesso 0,1-0,4 mm, che rappresenta una sottile lamina dura sulla quale si inseriscono le fibre del legamento parodontale, mentre l'area tra gli alveoli è occupata da *osso spugnoso*. (**Figura 6**)

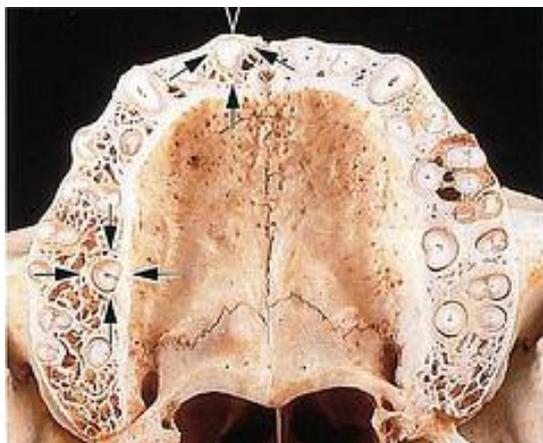


Figura 6 Sezione trasversale dei processi alveolari mascellari; le pareti degli alveoli sono rivestite da osso compatto (freccette).
(Immagine tratta da Lindhe J. Parodontologia clinica e odontoiatria impiantare. Edi-Ermes IV ed. Milano 2006).

L'osso alveolare proprio è perforato da numerosi canali di Volkmann, attraverso i quali i vasi sanguigni e linfatici nonché le fibre nervose passano dall'osso alveolare al legamento parodontale. Le fibre collagene del legamento parodontale sono inserite nell'osso che riveste la parete dell'alveolo del dente; quest'osso è chiamato *osso fascicolato* e le porzioni delle fibre collagene che sono inserite dentro all'osso fascicolato sono chiamate fibre di Sharpey (Feneis et al 1952) e sono frequentemente mineralizzate.

Morfologia:

La morfologia dell'osso alveolare dipende da più variabili: la posizione, lo stato di eruzione, la forma e la grandezza della radice. In un dente normo-allineato, completamente erotto e sottoposto a stimoli meccanici non patologici, il margine della cresta alveolare segue normalmente il contorno delle linee di giunzione smalto-cemento, proseguendo con un decorso festonato vestibolarmente e lingualmente; l'osso interprossimale a livello dei denti anteriori avrà un aspetto piramidale, mentre a livello dei molari sarà piatto in direzione vestibolo-linguale.

Metabolismo osseo:

Il processo alveolare si sviluppa in concomitanza con la formazione e l'eruzione dei denti e viene gradualmente riassorbito se i denti sono persi. Inizialmente l'osteogenesi è determinata dalla deposizione di sali di calcio in aree di matrice connettivale vicine alla gemma dentale in formazione. Si vengono così a creare delle zone di osso immaturo separate le une dalle altre da matrice non calcificata. All'interno di queste masse mineralizzate si creano delle lacune che vengono popolate da osteoblasti, da osteoclasti e da cellule progenitrici.

Gli osteoblasti elaborano una sostanza non mineralizzata nota come osteoide formata da fibre collagene e da una matrice che contiene glicoproteine e proteoglicani. Nel momento in cui si ha una nuova apposizione di osteoide, la vecchia osteoide, localizzata sotto la superficie, mineralizza ed il fronte di mineralizzazione avanza; questa matrice osteoide va incontro a calcificazione attraverso una deposizione di minerali quali calcio e fosfati, che in seguito vengono trasformati in idrossiapatite. Durante il processo di maturazione e di calcificazione dell'osteoide alcuni osteoblasti vi vengono intrappolati e in seguito, nel tessuto osseo calcificato, essi vengono chiamati osteociti.

L'osso, durante tutto il corso della vita, va incontro a processi di crescita apposizionale e a rimodellamento dipendenti dalle esigenze funzionali del dente in via di sviluppo e di eruzione (Jäger et al 1989, Kanagawa et al 1989). Sia l'osso corticale che l'osso spugnoso sono costantemente rimodellati: durante il processo di rimodellamento le trabecole ossee vengono continuamente riassorbite e riformate e la massa di osso corticale viene dissolta e rimpiazzata da nuovo osso; questi fenomeni consentono l'adattamento dell'osso ai movimenti dei denti (Klingler et al 1976). Durante il disfacimento dell'osso corticale si formano dei canali di riassorbimento per mezzo della proliferazione di vasi sanguigni. Tali canali, che al loro centro contengono vasi sanguigni, vengono in seguito riempiti con nuovo osso tramite la formazione

di lamelle disposte in strati concentrici intorno al vaso sanguigno. Si ristabilisce quindi un nuovo sistema Haversiano.

Il riassorbimento dell'osso è sempre associato agli osteoclasti, grosse cellule multinucleate che stimolano questo fenomeno attraverso sistemi di digestione enzimatica (Baumhammers et al 1965, John et al 1966). Gli osteoclasti sono mobili, in grado di migrare sulla superficie ossea e riassorbono sia la sostanza organica che quella inorganica. Gli osteoclasti attivi aderiscono alla superficie dell'osso e creano degli spazi chiamati lacune di Howship, vengono cioè formati canali di riassorbimento. **(Figura 7)** Successivamente compaiono osteoblasti che iniziano a riempire il canale con lamelle concentriche depositando nuovo osso e formando una nuova unità strutturale ossea.

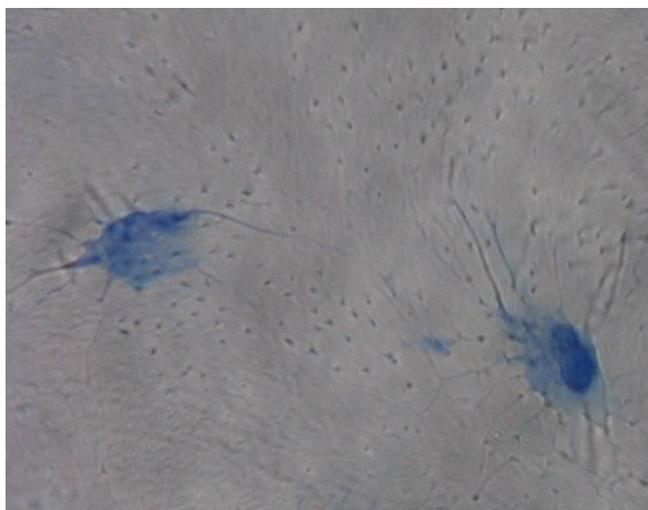


Figura 7 Lacune di Howship: sono visibili i prolungamenti degli osteociti. Ingrandimento 600x; blu di Toluidina e Pironina G. (Immagine personale).

Anche alcune cellule del legamento parodontale sono attivamente coinvolte nel metabolismo dell'osso alveolare; queste, infatti, esprimendo alcuni geni coinvolti nella regolazione delle funzioni degli osteoclasti e nella loro differenziazione (osteoprotegerina e RANK-L), possono modulare il processo di osteoclastogenesi (Wada et al 2001, Kanzaki et al 2001, Wescott et al 2007).

L'osso si dimostra così essere un tessuto dinamico; il bilancio tra l'attività delle cellule addette alla sua formazione, gli osteoblasti, e le cellule addette al suo riassorbimento, gli osteoclasti, determina la fase positiva o negativa della crescita ossea. Il rapporto fra apposizione e riassorbimento è funzione di più variabili, principalmente rappresentate da forze meccaniche.

1.2 Istologia del tessuto gengivale

Da un punto di vista istologico sia la gengiva libera che quella aderente sono costituite da: epitelio di rivestimento, lamina basale e tessuto connettivo detto anche lamina propria.

1.2.1 Tessuto epiteliale

Si tratta di un epitelio squamoso stratificato che può essere suddiviso in base al grado di differenziazione cellulare in quattro strati (Listgarten et al 1972):

-strato basale detto anche strato germinativo dove sono presenti cellule cuboidali con alta capacità mitotica unite alla lamina basale per mezzo degli emidesmosomi;

-strato spinoso che contiene più strati di cellule di grandi dimensioni e di forma rotondeggiante contenenti tonofilamenti e granuli di melanina e connesse tra loro da ponti intracellulari che hanno l'aspetto di spine;

-strato granuloso costituito da più strati di cellule contenenti granuli di cheratojalina, che si pensa svolgano un ruolo nel processo di cheratinizzazione insieme ai tonofilamenti dello strato spinoso;

-strato corneo formato da cellule con tendenza alla desquamazione e spesso prive di nucleo, ma ripiene di cheratina la cui quantità determina il grado di cheratinizzazione dell'epitelio che può essere differenziato in ortocheratinizzato, non cheratinizzato e paracheratinizzato. Nel primo caso le cellule più superficiali perdono il nucleo, nel secondo caso conservano le loro funzioni vitali e nel terzo caso conservano residui nucleici. **(Figura 8)**

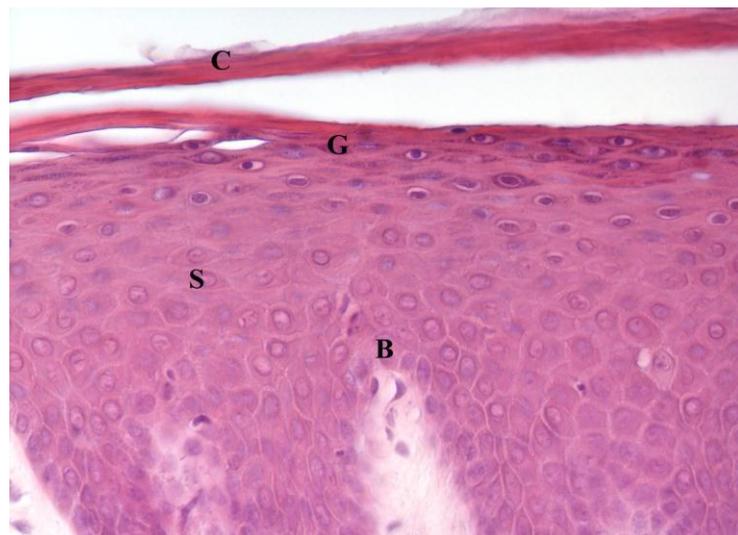


Figura 8 Epitelio pavimentoso pluristratificato cheratinizzato. Strato basale (B), spinoso (S), granuloso (G), corneo (C).

Ingrandimento 400x; Ematossilina-Eosina. (Immagine personale).

Le cellule dell'epitelio gengivale si rinnovano velocemente, circa ogni 20 giorni, riproducendosi nello strato basale e nella parte più profonda dello strato spinoso e spostandosi successivamente verso la superficie dove rimpiazzano le cellule esfoliate.

Il tessuto epiteliale gengivale può essere suddiviso come segue:

Epitelio orale: formato da un epitelio di tipo pavimentoso pluristratificato e da un sottostante stroma connettivale; l'unione tra i due è estremamente interdigitata, permettendo una più ampia superficie di contatto e un miglior apporto nutrizionale. Le porzioni di connettivo che si proiettano nell'epitelio sono dette papille connettivali, e sono separate le une dalle altre da creste epiteliali dette digitazioni epiteliali (Schroeder et al 1966). Le caratteristiche depressioni che determinano l'aspetto a "buccia d'arancia" corrispondono ai punti di fusione fra le creste epiteliali.

Oltre alle cellule che producono cheratina (il 90% della popolazione cellulare), nell'epitelio orale si ritrovano anche: *melanociti*, *cellule di Langerhans*, *cellule di Merkel*, *cellule infiammatorie*.

Epitelio sulcolare orale: è quella porzione di epitelio gengivale che guarda la superficie del dente senza esserne in diretto contatto e differisce dal primo per la mancanza di corneificazione e la netta diminuzione di creste papillari. Si tratta quindi di un epitelio squamoso stratificato non cheratinizzato caratterizzato da soli due strati cellulari: basale e spinoso.

Epitelio giunzionale: è la parte di epitelio gengivale aderente al dente; differisce morfologicamente dall'epitelio orale e dall'epitelio sulcolare, i quali invece sono fra loro, strutturalmente, molto più simili.

Le cellule dell'epitelio giunzionale sono organizzate in uno strato basale e in alcuni strati sovrabasali. Le cellule basali e sovrabasali risultano appiattite con l'asse maggiore parallelo alla superficie del dente. L'epitelio giunzionale può contrarre rapporti organici sia con la superficie dello smalto sia con la superficie del cemento attraverso l'interposizione di una lamina che è strutturalmente molto simile alla lamina basale, interfaccia tra epitelio e tessuto connettivo. Quest'ultima garantisce un corretto fissaggio dei due tessuti e controlla il passaggio delle sostanze. È composta da molecole proteiche e polisaccaridiche prodotte dalle cellule dello strato basale epiteliale ed è compenetrata da fibre reticolari, fibre collagene e emidesmosomi per mezzo dei quali è realizzata l'adesione tra la superficie dello smalto e le cellule epiteliali.

1.2.2 Tessuto connettivo

È la componente predominante della gengiva ed è costituito principalmente da fibre collagene (65%), fibroblasti (5%) e vasi e nervi (35%) immersi in una matrice amorfa.

Componente cellulare:

Fibroblasti: rappresentano il 65% della popolazione cellulare, sono responsabili della produzione dei differenti tipi di fibre presenti, ma anche indispensabili nella sintesi della matrice extracellulare. Presentano una morfologia fusiforme o stellata, con nucleo ovale e il loro citoplasma presenta il reticolo endoplasmatico rugoso ben sviluppato, il complesso di Golgi di grandezza considerevole e i mitocondri sono larghi e numerosi.

Mastociti: localizzati in prossimità di vasi sanguigni, sono caratterizzati dalla produzione di sostanze vasoattive sul sistema microvascolare. I mastociti sono anche responsabili della produzione di alcune componenti della matrice. All'esame microscopico si osserva un complesso di Golgi ben sviluppato e la presenza d'innomerevoli vescicole contenenti enzimi proteolitici, istamina ed eparina.

Macrofagi: hanno funzioni sia fagocitiche che di sintesi; derivano dai monociti circolanti nel sangue e il loro compito è quello di ingerire sia cellule danneggiate sia materiale estraneo, che vengono fagocitati nel citoplasma intracellulare e qui degradati.

Granulociti neutrofili: sono presenti, anche in una gengiva sana, a livello dell'epitelio giunzionale. Presentano un nucleo lobulato e numerosi lisosomi a livello citoplasmatico.

Linfociti: si ritrovano nella zona adiacente all'epitelio giunzionale e svolgono le funzioni di riconoscimento di sostanze estranee all'ospite (antigeni), produzione anticorpi, mediazione della risposta dell'ipersensibilità ritardata e sono i depositari della memoria immunologica. Sono cellule piccole, rotondeggianti e possiedono un nucleo denso, circondato da uno scarso citoplasma contenente pochi ribosomi.

Plasmacellule: localizzate attorno ai vasi sanguigni contengono un nucleo sferico localizzato eccentricamente e distribuito casualmente nel citoplasma si trova un reticolo endoplasmatico con numerosi ribosomi. Inoltre il citoplasma contiene un gran numero mitocondri e un complesso di Golgi ben sviluppato.

L'epitelio giunzionale contenente un numero esiguo di emidesmosomi, permette il passaggio di queste cellule infiammatorie dal connettivo al solco.

Componente extracellulare:

Comprende una porzione amorfa e una porzione fibrillare. La sostanza amorfa è formata da due grandi famiglie di macromolecole ad alto peso molecolare: i proteoglicani e le glicoproteine, immerse in una soluzione di acqua e sali minerali. La matrice è il mezzo in cui sono contenute le cellule del tessuto connettivo ed è essenziale per il mantenimento delle sue normali funzioni quali il trasporto d'acqua, elettroliti, fattori nutritivi, metaboliti, ecc., da e verso le singole cellule connettivali (Bartold et al 1995).

Le fibre del tessuto connettivo sono prodotte dai fibroblasti e costituiscono l'impalcatura per la matrice extracellulare fungendo anche da connessione tra i componenti della matrice stessa e le cellule. Possono essere divise in: fibre reticolari numerose nella zona del tessuto adiacente alla membrana basale, all'interfaccia tra epitelio e tessuto connettivo; fibre elastiche presenti nel tessuto connettivo della gengiva e del legamento parodontale principalmente in associazione con i vasi sanguigni e costituite da elastina e fibrillina; fibre ossitalaniche numerose nel legamento parodontale ma dalla funzione ancora sconosciuta (Carmichael et al 1966, Fullmer et al 1974). Infine troviamo le fibre collagene che predominano nel tessuto connettivo gengivale e costituiscono le componenti essenziali del parodonto. Sebbene siano di solito distribuite in modo irregolare, la maggior parte ha la tendenza ad unirsi in fasci con una precisa disposizione strutturale in base alla quale vengono divisi in quattro gruppi:

1. **fibre circolari:** decorrono nella gengiva libera e circondano il dente ad "anello";
2. **fibre dentogengivali:** si proiettano a ventaglio dal cemento sopralveolare in direzione coronale verso la gengiva libera, inserendosi a livello della membrana basale;
3. **fibre dentoperiostali:** si proiettano a ventaglio dal cemento sopralveolare in direzione apicale verso la gengiva aderente decorrendo sopra le creste ossee;
4. **fibre transettali:** originano dal cemento di due denti adiacenti e decorrono rettilinee attraversando il setto interdentale, al di sopra dell'osso alveolare.

1.3 Malattia parodontale

1.3.1 Definizione ed eziopatogenesi

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

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

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

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

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

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

La parodontite cronica si sviluppa nell’individuo, in modo graduale, da una gengivite a partire dal 30-40esimo anno di età. Entrambe le arcate dentarie possono essere colpite se si tratta di una forma generalizzata, ma più frequentemente si ha una diffusione irregolare e localizzata con interessamento prima dei molari e poi degli incisivi. Clinicamente la gengiva mostra un’inflammatione disomogenea, talvolta si nota una riduzione mentre altre volte un ispessimento fibroso, edema, eritema, sanguinamento al sondaggio e si può notare alle volte suppurazione.

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

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

I parametri clinici vengono riportati nella tabella sottostante:

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

Tabella 1 Parametri clinici per la diagnosi di parodontite cronica forma lieve/moderata e forma grave.

