



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

**Espressione, indotta da ipossia, di sintetasi neuronale dell'ossido
nitrico negli astrociti del corpo calloso umano**

*Hypoxia-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in
astrocytes of human corpus callosum*

Tesi di laurea di:
Merima Ramadani

Docente referente:
Chiar.ma Prof. Mara Fabri

Sessione Autunnale (Ottobre) 2023
Anno Accademico 2022/2023

Introduzione

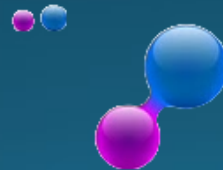
Lo scopo di questo studio era di valutare l'espressione di nNOS in astrociti del corpo calloso umano (CC) e la sua relazione con la durata dell'ipossia.

Il cervello umano necessita di *un elevato fabbisogno energetico*, dunque, il flusso sanguigno cerebrale (CBF) svolge un ruolo chiave nella funzione e la vitalità cerebrale, fornendo nutrienti e ossigeno.

In circostanze particolari, come durante un episodio di asfissia, esiste un fenomeno compensativo volto al mantenimento della circolazione cerebrale senza compromettere gli organi vitali.

Molti neurotrasmettitori svolgono un ruolo chiave nel regolazione del CBF modulando il tono vascolare.
L'ossido nitrico (NO) è uno di questi.

NO è un neurotrasmettitore gassoso largamente diffuso nel cervello; tra le altre funzioni, regola il flusso sanguigno cerebrale in risposta all'ipossia modulando il tono vascolare causando una vasodilatazione.



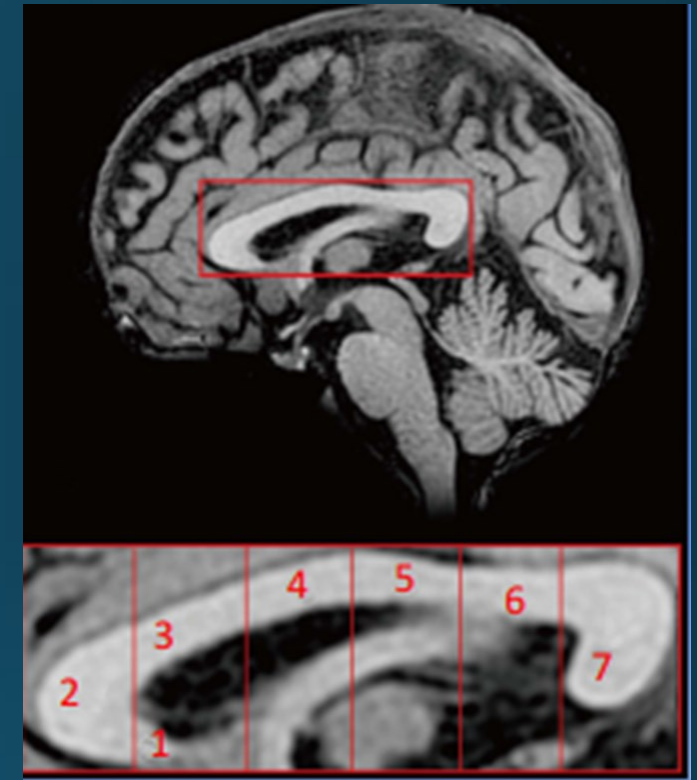
L'NO può essere sintetizzato da tre diverse isoforme dell'enzima NO sintasi: neuronale (nNOS), endoteliale e inducibile.

Introduzione

Corpo calloso

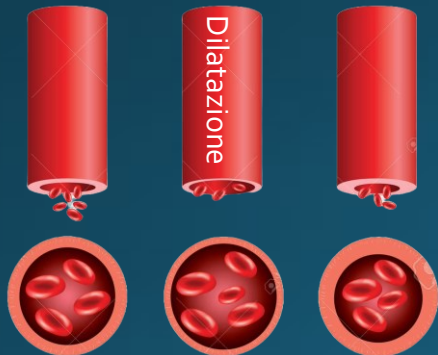


1. Rostro
2. ginocchio
3. Tronco anteriore
4. tronco centrale
5. tronco posteriore
6. istmo
7. splenio



Fabri et al., 2014

Recenti studi di imaging dimostrano la presenza di una risposta vascolare dipendente dal livello di ossigeno nel sangue, BOLD.



