



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

Espressione dell'isoforma neuronale dell'enzima Ossido Nitrico Sintetasi negli astrociti
del corpo calloso umano

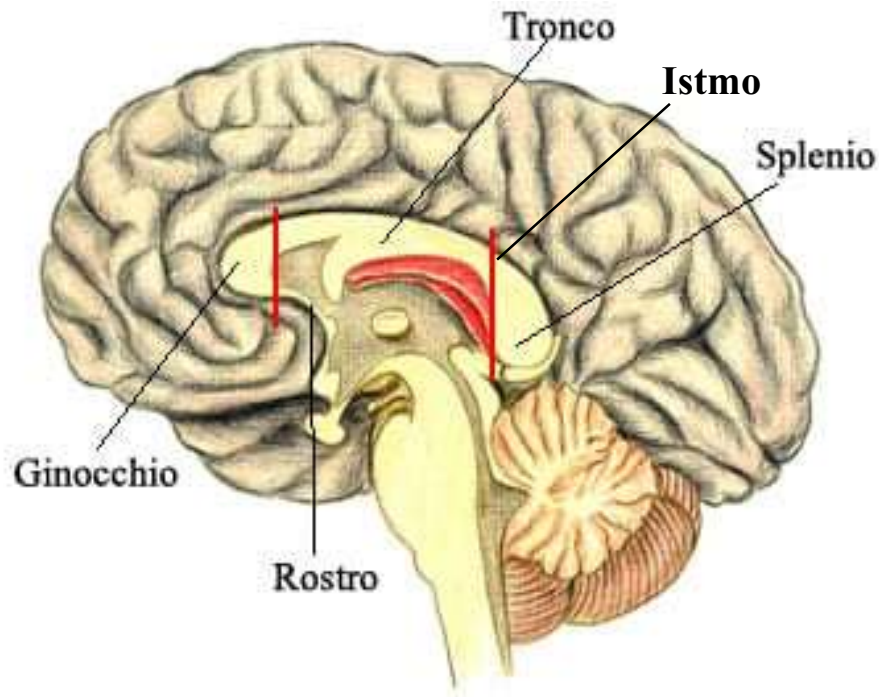
Expression of neuronal isoform of the enzyme Nitric Oxide Synthase in astrocytes of
the human corpus callosum

Tesi di Laurea di:
Chiara Vinciguerra

Docente referente:
Prof.ssa Mara Fabri

Sessione autunnale
Anno Accademico 2022/2023

INTRODUZIONE



- L'**ossido nitrico** (NO) è un neurotrasmettitore gassoso largamente diffuso nel cervello; tra le sue funzioni c'è quella di regolare il flusso sanguigno cerebrale in risposta all'ipossia. La sua sintesi è affidata ad un gruppo di enzimi appartenenti alla famiglia delle **ossido nitrico sintetasi** (NOS), che possono esistere in 3 diverse isoforme: neuronale (nNOS), endoteliale e inducibile.
- In questo studio l'attenzione è posta sull'isoforma neuronale (**nNOS**), che è quella tipica dei neuroni, allo scopo di valutarne l'espressione negli astrociti del corpo calloso (CC) umano e la relazione con la durata dell'ipossia.
- Il **corpo calloso** (CC) è la principale commessura che interconnette i due emisferi cerebrali. È costituito da assoni (mielinizzati e non) e cellule gliali, ed è suddivisibile in 5 regioni caratteristiche: rostro, ginocchio, tronco, istmo e splenio.

INTRODUZIONE



- Il cervello umano ha bisogno continuamente di energia e il **flusso sanguigno cerebrale (CBF)** è di fondamentale importanza per la sua funzione e vitalità, in quanto fornisce ossigeno e nutrienti. Molti neurotrasmettitori giocano un ruolo chiave nella regolazione del CBF, modulando il tono vascolare: l'ossido nitrico (NO) è uno di questi.
- Recentemente, nel CC umano sono stati trovati degli astrociti in grado di produrre **NO**, che grazie alla sua potente attività vasodilatatrice, contribuisce all'aumento del flusso sanguigno verso l'area più attiva, o eventualmente danneggiata, proteggendo i tessuti sottostanti da un eventuale danno ischemico.
- Studi di imaging mostrano anche la possibile evocazione di una risposta BOLD, dovuta probabilmente anche alla presenza degli astrociti, i quali agiscono sulla dilatazione del vaso per far fronte alla maggiore richiesta di O_2 .