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

Microbiologia

L’agente eziologico della malattia parodontale è il deposito di specifici batteri definito *placca batterica*. Si ritiene che l’accumulo di tali depositi porta, con modalità riproducibili, ad una risposta infiammatoria da parte dei tessuti gengivali associati (Socransky & Haffajee 1991, Sanz et al 2005), infatti la rimozione meccanica di questi dalle superfici orali non esfolianti è

il mezzo principale per prevenire la malattia. Questi batteri sono acquisiti precocemente nella vita e si ritiene che siano trasmessi dai genitori, principalmente la madre, ai figli o all'interno della coppia (van Winkelhoff & Boutaga 2005). La risposta infiammatoria indotta dai batteri da un lato svolge un'azione protettiva nei confronti del nostro organismo, ostacolando l'invasione dei batteri all'interno dei tessuti, dall'altro, se persiste ed è mal regolata, porta alla distruzione irreversibile del parodonto (Page 1991, Madianos et al 2005).

La placca viene definita come un deposito microbico naturale costituente un *biofilm* che contiene batteri immersi in una matrice intermicrobica, adesa alla superficie del dente e rimovibile attraverso sonda o specillo e composta da polimeri batterici extracellulari e prodotti di essudazione salivari e gengivali (Listgarten 1994). La biopellicola fornisce un ambiente protettivo per i batteri e favorisce il loro metabolismo come non sarebbe possibile se essi si trovassero allo stato libero (Schaudinn et al 2009).

Inizialmente la placca dentale veniva considerata come una biomassa che, producendo una varietà di fattori irritanti, come acidi ed endotossine, distruggeva i tessuti di sostegno dei denti, senza considerare biologicamente rilevanti le differenze della sua composizione (ipotesi della placca non specifica) (Theilade et al 1986). In seguito è stata focalizzata l'attenzione sugli specifici batteri che determinavano la risposta infiammatoria ed è stato scoperto che la tendenza delle zone infiammate a subire una distruzione permanente di tessuto è di natura specifica in quanto non tutte le lesioni causate da gengivite progredivano in parodontite. Alcuni studi hanno indicato un più alto rischio di distruzione parodontale in siti colonizzati da determinati patogeni piuttosto che altri (ipotesi della placca specifica) (Loesche et al 1979).

Sono circa 600 le specie batteriche riscontrate nel cavo orale e 415 quelle identificate a livello sottogengivale in associazione a placca dentale. I patogeni che sono stati identificati più frequentemente includono tre specie aerobiche: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e *Eikenella corrodens* e sette specie anaerobiche: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium*, e spirochete (Socransky et al 1994).

In seguito fu evidenziato che l'associazione di questi batteri all'interno delle biopellicole non è casuale: sono stati fino ad ora riconosciuti sei gruppi di specie batteriche strettamente associate e definiti come complessi di vario colore in base agli aspetti clinici derivanti dalla loro colonizzazione (Socransky et al 1998). I primi colonizzatori delle superfici dentali sono le specie batteriche appartenenti ai gruppi:

giallo costituito da sei specie del genere *Streptococcus*;

verde il cui rappresentante principale è il sierotipo A dell'*Actinomices Actinomycetemcomitans* riclassificato, ad oggi, come *Aggregatibacter Actynomycetemcomitans*;

porpora formato da *Veillonella Parvula* e *Actynomices Odontolyticus*; gruppo delle specie **Actinomyces**.

I complessi arancione e rosso, prevalentemente Gram-negativi, costituiscono i principali agenti eziologici delle malattie parodontali e colonizzano, invece, le superfici dentali per ultimi. I rappresentanti principali del complesso **arancione** sono *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella Intermedia* i quali precedono la colonizzazione da parte delle tre specie, strettamente correlate, *Tenerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* che formano il complesso **rosso**. Quest'ultimo gruppo è correlato alla profondità delle tasche parodontali e al sanguinamento al sondaggio quindi alla progressione della malattia. Inoltre negli ultimi sette anni di ricerca sono emersi come agenti parodonto patogeni vari Herpes virus (Slots et al 2003), come ad esempio il citomegalovirus umano (HCMV) e l'Epstein-Barr virus (EBV-1) (Zhang et al 2004).

Meccanismi di patogenesi

Una caratteristica della parodontite comune a molte malattie infettive è che anche se una specie colonizza l'ospite quest'ultimo può non manifestare le caratteristiche cliniche della malattia per diversi periodi di tempo. L'agente patogeno, infatti, è un fattore necessario ma non sufficiente perché si verifichi lo stato di malattia (Page et al 1997). L'instaurarsi e la progressione della malattia dipende infatti dalla manifestazione simultanea di molti fattori (Socransky & Haffajee 1992, 1993). L'ospite deve essere suscettibile sia a livello locale che sistemico (Genco et al 1986, Williams et al 1990), l'ambiente locale deve favorire l'espressione dei fattori di virulenza da parte del patogeno e deve inoltre contenere specie batteriche che incrementino l'infezione o comunque non inibiscano l'attività del patogeno e infine il patogeno deve essere presente in una minima dose effettiva tale da iniziare o causare la progressione dell'infezione.

Un patogeno parodontale deve essere in grado di:

- 1) colonizzare l'area sottogengivale,
- 2) produrre fattori che danneggino direttamente o indirettamente, tramite il rilascio di sostanze istolesive, il tessuto dell'ospite.

Colonizzare significa aderire, aggregarsi, moltiplicarsi ed adattarsi alle condizioni ambientali, competere con successo contro altri batteri presenti e superare i meccanismi di difesa dell'ospite.

Adesione: sulla superficie batterica sono presenti numerose molecole chiamate “adesine”, tra cui le fimbrie (Cisar et al 1984) e delle proteine associate alle cellule (Murray et al 1988), capaci di aderire sui recettori specifici presenti sulle cellule dell'ospite.

Coaggregazione: fenomeno per cui alcune specie batteriche aderiscono ad altri batteri attaccati alle superfici dell'ospite.

Moltiplicazione: i batteri devono essere capaci di moltiplicarsi nonostante le condizioni avverse offerte dagli ambienti parodontali come la limitata disponibilità di fattori nutritivi, la temperatura compresa tra i 30 e i 38°C (Haffajee et al 1992), il pH abbastanza ristretto (Forscher et al 1954) e il potenziale ossido riduttivo che rende difficile la sopravvivenza di alcune specie batteriche (Onisi et al 1960).

Relazioni interbatteriche: esistono delle interazioni vantaggiose per i batteri come la produzione da parte di alcune specie sottogengivali di fattori di crescita specifici utilizzati da altre specie o la presenza di alti livelli di ossigeno disponibile sulle superfici esterne e bassi livelli all'interno della placca dovuti all'intensa capacità di riduzione di molte specie sottogengivali, e interazioni svantaggiose tra cui la produzione di sostanze antagoniste come le batteriocine e gli acidi organici (Mashimo et al 1985) che rappresentano un ostacolo per i patogeni.

Invasione del tessuto: l'invasione delle cellule epiteliali è una proprietà comune di una vasta gamma di patogeni della mucosa, ma i meccanismi con cui avviene variano da specie a specie. Inizialmente si verifica un'invasione intercellulare seguita da un'invasione intracellulare nei fibroblasti, cellule epiteliali ed endoteliali, all'interno delle quali i patogeni si moltiplicano e diffondono nel tessuto circostante tramite il meccanismo di lisi cellulare (Listgarten et al 1964). *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* mettono in atto un'invasione molto veloce rispetto ad altre specie (circa 25/30 minuti) (Saglie et al 1988).

I meccanismi di difesa dell'ospite e delle capacità immunomodulative dei batteri verranno approfonditi in seguito.

1.3.2 Insorgenza e progressione

La maggior parte delle forme di malattia parodontale è rappresentata da disturbi associati alla placca che iniziano come infiammazione della gengiva che, se non trattata, può in certi individui suscettibili, diffondersi e coinvolgere porzioni più profonde del parodonto

In letteratura si riconoscono due tipi di gengive sane: 1) stato “*integro*”, che istologicamente non presenta infiltrati infiammatori; 2) stato “*cl clinicamente sano*”, che a livello clinico non presenta alterazioni, ma a livello istologico è caratterizzato dalla presenza di neutrofili e macrofagi a livello dell’epitelio giunzionale e di linfociti, soprattutto polimorfonucleati (PMN), nel tessuto connettivo sottostante (Page et al 1976); in questo stadio l’infiltrato infiammatorio rappresenta il 5% del volume totale del tessuto connettivo. Si può notare inoltre un aumento delle strutture vascolari e l’iniziale perdita di fibre collagene nell’area infiltrata del connettivo. La gengiva clinicamente sana grazie ad alcuni fattori di difesa riesce a fronteggiare l’attacco dei microbi senza arrivare allo stadio di malattia; tra i fattori di difesa ricordiamo la funzione fagocitica dei macrofagi e neutrofili, la regolare esfoliazione delle cellule epiteliali, la funzione di barriera costituita dall’epitelio integro, l’azione di rimozione meccanica dei microrganismi non adesi alla superficie dentale da parte dei fluidi del solco gengivale e l’effetto antimicrobico degli anticorpi.

Un’ulteriore deposizione di placca porta allo sviluppo della *gengivite conclamata* che clinicamente è caratterizzata da edema, gonfiore, arrossamento del margine gengivale, sanguinamento al sondaggio, perdita di aderenza gengivale e incremento del flusso del fluido crevicolare. In questo stadio clinico i segni sono reversibili se si procede alla rimozione della placca microbica con efficaci misure in grado di controllarla (Loe et al 1965). Istologicamente si nota un marcato aumento dei leucociti reclutati nella zona (Attstrom et al 1971), conseguente alla chemiotassi dei sistemi dell’ospite, ai prodotti derivati dal biofilm batterico come ad esempio i lipopolisaccaridi e all’iper-regolazione pro infiammatoria, mediata dalle citochine, delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali quali ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare) ed ELAM-1 (molecola di adesione leucocito-endoteliale) che spingono i leucociti ad aderire alle venule postcapillari e a cominciare a migrare, attraverso i vasi, verso il solco gengivale.

Nel 1976 Page e Schroeder classificarono la progressione dell’infiammazione gengivale in base a risultati istopatologici e clinici dei loro studi. Riconobbero quattro stadi nell’ambito della lesione in via di progressione:

- 1. Lesione iniziale** si presenta rapidamente, all'incirca dopo 2-4 giorni di accumulo di placca;
 - caratteristiche istologiche: alterazioni del plesso micro vascolare quali vasculite e vasodilatazione, con conseguente aumento della permeabilità; infiltrazione dell'epitelio giunzionale da parte dei polimorfonucleati mentre i linfociti vengono trattenuti nel connettivo e iniziale perdita di collagene a livello perivascolare come sopra citato;
 - caratteristiche cliniche: aumento del flusso del fluido crevicolare.
- 2. Lesione precoce** si manifesta dopo 7 giorni di accumulo di placca;
 - caratteristiche istologiche: si ha un aumento numerico dei vasi sottoepiteliali, l'infiltrato infiammatorio occupa il 15% del tessuto connettivo e le cellule predominanti sono rappresentate dai linfociti insieme ai polimorfo nucleati (Listgarten et al 1973); si nota la continua degenerazione dei fibroblasti e la loro rimozione dall'area permette una maggiore infiltrazione da parte dei leucociti (Page et al 1976).
 - caratteristiche cliniche: iperemia, formazione di una biopellicola in sede sottogengivale.
- 3. Lesione stabilizzata** se l'accumulo di placca persiste tra i 14 e i 21 giorni;
 - caratteristiche istologiche: le plasmacellule rappresentano la popolazione cellulare predominante in questo stadio in cui continua la perdita di collagene sia in direzione apicale che laterale, a favore dell'espansione dell'infiltrato infiammatorio e vi è una costante fuoriuscita dei granulociti neutrofili dal solco gengivale. L'epitelio dentogengivale subisce delle modificazioni che portano alla formazione di una tasca gengivale il cui epitelio risulta permeabile al passaggio di sostanze dentro e fuori i tessuti connettivi sottostanti;
 - caratteristiche cliniche: aumento dell'edema tissutale.
- 4. Lesione avanzata** o parodontite vera e propria;
 - caratteristiche istologiche: la persistente azione irritativa della placca determina la progressiva migrazione apicale dell'epitelio giunzionale e il concomitante approfondimento della tasca che diventa una vera e propria nicchia ecologica anaerobica per la proliferazione batterica. La lesione avanzata differisce in maniera sostanziale dalla lesione stabilizzata per l'interessamento dell'osso alveolare, che si retrae per allontanarsi dai batteri, e il notevole danno alle fibre

del connettivo. Gli elementi cellulari predominanti sono le plasmacellule che insieme ai leucociti costituiscono il 30% dell'infiltrato.

Il riassorbimento osseo è mediato da sostanze batteriche come i lipopolisaccaridi (LPS) e gli acidi lipoteiconici (LTA), che provocano il rilascio di citochine, mediatori dell'infiammazione, fattori di crescita (ad esempio Bone Morphogenetic Protein BMP) e fattori locali, come PGE2 e MMP, che stimolano direttamente l'attività degli osteoclasti o agiscono indirettamente sui pre-osteoclasti aumentando il pool delle cellule deputate al riassorbimento. Queste sostanze batteriche e i mediatori dell'ospite rivelano l'inibizione diretta o la modulazione degli osteoblasti che concorrono alla formazione dell'osso (Schwartz et al 1997). Sembra, inoltre, che nelle fasi acute della parodontite la distruzione ossea possa essere stimolata e favorita direttamente dai prodotti batterici come LPS e LTA e dai peptidoglicani.

-caratteristiche cliniche: si tratta di una lesione irreversibile, clinicamente riscontrabile con infiammazione gengivale, sanguinamento al sondaggio e formazione di tasche e/o recessioni gengivali. Il cambiamento dell'ecosistema dovuto alla presenza di tasche, dove i batteri possono annidarsi e proliferare indisturbati, attribuisce a tale lesione la capacità di autoalimentarsi; la progressione della malattia è quindi continua ma si alterneranno momenti di quiescenza a momenti di esacerbazione con attiva distruzione tissutale. Inoltre ciascun sito della bocca rappresenta un microambiente specifico ed individualizzato ossia, in uno stesso individuo, la gravità della lesione parodontale varia da dente a dente e, a volte, da una superficie dentale all'altra. La sito specificità è quindi un'altra caratteristica peculiare della parodontite (Lindhe et al 1984).

1.3.3 Interazione tra ospite e micro-organismi patogeni

La distruzione dei tessuti parodontali, come detto, non è causata esclusivamente dai batteri parodontopatogeni bensì dalla reciproca influenza instaurata tra parassita e ospite, che permette di innescare dei meccanismi di autodistruzione; la patogenicità dei microrganismi è infatti correlata tanto alla virulenza dei batteri stessi quanto ai sistemi di difesa innati e adattativi dell'ospite.

1.3.3.1 Fattori di virulenza microbici

Alla base del meccanismo tramite cui i batteri parodontopatogeni riescono a causare e sostenere la malattia parodontale vi sono delle sostanze, definite fattori di virulenza, prodotte o espresse dai batteri stessi, che direttamente o indirettamente sono dannose per l'ospite. Alcune di queste sostanze possono danneggiare direttamente le cellule e i tessuti parodontali, altre possono determinare l'eccessiva attivazione dei sistemi di difesa dell'ospite che danneggiano secondariamente il parodonto. Il principale effetto nocivo è rappresentato dalla risposta immunitaria dell'ospite contro gli antigeni presentati dai microbi (Baker 2000, Taubman et al 2005).

Questi fattori sono capaci di stimolare sia la risposta infiammatoria che immunitaria; essi attivano i mediatori chimici dell'infiammazione che favoriscono la permeabilità vascolare e stimolano attraverso azioni di chemiotassi le cellule infiammatorie a muoversi all'interno dei tessuti e le cellule difensive a produrre citochine e agenti pro infiammatori (Lindhe et al 1972, Helldén et al 1972). Stimolano inoltre il rilascio di sostanze effettrici dell'attività tossica da parte dei macrofagi come il TNF (fattore di necrosi tumorale) e IL-1 (interleuchina 1), e determinano l'attivazione del complemento per la via alternativa con la produzione di alcune proteine C3a e C5a che svolgono una funzione pro infiammatoria. È riconosciuto, inoltre, il ruolo induttivo da parte dei batteri parodonto patogeni sui livelli delle *metalloproteasi* dell'ospite di cui discuteremo in seguito.

1.3.3.2 Processi di difesa dell'ospite

I meccanismi di difesa dell'ospite possono essere suddivisi in due grandi famiglie:

- 1) Risposte innate o non specifiche**
- 2) Risposte adattative o specifiche**

Le prime comprendono le barriere meccaniche delle superfici epiteliali e la risposta infiammatoria. Le cellule dell'epitelio giunzionale svolgono diverse funzioni in tal senso; in primo luogo, in stato di salute, sono strettamente adese alla superficie dentale e costituiscono la prima barriera che si oppone all'ingresso dei patogeni, in secondo luogo il continuo processo di esfoliazione a cui sono sottoposte tali cellule rende difficoltosa la colonizzazione batterica, inoltre le cellule epiteliali sono in grado di liberare citochine (IL-1, IL-8, TNF) e altre molecole con azione nociva mirata ai batteri, stimolare o rinforzare la reazione infiammatoria e aumentare l'espressione di molecole di superficie con azione chemiotattica (ICAM-1, ELAM-1). Anche la saliva e il fluido crevicolare svolgono una funzione protettiva sia per la loro azione meccanica sia per il contenuto di sostanze come la lattoferrina, gli

anticorpi, le proteasi, gli agenti antibatterici salivari e le proteine del complemento che sono nocive per la crescita batterica e possono risultare battericide.

Le *proteasi* sono gli enzimi protagonisti nei processi distruttivi della malattia parodontale. Riconosciamo le endopeptidasi che scindono i legami presenti nelle catene polipeptidiche dei loro substrati e le esopeptidasi che invece agiscono nella porzione terminale della catena polipeptidica.

Le *metallo proteinasi* (MMP) della matrice sono responsabili del rimodellamento e della degradazione dei componenti della matrice in particolar modo del collagene (Meikle et al 1964, Kowashi et al 1979).