La presenza di un segnale BOLD nella sostanza bianca è stata spiegata con il coinvolgimento degli astrociti, che agirebbero sulla dilatazione dei vasi per andare a soddisfare maggiori richieste metaboliche e di ossigeno.



Astrocita

Metodi e materiali

- I. Raccolta e preparazione dei campioni.
- II. Immunoistochimica.

- III. Immunofluorescenza.
- IV. Analisi Semi-quantitativa e quantitativa di astrociti positivi alla nNOS.

Table 1 Autopsy data from selected cases

Case n	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

Raccolta e preparazione dei campioni

1. Sono stati acquisiti campioni post-mortem di corpo calloso umano adulto, senza segni macroscopici di alterazioni neuropatologiche, durante l'autopsia regolare eseguita presso l'Ospedale Regionale delle Marche.

2. Il tessuto è stato fissato per 11 giorni in paraformaldeide tamponata con fosfato al 4% (tampono fosfato, 1 M, pH 7,4) a 4 °C.

3. Inclusione in paraffina.

4. Taglio in sezioni adiacenti spesse 15 μm sul piano sagittale.

5. Le sezioni sono state trasferite su vetrini.

Immunoistochimica



Immunofluorescenza

Procedimento:

Ha lo scopo di dimostrare che le cellule simil-astrocitarie nNOS-positivo erano in realtà astrociti

1. Sezioni deparaffinate e reidratate.

2. Pretrattamento a bagnomaria per 30 minuti a 90°C in citrato di sodio 0,1M (pH 7,2).

3. Sezioni incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con BSA all'1%.

4. Incubazione con miscela di due anticorpi primari: anticorpo policlonale anti-umano nNOS prodotto in coniglio e anticorpo monoclonale anti-GFAP umano prodotto nel topo.

5. Lavaggio in PBS.

6. Incubazione al buio con anticorpi secondari fluorescenti, uno anti-IgG di coniglio (verde) e uno anti-IgG di topo (rosso).

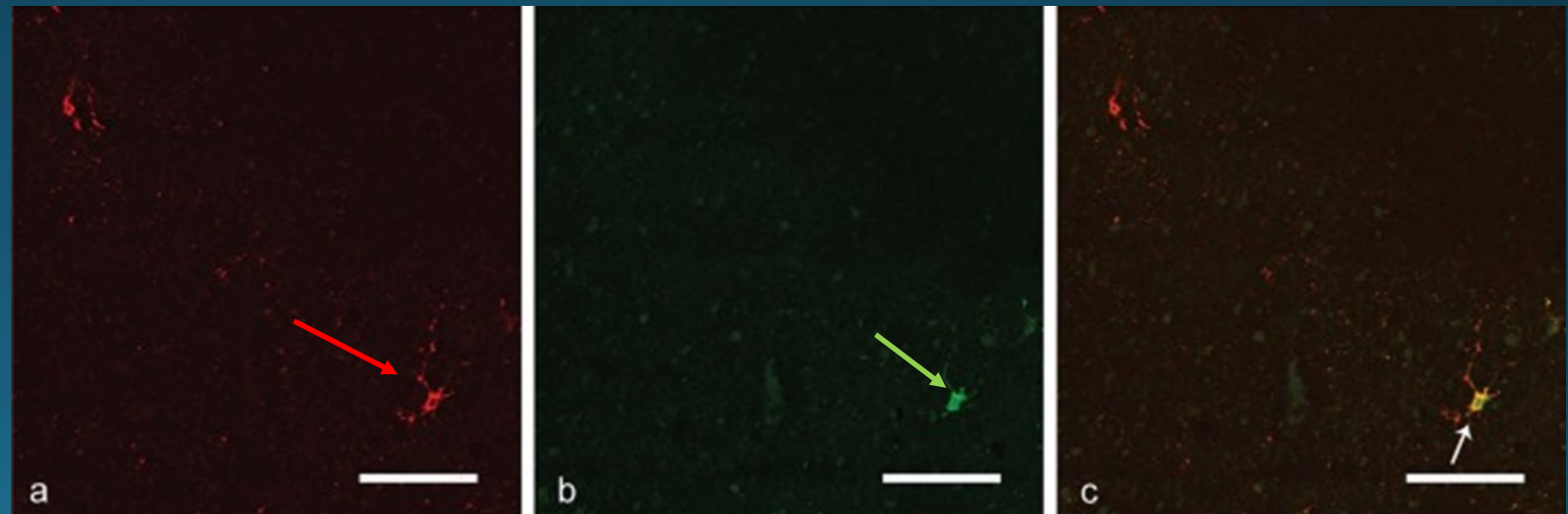
7. Lavaggio in PBS.