MATERIALI E METODI

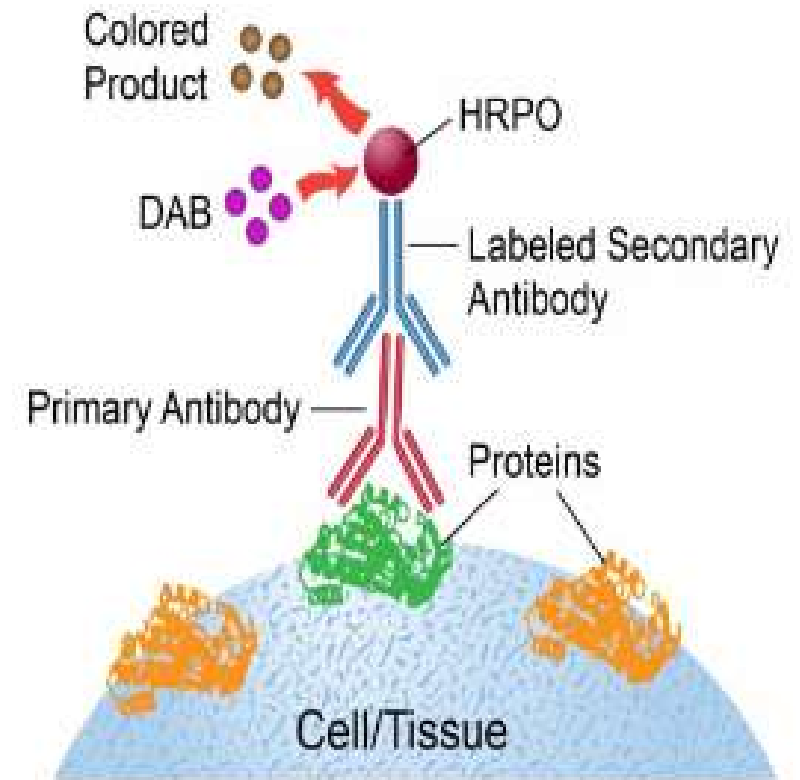
Table 1 Autopsy data from selected cases

Case <i>n</i>	Sex	Age	Cause of death	Agonal time (At)		PMI
				At < 10 min	10 min < At < 24 h	
1	F	28	Hanging	x		24
2	F	38	Traumatic vertebral injury after fall	x		48
3	M	51	Drowning		x	24
4	M	61	Acute myocardial infarction	x		72
5	M	79	Electromechanical dissociation		x	48
6	F	41	Thoraco-abdominal injuries in road traffic accident		x	48
7	F	43	Hemorrhagic shock in road traffic accident		x	48
8	F	40	Traumatic brain injury in road traffic accident		x	96
9	M	54	Overdose		x	48
10	M	57	Plastic bag suffocation		x	48
11	F	39	Inhalation of toxic products of combustion and carbon monoxide poisoning		x	72

- Campioni autoptici di CC di soggetti adulti sono stati trattati con **immunoistochimica** e **immunofluorescenza** utilizzando un anticorpo anti-nNOS ed un anticorpo contro la proteina fibrillare acida gliale (**GFAP**), il marker degli astrociti. In particolare, sono stati presi in considerazione 11 soggetti adulti, deceduti per diverse cause, di cui sono stati registrati: sesso, età al momento della morte, PMI (tempo trascorso dalla morte) e tempo di agonia, classificato come breve (<10 min) oppure medio (compreso tra 10 min e 24 h).
- Durante regolari autopsie, i tessuti di CC sono stati prelevati e preparati per ottenere sezioni istologiche sottili (15 µm), analizzate poi con tecniche di immunoistochimica e immunofluorescenza.