Le citochine sono invece delle proteine solubili che agiscono da messaggeri di segnali tra le cellule. Esse regolano la crescita e la differenziazione cellulare e innescano e sostengono la risposta infiammatoria. Le *citochine* pro infiammatorie sono l'interleuchina 1a (IL-1a), l'interleuchina 1b (IL-1b), il fattore di necrosi tumorale (TNF α) e l'interleuchina 6 (IL-6) ed hanno un ruolo chiave nella distruzione tissutale: esse stimolano il riassorbimento osseo. L'interleuchina 8 (IL-8), invece, è una chemochina, prodotta dai monociti, importante nel reclutamento delle cellule di difesa nelle aree in cui è necessaria la loro presenza (Abbas et al 1996, Gemsa et al 1997). Recentemente è stata studiata una nuova interleuchina (IL-17) che sembrerebbe essere coinvolta nella patogenesi della malattia parodontale (Garley & Jablonska 2008). Si tratta di una citochina proinfiammatoria, prodotta dai PMN, che stimola la produzione di altri mediatori, come IL-6 e MMP e induce la degradazione dei tessuti parodontali (Ohyama et al 2009). Questa citochina sembra essere inoltre coinvolta nei processi di riassorbimento osseo indotti dall'espressione da parte degli osteoblasti del ligando RANKL che induce la differenziazione dei monociti in osteoclasti (Kotake et al 1999, Dellavia et al 2011). Si riconoscono due sottotipi di IL-17: IL-17A ad azione anti-infiammatoria e IL-17B ad azione pro-infiammatoria (Garley & Jablonska 2008). **(Tabella 2)**

Citochine pro-infiammatorie	Origine	Cellule bersaglio	Effetti
IL-1	Macrofagi	Cellule T	Stimolazione del rilascio di IL-2
		Cellule B	Proliferazione
		Osteoclasti	Differenziazione dei precursori degli osteoclasti in osteoclasti maturi
		Cellule endoteliali	Aumento della permeabilità vascolare
IL-6	Macrofagi Linfociti T	Plasmacellule	Proliferazione
		Cellule B	Proliferazione
		Osteoblasti	Aumento dell'espressione di RANKL stimolando il riassorbimento osseo
IL-17	PMN	Osteoblasti	Aumento dell'espressione di RANKL stimolando il riassorbimento osseo
		Macrofagi	Produzione di IL-6 e MMP
TNFα	Macrofagi Linfociti T	PMN	Attivazione e reclutamento
		Macrofagi	Stimolazione e induzione della sintesi di IL-1
		Osteoclasti	Differenziazione dei precursori degli osteoclasti in osteoclasti maturi
Chemochine	Origine	Cellule bersaglio	Effetti
IL-8	Macrofagi Fibroblasti Cellule T	PMN	Attivazione e chemiotassi
		Leucociti	Attivazione e chemiotassi
Citochine immuno-regolatrici	Origine	Cellule bersaglio	Effetti
INFγ	Cellule T Cellule NK	Macrofagi	Attivazione
		Cellule NK	Induzione dell'espressione delle molecole MHC classe I e II
IL-5	Cellule T	Eosinofili	Attivazione
		Cellule B	Proliferazione e attivazione delle cellule B
IL-10	Cellule T	Cellule B	Attivazione
IL-12	Macrofagi	Cellule T	Proliferazione e attivazione delle cellule T
		Cellule NK	Attivazione
Citochine anti-infiammatorie	Origine	Cellule bersaglio	Effetti
IL-10	Cellule T Macrofagi	Macrofagi	Inibizione
		Cellule T	Inibizione
TGFβ	Cellule T Monociti	Cellule citotossiche	Inibizione della maturazione
		Macrofagi	Inibizione

Tabella 2 Le citochine e i loro effetti

Le *prostaglandine E2* (PGE2) sono delle amine vasoattive derivate dall'acido arachidonico e sono importanti mediatori dell'infiammazione. Esse agiscono sui fibroblasti e sugli osteoclasti stimolando la produzione di MMP, inducono la produzione di citochine pro infiammatorie da parte di varie cellule e stimolano il riassorbimento osseo.

I *leucociti polimorfonucleati* sono altri attori fondamentali dei meccanismi di difesa innati; sono i leucociti predominanti nel solco gengivale sia in condizione di salute che di malattia e sono reclutati in risposta a fattori chemiotattici presenti a livello del solco o prodotti da batteri presenti nella biopellicola (Moughal et al 1992). I PMN rappresentano la prima linea di difesa presente nel solco gengivale e ciò è dimostrato dal fatto che pazienti con disfunzioni a carico dei neutrofili presentano lesioni parodontali più gravi. Nei granuli primari e secondari contengono degli enzimi lisosomiali quali l'elastasi e la lattoferrina in grado di distruggere i tessuti parodontali una volta riversati nell'ambiente extracellulare. Inoltre queste cellule hanno un'azione fagocitica nei confronti dei parodontopatogeni e sono coinvolte nella sintesi e secrezione di molecole proinfiammatorie. Questi leucociti svolgono quindi un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia parodontale essendo coinvolti nel processo infiammatorio, che quando efficace può interrompere lo sviluppo della malattia e prevenire la successiva stimolazione antigenica e i processi immunitari più distruttivi.

La risposta dell'ospite ai fattori rilasciati dalla placca microbica coinvolge una serie di meccanismi effettori diversi, attivati dalla risposta immunitaria innata; questi meccanismi rappresentano una prima linea di difesa e possono risultare insufficienti ad eliminare un patogeno. A tale scopo viene in seguito attivata la risposta immunitaria adattativa, che rappresenta una seconda linea di difesa che migliora le capacità dell'ospite nel riconoscere il patogeno.

Le **risposte adattative** comprendono le risposte immunologiche e sono le più efficaci in quanto realizzate specificatamente contro il patogeno che esprime un particolare antigene.

Risposta immunitaria cellulo mediata: inizia con la penetrazione dell'antigene della placca microbica all'interno del tessuto connettivo. A questo livello l'antigene viene processato dalle cellule presentanti l'antigene (cellule di Langerhans, macrofagi e cellule dendritiche) e reso riconoscibile da parte del sistema immunitario (complesso MHC). La cellula T helper riconosce il legame tra l'antigene e il proprio MHC e ne viene stimolata a proliferare e sintetizzare citochine. Queste citochine regolano la maggior parte dei sistemi dell'immunità adattativa che intervengono nella malattia parodontale. Le cellule effettrici T helper sono presenti come Th1 e Th2 e si differenziano per la produzione di citochine (Mosmann et al 1986). Le Th1 producono l' IL-2, IFN- γ e il TNF- α . Queste citochine sono in grado di attivare

le cellule T citotossiche che sorvegliano i microrganismi in grado di penetrare nelle cellule dell'ospite ossia virus e batteri invasivi. Le cellule Th2 sono invece coinvolte nella risposta cellulare umorale. Di recente scoperta è una nuova classe di cellule (Th17), produttrici della famiglia delle sopra citate IL-17, che sembra essere direttamente coinvolta nella patogenesi dei danni tissutali cellulo-mediati (Steinman et al 2007).

È stato dimostrato che gli stadi iniziali delle lesioni parodontali sono caratterizzati sostanzialmente da un aumento dei livelli di cellule T helper e macrofagi, mentre gli stadi avanzati da un aumento dei livelli di cellule B e plasmacellule (Page and Schroeder 1976).

Risposta cellulare umorale: rappresentata dai diversi anticorpi diretti contro particolari microrganismi orali; essi sono capaci di opsonizzare i diversi batteri e legarsi strettamente alle fimbrie, prevenendo la colonizzazione batterica. Le cellule Th2 producono l'IL-4, IL-5 e IL-6 che attivano e stimolano la differenziazione delle cellule B in plasmacellule. Queste ultime producono gli anticorpi specifici o immunoglobuline all'interno dei fluidi quali, il fluido crevicolare e il plasma e in queste sedi riconoscono e legano l'antigene. Tramite questo legame l'anticorpo attiva differenti sistemi effettori, ad esempio il complemento, che, a sua volta media la migrazione e la fagocitosi da parte dei polimorfonucleati e dei macrofagi che eliminano in questo modo gli antigeni. Oltre alle azioni che vedono gli anticorpi congiunti al complemento e ai polimorfonucleati, gli anticorpi agiscono aggregando e agglutinando i microrganismi ed evitando l'adesione dei batteri all'epitelio. Mentre nella gengivite la quota preponderante dell'infiltrato infiammatorio è rappresentata dai macrofagi e PMN, nella parodontite avanzata essa è rappresentata dalle cellule B e dalle plasmacellule; è ragionevole pensare, quindi, che le funzioni delle cellule Th2 siano maggiori rispetto a quelle dipendenti dalle cellule Th1 nella malattia parodontale (Yamazaki et al 1994; Tokoro et al 1997).

1.3.3.3 Fattori di rischio della parodontite cronica

Con il termine "fattore di rischio" si intende un aspetto dello stile di vita, un'esposizione ambientale oppure una caratteristica innata o ereditaria, di cui è nota, sulla base di evidenze epidemiologiche, l'associazione con una data malattia. In un soggetto che presenta uno o più fattori di rischio si ha un aumento della probabilità di contrarre la malattia o delle possibilità di andare incontro ad un peggioramento (Haffajee 1991).

Oltre ai già citati fattori di rischio batterici che rappresentano una *conditio sine qua non* per l'insorgenza e la progressione della parodontite cronica, esistono dei fattori legati all'ospite che vengono suddivisi in imm modificabili, o genetici, e modificabili.

Diverse ricerche in ambito genetico hanno indicato che il rischio di parodontite cronica presenta una forte componente ereditaria (Michalowicz et al 1991, Yilmaz et al 1993, Hart et al 1994). Attualmente numerose indagini stanno cercando di identificare i geni e i polimorfismi associati a tutte le forme di parodontite. Dagli studi sui nuclei familiari e sui gemelli e dalle analisi del DNA già da tempo è stato riconosciuto il ruolo dei difetti dei PMN nella parodontite cronica (Michalowicz et al 1991, Hart et al 1994).

Per quanto concerne i fattori di rischio modificabili si possono distinguere fattori di rischio sistemici e locali. Tra i primi si riconoscono le malattie sistemiche di cui sopra, fumo, stress, farmaci, livello sociale, ambiente e nutrizione; mentre i principali fattori di rischio locali sono la diminuzione o l'alterazione della composizione della saliva, la respirazione orale, gli stimoli esogeni meccanici, chimici e termici, i traumi occlusali e le parafunzioni.

Fumo di tabacco e stress sono due fattori di rischio sistemici di particolare attualità nella società contemporanea:.

In letteratura vi sono forti indicazioni sull'esistenza di un'associazione positiva tra fumo di tabacco e la parodontite cronica, come attestato da molti studi trasversali e longitudinali condotti nel corso degli anni (Kinane & Chestnutt 2000, Johnson et al 1999). Non solo il fumo aumenta il rischio che si sviluppi la malattia ma anche la risposta alla terapia parodontale risulta alterata nei fumatori (Schenkein et al 1995). Inoltre i segni e i sintomi della malattia, quali arrossamento e sanguinamento gengivale, sono mascherati dall'attenuazione dell'infiammazione indotta dal fumo; sono state osservate maggiori profondità di sondaggio, di perdita di attacco e di osso di supporto in soggetti fumatori rispetto ai non fumatori e l'entità di distruzione tissutale risulta correlata alla durata ed alla quantità di tabacco usato nelle sue diverse forme (Shizukuishi 2007). I meccanismi d'azione del fumo di sigaretta e dei suoi prodotti derivati dalla combustione della nicotina sono stati descritti da Palmer e coll. (2005) in una revisione della letteratura in occasione del 5° Workshop della Federazione Europea di Parodontologia; in questa si evidenzia la stretta relazione esistente tra fumo ed effetti sul sistema immunitario e sui meccanismi dell'infiammazione. Inoltre tramite studi istologici sono state evidenziate numerose alterazioni vascolari a livello dei tessuti parodontali di pazienti fumatori: ridotto livello di citochine proinfiammatorie, enzimi e PMN, alterazione della proliferazione e adesione fibroblastica, alterazione della chemiotassi e fagocitosi e abnorme rilascio di proteasi dalle cellule neutrofile che vengono così coinvolte nel riassorbimento osseo (Yanbaeva et al 2007).

Sulla base di queste evidenze scientifiche risulta fondamentale l'impegno dell'odontoiatra nel chiarire al paziente fumatore tutti gli effetti nocivi che il fumo comporta sia a livello di salute orale che sistemica, nonché i benefici derivanti dall'abbandono di tale abitudine.

Per quanto riguarda lo stress, alcuni ricercatori hanno ipotizzato, e a seguito dimostrato, che l'alterazione della risposta infiammatoria nella malattia parodontale è causata da fattori psicologici come stress, ansia e depressione (Breivik et al 2000). Diversi sono gli studi clinici osservazionali ed epidemiologici in cui viene descritta la correlazione tra stati psicologici negativi e insorgenza della malattia parodontale (Monteiro da Silva et al 1996, Moss et al 1996, Genco et al 1998).

È stato dimostrato che in situazioni di iperattivazione del sistema allostatico, vengono rilasciate alte concentrazioni di ormone adrenocorticotropo, da parte dell'ipotalamo, e di glucorticoidi, da parte della corteccia surrenalica. In particolare questi ultimi, hanno un importante ruolo immunosoppressivo attraverso la riduzione del numero dei linfociti circolanti, dei monociti e degli eosinofili e mediante l'inibizione della migrazione di macrofagi e neutrofili. I corticosteroidi comportano inoltre, una alterazione del complesso sistema di produzione delle citochine, variano l'attività regolatrice dell'interleuchina 12 ed il bilancio fra interleuchina 10 e il TNF, e agiscono su altri meccanismi dell'infiammazione come l'attività NK, la fagocitosi e l'attività citotossica delle cellule T (Reiche et al 2004).

Tuttavia è necessario considerare alcuni bias presenti, negli studi oggi disponibili, sui rapporti esistenti fra stress e malattia parodontale come ad esempio la disomogeneità dei criteri adottati per l'analisi della malattia parodontale, così come risulta evidente una certa difficoltà nell'isolare tutte le variabili presenti nei campioni esaminati (Farneti et al 2011). Non è disponibile inoltre nessun marcatore biologico, o altro strumento oggettivamente stimabile, che possa valutare con sicurezza la maggior parte dei disturbi psichiatrici (Menezes 2000).

1.3.4 Correlazione con condizioni sistemiche

Negli ultimi anni la ricerca sul parodonto si è focalizzata sulle possibili correlazioni esistenti tra malattia parodontale e rischio di malattie sistemiche. Numerose evidenze scientifiche dimostrano che la parodontite può causare cambiamenti all'interno dell'intero organismo; quindi possiamo sostenere che nel concetto di salute generale si debba includere anche quella orale e parodontale. Questa nuova area di ricerca viene chiamata "medicina parodontale".

La parodontite può avere effetti sistemici *diretti* o *indiretti*; i primi tramite la disseminazione dei batteri patogeni, mentre i secondi tramite il contributo da parte dell'infiammazione locale all'infiammazione sistemica.

I batteri parodontopatogeni sono causa di gravi infezioni sistemiche quali ad esempio ascessi cerebrali (Ewald et al 2006, Marques et al 2004), infezioni polmonari (Latronica & Shukes 1973, Suzuki & Delisle 1984, De Soyza et al 2000), infezioni cardiache o di protesi endovascolari od ortopediche. In uno studio di Sandros et al (1994) si è dimostrato che i batteri parodontopatogeni sono in grado di penetrare nei tessuti gengivali e a seguito diffondere per via ematica o respiratoria e insediarsi in organi lontani dal cavo orale provocando un'infezione.

Studi rivolti alla comprensione dei meccanismi indiretti, hanno invece dimostrato che nel paziente parodontopatico si riscontra, oltre alla già conosciuta infiammazione locale, un aumento dell'infiammazione a livello ematico con un incremento dei livelli di granulociti neutrofilici circolanti e di parametri sistemici di infiammazione come la proteina C-reattiva. Si è inoltre notato un miglioramento dell'infiammazione sistemica e a seguito di terapia parodontale confermando il ruolo della parodontite quale aggravante dell'infiammazione sistemica (D'Aiuto et al 2006). In questo contesto le lesioni parodontali possono essere considerate come dei veri e propri serbatoi non solo di antigeni batterici e batteri Gram negativi, ma anche di citochine e molti altri mediatori dell'infiammazione.

Queste premesse rappresentano il punto a partire dal quale si sono e, continuano a susseguirsi, una serie di studi, clinici ed epidemiologici, per comprendere le patologie sistemiche correlate alla malattia parodontale, i meccanismi alla base di queste correlazioni e i possibili risvolti in ambito diagnostico e terapeutico.

1.3.4.1 Diabete mellito

Il Diabete Mellito è un disordine metabolico caratterizzato da iperglicemia dovuta a problemi di secrezione/funzione dell'insulina; rappresenta una delle più importanti e diffuse malattie croniche, circa 180-200 milioni di persone al mondo ne sono affette (Zimmer 2001, King 1998). La classificazione dell'American Diabetes Association del 2005 differenzia quattro tipi di diabete in base al criterio eziologico: **tipo 1** dovuto alla distruzione delle β cellule che porta ad un' insufficiente produzione di insulina; **tipo 2** prevalentemente associato ad un' aumentata resistenza all'insulina cui può anche associarsi un deficit relativo dell'ormone; diabete di **tipo 3** che riconosce eziologie specifiche varie (genetiche, farmacoindotte, infettive, ecc.); diabete **tipo 4** definito anche diabete gestazionale ossia una intolleranza al glucosio che si verifica in concomitanza della gravidanza.

Recenti ipotesi associano le infiammazioni croniche subcliniche all'instaurarsi di insulino resistenza (diabete tipo 2). Le infezioni orali, come sopra delucidato, innescano un'

infiammazione che determina una cascata di eventi tra cui l'aumento della produzione di citochine, l'attivazione delle proteine di fase acuta e conseguentemente l'insulino resistenza che porta a delle variazioni patologiche che possono risultare in diabete tipo 2 (Amar et al 2003). Alcuni ricercatori hanno riscontrato in pazienti diabetici (tipo 1 e tipo 2) la presenza di cinque specie parodontopatogene (*A. actynomicetmcomitans*, *E. corrodens*, *T. denticola*, *C. albicans* e *P. gingivalis*) in misura nettamente superiore rispetto alle altre; tuttavia non sono state trovate correlazioni statisticamente significative.