8. Colorazione con Sudan Black.

La fluorescenza è stata rilevata con un microscopio confocale dotato di un laser a gas misto Argon e He/Ne.

Figura 1

- Cellula simile agli astrociti GFAP-positivi (rosso);
- Cellula simile agli astrociti nNOS-positiva (verde);
- Immagine unita: la cellula gialla (freccia) cellula nNOS-positiva e GFAP positiva.



Analisi semiquantitative e quantitative degli astrociti positivi per nNOS

Per l'analisi semi-quantitativa sono state raccolte e osservate 10 sezioni scelte a caso da ciascun campione.

Ed è stato effettuato il conteggio degli astrociti nNOS e GFAP positivi

Il numero medio delle cellule marcate è stato calcolato includendo i rettangoli delle tre sezioni di tutti i casi appartenenti allo stesso gruppo sperimentale (+ ; ++).

Effettuata la determinazione % di nNOS positivi rispetto al numero totale di astrociti, il numero totale di astrociti nNOS e GFAP positivi in ogni singolo rettangolo .

I risultati sono stati espressi come:
media \pm deviazione standard (SD)

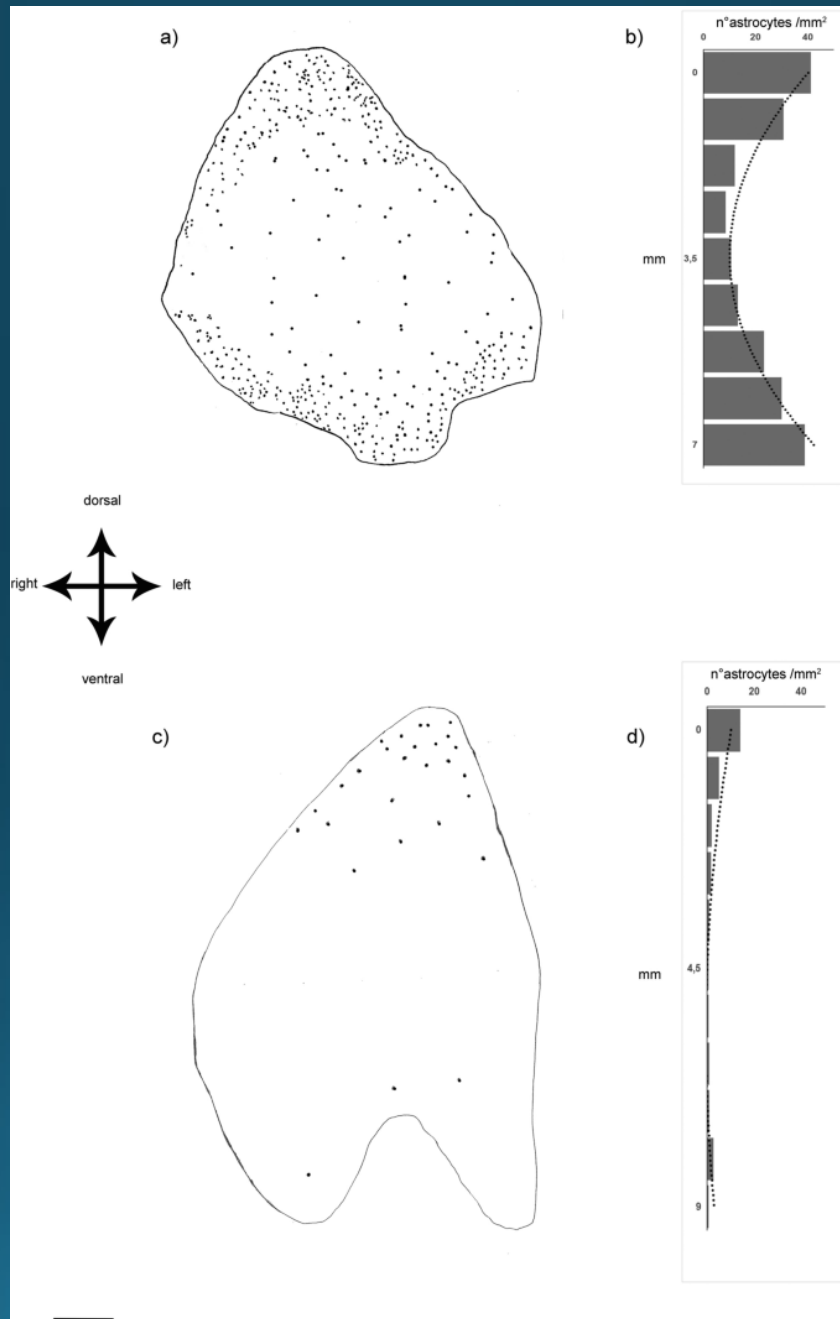
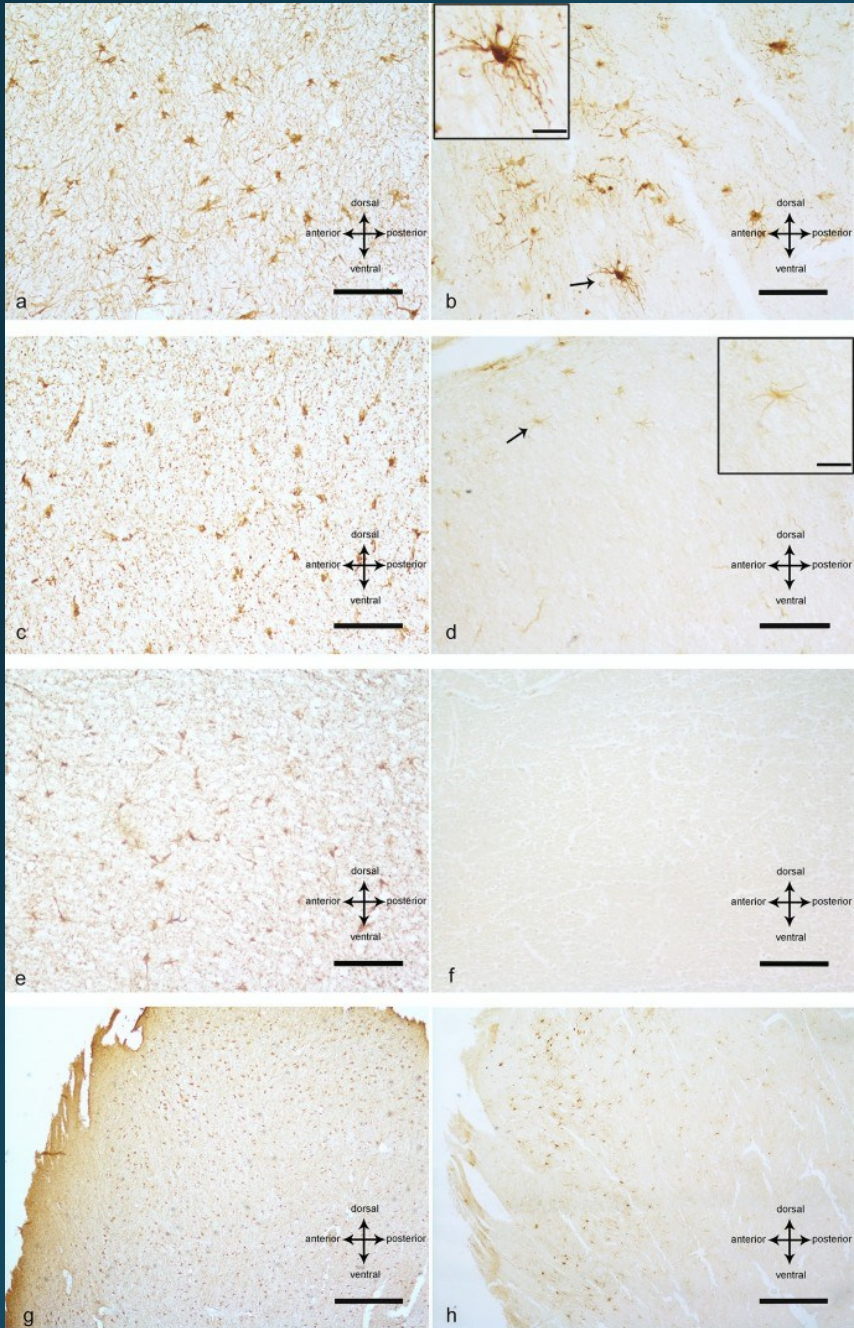
E infine è stata eseguita l'analisi dati con t test a due code

Livello di significatività:
→ basso ($p \leq 0,05$),
→ medio ($p \leq 0,01$)
→ alto ($p \leq 0,001$).