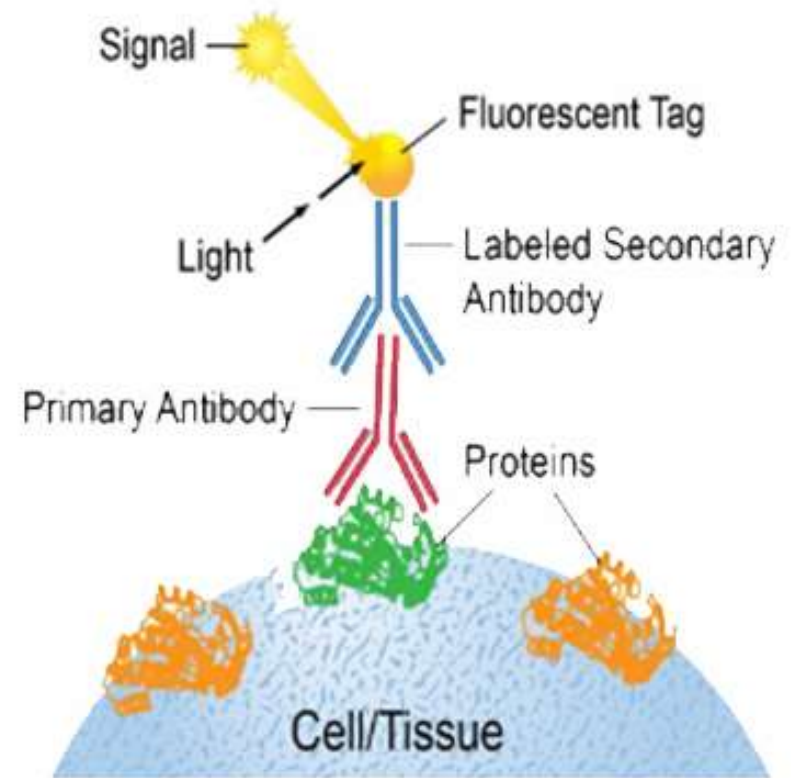
IMMUNOISTOCHIMICA

- Le sezioni di CC precedentemente ottenute sono state rimosse dalla paraffina e re-idratate con xilene ed alcol etilico. Sono state poi incubate:
 - per 30 min con perossido di idrogeno al 3% in metanolo, per inibire l'attività della perossidasi endogena;
 - per 1 ora a temperatura ambiente con la siero albumina bovina (BSA), per bloccare tutte le altre reazioni non specifiche.
- A questo punto, le sezioni sono state incubate a 4°C overnight con i seguenti **anticorpi primari**: anti-nNOS (rabbit, diluito 1/500 in PBS) o anti-GFAP (rabbit, diluito 1/100 in PBS). Dopo un lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate con **anticorpi secondari** goat anti-rabbit legati alla perossidasi, un enzima catalizzatore che in seguito all'aggiunta del suo substrato cromogeno DAB, produce un precipitato marrone.



IMMUNOFLUORESCENZA

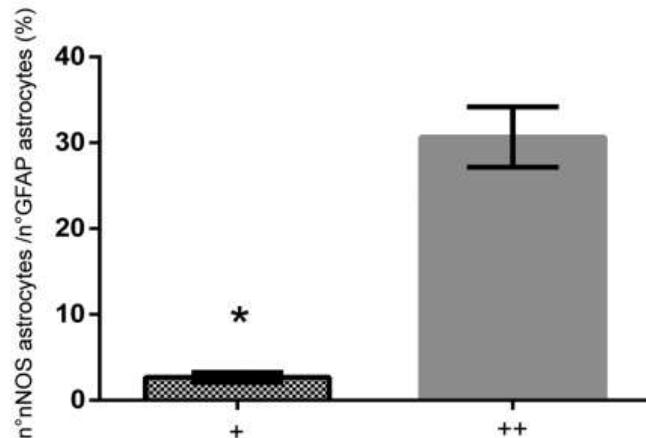
- Anche per l'immunofluorescenza le sezioni ottenute sono state rimosse dalla paraffina, re-idratate con xilene ed alcol etilico e sottoposte a diversi pre-trattamenti per poi essere incubate overnight a 4°C con una miscela di 2 **anticorpi primari**: anti-nNOS (rabbit, diluito 1/500 in PBS) e anti-GFAP (mouse, diluito 1/1000 in PBS).
- Dopo l'incubazione overnight, i vetrini sono stati lavati in PBS e incubati al buio per 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti **anticorpi secondari**: goat anti-rabbit (fluorescenza verde) e goat anti-mouse (fluorescenza rossa). I vetrini sono stati poi colorati con il Sudan Black per bloccare la fluorescenza del tessuto.