La parodontite è, inoltre, una frequente complicanza del diabete tipo 1, 2 e 4; numerosi studi hanno riscontrato una maggiore prevalenza di parodontiti tra pazienti diabetici tipo 1, 2 e 4 rispetto a pazienti non diabetici, altri studi, sia longitudinali che cross-over, hanno indicato l'esistenza di una relazione bidirezionale tra le due patologie e l'evidenza che la parodontite sia un fattore di rischio per il diabete tipo 2 e lo sviluppo delle parodontite sia una complicanza del diabete rafforza ulteriormente questa ipotesi. Il rischio per un soggetto diabetico di ammalare di parodontite viene stimato essere da due a tre volte maggiore rispetto a quello di un soggetto non diabetico adulto (Emrich 1991, Yalda 1994) e fino a cinque volte negli adolescenti e nei giovani.

Diversi studi hanno valutato le correlazioni esistenti tra citochine pro infiammatorie, proteine di fase acuta e lo sviluppo delle resistenze insuliniche e se questi mediatori influenzassero i livelli di glicemia. Gli autori di uno studio di coorte dell'84 di MONICA/KORA affermano che il diabete di tipo 2 è più frequente tra pazienti con elevati livelli di IL-18, proteina C reattiva e IL-6 e ciò suggerisce che la risposta infiammatoria può essere associata all'*insulino resistenza* e quindi lo sviluppo di diabete mellito tipo 2 (Thorand et al 2005). Un altro studio sperimentale invece dimostra gli effetti *iperglicemizzanti* di alcune citochine pro infiammatorie come IL-6 e TNF α . In un modello animale di omeostasi del glucosio, IL-6 riduce il rilascio di insulina nelle β cellule del pancreas e la somministrazione di IL-6 ricombinante nell'umano induce un aumento dose dipendente dei livelli di glicemia. TNF α , invece, sembra ridurre l'uptake e il metabolismo, a livello dei muscoli scheletrici, di glucosio alterando la trasduzione dei segnali indotti dall'insulina (Plomgaard et al 2005). Tuttavia da letteratura non sembrerebbero esistere effetti significativi indotti dal trattamento parodontale sul controllo glicemico.

Le modalità attraverso le quali il diabete favorisce l'insorgenza delle parodontiti, al contrario, non sono ancora perfettamente chiarite. Esiste, però, una significativa evidenza che alla base di questa associazione potrebbero esserci altri meccanismi, oltre a quelli associati alle più note complicanze del diabete mellito, come la ridotta funzionalità dei granulociti neutrofili

frequentemente presente nel diabete (Manouchehr-pour 1981), l'alterata modalità di guarigione delle ferite legata alle alterazioni micro vascolari che caratterizzano le principali problematiche fisiopatologiche del diabetico, la modificata omeostasi del collagene associata agli stati iperglicemici e l'alterata risposta infiammatoria.

Inoltre da letteratura non sembrerebbero esistere effetti significativi indotti dal trattamento parodontale sul controllo glicemico.

1.3.4.2 Malattie cardiovascolari

La malattia cardiovascolare (MCV) è una delle principali cause di mortalità nel mondo e la principale causa di morte in Europa e negli Stati Uniti. Il termine malattia cardiovascolare include ipertensione, malattie coronariche quali l'infarto miocardico acuto e l'angina pectoris, patologie che colpiscono le arterie periferiche e l'ictus. Tutte queste condizioni patologiche riconoscono un importante fattore eziologico comune nell'aterosclerosi. I processi infiammatori giocano un ruolo fondamentale nell'aterogenesi a partire dall'espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali, proseguendo con lo sviluppo della stria lipidica e stabilizzazione della placca ateromastica, fino alla rottura della placca stessa. Pazienti affetti da malattia parodontale condividono numerosi fattori di rischio con pazienti affetti da malattia cardiovascolare quali età, sesso maschile, stress, fumo e basso livello socio economico (Garcia et al 1998); inoltre una vasta rappresentanza di pazienti parodontopatici risultano affetti da patologie cardiovascolari (Nagao et al 1993). Queste osservazioni suggeriscono una possibile eziologia comune alle base delle due patologie. La domanda che ha spinto numerosi ricercatori ad investire delle risorse in molteplici studi è: la malattia parodontale può essere coinvolta nell'iniziazione/progressione dell'aterosclerosi e successivamente delle patologie cardiovascolari? È evidente che la risposta a questa domanda è fondamentale per capire se la terapia parodontale può prevenire l'insorgere o la progressione aterosclerosi o al contrario favorirla. Meurman et al (2004) hanno riscontrato un aumento del rischio di insorgenza di MCV in pazienti affetti da parodontite di circa il 20%. La correlazione tra infezione parodontale e MCV viene spiegata da vari autori attraverso cinque meccanismi specifici che possono svilupparsi indipendentemente o collettivamente:

- a) Effetti che i batteri esplicano direttamente sulle piastrine: è stato dimostrato che *P. gingivalis* e *S. sanguis* esprimono dei fattori di virulenza che inducono sia in vitro che in vivo l'aggregazione piastrinica (Herzberg et al 1998);
- b) Risposta autoimmune;

- c) Invasione o internalizzazione del batterio nelle cellule endoteliali e nei macrofagi: Deshpande et al (1998) dimostrarono che *P. gingivalis* è capace di invadere le cellule endoteliali dell'aorta e delle coronarie tramite le fimbrie sopra citate; inoltre sono state identificate specie parodontopatiche all'interno della placca ateromastica (Papapanou et al 2000, Cairo et al 2004, Fiehn et al 2005);
- d) Effetti endocrini sui mediatori pro infiammatori: in pazienti parodontopatici è stato evidenziato un aumento dei livelli sistemici dei mediatori pro infiammatori come la proteina C reattiva e il fibrinogeno (Lantz 1986, Kweider 1993, Ebersole et al 1997, Loos 2005);
- e) Alcune evidenze iniziali infine, suggeriscono che il controllo dell'infezione parodontale può esitare in un miglioramento dei livelli dei markers dell'infiammazione sistemica e della disfunzione endoteliale (Mattila et al 2002, D'Aiuto et al 2005).

Batteri o prodotti batterici circolanti possono raggiungere siti distanti. Come è stato dimostrato da Haraszthy et al (2000) in preparati ricavati da endoarterectomie ottenute da 50 pazienti sottoposti a endarterectomia carotidea, nel 44% delle lesioni era possibile evidenziare DNA batterico di almeno uno dei 4 patogeni parodontali ricercati (30% *Tannerella Forsithia*, 26% *Porphyromonas Gengivalis*, 18% *Aggregatibacter Actinomcetemcomitans*, 14% *Prevotella Intermedia*). In una recente pubblicazione dallo studio delle patologie coronarie e malattia parodontale (CORODONT, Spahr et al 2006), è stato mostrato che elevati livelli di alcuni patogeni parodontali (*A. Actinomicetemcomitans*, *T. Forsithia*, *P. Gingivalis*, *P. Intermedia* e *T. Denticola*) ed alti livelli di colonizzazione di *A. Actinomicetemcomitans*, erano significativamente associati con la malattia cardiovascolare in un' analisi multivariata corretta.

Secondo una revisione della letteratura, a cura di De Sanctis (2008), esistono sufficienti evidenze in grado di dimostrare che la malattia parodontale è associata con le lesioni indotte dall'arterosclerosi, anche se l'importanza nell'inizio e nella progressione della aterosclerosi deve essere ancora completamente chiarita.

1.3.4.3 Nascita prematura

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce "prematura" la nascita di un bambino vivo prima della 37° settimana, "molto prematura" prima della 32° settimana ed "estremamente prematura" prima della 28° settimana. L'eziologia del parto pre-termine è multifattoriale, riconducibile a molteplici fattori individuali, genetici ed ambientali tra cui razza nera, madre

giovane, violenza domestica, stress o depressione, stato socio-economico basso, fumo, cocaina, eroina, storia familiare e tanti altri. Da una recente revisione sistematica della letteratura sulla correlazione tra parodontiti e parto prematuro, effettuata da Xiong et al (2007), emergono dati discordanti; alcuni studi confermano, altri confutano l'esistenza di una relazione diretta tra i due fenomeni. Alcuni studi evidenziano che il miglioramento delle condizioni di igiene orale delle donne durante la gravidanza può ridurre il rischio di nascita pre-termine, allo stesso modo della terapia chirurgica parodontale; uno studio controllato e randomizzato di Michalowicz et al (2006) invece confuta l'esistenza di un legame causale tra parodontite e parto prematuro. Da un'altra recente revisione della letteratura a cura di Cortellini et al (2008) si evince che la malattia parodontale può essere associata ad un incremento del rischio di eventi negativi durante la gravidanza, ma l'evidenza attualmente disponibile è insufficiente per poter affermare con certezza che la terapia parodontale possa portare ad una significativa riduzione di tali eventi negativi.

Ci sono comunque delle evidenze che indicano che le malattie parodontali possono svolgere un ruolo aspecifico in diversi eventi negativi associati alla gravidanza e questo da un punto di vista eziopatogenetico potrebbe essere attribuito ad un incremento sistemico di citochine pro infiammatorie, causato dall'infezione parodontale, che può determinare modificazioni placentari che portano alla nascita pretermine (McGregor et al 1988) e alle frequenti batteriemie a cui possono essere soggette le donne gravide con problemi parodontali, che possono raggiungere i tessuti placentari costituendo una spinta infiammatoria all'induzione del travaglio (Offenbacher et al 1998).

1.3.5 Cenni di terapia

Gli obiettivi principali della terapia parodontale sono:

- 1) eliminare la placca batterica sopra e sottogengivale e i fattori di rischio correlati alla malattia;
- 2) arrestare la progressione della malattia;
- 3) ottenere uno stato di salute, comfort, funzione ed estetica dell'apparato masticatorio;
- 4) prevenire la riacutizzazione della malattia (AAP 2000).

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

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

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

una prima fase chiamata *Terapia causale*, atta a rimuovere l'agente microbico, seguita da vari *trattamenti chirurgici* al fine di ripristinare una corretta architettura dei tessuti parodontali. La terapia causale comprende: istruzioni di igiene orale, motivazione del paziente e rilevazione dell'indice di placca e di sanguinamento dello stesso. Successivamente si procede rimuovendo quanto più possibile il sistema chiuso del biofilm batterico presente sulle superfici radicolari. Questo trattamento può avvenire con strumenti meccanici, ad ultrasuoni, o manuali così come a "cielo coperto" o "aperto". Il tradizionale trattamento meccanico a cielo coperto viene praticato oggi con successo come levigatura radicolare in più sedute o tramite la "Full Mouth Therapy" (Quirynen et al 1995, De Sote et al 2001, Saxer 2002). Durante la levigatura le tasche parodontali vengono deterse con soluzioni disinfettanti come la Clorexidina.

È indispensabile rimuovere i fattori locali che contribuiscono alla progressione della parodontite cronica come otturazioni debordanti, restauri protesici incongrui, traumi occlusali, lesioni cariose e ripristinare i punti di contatto interdentali per evitare l'impacchettamento del cibo. La terapia causale comprende inoltre la rivalutazione del caso. Se le condizioni parodontali risultano migliorate a seguito della terapia causale è necessario programmare una terapia di mantenimento con sedute di igiene professionale ad intervalli di tempo opportuni. In alcuni casi però il mantenimento dell'igiene orale da parte del paziente risulta ostacolato da una sfavorevole architettura dei tessuti di supporto parodontali; diviene in questi casi necessario un intervento chirurgico al fine di arrestare la progressione della malattia e correggere la morfologia dei difetti ossei. A seconda del caso possiamo affidarci a tre tipologie differenti di intervento chirurgico:

1) Innesti gengivali, 2) Terapia rigenerativa, 3) Terapia resettiva. Possiamo infine ricorrere ad ulteriori trattamenti volti a ridurre i fattori di rischio come smettere di fumare e controllare i livelli glicemici.

1.4 Sistema endocannabinoide

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

I recettori cannabinoidi (CB) insieme agli endocannabinoidi costituiscono il sistema cannabinoide endogeno (ECS). Questo è stato definito come un complesso di neurotrasmettitori in grado di regolare l'eccitabilità neuronale e svolgere un ruolo centrale in numerose condizioni fisiopatologiche. Tale sistema, infatti, riveste grande importanza nel funzionamento dell'organismo, con implicazioni in svariati ambiti fisiologici tra cui integrazione e modulazione del dolore, funzioni mnestiche e cognitive, controllo della funzione motoria, regolazione del sistema immunitario e della risposta infiammatoria e modulazione del metabolismo osseo (Cota et al 1998, Di Marzo et al 2005).

1.4.1 Recettori cannabici

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

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

1.4.1.1 Recettori CB1

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

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

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

Nel sistema nervoso centrale i recettori CB1 sono prevalentemente presinaptici, suggerendo un loro ruolo generalmente inibitorio nella modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori (Tsou et al 1998). I recettori CB1 appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle G proteine, con i sette domini transmembrana, la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare (Howlett et al 1991) (**Figura 9**). Attraverso le G proteine di tipo inibitorio (Gi/Go), i recettori CB1 trasducono il segnale agendo su diversi effettori intracellulari. In particolare i cannabinoidi inibiscono l'adenilato ciclasi (Felder et al 1992, Gerard et al 1991), modulano alcuni canali ionici inducendo la chiusura dei canali del calcio voltaggio dipendenti e l'apertura di quelli del potassio rettificanti entranti e modulano l'attivazione di diverse proteine kinasi intracellulari: MAP (mitogen activated protein) kinasi (Amery 1998), specificatamente della famiglia di ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases type 1 and 2) e di JNK (c-jun N-terminalkinase), PKB (protein kinase B), FAK (Focal Adesion inase) e PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Howlett et al 2002).

1.4.1.2 Recettori CB2

Il recettore CB2 possiede un'omologia del 48% con il recettore CB1 (Munro et al.,1993) ed è principalmente localizzato nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti (Klein et al 1995, Schatz et al 1997). Anche il recettore CB2 trasduce il segnale mediante G proteine, ma conosce effettori solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1. In particolare, il recettore CB2 non è in grado di modulare i canali ionici, mentre, come il recettore centrale, è negativamente accoppiato all'adenilato ciclasi ed è in grado di attivare le MAP kinasi (Amery 1998). Recenti studi hanno rilevato l'espressione di mRNA del recettore CB2 anche a livello di alcune aree cerebrali come il cervelletto ed il midollo allungato. In quest'ultimo, l'immunoreattività del recettore CB2 è stata trovata nei neuroni all'interno del nucleo motorio dorsale del vago, nel nucleus ambiguous e nel nucleo trigemino spinale. Tramite l'uso di antagonisti selettivi del recettore CB2, i recettori del midollo allungato sono funzionalmente accoppiati all'inibizione

dell'emesi quando costimolati con i recettori CB1 da cannabinoidi endogeni in grado di attivare entrambi i recettori (Van Sickle et al 2005). Diverse evidenze scientifiche assegnano ai recettori CB2 capacità di ridurre sia l'infiammazione indotta sperimentalmente sia l'iperalgia di origine flogistica; inoltre, questi recettori identificati a livello delle cellule sia osteoblastiche che osteoclastiche, sembrano avere un ruolo rilevante nella regolazione endocrina del metabolismo osseo (Zimmer et al 2008).

Esistono preliminari evidenze farmacologiche dell'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali (recettore non-CB1 o CB3) per i cannabinoidi a livello del sistema nervoso centrale la cui caratterizzazione molecolare non è ancora stata definita (Breivogel et al 2001, Calignano et al 1998, 2001, Di Marzo et al 2000).

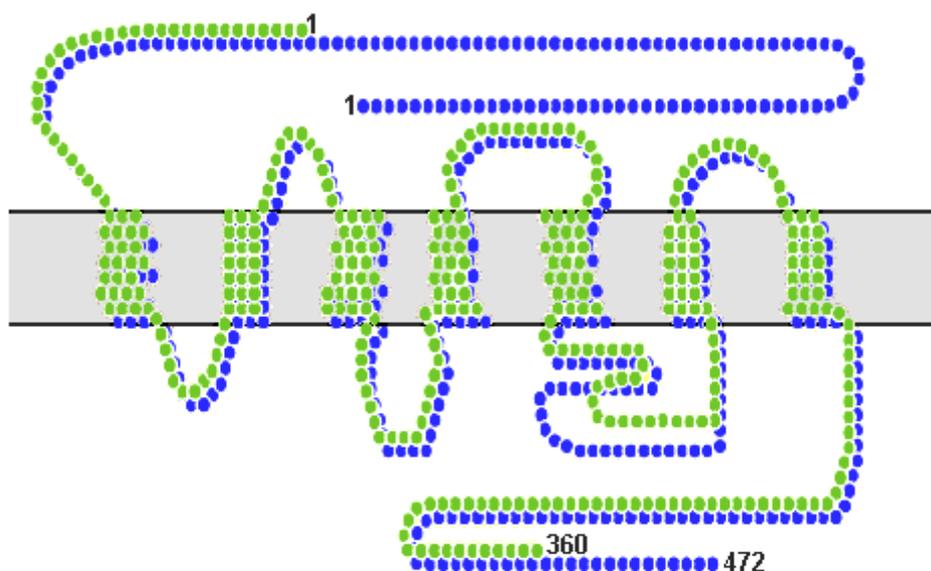


Figura 9 Struttura dei recettori CB1 e CB2. (Immagine personale).

1.4.2 Ligandi dei recettori cannabinici

1.4.2.1 Agonisti

La conoscenza della struttura primaria delle proteine recettoriali ha permesso nell'ultimo decennio lo sviluppo di numerosi composti agonisti per i due recettori cannabinici a partire da modifiche strutturali nella molecola del THC (delta-9-tetraidrocannabinolo). In base alla struttura chimica gli agonisti cannabinici vengono divisi in quattro gruppi: 1) i derivati benzopiranicici, come alcuni costituenti naturali della cannabis; 2) i composti biciclici il cui principale esponente è il CP-55940; 3) gli aminoalchilindoli; 4) i ligandi endogeni per i recettori cannabinici; identificati nel 1992 da estratti di cervello porcino essi comprendono

amidi ed esteri degli acidi grassi di cui i più studiati e caratterizzati sono l'anandamide e il 2-arachidonoilglicerolo (Devane et al 1992; Mechoulam et al 1995; Sugiura et al 1995).

