## ISTITUZIONI DI PATOLOGIA GENERALE E IMMUNOLOGIA

# APPUNTI revisionati dal docente LEZIONI 2018/19 (docente prof. Adriano Angelucci) PRIMA PARTE

# 1. INTRODUZIONE: IL CONCETTO DI SALUTE E SUSCETTIBILITA' ALLA MALATTIA

Gli organismi viventi sono sistemi complessi che rispondono alle leggi della fisica e della chimica e che mantengono le loro funzioni nel tempo in maniera attiva. Lo stato in cui tali funzioni viene mantenuto in maniera ottimale si chiama "stato di benessere" o "salute". Al contrario un deficit nello stato di benessere può determinare una malattia. Lo stato di benessere è sempre determinato da un equilibrio dinamico dovuto dall'interazione tra organismo e l'ambiente. Secondo questa definizione lo stato di benessere non può essere definito in maniera oggettiva ma deve considerare nel tempo l'evoluzione delle condizioni sia dell'organismo che dell'ambiente in cui si trova [Esempio: Lo stato di benessere di un bambino non può essere giudicato sugli stessi parametri usati per una persona anziana, così come non si possono usare gli stessi parametri per giudicare lo stato di benessere di un abitante di una metropoli americana e i membri di una tribù amazzonica).

A livello biologico ci sono alcune caratteristiche generali del sistema organismo/ambiente che possono spiegare perchè ci ammaliamo:

1-Fragilità dei sistemi biologici: La complessità fa aumentare anche il numero di potenziali difetti mentre il trade-off (compromesso) adottato dai sistemi biologici favorisce la specializzazione di alcune funzioni a discapito di altre. Ad esempio, nella teoria del pleiotropismo antagonista (vedi teorie sull'invecchiamento) si indica che le strategie che favoriscono la crescita veloce e la riproduzione possono rendere meno longevo l'organismo.

2-Variazione dell'ambiente: una variazione repentina dell'ambiente in cui si è adattati può rendere difficile il mantenimento dello stato di salute. Le cause fisiche e chimiche spesso rientrano in questa categoria e possono essere interpretate come variazioni "estreme" dell'ambiente in cui si vive.

3-Mutazioni e variabilità: L'evoluzione biologica è basata sul sottile equilibrio tra tassi di mutazione e integrità somatica. Modulando l'efficienza dei sistemi di riparo e il polimorfismo i diversi organismi possono aumentare la propria capacità di adattamento all'ambiente ma possono anche incorrere più frequentemente a perdita di integrità somatica. I tumori possono essere considerati come l'esito di questa perdita di integrità somatica.

La patologia cerca di spiegare i motivi dei segni e dei sintomi che si manifestano nei pazienti, fornendo una base razionale alla pratica clinica e alla terapia. Lo studio della patologia è suddiviso in patologia generale e patologia sistematica. La prima riguarda le comuni reazioni di cellule e tessuti in risposta a stimoli nocivi o a difetti ereditari; la seconda studia le alterazioni e i meccanismi responsabili di malattie di organi specifici. La malattia è un processo che evolve nel tempo, possiede un esordio, uno sviluppo e una remissione spesso con guarigione completa. Il processo di evoluzione di una malattia si definisce **patogenesi**. Una malattia che non possiede un processo che evolve nel tempo si parla di stato morboso (stato cronico stazionario). Nello studio della patologia si usano termini specifici, eccone alcuni:

# **DIZIONARIO INIZIALE**

- · EZIOLOGIA: (Gr. aita=causa) lo studio della causa
- PATOGENESI: (Gr. pathos=malattia) i processi patologici che accompagnano lo sviluppo della malattia
- REMISSIONE: diminuzione dei sintomi della malattia
- · PROGRESSIONE: inasprimento della gravità della malattia
- INCIDENZA: numero di NUOVI casi in un periodo di tempo
- · PREVALENZA: numero TOTALE di casi in un periodo di tempo
- MORBILITÀ: 1-condizione di malattia 2-rapporto numerico della persone malate su quelle sane in una comunità

La patologia si può occupare della salute degli organismi viventi a diversi livelli di complessità: -Patologia ambientale: si occupa del benessere al più alto grado di complessità (ecosistema) -Epidemiologia: si occupa delle comunità, delle statistiche di una malattia per una determinata popolazione -Medicina clinica: occupa del benessere di un singolo individuo -Fisiopatologia: Studia le malattie livello di apparati е organi -Istopatologia: si occupa dell'aspetto patologico dei tessuti -Patologia stato meccanismi cellulare: si occupa dello dei di omeostasi cellulari. I quattro aspetti di un processo patologico sono: la causa (eziologia), i meccanismi biochimici e molecolari del suo sviluppo (patogenesi), le alterazioni strutturali indotte (cambiamenti morfologici) e le conseguenze di tali cambiamenti (manifestazioni cliniche).