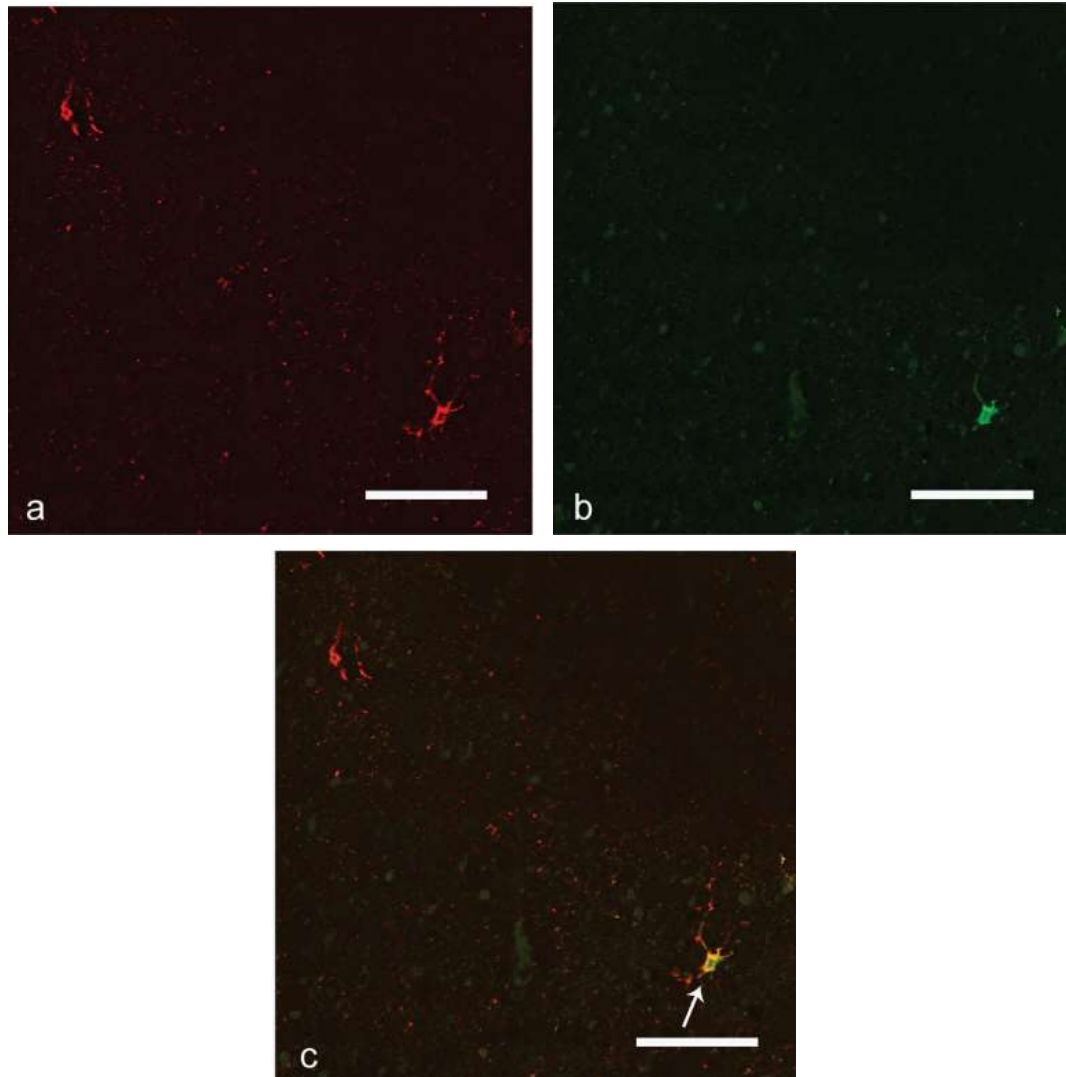
ANALISI DEI DATI

Table 2 Semi-quantitative evaluation of nNOS expression by immunohistochemistry

Case n	Number of nNOS-positive cells	
	At < 10 min	10 min < At < 24 h
1	-	
2	-	
3		++
4	-	
5		++
6		+
7		+
8		+
9		++
10		+
11		++



