



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DEL MOLISE**

Dipartimento di Scienze per la Salute

Dottorato di Ricerca in Scienze per la Salute

Coordinatore: *Chiar.mo Prof. Guido Maria GRASSO*

XXIII ciclo

Espressione delle superossido dismutasi nell'infarto del miocardio:

correlazioni clinico-patologiche

Relatore:

Dottorando :

Chiar.mo Prof. Fabrizio GENTILE

Dott. Massimiliano GUERRIERO

Anno Accademico 2011/2012

Introduzione	2
Cenni di anatomia e fisiopatologia della cardiopatia ischemica	4
Anatomia (macroscopica e microscopica) del cuore	4
Vasi coronarici ed irrorazione del cuore	9
La cardiopatia ischemica	11
Gli eventi molecolari che caratterizzano l'ischemia cardiaca	17
I danni da riperfusione	19
I meccanismi di protezione cellulare verso le specie reattive dell'O ₂	22
Catalasi e Glutathione Perossidasi.	31
Le Super Ossido Dismutasi SOD	32
Materiali e metodi	55
Selezione dei campioni	55
Analisi dei campioni e fasi preliminari di messa a punto del sistema sperimentale	56
Preparazione dei campioni tissutali	60
Realizzazione dei microarray tissutali	82
Taglio delle sezioni istologiche da microarray	87
Anticorpi utilizzati	90
Esecuzione dei test di immunistochemica	91
Valutazioni ed analisi statistiche	94
Real Time -PCR	97
Risultati	118
Discussione	129
Limiti dello studio	135
Prospettive dello studio	136
Dedica	139
Ringraziamenti	140
Bibliografia	141

Introduzione

L'infarto del miocardio è una patologia causata dalla morte, o necrosi, di una zona di tessuto miocardico, questa è dovuta all'improvvisa occlusione di uno o più rami delle arterie coronarie.

Questa condizione morbosa molto diffusa nei Paesi occidentali, contro la quale la scienza medica lotta ogni giorno di più, rappresenta oggi la più frequente fra le cause di morte ed è in costante aumento. L'aumento dell'incidenza di tale patologia è legata al cambiamento dello stile di vita nelle nazioni industrializzate. Lo stress, il cambiamento delle abitudini alimentari che prediligono un'alimentazione molto più ricca di grassi e proteine rispetto al passato e le abitudini di vita sempre più sedentarie, concorrono nell'incremento del rischio di infarto in tali popolazioni.

Con l'acronimo inglese ROS (*Reactive Oxygen Species*) si indicano le specie reattive dell'ossigeno, esse sono piccole molecole altamente reattive, che derivano principalmente dalla respirazione aerobica. In condizioni fisiologiche, esiste un equilibrio tra i livelli di ROS, prodotti durante il normale metabolismo cellulare, e la loro degradazione ad opera di sistemi antiossidanti endogeni, che li trasformano in molecole non tossiche. La perturbazione di questo equilibrio produce

una condizione chiamata stress ossidativo, che è causa di un'ampia varietà di patologie, tra cui danni cardiovascolari, disordini neurologici o alterazioni cromosomiche. Lo stress ossidativo rappresenta, inoltre, uno dei maggiori stimoli apoptotici, ed è noto che l'apoptosi dei miociti cardiaci gioca un ruolo significativo nello sviluppo dell'infarto del miocardio e di diverse patologie cardiovascolari quali le cardiomiopatie dilatative, l'ipertensione e l'aterosclerosi.

La famiglia delle superossido dismutasi (SOD) è tra gli antiossidanti enzimatici più diffusi ed importanti: se ne conoscono 3 isoforme, una citoplasmatica (SOD1), una mitocondriale (SOD2) ed una extracellulare (EC-SOD o SOD3).

Questo studio si pone come obiettivo la valutazione dell'espressione delle SOD, attraverso tecniche di immunoistochimica applicata ai tissue microarray ed RT-PCR, in un campione di soggetti colpiti da infarto.

Il fine di tale lavoro è verificare l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione delle superossido dismutasi e la patologia ischemica cardiaca.

Valuteremo, inoltre, l'espressione di marcatori apoptotici, al fine di verificare una corrispondenza tra le variazioni nell'espressione delle

superossido dismutasi ed i fenomeni apoptotici.

Cenni di Anatomia e fisiopatologia della cardiopatia ischemica

Anatomia macroscopica e microscopica del cuore

Le dimensioni del cuore possono variare in base a quelle corporee del soggetto, normalmente il cuore ha un peso di 250-300 gr nella donna e 300-350 gr nell'uomo. Lo spessore delle pareti libere dei ventricoli è rispettivamente di 0,3-0,5 cm per il destro e 1,3-1,5 cm per il sinistro. L'aumento delle dimensioni dell'organo e/o dello spessore delle pareti è tipico delle condizioni patologiche (ipertrofia o dilatazione).

Le cavità del cuore sono quattro, due atri e due ventricoli. Gli atri comunicano con i sottostanti ventricoli mediante le valvole atrioventricolari (tricuspide a destra, bicuspidale o mitrale a sinistra). Nell'atrio destro sboccano le vene cave e la grande vena coronaria, nel sinistro le quattro vene polmonari. Gli orifizi che mettono in comunicazione il cuore con le arterie, i vasi che trasportano il sangue lontano dal cuore, sono anch'essi asserviti da valvole per impedire il reflusso: la valvola semilunare polmonare (ventricolo destro - arteria polmonare) e la valvola semilunare aortica (ventricolo sinistro - aorta).

Un setto (con due porzioni, interatriale ed interventricolare) divide completamente la parte destra del cuore dalla sinistra.

Il tessuto connettivale presente nel cuore, costituito da cellule di origine mesenchimale deputate alla sintesi di matrice extracellulare, rappresenta un supporto inerte per la contrazione cellulare e per il sistema vascolare; esso svolge inoltre un importante ruolo di integrazione e sincronizzazione dei movimenti specifici a cui la massa muscolare va costantemente incontro.

La superficie esterna del cuore appare liscia e lucente, in quanto avvolta da una sottile membrana, il pericardio, costituito da due strati distinti: uno esterno, il pericardio fibroso, e uno interno, il pericardio sieroso.

Il pericardio sieroso, o epicardio, riveste le due tonache più interne del cuore, che quindi nel complesso risulta costituito da tre strati uno interno all'altro: l'epicardio, il miocardio e l'endocardio.

L'epicardio è costituito da uno strato sottile e superficiale di cellule poligonali appiattite (mesotelio) e di un sottostante strato connettivale ricco di fibre elastiche (strato sottomesoteliale). Più in profondità si trova uno strato sottoepicardico di connettivo fibrillare lasso, nello spessore del quale decorrono vasi e nervi; in questo strato, soprattutto in corrispondenza dei solchi del cuore, si accumula tessuto

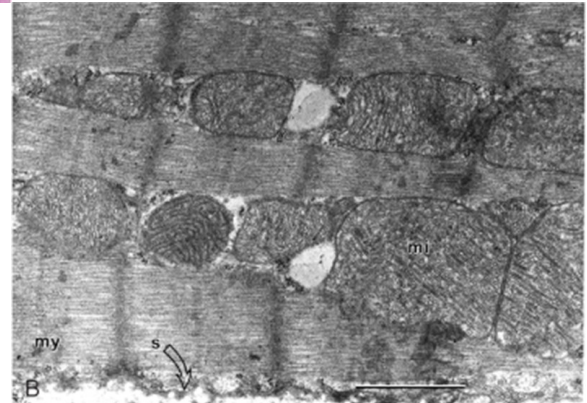
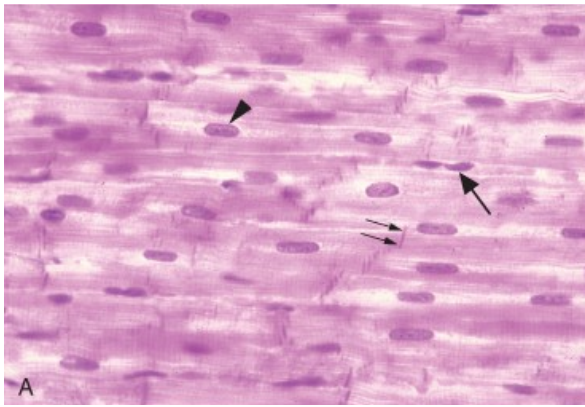
adiposo. Sotto l'epicardio, si trova il miocardio, costituito da fibrocellule muscolari, che sostengono la funzione di pompaggio del sangue nel corpo umano. È la più spessa tra le tre tonache, raggiungendo uno spessore di 5-15 mm, a seconda delle zone, dato che lo spessore del miocardio è maggiore in corrispondenza dei ventricoli ed è correlato al lavoro muscolare effettuato.

Il miocardio è composto da cellule muscolari specializzate chiamate miociti cardiaci o miocardiociti. Essi sono organizzati, in corrispondenza del ventricolo sinistro, la camera che spinge il sangue nella circolazione sistemica, in strati circolari e spirali.

Elementi fondamentali dei miocardiociti sono:

La membrana cellulare o sarcolemma e tubuli T, implicati nella trasmissione dell'impulso.

- Reticolo sarcoplasmatico, sito di stoccaggio dello ione Ca^{2+} necessario per la contrazione.
- Elementi contrattili (indicati con my nella figura B sottostante).
- Mitochondri (indicati con mi nella figura B sottostante).
- Nucleo sempre collocato al centro della cellula (testa di freccia nella figura A sottostante).



Struttura (A) e microstruttura (B) del tessuto miocardico

Le cellule muscolari cardiache contengono un numero di mitocondri ben superiore alle cellule del muscolo scheletrico e ciò è legato alla completa dipendenza del muscolo cardiaco da un metabolismo aerobico. Il muscolo cardiaco si contrae in una fase definita sistole e si rilassa in una definita diastole.

L'unità funzionale di base è costituita dal sarcomero: esso è a sua volta costituito da filamenti spessi di miosina e filamenti sottili di actina, sono inoltre presenti proteine regolatrici della contrazione quali la tropomiosina e la troponina. La lunghezza di un sarcomero durante una sistole è data dal grado di sovrapposizione delle proteine sarcomeriche. Il processo di contrazione avviene per scorrimento dei

filamenti sottili, posti alle due estremità del sarcomero, lungo i filamenti spessi di miosina, ciò determina una parziale sovrapposizione dei due tipi di filamenti. Durante la diastole il sarcomero si allunga, e si riduce lo spazio di sovrapposizione tra le proteine sarcomeriche: ciò incrementa la forza di contrazione disponibile nella successiva fase sistolica. In condizioni patologiche, come durante l'infarto, la sovrapposizione di actina e miosina si riduce ulteriormente ed, oltre un certo limite, si determina una riduzione permanente nelle capacità contrattili del sarcomero.

I miociti rappresentano soltanto il 25% delle cellule del cuore, ma la loro dimensione, decisamente superiore a quella dei restanti fenotipi cellulari, fa sì che essi rappresentino anche il 90% della massa cardiaca. Le altre cellule presenti sono principalmente fibroblasti, cellule endoteliali e rare cellule del sistema immunitario (in condizioni fisiologiche). Nella porzione atriale del cuore sono presenti miociti cardiaci che morfologicamente e funzionalmente si differenziano da quelli presenti nei ventricoli, in quanto di dimensioni inferiori e ricchi di granuli cellulari contenenti ANP (atrial natriuretic peptide), un fattore implicato in molti processi fisiologici. La funzionalità dei miociti cardiaci è strettamente correlata alla presenza dei cosiddetti dischi

intercalari, strutture che permettono una stretta relazione sia meccanica, per la trasmissione della forza di contrazione, sia ionica, per la trasmissione dell'impulso di contrazione.

Nella generazione dell'impulso e nella sua trasmissione, sono di fondamentale importanza i siti caratterizzati dalla presenza del miocardio specifico. Il nodo seno-atriale o pace-maker, sito nei pressi della vena cava superiore, il nodo atrio-ventricolare, sito nell'atrio destro, nello spessore del setto interatriale, il fascio di Hiss che percorre il setto interatriale ed in parte quello interventricolare, prima di dividersi nella branca destra ed in quella sinistra che si dirameranno in una rete che terminerà nello spessore dei muscoli papillari dei ventricoli destro e sinistro.

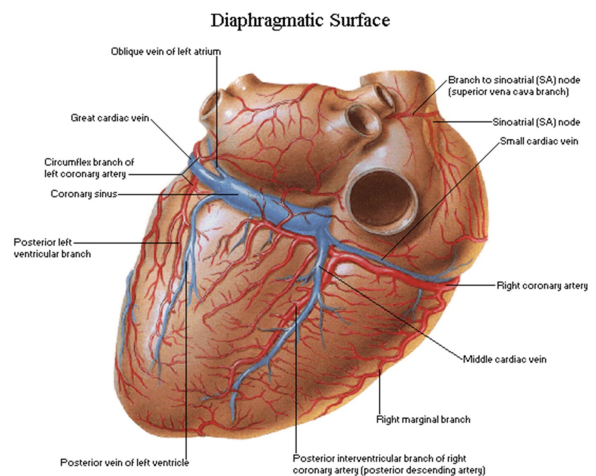
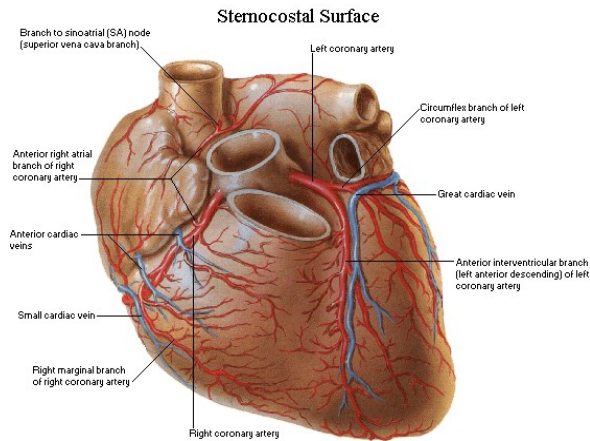
Infine, l'ultima tonaca della parete cardiaca è l'endocardio, il rivestimento interno che protegge la cavità cardiaca. È costituito da endotelio sostenuto da uno strato di tessuto connettivo sottoendoteliale, ed ha la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore evitando, in condizioni normali, la formazione di coaguli.

Vasi coronarici ed irrorazione del cuore

Generando energia prevalentemente per ossidazione di substrati, il cuore necessita di un costante afflusso di sangue ossigenato. Ciò

avviene grazie alle arterie coronarie, due vasi che prendono origine dall'aorta nei pressi del punto di inserzione di quest'ultima nel ventricolo sinistro.

Le arterie coronarie sono vasi lunghi 5-10 cm e del diametro di 2-4 mm, che decorrono sulla superficie dell'organo in corrispondenza del solco coronario e del solco interventricolare. Esse si diramano in una fitta rete di capillari che penetrano nel tessuto cardiaco. Le tre maggiori arterie coronarie sono l'arteria coronaria anteriore sinistra discendente e la circonflessa sinistra, entrambe derivano dalla biforcazione della branca sinistra dell'arteria coronaria principale, ed, infine, l'arteria coronaria di destra.



Distribuzione e territorio irrorato dai vasi coronarici

L'afflusso di sangue nelle arterie coronarie si realizza principalmente durante la diastole ventricolare, quando la microcircolazione non sarà compressa dalla contrazione del muscolo cardiaco. La conoscenza dell'area di perfusione dei rami delle coronarie aiuta nell'individuazione dell'area di occlusione vascolare e di infarto miocardico.

La cardiopatia ischemica

Con il termine di infarto del miocardio si intende l'ischemia e la

successiva necrosi di un distretto del miocardio, cioè il danno che consegue al mancato apporto ematico ad un distretto cardiaco, e quindi in ultima analisi di glucosio ed ossigeno, tramite il circolo sanguigno delle arterie coronarie. La sindrome acuta è legata, perciò, al venir meno della funzione cardiaca di pompa ed alle complicanze che ne derivano, in primo luogo le aritmie ipercinetiche (fibrillazione ventricolare, tachicardia ventricolare ecc.) ed ipocinetiche (arresto sinusale, blocco di branca, emblocchi ecc.).

In Italia le cardiopatie ischemiche (sindromi anginose, infarto, scompenso cardiaco congestizio) interessano il 5% della popolazione, con 2.000.000 di ammalati e 350.000 nuovi casi/anno; la morte per causa vascolare costituisce il 45% di tutte le morti.

L'infarto può essere causato:

1. dall'ostruzione acuta di un'arteria coronaria dovuta a trombosi nell'80% dei casi, quasi sempre in prossimità di una placca ateromasica, ossia di una lesione vasale che inizia dalla deposizione di una pappia lipidica, una proliferazione di tessuto muscolare, che in seguito si organizza ed ostruisce il lume vasale;
2. da un'emorragia subintimale per rottura dei capillari neoformati entro la placca ateromasica stessa;

3. da uno spasmo o ripetuti spasmi.

La necrosi inizia dopo 20-40 minuti dall'occlusione ed il processo, a seconda della gravità, può interessare il miocardio subendocardico, che è sottoposto ad uno stress pressorio maggiore (infarto non Q), oppure, nei casi più gravi, estendersi in senso transmurale, a tutto lo spessore.

Gli infarti presi in analisi durante questo studio sono stati classificati in base ad un fattore temporale, dal momento d'insorgenza dell'evento, al momento del decesso, oltre che, in una successiva fase di analisi, in base ad opportune caratteristiche istologiche, riconosciute dal patologo che ne firmerà il referto autoptico.

Il fattore tempo, in un evento ischemico, è di notevole importanza: il perdurare delle condizioni di anossia nel tessuto interessato dall'occlusione di un vaso coronario porta a delle modificazioni strutturali e funzionali a carico dei miociti cardiaci. Oltre una certa soglia di tempo, subentra la morte cellulare per necrosi. Si individuano, in base al fattore temporale, tre categorie di infarto:

1. La diagnosi di infarto subacuto si delinea quando tra l'insorgenza dell'evento ischemico e la morte trascorrono oltre 24h-48h

2. L'infarto acuto, entro 24h

3. L'infarto iperacuto, entro le 12h

Le conoscenze sui processi che si realizzano durante un evento ischemico e nelle ore successive, sono in gran parte state acquisite grazie a studi su organismi modello, in cui è relativamente semplice indurre ischemie serie tramite occlusione di una delle arterie coronarie.

La gravità dell'ischemia che può realizzarsi nell'uomo può essere varia e legata a vari fattori, ma gli eventi molecolari che l'accompagnano sono simili a quelli studiati negli organismi modello, anche se, essi possono realizzarsi in tempi più o meno lunghi. A seguito dell'occlusione di un vaso coronario principale, l'afflusso di ossigeno nei tessuti si riduce notevolmente ed in brevissimo tempo. Ciò comporta l'inibizione del metabolismo ossidativo mitocondriale.

Il flusso energetico prodotto dalla catena respiratoria diminuisce, aumenta la quantità di nicotinammide adenina dinucleotide ridotta (NADH). Inizia l'inibizione del ciclo di Krebs (degli acidi tricarbossilici) e l'ossidazione degli acidi grassi. In concomitanza con tutto ciò prende inizio un metabolismo basato sulla glicolisi anaerobica. Nelle ischemie, il principale substrato metabolico è il glicogeno sarcoplasmatico.

Il metabolismo glicolitico risulta, però, assolutamente insufficiente al fabbisogno energetico cellulare: a fronte di 38 molecole di ATP

prodotte dal metabolismo aerobico, quello anaerobico ne produce soltanto 3 per ogni molecola di glucosio, proveniente dal glicogeno, e metabolizzata attraverso la via anaerobica.

In tali condizioni, anche un metabolismo spinto al massimo, può produrre soltanto il 7% dell'energia necessaria al corretto funzionamento del miocardio. Per tale motivo, la contrazione muscolare, è rapidamente soppressa durante l'ischemia. Il lavoro meccanico svolto dal cuore porta rapidamente all'esaurimento delle molecole di ATP disponibili, ma non solo: anche l'ADP viene degradato in AMP. Rapidamente a livello cellulare si accumulano adenosine, inosine, ipoxantine e xantine. Tali cataboliti vengono rapidamente eliminati nel caso di ri-perfusione della zona infartuata.

I danni prodotti dall'ischemia sono da attribuirsi anche all'accumulo di cataboliti (lattato e nucleotidi purinici, principalmente). Fenomeni di acidosi, accumulo di prodotti azotati tossici derivanti dalla degradazione di amminoacidi ed adenosine e di fosfati derivanti dalla scissione dell'ATP ed ADP, sono la norma nei fenomeni ischemici.

Le acidosi sono processi che portano ad una serie di conseguenze molto gravi: esse inibiscono la glicolisi anaerobica, riducendo in tal modo, ancor più il metabolismo attivo della cellula, ma non solo. Esse hanno

effetti sull'ultrastruttura di molte macromolecole, causano l'aggregazione della cromatina nucleare e la formazione di una matrice amorfa mitocondriale.

L'accumulo dei fosfati è sicuramente causa di disfunzioni contrattili. Inoltre l'accumulo di cataboliti determina un'alterazione dell'equilibrio osmotico con acquisizione d'acqua dall'ambiente circostante e la susseguente rottura del sarcolemma o danneggiamento del citoscheletro.

L'idrolisi dei trigliceridi di scorta, a livello miocardico, aumenta in caso di infarto e ciò comporta un accumulo di acidi grassi, acetil coenzima A ed acil carnitine a livello cellulare. L'accumulo di esteri degli acidi grassi determina mal funzionamento di molti enzimi fondamentali. Ad esempio l'adenin nucleotide transferasi viene inibita dall'accumulo di Acetil coA. Ciò impedisce la traslocazione dell'ATP dai mitocondri al citoplasma. Inoltre gli acidi grassi possono agire da veri detergenti distruggendo la membrana cellulare.

Negli ultimi anni si è fatta strada la teoria che durante l'infarto e, successivamente, dopo l'eventuale riperfusione, possa determinarsi un aumento di radicali liberi (ioni superossido O_2^- o idrossido OH) che possono contribuire al danno dei miociti.

I radicali liberi sono specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS) che causano gravi danni molecolari a carico dei lipidi, degli acidi nucleici e delle proteine. Molti pathway sono noti come produttori di radicali liberi in condizioni non fisiologiche e nelle prime fasi di riperfusione di tessuti precedentemente ischemici. Per esempio, uno dei processi è l'ossidazione delle xantine o l'ossidazione del NADPH dei neutrofili attivati. Questi due processi sono stati entrambi molto studiati. In particolare l'ossidazione delle xantine, che converte l'ipoxantina in xantina e acido urico con il rilascio di superossido e perossido di idrogeno, è coinvolta nella degradazione dell'ATP. Il pathway che coinvolge i neutrofili è particolarmente importante perché essi hanno un ruolo determinante, insieme ai macrofagi, nella fagocitosi dei miociti danneggiati e permettono la sostituzione del miocardio necrotico con il tessuto cicatriziale. Inoltre essi svolgono un ruolo fondamentale nei processi infiammatori che sono causa di ulteriori danni anche a carico dei miociti non danneggiati dall'ipossia. I neutrofili si accumulano in enorme numero nella zona ischemica e continuano a svolgere il proprio ruolo anche dopo riperfusione danneggiando anche miociti integri attraverso il rilascio di enzimi litici, quale l'elastasi, e di ROS come cataboliti. Inoltre il loro numero elevato può causare ostruzione dei

micro capillari impedendo la riperfusione.

Molti studi sono stati condotti sulla presenza di ROS nei siti ischemici prima e dopo riperfusione: la quantità di ROS si è dimostrata molto abbondante e l'attività delle SOD e degli altri enzimi antiossidanti, è l'unica a poter attenuare gli effetti negativi della persistenza di tali prodotti.

Gli eventi molecolari che caratterizzano l'ischemia cardiaca

Fin dai primi minuti successivi all'occlusione di un vaso coronario si hanno delle alterazioni morfo-funzionali a carico delle strutture cellulari della zona interessata dall'ischemia.

Le cellule iniziano a gonfiarsi a causa dell'alterazione dell'equilibrio osmotico, vi è una perdita graduale del glicogeno cellulare ed alterazioni della cromatina nucleare. Questi primi cambiamenti sono reversibili in caso di riperfusione e, quindi, di nuovo apporto di ossigeno e sostanze nutritive. Col passare del tempo, però, alcune alterazioni diventano irreversibili, in particolare due sono le alterazioni di maggiore entità: la formazione di addensati a livello della matrice mitocondriale e la rottura della membrana cellulare a causa dell'eccessivo ingresso d'acqua, provocato dallo scompenso osmotico.

In una fase successiva appaiono le bande di contrazione, indice di necrosi. Tali bande indicano un grave danneggiamento del sarcolemma dovuto ad un accumulo di ioni calcio nel citoplasma ed alla distruzione della ultrastruttura dei sarcomeri e delle miofibrille, unità funzionali di base dei miociti.

Il danno ai miociti, però, in genere, è preceduto da danni ultrastrutturali a carico dei vasi e dei capillari. Le cellule endoteliali della tonaca intima sono le prime a subire danni, la loro rottura provoca il riversamento del contenuto citoplasmatico nel lume del vaso ed aggrava o è causa di occlusione. In caso di riperfusione i danni a livello dell'endotelio provocano una massiva emorragia con riversamento del sangue nei tessuti circostanti. In altri casi, invece, l'occlusione impedisce la riperfusione.

La rottura delle membrane cellulari dei miociti è molto probabilmente legata ad un'alterazione delle molecole che la costituiscono, quali lipidi e proteine, causata, probabilmente, da alterazioni di tipo chimico, piuttosto che da stress di tipo meccanico; studi condotti in laboratorio in mezzi ipotonici hanno mostrato che i miociti sono in grado di assumere dimensioni 150% maggiori delle dimensioni originali senza particolari problemi, quindi

durante l'ischemia deve subentrare qualche ulteriore alterazione che ne determina la fragilità della membrana cellulare e del citoscheletro.

La presenza di ROS nelle cellule di un tessuto ischemico è forse la causa maggiore di alterazioni a carico della membrana cellulare delle stesse. Sappiamo che i ROS agiscono sia sui lipidi che sulle proteine. Sui primi determinano la loro ossidazione ed idrolisi che potrebbe essere causa di rottura della membrana, ma la teoria oggi più accreditata è che i ROS interagiscano negativamente, principalmente, sulle proteine della membrana e del citoscheletro ad essa associata, modificandone la struttura ed inducendone un'irreversibile fragilità.