1.4.2.2 Antagonisti

La ricerca nel campo dei cannabinoidi è progredita ulteriormente grazie alla sintesi di composti antagonisti selettivi per i due tipi di recettori cannabici CB1 e CB2. Il primo composto disponibile è stato l'SR141716A (rimonabant) (Rinaldi-Carmona et al 1992), antagonista ad alta affinità per il recettore centrale CB1. Nei test comportamentali l'SR141716A antagonizza pienamente i classici effetti indotti dai cannabinoidi, ma alcuni studi riportano una sua capacità di indurre effetti opposti a quelli degli agonisti cannabici, suggerendo un comportamento da agonista inverso (Bouaboua et al 1995). L'SR144528 è invece un antagonista selettivo ad altissima affinità per il recettore CB2. Un antagonista del recettore CB1, analogo all'SR141716A perché contenente un gruppo 4-iodiofenile al posto del 4-clorofenile, è l'AM251: esso mostra una più alta affinità per il recettore CB1 (Haller et al 2004, Pistis et al 2004, Rodgers et al 2005).

1.4.2.3 Endocannabinoidi

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

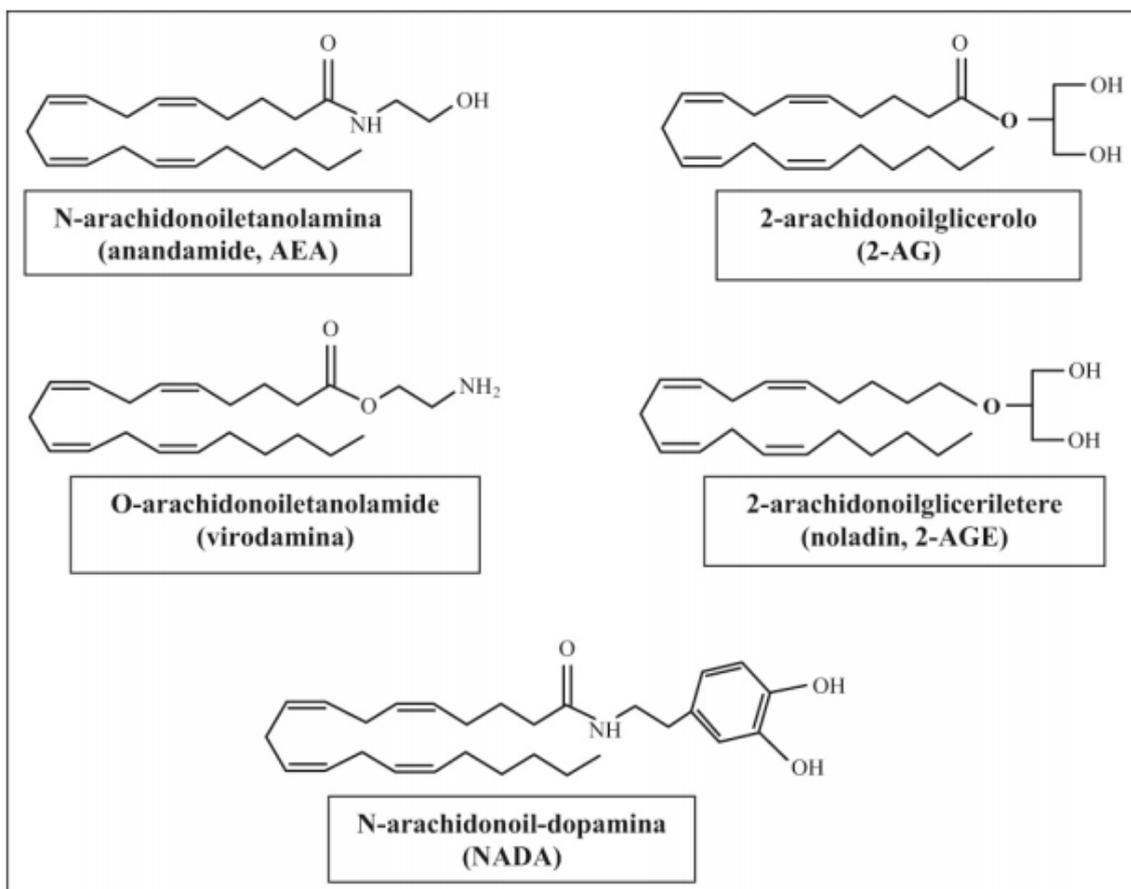


Figura10 Schema rappresentativo dei principali Endocannabinoidi (Immagine tratta da Pavanini et al 2010).

ANANDAMIDE

L'AEA è ampiamente distribuita sia a livello cerebrale che periferico (Piomelli 2003). All'interno del cervello, i livelli di AEA, equivalenti a quelli della dopamina e della serotonina, ben si correlano con la distribuzione del recettore CB1. La presenza di discreti livelli di AEA anche in aree cerebrali e tessuti periferici poveri di recettori cannabici, quali ad esempio il talamo ed il cuore, ha indotto ad ipotizzare l'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali per l'AEA. Studi recenti dimostrano che l'AEA, oltre ad essere agonista parziale per CB1 e CB2, è anche in grado di agire come agonista puro per i recettori vanilloidi VR1, una classe di recettori-canale aventi il sito di legame localizzato nella porzione intracellulare.

2-ARACHIDONOILGLICEROLO

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

1.4.3 Sintesi, rilascio, ricaptazione e degradazione degli endocannabinoidi

Sintesi:

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

In particolare, l'anandamide viene prodotta mediante un processo a due steps: nel primo step viene sintetizzato il precursore dell'AEA, l'N-arachidonilfosfatidiletanolamina (NArPE); tale molecola deriva dalla N-trans-acilazione della fosfatidiletanolamina, catalizzata dall'enzima N-acyl-transferasi e attivata dagli ioni calcio; nel secondo step, avviene l'idrolisi del NArPE che porta alla formazione dell'anandamide, processo catalizzato da una fosfolipasi di tipo D (PLD) (Di Marzo 1994, Cadas et al 1997) (**Figura 11**). 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-arachidonil-lyso-fosfolipide (Lyso-PI) idrolizzato dall'enzima fosfolipasi A1 (PLA1) e l'1,2-diacilglicerolo (1,2-DAG) idrolizzato dalla fosfolipasi C (PLC). Il secondo step di reazione prevede la formazione finale del 2-AG, a partire dai suoi precursori (1,2-DAG e Lyso-PI), mediante idrolisi enzimatica da parte degli enzimi diacilglicerolo lipasi (DGL) e lyso-fosfolipasi C (Lyso-PLC) (Higgs et al 1994, Pete et al 1994).

Rilascio:

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

Reuptake e degradazione:

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

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

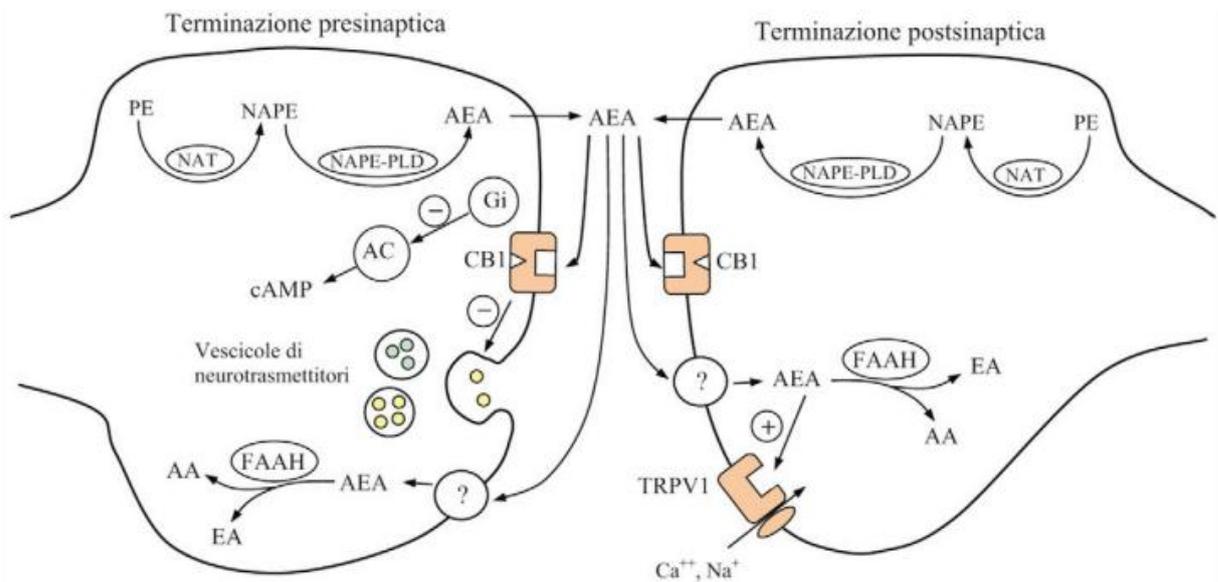


Figura 11 Rappresentazione schematica della sintesi, azione e degradazione dell’anandamide a livello sinaptico.

(Immagine tratta da Pavanini et al 2010).

1.4.4 Effetti biologici legati alla modulazione del sistema endocannabinoide

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

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

Tuttavia, come già discusso in precedenza, l'AEA è risultata una molecola biologicamente attiva anche a livello di altri sistemi recettoriali, quali ad esempio i TRPV1 (recettori vanilloidi) (Smart et al 2000, Ross et al 2001), che quindi potrebbero avere un ruolo centrale in alcuni degli effetti prodotti in vivo dall'AEA. L'interazione AEA/TRPV1 sembra contribuire alla regolazione di numerosi processi fisiologici e patologici: è stato infatti dimostrato, già da tempo, che i TRPV1 possono mediare l'azione vasodilatatrice dell'AEA

(Zygmunt et al 1999). In uno studio recente condotto su ratti ipertesi, l'effetto ipotensivo dell'AEA non è stato bloccato dall'AM251, antagonista del recettore CB1, e quindi tale effetto non poteva essere attribuito alla mediazione di CB1 (O'Sullivan et al 2004), è probabile che in alcuni casi i due sistemi agiscano sinergicamente (Ho et al 2009). Inoltre, come già detto, i recettori TRPV1 sembrano prendere parte alla modulazione della nocicezione esercitata dall'AEA.

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

Due recenti revisioni della letteratura (Hiley 2009, Pacher et al 2009) hanno approfonditamente discusso il ruolo del sistema endocannabinoide nelle MCV. Il sistema endocannabinoide (ECS) in corso di numerose condizioni patologiche, come modelli sperimentali di shock emorragici e settici e infarto miocardico acuto, sembra essere iperattivato e sembra contribuire ad importanti meccanismi di difesa, come ad esempio ipotensione e bradicardia, attraverso l'attivazione dei recettori CB1 (Kunos et al 2005, Pacher et al 2006, Mukhopadhyay et al 2008). Questa ipotesi è stata confermata da altri studi in cui è stato dimostrato che AEA e 2-AG vengono prodotte, rispettivamente da macrofagi e piastrine, durante stati ipotensivi seguenti a shock emorragico e settico (Wagner et al 1997, Varga et al 1998). Gli EC, quindi, vengono attivati in risposta a situazioni stressanti, a livello cardiocircolatorio, svolgendo un importante ruolo di difesa nei confronti del nostro organismo.

Altri studi hanno dimostrato che la somministrazione di PEA e 2-AG diminuisce drasticamente i danni cardiaci a livello di modelli animali, mentre gli antagonisti dei recettori CB2 come SR144528 annullano gli effetti benefici mediati da PEA e 2-AG (Lepicier et al 2003). Il rimonabant, antagonista del recettore CB1, invece blocca solo parzialmente gli effetti del 2-AG.

Inoltre altri studi sperimentali in vivo su modelli di danno da ischemia/riperfusion, dimostrano una diminuzione dell'incidenza di aritmie ventricolari, spesso conseguenti al

fenomeno di ischemia/riperfusion, a seguito dell'attivazione dei recettori CB2 (Krylatov et al 2001). Dopo qualche anno Di Filippo et al (2004) dimostrarono, in modelli animali in vivo, una significativa riduzione dell'estensione dell'infarto a seguito di un trattamento preventivo con agonisti non selettivi dei recettori CB1 e CB2.

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

1.5 Relazione tra malattia parodontale e sistema endocannabinoide

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

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

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

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

1.6 Scopo del lavoro

Lo scopo di questo progetto immunohistochimico è di valutare la presenza e la distribuzione dei recettori endocannabinoidi nel tessuto gengivale, in pazienti sani e affetti da parodontite cronica.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Protocollo sperimentale

2.1.1 Selezione dei soggetti

In questo studio sono stati reclutati 20 pazienti, di età compresa tra i 40 e i 60 anni, sani dal punto di vista sistemico (autoriferiti), senza patologie gravi negli ultimi 3 mesi, senza impianti adiacenti ai denti interessati da prelievo.

I soggetti per poter essere coinvolti nel progetto di ricerca dovevano rispondere a determinati requisiti. L'esclusione è avvenuta per soggetti in gravidanza e allattamento, per la presenza di malattie sistemiche (malattie cardiovascolari, disordini del metabolismo osseo, forme gravi di diabete ed anemia), per terapie con particolari farmaci (immunosoppressori, anti-epilettici, bifosfonati, antinfiammatori a base oppiacea), per la pregressa o presente radioterapia o chemioterapia ed infine per i fumatori di sigari e sigarette (>10) e cannabis.

I pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi così distinti:

Gruppo test

10 pazienti affetti da parodontite cronica associata a placca con almeno 4 *siti attivi* (tasche parodontali con sondaggio ≥ 5 mm e sanguinamento), presenza visibile di tartaro e depositi di placca (FMPS $\geq 25\%$) e con sanguinamento generalizzato (FMBS $\geq 25\%$). (**Figura 12**)

Gruppo controllo

10 pazienti sani con FMPS $< 25\%$ e FMBS $< 25\%$, senza problemi pregressi di malattia parodontale, con un numero di denti superiore a 24 e candidati all'estrazione di un terzo molare. (**Figura 13**)



Figura 12 Paziente del gruppo test.



Figura 13 Paziente del gruppo controllo.

2.1.2 Prelievo bioptico

Al momento della visita iniziale è stato effettuato un charting parodontale per elaborare il piano di trattamento. Nei pazienti con parodontite cronica associata a placca, durante le consuete manovre terapeutiche (scaling e root planning), è stato eseguito il prelievo di gengiva dal lato palatale di un sito attivo; nel gruppo controllo sano, invece, il prelievo gengivale è stato eseguito contestualmente all'avulsione del terzo molare sul lato disto-palatale del secondo molare corrispondente, durante l'adattamento del lembo per la sutura. Il prelievo è stato isolato mediante tre incisioni, effettuate con lama 15C, in regione interprossimale del sito d'interesse: un'incisione longitudinale alla base della papilla e due convergenti, una mesiale e una distale, perpendicolari ad essa. **(Figura 14 A e B)**

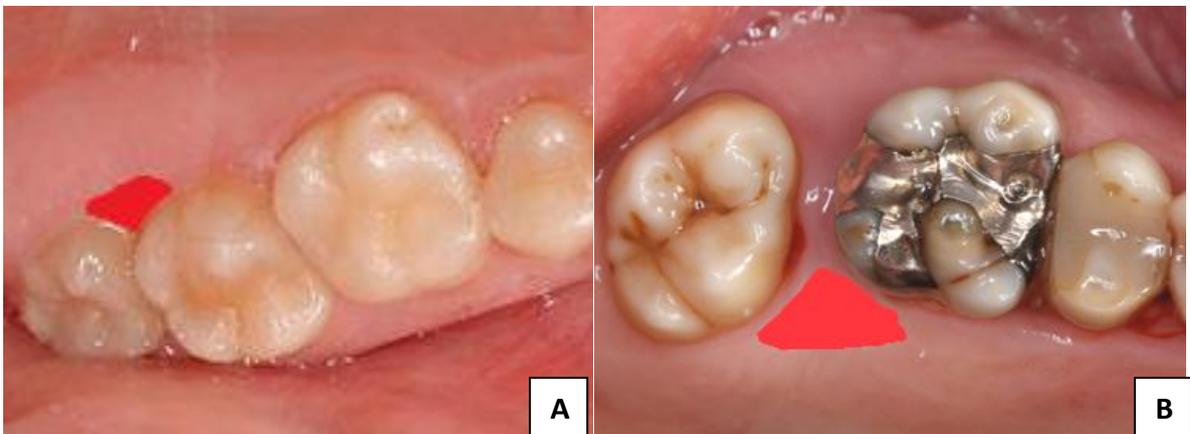


Figura 14 A e B. **A** Prelievo bioptico in paziente sano. In evidenza la papilla palatale, sede di prelievo. **B** Prelievo bioptico in paziente malato.

2.2 Processazione istologica dei campioni

Il protocollo utilizzato ha previsto le seguenti fasi:

1. *Fissazione*

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

2. *Disidratazione*

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

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

3. *Inclusione*

- Il campione è stato immerso in una soluzione di xilolo: paraffina (rapporto xilolo: paraffina liquida 3:1,1:1,1:3) ed infine lasciato in paraffina liquida in forno a $56^{\circ} + 6-7^{\circ}C$ per 12 ore, così da permettere l'infiltrazione del campione; la paraffina (Paraplast Plus) era stata precedentemente messa in un beaker e fatta sciogliere in forno, con temperatura superiore alla temperatura di fusione della paraffina di $6-7^{\circ}C$;
- prima dell'inclusione, il Bio-Mold (vaschetta in acciaio della misura scelta) è stato posto in forno a scaldare per evitare che la paraffina si raffreddasse rapidamente senza riuscire ad inglobare il pezzo. Anche la pinzetta è stata preriscaldata in forno perché non si attaccasse alla paraffina;
- è stato versato un filo di paraffina nel Bio-Mold;
- il campione è stato estratto dal beaker (con ausilio della pinzetta preriscaldata) e posto nel Bio-Mold nel senso di orientamento prescelto per il taglio;
- sul Bio-Mold è stato appoggiato l'anello ring e riempito con la paraffina; (**Figura 15**)

- il tutto è stato lasciato a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente posto nel congelatore.



Figura 15 Campioni inclusi in paraffina. (Immagine personale).