- **Analisi semi-quantitativa.** Per ciascun soggetto sono state raccolte 10 sezioni di CC, che sono state osservate per analizzare il numero di cellule nNOS positive, indicando con:
 - -, assenza di cellule immunopositive;
 - +, presenza di poche cellule immunopositive;
 - ++, presenza di numerose cellule immunopositive.
- **Analisi quantitativa.** Per ciascun soggetto sono state analizzate 3 sezioni di CC distanti 300 micrometri l'una dall'altra, in cui sono stati considerati 3 campi rettangolari: questi sono stati poi a loro volta divisi in quadrati con superficie di 0.64 mm², in cui è stato effettuato il conteggio degli astroцити n-NOS e GFAP positivi. Il numero totale di astroцити nNOS e GFAP positivi in ciascun rettangolo è stato calcolato moltiplicando i conteggi in ogni quadrato per il numero di quadrati inclusi.
- Il rapporto tra il numero di astroцити nNOS positivi e il numero di astroцити GFAP positivi nei gruppi sperimentali + e ++ era rispettivamente del 3% e del 30%.

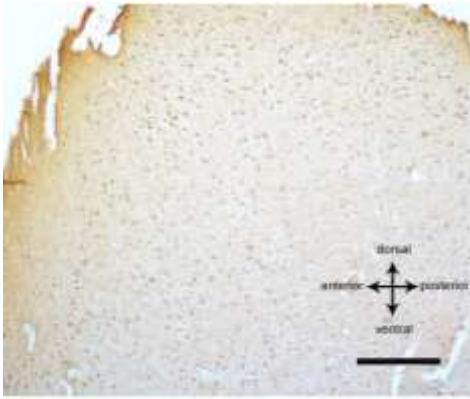


RISULTATI

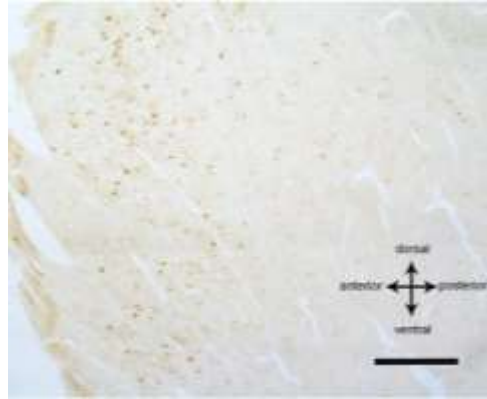
- Immunoistochimica e immunofluorescenza hanno mostrato la presenza nel CC umano di astroцитi positivi al GFAP (fig. a) e di cellule simili agli astroцитi nNOS positive (fig. b). Alcune cellule simili agli astroцитi positive al nNOS sono anche positive al GFAP: questo dimostra che si tratta effettivamente di astroцитi.
- **Relazione con la durata dell'ipossia.** Nei casi di tempi di agonia, e quindi di ipossia, inferiori a 10 minuti, non si osservano cellule nNOS-positive; in casi di ipossia prolungata molti astroцитi risultano immunopositivi al nNOS. Quindi, il numero di astroцитi nNOS positivi è tanto maggiore quanto più lungo è il tempo di agonia (e quindi la durata dell'ipossia).
- Caso particolare del soggetto 10 (morto per soffocamento con busta di plastica): si nota un numero più basso di astroцитi nNOS positivi, infatti mancano i tipici segni patologici di asfissia.