I danni da riperfusione

Esiste un'ipotesi secondo la quale anche miociti danneggiati solo lievemente ed in modo reversibile durante l'ischemia, subiscono danni nella successiva fase di riperfusione, per l'alterazione dell'equilibrio osmotico della cellula, per sovraccarico di ioni calcio ed iperproduzione di ROS.

Studi condotti su animali modello non ischemici e perfusi con soluzioni contenenti radicali liberi, enzimi e substrati tipici dei tessuti ischemici, hanno evidenziato che i danni prodotti sui tessuti cardiaci, sono del

tutto simili a quelli riscontrati in tessuti ischemici. Ciononostante non è possibile affermare che, durante la ri-perfusione, la presenza dei radicali liberi sia causa di morte cellulare. Questo perché la misurazione dei radicali presenti subito dopo ri-perfusione potrebbe essere non quantitativa e, soprattutto, il luogo di produzione dei ROS rilevati potrebbe non essere determinabile. Tali ROS potrebbero provenire da altri distretti corporei attraverso la circolazione e persistere soltanto a livello interstiziale oppure essere prodotti in loco ed, effettivamente essere causa di danni cellulari. In condizioni di ischemia grave ed irreversibile, la produzione di ROS potrebbe avvenire nei pressi o totalmente a carico dei miociti che già sono stati irreversibilmente danneggiati. In tali condizioni la presenza o produzione di ROS può soltanto aggravare o accelerare il danno, ma non di certo esserne causa diretta. Per poter studiare correttamente gli effetti della presenza dei radicali in un sito di infarto è necessario disporre di un sistema sperimentale in grado di ridurre la concentrazione dei ROS durante le fasi dell'ischemia. Infatti esiste una controversia in tale materia che non è stata ancora risolta. I primi studi condotti su animali modello attraverso la somministrazione dell'inibitore della xantina ossidasi o delle SOD non hanno mostrato differenze nelle dimensioni

dell'infarto a causa dell'alta variabilità nel contenuto di ROS nel circolo sanguigno coronarico. In successivi studi condotti sul cane, sembra che l'utilizzo delle SOD con o senza catalase possa ridurre l'area di infarto, mentre l'inibitore della xantina ossidasi non ha ottenuto alcun risultato. In altri animali modello, come il maiale, l'uso di tali enzimi non sembra aver portato benefici.

Un'ulteriore branca di studio si è occupata degli effetti negativi della presenza abbondante dei neutrofili nel sito di infarto. Studi condotti con anti-infiammatori o con anticorpi specifici che bloccano l'azione dei neutrofili nei confronti delle cellule endoteliali, mostrano una riduzione dell'area di infarto. Contrariamente, però, ci sono anche ulteriori studi che non hanno evidenziato differenze sostanziali nelle aree di infarto di soggetti trattati e non.

Alla luce di quanto affermato e degli studi condotti non è possibile fare affermazioni precise sull'effetto della presenza di ROS nei siti ischemici. Il contributo preciso dei radicali liberi sul danno e la morte dei miociti cardiaci non è ancora oggi ben chiaro.

[Riferimenti bibliografici di questo capitolo: Cardiovascular Pathology; Pathologic Basis of Disease, Elsevier 2005, 7th edition , 1, 12, 13, 14, 30, 31, 32, 39, 40, 57, 60, 78, 79, 80, 82, 95, 97, 98, 110, 111, 112, 124, 125].

I meccanismi di protezione cellulare verso le specie reattive dell'ossigeno

In tempi recenti si è fatta strada la teoria che durante l'infarto e, successivamente, in seguito all'eventuale riperfusione, possa determinarsi un aumento di radicali liberi (ioni superossido O_2^- o idrossido OH) che possono contribuire al danno dei miociti.

I radicali liberi sono specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS) che causano gravi danni molecolari a carico dei lipidi, degli acidi nucleici e delle proteine. Molti pathway metabolici sono noti come produttori di radicali liberi in condizioni non fisiologiche e nelle prime fasi di riperfusione di tessuti precedentemente ischemici. Per esempio, uno dei processi è l'ossidazione delle xantine un altro è rappresentato dall'ossidazione del NADPH ad opera dei neutrofili attivati; questi due processi sono stati entrambi molto studiati.

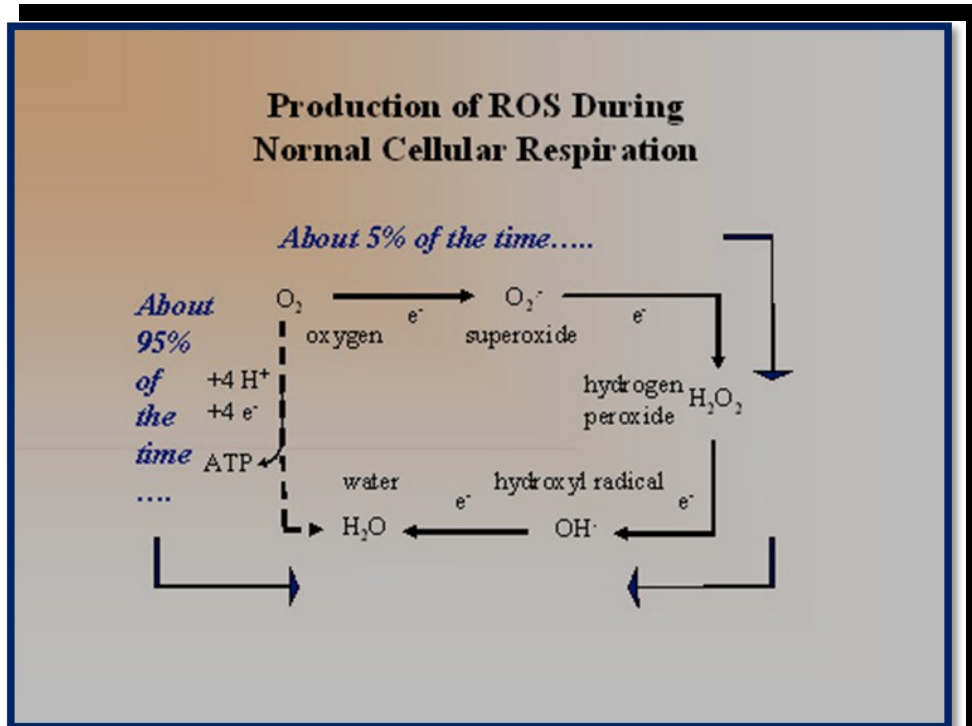
In particolare, l'ossidazione delle xantine, che converte l'ipoxantina in xantina e acido urico con il rilascio di superossido e perossido di idrogeno, è coinvolta nella degradazione dell'ATP.

Il pathway che coinvolge i neutrofili è particolarmente importante perché essi hanno un ruolo determinante, insieme ai macrofagi, nella fagocitosi dei miociti danneggiati e permettono la sostituzione del

miocardio necrotico con il tessuto cicatriziale. Inoltre essi svolgono un ruolo fondamentale nei processi infiammatori acuti che sono causa di ulteriori danni anche a carico dei miociti non danneggiati dall'ipossia. I neutrofili si accumulano in enorme numero nella zona ischemica e continuano a svolgere il proprio ruolo anche dopo riperfusione danneggiando anche miociti integri attraverso il rilascio di enzimi litici, quale l'elastasi, e di ROS come cataboliti. Inoltre il loro numero elevato può causare ostruzione dei micro capillari impedendo la riperfusione.

Il cuore è un organo a metabolismo aerobio obbligato, che consuma approssimativamente 8-15 ml di O₂/min/100g di tessuto in condizioni di riposo; in condizioni anaerobiche, non può produrre abbastanza energia per sostenere i processi cellulari essenziali. E' dunque indispensabile un apporto costante di ossigeno per la vitalità e le funzioni cardiache. Il ruolo dell'Ossigeno è vitale e deleterio al tempo stesso: esso partecipa, infatti, alla formazione di NO, fondamentale nel determinare il tono vascolare, la contrattilità cardiaca e molti altri parametri, ed alla formazione di molecole molto importanti conosciute come specie reattive dell'ossigeno, i cosiddetti ROS che, se da un lato partecipano ai normali processi di comunicazione intercellulare, dall'altro possono indurre danni irreversibili o morte cellulare.

Le specie reattive dell'ossigeno sono piccole molecole che derivano principalmente dalla respirazione aerobica.



Produzione dei ROS durante la normale respirazione cellulare

Le specie reattive dell'ossigeno includono i radicali liberi, specie con uno o più elettroni spaiati come l'anione superossido, l'idrossido, e i non radicali, capaci di generare radicali liberi, come il perossido di idrogeno.

nome specie reattiva	formula	radicale	ossidante
OSSIGENO TRIPLETTO	O ₂	SI	NO
ANIONE SUPEROSSIDO	O ₂ ^{•-}	SI	SI
PEROSSIDO D'IDROGENO	H ₂ O ₂	NO	SI

RADICALE IDROSSILICO	HO [•]	SI	SI
OSSIGENO SINGOLETTO	¹ O ₂	NO	SI

Specie reattive dell'ossigeno (ROS) radicaliche e non radicaliche

ANIONE SUPEROSSIDO O₂^{•-}

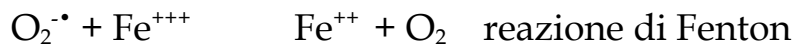
Esso è generato accidentalmente nella catena di trasporto degli elettroni (e⁻) nei mitocondri e nei microsomi, oppure intenzionalmente dalle cellule fagocitarie tramite le ossidasi NADPH-dipendenti. Questo anione ha una reattività bassa, con diffusione alta; partecipa alla reazione di Fenton; viene trasformato in H₂O₂ dalla SOD nel citoplasma e nei mitocondri. Il superossido è biologicamente abbastanza tossico ed è usato dal sistema immunitario per uccidere i microorganismi patogeni. Nei fagociti, il superossido è prodotto in grandi quantità dall'enzima NADPH ossidasi per essere utilizzato nei meccanismi di eliminazione ossigeno-dipendenti degli agenti patogeni. Mutazioni nel gene che codifica l'NADPH ossidasi causa una sindrome di immunodeficienza chiamata sindrome granulomatosa cronica, caratterizzata da un'estrema suscettibilità alle infezioni. Il

superossido è anche prodotto in modo deleterio come prodotto di scarto della respirazione mitocondriale (in modo particolarmente notevole dal Complesso I e dal Complesso III), come anche da molti altri enzimi quali la xantina ossidasi.

La tossicità biologica del superossido è dovuta alla sua capacità di inattivare il gruppo ferro-zolfo contenuto negli enzimi (che sono importantissimi in un gran numero di processi metabolici), liberando di conseguenza ferro semplice nella cellula, secondo la reazione di Fenton e generare il radicale idrossile che è altamente reattivo. Nella sua forma HO_2 , il superossido può anche avviare nei lipidi la perossidazione degli acidi grassi polinsaturi. Reagisce anche con i composti carbonilici e con i carboni alogenati per creare radicali perossilici tossici. Il superossido può anche reagire con il monossido di azoto (NO) formando il ONOO^- . Per questo, il superossido è una causa prima dello stress ossidativo.

RADICALE IDROSSILE HO^\bullet

Esso è generato nella catena di trasporto degli e^- nei mitocondri sia per azione delle radiazioni elettromagnetiche che in presenza di metalli di transizione, attraverso reazioni come quelle di Fenton o di Haber-Weiss:



Il Radicale Ossidrile possiede reattività alta ma diffusione limitata.

PEROSSIDO DI IDROGENO H_2O_2

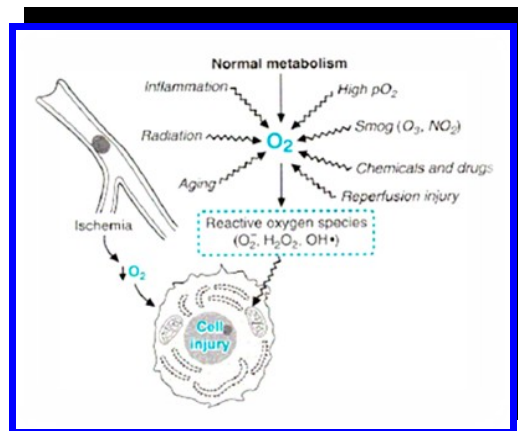
Questa molecola è generata attraverso diverse vie: enzimaticamente dalla SOD a partire da $\text{O}_2^{\cdot-}$; enzimaticamente dalle xantina ossidasi dei perossisomi oppure nella catena di trasporto degli e^- nei mitocondri. Esso diffonde velocemente ed è degradato dalla catalasi nei perossisomi.

OSSIGENO SINGOLETTO $^1\text{O}_2$

L'Ossigeno singoletto è prodotto principalmente per fotoeccitazione in presenza di un iniziatore come le clorofilla; può reagire con doppi legami, per esempio quelli degli acidi grassi producendo idroperossidi.

Le varie specie radicaliche danneggiano le strutture cellulari alterando la struttura della membrana e quindi anche la fluidità e la permeabilità, e perturbando in questo modo la comunicazione intercellulare, o danneggiando il materiale genetico e l'attività dei vari enzimi, inducendo così la morte della cellula.

Azione dei ROS sulla cellula



Il ROS vascolare a maggior diffusione ed importanza è l'anione superossido O_2^- , che inattiva l'ossido nitrico, il principale fattore di vasodilatazione. Elevati livelli di anione superossido, con il conseguente accumulo di perossido di idrogeno e la diminuzione della biodisponibilità di ossido nitrico giocano un ruolo critico nella regolazione del rimodellamento vascolare attraverso la modulazione di processi quali contrazione e dilatazione cellulare, migrazione, crescita ed apoptosi delle cellule, turnover delle proteine della matrice extracellulare. Possono inoltre interagire e attivare chinasi regolate da

segnali extracellulari (ERKs), proteinchinasi attivate da mitogeni (MAPKs), fosfatasi, fattori trascrizionali, in grado di indurre l'espressione di geni pro-infiammatori coinvolti nella risposta infiammatoria vascolare associata a ipertensione ed aterosclerosi. Inoltre hanno un importante ruolo nella modulazione della reazione infiammatoria operata dai macrofagi.

D'altro canto, uno degli effetti negativi principali dei ROS è quello di reagire direttamente con lipidi, proteine e DNA, una volta abbattute le difese antiossidanti delle cellule, causando danni e/o morte cellulare, come avviene nel caso della perossidazione dei lipidi che danneggia le membrane degli organelli e delle cellule, nel caso di mutagenesi del DNA attraverso l'ossidazione delle purine ed altre alterazioni della cromatina ROS-mediate o ancora nel caso di alterazioni di proteine che portano a denaturazione o inattivazione di enzimi critici.

In condizioni fisiologiche esiste un equilibrio, conosciuto come "stato redox" della cellula, tra i livelli di ROS prodotti durante il normale metabolismo cellulare e la loro degradazione ad opera degli antiossidanti endogeni, enzimatici e non, che li degradano trasformandoli in molecole non tossiche allo scopo di proteggere i

tessuti. L'alterazione di questo bilanciamento, attraverso l'incremento o il decremento della produzione di ROS, produce una condizione chiamata stress ossidativo. Quando i livelli di ROS sono elevati, essi tendono a reagire con numerose proteine, nonché con DNA e membrane cellulari, causando un'ampia varietà di condizioni patologiche, tra cui danni cardiovascolari come ischemia, ipertensione e aterosclerosi, disordini neurologici o alterazioni cromosomiche.

Tra i pathways antiossidanti enzimatici meglio caratterizzati ci sono la superossido dismutasi, che permette la formazione di H₂O₂ dall'O₂⁻, le catalasi e la glutazione perossidasi, che coordinano la catalisi dell'H₂O₂ in acqua. I meccanismi non enzimatici includono gli antiossidanti quali vitamine E, C, β-carotene e glutazione, che funge da substrato ridotto per l'attività enzimatica della glutazione perossidasi.

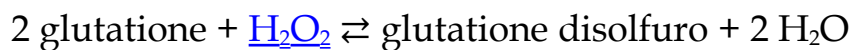
Catalasi

Si tratta di enzimi che catalizzano la demolizione dell'acqua ossigenata in acqua e ossigeno; sono metalloproteine, il cui gruppo prostetico (cioè la parte non proteica) è rappresentato dal ferro. Tali enzimi hanno la capacità di proteggere i tessuti dai perossidi, cioè da quei composti

chimici che si formano nel corso di processi ossidativi e che sono in grado di agire come tossici sulle cellule alterandone importanti funzioni vitali.

Glutazione perossidasi

La glutazione perossidasi è un [enzima](#) appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:

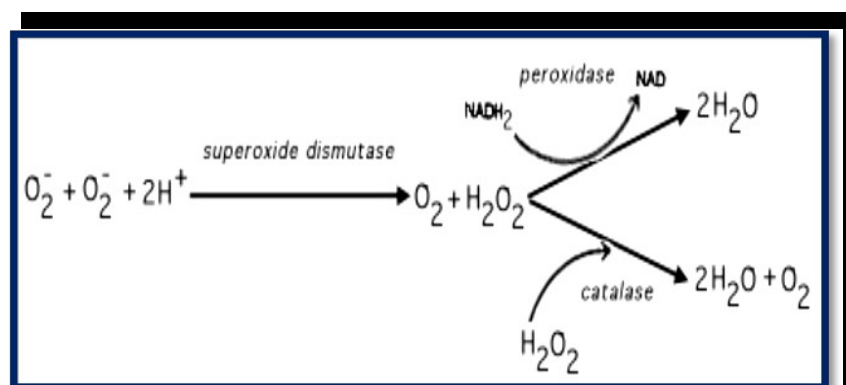


Vi sono diversi isoenzimi codificati da diversi geni, che variano nella localizzazione cellulare e nella specificità di substrato. La Glutazione perossidasi 1 (GPx1) è la versione più abbondante, presente nei citoplasmi di quasi tutti i tessuti di mammiferi, che ha come substrato preferenziale il perossido di idrogeno. La Glutazione perossidasi 4 (GPx4) ha una alta preferenza per gli idroperossidi lipidici; viene espressa in quasi ogni cellula di mammiferi, anche se a livelli molto più bassi. La Glutazione perossidasi 2 è un enzima intestinale ed

extracellulare, mentre la glutazione perossidasi 3 è extracellulare, specialmente abbondante nel plasma. Fino ad oggi, sono state identificate negli umani otto differenti iso-forme di glutazione perossidasi (GPx1-8).

Le Superossido Dismutasi SOD

La famiglia delle superossido dismutasi è tra gli antiossidanti enzimatici più diffusi ed importanti e catalizza la dismutazione di due radicali superossido in perossido di idrogeno e ossigeno.



Reazione di dismutazione dello ione superossido

Sotto questo aspetto, le SOD assumono un ruolo centrale nella risposta dell'organismo alla tossicità dei sottoprodotti metabolici dell'ossigeno. Le SOD sono enzimi ubiquitari dimerici o tetrameriche costituiti da subunità identiche, presenti nel citoplasma delle cellule eucariotiche e nel periplasma di quelle batteriche. Si tratta di un metallo enzima e, sulla

base del tipo di metallo presente nel gruppo prostetico, si distinguono due famiglie di SOD.

Il primo gruppo comprende la Cu/Zn-SOD (SOD1), localizzata nel citosol e nel nucleo delle cellule eucariotiche; il secondo comprende la Fe/Mn-SOD (SOD2), trovata principalmente in batteri e archeobatteri e nei mitocondri delle cellule eucariotiche.

Nel 1982 fu scoperta da Marklund un'ulteriore famiglia di Cu/Zn-SOD, chiamata superossido dismutasi extracellulare (EC-SOD o SOD3), che è risultata la SOD predominante nei fluidi extracellulari, quali linfa, fluidi sinoviali e plasma.

Delle 3 isoforme, la Cu/Zn-SOD (SOD1) è la più abbondante in termini di espressione totale in quasi tutti i tipi cellulari ed è altamente espressa nella parete vascolare, dove è appunto l'isoforma predominante. Diversi studi hanno dimostrato che l'attività della Cu/Zn-SOD è circa il 50-80% dell'attività totale delle SOD, la Mn-SOD (SOD2) circa il 2-12% e l'EC-SOD (SOD3) la restante percentuale.

Quindi volendo riepilogare:

Il citosol di praticamente tutte le cellule eucariote contiene l'enzima SOD con [rame](#) e [zinco](#) (Cu-Zn-SOD). L'enzima Cu-Zn è un omodimero di peso molecolare 32,500. Le due subunità sono unite innanzitutto grazie a interazioni idrofobiche ed elettrostatiche. I legami di rame e zinco sono catene laterali all'[istidina](#).

I [mitocondri](#) del fegato dei polli (e quasi tutti gli altri), e molti [batteri](#) (come l' *E. coli*) contengono una forma con [manganese](#) (Mn-SOD). I legami degli ioni manganese sono 3 catene laterali all'istidina, una catena laterale all'[aspartato](#) e una molecola d'acqua o legame o legame [ossidrile](#) a seconda dello stato di ossidazione del Mn (rispettivamente II e III). * *E. coli* e molti altri batteri contengono anche una forma dell'enzima con [ferro](#) (Fe-SOD); alcuni batteri contengono Fe-SOD, altri Mn-SOD, e altri entrambi. I siti attivi delle superossido dismutasi contenenti Mn e Fe contengono lo stesso tipo di [amminoacidi](#) nelle catene laterali.

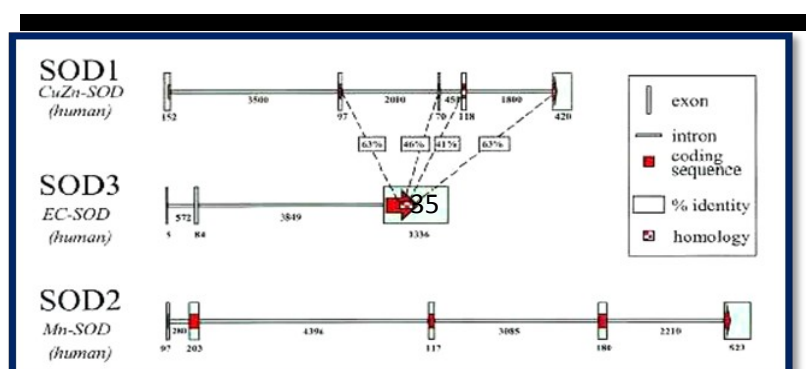
Evoluzione della SOD

Si ritiene che l'apparizione della SOD fu contemporanea alla proliferazione degli organismi fotosintetici, i quali cominciarono a produrre ossigeno circa due miliardi di anni fa. La varietà di

enzimi antiossidanti evolse per neutralizzare gli effetti tossici dei sottoprodotti derivanti dall'utilizzo di ossigeno.

Lo studio delle omologie strutturali e delle sequenze aminoacidiche ha permesso di determinare l'esistenza di due principali famiglie di superossido dismutasi apparse nei procarioti nel medesimo periodo: le SODs contenenti Cu, Zn e quelle contenenti Fe, Mn o Ni. Nonostante entrambe le classi svolgano la stessa funzione, le grandi differenze tra le strutture cristalline, la presenza di diversi cofattori metallici e i diversi meccanismi catalitici rendono difficile ipotizzare un antenato comune.

La ricostruzione della storia evolutiva della Cu,Zn SOD, ricavata da allineamenti multipli di sequenze mostra come la SOD extracellulare si sia diversificata da quella citoplasmatica nei primi stadi dell'evoluzione, prima della differenziazione di funghi, piante e metazoi.



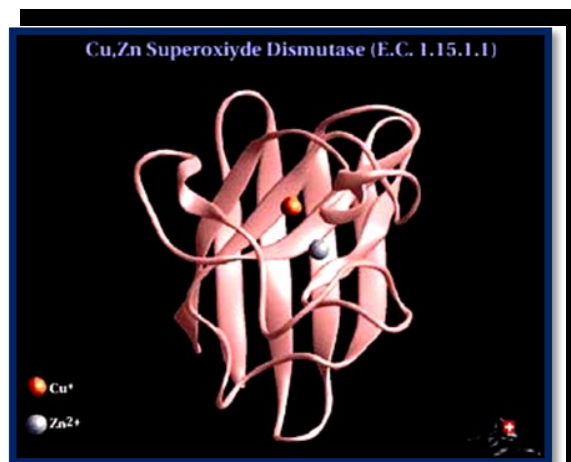
Organizzazione genomica di tre membri conosciuti della famiglia delle superossido dismutasi. SOD1 e SOD3 presentano omologie nella sequenza aminoacidica. SOD2 non presenta significative similarità con le altre due.

La sequenza genomica per la Cu,Zn SOD è stata identificata in *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*. L'organizzazione genomica del gene per la SOD mostra forti similarità tra le specie analizzate ed è caratterizzata da cinque esoni e quattro introni. La TATA box e la CCAAT box, oltre ad alcune regioni ricche in GC altamente conservate, sono localizzate in tutte e tre le specie con un pattern simile in prossimità delle regioni promotoriali. Ciò suggerisce che intense pressioni evolutive abbiano preservato le regioni regolatorie chiave per questo gene (Zelko et al., 2002)

Secondo alcune ipotesi la Cu,Zn SOD si sarebbe evoluta implicando una duplicazione genica e l'aggiunta degli esoni I e III, inoltre la velocità con cui questa evoluzione avrebbe avuto luogo non sarebbe rimasta costante durante l'ultimo miliardo di anni, contrastando con la teoria dell'orologio molecolare. Infatti, mentre la

Mn SOD è mutata in modo costante nel tempo, la Cu,Zn si è evoluta molto lentamente all'inizio e più rapidamente negli ultimi 100 milioni di anni. Una possibile spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere ricercata nell'accumulo di cambiamenti deleteri nella sequenza aminoacidica che avrebbero causato un rallentamento del processo evolutivo, l'accumulo di mutazioni silenti avrebbe infine permesso l'uscita da questa situazione di stallo e un ritorno ad un processo evolutivo più rapido.