4. *Taglio del campione*

- Preparazione del bagno (H₂O distillata) stendifette ad una temperatura di 37°C;
- estrazione dal freezer del blocchetto;
- distacco del Bio-Mold con una spatola;
- delimitazione con un bisturi di tutti i margini della paraffina (sparaffinamento);
- montaggio del pezzo sul microtomo; (**Figura 16**)
- azzeramento della lama (l'angolazione/ inclinazione della lama è di 6°);
- con velocità regolare sono state iniziate le sezioni seriate con spessore delle fette di 4-5 µm;
- con una pinzetta è stata tirata la striscia dei campioni e immersa in acqua distillata;
- il blocchetto di inclusione è stato rimesso in freezer dopo 20-30 tagli per evitare il surriscaldamento.



Figura 16 Microtomo. (Immagine personale).

5. *Posizionamento sui vetrini*

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

6. *Preparazione per la colorazione*

- Il vetrino è stato posto nel forno a 38°C overnight per sciogliere tutta la paraffina (deparaffinare);
- i vetrini sono stati passati nella scala degli alcoli decrescente per reidratarli dopo aver fatto due passaggi in xilolo da 10 minuti ciascuno:
 1. Alcool 100% 5 minuti
 2. Alcool 96% 5 minuti
 3. Alcool 70% 5 minuti
 4. Alcool 50% 5 minuti
 5. acqua distillata fino alla colorazione.

7. *Colorazione dei vetrini*

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

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

Ematossilina-Eosina

La procedura ha previsto:

1. bagno in Ematossilina di Carazzi (Bio-optica) per 15 minuti;
2. viraggio sotto H₂O di fonte per 15 minuti;
3. immersione in H₂O distillata;
4. passaggio nel bagno di Eosina (Bio-optica) per 1 minuto;
5. reidratazione in scala alcolica crescente (da alcool 50% a alcool 100%);
6. immersione nel bagno di Xilolo per 10 minuti;
7. protezione dei preparati con vetrino copri-oggetto montati con colla Entellan (Bio-optica, Milano).

2.3 Analisi immunoistochimica

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

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

1. Sparaffinatura e reidratazione

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

2. Smascheramento dell'antigene

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

3. Blocco degli enzimi endogeni

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

4. Blocco delle proteine sieriche

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

5. Incubazione con anticorpo primario

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

6. Intensificazione dell'anticorpo primario

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

7. Incubazione con polimero quanto HRP

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

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

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

9. Contro-colorazione con Ematossilina di Mayer

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

10. Disidratazione

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

11. Passaggio in Xilolo e montaggio

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

2.4 Elaborazione dei dati e analisi statistica

Tutte le sezioni sono state valutate al microscopio ottico a luce trasmessa in campo chiaro (Eclipse E600, Nikon) tramite diversi obiettivi: 2x, 20x, 40x. Il primo obiettivo permette di avere una visione d'insieme del campione, mentre gli altri due consentono una valutazione più approfondita e accurata.

Il microscopio è collegato ad una macchina fotografica digitale (DXM1200, Nikon, Tokyo, Japan) che permette di effettuare fotografie digitali. Per ogni campione sono state analizzate tre sezioni su ciascuna delle quali sono state effettuate 10 fotografie digitali tramite una mappatura randomizzata utilizzando l'obiettivo 20x. La scelta delle fotografie deve essere casuale in modo da non essere influenzata dall'operatore.

Analisi istologica qualitativa

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

Analisi istologica quantitativa

Le immagini digitali effettuate sulle sezioni processate per l'immunoistochimica sono state analizzate mediante l'utilizzo di un programma di immagine (Photo Shop, Ps5), al fine di valutare la presenza e la distribuzione dei recettori CB1 e CB2 nel tessuto gengivale.

È stato determinato un range di colori che indicasse l'avvenuta marcatura al fine di quantificarla come frazione del numero di pixel marcati sui pixel totali dell'immagine ed è stata quindi calcolata la percentuale di marcatura per ogni singola immagine. È stato escluso dal range di colori di marcatura il colore di fondo presente sulle immagini dovuto alle perossidasi presenti (marroncino tenue). Al fine di valutare la *presenza* dei recettori è stata quantificata la marcatura su tutta l'immagine senza fare distinzione tra epitelio e connettivo; per valutare la *distribuzione* dei recettori nel tessuto e verificare eventuali differenze di

concentrazione tra epitelio e connettivo, si è isolato l'epitelio dal connettivo in modo da effettuare delle quantificazioni sulle singole componenti epiteliale e connettivale. Si sono potute così valutare non solo le differenze di distribuzione dei recettori tra epitelio e connettivo all'interno di uno stesso campione ma anche le differenze tra campione sano e campione malato.

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

Studio di popolazione

Per valutare le caratteristiche dei due gruppi è stato effettuato uno studio di popolazione utilizzando su ciascun gruppo il test di Wilcoxon-Mann-Whitney per la distribuzione dell'età e il χ^2 (Chi-quadro) per la distribuzione del sesso.

Analisi statistica

L'analisi statistica si compone di due parti:

- *Analisi descrittiva*

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

- *Analisi inferenziale*

Per quanto riguarda l'analisi inferenziale le percentuali di espressione di CB1 e CB2 nei pazienti con parodontite cronica e senza parodontite, sono stati analizzati con il programma Statistical Package for Social Sciences (SPSS V.15.0- IBM) utilizzando il Test non parametrico di Wilcoxon-Mann-Whitney (detto anche Test della somma dei ranghi) con un livello di significatività di $p < 0.05$.

3 RISULTATI

Studio di popolazione

Il gruppo controllo è costituito da 10 soggetti di cui 4 donne e 6 uomini, mentre il gruppo test è costituito da 10 soggetti di cui 5 donne e 5 uomini. All'analisi statistica non risultano differenze statisticamente significative sul sesso e sulla media delle età ($p > 0,05$).

	Gruppo controllo	Gruppo test
Donne (n)	4	5
Uomini (n)	6	5
Media delle età (anni)	48,2	51,3

Tabella 3 Distribuzione dello studio di popolazione.

Analisi istologica qualitativa

Gruppo controllo:

L'osservazione al microscopio ottico ha dimostrato che i campioni del gruppo controllo, analizzati dopo colorazione con ematossilina-eosina, si presentavano sani e senza la presenza di cellule infiammatorie. I campioni risultavano ben conservati e integri nella loro morfologia nonostante la processazione istologica. (**Figura 17**)

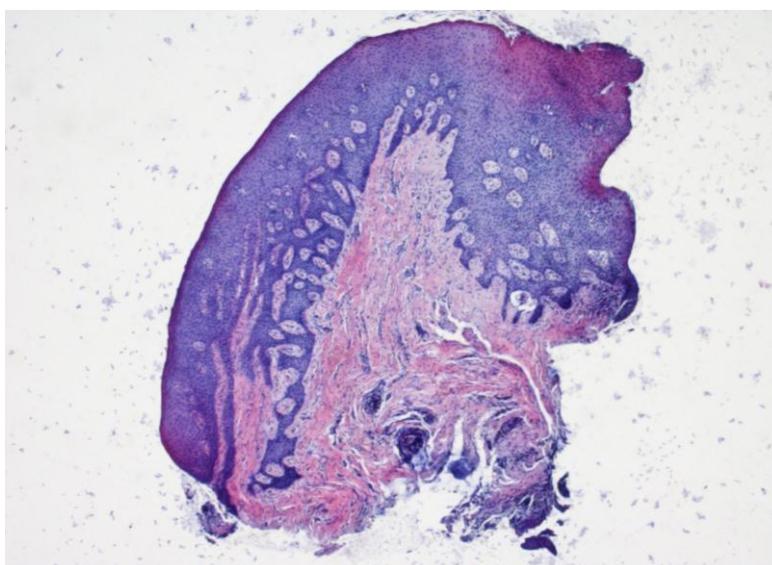


Figura 17 Papilla gengivale di un soggetto sano. Si osserva in rosa il connettivo e in viola/blu la porzione epiteliale. Colorazione Ematossilina Mayer/Eosina ingrandimento totale 25x.. (Immagine personale).

Aumentando l'ingrandimento (10x, 20x) è stata osservata la struttura microscopica del campione, anch'essa ben conservata. L'epitelio presentava un'architettura normale in cui erano visibili lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granulare e lo strato corneo. (**Figura 18 A-B**)

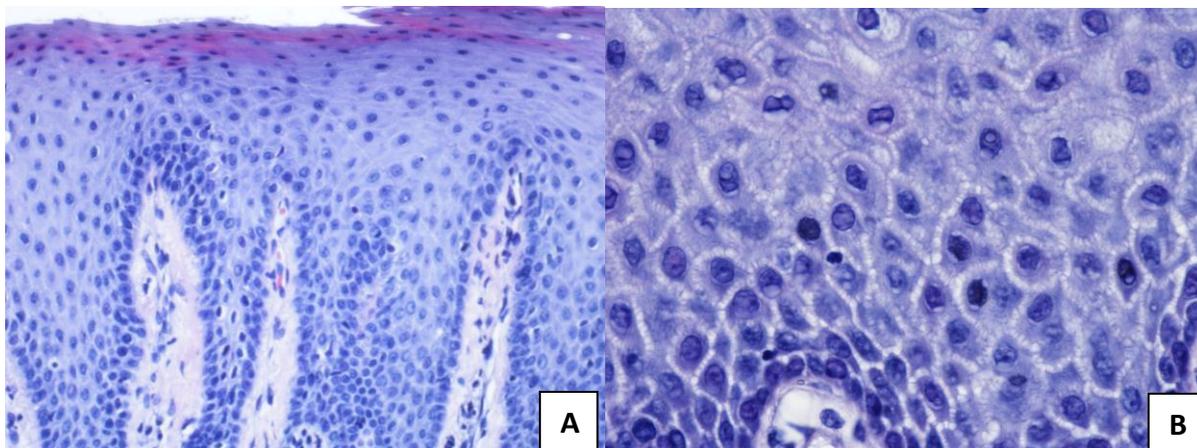


Figura 18A e B. A Epitelio gengivale. Si nota la presenza delle papille che si invaginano nella porzione connettivale. Le cellule dei vari strati che costituiscono l'epitelio, colorati in blu, sono ben distinguibili. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 200x. B Particolare che mostra, dal basso verso l'alto, lo strato basale, poi spinoso e l'inizio del granuloso. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 400x. (Immagine personale).

Lo strato basale, posto immediatamente a contatto con la membrana basale, si presentava costituito da cheratinociti di forma cubica o colonnare con nucleo ovale voluminoso. Quest'ultimo, essendo formato da componenti acide, si presentava di colore blu intenso, dovuto alla colorazione con ematossilina, mentre il citoplasma basofilo si presentava colorato di rosa. Procedendo verso la superficie i cheratinociti assumevano diverse forme: ellissoidale, rotondeggiante e poliedrica con nuclei più piccoli. Lo strato basale e lo strato spinoso costituivano circa i due terzi dell'intero spessore dell'epitelio. Lo strato granulare era costituito da cellule più grandi, appiattite e basofile. I cheratinociti dello strato corneo si presentavano radicalmente trasformati nel loro aspetto: molto appiattiti, eosinofili, intensamente colorati di rosa per l'eosina e privi di nucleo. La membrana basale presentava la normale struttura a creste epiteliali. (**Figura 19**)

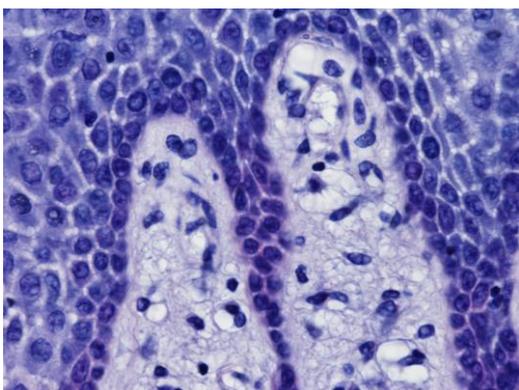


Figura 19 Creste epiteliali che si invaginano nel tessuto connettivo. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 400x.(Immagine personale).

All'osservazione non si sono riscontrati fenomeni di acantosi. A livello connettivale sono stati osservati fasci di fibre collagene normalmente organizzati: alcuni avevano andamento parallelo rispetto alla superficie epiteliale, altri invece si dirigevano ortogonalmente. Non si notavano addensamenti di cellule infiammatorie né un incremento del numero dei vasi. Il tessuto si presentava sempre compatto e organizzato in modo normale (**Figura 20**).

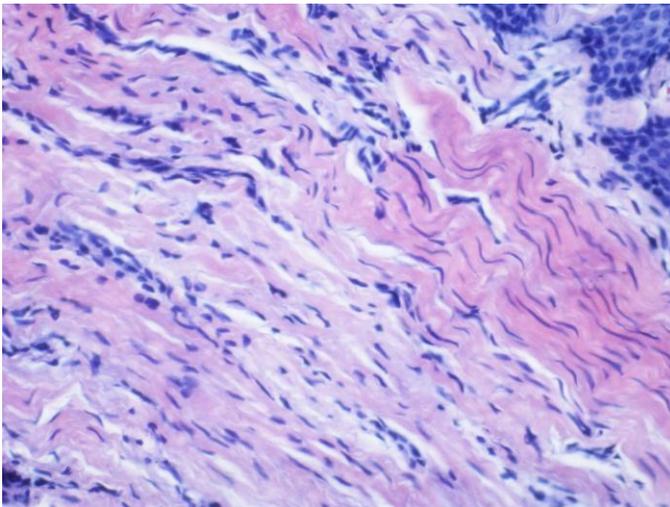


Figura 20 Tessuto connettivo di gengiva. Si nota la presenza delle fibre che costituiscono la matrice. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 200x.(Immagine personale).

Gruppo test

I campioni del gruppo test presentavano delle alterazioni strutturali: l'epitelio appariva ispessito e le creste epiteliali più accentuate, il connettivo si presentava più lasso, con una morfologia meno compatta rispetto al connettivo dei campioni sani.(**Figura 21**)

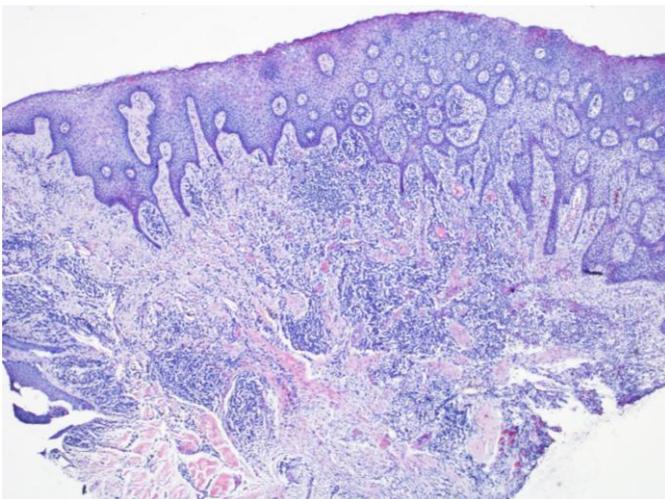


Figura 21 Papilla gengivale di un soggetto parodontopatico . Si osserva il notevole infiltrato infiammatorio ben diffuso nel campione. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 25x. (Immagine perosonale).

A piccolo ingrandimento si apprezzava una struttura meno compatta e più disgregata dell'intero campione. L'epitelio giunzionale non era ben delineato, le cellule si presentavano più distanziate e meno compatte. È stato riscontrato un marcato infiltrato infiammatorio e un aumento numerico degli elementi vascolari (**Figura 22, 23, 24**).

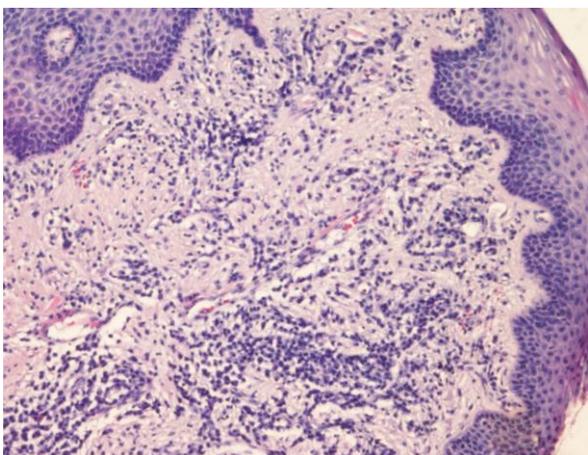


Figura 22 Particolare della figura 21 che mostra la presenza di un marcato infiltrato infiammatorio nella porzione sub epiteliale. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 100x. (Immagine personale).

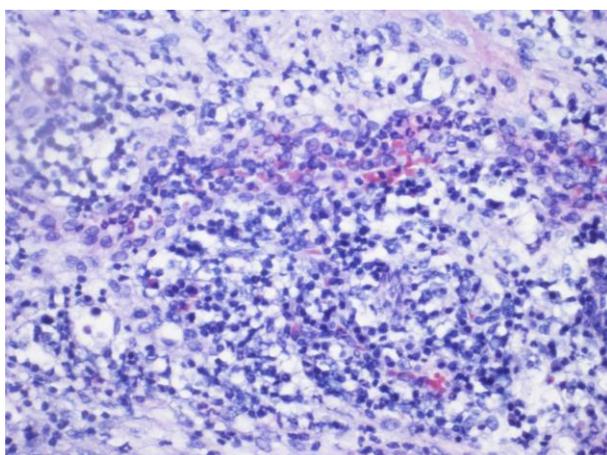


Figura 23 Particolare dell'infiltrato infiammatorio nella porzione connettivale del campione. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 200x. (Immagine personale).

L'infiltrato infiammatorio era maggiormente rappresentato a livello perivascolare (**Figura 24 A-B**) e a livello dell'epitelio giunzionale essendo questo la zona di minor resistenza all'invasione batterica. Le fibre collagene erano orientate in fasci più lassi. In alcuni campioni le cellule infiammatorie erano confinate al tessuto connettivo subepiteliale mentre in altri si estendevano in profondità fino alle fibre collagene dell'attacco connettivale.