RISULTATI

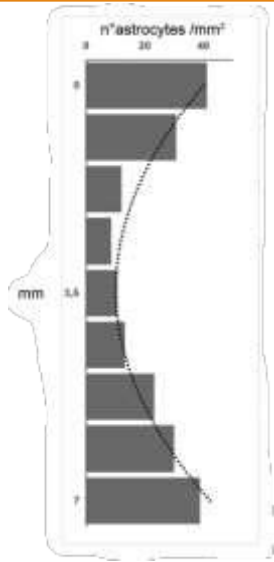
a



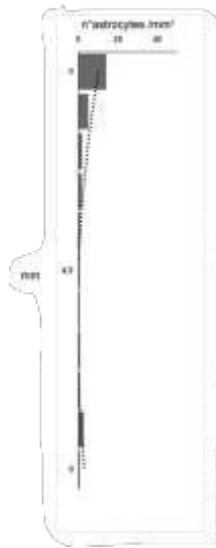
b



c



d



- Gli astrocyti sono distribuiti per l'intero CC (fig. a), mentre gli astrocyti nNOS positivi sono presenti specialmente sul suo confine (fig. b).
- La distribuzione dorso-ventrale degli astrocyti nNOS positivi nei campioni di ciascun gruppo sperimentale mostra il trend di una curva convessa:
 - nel gruppo ++ (fig. c), il loro numero varia da 40 cellule/mm² nella regione più dorsale, diminuisce a 12 nella regione intermedia e poi cresce di nuovo fino a 40 cellule/mm² nella regione più ventrale;
 - nel gruppo + (fig. d), il trend è simile anche se i numeri sono inferiori. Si va da 15 cellule/mm² nella regione dorsale, a 0 nella regione intermedia, per poi tornare a 2-3 cellule/mm² nella regione ventrale.

CONCLUSIONI

- Questo studio ha dimostrato per la prima volta la presenza dell'immunopositività all'isoforma neuronale del NOS negli astrociti del CC umano e la sua probabile **relazione con la durata dell'ipossia**. Infatti, quando l'ipossia è breve gli astrociti del CC non appaiono nNOS positivi, mentre in casi di ipossia prolungata, gli astrociti del CC diventano immunopositivi al nNOS.
- La positività al nNOS degli astrociti localizzati al confine del CC potrebbe rappresentare la pronta risposta che queste cellule mettono in atto per contrastare la mancanza di ossigeno che si verifica durante un episodio di ipossia che precede la morte. L'NO prodotto dagli astrociti, infatti, media la **vasodilatazione** e quindi permette l'aumento del flusso sanguigno verso l'area danneggiata, proteggendo i tessuti sottostanti dal danno ischemico.
- Capire come e dove gli astrociti diventano capaci di esprimere nNOS potrebbe essere importante per comprendere l'attività del cervello sia in condizioni fisiologiche che patologiche. La positività all'nNOS potrebbe quindi essere usata, in ambito forense, come **biomarcatore** della durata dell'ipossia, e quindi la durata dell'agonia e la stima del momento del decesso, soprattutto nei casi in cui non siano presenti ulteriori indizi per capire quando si sia potuto verificare l'evento letale.
- L'espressione di nNOS da parte degli astrociti dopo un'ipossia cerebrale potrebbe essere interpretato come un primo segnale del processo che trasforma gli astrociti in **cellule dal fenotipo neuronale**.

RIASSUNTO ESTESO

- L'ossido nitrico (NO) è un neurotrasmettitore gassoso largamente diffuso nel cervello e tra le sue funzioni c'è quella di regolare il flusso sanguigno cerebrale in risposta all'ipossia. L'NO può essere sintetizzato da 3 diverse isoforme dell'enzima NO sintasi: neuronale (nNOS), tipica dei neuroni, endoteliale e inducibile.
- **Lo scopo di questo studio era quello di valutare l'espressione di nNOS in astrociti del corpo calloso umano (CC) e la sua relazione con la durata dell'ipossia.** Campioni autoptici di CC di soggetti umani adulti sono stati trattati con immunoistochimica e immunofluorescenza utilizzando anticorpi anti-nNOS e la proteina fibrillare acida gliale (GFAP), il marker degli astrociti.
- I risultati hanno dimostrato per la prima volta la presenza di astrociti nNOS-immunopositivi nel CC umano: in particolare, gli astrociti nNOS-positivi erano assenti nei soggetti deceduti dopo una breve ipossia, mentre il loro numero aumenta con il prolungamento dell'ipossia. Questo suggerisce che l'immunopositività degli astrociti al nNOS sembra essere correlata alla durata dell'ipossia e al conseguente danno cerebrale.