SOD1 (Cu/Zn-SOD)



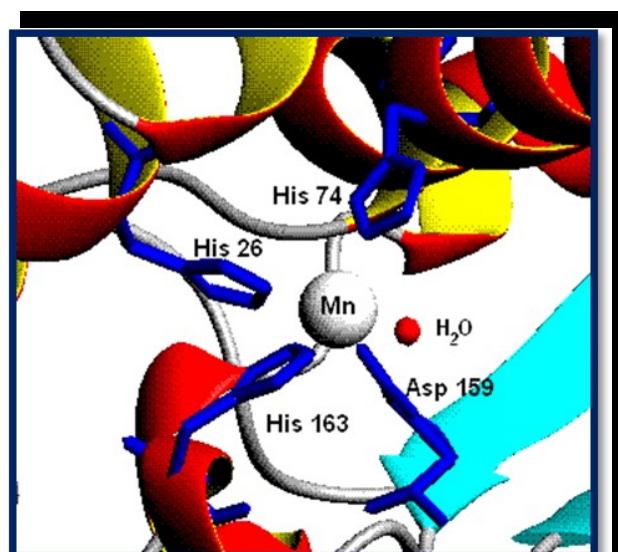
Struttura tridimensionale di una Cu,Zn-SOD

L'attività della Cu/Zn-SOD ha lo scopo, al pari di quella dell'EC-SOD, di limitare l'incremento dei ROS, permettendo il rilascio del NO e favorendo la dilatazione dell'endotelio. La riduzione della sua attività ha effetti sulla funzione vascolare sia nelle grandi arterie che nei capillari: la

deficienza di tale isoforma causa infatti un incremento di superossido vascolare e di perossinitrito, che causano un incremento del tono miogenico, della vasocostrizione, della permeabilità vascolare e una dilatazione alterata endotelio-dipendente NO-mediata.

SOD2 (Mn-SOD)

La Mn-SOD è il principale enzima antiossidante della matrice mitocondriale: permette la detossificazione dell'O₂⁻, proteggendo dallo stress ossidativo, ed è essenziale per il mantenimento del normale sviluppo e della funzionalità cellulare.



Struttura del sito attivo della superossido dismutasi 2 umana

La frequenza allelica di polimorfismi nel gene dell'MnSOD è stata associata alle cardiomiopatie dilatative idiopatiche, e ciò suggerisce che essa giochi un ruolo importante nella suscettibilità e nella progressione delle cardiomiopatie dilatative. Topi mutanti deficienti per Mn-SOD

muoiono per immaturità di sviluppo, cardiomiopatie, anomalie metaboliche, o in caso di sopravvivenza possono presentare insufficienza cardiaca cronica e significativa degenerazione del muscolo cardiaco. Al contrario, un'overespressione di MnSOD nel cuore riduce il superossido mitocondriale proteggendo dal danno cardiaco indotto dal diabete, con una regressione dei danni morfologici e delle alterazioni di tipo contrattile.

SOD3 (EC-SOD)

L'EC-SOD, infine, è altamente espressa nei vasi sanguigni, in particolare nelle pareti delle arterie, ed è la forma predominante nell'aorta di babbuino e uomo. Più del 90% dell'EC-SOD è localizzata nello spazio extracellulare della tonaca muscolare dei vasi, proteggendo la parete delle arterie dallo stress ossidativo; una piccola quantità è localizzata sulla superficie delle cellule endoteliali legata ai proteoglicani eparansolfato ed, infine, una porzione ancora minore può essere localizzata in equilibrio tra superficie cellulare/matrice e plasma. Sebbene sia definita come una SOD extracellulare, alcune evidenze dimostrano una sua espressione anche intracellulare. L'espressione nelle

cellule vascolari e nella parete dei vasi può essere alterata in risposta a vari stimoli esercitati da fattori di crescita, citochine, angiotensine, nonché durante ipertensione, aterosclerosi e diabete; inoltre si verifica un incremento di espressione nelle regioni in cui il flusso vascolare è alterato.

L'importanza fisiologica delle SOD è evidente dalle gravi patologie osservate nei topi modificati geneticamente per la mancanza di tali enzimi. Essi muoiono pochi giorni dopo la nascita, a causa del forte stress ossidativo; in assenza di SOD1 sviluppano una gran varietà di patologie, tra cui il carcinoma epatocellulare, una grave perdita di massa muscolare, un'incidenza precoce della cataratta ed una speranza di vita minore. Quelli che mancano di SOD3 non mostrano invece nessun difetto evidente ed hanno una normale aspettativa di vita.

È stato ipotizzato che i ROS possano prender parte a meccanismi quali necrosi ed alterazioni della perfusione che portano all'infarto acuto del miocardio. Come citato, il ruolo dei ROS nelle patologie ischemiche cardiache non è ancora del tutto chiaro, ed anche il ruolo svolto dalle SOD è stato interpretato, nel corso di vari studi, in modo controverso. L'overespressione della SOD, infatti, sembra ridurre le dimensioni

dell'infarto nei topi, agendo direttamente sul livello dei ROS. E' comunque evidente che il ruolo svolto dalle SOD è marginale, in quanto, pur migliorando la prognosi, esse non hanno un effetto drastico sull'insorgenza della patologia ischemica negli organismi modello.

Numerose evidenze hanno dimostrato che i ROS sono fortemente implicati nel signalling che porta all'ipertrofia cardiaca. Molti fattori extracellulari capaci di indurre ipertrofia dei cardiomiociti e molti pathways che determinano ipertrofia possono, infatti, essere attivati direttamente o indirettamente dai ROS.

Diversi studi hanno dimostrato, inoltre, il contributo dei ROS nei processi di rimodellamento cardiovascolare mediante l'attivazione delle MMP, che partecipano alla riconfigurazione della matrice extracellulare, agiscono come molecole segnale nello sviluppo di ipertrofia compensatoria e contribuiscono alla morte dei cardiomiociti mediante apoptosi. L'attivazione delle MMP associata ai ROS ha un importante ruolo anche nella rottura delle placche vasali, nello sviluppo di trombosi e di occlusione delle coronarie.

L'incremento di produzione di ROS è un importante meccanismo nello sviluppo delle disfunzioni vascolari ed endoteliali, che contribuiscono

alla vasocostrizione e all'incremento dei danni al tessuto cardiaco, in casi di insufficienza cardiaca.

È ormai noto, infine, che le alterazioni del sistema cardiovascolare collegate all'età sono attribuibili all'accumulo a lungo termine dei ROS, sebbene il loro contributo relativo nei processi di invecchiamento resti ancora non chiaro.

La morte delle cellule cardiache può essere associata a vari eventi patologici, tra cui l'infiammazione, il danno ischemico, il rigetto in seguito a trapianto. Una percentuale di cardiomiociti va incontro quindi ad apoptosi in caso di patologie come le cardiomiopatie o l'ischemia, evento quest'ultimo che può essere indotto sperimentalmente generando superossidi.

Lo stress ossidativo è uno dei maggiori stimoli apoptotici in diverse patologie cardiovascolari; è stato infatti dimostrato che gioca un ruolo pilota nella progressione dell'infarto del miocardio, nell'ischemia, nell'ipertensione, nelle cardiomiopatie e nell'aterosclerosi. La morte dei cardiomiociti indotta da stress ossidativo è associata a cambiamenti degli standard strutturali e biochimici delle cellule caratteristici dell'apoptosi. L'incremento della produzione di ROS attiva la famiglia delle proteine

Bcl-2, il conseguente pathway mitocondriale di caspasi e quello delle MAPKs, e ciò può portare all'apoptosi e all'alterazione della normale funzionalità cardiaca. L'apoptosi è poi naturalmente alla base di numerosi danni cardiovascolari e gioca un ruolo significativo nello sviluppo dell'infarto cardiaco.

SOD e Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia progressiva che colpisce i motoneuroni, cioè le cellule nervose del midollo spinale che comandano il movimento dei muscoli. Il significato letterale è: raggrinzimento (Sclerosi) della porzione laterale (Laterale) del midollo spinale e perdita del trofismo muscolare (Amiotrofica). La SLA è anche chiamata Malattia del motoneurone, Malattia di Charcot (dal nome del neurologo francese che l'ha descritta per la prima volta nel 1860) oppure Malattia di Lou Gehrig, dal nome di un famoso giocatore di baseball americano che ne fu colpito. Chiunque può essere colpito dalla SLA, anche chi ha genitori e parenti assolutamente sani. Nella maggioranza dei casi si tratta infatti di una malattia sporadica (cioè che si verifica senza che ci siano stati casi precedenti in famiglia). Più raramente si

possono osservare forme ereditarie, di solito clinicamente indistinguibili dalla forma sporadica. Come si manifesta: La sclerosi laterale amiotrofica colpisce gli adulti, in genere dopo i 40 anni. Esiste però anche una forma giovanile che si manifesta nel primo decennio di vita. I primi sintomi variano da un individuo all'altro, ma in genere consistono in alterazioni motorie, nel far cadere involontariamente oggetti, affaticamento delle braccia e delle gambe, difficoltà nel parlare, crampi muscolari. D'altra parte questi sintomi non sono caratteristici solo della SLA, ma sono comuni a molte altre patologie. Le mani sono spesso colpite per prime, rendendo difficili le normali attività quotidiane. Con il passare del tempo sempre più muscoli vengono interessati, finché la malattia assume una distribuzione simmetrica. Le funzioni intellettive e sensoriali rimangono integre, ed il malato assiste così in piena lucidità alla perdita progressiva delle proprie capacità motorie. Con il progredire della malattia si giunge alla paralisi completa degli arti e diventa difficile o impossibile deglutire, masticare e parlare. La paralisi dei muscoli respiratori rende infine necessaria la ventilazione assistita ed è purtroppo una causa frequente di morte per le persone affette da SLA. Come si trasmette: La maggior parte dei casi di SLA sono sporadici, cioè non ereditari. Solo il 10% circa dei casi sono ereditari. In questo caso si

parla di SLA familiare. La SLA familiare di tipo 1 si trasmette con modalità chiamata autosomica dominante. Questo significa che una persona affetta ha il 50% di probabilità ad ogni gravidanza di avere un figlio affetto, indipendentemente dal sesso. In questo caso non esistono portatori sani. La SLA familiare di tipo 2 si trasmette con modalità chiamata autosomica recessiva. In questo caso un individuo malato può nascere solo se riceve una copia difettosa del gene da ciascuno dei genitori, entrambi portatori sani dell'alterazione genetica.

La diagnosi: La diagnosi di SLA non è semplice ed è importante che il medico possa escludere altre patologie con sintomi simili. Tranne che per alcuni casi familiari (per cui è possibile effettuare un esame genetico), non esiste alcun test specifico per la diagnosi della SLA. Questa si basa quindi su una serie di osservazioni cliniche ed esami.

Esiste una terapia: Non esiste attualmente una terapia efficace per la SLA. Recentemente è stato approvato ed è commercializzato un farmaco specifico per la SLA, il riluzolo (Rilutek). Questo farmaco però per il momento ha dimostrato solo un effetto nell'aumentare di qualche mese la sopravvivenza di un gruppo di malati con caratteristiche cliniche particolari (anche se ora viene somministrato a tutti i pazienti con diagnosi certa di SLA).

Ricerca: numerosi studi sono in corso, e diversi altri sono stati effettuati negli ultimi anni, per comprendere le cause della SLA e per cercare di mettere a punto terapie efficaci. Vediamo quali sono stati i principali canali di ricerca sinora.

Nel 1993 è stata identificata la mutazione di un gene responsabile di circa un quinto dei casi di SLA familiare. Il gene alterato è proprio la superossido dismutasi di tipo 1 (SOD1) che normalmente svolge una funzione protettiva nelle cellule, eliminando i radicali liberi tossici. A 10 anni dalla sua scoperta, sono state finora riconosciute oltre 100 mutazioni di questo gene tutte associate alla SLA. Modelli sperimentali cellulari e animali, nei quali sono state riprodotte alcune di queste alterazioni genetiche, hanno messo in evidenza che tali mutazioni non portano ad una riduzione dell'attività dell'enzima SOD1, ma all'acquisizione di proprietà tossiche della proteina alterata. Numerosi sono gli studi in corso volti a capire perché e come la mutazione della SOD1 sia in grado di produrre la morte selettiva dei motoneuroni. I ricercatori pensano che queste informazioni possano aiutare a capire cosa succede anche nelle forme sporadiche di SLA.

Nel 2001 è stata identificata la mutazione di un altro gene responsabile di una forma giovanile di SLA di tipo 2. Si tratta di un gene che codifica per una proteina chiamata "Alsina" il cui effetto biologico è simile ad una classe di proteine, conosciute come Rho-GTPasi, coinvolte in vari segnali intracellulari tra cui l'organizzazione del citoscheletro della cellula. In questo caso è la perdita di funzione della proteina la causa della tossicità, ma ancora non è chiaro perché a subirne le conseguenze siano specificamente i motoneuroni.

Numerosi studi sono in corso per identificare le alterazioni genetiche legate ai restanti quattro quinti della SLA familiare. La ricerca è inoltre mirata ad individuare i fattori di rischio genetici associati alla predisposizione di un individuo a contrarre la malattia in forma sporadica.

Tra le varie ipotesi di meccanismi responsabili della SLA, quelle di maggior rilievo riguardano l'accumulo di glutammato extracellulare e le alterazioni delle proteine che costituiscono lo scheletro dei motoneuroni. Il glutammato svolge un'azione eccitatoria fisiologica sui motoneuroni che, se supera un certo limite, diventa tossica provocando la morte dei neuroni stessi. Il riluzolo, l'unico farmaco che ha mostrato sinora un

modesto ma significativo effetto nel prolungare la sopravvivenza di pazienti, agirebbe riducendo i livelli di glutammato extracellulare. Recentemente è stato osservato che, nei pazienti con SLA e nei topi modelli della malattia, una delle proteine responsabili della rimozione del glutammato extracellulare (conosciuta come trasportatore gliale del glutammato, ovvero EAAT2 o GLT1) è ridotta proprio nelle regioni del midollo spinale e del cervello che sono affette dalla patologia. Attualmente sono in corso degli studi mirati ad individuare nuovi farmaci in grado di attivare questo trasportatore e/o di inibire i recettori attraverso cui il glutammato può svolgere la sua azione tossica sui motoneuroni.

Una delle caratteristiche neuropatologiche della SLA, che la contraddistingue da altre malattie neurodegenerative, è la formazione di aggregati proteici filamentosi nei motoneuroni la cui composizione non è ancora del tutto nota. Si ipotizza che tali alterazioni dipendano da un accumulo dei neurofilamenti (microscopiche fibre presenti all'interno dei neuroni), dovuto a difetti genetici o molecolari di queste proteine. Ad esempio un'eccessiva fosforilazione dei neurofilamenti dovuta all'attivazione di chinasi può determinare il loro accumulo e portare così all'ingolfamento degli assoni impedendo il trasporto delle molecole vitali

per il motoneurone. E' altresì ipotizzabile che il meccanismo di degradazione proteica intracellulare, che normalmente serve alla cellula per liberarsi da proteine tossiche, sia meno funzionante nei motoneuroni affetti da SLA. Diversi studi sono rivolti ad indagare a fondo queste ipotesi, al fine di individuare delle molecole bersaglio per nuove terapie farmacologiche. Per quanto riguarda potenziali trattamenti farmacologici, gli studi clinici sperimentali effettuati sino ad ora non hanno ancora individuato dei farmaci efficaci in grado di migliorare la qualità di vita e di prolungare la sopravvivenza dei pazienti. I composti provati sino ad ora fanno parte di varie classi di farmaci con meccanismi d'azione diversi. Le cosiddette sostanze neurotrofiche, cioè le molecole che favoriscono la sopravvivenza dei neuroni (come il BDNF o il più recente Xaliproden) non hanno mostrato effetti benefici significativi. La miotrofina (una forma sintetica del fattore di crescita Insulin Growth Factor o IGF1) è tuttavia tuttora in esame in uno studio clinico americano in quanto i due studi clinici effettuati precedentemente hanno prodotto risultati contrastanti riguardo all'efficacia di questo composto. Uno studio preclinico recente su un modello animale di SLA ha dimostrato che quando questa neurotrofina è somministrata nei muscoli attraverso l'uso di un vettore virale e viene trasportata nel corpo cellulare del

motoneurone dove è prodotta in modo costante, i topi si ammalano più tardi e la malattia progredisce più lentamente. Sebbene siano necessari numerosi esperimenti per verificare l'innocuità dell'uso di un vettore virale nell'uomo, questi studi aprono una nuova promettente prospettiva terapeutica per questa malattia. Tra le alterazioni molecolari di recente individuate c'è quella del vascular endothelial growth factor (VEGF): nei topi che mancano di questa molecola si sviluppa una malattia simile alla SLA e nell'uomo con ridotti livelli di VEGF è aumentato il rischio per la SLA. Nei topi dove l'espressione del gene per questo fattore di crescita è aumentata, la degenerazione dei motoneuroni viene rallentata. Altri tipi di farmaci utilizzati come antiepilettici e come potenziali farmaci neuroprotettivi nei confronti della tossicità da glutammato, quali il Gabapentin e il topiramato, sono risultati inefficaci. In qualche caso il topiramato ha mostrato effetti collaterali importanti. Tra i farmaci antiossidanti, cioè quelli che proteggono le cellule dai radicali liberi, la vitamina E (alfa-tocoferolo), sebbene sia largamente usata nel trattamento sintomatico di varie patologie neurodegenerative, non ha mostrato effetti significativi sulla sopravvivenza. Attualmente è in corso uno studio clinico americano con il coenzima Q10, un antiossidante protettivo per i mitocondri, gli orfanelli che forniscono energia alle

cellule, e con Celebrex un farmaco inibitore della COX2, un enzima che genera i radicali liberi. Lo studio clinico sulla creatina, che si è appena concluso in America e che è stato presentato durante il tredicesimo congresso internazionale sulle malattie del motoneurone a Melbourne in Australia nel Novembre 2002, purtroppo non ha replicato il dato preliminare di un piccolo studio effettuato nel 2001-2002 che aveva mostrato un effetto benefico di questa sostanza sul recupero della forza muscolare. Altri studi clinici in corso sia in America che in Europa riguardano la minociclina, un antibiotico già usato nell'uomo per altri tipi di patologie e che passa la barriera ematoencefalica, potendo raggiungere facilmente le regioni nervose affette dalla patologia. Recentemente, vari studi effettuati nel modello animale hanno dimostrato che questo farmaco migliora la progressione della malattia, agendo con meccanismi diversi dai farmaci utilizzati sinora. Altri importanti studi clinici, da poco iniziati in Europa, riguardano l'uso di un modulatore degli astrociti, le cellule di sostegno dei neuroni oltre che produttori di potenziali sostanze tossiche in certe circostanze (es. l'ossido nitrico e le citochine) e la pentoxifillina, un farmaco anti-infiammatorio. Diversi studi sperimentali indicano che le citochine ed in particolare il TNF (Tumor Necrosis Factor) sono modificati prima che i sintomi del

deficit neuromotorio siano evidenti facendo ipotizzare un loro ruolo importante nella patogenesi della malattia. Queste molecole sono considerate dei potenziali bersagli terapeutici. Associata all'ipotesi infiammatoria e' la recente scoperta di una proteina, la p38MAPK (mitogen activated protein kinase) che si è visto essere fortemente attivata nei topi con la malattia prima che siano manifesti i sintomi. Questa proteina è attivata da una varietà di stimoli tra cui lo stress ossidativo e le citochine infiammatorie. Per quanto riguarda l'uso di cellule staminali (cioè le cellule che mantengono uno stato embrionale anche nell'adulto e che, potenzialmente, possono essere trasformate in particolari condizioni in altre cellule, tra cui i neuroni), non esiste a tutt'oggi un chiaro esempio di recupero di motoneuroni nei modelli animali.

Un recente studio sperimentale, coordinato da Antonio Musaro', del dipartimento di Istologia ed embriologia medica della Sapienza, offre nuove speranze nella lotta alla SLA, la sclerosi laterale amiotrofica che colpisce progressivamente i motoneuroni, le cellule nervose che controllano il movimento dei muscoli.

Ad oggi l'ipotesi piu' accreditata sulla causa della degenerazione dei motoneuroni e' ancora quella della mutazione del gene che produce la superossido dismutasi (SOD1). Quando l'enzima subisce una mutazione, diventa tossico e provoca la degenerazione delle cellule.

Un nuovo percorso di ricerche è iniziato quando recenti studi sperimentali condotti nel 2005 hanno avanzato il dubbio che i motoneuroni non siano i soli bersagli primari della mutazione SOD1, suggerendo che gli scarsi risultati ottenuti con la terapia convenzionale (Riluzolo) dipendano da una incompleta conoscenza delle basi molecolari e cellulari della malattia stessa. Il progetto di ricerca della Sapienza, finanziato da Telethon (Italia) e dalla Mda-Muscular dystrophy association (USA), ha puntato a dimostrare l'ipotesi che il muscolo scheletrico sia un bersaglio primario dell'effetto tossico del gene mutato SOD1, a prescindere dalla degenerazione dei motoneuroni. La sperimentazione e' stata condotta nei laboratori del dipartimento di Istologia ed embriologia medica dove i ricercatori hanno generato un topo modificato nel quale gli effetti del gene mutato si producono solo nei confronti dei muscoli volontari. Nella cavia si e' osservata la progressiva atrofia dei muscoli e la successiva comparsa degli altri sintomi della malattia, senza una apparente degenerazione dei

motoneuroni, contrariamente all'ipotesi dominante che li vuole bersaglio primario della SLA.

[Riferimenti bibliografici di questo capitolo: 4, 5, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 58, 62, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 105, 107, 108, 109, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139]

Materiali e metodi

Selezione dei campioni

Per la realizzazione dei *MICROARRAY TISSUTALI* sono stati selezionati 132 campioni provenienti dai cuori di pazienti deceduti e sottoposti ad autopsia.

Nella scelta dei campioni si è prestata massima cura nel selezionare soltanto i pazienti che avevano un intervallo di tempo tra la morte e l'autopsia, e quindi il prelievo dei campioni, che non fosse superiore alle 12 ore.

SESSO N - P	M	F	sconosciuto	Totale
Normale	4	5	1	10
Patologico	61	44	17	122
				132

Distribuzione del campione in base alla variabile sesso

L'età dei soggetti deceduti andava dai 17 ai 99 anni, con una media di 74 anni. La popolazione Svizzera è sicuramente da annoverarsi tra le più longeve, infatti, l'età media della Popolazione Europea nel 1998 era di 37,1 anni (Dati: United Nations Population Division, World Population Prospects: The 1998 Revision). Il campione non può essere assunto, per ovvie ragioni, come

rappresentativo dell'intera Popolazione Svizzera, ma è indice di un dato comune nella Confederazione Elvetica.

Dei 132 campioni, 122 sono soggetti deceduti per infarto e 10 sono soggetti deceduti per cause non correlabili a patologie cardiovascolari. I soggetti patologici sono stati suddivisi in tre gruppi distinti in base alla diagnosi riportata sul referto autoptico e che tiene conto della diagnosi effettuata al momento del ricovero. Sono stati così individuati i soggetti con infarto sub-acuto (nr.26), acuto (nr.37) ed iper-acuto (nr.59). Dal referto autoptico sono, inoltre, state prelevate le informazioni circa data di nascita, morte, età e indice di massa corporea del soggetto, oltre che informazioni relative allo stato dell'intero sistema cardiovascolare (presenza di aterosclerosi, infarti pregressi, bypass, riperfusioni, ecc.).

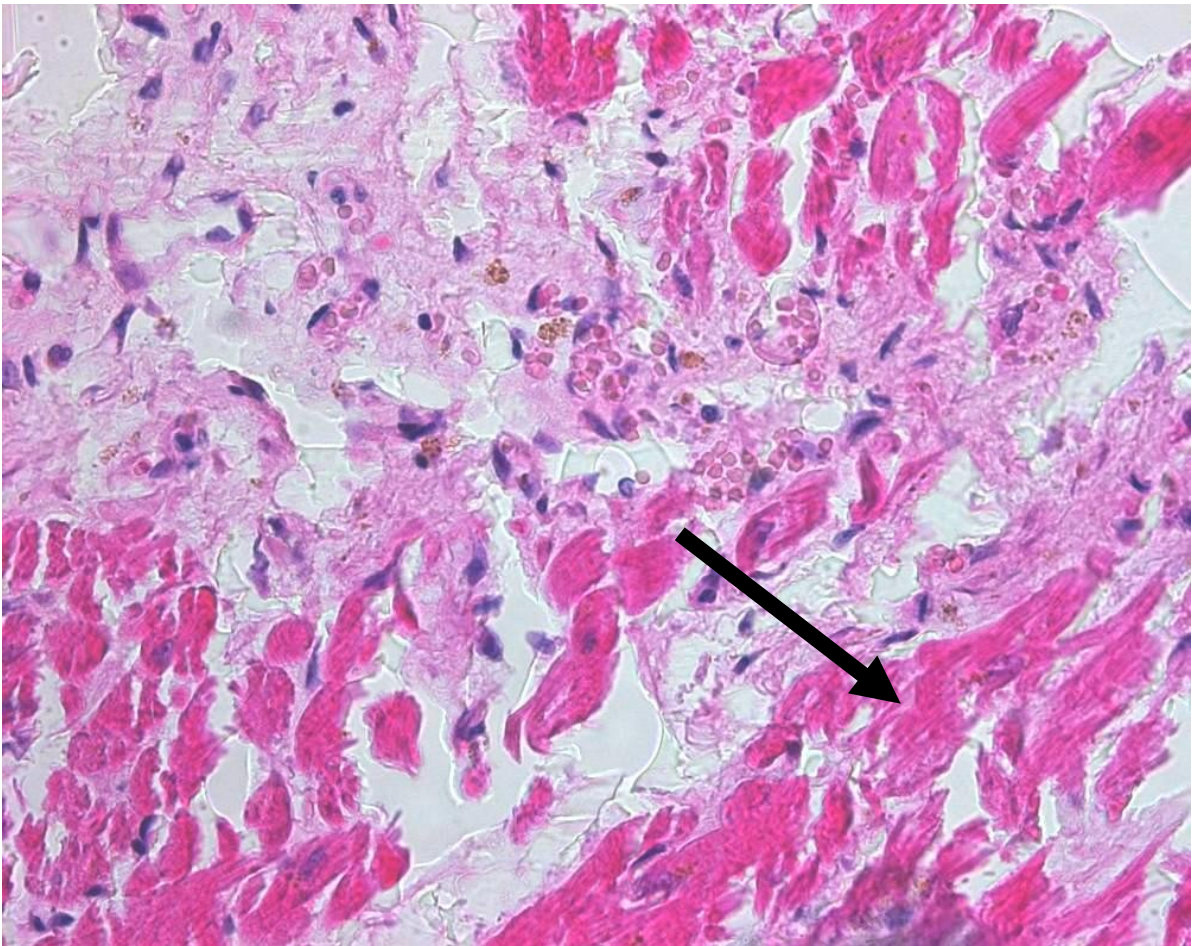
Analisi dei campioni e fasi preliminari di messa a punto del sistema sperimentale

Alla selezione dei campioni, è stata effettuata dapprima in base alle informazioni riportate sul referto autoptico, poi ad essa è seguita una fase di analisi diretta dei tessuti.