#### 2. LA PATOLOGIA CELLULARE: GLI ADATTAMENTI

La patologia cellulare è fondamentale in quanto le cellule costituiscono l'unità funzionale di tutti gli organismi, quindi è facile pensare che molte patologie derivano dalla disfunzione di un'unica cellula. Disfunzioni di una singola cellula, o poche cellule, sono per lo più asintomatiche a livello sistemico, l'unica eccezione è rappresentata dal sistema nervoso, in cui la perdita funzionale di poche cellule può avere conseguenze fisiopatologiche rilevanti. Sebbene la cellula possa essere considerata l'unità funzionale dell'organismo, nella maggioranza delle risposte ad un evento dannoso sono molti i tipi cellulari ad intervenire e a organizzarsi tra oro. Quindi è importante considerare la risposta cellulare in un contesto più generale di comunicazione paracrina ed endocrina. Nel riparo di una ferita, iperplasia, atrofia, metaplasia sono regolate in maniera coordinata tramite segnalazione di fattori di crescita rilasciati sequenzialmente nell'ambiente extracellulare.



Un evento dannoso proveniente dall'ambiente esterno provoca una perturbazione significativa nell'omeostasi cellulare (stato stazionario della cellula in cui vengono mantenute strutture e funzioni) che causa uno stress, un processo di risposta ad un danno che permette la stabilizzazione e la protezione della struttura e della funzione delle macromolecole. Il danno cellulare può essere tale da condurre a un punto di criticità che a seconda dell'intensità e della durata del danno, determina un cambiamento di stato della cellula. Nelle condizioni peggiori le cellule muoiono, o arrivano a uno stato di senescenza in cui vengono perse tutte la funzionalità. In alternativa la cellula attua processi di adattamento di guadagno o di perdita, che sono risposte funzionali e strutturali reversibili ai cambiamenti ambientali, durante le quali la cellula raggiunge nuovi stati stazionari (l'omeostasi non si può raggiungere in un unico modo). Anche un adattamento di guadagno può essere considerato momentaneo poiché quando viene risolto l'evento causale, la cellula riprende la sua normale funzionalità a più basso "dispendio energetico".



Ogni cellula del nostro corpo è evolutivamente programmata per rispondere (tramite adattamento o morte cellulare) a differenti tipologie di cause di danno. Per quelle più comuni la cellula possiede un meccanismo più efficiente rispetto alle cause di danno più rare o di intensità estrema. Tra le possibili fonti di danno più comuni troviamo:

-Ipossia: La riduzione dei livelli di ossigeno per un'ischemia o per un distruzione della rete vascolare locale, è una potenziale causa di necrosi. L'ossigeno infatti è fondamentale per produrre ATP tramite fosforilazione ossidativa, e per mantenere l'equilibrio osmotico della membrana cellulare (pompe Na+/K+). La morte per necrosi se la riduzione di ossigeno è l'unica fonte di danno può essere evitata tramite alcuni meccanismi di adattamento della cellula: in primis l'ATP può essere prodotto anche in assenza di ossigeno utilizzando il glucosio proveniente dai fluidi del corpo e dall'idrolisi del glicogeno intracellulare. Se l'apporto di ossigeno alle cellule è ridotto, come accade nell'ischemia, la fosforilazione ossidativa cessa, ma si innesca un programma di risposta basato sull'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 (hypoxia induced-factor 1) che permette l'utilizzo di glicogeno per la glicolisi anaerobia. Come conseguenza la riserve di glicogeno si esauriscono rapidamente, la glicolisi inoltre ha come effetto l'accumulo di acido lattico e fosfati inorganici, il pH intracellulare si riduce e questo determina una riduzione dell'attività di molti enzimi, se non la denaturazione delle proteine. Quest'ultimo aspetto è alla base della realizzazione di necrosi coagulativa a seguito di ischemia.

-Danno mitocondriale: I mitocondri forniscono l'energia necessaria producendo ATP, quindi sono elementi essenziali in tutti i processi di danno e morte cellulare. I mitocondri possono essere danneggiati dall'aumento di Ca<sup>2+</sup>, dalle specie reattive dell'ossigeno (prodotte da una fosforilazione ossidativa anomale) e dalla mancanza di ossigeno. Le mutazioni nei geni mitocondriali sono la causa di alcune malattie ereditarie. Il danno al mitocondrio può innescare direttamente l'apoptosi tramite la via intrinseca.

-Afflusso di calcio: Gli ioni Ca++ sono importanti mediatori nella lesione cellulare. Si è potuto verificare che l'assenza di Ca++ in modelli sperimentali determina una maggiore protezione delle cellule da varie tipologie di danno. L'accumulo di calcio intracellulare provoca lesioni mediante diversi meccanismi come ad esempio l'apoptosi indotta da attivazione diretta della caspasi o tramite aumento della permeabilità mitocondriale.

-Accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e radicali liberi : Le specie chimiche reattive possono essere prodotte in varie situazioni : 1) come prodotti collaterali delle reazioni di ossidoriduzione che avvengono

durante i normali processi metabolici; 2) dall'assorbimento dell'energia radiante; 3) nello scoppio ossidativo che si verifica in neutrofili attivati durante l'infiammazione; 4) dal catabolismo di sostanze chimiche esogene o farmaci; 5) da metalli di transizione che accettano o donano elettroni liberi durante le reazioni intercellulari e catalizzano la formazione dei ROS; 6) dall'ossido nitrico che viene usato dalle cellule come messaggero ma che può fungere esso stesso da specie reattiva o generare ROS.

-Difetti dell'integrità di membrana: la presenza di radicali liberi, diminuzione della sintesi o aumento della degradazione di fosfolipidi, anomalie citoscheletriche sono tra le cause che possono determinare il danneggiamento della membrana plasmatica. Una ovvia conseguenza di tale danneggiamento può essere la l'aumento della permeabilità.

La risposta adattativa può consistere in un aumento del volume delle cellule (ipertrofia) e della loro attività funzionale, in un incremento del loro numero (iperplasia), in una diminuzione delle dimensioni e dell'attività metabolica (atrofia) o in un cambiamento nel fenotipo cellulare (metaplasia). L'Iperplasia o l'ipertrofia rappresentano un adattamento di guadagno che riguarda la singola cellula, ma ha un effetto spesso macroscopico, funzionalmente rilevante a livello di organo, denominato comunque ipertrofia. -L'IPERTROFIA può essere dovuta sia a cause fisiologiche che patologiche. Nel primo caso dipende da un aumento delle richieste funzionali o da una stimolazione indotta da ormoni e fattori della crescita. L'esempio più eclatante è quello delle cellule muscolari che possiedono una capacità di divisione limitata, sono relativamente stabili nel tempo, e rispondono ad un aumento della domanda metabolica soprattutto mediante l'ipertrofia. Lo stimolo più comune per l'ipertrofia del muscolo è l'aumento del carico da lavoro: i muscoli ipertrofici sono determinati da un ingrossamento delle singole fibre muscolari in risposta a un aumento della domanda; le cellule muscolari incrementano la sintesi di proteine con conseguente aumento del numero dei miofilamenti. Un altro esempio lo ritroviamo nell'ingrossamento dell'utero durante la gravidanza. Questo è indotto dagli ormoni estrogeni che agiscono sulla muscolatura liscia mediante recettori estrogenici che aumentano la sintesi delle proteine nel muscolo liscio con conseguente aumento delle dimensioni cellulari. Nel secondo caso, ipertrofia patologica, abbiamo la cosiddetta risposta compensatoria in cui avviene un aumento di volume per compensare la parte mancante. Ad esempio quando uno dei due reni non funziona bene a causa di una malattia, il secondo rene aumenta di volume per svolgere la funzione mancante. Oppure, ad esempio, quando deve essere rimosso un pezzo di fegato, es: per rimuovere un tumore, la restante ghiandola aumenta di volume tramite ipertrofia e compensa la parte mancante. Un'altra situazione la possiamo ritrovare nel cuore che a causa di malattie cardiovascolari può essere costretto a dover pompare più sangue e va incontro a ipertrofia compensatoria. Il Papilloma virus è in grado di infettare gli epiteli facendo crescere a dismisura le cellule che ha infettato. *Meccanismi ipertrofia*: Un importante fattore di crescita è l'IGF-1 che può indurre ipertrofia muscolare senza stimolo meccanico (è una sostanza legata al doping). Le sostanze dopanti possono aumentare la prestazione sportiva agendo sul muscolo e aumentandone la funzionalità, oppure sulla capacità di trasporto dell'O<sub>2</sub> ai tessuti (eritropoietina). L'IGF-1 attraverso un meccanismo di segnalazione intracellulare (senza stimolo meccanico) permette la formazione di fibre più grandi contenenti proteine necessarie alla contrazione della fibra. Le proteine a funzione contrattile (actina e miosina, costituiscono il 70% delle proteine totali) poi sono necessarie proteine con funzione regolatoria (tropomiosina e troponina), proteine strutturali (actnine, desmina, nebulina) e proteine enzimatiche che sostengono il metabolismo muscolare (mioglobina, catalasi, citocromi, perossidasi, enzimi glicolitici, enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici). L'aumento dei mitocondri e delle loro dimensioni in queste cellule permette la produzione di più ATP. L'aumento muscolare può avvenire direttamente tramite segnalazione da parte di IGF-1, oppure indirettamente tramite la diminuzione dei seganli inibitori. Un freno importante è la miostatina che non permette la crescita della fibra. La miostatina è prodotta soprattutto dalle cellule del muscolo scheletrico e la sua attività viene regolata da un inibitore chiamato follistatina.