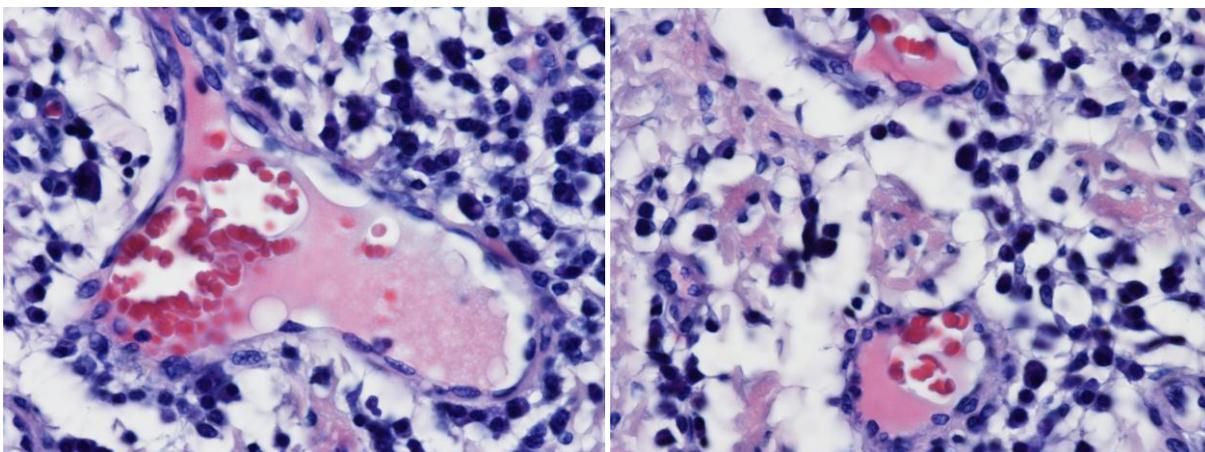


Figura 24 A e B Infiltrato infiammatorio perivascolare. Le cellule infiammatorie sono colorate con ematossilina in blu, mentre le particelle sono colorate con eosina in rosso; si evidenziano le emazie presenti nel vaso sanguigno. Colorazione Ematossilina Mayer/ Eosina, ingrandimento totale 400x. (Immagine personale).

Analisi istologica quantitativa

Nella tabella sono stati riportati i risultati delle analisi effettuate sui campioni del gruppo test e controllo.

	CB1 Connettivo		CB1 Epitelio		CB2 Connettivo		CB2 Epitelio	
	Media	SD	media	SD	Media	SD	Media	SD
Pz malati								
campione 1	2,48	0,64	4,05	0,54	3,42	0,65	4,78	0,31
campione 2	3,45	0,76	3,78	0,32	2,78	0,44	3,65	1,23
campione 3	1,98	0,43	2,98	0,14	2,66	0,12	2,87	0,65
campione 4	2,65	0,32	4,02	0,31	1,97	0,61	2,1	0,74
campione 5	2,26	1,06	3,73	0,23	2,46	1,11	2,68	1,03
campione 6	2,34	0,93	3,23	0,84	2,51	1,08	3,12	1,12
campione 7	2,08	0,61	8,27	1,43	1,65	0,72	4,12	1,1
campione 8	2,41	0,79	5,08	2,32	1,86	0,75	6,35	0,35
campione 9	2,08	0,64	3,44	0,14	2,65	0,53	3,42	0,65
campione 10	2,43	0,15	4,23	0,23	1,98	0,48	2,32	0,12
MEDIA	2,46		4,28		2,39		3,54	
SD	0,41		1,52		0,53		1,28	
Pz Sani								
campione 1	0,01	0,01	0,04	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01
campione 2	0,82	1,08	0,98	0,54	0,04	0,03	0,02	0,02
campione 3	0,02	0,04	0,01	0,03	0,32	0,12	0,53	0,02
campione 4	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,06	0,02
campione 5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01
campione 6	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
campione 7	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,16	0,12
campione 8	0,23	0,14	0,03	0,03	0,03	0,23	0,1	0,02
campione 9	0,03	0,01	0,02	0,02	0,02	0,13	0,02	0,01
campione 10	0,01	0,03	0,13	0,02	0,11	0,02	0,01	0,03
MEDIA	0,12		0,13		0,06		0,10	
SD	0,26		0,30		0,10		0,16	

Tabella 4 Risultati ottenuti dalle quantificazioni dei campioni sani e parodontopatici espressi in percentuale.

Gruppo controllo

Dall'osservazione delle mappature dei campioni sani si notava un'esigua presenza di marcatura per i recettori CB1 e CB2. La distribuzione di questi recettori nell'epitelio si concentrava nella zona compresa tra lo strato granulare e lo strato corneo mentre nel connettivo si notava una marcatura scarsa senza privilegiare nessuna area in particolare. **(Figura 25, 26)**

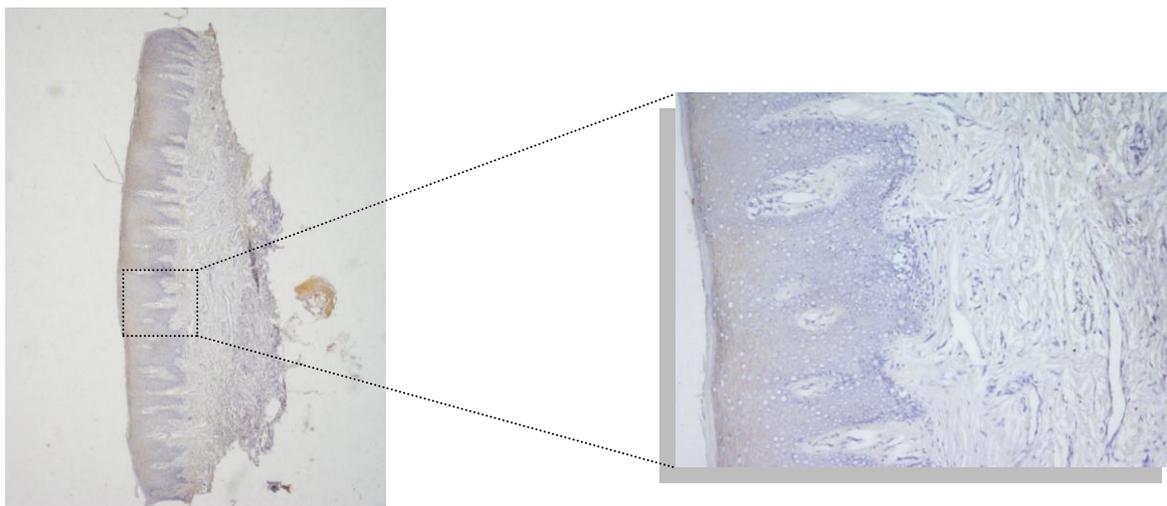


Figura 25 Campione di paziente sano con relativo particolare. Colorazione immunohistochimica anti CB1, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (Immagine personale).

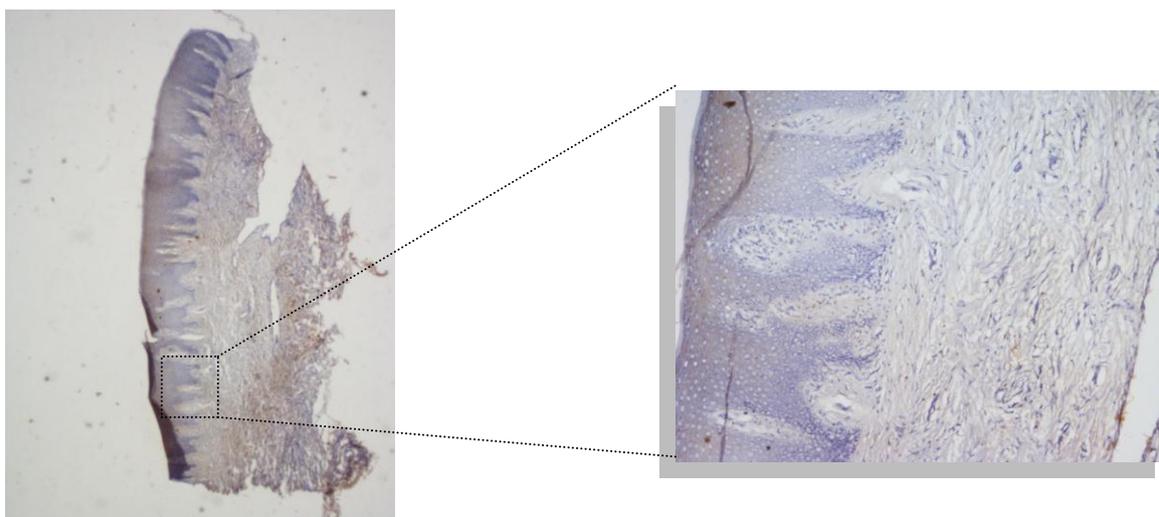


Figura 26 Campione di paziente sano con relativo particolare. Colorazione immunohistochimica anti CB2, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (Immagine personale).

La media e la deviazione standard, calcolate sui dati ottenuti dalle quantificazioni anti-CB1 sul tessuto connettivo, sono risultate di $0,12\% \pm 0,26\%$ mentre sul tessuto epiteliale è stato

ottenuto un valore di $0,13\% \pm 0,30\%$; dalle quantificazioni anti-CB2 invece la media e la deviazione standard sono risultate $0,06\% \pm 0,10\%$ sul tessuto connettivo e $0,10\% \pm 0,16\%$ sul tessuto epiteliale. (**Grafico 1**)

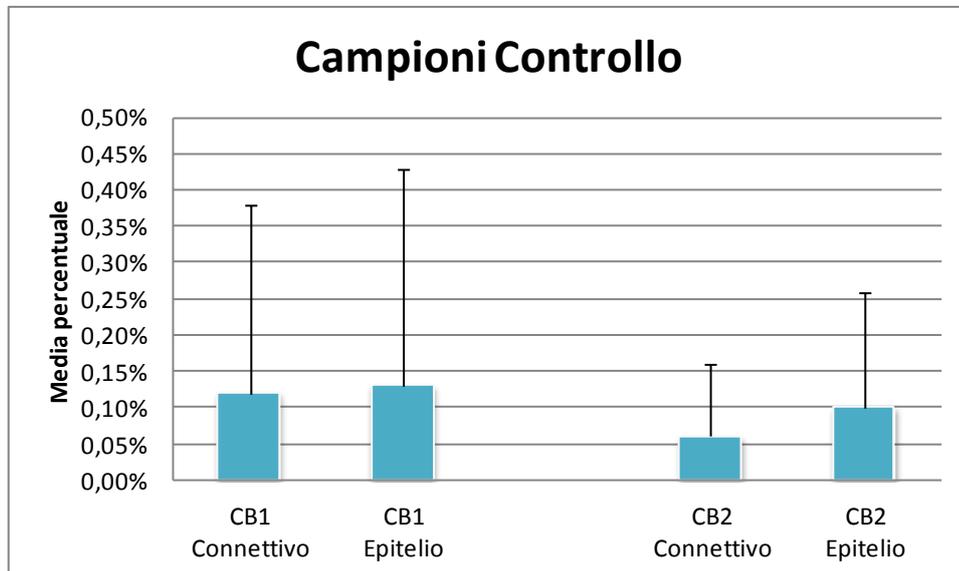


Grafico 1 L'istogramma rappresenta le medie e le deviazioni standard delle quantificazioni dell'analisi immunocistochimica CB1 e CB2 ottenute dai campioni controllo.

Gruppo test

Nella valutazione delle mappature dei campioni parodontopatici è stata osservata la distribuzione del recettore CB1, che a livello connettivale risultava diffusa mentre a livello epiteliale risultava maggiormente concentrata nella zona compresa tra lo strato granulare e lo strato corneo. La distribuzione è risultata comparabile a quella osservata nei campioni anti-CB2. (Figura 27, 28)

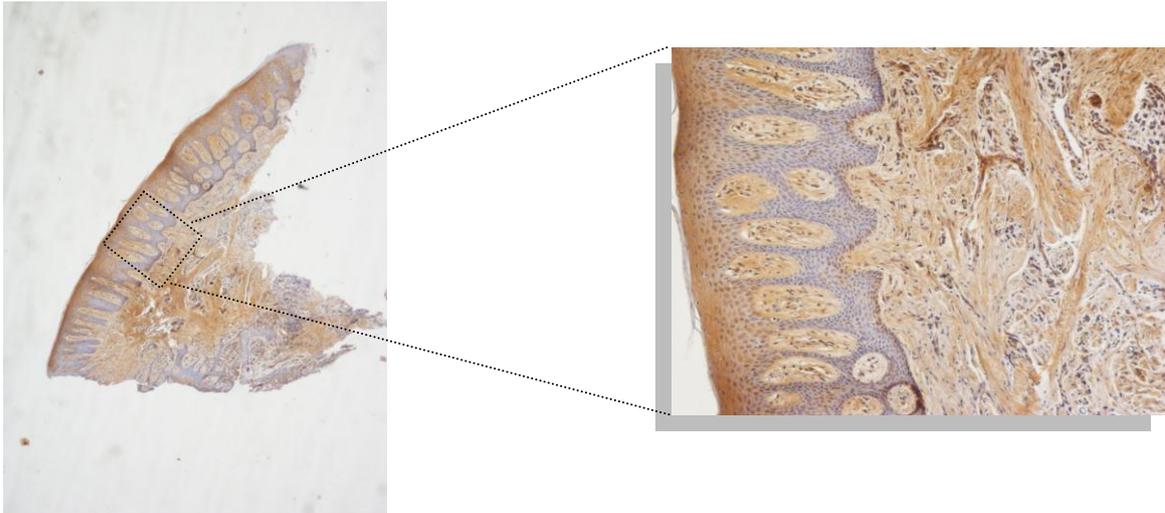


Figura 27 Campione di paziente parodontopatico con relativo particolare. Colorazione immunostochimica anti CB2, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (Immagine personale).

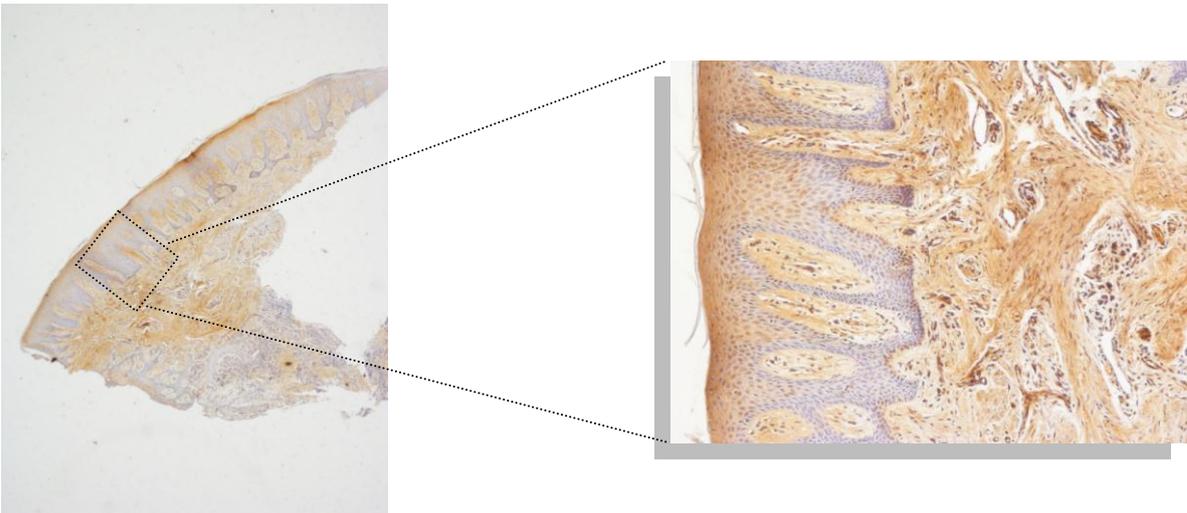


Figura 28 Campione di paziente parodontopatico con relativo particolare. Colorazione immunostochimica anti CB1, ingrandimento totale 25x a sinistra e 100x il particolare. (Immagine personale).

La media e la deviazione standard, calcolate sui dati ottenuti dalle quantificazioni anti-CB1 sul tessuto connettivo, sono risultate di $2,46\% \pm 0,14\%$, mentre sul tessuto epiteliale $4,28\% \pm$

1,52%; dai dati ottenuti dalle quantificazioni anti-CB2 invece, la media e la deviazione standard sono risultate $2,39\% \pm 0,53\%$ sul tessuto connettivo mentre $3,54\% \pm 1,28\%$ sul tessuto epiteliale. (**Grafico 2**)

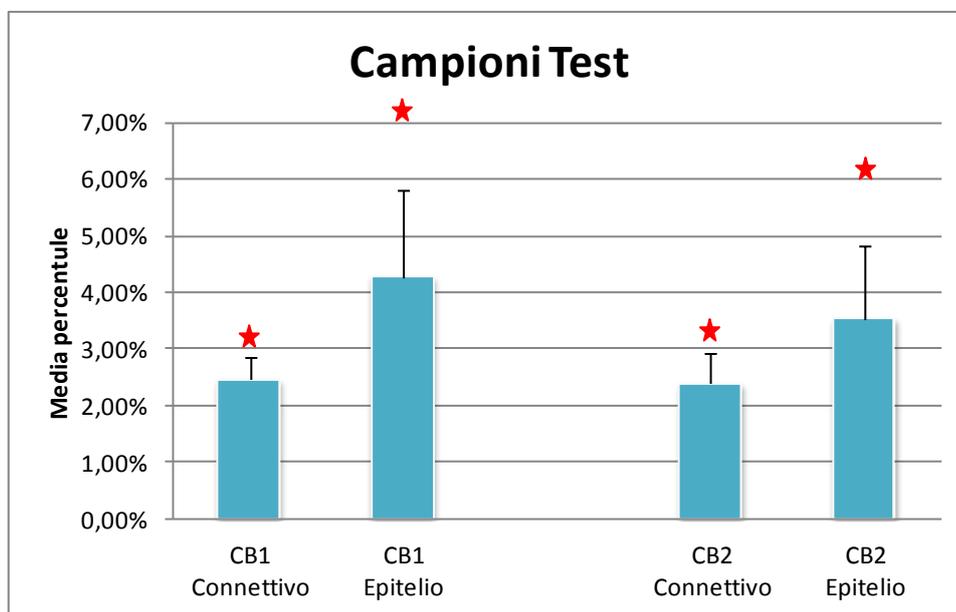


Grafico 2 L'istogramma rappresenta le medie e le deviazioni standard delle quantificazioni dell'analisi immunocistochimica CB1 e CB2 ottenute dai campioni test. Gli asterischi indicano che i valori risultano statisticamente significativi.