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		++

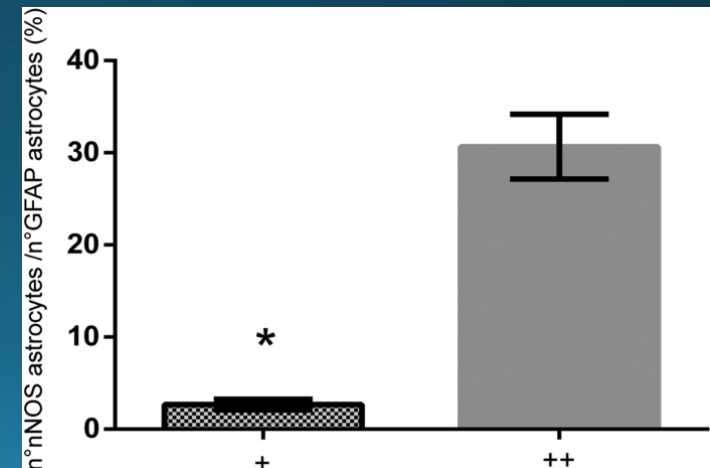
FIGURA 2



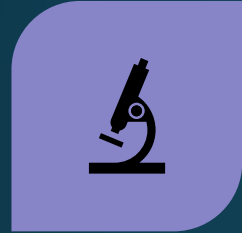
Risultati

FIGURA 3
distribuzione
dorso-ventrale
degli astrociti
positivi per nNOS.

FIGURA 4



Conclusione



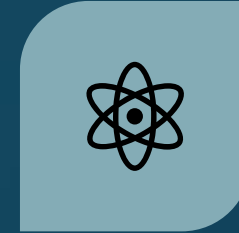
Questo studio preliminare su un piccolo gruppo di casi dimostra per la prima volta che l'immunopositività nNOS è presente negli astrociti del CC e che può essere **correlata alla durata dell'ipossia.**



L'espressione di nNOS da parte degli astrociti in CC può essere una risposta patofisiologica del cervello all'ipossia-ischemia, **per ridurre/prevenire il danno cerebrale.**



Questo innovativo biomarcatore potrebbe essere introdotto nell'attività forense, soprattutto nei casi in cui non sono presenti altri indizi utili per **rilevare quando** potrebbe essere accaduto l'evento letale.



Un'ipotesi che spieghi la presenza di nNOS negli astrociti, è che in particolari condizioni, a partire da un danno cerebrale può essere innescata una proliferazione degli astrociti e una loro **trasformazione in neuroni**, con lo scopo di sostituire le cellule danneggiate.



Quindi l'espressione di nNOS negli astrociti dopo un'ipossia cerebrale potrebbe essere interpretata come un **segno precoce** del processo in corso che trasforma gli astrociti in cellule con fenotipo neuronale.

Riassunto

L'ossido nitrico (NO) è un neurotrasmettitore gassoso largamente diffuso nel cervello; tra le altre funzioni, regola il flusso sanguigno cerebrale in risposta all'ipossia.

L'NO può essere sintetizzato da tre diverse isoforme dell'enzima NO sintasi: neuronale (nNOS), tipico dei neuroni, endoteliale e inducibile.

Lo scopo di questo studio era di valutare l'espressione di nNOS in astrociti del corpo calloso umano (CC) e la sua relazione con la durata dell'ipossia.

Sono stati processati campioni autoptici di corpo calloso provenienti da soggetti umani adulti con tecniche di immunoistochimica e immunofluorescenza utilizzando anticorpi anti-nNOS e anti-GFAP, il marcatore degli astrociti.

I risultati hanno dimostrato per la prima volta la presenza di astrociti immunopositivi al nNOS nel CC umano. In particolare, gli astrociti immunopositivi erano assenti nei soggetti deceduti dopo un breve periodo di ipossia; il loro numero e *l'intensità della marcatura*, tuttavia, aumentavano con il prolungamento dell'ipossia.

L'immunopositività degli astrociti CC sembra quindi correlata alla durata dell'ipossia e al conseguente danno cerebrale.