*Le distrofie muscolari* sono una categoria di patologie in cui c'è una perdita della funzionalità muscolare. Si assiste spesso alla pseudo-ipertrofia cioè il muscolo appare più grande anche se le fibre muscolari sono spesso

atrofiche. Questo è possibile poiché tra le fibre muscolari avviene la deposizione di matrice extracellulare che causa un aumento di volume a livello macroscopico, quindi il rigonfiamento non è dovuto a una reale ipertrofia delle cellule muscolari, ma da un accumulo di matrice extracellulare tra le fibre. In questo caso le fibre muscolari vanno incontro ad atrofia poiché avviene una mutazione a carico della distrofina, un gene del cromosoma X. La distrofina è un segnalatore che forma una catena a livello intra-citoplasmatico ed è fondamentale per mantenere la funzionalità muscolare. In assenza di questo segnalatore il muscolo non viene più attivato e va incontro ad uno stadio atrofico.

L'IPERPLASIA può realizzarsi solo se il tessuto contiene cellule in grado di dividersi, e determina l'aumento di volume di un tessuto/organo tramite aumento dell numero di cellule. Anche questa può derivare sia da cause fisiologiche che patologiche. Nel primo caso l'iperplasia è prodotta dall'azione di ormoni o di fattori di crescita e può avvenire sia quando esiste la necessità di aumentare la capacità funzionale di organi, sia quando è necessario un incremento compensativo in seguito ad un danno. Un esempio di iperplasia fisiologica lo possiamo ritrovare nel fegato che è una ghiandola non solo in grado di accrescere il volume delle proprie cellule (ipertrofia), ma è anche in grado di rigenerarle: le cellule rimanenti, ad esempio dopo un trapianto, proliferano in modo tale che l'organo recuperi celermente le sue dimensioni originali. Un altro esempio di iperplasia ormonale è la proliferazione dell'epitelio ghiandolare del seno femminile durante la pubertà e la gravidanza.

L'iperplasia è un adattamento usato dall'endometrio nel ciclo ormonale. L'endometrio, su segnalazione degli ormoni sessuali prodotti dall'ovaio, diventa iperplastico per prepararsi ad accogliere ciclicamente, nella donna, la cellula uovo. All'inizio del ciclo la donna produce estrogeni andando incontro ad una fase follicolare e successivamente ad una fase lutea, dal 14° giorno in poi, producendo progesterone. Il rapporto dei livelli di questi due ormoni determina quando le cellule devono proliferare, situazione di iperplasia, e quando avviene il fenomeno di regressione ( crollo dei livelli di progesterone). Quindi da una situazione di iperplasia, andiamo incontro ad una situazione di atrofia. Il ciclo si conclude con le mestruazioni in cui si perde l'endometrio ipertrofico.

Nel **secondo caso**, iperplasia patologica, è provocata dall'azione di ormoni presenti in concentrazioni eccessive, oppure da fattori di crescita che agiscono sulle cellule bersaglio. L'iperplasia endometriale può essere un esempio anche di iperplasia patologica: l'equilibrio tra estrogeno e progesterone risulta alterato e si verifica un'iperplasia delle ghiandole endometriali che è di solito causa di un eccessivo sanguinamento mestruale. L'iperplasia prostatica benigna è un altro esempio frequente di iperplasia patologica indotta come risposta a stimoli ormonali androgenici. L'iperplasia cessa se viene a mancare la stimolazione ormonale. Tale fenomeno viene usato nella terapia dei tumori ormono-dipendenti (mammella, prostata), adottando una strategia di blocco della segnalazione ormonale sulle cellule tumorali. *Meccanismi dell'iperplasia*: L'aumento del numero di cellule di un tessuto può essere sostenuto da una maggiore attività delle cellule staminali, oppure dalla stimolazione diretta tramite fattori di crescita di cellule a grado di differenziamento

-ATROFIA: E' definita come una riduzione delle dimensioni di un organo o di un tessuto a causa di una diminuzione delle dimensioni delle cellule. Invece, quando si vuole indicare una diminuzione del numero di cellule si usa il termine aplasia. L'atrofia può essere fisiologica o patologica. Le condizioni fisiologiche che possono indurre un adattamento di perdita sono: invecchiamento dell'individuo, disuso, menopausa, senescenza. Per la legge di parsimonia l'organismo non mantiene più le strutture e le funzioni che non utilizza, e la modalità con cui diminuisce le richieste energetiche è l'atrofia. L'atrofia fisiologica è comune durante il normale sviluppo: alcune strutture embrionali vanno incontro ad atrofia durante lo sviluppo fetale, oppure la diminuzione delle dimensioni dell'utero che avviene subito dopo il parto è un'altra forma di atrofia fisiologica. L'atrofia patologica dipende da diverse cause e può essere locale o generalizzata. Le comuni cause di atrofia sono:

-Diminuzione del carico da lavoro (atrofia da disuso): Quando un osso subisce una frattura e viene immobilizzato con il gesso si verifica un'atrofia del muscolo scheletrico: le fibre muscolari si sgonfiano. Questa

diminuzione può essere reversibile se si riprende l'attività, oppure meno reversibile se il disuso è prolungato e causa dell'apoptosi che determina una riduzione in numero e in volume delle fibre muscolari.