In questa seconda fase, sono stati esaminati al microscopio i

vetrini corrispondenti ai tessuti miocardici selezionati in precedenza e colorati con colorazione istopatologica di routine (ematossilina-eosina) (vedere figura sottostante).

Il fine ultimo di tale fase è stato quello di individuare e selezionare quelle aree tissutali che mostravano chiari segni di ischemia, contraddistinti da bande di contrazione, citoplasma ipereosinofilo, cellule "waves".



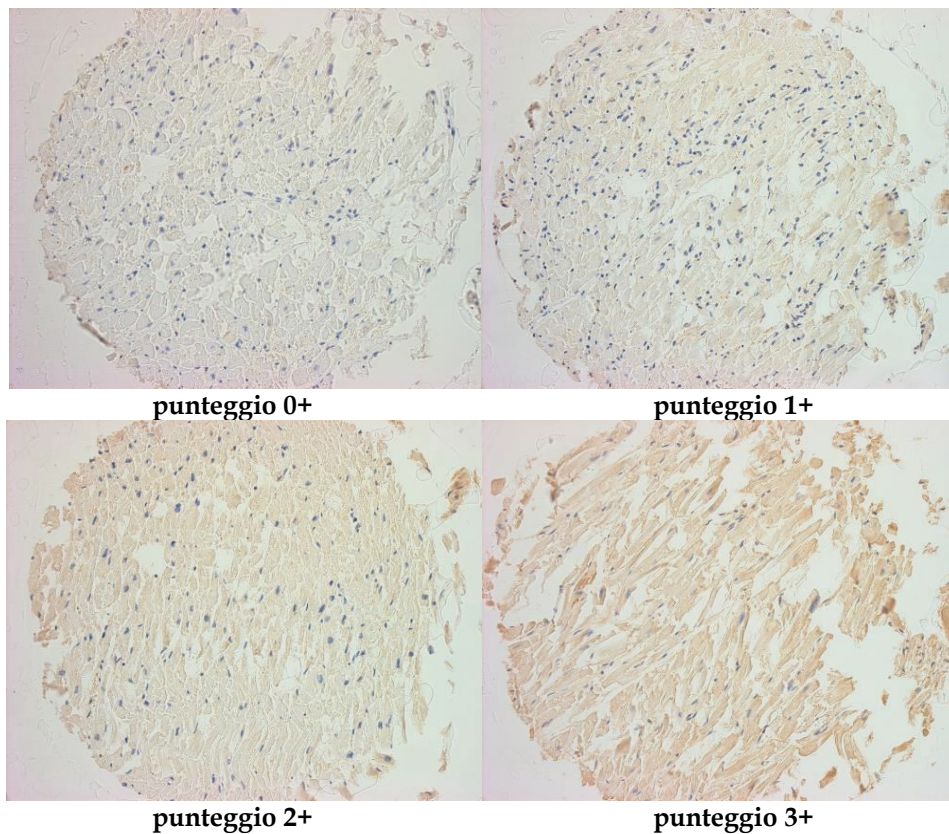
Una delle aree di tessuto cardiaco ischemico selezionate per la realizzazione del MICROARRAY TISSUTALI. Sono bene visibili le bande di contrazione in alcuni miociti cardiaci ormai irreparabilmente danneggiati dall'ischemia ed un'area in cui i miociti danneggiati sono stati rimossi dai macrofagi.

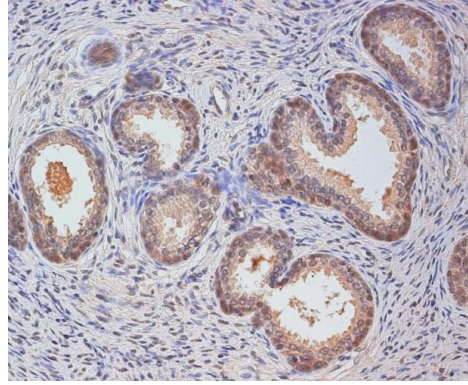
In tale fase, inoltre si è badato a marcare sulla sezione le aree in cui

eseguire il prelievo di tessuto durante la fase realizzativa dei MICROARRAY TISSUTALI, cercando di prelevare, laddove possibile, tessuti dalla zona ischemica, dalla zona marginale dell'infarto e dalla periferia del tessuto.

Frattanto si è provveduto al reperimento di tessuti che fungessero da controlli positivi durante gli esperimenti di immunohistochimica.

Ciò è stato necessario perché gli anticorpi utilizzati per le SOD non sono stati prodotti e testati per tale tecnica, il che ha reso necessario una prima fase di messa a punto dei protocolli sperimentali (Fig. A - B - C).



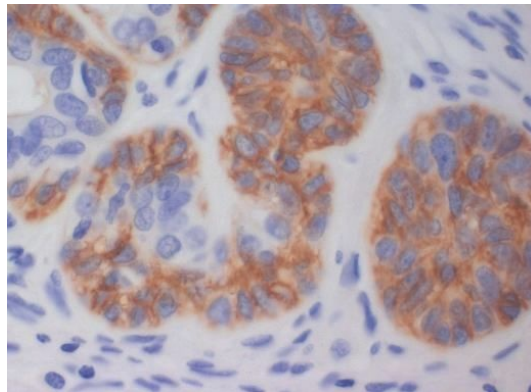


tessuto prostatico di controllo

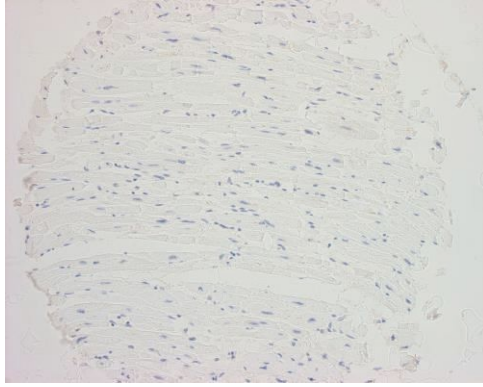
A- Assegnazione di punteggi per l'intensità di colorazione della SOD1 nei tessuti cardiaci. In basso colorazione su tessuto di controllo (prostata normale).

punteggio 1+

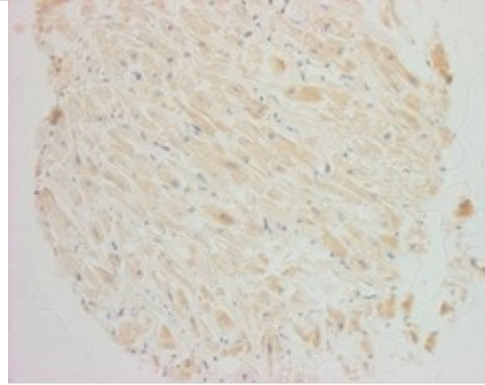
punteggio 0+



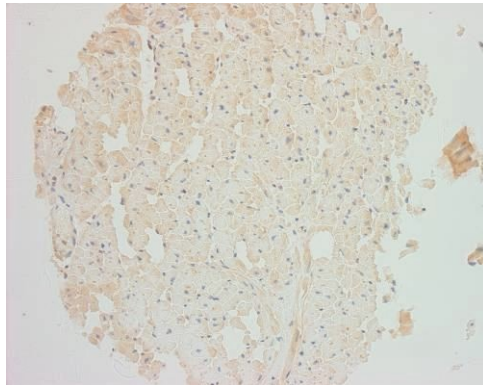
B: Assegnazione degli score per l'intensità di colorazione della SOD2 nei tessuti cardiaci. In basso colorazione su tessuto di controllo (prostata normale).



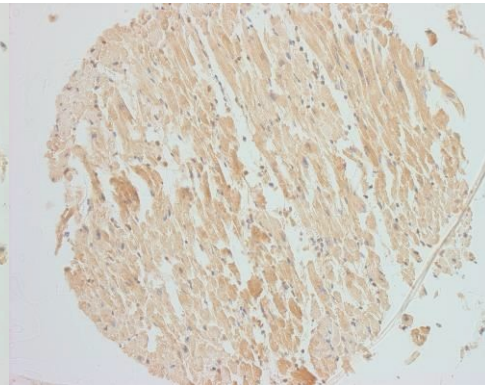
punteggio 0+



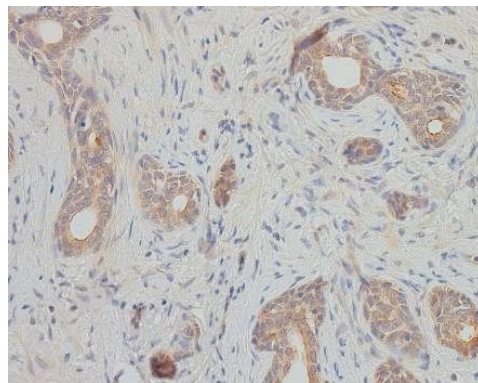
punteggio 1+



punteggio 2+



punteggio 3+



tessuto prostatico di controllo

C: Assegnazione degli score per l'intensità di colorazione della SOD3 nei tessuti cardiaci. In basso colorazione su tessuto di controllo (prostata normale).

Preparazione dei campioni tissutali

Campionamento

Per ottenere buoni preparati, è necessario, in primo luogo, che il materiale prelevato sia fresco.

In secondo luogo, è conveniente che i pezzi da fissare non superino 1 cm di spessore massimo. Pertanto, dopo il prelievo, è necessario operare un sezionamento del tessuto o organo, utilizzando pinzette e forbici (o bisturi) molto affilate, cercando di evitare al massimo deformazioni o compressioni improprie, che causerebbero alterazioni tissutali.

La fase di sezionamento preliminare deve avvenire sempre in ambiente umido, per evitare l'essiccamento del campione che potrebbe produrre danni ai componenti del tessuto. Quindi, il sezionamento può avvenire anche a campione immerso in soluzione fisiologica. Una volta sezionati, i campioni dovranno essere lavati con soluzione fisiologica per eliminare tracce di sangue o altri liquidi organici.

Le principali cause potenziali di danno sono l'evaporazione, il rigonfiamento osmotico, la coartazione, la decomposizione e la putrefazione, causate da batteri e muffe, e l'autolisi. Quest'ultima

rappresenta il processo di auto-digestione delle cellule da parte degli enzimi che sono presenti al loro interno. Sono essenzialmente proteinasi, che scindono le proteine in peptidi, aminopeptidasi e carbossipeptidasi, che catalizzano l'idrolisi di peptidi e proteine scindendo un legame peptidico alla volta a partire dalla estremità rispettivamente amminotermine o carbossilica libera della molecola, agendo in tale maniera sulle proteine intracellulari, passando dall'essere essenziali nella maturazione delle proteine all'interno della cellula, alla demolizione delle stesse.

Fissazione

Il primo obiettivo della fissazione è quello di stabilizzare i costituenti cellulari: si tratta, quindi, di bloccare in un preciso istante l'attività vitale di cellule e tessuti, alla stessa maniera di come viene immortalata un'immagine su pellicola fotografica. La fissazione permette di visualizzare un'immagine statica delle cellule e dei tessuti e ciò è possibile solo se si mantiene la stessa conformazione strutturale, preservando nella cellula un'integrità morfologica e chimica che si avvicini il più possibile a quelle della cellula viva. La cellula è composta di proteine, carboidrati, lipidi e altre sostanze organiche e inorganiche. Queste sostanze cellulari sono liberamente tenute insieme

nel citoplasma cellulare da legami idrogeno o ponti salini che si trovano in un costante stato di equilibrio chimico e biologico. Con la fissazione, la forma, la struttura, i rapporti intercellulari, i rapporti topografici e i costituenti chimici dei tessuti sono conservati. Tutti i processi vitali cellulari si fermano quando il tessuto è immesso in un fissativo. I legami chimici deboli sono trasformati in complessi stabili che non si rompono con la ulteriore manipolazione istologica. Infatti, dopo il prelievo, la fase successiva di fissazione deve avvenire nel più breve tempo possibile, per evitare le alterazioni autolitiche. Se non è possibile, i preparati devono almeno essere refrigerati in attesa del trattamento con i fissativi.

La fissazione può essere considerata l'operazione più importante della tecnica istologica, dipendendo da essa la buona riuscita di un preparato microscopico.

L'obiettivo secondario della fissazione è quello di indurire e proteggere i tessuti dal trauma di essere ulteriormente manipolati, in modo che sia più facile da tagliare durante lo sgrossamento del campione. E' bene ricordare come alcuni tessuti o strutture siano più resistenti di altre all'autolisi. La cute, l'osso, la cartilagine, per esempio resistono al processo autolitico meglio del S.N.C., del pancreas, del surrene,

dell'intestino. Se poi l'organo o i tessuti sono affetti da processi morbosi, la velocità di autolisi aumenta sensibilmente.

Inoltre, la fissazione permette al tessuto di essere orientato nella maniera corretta all'interno della bio-cassetta nella preparazione per l'inclusione in paraffina e il taglio al microtomo. La denaturazione delle proteine del tessuto fissato è una minima conseguenza per la qualità dei risultati per la routine dell'Anatomia Patologica. La formaldeide neutra tamponata o la formalina permettono di fare una diagnosi nella maggior parte dei casi. Tuttavia, alcuni studi specializzati, quali la microscopia elettronica, l'istochimica e l'immunocitochimica richiedono specifiche procedure di fissazione e diverse tipologie di fissativi, ai quali si vanno ad aggiungere fissativi "moderni", come quelli spray, comunemente utilizzati per la fissazione di citocentrifugati e strisci citologici e che permettono di velocizzare la pratica fissativa.

I fissativi si possono distinguere in fissativi fisici e fissativi chimici.

FISSATIVI FISICI

Esistono varie metodiche per la fissazione fisica, le più importanti sono sicuramente la fissazione tramite calore, la fissazione per

crioessiccazione, la fissazione per congelamento-sostituzione e la fissazione mediante microonde.

La *fissazione tramite calore* viene usualmente adoperata solo in microbiologia sulle cellule batteriche, mentre in istologia e citologia le cellule dei tessuti vengono, per la loro fragilità e ricchezza d'acqua, alterate in maniera irreparabile: il meccanismo d'azione di tale tipo di fissazione si estrinseca nella denaturazione delle proteine. È stato soprattutto raccomandato da Ehrlich, per la fissazione degli strisci di sangue, che consiglia un trattamento di breve durata (da mezzo minuto a 2 min.) a 110 ° C.

La *fissazione per crioessiccazione (o Freeze-Drying)* è una tecnica piuttosto complessa, che richiede apparecchiature costose, proposta da Altmann fin dal 1890, ripresa da Bensley, Gersch e Hoerr negli anni '30 e successivamente sviluppata da altri autori. Il vantaggio più grande di questa tecnica è sicuramente quello di non richiedere l'utilizzo di alcun tipo di liquido fissativo. Il metodo richiede una grande rapidità nel prelevare il tessuto, raffreddarlo alla temperatura dell'azoto liquido, disidratarlo a temperature comprese fra 60° C e 30° C, ed includerlo in un mezzo adatto, come ad esempio la paraffina. Il raffreddamento

iniziale del campione rappresenta, insieme alla rapidità del prelievo, il passaggio più delicato della procedura. E' necessario, infatti, evitare che si formino cristalli di ghiaccio che possano deformare, alterare e distruggere la morfologia e l'architettura microscopica del tessuto, lasciando delle tracce indelebili della loro presenza; se il raffreddamento è abbastanza veloce, nei tessuti si formano molteplici nuclei minuti di cristallizzazione che portano alla formazione di ghiaccio vetroso, non cristallino, che causano delle alterazioni morfologiche riconoscibili solo al microscopio elettronico. Per tale motivo, si utilizzano campioni di piccole dimensioni (all'incirca 1 mm³); il raffreddamento avviene ponendo i campioni a contatto con un liquido raffreddante che abbia alta conduttività anche a basse temperature (come l'isopentano), a sua volta raffreddato con l'azoto liquido. La disidratazione viene ottenuta esponendo il tessuto congelato ad una pressione di vapore inferiore a quella della pressione di equilibrio del ghiaccio, in maniera tale da determinare la sublimazione dei cristalli di ghiaccio e, di conseguenza, l'essiccamento del tessuto. Questo processo viene effettuato a temperature non superiori a -40° C, per evitare che il ghiaccio possa ricristallizzare, ma è necessario che la temperatura non scenda eccessivamente per non prolungare il processo

di sublimazione. In pratica il tessuto viene mantenuto al freddo in un recipiente immerso in una miscela raffreddante adatta e, contemporaneamente, è posto sotto vuoto spinto. Il vapore acqueo prodotto dal processo viene allontanato dalla pompa da vuoto combinata con una "trappola per l'umidità". Per questo scopo esistono apparati appositamente studiati, nei quali, dopo la fissazione, si può direttamente procedere alla infiltrazione con la sostanza utilizzata per l'inclusione.

Un metodo semplificato, denominato *fissazione per congelamento-sostituzione*, non richiede l'uso di apparecchiature sofisticate; in questa metodica i minuti cristalli di ghiaccio ottenuti con il congelamento veloce come nel freeze-drying, vengono sostituiti, senza farli sciogliere, con un solvente polare puro o miscelato con un fissativo. Il metodo preparativo prevede, dopo la sostituzione dell'acqua, una normale procedura di inclusione. Esistono vari tipi di procedimenti, tra i quali quello proposta da Peyrot, che ben si presta per lo studio del glicogeno, e quello di Feder e Sidman, per un utilizzo più generale.

L'introduzione dei forni a microonde commerciali ha consentito un facile accesso al riscaldamento controllato, con una vera e propria

fissazione a microonde, superando così i precedenti problemi di riscaldamento irregolare, causati dalle fiamme dirette. L'energia a microonde interagisce con le molecole dipolari, causando un'oscillazione alla frequenza di 2450 MHz. Le molecole di acqua e le catene laterali polari delle proteine incrementano la loro energia termica con successivo riscaldamento delle proteine. La fissazione al microonde permette di eseguire in modo adeguato le tecniche di microscopia ottica, utilizzate nell'istopatologia di routine. Queste includono le colorazioni standard, le colorazioni speciali, l'istochimica per alcuni enzimi e le tecniche di immunocitochimica. I tessuti trattati a microonde (a 50 °C), post-fissati in tetrossido di osmio, danno anche risultati soddisfacenti per la microscopia elettronica. Esistono, oggi, dei metodi rapidi di fissazione a microonde, che permettono anche la fissazione di materiale autoptico.

FISSATIVI CHIMICI

I fissativi sono composti chimici solidi o gassosi usati in soluzione acquosa o alcolica. La classificazione in base alla loro composizione chimica non viene più seguita già dal '70 e si preferisce distinguerli in fissativi semplici (primari) quando vengono usati da soli ed in miscele

fissative quando sono mescolati tra loro secondo varie formule. L'impiego delle miscele fissative trova giustificazione nel fatto che nessun fissativo semplice possiede tutti i requisiti richiesti per una buona fissazione. Le miscele sono concepite in modo tale da colmare queste lacune oppure per annullare, utilizzando fissativi ad azione antagonista, gli effetti negativi degli stessi. Per esempio, l'acido acetico e l'acido picrico, poco usati di solito da soli, trovano, invece, largo impiego se usati contemporaneamente. L'acido acetico tende a rigonfiare i tessuti mentre l'acido picrico tende a coartarli. Con l'impiego contemporaneo di entrambi, l'effetto negativo si annulla. Va tenuta presente l'incompatibilità chimica di alcuni fissativi in quanto si possono avere reazioni chimiche che annullano o riducono notevolmente l'effetto di fissazione. L'osmio tetrossido, ad esempio, non può essere utilizzato in miscela alcolica in quanto l'alcool lo riduce.

Teoria sulla fissazione chimica

I tessuti biologici sono essenzialmente composti da proteine, lipidi e glucidi. E' necessario comprendere, quindi, attraverso quali meccanismi chimico-fisici avvenga la fissazione di questi componenti cellulari. E'

paradossale se si pensa che la fissazione, volta alla preservazione del tessuto, consista poi, in realtà, nell'alterazione dei costituenti tissutali.

Le *proteine* tissutali sono circondate da molecole d'acqua legate ad esse per la presenza dei gruppi ionizzati degli aminoacidi ($-NH_3$). Questo mantello di idratazione ha carica elettrica positiva, e, rivestendo tutte le proteine, fa sì che tutte abbiano carica elettrica positiva e che si respingano tra di loro rimanendo in sospensione a formare una soluzione colloidale. Se viene sottratto il mantello di idratazione, ad esempio mediante una forte disidratazione, le molecole precipitano; in tale maniera le proteine non subiscono alterazioni chimiche. La denaturazione, al contrario, si rende responsabile proprio di un'alterazione della molecola proteica, con distruzione o rilasciamento dei legami che trasforma la struttura proteica in una struttura a dispersione casuale, che favorisce la formazione di nuovi legami chimici tra le proteine: questo fenomeno è denominato reticolazione.

La fissazione avviene per:

- Per COAGULAZIONE PROTEICA:

- Si denaturano le proteine, bloccando i legami idrofili, escludendo l'acqua dal legame con le proteine stesse.

- Per GELIFICAZIONE o reticolazione:
 - Consiste nello stabilizzare le proteine mediante la formazione di ponti (cioè legami crociati nel caso della formalina)

Nella reticolazione le proteine passano da una fase di sol ad una di gel: si assiste al fenomeno della coagulazione, in cui le proteine denaturate assumono una nuova struttura spaziale in una fase solida contenente poca acqua. Durante la denaturazione, il fissativo può contrarre rapporti chimici con le proteine, stabilizzandole prima che si raggiunga la vera e propria coagulazione. Proprio per questo, tra i fissativi si possono distinguere, in base alle modalità di azione sui tessuti, i fissativi coagulanti e quelli non coagulanti, come indicato da Baker nel 1958. Fanno parte del primo gruppo l'alcool etilico, l'alcool metilico, l'acetone, l'acido picrico, il cloruro di mercurio e il triossido di cromo; mentre appartengono al secondo gruppo la formaldeide, la glutaraldeide, l'acroleina, il tetrossido di osmio, il bicromato di potassio, l'acido acetico e l'acido tricloroacetico. Inoltre possono essere suddivisi in additivi e non additivi, a seconda che contraggano o meno rapporti chimici con i costituenti dei tessuti. Questa distinzione è

fondamentale, in quanto i fissativi additivi non possono essere usati nelle reazioni istochimiche senza particolari accorgimenti.

I *lipidi* possono essere fissati solo ed esclusivamente se viene variata la loro struttura chimica, al contrario di quanto avvenga con le proteine, per le quali è necessaria solo una modificazione sterica. Per rendere insolubili i lipidi e prevenirne l'acidificazione e/o l'irrancidimento, è necessario indurre ossidazione o formazione di Sali. Nelle convenzionali tecniche istopatologiche, i lipidi sono in gran parte rimossi durante la preparazione dei tessuti. Solitamente si usano sezioni criostatate per dimostrare la presenza dei lipidi nei tessuti, seguita da una specifica colorazione per i lipidi. I fissativi contenenti cloruro di mercurio e dicromato di potassio possono essere efficaci per la conservazione dei lipidi nelle sezioni al criostato. In generale, i fosfolipidi, che contengono gruppi amminici, sono fissati con le aldeidi. Tuttavia, si è evidenziato che la formaldeide reagisce con gli acidi grassi insaturi durante la fissazione istologica, in modo che meno lipidi possono essere dimostrati istochimicamente in un tessuto che è stato conservato in formaldeide per un lungo tempo. Una corretta dimostrazione ultrastrutturale dei lipidi è stata ottenuta mediante post-fissazione in tetrossido di osmio imidazolo.

I *glucidi*, specie quelli a basso peso molecolare, sono impossibili da fissare e, per questo, vengono solamente inclusi tra le proteine fissate.

Metodiche della fissazione chimica

Esistono varie metodiche attraverso le quali può avvenire la fissazione: fissazione per perfusione, fissazione per immersione e fissazione mediante vapori.

La *fissazione per perfusione* consiste nel far circolare all'interno dei vasi di un tessuto il liquido fissativo, affinché si distribuisca attraverso la rete capillare: l'aspetto positivo di tale metodica è rappresentato dalla fissazione uniforme dei tessuti. Si tratta, in effetti, di una fissazione in vivo in quanto la fissazione avviene quasi nello stesso istante in cui il tessuto cui va incontro a morte. La limitazione maggiore è che può essere utilizzata solo su animali da esperimento sedati, pur rappresentando la migliore metodica fissativa possibile. Per una corretta fissazione, è necessario che il liquido fissativo abbia pH, temperatura e pressione osmotica uguali a quelli del tessuto perfuso. E' necessario inoltre iniettare la sostanza fissativa alla medesima pressione del sangue dell'animale da esperimento, per evitare la formazione di artefatti e per permettere un'opportuna perfusione capillare. Prima

della perfusione del liquido fissativo si procede ad un lavaggio del letto vascolare con vasodilatatori e anticoagulanti che permettano di allontanare il sangue. La durata della perfusione varia dai 10 ai 15 minuti: l'avvenuta fissazione si evidenzia con il progressivo impallidire e l'aumentata consistenza del tessuto trattato. Non è applicabile, per ovvie ragioni, alla citologia.