Con il Test di Wilcoxon sono stati effettuati i seguenti confronti:

- medie dei campioni parodontopatici CB1 del tessuto connettivo con le medesime dei campioni sani;
- medie dei campioni parodontopatici CB1 del tessuto epiteliale con le medesime dei campioni sani;
- medie dei campioni parodontopatici CB2 del tessuto connettivo con le medesime dei campioni sani;
- medie dei campioni parodontopatici CB2 del tessuto epiteliale con le medesime dei campioni sani.

Le medie dei campioni parodontopatici sono risultate significativamente diverse rispetto a quelle dei campioni sani sia per CB1 che per CB2, sia per il connettivo che per l'epitelio (per $p < 0,01$).

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il ruolo del sistema endocannabinoide nella patogenesi di numerose condizioni sistemiche appare oggi un argomento di notevole interesse. Come già accennato in precedenza numerose sembrano essere le azioni riconducibili agli endocannabinoidi, come ad esempio l'Anandamide, a livello sistemico: azione antinocicettiva, antinfiammatoria e immunosoppressiva (Calignao et al 1998, Costa et al 2002, Klein et al 2005), stimolazione all'assunzione di cibo (Monteleone et al 2005, Di Marzo et al 2011), vasodilatazione e riduzione della pressione arteriosa (Harvey et al 2004, Zygmunt et al 1999). Recenti revisioni della letteratura, inoltre, hanno approfonditamente discusso il ruolo del sistema endocannabinoide nelle MCV (Hiley 2009, Pacher et al 2009): esso sembra essere iperattivato e sembra contribuire ad importanti meccanismi di difesa, come ad esempio ipotensione e bradicardia, attraverso l'attivazione dei recettori CB1. Si può affermare che gli EC vengono attivati in risposta ad alterazioni metaboliche e situazioni stressanti, a livello cardiocircolatorio, svolgendo un importante ruolo di difesa nei confronti del nostro organismo.

Se da un lato appare chiaro il ruolo degli endocannabinoidi nei processi infiammatori a livello sistemico, dall'altro rimangono poco chiari gli effetti del ECS a livello della malattia parodontale.

Seguendo il filone dello studio di Nakajima et al (2006) in cui è stata valutata la presenza dei recettori CB1 e CB2 in fibroblasti umani nonché la presenza di AEA nel fluido crevicolare, in questo studio sperimentale si è valutata, tramite un'analisi immunoistochimica, la presenza e la distribuzione dei recettori CB1 e CB2 nella gengiva di soggetti sani e parodontopatici. Dall'analisi inferenziale delle medie di marcatura dei campioni si è evidenziata una differenza significativa tra i campioni sani e parodontopatici nell'espressione dei recettori CB1 e CB2; nei pazienti parodontopatici si è riscontrato un significativo aumento dell'espressione dei recettori CB1 e CB2 rispetto ai sani. Inoltre questi recettori sembrano essere localizzati sia a livello epiteliale che connettivale mostrando alcune peculiarità: a livello epiteliale sono maggiormente rappresentati negli strati più superficiali (granulare e corneo), mentre a livello connettivale sembrano essere diffusi senza mostrare specifiche differenze di localizzazione.

Questi risultati confermano l'ipotesi di un possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoide nei processi infiammatori a livello parodontale; come per altre patologie sistemiche, anche a livello parodontale, l'iperattivazione del sistema endocannabinoide può essere interpretata come un fenomeno difensivo del nostro organismo che tenta di moderare

l'eccessiva risposta infiammatoria e i danni che da essa ne conseguono. Si potrebbe in futuro valutare se il sistema endocannabinoide o le sue alterazioni possano essere considerate o meno uno dei meccanismi di suscettibilità che predispongono alcuni soggetti alla malattia parodontale.

Inoltre per poter meglio indagare la correlazione tra sistema endocannabinoide e malattia parodontale potrebbe essere interessante valutare l'espressione dei recettori endocannabinoidi con analisi di immunofluorescenza. Analizzando i campioni processati con immunostochimica si è riscontrata una parziale colorazione di fondo aspecifica, che in alcuni casi ha reso più complessa la valutazione quantitativa. Per questo motivo si potrebbe in futuro ripetere l'analisi con immunofluorescenza con lo scopo di evitare questa colorazione aspecifica.

Il lavoro proposto è da considerarsi uno studio pilota data l'esiguità del campione; tuttavia l'evidente differenza che si nota tra i due gruppi, validata dall'analisi statistica, conferma l'ipotesi iniziale e incoraggia l'approfondimento dell'argomento su campioni più numerosi.

Su una casistica più elevata sarebbe inoltre possibile indagare la correlazione con alcune caratteristiche individuali come il sesso, l'età anagrafica e la storia ostetrica ed eventualmente analizzare la correlazione tra l'espressione dei recettori endocannabinoidi nel cavo orale e alcune malattie di tipo sistemico come diabete, MCV e stress. Alcuni interessanti studi dimostrano l'importante ruolo del sistema endocannabinoide nell'impianto dell'embrione e nel mantenimento della gravidanza. Alti livelli di AEA possono portare infatti ad una gravidanza precoce che può essere monitorata valutando i livelli sierici degli enzimi di sintesi e degradazione dell'AEA come ad esempio il FAAH (Karasu et al 2010).

I risultati hanno dimostrato come pazienti sani e pazienti malati esprimono diversamente i recettori endocannabinoidi; non è però stato possibile verificare se questa espressione sia tipica del paziente malato o sia sito specifica, cioè strettamente legata ai tessuti coinvolti da malattia parodontale. Sarebbe quindi opportuno in futuro confrontare l'espressione dei recettori CB1 e CB2 in siti sani e siti malati dello stesso paziente.

5 BIBLIOGRAFIA

- Ameri A. "The effects of cannabinoids on the brain". *Prog Neurobiol* 1999; 58:315-348.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition". *Science* 1997; 277:1094–1097.
- Berkovitz B.K, Moxham BJ, Newman HN. "The periodontal ligament in health and disease". Pergamon Press, Oxford 1982.
- Cadas H, Di Tomaso E, Piomelli D. "Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain". *J Neurosci* 1997; 17:1226–1242.
- Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP, Pozzi G. "Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial". *J Periodontal Res* 2004; 39(6):442-6.
- Cairo F, Rotundo R, Frazzangaro G, Muzzi L, Pini Prato GP. "Diabetes mellitus as a risk factor for periodontitis". *Minerva Stomatol* 2001; 50(9-10):321-30.
- Cattaneo L, Baratta L. "La bocca". Novartis 1985.
- Ciancio SC, Neiders ME, Hazen SP. "The principal fibers of the periodontal ligament". *Periodontics* 1967; 5(2):76-81.
- Cisar J, Sandberg A, Mergenhagen S. "The function and distribution of different fimbriae on strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*". *J Dent Res* 1984; 63:393-396.
- Clemente F, Fumagalli G. "Farmacologia generale e molecolare". UTET, Torino 2012.

- Cota D, Woods SC. "The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis". *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2005; 12:338-351.
- D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M. "Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol". *J Dent Res* 2005; 84:269-273.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. "The endocannabinoid system:a general view and latest additions". *Br J Pharmacol* 2004; 141:765-774.
- Deshpande RG, Khan M, Genco CA. "Invasion strategies of the oral pathogen porphyromonas gingivalis: implications for cardiovascular disease". *Invasion Metastasis* 1998-1999; 18(2):57-69.
- Di Marzo V, Fontana A. "Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: killing two birds with one stone". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995; 53(1):1-11.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action". *Trends Neurosci* 1998; 21:521-528.
- Di Marzo V. "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons". *Nature* 1994; 372, 686–691.
- Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. "Systemic acute-phase reactants,C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis". *Clin Exp Immunol* 1997; 107(2):347-52.
- Eick S & Pfister W. "Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for periodontopathogenic species in subgingival plaque samples". *J Clin Periodontol* 2002; 29:638-644.
- Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S. "The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function:a pilot trial". *Am Heart J* 2006; 151:47.

- Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. "Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels". *J Periodontol* 2005; 76(5):731-736.
- Genco J, Van Dyke E, Levine J, Nelson D, Wilson E. "Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease". *J Dent Res* 1985; 65:1379-1391.
- Haffajee AD, Socransky SS, Goodson M. "Subgingival temperature: relation to baseline clinical parameters". *J Clin Periodontol* 1992; 19:401-408.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M. "Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques". *J Periodontol* 2000; 71:1554-1560.
- Hart TC. "Genetic considerations of risk in human periodontal disease". *Curr Opin Periodontol* 1994; 3-11.
- Higgs HN & Glomset JA. "Identification of a phosphatidic acidpreferring phospholipase A1 from bovine brain and testis". *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91:9574-9578.
- Hiley R. "Endocannabinoids and the heart". *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53(4):267-276.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB. "Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion". *J Neurochem* 1997; 69:631-638.
- Ho WS, Gardiner SM. "Acute hypertension reveals depressor and vasodilator effects of cannabinoids in conscious rats". *Br J Pharmacol* 2009; 156(1):94-104.
- Karasu T, Marczylo T, Maccarrone M, Konje J. "The role of sex steroid hormones, cytokines and the endocannabinoid system in female fertility". *Human Reproduction Update* 2011; 17(3):347-361.
- Kim J & Amar S. "Periodontal disease and systemic condition: a bidirectional relationship". *Odontology* 2006; 94:10-21.

- Lantz MS, Rowland RW, Switalski LM, Höök M. "Interactions of *Bacteroides gingivalis* with fibrinogen". *Infect Immun* 1986; 54(3):654-8.
- Lindhe J, Hellden L. "Substances in the dento-gingival junction chemotactic for neutrophils". *J Periodontol* 1972; (10):22-3.
- Listgarten MA. "The structure of dental plaque". *Periodontol* 2000 1994; 5:52-65.
- Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 2003;278(45):45034-45039.
- Loesche WJ. "Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis". *J Dent Res* 1979; 58(12):2404-12.
- Loos BG. "Systemic markers of inflammation in periodontitis". *J Periodontol* 2005; 76:2106-2115.
- Lovegrove JM. "Dental plaque revisited:bacteria associated with periodontal disease." *J N Z Soc Periodontol* 2004; 87:7-21.
- Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. "Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease". *J Periodontol* 1981; 52(8):410-415.
- Marieb EN. "Elementi di anatomia e fisiologia dell'uomo". Zanichelli, Bologna 2001.
- Marks SCJr, Schroeder HE. "Tooth eruption:theories and facts". *Anat Rec* 1996; 245(2):374-93.
- 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.

- Mattila K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, Asikainen S. "Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels, a pilot study". *Online BioMed Central Infectious Diseases* 2002; 8:10-30.
- Meikle MC, Hembry RM, Holley J, Horton C, McFarlane CG, Reynolds JJ. "Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) in human gingival tissues from periodontitis patients". *J Periodontal Res* 1994; 29(2):118-26.
- Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. "Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease". *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(6):403-13.
- Michalowicz BS. "Genetic and inheritance considerations in periodontal disease". *Curr Opin Periodontol* 1993; 11-7.
- Monteleone P, Matias I, Martidas V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V. "Blood levels of the Endocannabinoid Anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in Bulimia nervosa". *Neuropsychopharmacology* 2005; 30:1216-1221.
- Müller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Höffler U. "In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics". *J Clin Periodontol* 2002; 29:736-742.
- Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K. "Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF- κ B pathway inhibition". *FEBS Lett* 2006; 580(2):613-9.
- Nasry HA, Preshaw PM, Stacey F, Heasman L, Swan M, Heasman PA. "Smoking cessation advice for patients with chronic periodontitis". *Br Dent J* 2006; 11;200(5):272-5.
- Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. "Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis". *J Endod* 2002; 28:679-83.

- O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD. "Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries". *Br J Pharmacol* 2004; 142(3):435-42.
- Olive M, Bacon W, Hildwein M. "Bone resorption in orthodontic tooth movement:an attempted schematization". *Orthod Fr* 1989; 60(2):895-904.
- Pacher P. "The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease". *Semin Immunopathol* 2009; 31(1):63-77.
- Pete MJ, Ross AH, Exton JH. "Purification and properties of phospholipase A1 from bovine brain". *J Biol Chem* 1994; 269:19494–19500.
- Piomelli D. "The molecular logic of endocannabinoid signaling". *Nature Rev* 2003; 4:873-884.
- Quian H, Zhao Y, Peng Y, Han C, Li S, Huo N, Ding Y, Fuan Y, Xiong L, Sang H. "Activation of cannabinoidi receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament". *J Periodontal Res* 2010; 45:504-511.
- Schaudinn C, Gorur A, Keller D, Parish P. "Periodontitis an archetypical biofilm disease". *J Am Dent Association* 2009; 140(8):978-986.
- Schenkein HA, Gunsolley JC, Koertge TE, Schenkein JG, Tew JG. "Smoking and its effects on early-onset periodontitis". *J Am Dent Assoc* 1995; 126(8):1107-13.
- Schwegler JS. "Anatomia e fisiologia dell'uomo". Edi-Ermes (II ed.), Milano 1999.
- Shizukuishi S. "Smoking and periodontal disease". *Clin Calcium* 2007; 17(2):226-32.
- Shore RC, Moxham BJ, Berkovitz BK. "A quantitative comparison of the ultrastructure of the periodontal ligaments of impeded and unimpeded rat incisors". *Arch Oral Biol* 1982; 27(5):423-30.

- Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. "New concepts of destructive periodontal disease". *J Clin Periodontol* 1984; 11(1):21-32.
- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. "Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease". *J Clin Periodontol* 2002; 29:260-268.
- Theilade E. "The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases". *J Clin Periodontol* 1986; 13(10):905-11.
- Thorand B, Kolb H, Baumert J, Koenig W, Chambless L, Meisinger C, Illig T, Martin S, Herder C. "Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study". *Diabetes* 2005; 54(10):2932-2938.
- Ueda N, Yamamoto S. "The fatty acid amide hydrolase (FAAH)". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66:201-210.
- Wilson RI, Nicoll RA. "Endocannabinoid signaling in the brain". *Science* 2002; 96:678-682.
- Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, Van der Velden U. "Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*". *J Clin Periodontol* 1997; 24:573-579.
- Yilmaz S, Atasu M, Kuru B. "A genetic and dermatoglyphic study on periodontitis". *J Marmara Univ Dent Fac* 1993; 1(4):297-306.

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento va alla Prof.ssa Chiarella Sforza e la Dott.ssa Claudia Dellavia per avermi permesso di frequentare, negli ultimi quattro anni, il Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche “Città studi” (Milano) e per avermi concesso la possibilità di seguire numerosi progetti sperimentali lasciandomi sempre la massima libertà di scelta ed opinione. Le ringrazio anche, e soprattutto per gli innumerevoli consigli di vita professionale e non solo, per l’infinita disponibilità, per la fiducia in me riposta e per le attenzioni che mi hanno rivolto nei momenti di difficoltà.

Ringrazio Francesco, per avermi sostenuta in questi cinque anni di studio, per avermi incoraggiata nei momenti di sconforto, per avermi sempre saputo riportare con i piedi a terra ricordandomi le cose importanti della vita e per avermi aiutata continuamente e con tutti i suoi mezzi nel bisogno. Lo ringrazio per la fiducia riposta in me e per essere stato un mio punto di riferimento stabile.

Il più sentito dei ringraziamenti va sicuramente ai miei genitori che mi hanno permesso di arrivare fin qui supportandomi ed aiutandomi quando era necessario; li ringrazio per tutto quello che han fatto e continuano a fare per me. Un grazie in particolare va alla mitica nonna Giulia che con i suoi consigli pragmatici è riuscita sempre a colpire nel segno!

Ringrazio Pica che nonostante questi anni di “conflittuale” convivenza rimane sempre un mio punto di riferimento. Un grazie speciale per aver assunto le parti di *graphic-designer* nella stesura di questo elaborato!

Ringrazio tutte le persone che mi hanno affiancata in questi anni di ricerca ad iniziare da Riccardo, Marcio, Federica, Giuseppe, Michele, Andrea e Gaia. Grazie alla dott.ssa Carmagnola per i suoi preziosi consigli. Un ringraziamento in particolare a Stefano per i suoi concreti consigli tecnici, statistici e grafici e ad Elena per l’infinita pazienza e disponibilità dimostratami e per le numerose giornate trascorse a discutere, ma anche a ridere sugli imprevisti occorsi in questo percorso sperimentale.

Ringrazio tutto il personale della clinica odontoiatrica per i preziosi insegnamenti e la passione nel lavoro trasmessami. Ringrazio in particolare il dott. Andreoni e il suo staff, il dott Fenini, il dott.Sanguini, la dott.ssa Idotta e il dott. Di Rosario. Ringrazio il dott. Bianchi

mio tutor “conservatore” insostituibile e mio futuro gelataio di fiducia e il mitico dott. Safaee per le sua integerrima professionalità...

Ringrazio Federica con la quale ho condiviso anni di studio, ricerca, ma soprattutto di sincera amicizia; grazie per essermi stata sempre vicina nel momento del bisogno e grazie per le numerose cene in casa MuRoToChi!

Ringrazio Gabriele e Sara che con la loro simpatia, le loro paranoie e a volte la loro follia, malgrado il loro spiccato spirito padano, hanno saputo accogliere con affetto una “terroncella” tra di loro. Un doppio grazie a Gabriele per essersi preso cura del mio computer quando necessario e alla Sara per averci sempre offerto pezzi da novanta dalla sua cantina!

Grazie a Maria, l’amica di sempre, per le sue parole giuste al momento giusto... Anche a distanza ha sempre trovato il tempo e il modo per incoraggiarmi.

Ringrazio Valeria per le interminabili chiacchierate, i consigli disinteressati e la fiducia riposta in me.

Un grazie a Giulia e Marianna, amiche di interminabili pomeriggi sui libri, inframezzati da pediluvi e granite nei periodi estivi!

Ringrazio Martina per il suo importante ruolo di sostegno morale ogni lunedì mattina, nonchè compagna di avventure/disavventure protesiche!

Ringrazio infine tutti coloro che per sbadataggine o fretta, ma non per mancanza di affetto, non ho inserito in questo elenco.