- -Perdita di innervazione: Il funzionamento e il metabolismo dei muscoli dipende da una continua trasmissione nervosa. Un danno dei nervi conduce all'atrofia delle fibre muscolari.
- -Diminuzione del flusso sanguigno: La riduzione del flusso sanguigno verso un tessuto a causa di una parziale occlusione arteriosa provoca atrofia. Il cervello può subire atrofia per aterosclerosi e parziale occlusione delle arterie afferenti.
- -Nutrimento inadeguato: Una grave malnutrizione in termini di proteine e calorie è associata all'uso delle proteine del muscolo scheletrico come fonte di energia e provoca atrofia muscolare.
- -Difetti di stimolazione endocrina: molti tessuti che rispondono agli ormoni dipendono dalla stimolazione ormonale per le loro normali funzionalità. La riduzione della stimolazione estrogenica dopo la menopausa determina atrofia fisiologica dell'endometrio, dell'epitelio vaginale e delle mammelle. Gli epiteli svolgono una funzione importantissima per difenderci dalle infezioni. Un epitelio atrofico è secco, non c'è più il rilascio del liquido di protezione e va incontro a molte più infezione: diventa terreno fertile per la crescita di batteri e funghi. Effetti: Incontinenza, sanguinamento. A livello vaginale troviamo un tessuto che è riccamente vascolarizzato, nella menopausa c'è un minore apporto di sangue che contribuisce all'atrofia.

-Pressione: La compressione di un tessuto per un certo periodo di tempo può provocare atrofia. Quando ci sono delle cisti o dei tumori, nel tessuto circostante avviene una compressione meccanica che fa sì che quel tessuto risponde con un adattamento atrofico: diminuisce di volume. Questo è il motivo per cui le cisti, anche se benigne devono essere asportate: generano pressione ai tessuti circostanti e li portano in atrofia. Meccanismi dell'atrofia: L'atrofia è causata da una diminuzione della sintesi delle proteine e da un aumento della degradazione proteica nelle cellule. Questa avviene principalmente attraverso la via ubiquitina-proteasoma (le ubiquitina ligasi marcano le proteine per la degradazione nei proteosomi). In un muscolo atrofico le cellule contengono meno mitocondri, miofilamenti e una ridotta quantità di RER. In ogni caso si può raggiungere un nuovo equilibrio se si riescono a bilanciare le esigenze metaboliche della cellula, ma se l'atrofia continua poiché prodotta da una riduzione graduale del flusso sanguigno, le cellule risulteranno irreversibilmente danneggiate e muoiono, spesso per apoptosi. L'atrofia è associata al fenomeno dell'autofagia.

AUTOFAGIA: E' un processo fisiologico attraverso cui, in carenza di nutrienti e macromolecole, la cellula cerca di recuperarli dal proprio interno: Capacità di auto-digerirsi. Il processo standard prevede la formazione di un autofagosoma molto grande: una vescicola a doppia membrana che può contenere anche un mitocondrio. L'autofagosoma, tramite l'associazione di numerose proteine e la presenza delle LC3 che vengono tagliate, si va a fondere con il lisosoma, ricco di enzimi digestivi e forma un fagolisosoma che degrada le molecole. Avviene così un adattamento di perdita: sacrifico parte del mio patrimonio per sopravvivere. (Sperimentalmente per verificare se è in atto un'autofagia nella cellula si controlla la formazione di LC3 a più basso peso molecolare (proteina tagliata). Questo appena descritto è la macro-autofagia e non è l'unico meccanismo di adattamento di perdita che ricicla materia, ma è quello più ingente che permette di riciclare interi organelli cellulari. Nell'organismo sono presenti altri adattamenti di perdita come: la *micro-autofagia*, in cui il materiale non passa attraverso la formazione di un autofagosoma, ma viene veicolato direttamente all'interno del lisosoma, oppure l'autofagia mediata da chaperonine che vanno a riconoscere le proteine denaturate e le veicolano all'interno del lisosoma. La macro-autofagia è l'evento più drastico e si verifica quando la cellula è in grossa carenza di nutrienti. La micro-autofagia o l'azione delle chaperonine avvengono normalmente all'interno della cellula per la continua rigenerazione delle molecole. Gli eventi che inducono un adattamento autofagico sono: mancanza di nutrienti (glucosio), di fattori di crescita, di amminoacidi.