La *fissazione per immersione* è senza ombra di dubbio la più usata nella pratica istologica e si attua mediante l'immersione del frammento di tessuto, nel più breve tempo possibile, all'interno del liquido fissativo: è buona regola che il prelievo del tessuto sia immediatamente seguito dalla fissazione, al fine di limitare il più possibile l'autolisi. Poiché la qualità della fissazione dipende dalla rapidità con la quale avviene, la stessa è legata alla velocità di penetrazione del fissativo e allo spessore del tessuto da fissare. Ogni fissativo possiede una propria velocità di fissazione: sono dei fissativi ad alta velocità di penetrazione il bicromato di potassio, il triossido di cromo e la formalina (quest'ultima ha una velocità di circa 1mm/h, per poi rallentare a mano a mano che permea nei tessuti), meno penetranti sono il tetrossido di osmio e l'acido picrico. E' naturale che i frammenti di tessuto debbano essere più sottili quanto più bassa sia la velocità di penetrazione del fissativo:

di solito, in istologia, è necessario che i campioni non superino i 3 mm di spessore. La velocità di fissazione dipende anche dalla temperatura alla quale questa avviene: infatti la velocità aumenta all'aumentare della temperatura, per tale motivo converrebbe fissare tra 37-40° C, se a tali temperature non si accelerassero i processi trasformativi ed autolitici. Si ritiene auspicabile, quindi, fissare ad una temperatura attorno ai 4° C, ma è molto più comune nei laboratori di Anatomia Patologica utilizzare una fissazione a temperatura ambiente. Sono da evitare le temperature inferiori ai 4° C, per il discorso inverso a quello fatto poc'anzi, in quanto si potrebbe avere un'alterazione della morfologia per la formazione di cristalli di ghiaccio. A questo si aggiunge che non tutti i tessuti posseggono la stessa permeabilità al fissativo. Infatti esistono tessuti permeabili (fegato, rene, miocardio); altri scarsamente permeabili (S.N.C. e polmone). Alcuni tessuti richiedono più tempo per fissare rispetto ad altri, a seconda della loro struttura. Gli organi fibrosi come l'utero o il tratto intestinale impiegano più tempo rispetto a tessuti di piccole dimensioni come biopsie o scrapings. Quindi, la durata della fissazione di un campione per immersione varia da caso a caso, dipendendo dal tipo di fissativo, dalla natura stessa del tessuto, dal suo spessore, nonché dalla temperatura

alla quale avviene la fissazione. Per una corretta fissazione sono necessarie al massimo 24 ore, infatti fissazioni più lunghe possono determinare una serie di artefatti ed effetti indesiderati, come l'eccessivo indurimento dei tessuti.

Nella fissazione per immersione è importante anche un opportuno rapporto volumetrico tra il fissativo e il tessuto, che, generalmente, si ritiene ottimale a 20:1 o a 30:1. Questo rapporto va tenuto presente soprattutto in considerazione del fatto che durante la fissazione si ha perdita di acqua dal tessuto, con conseguente diluizione del fissativo e riduzione della sua efficacia, nonché contemporaneo consumo dei fissativi. Il fissativo deve penetrare uniformemente nel tessuto e per questo motivo nei contenitori deve essere posto prima il fissativo e poi i campioni.

Dei buoni fissativi devono avere un pH ottimale, che si avvicini di molto a quello dei tessuti (pH tra 7.3-7.4), ed una pressione osmotica intorno a 0.5 oms: tale valore è ottimale per le cellule in anossia e non opportunamente nutrite, come sono quelle dei campioni. Valori inferiori a 0.5 oms, ossia una soluzione ipotonica, determinano rigonfiamento cellulare, valori superiori causano coartazione cellulare.

Per variare l'osmolarità del fissativo è necessario aggiungere alla soluzione cloruro di sodio o saccarosio o destrano, determinandone la quantità, attraverso misurazione dell'osmolalità con termometro di Beckmann o con osmolarimetro; un pH ottimale si ottiene, invece, aggiungendo opportuni sistemi tampone: questi sono generalmente costituiti da un acido totale e da un sale dello stesso acido con una base forte o viceversa.

E' importante sottolineare che l'osmolarità del fissativo va calcolata dopo l'aggiunta del sistema tampone per il raggiungimento del pH desiderato, in quanto fa variare l'osmolarità della soluzione.

Nella routine istologica si utilizza la Formalina neutra tamponata pH 6.8-7

- Essa può essere usata per fissare qualsiasi tipo di tessuto.
- I vantaggi rispetto alla formalina al 10%(non tamponata) sono:
 - Non si hanno i complessi con la tirosina, legame che richiede ambiente acido.
 - Si ha una reazione reversibile con i gruppi sulfidrilici, specialmente se questi sono presenti in grande quantità.

- Reazione con i gruppi aminici, favoriti dalla debole alcalinità.
- Coartazione dei tessuti molto minore di quella acida.
- Interazione minore con le proteine tissutali.
- Non provoca la formazione di un pigmento.
- La concentrazione idrogenionica rimane inalterata per oltre un anno e mezzo.

Composizione:

▪ Na_2HPO_4 fosfato sodico bibasico anidro	6.5g
▪ KH_2PO_4 fosfato potassico monobasico anidro	4.0g
▪ HCHO formaldeide al 40%	100 ml
▪ H_2O distillata	900 ml

Utilizzo:

- Porre i frammenti di tessuto in fissativo per 24h, cambiare la miscela e tenere i preparati in fissativo per altre 24h.

- I frammenti non debbono essere spessi più di 6 mm, poiché in caso contrario aumenta il tempo di fissazione.
- Il rapporto volumetrico tessuto/fissatore dovrebbe essere di 1/20, si accetta anche 1/10.

Disidratazione, chiarificazione ed inclusione

Successivamente, prima di essere sezionati, i campioni devono essere infiltrati con opportuni mezzi (paraffina, resine varie) che, solidificando, includano il tessuto nel loro interno, consentendo il sezionamento del campione. Queste sostanze includenti hanno però lo svantaggio di essere idrofobiche e quindi non riuscirebbero ad infiltrare i campioni ancora idratati. Quindi, è necessario procedere ad una disidratazione dei campioni, per sostituire l'acqua con un mezzo che sia miscibile con le sostanze di inclusione.

Quindi dopo la fissazione, i pezzi operatori devono essere sottoposti a due passaggi:

- La disidratazione
- La diafanizzazione

Questi passaggi comportano il completo allontanamento dell'acqua dai tessuti fissati.

La disidratazione può essere effettuata con un qualsiasi agente chimico anidro, capace di sostituire l'acqua presente nei tessuti, in grado di non provocare eccessiva coartazione dei campioni e con la proprietà di essere solubile e miscibile con i solventi intermedi che devono essere applicati prima dell'infiltrazione in paraffina.

Da un punto di vista pratico, è l'etanolo ad essere maggiormente utilizzato, con l'applicazione di soluzioni a concentrazioni crescenti di questo disidratante; i tempi di permanenza sono variabili a seconda delle dimensioni del campione (comunque da non superare in totale le 2-3 ore):

- etanolo 70%
- etanolo 80%
- etanolo 95% (effettuando 2 cambi)
- etanolo 100% (effettuando 2 cambi)

Dal momento che l'etanolo, ora contenuto nel preparato dopo la disidratazione, non è miscibile con la sostanza che dovrà infiltrarlo, per la fase di inclusione in paraffina occorre sostituire l'etanolo con un solvente intermedio, che sia miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina. Questo processo prende il nome di chiarificazione, in quanto la procedura rende molto trasparenti i campioni. Gli agenti di

chiarificazione più utilizzati sono lo xilolo e il toluene (di solito si utilizza il primo).

Dopo il ciclo di inclusione/infiltrazione automatica, il cestello metallico contenente le biocassette con i campioni viene prelevato dal processatore, e si passa alla fase di inclusione vera e propria, in cui i singoli campioni istologici verranno composti in modo che la paraffina solidifichi intorno ad essi su un supporto solido adatto per la successiva fase di allestimento delle sezioni istologiche.

L'inclusione è la procedura che consente di preparare il tessuto in modo da poter passare alla fase di taglio delle sezioni istologiche, queste devono essere di spessore adatto al tipo di osservazione (e quindi al tipo di microscopio) cui saranno sottoposte: 4,5 µm nel caso della microscopia ottica. I tessuti inclusi (infiltrati) in paraffina sono sezionati al microtomo, apparecchio in grado di realizzare sezioni di spessore sino a 3-4 micron (1 micrometro o micron = 10^{-6} metri = un milionesimo di metro = 10^{-3} mm = un millesimo di mm).

La massima parte dei campioni utilizzati nella tecnica istologica viene inclusa, dopo la fissazione, disidratazione e chiarificazione, in un mezzo solido che ne permette il sezionamento. La sostanza utilizzata per la preparazione dei blocchetti di materiale incluso è la

paraffina. La paraffina è una miscela di idrocarburi saturi ad elevato peso molecolare, insolubili sia in acqua che in etanolo.

La paraffina è allo stato solido a temperatura ambiente, ma diventa liquida se portata a temperature superiori al suo punto di fusione, tra i 50° C e i 70° C, generalmente 56-58° C. La paraffina, prima dell'uso, deve essere sciolta a temperatura di fusione, e poi filtrata per eliminare eventuali impurità.

I passaggi di infiltrazione, da effettuare alla temperatura di 56-58 °C, sono i seguenti:

- xilolo / paraffina (50%-50%)
- paraffina pura (con 2-3 cambi)

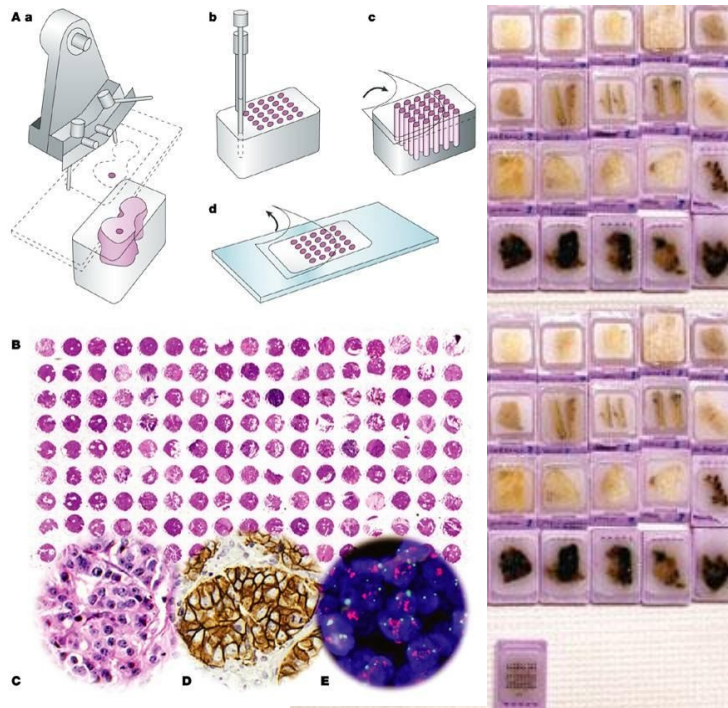
I tempi minimi di incubazione sono di tre ore; tempi massimi non ce ne sono, poiché il campione, una volta infiltrato dalla paraffina, non si deteriora. Ad infiltrazione completata, i campioni vengono immersi in contenitori sagomati in cui viene fatta colare paraffina liquida, ed il tutto viene lasciato solidificare a temperatura ambiente.

Realizzazione dei *MICROARRAY TISSUTALI*

Le fasi finora descritte sono comunemente svolte per tutti i campioni istologici. L'allestimento di un Tissue microarray necessita,

però, di una serie di procedimenti che, in alcune fasi, non si discostano molto dalla preparazione di normali campioni istologici. Anche in questo caso, infatti, il campione va sezionato in modo da essere attraversato dalla luce posta al di sotto dell'apparato condensatore del microscopio ottico. Attraverso tecniche di immunistochemica verranno, poi, messe in evidenza le macromolecole di nostro interesse, ma prima di procedere in tal modo, il tissue microarray va realizzato a partire da campioni istologici già inclusi in paraffina o da campioni di tessuto fresco che andranno processati ed inclusi in paraffina.

Per la realizzazione dei tissue microarray è necessario, però, intervenire attraverso un'apposita apparecchiatura al fine di prelevare, dai blocchetti solidificati istopatologici originali), "carote" di tessuto che vengono, successivamente, innestate in un nuovo blocco di paraffina, precedentemente forato. L'operazione viene ripetuta per ogni singolo campione selezionato, con un'apposita apparecchiatura che permette una regolazione micrometrica delle distanze tra le varie carote innestate nel blocco finale di paraffina (vedere figura sottostante).



Fasi realizzative dei microarray tissutali. Dalla fase di prelievo dalla inclsione di origine all' innesto nell a i n c l u s i o n e di destinazione. In basso le varie fasi che portano alla realizzazione di un *MICROARRAY TISSUTALI* ed un esempio delle enormi potenzialità di analisi, tipiche di tale tecnica.

E' possibile in tal modo ottenere una inclusione di paraffina contenente anche più di mille campioni di tessuto provenienti da altrettanti pazienti.

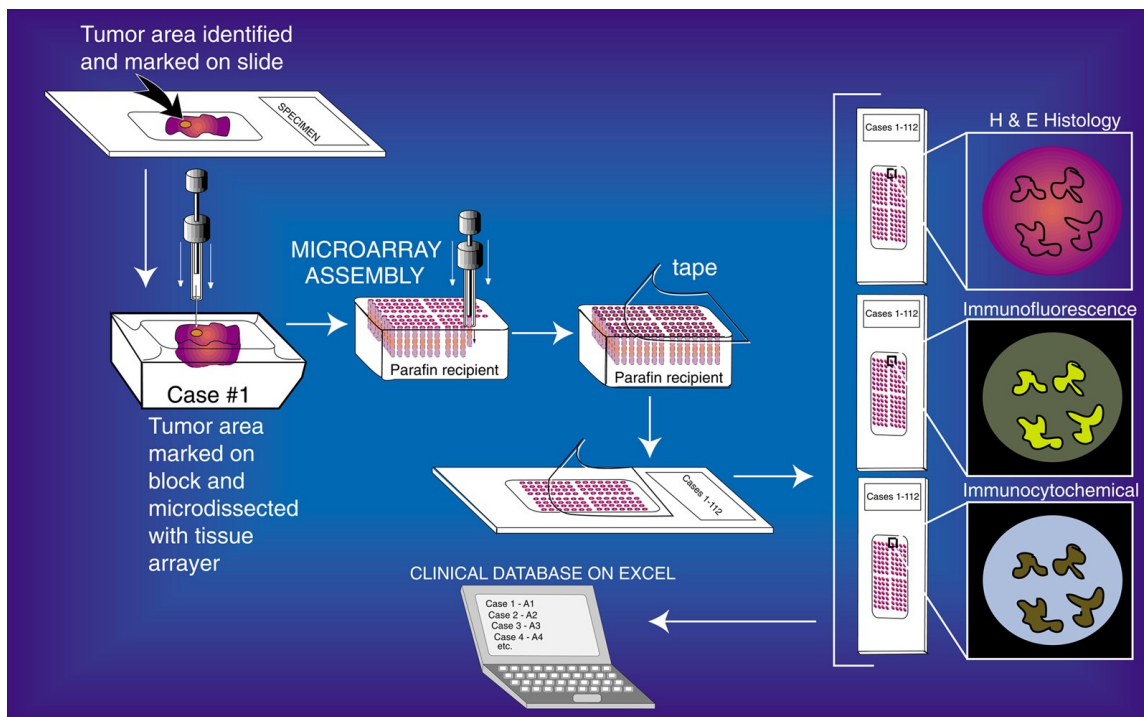
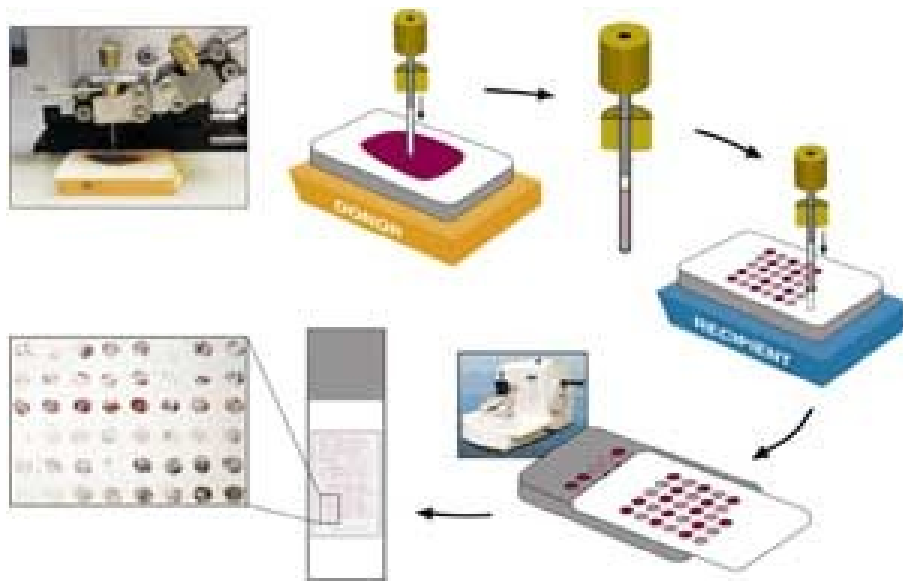
I blocchi di tessuto donatore dovrebbero essere istologicamente rappresentativi e spessi come minimo 1 mm o, preferibilmente, 3-4

mm. Anche blocchi d'archivio di 20-40 anni prima possono essere adeguati all'utilizzo se sono stati fissati in formalina al 4 %.

Di solito, si effettuano prelievi del diametro di 0.6 mm che dal blocco donatore vengono depositati nel blocco del *MICROARRAY TISSUTALI* con uno spazio tra ogni campione di 0.8 mm. Con questa configurazione, il numero massimo di campioni che possono essere posti in un'area di 45 x 25 mm è di circa 1000, ma più frequentemente sono posizionati circa 400-800 campioni

Riducendo il diametro a 0.4 mm è possibile costruire un array con 2500 campioni in un singolo blocco *MICROARRAY TISSUTALI*.

Passaggio di fondamentale importanza, che precede la costruzione dell'array, è la scelta dell'area di interesse dello studio. Per far questo è importante basarsi soprattutto sull'esperienza dell'istopatologo responsabile della scelta del tessuto da esaminare. Viene prelevata una sottile sezione e sottoposta a colorazione con Ematossilina ed Eosina (H&E); l'osservazione al microscopio della sezione stessa suggerirà il punto preciso dove effettuare il prelievo del cilindretto di tessuto significativo (vedere le due figure sottostanti).



Schema concettuale della selezione delle aree di interesse per la costruzione di un MICROARRAY TISSUTALI. Dalle sezioni di archivio colorate in ematossilina o CAB si selezionano le aree di interesse nelle quali effettuare il prelievo. Nell'immagine l'intera sequenza di produzione del MICROARRAY TISSUTALI. (Tessuto non cardiaco).

Dato che la morfologia dei tessuti può cambiare tra le sezioni tagliate, coloriamo con H & E la prima e poi ogni cinquantesima

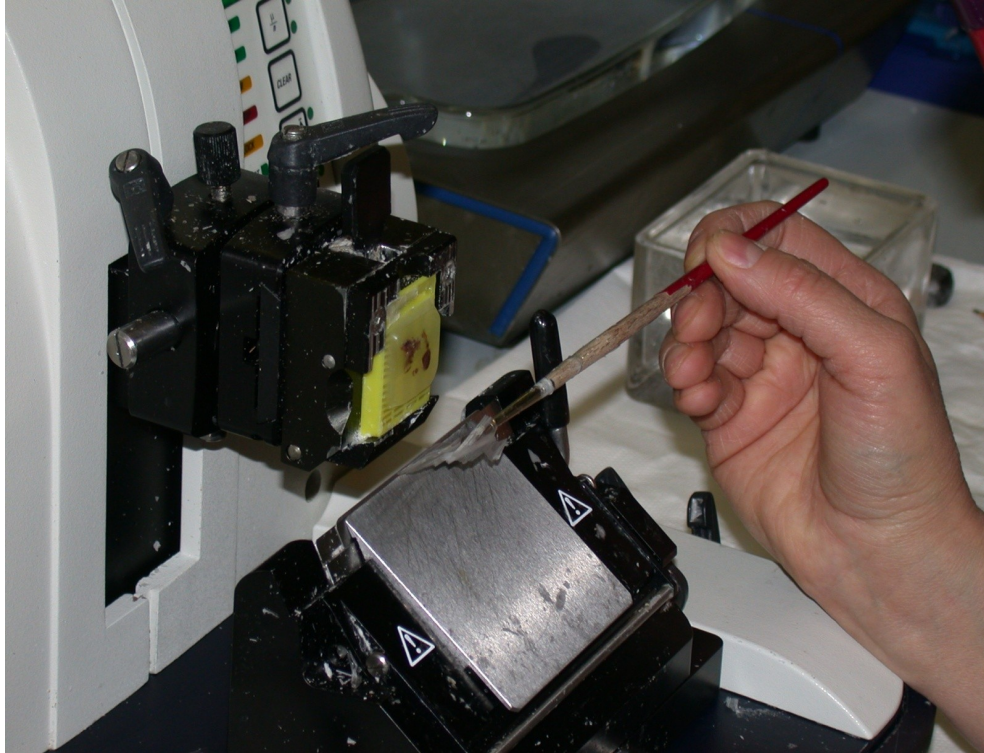
sezione dei blocchi MICROARRAY TISSUTALI osservando la morfologia dei campioni.

Il blocco MICROARRAY TISSUTALI è successivamente sezionato in sezioni da 5 μm che vengono poi posizionate grazie ad un sistema di copertura adesiva, che aiuta a trasferire le posizioni precise dei tessuti dal blocco MICROARRAY TISSUTALI sul vetrino del microscopio.

Questo sistema di posizionamento dei campioni può essere collegato ad un database che contiene dati demografici, clinico-patologici e di sopravvivenza dei pazienti, permettendo un più rapido collegamento dei dati molecolari con le caratteristiche cliniche e alla costruzione di archivi di immagini.

Taglio delle sezioni istologiche da microarray

Il taglio delle sezioni di tessuto viene effettuato utilizzando un microtomo. Il tipo più diffuso, utilizzato per la preparazione di sezioni per la microscopia ottica, è il microtomo a rotazione.



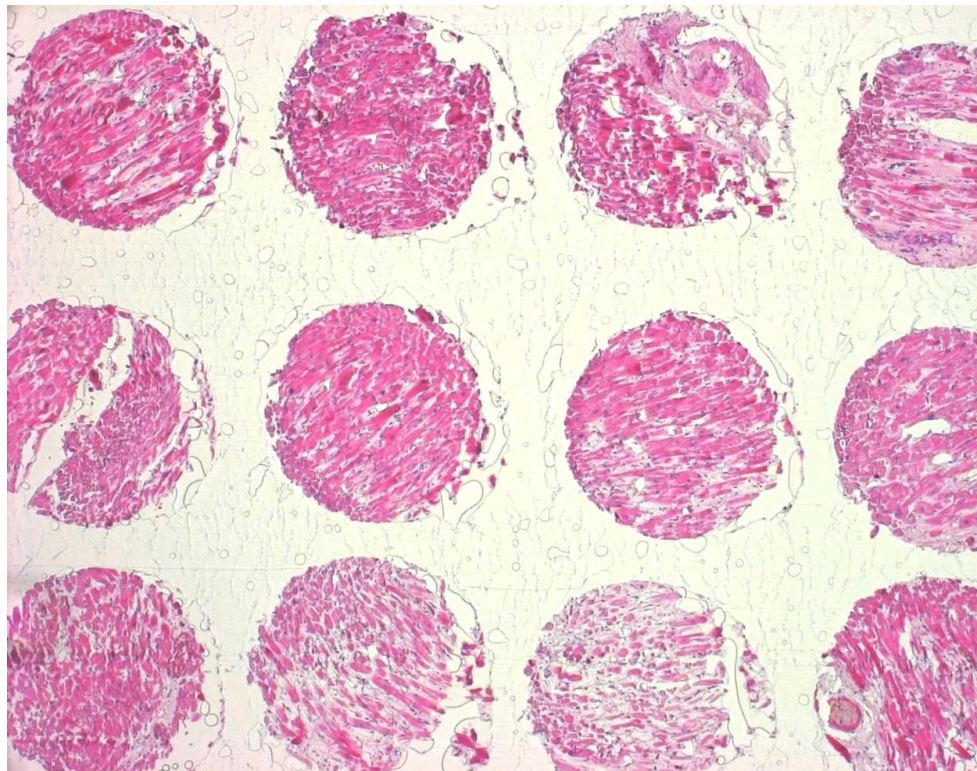
Il blocchetto contenente il tessuto va fissato al supporto semplicemente attraverso un supporto di plastica incluso alla base del blocchetto di paraffina.

Una perfetta affilatura e pulizia della lama sono, ovviamente, requisiti indispensabili per ottenere buone sezioni.

Prima di effettuare il taglio di ogni singola sezione, sul blocco viene posta una pellicola biadesiva. Effettuato il taglio, la sezione rimarrà adesa su uno dei lati della pellicola e l'altro lato della pellicola aderirà al vetrino.



I vetrini con le sezioni adese vengono esposti agli UV oppure mantenuti nella stufa per 30 min. a 40°C per fissare definitivamente le sezioni ai vetrini.



Ciò è indispensabile, affinché non subentrino spostamenti dei *dischetti tissutali* nelle successive fasi di lavorazione.

Anticorpi utilizzati

Per l'immunolocalizzazione delle tre forme di SOD sono stati utilizzati anticorpi commerciali specifici per ogni singola isoforma.

Per la SOD 1 è stato utilizzato un anticorpo *policlonale* prodotto nella pecora dalla ditta Novus Biologicals (Sheep Polyclonal anti-Superoxide Dismutase 1; NB200-600).

Per la SOD 2 è stato utilizzato un anticorpo *monoclonale* prodotto nel topo dalla ditta Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; sc-65437).

Per la SOD 3 è stato utilizzato un anticorpo *policlonale* prodotto nel coniglio della StressGen [Rabbit Anti-Extracellular Superoxide Dismutase (EC SOD) Polyclonal Antibody; SOD-105].

Tutti gli anticorpi non erano stati testati dalle ditte produttrici per l'immunoistochimica per cui è stato necessario un lungo processo di messa a punto della metodica su controlli positivi.

Per la SOD1 e la SOD 2 è stato utilizzato come controllo positivo tessuto di prostata umana sana.

Per la SOD 3 è stato utilizzato come controllo positivo tessuto di polmone umano sano

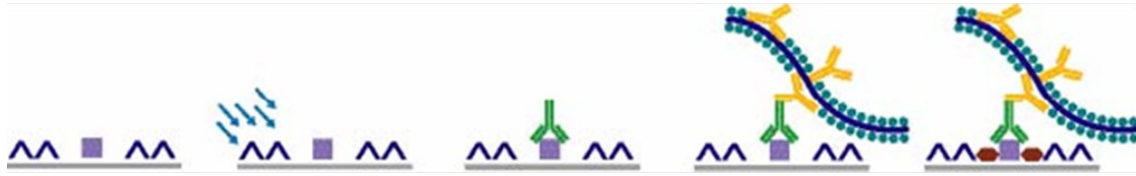
Sono state così individuate le condizioni sperimentali più opportune per la perfetta efficienza dei singoli anticorpi.