**N.B.:** l'autofagia può anticipare l'atrofia. Questa non è un processo di morte, ma di adattamento. Solo se l'adattamento non va a buon fine si può innescare il processo di atrofia ed eventualmente quello di morte. L'autofagia è incompatibile con l'apoptosi, o c'è l'una o c'è l'altra, almeno nella risposta iniziale. Solo se le cellule non riescono a sopravvivere a l'evento dannoso allora vanno incontro al suicidio, all'apoptosi. Un aspetto che spesso si incontra in istopatologia sono dei granuli di lipopuscina nelle cellule nello stato chiamato atrofia bruna. Questi granuli sono dei residui di autofagosomi che contengono i lipidi.

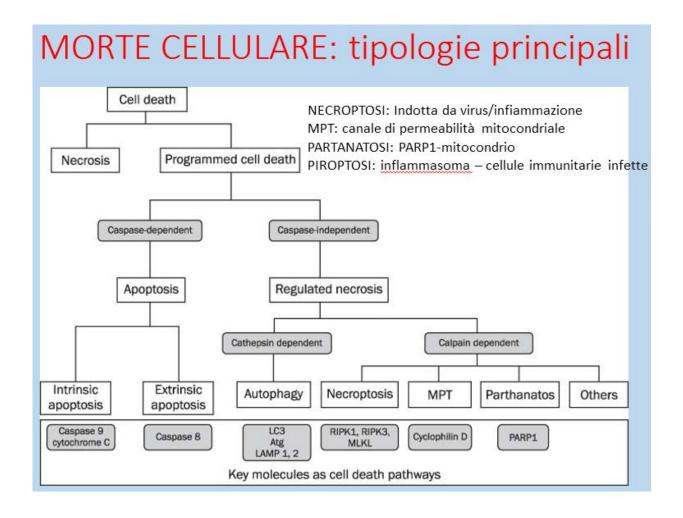
-METAPLASIA: È un'alterazione reversibile in cui un tipo di cellula differenziata è sostituita da un altro tipo di cellula. Spesso costituisce una risposta adattativa in cui un tipo di cellula che è sensibile ad un particolare stress è sostituito da un altro tipo di cellula maggiormente in grado di resistere alle sfavorevoli condizioni ambientali. Sono spesso adattamenti ad un evento cronico. La componente staminale al di sotto del tessuto interessato forma nuove cellule: riprogrammazione delle cellule staminali. Le cellule che devono essere sostituite muoiono e le cellule staminali riproducono nuove cellule differenziate diverse dalle prime. In generale la metaplasia avviene nelle zone di confine spesso tra stomaco/esofago, stomaco/duodeno, poiché in quelle zone sono presenti cellule staminali multipotenti. La metaplasia rappresenta un adattamento che ha una rilevanza patologica maggiore rispetto all'iperplasia o all'ipertrofia, in quanto è un adattamento di perdita di funzione spesso associato ad una modifica profonda dell'architettura del tessuto. A esempio nelle vie respiratorie abbiamo un epitelio muciparo colonnare che ha la caratteristica di rilasciare muco all'esterno. Successivamente ad un'irritazione cronica, come nel caso dei fumatori, questo viene sostituito da epitelio piatto squamoso che ha la caratteristica di essere più resistente all'infiammazione cronica, ma che non riesce più a produrre muco e quindi a difendersi dalle infezioni. Si ha un adattamento di perdita: motivo per cui i fumatori sono più suscettibili all'infezioni delle vie respiratorie. Queste trasformazioni possono essere temporaneamente vantaggiose, ma a lungo andare creano svantaggio. Altro esempio lo ritroviamo nell'epitelio transizionale della vescica che ha la caratteristica di dilatarsi, ma a causa di un'infezione cronica può diventare un epitelio squamoso che riuscirà ad esser più resistente verso l'infezione cronica, ma non ha più la capacità di dilatarsi. La metaplasia è una trasformazione che riguarda soprattutto gli epiteli, ma può colpire anche altri tessuti connettivi come ad esempio il tessuto osseo che in conseguenza a ferite importante in associazioni a cicatrici, può sorgere in posti dove prima non era presente. La Miosite ossificante provoca un'infiammazione del muscolo che porta alla formazione di tessuto osseo (condizione estrema): Il danno non può essere riparato facilmente e viene deposto osso al posto del muscolo. Anche la metaplasia è largamente reversibile quindi il fumatore che smette di fumare torna ad avere i bronchi con epitelio colonnare. Una metaplasia inversa che va dal tipo squamoso al tipo colonnare può verificarsi nell'esofago di Barrett. Meccanismo della metaplasia: La metaplasia non è prodotta da un alterazione nel fenotipo di una particolare cellula già differenziata, ma dipende da una riprogrammazione di cellule staminali che si trovano al di sotto del tessuto che deve essere modificato, oppure di cellule mesenchimali indifferenziate presenti nel tessuto connettivo. La differenziazione è provocata da segnali generati da citochine, fattori di crescita e componenti della matrice extracellulare presenti nel microambiente cellulare.

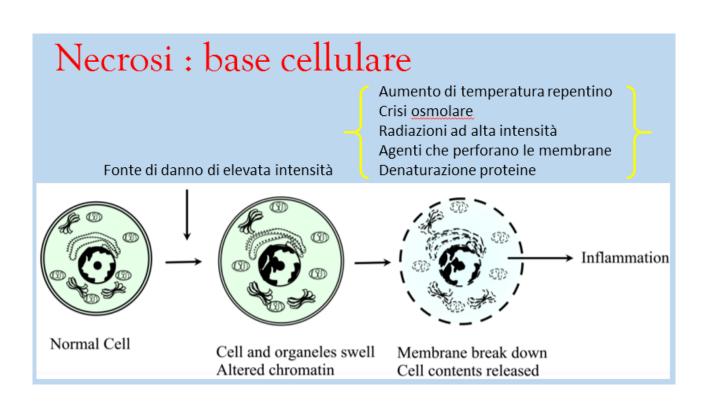
-DISPLASIA: È un fenomeno molto evidente a livello istologico e rappresenta un cambiamento disordinato delle dimensioni e della morfologia delle cellule, principalmente a carico dei tessuti epiteliali. Al contrario della metaplasia in cui ancora si può riconoscere la struttura stratificata dell'epitelio, nella displasia non si conserva la normale organizzazione e le cellule crescono in maniera disordinata. La displasia è un evento abbastanza frequente, non necessariamente irreversibile, che si verifica in conseguenza con gli altri adattamenti: iperplasia, ipertrofia, metaplasia e soprattutto quando siamo in presenza di agenti dannosi persistenti come agenti patogeni o infettivi (virus). Un esempio importante è la displasia della cervice uterina, che può evolvere in neoplasia. Questo esempio ci permette di descrivere il continuum delle trasformazioni istologiche dell'epitelio che inizialmente è di tipo squamoso fino ad arrivare all'estremo opposto: un carcinoma, trasformazione di tipo invasivo. Le singole cellule che fanno parte di questo tessuto perdono l'originale organizzazione spaziale: non c'è più la distinzione tra cellule basali tondeggianti e cellule apicali differenziate

poiché diventano tutte uguali, di morfologia irregolare e con un rapporto nucleo citoplasma molto più alto. Quello che avviene è un mancato differenziamento cellulare verso l'originale tessuto istologico ed un aumento delle cellule proliferanti e delle dimensioni del nucleo. Per verificare la displasia della cervice uterina si utilizza un test poco invasivo (pap test) che permette di raccogliere un campione di cellule epiteliali, fare un vetrino colorarle ed analizzarle. Se la maggior parte delle cellule sono poco colorate in rosso con nuclei molto piccoli possiamo affermare che non è in atto nessuna displasia, invece se le cellule sono colorate in blu intenso e il rapporto nucleo citoplasma cambia in maniera molto evidente, è presente un carcinoma. Oggi esiste un vaccino efficace per prevenire il tumore della cervice, che protegge dall'infezione di alcuni ceppi di papillomavirus che sono la prima causa di tumore della cervice.

#### 3. PATOLOGIA CELLULARE: MORTE

I principali meccanismi che portano alla morte cellulare sono anche responsabili di molte patologie. Si ha morte cellulare quando le cellule sottoposte a danni di grande intensità o durata non riescono ad adattarsi. Il danno può progredire fino a superare il punto di criticità, in questo caso la morte cellulare costituisce una degli esiti possibili. L'autofagia ad esempio, è un meccanismo di difesa e risposta al danno dando la possibilità alla cellula di sopravvivere, però quando la causa del danno permane nel tempo l'autofagia può indurre il suicidio della cellula che avviene secondo una morte programmata caspasi indipendente. Quando si parla di morte programmata si intende la realizzazione di un programma genetico volto ad eliminare la cellula procurando meno danni possibili all'organismo. La morte programmata si può realizzare con diverse modalità, tra cui la meglio conosciuta e forse la più utilizzata e l'apoptosi. Quando sono coinvolte le caspasi, una famiglia di enzimi, normalmente si parla di apoptosi, altrimenti entrano in gioco effettori diversi. La morte della cellula può realizzarsi anche senza l'attivazione di un programma definito, e in questo caso parliamo di necrosi. Il concetto di base per evidenziare questi due tipi di morte e che una (apoptosi) è fisiologica e programmata, l'altra (necrosi) è un evento patologico non è programmato a livello genetico, non prevedibile e associato ad un danno di alta intensità. Nella necrosi di solito avviene un rigonfiamento della cellula e la rottura delle membrane. Quest'ultimo evento è quello caratterizzante in quanto fa perdere l'integrità della cellula, con rilascio del contenuto citoplasmatico che passa nello spazio extracellulare e provoca una reazione infiammatoria. La necrosi può essere provocata da una variazione repentina della temperatura, da una crisi osmolare (perdita dell'equilibrio ionico), da agenti che perforano le membrane (a volte anche usati a livello biologico come difesa: alcune proteine si inseriscono all'interno della membrana del microrganismo patogeno per poterla rompere), o a causa della denaturazione delle proteine (In questo caso la cellula può solo andare incontro a necrosi in quanto non ha più gli enzimi necessari per dare inizio ad un programma di apoptosi, o al mantenimento delle funzionalità di base).