Per la Caspasi3 attivata è stato utilizzato un anticorpo *policlonale* purificato prodotto nel coniglio dalla ditta R&D (R&D system; AF835). Tale anticorpo è capace di discriminare la subunità p17 della Caspasi3 attivata, ma non rileva il precursore dell'enzima, permettendo in tal modo, di marcare le cellule nel pieno dei processi apoptotici.

Esecuzione dei test di Immunoistochimica

Per effettuare il test è buona norma utilizzare vetrini superfrost. Dopo il taglio, lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente, in ambiente pulito e privo di polveri. Sparaffinare le sezioni:

- 4X5' Xilolo
- 3X5' Etanolo 100%
- 1X5' Etanolo 96%
- 1X5' Etanolo 70%
- 3X5' PBS



Tessuto con antigene bersaglio	Blocco delle perossidasi endogene	Applicazione dell'anticorpo primario	Applicazione del sistema di rilevazione con anticorpo secondario	Applicazione del substrato cromogeno
--------------------------------	-----------------------------------	--------------------------------------	--	--------------------------------------

Per lo smascheramento degli epitopi (smascheramento antigenico) si è utilizzata una tecnica basata sul calore generato da un forno a microonde da laboratorio, sottoponendo i vetrini ad una temperatura di 90°C per 30' o 60' in un tampone di Sodio Citrato con pH 6 (per la sola SOD-1, il tempo del trattamento è stato protratto a 60').

I vetrini sono stati quindi lavati due volte in PBS.

Lavorando con un substrato ossidabile, dal quale deriva la colorazione di rivelazione delle proteine (DAB), è buona norma, se non necessario, effettuare il blocco delle perossidasi endogene, immergendo le sezioni in un bagno di H₂O₂/MetOH 0,3% (1ml H₂O₂ 30% in 100 ml MetOH) per 30'.

Anche in questo caso seguono due sciacqui in PBS

In condizioni sperimentali particolarmente difficili è possibile effettuare il blocco dei siti di aspecificità per l'avidina e la biotina,

attraverso un opportuno kit commerciale (Zimed Invitrogen 00-4303).

Segue la saturazione dei siti di aspecificità in siero (derivante dalla stessa specie in cui è prodotto l'anticorpo secondario) per 30' a temperatura ambiente (RT). Diluire l'anticorpo primario con la soluzione apposita per ridurre eventuale background (Dako Real Antibody Diluent S2022). Incubare ON a 4°C

Il giorno successivo si effettuano le seguenti fasi:

Capovolgere il vetrini in modo da drenare tutto l'anticorpo primario

Lavare 2X5' in TRIS 0,5M/PBS 1:10

Incubazione dell'anticorpo secondario 30' RT (dipende dall'anticorpo primario) Lavare 2X5' in TRIS 0,5M/PBS 1:10

Incubare in Sol. ABC Elite Vector 30' RT

Lavare 2X5' in TRIS 0,5M/PBS 1:10

Lavare in TRIS 0,05M (50ml di TRIS 0,5 in 500ml finali di H₂O)

Applicare il cromogeno per 5' RT dopo aver parzialmente asciugato le sezioni

(KIT Dako 1ml di diluente + 1 goccia di DAB) Sciacquare in H₂O di fonte

Ematossilina 25''

Sciacquare in H₂O di fonte

3 sciacqui in HCl, H₂O corrente per 10', Montare

Valutazioni ed analisi statistiche

Valutazione ed analisi statistica dei MICROARRAY TISSUTALI

L'analisi dei MICROARRAY TISSUTALI colorati per i singoli marcatori è stata effettuata al microscopio ottico ed in campo chiaro, dato che il cromogeno utilizzato genera una colorazione bruna DAB.

La valutazione dell'espressione delle proteine in analisi è stata di tipo qualitativo e semiquantitativo.

La valutazione è stata effettuata assegnando uno score di intensità di colorazione: 0 per i dischetti tissutali che non presentavano colorazione, 1 per i dischetti tissutali col colorazione molto tenue, 2 per i dischetti tissutali con colorazione media, 3 per i dischetti tissutali con colorazione molto intensa. Per la sola SOD2, enzima con localizzazione mitocondriale, l'assegnazione degli score si è limitata ai soli valori 0 ed 1, in quanto in tutti i tessuti in analisi l'intensità della colorazione è risultata molto bassa. L'assegnazione degli score è un metodo comunemente utilizzato negli studi effettuati su MICROARRAY TISSUTALI e rende possibile la valutazione statistica dei dati in una seconda fase.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con un programma specifico: MICROARRAY TISSUTALI Foresight 3. Tale software permette la valutazione dei coefficienti di correlazione statistica, la creazione di curve di sopravvivenza e numerose altre funzioni che sono tipiche dell'analisi statistica dei dati generati attraverso i tissue microarray.

I coefficienti di correlazione e i valori di significatività statistica riscontrati, sono stati verificati anche attraverso l'utilizzo del software di analisi statistica SPSS Base.

Assegnazione degli score per le variabili biometriche e patologiche

L'analisi dei referti autoptici dei singoli pazienti ha permesso l'acquisizione di una serie di informazioni di notevole importanza per una corretta analisi dei dati ottenuti. Da ogni singolo referto sono stati prelevate variabili biometriche e patologiche, quali:

- Età
- Sesso (non sempre possibile)
- Indice di massa corporea BMI
- Classificazione dell'infarto

Tali dati sono stati utilizzati durante la successiva analisi per verificare eventuali correlazioni statisticamente significative con i livelli di espressione delle proteine in analisi. Per il sesso, l'indice di massa corporea (BMI) e per la classificazione dell'infarto è stato nuovamente utilizzato il sistema di assegnazione degli score.

Sul sito dell'Istituto Superiore della Sanità, ai primi due posti tra i fattori di rischio non modificabili per l'infarto sono riportati l'età ed il sesso.

Nel nostro studio l'età è stata presa in analisi come variabile lineare, mentre al sesso è stato assegnato uno score 1 per il femminile e 2 per il maschile. Ciò perché gli uomini sono statisticamente più a rischio delle donne.

Anche il peso è da considerarsi un fattore di rischio quando si è al di sopra della soglia del normopeso ed il rischio aumenta notevolmente quanto maggiore è il grado di sovrappeso.

L'indice di massa corporea è dato dalla massa (espressa in Kg) diviso il quadrato dell'altezza (espresso in m).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità e la medicina nutrizionale convenzionale usa delle tabelle come la seguente per definire termini da "magrezza" fino a "obesità" in diverse sfumature.

BMI (Body Mass Index)

$x > 40$	Sovrappeso di III grado, score 4
$30 < x < 39,9$	Sovrappeso di II grado, score 3
$25 < x < 29,9$	Sovrappeso di I grado, score 2
$18,5 < x < 24,9$	Normopeso, score 1
$x < 18,4$	Sottopeso, score 0

Real Time PCR

La RT-PCR è una metodica estremamente sensibile per rilevare l'espressione di mRNA estratti da un numero limitato di cellule o da piccole quantità di tessuto e può essere quindi usata come metodo quantitativo per confrontare l'espressione di uno o più geni in diversi campioni, tissutali o cellulari.

E' una tecnica complessa che consta di diverse fasi:

- Estrazione e purificazione degli RNA totali
- Analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto
- Sintesi di cDNA (Retrotrascrizione)
- PCR
- Analisi dei prodotti di PCR attraverso elettroforesi su gel d'agarosio, e valutazione dei livelli di espressione dei cDNA "target".

Nella RT-PCR quantitativa, durante la fase di PCR, si amplifica sia il cDNA "target" che si vuole quantizzare sia il cDNA, di un gene house-keeping, cioè espresso in tutti i tipi cellulari ed in tutti i tessuti in maniera costante. I cDNA target e standard sono sottoposti ai medesimi cicli di amplificazione. I geni house-keeping usati come standard nella RT-PCR sono generalmente il GAPDH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) e la Beta-actina. I prodotti amplificati possono poi essere visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Prelievo e scelta dei campioni

Per l'analisi di espressione dei geni delle SOD si è deciso di effettuare esperimenti di RT-PCR su cDNA sintetizzati da RNA totali estratti da tessuti di miocardio, provenienti da cuori espianati a soggetti con cardiomiopatia terminale. In particolare i tessuti provengono da soggetti affetti da insufficienza cardiaca post ischemica.

I tessuti normali sono porzioni tissutali di cuori destinati a trapianto.

Estrazione e purificazione di RNA totale

L'RNA totale contiene tutte le tre forme di acido ribonucleico caratteristiche di una cellula di mammifero: rRNA (80-85%), tRNA (10-

15%) e mRNA (1-5%).

La purificazione dell'RNA è in genere più difficile di quella del DNA soprattutto a causa della possibile degradazione dell'RNA durante il processo di estrazione dovuta all'azione delle ribonucleasi. La resa di un'estrazione di RNA può essere molto bassa in quanto esso, per sua natura chimica, è soggetto alla degradazione da parte delle RNAsi che si trovano in ogni cellula, e che sono particolarmente abbondanti in tutti i tessuti. Per tale motivo è opportuno sempre adottare specifiche precauzioni durante l'estrazione e la purificazione dell'RNA: il materiale "disposable", cioè eppendorf e puntali, deve essere sempre sterile ed è opportuno lavorare sempre con guanti. Inoltre le eventuali soluzioni necessarie per l'estrazione e la purificazione dell'RNA devono essere sterili, in particolare l'acqua in cui si sospende l'RNA deve essere trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) che inattiva le RNAsi e, successivamente, autoclavata, in modo da sterilizzarla e rendere inattivo il DEPC.

Sono stati sviluppati vari metodi di estrazione dell'RNA nel tentativo di migliorare la resa e la qualità dell'RNA estratto. Essi hanno in comune alcuni punti essenziali:

- Neutralizzazione e distruzione delle RNAsi

- Lisi cellulare
- Denaturazione delle proteine
- Purificazione dell'RNA

Il tentativo di neutralizzare le RNAsi interne alla cellula, che si scatenano appena questa viene lisata, è l'elemento cruciale del processo di estrazione. Sostanze diverse sono state usate come inibitori, le più frequenti sono: l'eparina, il polivinil solfato, i sali di vanadio e l'RNAsina. Oltre alla neutralizzazione delle RNAsi, si può provare a denaturare contemporaneamente tutte le altre proteine cellulari usando sostanze deproteinizzanti come il fenolo o il cloroformio, detergenti come il sodio dodecil solfato (SDS) e il sarcosyl, proteasi quale la proteinasi K con o senza SDS, e potenti denaturanti come la guanidina isotiocianato e l'idrocloruro.

Risolto il problema rappresentato dalle RNAsi si passa alla lisi cellulare con sostanze detergenti associate talvolta a lavoro meccanico con pestelli a mano o con omogenizzatori nel caso dei tessuti. Le cellule tenute in coltura sono, infatti, lisate all'istante mentre per i tessuti è richiesto maggiore impegno; l'importante è che l'operazione sia più veloce possibile per evitare l'azione delle prime RNAsi liberate dalla lisi cellulare. Se si vuole estrarre l'RNA cellulare

totale senza separare quello citoplasmatico da quello nucleare si possono lisare le cellule con sostanze che dissolvono, allo stesso tempo, sia la membrana plasmatica che la membrana nucleare e denaturano tutte le proteine; se invece si vuole analizzare l'RNA citoplasmatico e quello nucleare separatamente, si usano detergenti quali il Triton o l'NP40 per lisare le cellule.

La denaturazione delle proteine è necessaria per liberare l'acido nucleico dalle proteine stesse. Questa fase può essere svolta usando fenolo, guanidina tiocianato, o sostanze riducenti come il mercaptoetanolo e il ditiotreitolo (DTT).

L'ultima fase è la purificazione dell'RNA che viene separato dal DNA genomico mediante precipitazioni differenziali o per ultracentrifugazione, o anche mediante una combinazione di entrambe le tecniche. Il metodo di estrazione e purificazione utilizzato in questo lavoro di tesi è rappresentato dal TRIZOL Reagent, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, aggiunta ai tessuti prima della loro omogenizzazione.

Il TRIZOL è una soluzione che ha la duplice funzione di mantenere l'integrità dell'acido ribonucleico e di rompere le cellule; 1 ml di TRIZOL è sufficiente per processare 100-150 mg di tessuto. La

guanidina lisa le cellule e denatura le proteine, mentre il fenolo deproteinizza l'RNA. I tessuti devono essere omogeneizzati e, successivamente, centrifugati al fine di prelevare soltanto il surnatante che contiene cellule e lisati. Le componenti tissutali più grandi, precipitate nel pellet, vengono eliminate. Si "pipetta" più volte la miscela formata da 1 ml di TRIZOL e dalle cellule, per frammentare il DNA genomico, e poi si mettono ad incubare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti per avere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Si aggiungono quindi 200 μ l di cloroformio e si agitano vigorosamente i campioni che vengono poi incubati per 3 minuti a temperatura ambiente (R.T.). Il cloroformio ha il duplice effetto di sequestrare il fenolo e di appesantire la fase organica che si separerà ancora più nettamente.

Dopo centrifugazione a 12.000 g per 15 min a 4°C, si ottiene la separazione della soluzione in due fasi: una fase organica inferiore di colore rosso, contenente fenolo, proteine e DNA, ed una fase acquosa superiore incolore, contenente l'RNA. Le due fasi sono separate da un'interfase semisolida contenente DNA e proteine.

Si preleva quindi delicatamente la fase acquosa facendo attenzione a non prelevare la fase organica e si precipita l'RNA aggiungendo ai

campioni 500 μ l di isopropanolo ed incubandoli a R.T. per 10 min. Dopo centrifugazione a 12.000 g per 10 min a 4°C, l'RNA che prima era invisibile si deposita sul fondo della parete e forma un sedimento (pellet). L'ultima fase dell'estrazione consiste nel lavare il pellet centrifugandolo a

7500 g per 5 min a 4°C in 1 ml di una soluzione contenente etanolo al 75% (DEPC). Dopo questo lavaggio si elimina il surnatante e si lascia asciugare il pellet costituito da solo RNA (anche piccole tracce di etanolo potrebbero interferire nella susseguente reazione di retrotrascrizione). Il pellet sarà quindi risospeso in 15-20 μ l di H₂O autoclavata o trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) che inattiva le RNAsi.

Analisi quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto

Per valutare la concentrazione e l'assenza di contaminazioni proteiche dei campioni di RNA può essere usata la SPETTROFOTOMETRIA.

L'RNA mostra picchi di assorbimento a 260 nm a causa dei doppi legami coniugati presenti nelle sue basi. A 260 nm un valore di A₂₆₀ di 1,0 è dato da una soluzione di RNA a singolo filamento con concentrazione di 40 μ g/ml. Se si misura anche l'assorbanza a 280

nm si può quantificare la contaminazione da proteine. Infatti, gli acidi nucleici puri danno rapporti A_{260}/A_{280} di 1,8-2,0 ed un valore sotto 1,6 indica una contaminazione da proteine significativa. La contaminazione da DNA genomico di una preparazione di RNA può essere rilevata dal grado di viscosità del campione e può essere confermata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

La lettura delle assorbanze a 260 nm e a 280 nm dei campioni di RNA è stata effettuata attraverso il BIOFOTOMETRO della EPPENDORF.

L'analisi qualitativa dell'RNA estratto viene fatta sottoponendo la stessa quantità (in genere 3 μ g) dei campioni di RNA estratti ad elettroforesi su gel di agarosio e formaldeide. Prima di preparare il gel, è necessario lavare la cameretta elettroforetica per almeno un'ora con una soluzione 100 mM di NaOH. Si prepara quindi un gel di agarosio all' 1.5% sciogliendo l'agarosio in una soluzione tampone di MOPS 1X. Dopo ebollizione si lascia raffreddare e si aggiunge formaldeide al 37% (sotto cappa), che è un composto denaturante.

Prima di caricare, ai campioni di RNA si aggiungono 3 volumi di LOADING BUFFER, una miscela di composti necessari rispettivamente per rendere visibile l'acido nucleico sul gel (Bromuro

di Etidio) e per denaturare i campioni (Formaldeide e Formammide). Quindi i campioni vanno tenuti a 65°C per 10 minuti e poi analizzati su gel d'agarosio e formaldeide usando come tampone di corsa il MOPS 1X.

Ultimata la corsa è possibile osservare il gel al transilluminatore a luce UV e vedere le tre bande fluorescenti corrispondenti a tre marcatori interni: 28S, 18S e 5S; se l'RNA non è degradato e quindi è integro, le bande saranno ben distinguibili e inoltre la banda del 28S avrà un'intensità di fluorescenza maggiore delle altre due bande ed in particolare presenterà una fluorescenza quasi due volte più intensa della banda corrispondente al 18S. Qualora l'RNA dovesse essere degradato sul gel apparirà uno "SMEAR" ossia una "strisciata" fluorescente lungo tutto il gel sottostante alle bande.

A questo punto possiamo sintetizzare dai nostri RNA i cDNA.

Sintesi di cDNA (retrotrascrizione)

Un cDNA è una molecola di DNA a singola o a doppia elica sintetizzata da un RNA messaggero. Essendo una copia dell'mRNA, anche il cDNA manca delle sequenze non codificanti del genoma, gli introni. Queste regioni vengono rimosse in seguito al processo di

maturazione, detto SPLICING, a cui sono sottoposti i trascritti primari, negli eucarioti, prima di uscire dal nucleo e passare nel citoplasma per poter essere tradotti. Dopo la rimozione degli introni, si ha la saldatura degli esoni codificanti adiacenti. Il trascritto primario maturo che passa nel citoplasma avrà inoltre un "cap" all'estremità 5', che ha la funzione di proteggere l'RNA dalla degradazione enzimatica, e una coda di "polyA" formata da residui di acido adenilico posti in successione all'estremità 3', in genere 150-200 basi. Possono essere presenti, alle estremità, anche segmenti non codificanti chiamati "regioni non tradotte" 5' e 3' (UTR).

La retrotrascrizione consente quindi di ottenere cDNA dai corrispondenti RNA precedentemente estratti. Questa reazione è una fase cruciale dell'RT-PCR e può avvenire o contemporaneamente alla PCR o in momenti separati; si possono quindi usare due tubini nei quali aggiungiamo separatamente i due enzimi coinvolti nei due processi (DNA polimerasi-RNA dipendente e DNA polimerasi-DNA dipendente) o un unico tubino entrambi gli enzimi e in cui le due reazioni procedono simultaneamente. La separazione delle due reazioni consente di generare un pool di cDNA stabili che possono essere indefinitamente

analizzati; la scelta di un unico step di reazione con entrambi gli enzimi ha il vantaggio di ridurre il tempo di lavoro ed il rischio di contaminazioni.

Due sono gli enzimi comunemente usati nella reazione di retrotrascrizione : la AMV- RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) e la MMLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase). L'AMV-RT è un enzima più termostabile e conduce la polimerizzazione a temperature anche superiori a 55°C, quindi riduce i problemi associati alla formazione di strutture secondarie dell'RNA; invece la MMLV-RT ha una ridotta attività RNasi H rispetto all'AMV-RT e per questo motivo è preferita per la sintesi di molecole di cDNA più lunghe e addirittura del "full length" cDNA.

Altri componenti essenziali nella reazione di retrotrascrizione sono i primers, indispensabili per l'innesco della reazione di polimerizzazione della trascrittasi inversa. Esistono due tipi di primers: gli oligo dT e i random esameri pd(N)₆. La giusta scelta dei primers è fondamentale per ridurre il "background" e massimizzare il numero di copie di molecole di mRNA che possono essere analizzate da piccole

quantità di campione. Gli oligo dT sono oligonucleotidi composti da timidine che si appaiano alla coda di poliA presente all'estremità 3' dell'RNA messaggero, mentre i pd(N)₆ sono degli esameri di nucleotidi che si appaiano in maniera casuale (random) in più punti del trascritto. Talvolta l'uso di oligo dT non è consigliato in quanto presenta lo svantaggio che parte dell'informazione presente all'estremità 5' del messaggero potrebbe essere perduta. Tale inconveniente non dovrebbe sussistere se usiamo esameri di nucleotidi (pd(N)₆) che si appaiano in siti diversi del trascritto.

Dopo l'appaiamento dei primers l'aggiunta dei quattro desossiribonucleotidi trifosfati consente all'enzima di copiare il messaggero in direzione 5'-3' a partire dai primers.

Nel mio lavoro sperimentale ho condotto la reazione di retrotrascrizione separatamente dalla PCR, usando i primers pd(N)₆ e la trascrittasi inversa MMLV.

Prima di iniziare la reazione di retrotrascrizione, gli RNA totali (1-5 µg di RNA per campione in 8 µl di H₂O sterile) sono stati incubati ad una temperatura di 65°C per 10 minuti e subito messi in ghiaccio per impedire la formazione di strutture secondarie attraverso

l'appaiamento delle basi di segmenti complementari distanti, presenti sulla stessa molecola di acido ribonucleico, che potrebbero interferire con l'intero processo di retrotrascrizione.

Dopo centrifugazione è stata aggiunta ai campioni la miscela contenente 5 μ l di BULK FIRST-STRAND cDNA REACTION con la MMLV-RT, 1 μ l di DTT e 1 μ l di primers pd(N)₆; i campioni sono stati poi incubati a 37°C per un'ora.

Sono stati così sintetizzati i cDNA a singolo filamento ancora legati all'RNA in un ibrido che sarà poi denaturato durante la fase iniziale di denaturazione della PCR.

Oligonucleotidi e programmi di PCR

Gli oligonucleotidi progettati esintetizzati presso il laboratori del CE.IN.GE, per l'amplificazione dei geni delle SOD sono i seguenti:

SOD1	FW 5' - GCTGGTGTGCGTCGTAGTCTC	RW 5' - TGCTTCCCACACCTTCACTG
SOD2	FW 5' - GGTGGGGTGGCTGGTTTC	RW 5' - CATTCGCCAGTIGATTACAT
SOD3	FW 5' - CCTGCGTTCCTGGGCTGGCTG	RW 5' - CTCCGTGACCTGGCGTACAT

Le temperature ottimali di annealing utilizzate durante le reazioni di RT-PCR sono state:

SOD1	56,1°C
SOD2	50,0°C

SOD3	61,2°C
------	--------

Per tutte le reazioni sono stati effettuati 30 cicli di amplificazione con una denaturazione iniziale di 5 min. a 94°C; denaturazione di 1 min. a 94°C; annealing 0,5 min. alle temperature indicate; extension 1 min. a 72°C; final extension 5 min. a 72°C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR offre un approccio alternativo alla clonazione dei geni per la produzione di molte copie di una sequenza identica di DNA a partire anche da piccole quantità di campione. Consente inoltre di valutare l'espressione di un determinato gene confrontandolo con un gene standard di riferimento.

E' una reazione esponenziale composta da cicli ripetuti di denaturazione, appaiamento (annealing) dei primers alle sequenze "target" ed estensione. Questi cicli possono essere reiterati in una macchina programmata, in cui una celletta termostata viene automaticamente e ritmicamente riscaldata per denaturare il DNA e raffreddata per permettere l'appaiamento dei primers alla sequenza che si vuole amplificare. Ad ogni ciclo di reazione si raddoppia la quantità di acido nucleico di partenza, quindi la concentrazione del

prodotto finale sarà uguale a 2^n in cui "n" è il numero di cicli scelti per la reazione.

La PCR è divisa essenzialmente in 3 fasi:

- DENATURAZIONE
- ANNEALING
- ESTENSIONE

Queste tre fasi sono ripetute per un numero di cicli stabilito (20-35).

Generalmente ad esse viene aggiunta una fase di denaturazione iniziale ed una fase di estensione finale. La denaturazione avviene generalmente ad una temperatura di 94°C per 1 o anche 3 minuti e serve a separare i due filamenti di DNA; nel mio caso l'ibrido formato dal cDNA a singolo filamento e dall'RNA usato come stampo per la retrotrascrizione; l'annealing comporta l'appaiamento dei primers alla sequenza "target" che si vuole amplificare (nel nostro caso il cDNA a singolo filamento) e avviene ad una temperatura compresa tra 53 e 61°C per 1 minuto. Questa fase è influenzata molto dalla scelta dei primers che hanno generalmente una lunghezza compresa tra 20 e 25 nucleotidi ed una percentuale di G e C tra il 50 e il 60% . La sequenza nucleotidica della coppia di primers non deve avere più di quattro basi uguali successive,

specialmente se G o C, e deve avere un contenuto di G + C molto simile affinché le temperature di appaiamento siano simili. Inoltre deve esserci un grado minimo di complementarietà interna e nessuna complementarietà tra i due primers per evitare sia la formazione di strutture secondarie e di "hairpin loop", sia la formazione di dimeri di primer. Le temperature di appaiamento si basano sulla T_m (temperatura di melting) che è la temperatura a cui il 50% dei primers sono appaiati alla sequenza bersaglio; per primer di più di venti basi la T_m si può calcolare approssimativamente in °C dall'equazione: $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$ in cui G, C, A e T sono rispettivamente il numero di purine e di pirimidine del primer.

I primers dovrebbero essere scelti in modo da appaiarsi specificamente solo alla sequenza di nostro interesse per evitare la co-amplificazione di sequenze omologhe, quindi devono essere molto specifici. I due primers scelti per amplificare il cDNA devono appaiarsi a sequenze nucleotidiche di esoni diversi; ciò consente di evidenziare eventuali prodotti amplificati di DNA genomico contaminante che in questo modo risultano essere più lunghi dei prodotti amplificati dei cDNA "target". Nelle reazioni di PCR di questa tesi sono stati quindi usati coppie di "primers" specifici per il

cDNA “target” da amplificare. Per trovare le sequenze nucleotidiche dei cDNA è stata usata la banca dati del sito <http://www.ensembl.org>. Ensembl fa parte di un unico progetto tra EMBL (European Molecular Biology Laboratory), European Bioinformatics Institute (EBI) e il Wellcome Trust Ranger Institute (WTSI) che ha lo scopo di sviluppare un sistema informatico che offre informazioni su genomi eucariotici.

Quindi il progetto Ensembl offre immediatamente, senza alcuna restrizione di accesso, dati esatti dei genomi eucariotici e “software” necessari per l’analisi e la presentazione dei suddetti dati. I

“primers” sono stati quindi disegnati con l’ausilio del software OLIGO 6.0, usufruendo della sequenza nucleotidica della EC-SOD presente nella banca dati del sito <http://www.ensembl.org>.

I parametri ottimali nel disegno degli oligo attraverso il software OLIGO 6.0 sono:

- “primers” stabili al 5’ con stabilità decrescente verso il 3’
- bassa stabilità sia di duplex interoligo sia intraoligo
- assenza di formazione di duplex al 3’
- assenza di strutture secondarie fra gli oligo
- %GC paragonabile a %AT.

L'ultima fase della PCR, l'estensione, rappresenta la fase di sintesi della PCR, ed è caratterizzata dall'aggiunta di nucleotidi da parte della DNA polimerasi ai primers che fungono da innesco sulla sequenza "target". L'enzima DNA polimerasi-DNA dipendente scelto per la reazione di PCR è la Taq polimerasi estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus*, che funziona a temperature estremamente elevate (72°C), è termoresistente e non si inattiva a temperature anche più alte (95°C), e mantiene quindi l'attività enzimatica alle alte temperature caratteristiche dei cicli di reazione della PCR.

Oltre alla scelta dei primers un altro parametro da valutare è la concentrazione di Mg^{2+} da usare nella reazione; questo ione è richiesto come cofattore per la Taq polimerasi. Un eccesso stabilizza il DNA a doppio filamento e può impedire la denaturazione

completa del prodotto ad ogni ciclo, portando alla formazione di prodotti indesiderati per appaiamento aspecifico dei primers; però una concentrazione molto bassa di Mg^{2+} potrebbe comunque essere svantaggiosa in quanto può ostacolare la polimerizzazione del filamento da parte della Taq polimerasi.

E' opportuno usare durante la PCR sia un controllo positivo, se

possibile, sia un controllo negativo: il primo ci consente di valutare il buon funzionamento della reazione, il secondo ci consente di verificare la sua purezza, assicurandoci che non ci siano contaminazioni. I reagenti usati per una reazione di PCR sono: la Taq polimerasi, i dNTP, il tampone necessario per la reazione di polimerizzazione, il $MgCl_2$, una coppia di primers e l' H_2O sterile.

In genere è preferibile preparare l'intera miscela di reazione contenente tutti i componenti e poi dividerla nei vari campioni da amplificare compresi i due controlli, ovviamente in quello negativo ci sarà l' H_2O sterile e in quello positivo il pool di cDNA contenente sicuramente la sequenza nucleotidica "target".

Analisi dei prodotti di PCR attraverso elettroforesi su gel di agarosio

Il gel può essere preparato a diverse percentuali di agarosio in base alla lunghezza dei frammenti di DNA che si vogliono analizzare: percentuali più alte sono usate per frammenti piccoli mentre percentuali più basse per frammenti di lunghezza maggiore; ad esempio un gel di agarosio al 2% separa molecole di DNA con lunghezza compresa tra 0.1 e 2 kb, mentre gel di agarosio allo 0.3%

separano molecole con lunghezza compresa tra di 5 e 60 kb.

I frammenti di DNA, sottoposti durante l'elettroforesi ad un campo elettrico, migrano verso il polo positivo attraverso le maglie del gel formate dall'agarosio, con una velocità inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare e quindi della loro lunghezza. Quindi i frammenti più lunghi restano intrappolati nelle maglie del gel e la loro corsa sarà rallentata, mentre i frammenti più corti migrano con una velocità maggiore.

Ai campioni, prima di caricarli sul gel, viene aggiunto un "LOADING DYE 6X" contenente Glicerolo e Orange G e/o Bromo fenolo blu. La presenza di bromuro di etidio nel gel, trattandosi di una sostanza mutagena capace di intercalarsi tra le coppie di basi ed emettere fluorescenza se colpita da raggi UV, consente di osservare il gel a corsa ultimata se lo si pone su una lampada ad UV: il transilluminatore. Saranno visibili delle bande diverse corrispondenti ai vari frammenti di DNA.

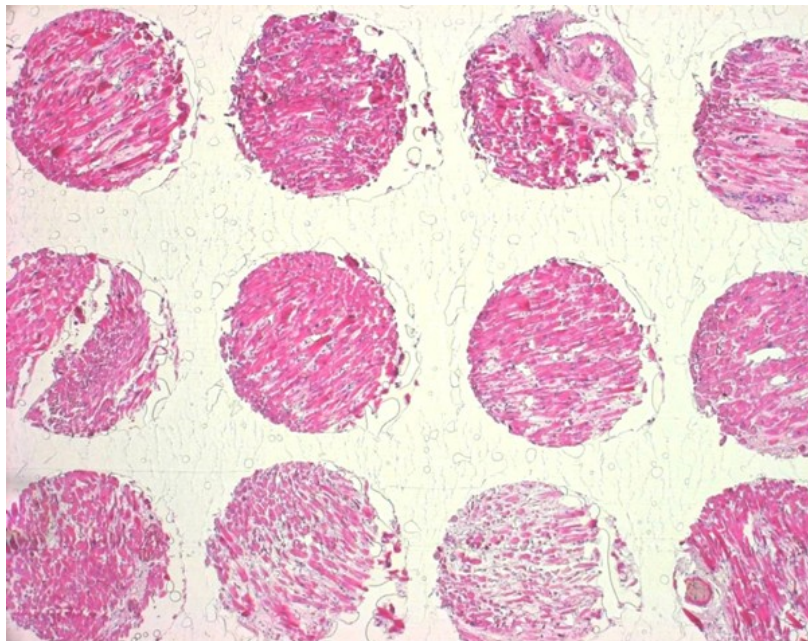
I gel d'agarosio contenenti le bande fluorescenti, corrispondenti ai frammenti di DNA, possono essere fotografati attraverso diversi sistemi fotografici. Nel mio lavoro sperimentale il sistema utilizzato è la fotocamera POLAROID GEL CAM.

La quantizzazione dell'espressione dei geni delle SOD è avvenuta attraverso un metodo semiquantitativo e densitometrico. I valori sono adimensionali e linearizzati grazie al gene house keeping della GAPDH.

[Riferimenti bibliografici di questo capitolo: 2, 3, 6, 7, 20, 21, 29, 43, 44, 52, 77, 81, 83, 88, 93, 94, 96, 99, 101, 102, 104, 106, 116]

Risultati

Prima ancora di iniziare ad esaminare i preparati istologici colorati con le tecniche immunohistochimiche, il primo passaggio consiste nel controllo della qualità di allestimento del microarray tissutale, cioè bisogna innanzitutto verificare se i dischetti di tessuto sono correttamente allineati e corrispondono alla griglia programmata, inoltre è necessario valutare se i singoli dischetti di tessuto si sono conservati inalterati nel passaggio dall'originale blocchetto di paraffina al blocchetto del microarray. (figura sottostante)



Fase di verifica della bontà realizzativa del microarray di tessuti cardiaci.

L'allineamento e l'integrità dei dischetti è più che soddisfacente.

Per effettuare questa verifica, è necessario che le prime sezioni istologiche tagliate del micorarray vengano colorate con la colorazione di routine con ematossilina-eosina, la verifica al microscopio ci permetteva di evidenziare

che i tessuti erano abbastanza integri e che l'allineamento dei dischetti era praticamente perfetto.

Questo è un passaggio molto importante infatti, nella fase di taglio delle sezioni del microarray, che è costituito nel nostro caso da tanti cilindretti di tessuto cardiaco ischemico affiancati gli uni agli altri, si perdono inevitabilmente alcuni dischetti di tessuto. Questo fenomeno può essere dovuto ad esempio alla imperfetta adesione della pellicola adesiva collocata sul blocchetto prima del taglio, oppure in altri casi, è causato dall'assenza del cilindro di tessuto nel sito di innesto, dovuto ad un impreciso prelievo oppure all'esaurimento del tessuto in seguito al taglio di un numero elevato di sezioni istologiche.

Il numero dei dischetti perso durante il taglio delle sezioni è stato minimo, così i vetrini dei microarray erano idonei e erano utilizzati per le indagini immunoistochimiche come già descritto nella sezione dei materiali e metodi.

Le colorazioni immunoistochimiche effettuate sui tessuti di controllo prima e durante gli esperimenti ed i test effettuati sui microarray hanno evidenziato che l'efficienza e la specificità degli anticorpi utilizzati era ottima, alcune perplessità emergevano, almeno inizialmente, sui primi risultati ottenuti nei tessuti cardiaci.

Le colorazioni della SOD-1 e SOD-3 hanno presentato una distribuzione

diffusa, anche se nei vari tessuti inseriti nel microarray si evidenziavano differenze di intensità ed evidenti segni di specificità.

I test immunohistochimici sono stati condotti due volte consecutive al fine di evitare il rischio di una colorazione aspecifica e falsata.

Nessun tipo di problema si incontrava con gli esperimenti di analisi immunohistochimica per la SOD-2 e per la Caspasi3 attivata.

Si decideva di effettuare un'analisi dei vetrini di tipo qualitativo e semiquantitativo in virtù dell'impossibilità di realizzare conte numeriche esatte per le cellule positive, che sicuramente avrebbero presentato un risultato con gran parte dei dischetti tissutali positivi al 100%.

Si provvedeva ad individuare ed assegnare vari gradi di positività, identificati da un punteggio crescente, attribuito ad ognuno dei dischetti tissutali colorati ed esaminati, come riportato nella sezione dei materiali e metodi (con particolare riferimento allo hercep test).

I dati così raccolti, sono stati riportati su un foglio Excel sul quale erano già stati riportati tutti i dati biometrici e relativi alla patologia. Il file è stato analizzato attraverso il software TMA Foresight 3 e SPSS 13.0.

Prima ancora di esaminare i risultati dei test statistici, è importante descrivere alcune delle diverse variabili che in questo studio sono state considerate e analizzate, con verifica dei valori di correlazione tra le stesse:

l'età; il sesso; l'indice di massa corporea (BMI); la classificazione normale e quella patologica, indicizzate, rispettivamente, con un punteggio di 1 e di 2; la diagnosi sul tipo di infarto (subacuto, acuto ed iperacuto) ed, infine, i valori di intensità di espressione dei singoli marcatori presi in considerazione nella nostra analisi.

Come già descritto nei materiali e metodi, sia l'età che il sesso sono riconosciuti come fattori di rischio non modificabili.

Nel corso del nostro studio, abbiamo voluto verificare se questi fattori potessero essere realmente considerati come fattori discriminanti nell'insorgenza della cardiopatia ischemica.

L'età mostra concretamente un fattore di correlazione statisticamente rilevante ($p=0,048$; test di correlazione di Spearman's Rho, test di associazione Kendall's Tau b) con l'insorgenza della patologia (**Tabella 1**).

			Norm./Patol.	Età
Tau_b di Kendall	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	-,083*
		Sig. (2-code)	.	,048
		N	396	396
Età		Coefficiente di correlazione	-,083*	1,000
		Sig. (2-code) N	,048	.
			396	396

Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	-,100*
	Sig. (2-code)		.	,048
		N	396	396
Età	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	-,100*	1,000
	Sig. (2-code)		.	,048
		N	396	396

*. La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

Tabella 1: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici ed età

Al contrario della variabile età, il sesso, nell'ambito dei casi presi in esame, non è risultato un fattore di rischio statisticamente significativo ($p=0,148$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b). Questo dato, è in parte riconducibile al numero ristretto dei soggetti normali presi in esame (**Tabella 2**).

			Norm./Patol.	Sesso
Tau_b di Kendall	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	,078
	Sig. (2-code)		.	,148
		N	396	345
Sesso	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	,078	1,000
	Sig. (2-code)		,148	.
		N	345	345
Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	1,000	,078
	Sig. (2-code)		.	,148
		N	396	345
Sesso	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione	,078	1,000
	Sig. (2-code)		,148	.
		N	345	345

Tabella 2: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici ed il sesso

Anche l'indice di massa corporea non ha mostrato una correlazione statisticamente significativa (anche se con il valore della $p=0,075$, quindi prossimo allo 0,05) con i soggetti normali e patologici (**Tabella 3**).

		Norm./Patol.	Score B.M.I.
--	--	--------------	--------------

Tau_b di Kendall	Norm./Patol. Coefficiente di correlazione Sig. (2-code) N	1,000	,082
		,075	396
	Score B.M.I. Coefficiente di correlazione Sig. (2-code) N	,082	1,000
		,075	396
Rho di Spearman	Norm./Patol. Coefficiente di correlazione Sig. (2-code) N	1,000	,090
		,075	396
	Score B.M.I. Coefficiente di correlazione Sig. (2-code) N	,090	1,000
		,075	396

Tabella 3: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici e l'indice di massa corporea

Tutte le proteine considerate nella nostra analisi hanno presentato una correlazione inversa con la condizione del soggetto (normale o patologico): ciò indica che esse sono maggiormente espresse nei casi normali piuttosto che nei casi patologici. (N-P/SOD1 $p=0,02$; N-P/SOD3 $p=0,001$; N-P/Caspasi3 $p=0,01$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b).

La SOD2 è stata l'unica proteina in analisi che non ha raggiunto la significatività statistica ($p=0,064$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b)

(**Tabella 4**).

	Norm./Patol.	SOD-1	SOD-2	SOD-3	
Tau_b di Kendall	Norm./Patol. Coefficiente di correlazione Sig. (2-code) N	1,000	-,152**	-,102	-,257**
		,002	,064	,000	
	SOD-1 Coefficiente di correlazione Sig. (2-code) N	-,152**	1,000	,109*	,242**
		,002	,039	,000	
		358	358	321	350

	SOD-2	Coefficiente di correlazione				
	correlazione		-,102	,109*	1,000	-,003
	Sig. (2-code)	N	,064	,039	.	,958
			331	321	331	323
	SOD-3	Coefficiente di correlazione				
	correlazione		-,257**	,242**	-,003	1,000
	Sig. (2-code)	N	,000	,000	,958	.
			362	350	323	362
Rho di Spearman	Norm./Patol.	Coefficiente di correlazione				
	correlazione		1,000	-,161**	-,102	-,269**
	Sig. (2-code)	N	.	,002	,064	,000
			396	358	331	362
	SOD-1	Coefficiente di correlazione				
	correlazione		-,161**	1,000	,115*	,269**
	Sig. (2-code)	N	,002	.	,039	,000
			358	358	321	350
	SOD-2	Coefficiente di correlazione				
	correlazione		-,102	,115*	1,000	-,003
	Sig. (2-code)	N	,064	,039	.	,958
			331	321	331	323
	SOD-3	Coefficiente di correlazione				
	correlazione		-,269**	,269**	-,003	1,000
	Sig. (2-code)	N	,000	,000	,958	.
			362	350	323	362

** . La correlazione è significativa al livello 0,01 (2-code).

* . La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

Tabella 4: Calcolo della correlazione tra soggetti normali e patologici ed i livelli di espressione delle superossido dismutasi.

Consideriamo ora altri fattori cercando di spiegarne il significato biologico.

Il tipo di infarto diagnosticato non è riferito all'estensione del danno ischemico a carico del tessuto cardiaco, ma soltanto ad una questione di natura temporale.

Questo concetto è importante nella interpretazione dei dati ottenuti, soprattutto per comprendere le dinamiche di espressione delle proteine considerate nel nostro studio.

Come già descritto nella sezione materiali e metodi, abbiamo assegnato un punteggio ad ogni tipo di infarto diagnosticato, in base ad un fattore

temporale trascorso dal momento della diagnosi alla morte del soggetto, per cui, basandosi sui livelli di correlazione tra il tipo di infarto e l'intensità di espressione dei singoli marcatori esaminati, è possibile comprendere in che modo esse varino durante l'evoluzione della patologia. In particolare, è possibile valutare le variazioni nell'espressione delle proteine durante le prime fasi post ischemiche, i successivi processi di rimozione del tessuto infartuato, ad opera delle cellule del sistema immunitario, e infine quelli di cicatrizzazione e rimodellamento tissutale. Questi ultimi processi, ovviamente, sono quei fenomeni cui vanno incontro in maggiore misura i soggetti che, superando la fase critica post infarto, possono rientrare nelle diagnosi di infarti acuti e, in misura maggiore, subacuti.

I livelli della SOD1 e della SOD3 hanno una correlazione diretta con il tipo di infarto (Type/SOD1 $p=0,001$, Type/SOD3 $p=0,024$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b), questo significa che la loro espressione aumenta durante il decorso della patologia, risultando statisticamente più elevata nei soggetti deceduti con una diagnosi di infarto subacuto, rispetto ai casi di exitus in infarti acuti ed iperacuti. Anche in questo caso, non è possibile effettuare valutazioni certe sui livelli di correlazione tra la SOD2 ed il tipo di infarto ($p=0,22$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b) (**Tabella 5**).

La Caspasi3 attivata, qui utilizzata come marcatore delle cellule apoptotiche,

ha, al contrario, una correlazione inversa con il tipo di infarto (Type/Caspasi3 $p=0,037$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b) , ma mantiene una correlazione diretta con la SOD1 e la SOD3 (SOD1/Caspasi3 $p=0,08$, SOD3/Caspasi3 $p=0,001$; test Spearman's Rho, Kendall's Tau b): questo indica che maggiore è l'espressione delle due isoforme della SOD, maggiore sarà anche il numero delle cellule che esprimono la Caspasi3 e, ragionevolmente, delle cellule apoptotiche (**Tabella 5**).

Infine, prendiamo in considerazione le correlazioni che esistono tra i livelli di espressione dei vari marcatori e vediamo che le tre isoforme dell'enzima antiossidante sono correlate tra loro da un fattore positivo, e tutte sono correlate in modo diretto con la Caspasi3. (**Tabella 5**). La SOD 2 ha significatività statistica soltanto nelle correlazioni con la SOD1 e la Caspasi3.

			Type	SOD-1	SOD-2	SOD-3	Casp-3
Tau_b di Kendall	Type	Coefficiente di correlazione	1,000	,195**	-,067	,112*	-,108*
		Sig. (2-code)	.	,000	,220	,024	,040
		N	366	331	306	333	288
SOD-1		Coefficiente di correlazione	,195**	1,000	,109*	,242**	,136**
		Sig. (2-code)	,000	.	,039	,000	,008
		N	331	358	321	350	299

	SOD-2	Coefficiente di correlazione	-,067	,109*	1,000	-,003	,223**
		Sig. (2-code)	,220	,039	.	,958	,000
		N	306	321	331	323	292
	SOD-3	Coefficiente di correlazione	,112*	,242**	-,003	1,000	,295**
		Sig. (2-code)	,024	,000	,958	.	,000
		N	333	350	323	362	304
	Casp-3	Coefficiente di correlazione	-,108*	,136**	,223**	,295**	1,000
		Sig. (2-code)	,040	,008	,000	,000	.
		N	288	299	292	304	312
Rho di Spearman	Type	Coefficiente di correlazione	1,000	,212**	-,070	,123*	-,123*
		Sig. (2-code)	.	,000	,221	,024	,037
		N	366	331	306	333	288
	SOD-1	Coefficiente di correlazione	,212**	1,000	,115*	,269**	,152**
		Sig. (2-code)	,000	.	,039	,000	,008
		N	331	358	321	350	299
	SOD-2	Coefficiente di correlazione	-,070	,115*	1,000	-,003	,239**
		Sig. (2-code)	,221	,039	.	,958	,000
		N	306	321	331	323	292
	SOD-3	Coefficiente di correlazione	,123*	,269**	-,003	1,000	,327**
		Sig. (2-code)	,024	,000	,958	.	,000
		N	333	350	323	362	304
	Casp-3	Coefficiente di correlazione	-,123*	,152**	,239**	,327**	1,000
		Sig. (2-code) N	,037	,008	,000	,000	.
			288	299	292	304	312

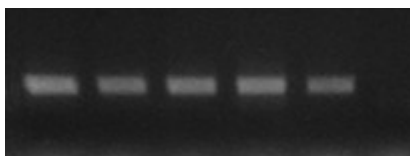
** . La correlazione è significativa al livello 0,01 (2-code).

*. La correlazione è significativa al livello 0,05 (2-code).

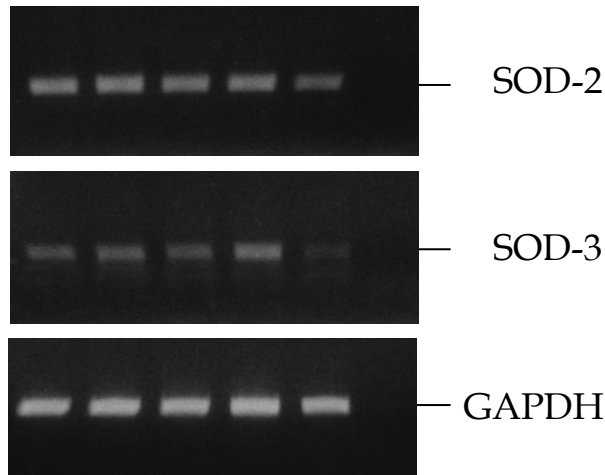
Tabella 5: Calcolo della correlazione tra tipo di infarto diagnosticato ed i livelli di espressione delle superossido dismutasi e della Caspasi3.

L'analisi densitometrica delle immagini dei gel delle RT-PCR ha presentato che non ci sono importanti differenze di espressione dei geni delle tre SOD in tessuti normali e patologici (vedere figura e grafico successive).-

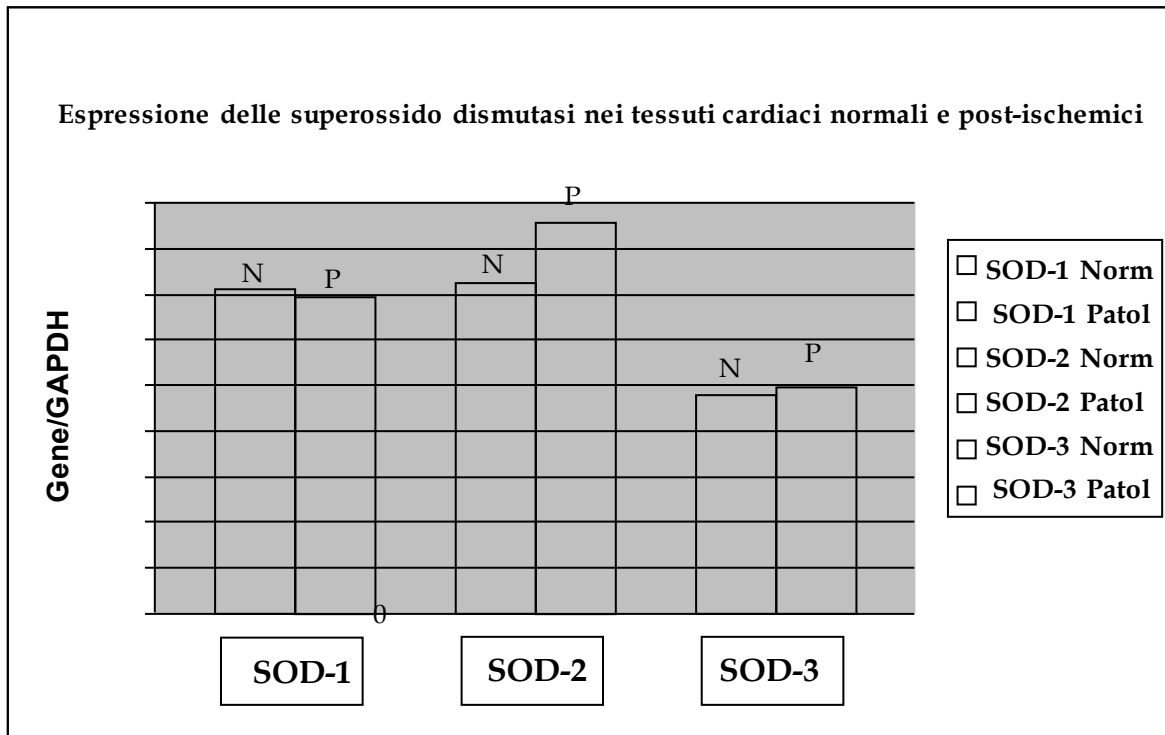
P P P N N



SOD-1



Gel che rappresentano l'espressione delle SOD e della GAPDH in tessuti cardiaci normali e post-ischemici. In basso In basso, istogramma con i risultati della quantizzazione densitometrica (Medie dei valori normali e patologici).



Discussione

Gli esperimenti con microarray tissutali consentono di ottenere una grande quantità di informazioni in poco tempo, con un minimo utilizzo di materiali ed in condizioni sperimentali assolutamente uniformi.

Nell'ambito della ricerca, le analisi effettuate avvalendosi di microarray tissutali non forniscono una risposta finale ad un problema biologico e sono poco utili ai fini diagnostici, ma consentono di indirizzarci verso nuovi canali di ricerca e di valutare i problemi da differenti prospettive.

I risultati ottenuti da tali indagini sono facilmente riassumibili in una tabella in cui sono riportati i coefficienti di correlazione statistica con i relativi livelli di significatività.

Lo studio attraverso i microarray tissutali, come detto, ci fornisce l'opportunità di valutare fenomeni biologici da una prospettiva differente e innovativa: infatti, nell'ambito della ricerca biomedica, poter lavorare con un sufficiente numero di campioni è di fondamentale importanza se si vuole approfondire un problema, andando al di là dell'analisi di singolo evento. Questo è vero ancor di più quando la ricerca è effettuata su tessuti umani, nei quali, l'incredibile complessità dell'organismo, si manifesta in un'altissima variabilità di espressione dei parametri

biometrici.

Il rischio che si corre in tali studi, però, è quello di fermarsi alla valutazione dei meri dati numerici sottovalutando l'interpretazione complessiva dei fenomeni biologici che ci sono alla base dei risultati così ottenuti.

È per questo che, proveremo ora, di interpretare, dal punto di vista biologico i dati ottenuti, provando a fare delle ipotesi sugli eventi molecolari che possano essere alla base dei fenomeni considerati.

L'innovazione proposta da tale studio è l'applicazione dei microarray tissutali, tecnica ormai nota e applicata negli ultimi anni, nei maggiori studi sulle neoplasie, sino a quelli sui tessuti cardiaci postischemici.

I dati ci mostrano che, mentre l'età è effettivamente un fattore di rischio, il sesso, nel campione da noi considerato, non lo è. La spiegazione di tale affermazione, che sembra in contraddizione con conoscenze ampiamente dimostrate, può risiedere nella limitatezza del campione complessivo considerato, e ancor più, nell'esiguità dei soggetti normali inclusi in questa analisi. La ristrettezza del campione esaminati è da tener presente, soprattutto, quando analizzeremo variabili che si avvicinano molto alla significatività statistica, pur non raggiuogendola.

L'indice di massa corporea rientra proprio in questo tipo di fenomeno,

infatti, esso pur non raggiungendo la significatività statistica per i test a due code, si colloca in prossimità del valore dello 0,05: probabilmente un campione più esteso di soggetti normali avrebbe sancito che, così com'è noto, la forma fisica, e quindi un peso corporeo non sopra della norma, sia fondamentale nella prevenzione della malattia cardiaca. Inoltre, negli ultimi anni il numero di persone in sovrappeso, nei Paesi industrializzati, è cresciuto in proporzioni preoccupanti e il problema sta assumendo contorni assai seri. Gli Stati Uniti detengono il primato della popolazione globale in sovrappeso (55% con un indice di massa corporea IMC > 25) e vittima dell'adiposità (31% con IMC > 30).

Diversamente dagli Stati Uniti, in Svizzera, Paese dal quale deriva la casistica esaminata, i fenomeni del sovrappeso e dell'adiposità sono notevolmente più contenuti.

Stando all'inchiesta sulla salute condotta nel 2002, nel 2001 in Svizzera erano in sovrappeso 1,8 milioni di persone di età superiore ai 15 anni (29,4%). Altre 500'000 persone sono state classificate obese (7,7%), per un totale di 2,2 milioni di persone in eccesso ponderale. Ciò corrisponde a più di un terzo della popolazione di età superiore ai 15 anni (37,1%) (Dati Società Svizzera per la Nutrizione , SSN).

Così, in una popolazione interessata ancora in modo limitato da fenomeni

di obesità, le differenze riscontrabili tra soggetti normali e quelli patologici si attenuano sensibilmente, rendendo il dato statisticamente non significativo.

Dal punto di vista prettamente molecolare, lo studio ha fatto emergere alcuni aspetti importanti e inediti.

La SOD1 e la SOD3 hanno una correlazione inversa con i gruppi normali e patologici, ciò, come già detto in precedenza, ciò significa che vi è una maggiore espressione di tali proteine nei normali, piuttosto che nei patologici.

Eppure, per entrambe le proteine il fattore di correlazione con il tipo dell'infarto è positivo.

Questa affermazione, a prima vista contraddittoria, in realtà non lo è. La SOD1 e la SOD3 aumentano dopo l'infarto e sono maggiormente espresse nei soggetti con infarto subacuto.

Pur essendo un dato descritto per la prima volta nell'uomo, tale andamento dell'espressione è abbastanza prevedibile conoscendo gli eventi che seguono l'infarto al miocardio e descritti ampiamente in precedenza: le alterazione a livello molecolare di gran parte delle molecole biologiche e l'accumulo dei cataboliti a livello cellulare, sono certamente causa di uno stress ossidativo ampiamente superiore alla norma. In tale

situazione, le cellule ancora metabolicamente attive, cercano di contrastare tale condizione, aumentando l'espressione degli enzimi antiossidanti. Un'altra spiegazione può risiedere nel maggiore stress ossidativo che si realizza a seguito della riperfusione del tessuto miocardico: i soggetti che decedono con diagnosi di infarto al miocardio subacuto possono aver subito interventi farmacologici nel tentativo di ristabilire il circolo sanguigno a livello coronarico (es. terapie trombolitiche). Proprio in tale circostanza, alcune fonti bibliografiche citano un ulteriore aumento dello stress ossidativo (Cardiovascular Pathology, W.B. Saunders Company, 1991). Le cellule quasi irreversibilmente danneggiate dall'ischemia possono in ultima analisi, prima di soccombere, tentare di opporsi al suddetto stress aumentando l'espressione delle SOD. L'individuazione delle cellule apoptotiche e la distinzione di queste dalle altre cellule che vanno incontro a necrosi è stato di fondamentale importanza nel nostro sistema sperimentale. Su sezioni di tessuto, sono due i metodi per rilevare l'apoptosi: il primo metodo è di tipo immunologico, basato sulla rilevazione della Caspasi3 attivata mentre il secondo metodo è biomolecolare e basato sulla rilevazione della frammentazione del DNA, chiamato TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase).

Uno dei motivi per cui si è deciso di utilizzare il primo metodo, piuttosto

che il secondo, risiede nella semplicità di esecuzione e nella affidabilità dei risultati. Inoltre, la frammentazione del DNA è un fenomeno ben più tardivo dell'attivazione della Caspasi3 nella sequenza di eventi che portano all'apoptosi. Per tale motivo, spesso, la TUNEL non è in grado di rilevare una porzione delle cellule che, pur avendo sorpassato un punto di non ritorno nella sequenza di eventi, tipica della morte cellulare programmata, non presentano ancora una sufficiente frammentazione del DNA per essere rilevata attraverso la TUNEL. Per tali motivi spesso, gli esperimenti di TUNEL ricevono pareri contrastanti dagli addetti ai lavori.

Più controverso è l'aspetto legato all'apoptosi dei miociti cardiaci durante l'ischemia, fenomeno rappresentato, appunto, dall'espressione della Caspasi3 clivata o attivata. L'indice di correlazione negativo, indica che i processi apoptotici sono maggiormente presenti nelle prime fasi dopo l'occlusione dei vasi e vanno scemando con il passare del tempo.

Il dato non è contraddittorio con quanto affermato sin'ora, anzi, la correlazione inversa con il fattore temporale è del tutto coerente con i processi di rimodellamento tissutale: infatti negli infarti sub acuti, i processi apoptotici vanno scemando a favore della rimozione dei tessuti necrotici ed alla deposizione della componente fibrotica che darà vita al tessuto cicatriziale.

Inoltre, la Caspasi3 correla positivamente e significativamente con tutte e tre le SOD, indice che la maggiore espressione delle SOD, probabilmente indotta da un maggiore stress ossidativo in loco, è correlabile con l'aumento dei processi apoptotici.

L'analisi dei campioni dal punto di vista biomolecolare attraverso RT-PCR non ha mostrato significative differenze tra campioni normali e patologici: il numero dei campioni disponibili era davvero molto esiguo e degli stessi non avevamo informazioni circa il tipo di infarto, ma soltanto che si trattava di tessuti post-ischemici ed appartenevano a pazienti terminali pronti per il trapianto. E' più che plausibile che tali soggetti abbiano subito l'evento ischemico molto tempo addietro e siano sopravvissuti, pur sviluppando una gravissima insufficienza cardiaca. Ovvio che la non uniformità delle condizioni dei soggetti in analisi abbiano contribuito a creare delle differenze che possono sembrare contraddittorie, ma che non lo sono

Limiti dello studio

Nel corso dello studio sono emersi anche dei limiti nell'applicazione di tale tecnica. La valutazione di proteine che rientrano in un normale metabolismo cellulare, può creare problemi di valutazione durante l'analisi

dei microarray tissutali.

Infatti, in questi casi, diversamente da quanto avviene nello studio di marcatori specifici per una determinata neoplasia, in cui le cellule neoplastiche possono o meno esprimere il marcatore in modo netto, nel caso di enzimi e proteine, che sono costitutivamente espresse, è necessario effettuare una valutazione qualitativa e semiquantitativa, piuttosto che una stima quantitativa. Il fatto però, che anche con un'analisi di tipo qualitativo, così come effettuato in tale studio, si possano ottenere ottimi risultati, come si evince dai livelli di significatività statistica raggiunti, è la dimostrazione che la tecnica è ampiamente utilizzabile in vari campi di ricerca e non soltanto nella patologia molecolare.

Prospettive di studio

Gli studi su tessuto cardiaco post ischemico mediante microarray tissutali, non hanno ancora esaurito le informazioni che ci possono fornire e, soprattutto, le indicazioni su come procedere in futuro nello studio della patologia ischemica.

Alcuni dati andranno sicuramente approfonditi: l'apoptosi delle cellule cardiache è da sempre un argomento di grande dibattito. Due linee di pensiero si contrappongono: la prima indica i processi apoptotici come

effetto dell'ischemia, la seconda come parziale causa della patologia cardiaca. Quello che oggi possiamo affermare è che i processi apoptotici sembrano contingentati alle prime ore dopo l'occlusione del vaso che porta all'ischemia, andando affievolendosi dopo le 48 ore. Tale dato, se confermato, sarebbe di notevole importanza. L'approccio

immunoistochimico ha fornito dei dati importanti, ma in futuro vorrei eseguire esperimenti di TUNEL per confrontare e verificare il dato già in nostro possesso.

D'altra parte, sarebbe interessante capire quali pathway di segnali vengano attivati per l'inizio dell'apoptosi. In tal senso è mia intenzione effettuare esperimenti di immunoistochimica per le proteine FAS e FASL, oltre che per la proteina ARC, il principale mediatore dei fenomeni apoptotici a valle del recettore FAS, capace di attivare la via mitocondriale e/o direttamente la Caspasi8 e, quindi, la Caspasi3.

Infine vorrei ampliare le conoscenze e lo studio dello stress ossidativo nel tessuto cardiaco infartuato, attraverso tecniche biochimiche (kit per la quantizzazione degli agenti ossidanti, WB).

Dal punto di vista dell'analisi statistica dei dati un aspetto importante è stato tralasciato per motivi di tempo: la selezione di tessuti provenienti dal centro della zona ischemica, dall'immediata periferia e da

zone distali, potrebbe permettere un'ulteriore stratificazione dei dati in nostro possesso, rilevando alcuni aspetti inediti. In tal senso è necessario effettuare nuove indagini di carattere statistico sulle diverse porzioni tissutali del TMA. Tale ipotesi non è da sottovalutare e rientrerà sicuramente tra le attività da svolgere in un prossimo futuro.

Dedica

Dedico questa tesi a quei figli che, con Cinzia, desiderammo ma forse, non avremo mai, aspettando sempre tempi migliori, per stare dietro alle nostre difficili professioni, alle nostre ambizioni e ai nostri sogni, in questa epoca così complessa e tanto povera di certezze.

Ringraziamenti

In particolar modo ringrazio il Prof. Luigi Maria Terracciano ed il suo staff del Dipartimento di Patologia dell'Università di Basilea che hanno reso possibile la realizzazione di questo studio.

Un grandissimo ringraziamento al professor Fabrizio Gentile, mio tutor nel corso di questo dottorato di ricerca, per la pazienza e la comprensione dimostrate nei miei confronti in più di un'occasione.

Ringrazio inoltre, il professore Guido Maria Grasso, direttore del dipartimento di Scienze per la Salute e coordinatore di questo dottorato di ricerca, per la grande disponibilità dimostrata nei miei confronti nel corso di questi anni.

Bibliografia

1. Adegate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol. Cell. Biochem.* 2004;**261**:187-191.
2. Baker H., (1744), *Phil. Trans.*, 42, 616.
3. Bannister J.V., Bannister W.H. Rotilio G. (1987) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 111-180.
4. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;**271**(5 Pt 1):C1424-37.
5. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004;**555**:589-606.
6. Blanchard E. (1847), *Ann. Sci. nat. Zool*, 8, 271.
7. Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F.Jr, Hallewell R.A., Tainer, J.A. (1992) *Cell* 71, 107-118.
8. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Dec **15**;166(12 Pt 2):S38-43.
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular

diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):840-4.

10. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res.* 2005 Apr 29;96(8):818-22

11. Castellano I. , Di Maro A., Ruocco M.R., Chambery A., Parente A., Di Martino M.T., Parlato G., Masullo M., De Vendittis E. (2006) *Biochimie*

12. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 2001 Aug 3;89(3):279-86.

13. Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH: Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30:2281-2289, 1998

14. Chen, E.P., Bittner, H.B., Davis, R.D., Folz, R.J., and Van Trigt, P. 1996. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation*. **94**:II412-II417.

15. Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc*

Res. 2003;60:635–642.

16. Davies, K.J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **61**:1–31.
17. Davis ME, Cai H, McCann L, Fukai T, Harrison DG. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol.* 2003;284:H1449–1453.
18. de Haan, J.B., et al. 2004. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H₂O₂-mediated cell death. *Free. Radic. Biol. Med.* **36**:53–64.
19. De Vendittis E., Ursby T., Rullo R., Gogliettino M.A., Masullo M., Bocchini,V. (2001), *Eur. J. Biochem.* 268, 1794–1801.
20. Dello Russo A, Rullo R, Nitti G, Masullo M., Bocchini V. *Biochim. Biophys. Acta* 1343, (1997), 23–30.
21. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:506–14.
22. Didion S.P, Kinzenbaw D.A, Schrader L.I and Faraci F.M. Heterozygous CuZn Superoxide Dismutase Deficiency Produces a Vascular Phenotype With Aging *Hypertension* 2006;48:1072-1079;
23. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice.

Circ Res. 2002;91:938–944.

24. Elchuri, et al., S. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life..

Oncogene **24**: 367-380

25. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24: 1367–1373.

26. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 2003 Aug 1;35(3):236-56

27. Fattman CL, Chu CT, Kulich SM, Enghild JJ and Oury TD, Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001), pp. 1198–1207

28. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 1999;65:337–40.

29. Flemming W. (1879), *Virchows Arch.*, 77, I.

30. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):239-49.

31. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002

Aug 1;55(2):239-49.

32. Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;101:2101-2111.
33. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000;105:1631-1639.
34. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griending KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999;85:23-28.
35. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):500-8. Review.
36. Gogliettino M.A., Tanfani F., Sciré A., Ursby T., Adinolfi B.S., Cacciamani T., De Vendittis E. (2004) *Biochemistry* 43, 2199-2208.
37. Griending, K.K., and FitzGerald, G.A. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* **108**:1912-1916.
38. Griending, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86**:494-501.
39. Grieve D.J., Byrne J.A., Cave A. C., and Shah A. M. Role of

Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction.
Heart Lung and Circulation 2004;13:132-138)

40. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho Y-S, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1131-1138.
41. H. Yamada, Y. Yamada, T. Adachi, H. Goto, N. Ogasawara, A. Futenna, M. Kitano, K. Irano and K. Kato, Molecular analysis of extracellular-superoxide dismutase gene associated with high level in serum, *Jpn. J. Hum. Genet.* **40** (1995), pp. 177-184
42. Hannover A. (1840), *Ann. Anat. Physiol, wiss. Med.* (no vol. number), 549.
43. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111-29.
44. Hemnani, T., and Parihar, M.S. 1998. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **42**:440-452.
45. Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., and Floyd, R.A. 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1456-1462.
46. Hiroi, S., Harada, H., Nishi, H., Satoh, M., Nagai, R., and Kimura, A.

(1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 332–339

47. Hirose K., Longo D.L., Oppenheim J.J., Matsushima K. (1993)

FASEB J. 7, 361–368.

48. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect.* 1998 Oct;106 Suppl 5:1219-28.

49. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, et al. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;97:363–8.

50. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001;88:529–35.

51. Ide, T., et al. 1999. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ. Res.* 85:357–363.

52. Kiernan J. A. (2008), *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, Pergamon Press.

53. Kirkman, H.N., and Gaetani, G.F. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:4343–4347.

54. Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., and Gaetani, G.F. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **274**:13908–13914.
55. Konat, G.W. 2003. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J. Biosci.* **28**:57–60.
56. Kumar D and Jugdutt B.I. Apoptosis and oxidants in the heart J Lab Clin Med Volume 142, Number 5 November 2003
57. Lakatta, E.G. 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation.* **107**:490–497.
58. Landmesser U, Merten R, Speikermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation.* 2000;101:2264–2270.
59. Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J. J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., and Matzuk, M. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9782–9787
60. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J*

Physiol 2004;287:R1014-30.

61. Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C. Epstein, C.J. (1995) Nat. Genet. 11, 376-381.

62. Li, et al., Y. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.. *Nat. Genet.* 11: 376-381.

63. Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., and Chan, P. H. (1995) *Nat. Genet.* 11, 376-381

64. Lien YC, Lin SM, Nithipongvanitch R, Oberley TD, Noel T, Zhao Q, et al. Tumor necrosis factor receptor deficiency exacerbated Adriamycin-induced cardiomyocytes apoptosis: an insight into the Fas connection. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 261-269.

65. Liu L, Zhang XJ, Jiang SR, Ding ZN, Ding GX, Huang J, Cheng YL. Heat shock protein 27 regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via reactive oxygen species generation and Akt activation. *Chin Med J (Engl)*. 2007 Dec 20;120(24):2271-7.

66. Lockwood, T.D. 2000. Redox control of protein degradation. *Antioxid. Redox Signal.* 2:851-878.

67. Machida, Y., et al. 2003. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha increases production of hydroxyl radical in murine myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**:H449-H455.
68. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. *Circ Res* 1997;81:137-44.
69. Macmillan-Crow L.A., Cruthirds D.L. (2001) Free Radic. Res. 34, 325-336.
70. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jan;25(1):29-38
71. Mann, D.L., and Spinale, F.G. 1998. Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation.* **98**:1699-1702.
72. Marklund SL, Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222 (1984), pp. 649-655.
73. Marklund SL, Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.* 74 (1984), pp. 1398-1403.
74. Marklund SL, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), pp. 7634-7638.
75. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase. *Methods*

Enzymol. 2002; 349:74–80.

76. McCord J.M., Boyle J.A., Day E.D.Jr, Rizzo L.J., Salin M.L., (1977) Superoxide and Superoxide dismutases, Academic Press, London, 129–138.

77. Mikiko Takikita, Joon-Yong Chung and Stephen M Hewitt. Tissue microarrays enabling high- throughput molecular pathology. *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18:318-325

78. Moudgil R, Menon V, Xu Y, Musat-Marcu S, Kumar D, Jugdutt BI. Postischemic apoptosis and functional recovery after angiotensin II type 1 receptor blockade in isolated working rat hearts. *J Hypertension* 2001;19:1121-9.

79. Mueller CF, Laude K, Mc Nally JS and Harrison DG . Redox mechanism in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 2, 274-278

80. Muller, et al., F. L. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy.. *Free Radic. Biol. Med* **40**: 1993-2004.

81. Muzi P., Bologna M. (1999), *Tecniche di Immunoistochimica, Il Caleidoscopio*

82. Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD, Li RK. Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and

ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H939-H947.

83. Napoli C., Pignalosa O., de Nigris F., Botti C., Rossi L., Mita L., Mansueto G., Somma P., De Rosa G., Sica V. Tissue microarray: un nuovo strumento di ricerca. *Il Patologo Clinico* n.7/8 del 2004 pag 272- 278.

84. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn R C, Otsu K, and Shirasawa T Oxidative Stress Causes Heart Failure with Impaired Mitochondrial Respiration. *The journal of biological chemistry* 2006 vol. 281, no. 44, pp. 33789–33801, November 3,

85. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*. 2001;104:1165–1170.

86. Nordberg, J., and Arner, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1287–1312.

87. Nozik-Grayck E., Suliman H.B., Piantadosi C.A. Extracellular superoxide dismutase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2005). **37** 2466–2471

88. Olli-P. Kallionemi, Urs Wagner, Juha Kononen and Guido Sauter. Tissue Microarray technology for high- throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics*, 2001, Vol. 10, No. 7
89. Ookawara T, Eguchi H, Nishimura M, Kizaki T, Takayama E, Saitoh D, Ohno H, Suzuki K. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Comm.* 2003; 303:914-919.
90. Oury. T.D.,. Chang L.Y.,. Marklund S.L.,. Day B.J and Crapo J.D., Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung, *Lab. Invest* **70** (1994), pp. 889-898.
91. Passerini AG, Polacek DC, Shi C, Francesco NM, Manduchi E, Grant GR, Pritchard WF, Powell S, Chang GY, Stoeckert CJ, Davies PF. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:2482-2487.
92. Pimentel DR, et al. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2001;**89**:453-460.
93. Prof. Simone Beninati, Dr. Alessandro Lentini. "Tecniche Istologiche", dispense per il corso di "Biologia Umana", Università di Roma Tor Vergata,

Facoltà di Scienze MFN, Corso di Laurea Triennale in Biologia Umana.

www.uniroma2.it/didattica/tecnistol/deposito/DISPENSE.doc

94. Proietti L., Sandonà P. B., Longo B., Gulino S., Duscio D. (2002),
Esposizione Occupazionale a Formaldeide in un Servizio di Anatomia
Patologica, *G. Ital. Med. Lav. Erg.*, 24, 1, 32-34.
95. Qin F, Shite J, Mao W, Liang C. Selegiline attenuates cardiac oxidative
stress and apoptosis in heart failure: association with improvement of
cardiac function. *Eur J Pharmacol* 2003;461: 149-58.
96. Quekett J. (1848), *Practical treatise on the use of the microscope*,
London (Bailliere).
97. Rahman, I. 2003. Oxidative stress, chromatin remodeling and
gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J. Biochem.
Mol. Biol.* 36:95-109.
98. Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., and Galis,
Z.S. 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam
cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro.
Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* 98:2572-
2579.
99. Ranvier L. (1875), *Traité technique d'Histologie*, Paris (Savy).
100. Rathore, N., John, S., Kale, M., and Bhatnagar, D. 1998. Lipid

peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol. Res.* **38**:297–303.

101. Reaumur (1750), *Phil. Trans.*, 45, 304.

102. Reaumur R.-A. F. (1742), *Memoire Pour Servir a l’Histoire des Insect*, Vol. 6, Paris (Imprimerie Royale).

103. Remak R. (1854), *Arch. Anat. Path, wiss. Med.*, 99.

104. Ruocco M.R., Arcari P., Castellano I., Masullo M., Raimo G., De Vendittis E. (2004), in “*Biochemistry and Molecular Biology in the Thermophilic Archaeon Sulfolobus solfataricus*”, (Farina B., Faraone Mennella, M.R., Eds.), *Research Signpost, Kerala (India)*, pp 81–103.

105. S.L. Marklund, P. Nilsson, K. Israelsson, I. Schampi, M. Peltonen and K. Asplund, Two variants of extracellular-superoxide dismutase: relationship to cardiovascular risk factors in an unselected middle-aged population, *J. Intern. Med.* **242** (1997), pp. 5–14

106. S.Pileri, M.T.Rivano. *Compendio di immunoistochimica :Principi e metodi applicati alla microscopia ottica*. Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica Università degli Studi di Bologna Labometrics S.p.a.

107. Sabri, A., Hughie, H.H., and Lucchesi, P.A. 2003. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid. Redox Signal.* **5**:731–740.

108. Sawyer, D.B., et al. 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**:379–388.
109. Sawyer, D.B., et al. 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**:379–388.
110. Schafer yTD,. Fattman L M, Choi C.L, Weck A., Watkins K. E, S. C. Depletion of pulmonary EC-SOD after exposure to hyperoxia. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 283:L777–L784; 2002
111. Schocken DD, Arrieta MI, Leaverton PE, Ross EA. Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:301–6.
112. Seddon M, Yee H Looi and Ajay M Shah Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 2007;93;903-907;
113. Sentman, et al., M. L. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **281**: 6904-6909.
114. Shen X, Zheng S, Metreveli N S, and Epstein P N. Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy. *DIABETES*, 2006 VOL. 55, MARCH
115. Sinclair, D.A. 2002. Paradigms and pitfalls of yeast longevity

research. *Mech. Ageing Dev.* **123**:857–867.

116. Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S. (2002), Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids (2002), *American Journal of Pathology*, Vol. 161, 6, December.
117. Stadtman, E.R., and Levine, R.L. 2003. Free radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* **25**:207–218.
118. Stralin P, Kurlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2032–2036.
119. Stralin P, Kurlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2032–2036.
120. Stralin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol.* 2001;281:H1621–H1629.
121. Suematsu, N., et al. 2003. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation.* **107**:1418–1423.

122. Suzuki YJ, Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:345–53.
123. T. Adachi and X.L. Wang, Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism, *FEBS Lett.* **433** (1998), pp. 166–168.
124. T. Adachi, N. Yamazaki, H. Tasaki, T. Toyokawa, K. Yamashita and K. Hirano, Changes in the heparin affinity of extracellular-superoxide dismutase in patients with coronary artery atherosclerosis, *Biol. Pharm. Bull.* **21** (1998), pp. 1090–1093
125. Tarzami ST, Miao W, Mani K, Lopez L, Factor SM, Berman JW, et al. Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. *Circulation* 2003; 108: 2387–2392.
126. Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**:L1005–L1028.
127. Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**:L1005–L1028.
128. Thollon, C., Iliou, J.P., Cambarrat, C., Robin, F., and Vilaine, J.P. 1995. Nature of the cardiomyocyte injury induced by lipid

hydroperoxides. *Cardiovasc. Res.* **30**:648–655.

129. Ursby T., Adinolfi B.S., Al-Karadaghi S., De Vendittis E., Bocchini, V. J. (1999) *Mol. Biol.* **286**, 189–205.

130. Ursini, F., et al. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* **252**:38–53.

131. Valenti, L., Conte, D., Piperno, A., Dongiovanni, P., Fracanzani, A. L., Fraquelli, M., Vergani, A., Gianni, C., Carmagnola, L., and Fargion, S.(2004) *J. Med. Genet.* **41**, 946–950

132. Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol.* In press.

133. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* 1999;**99**:2934–2941

134. von Harsdorf, R., Li, P.F., and Dietz, R. 1999. Signaling pathways in reactive oxygen species- induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* **99**:2934–2941.

135. Wang R, Miura T, Harada N, Kametani R, Shibuya M, Fukagawa Y, et al. Pleiotropic effects of the beta- adrenoceptor blocker carvedilol on calcium regulation during oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **318**: 45-52.

136. Xia, Y., Roman, L.J., Masters, B.S., and Zweier, J.L. 1998. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J. Biol. Chem.* **273**:22635–22639.
137. Xia, Y., Tsai, A.L., Berka, V., and Zweier, J.L. 1998. Superoxide generation from endothelial nitricoxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J. Biol. Chem.* **273**:25804–25808.
138. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK: The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 98:1253–1260, 1996
139. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD

Testi consultati

1. Cardiovascular Pathology

Virmani R., Atkinson J.B., Fenoglio J.J. Vol. 23, Major Problems in Pathology
W.B. Saunders Company, 1991

2. Pathologic Basis of Disease

Robbins and Cotran 7th edition Elsevier, 2005