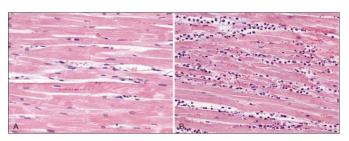




APOPTOSI	NECROSI
Riguarda una singola cellula	Riguarda un gruppo di cellule
E' regolata da un programma genetico	Evento imprevedibile, non geneticamente regolato
Fenotipo:	Fenotipo:
-Diminuzione del volume	-Aumento del volume
-Si creano estroflessioni della membrana.	-La membrana si disgrega
Non avviene la rottura della membrana	Avviene la rottura della membrana
-Condensazione del nucleo	-Distruzione del nucleo
E' un processo programmato relativamente lento	Negli effetti iniziali è un processo molto rapido
Non induce infiammazione	Associata ad un processo infiammatorio

**NECROSI**: La necrosi solitamente non è un evento puntiforme, non riguarda una sola cellula, ma più cellule limitrofe ed ha conseguenze a livello tissutale. L'aspetto morfologico della necrosi è il risultato della denaturazione di proteine intracellulari e della digestione enzimatica della cellula danneggiata in modo letale. Gli enzimi che digeriscono la cellula necrotica provengono dai lisosomi delle medesime cellule morenti e dai lisosomi dei leucociti che partecipano alla reazione infiammatoria

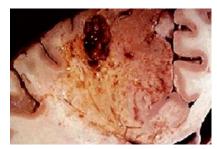
-La necrosi coagulativa: è una forma di necrosi in cui l'architettura dei tessuti morti viene preservata. I tessuti interessati presentano una consistenza compatta. Le cellule necrotiche, alla fine, sono rimosse per fagocitosi dei leucociti richiamati dal circolo sanguigno. Questo tipo di necrosi avviene quando c'è una repentina denaturazione delle proteine che tendono a precipitare (motivi di temperatura, pH, salinità). In laboratorio può essere anche indotta per fissare il tessuto in un determinato punto sperimentale: si denaturano le proteine così che la cellula muore istantaneamente. In vivo è peculiare dell'ipossia che, collegata ad un abbassamento del pH del tessuto, porta alla denaturazione delle proteine e quindi a una necrosi coagulativa.



Nel momento in cui c'è un infarto del miocardio e si fa un autopsia per osservare istologicamente il cuore, si potrà osservare il mantenimento della struttura di fibre muscolari ma queste sono necrotiche come si può evidenziare dall'assenza dei nuclei. Questo è l'esempio di una necrosi coagulativa: i nuclei non si vedono quasi più, si perdono e vengono degradati; le cellule, inoltre, appaiono più colorate grazie all'aumento di

**A) Miocardio normale, B) cellule del miocardio prive di nucleo** appaiono più colorate grazie all'aumento di eosinofilia, attribuite in parte alla perdita dell'RNA citoplasmatico (si lega al colorante basofilo blu, ematossilina) e in parte alle proteine citoplasmatiche denaturate (si legano al colorante esosinofilo rosso, eosina). Le cellule morte possono essere sostituite da aggregati di fosfolipidi detti figure mieliniche provenienti dalle membrane cellulari danneggiate. Questi fosfolipidi sono poi ulteriormente degradati ad acidi grassi e la loro calcificazione produce saponi di calcio: Le cellule morte alla fine possono risultare calcificate.

-Necrosi liquefattiva: è una forma di necrosi in cui avviene la distruzione del tessuto con accumulo di cellule infiammatorie: il tessuto perde l'integrità, diventa liquido (pus), ricco di agenti infettivi e soprattutto di cellule del sistema immunitario. Nell'immagine è mostrato l'esempio di necrosi liquefattiva: Nel tessuto cerebrale è visibile un ascesso: una zona infiammata circoscritta da una parete di matrice extracellulare. All'interno non riusciamo più a riconoscere il tessuto originario che è stato sostituito completamente dalle cellule del sistema immunitario e



dell'agente infettivo. Il fatto che l'infezione è circoscritta è un adattamento in modo tale da non danneggiare il resto del tessuto.

-Necrosi secondaria: Avviene quando i detriti dell'apoptosi non vengono correttamente eliminati alla fine del processo: mancato completamento del processo apoptotico, perchè i residui apoptotici non vengono fagocitati dai macrofagi. Da apoptosi si passa a necrosi, che in questo caso viene detta secondaria. Il riconoscimento dei corpi apoptotici avviene tramite molecole di riconoscimento presenti sulla loro membrana.

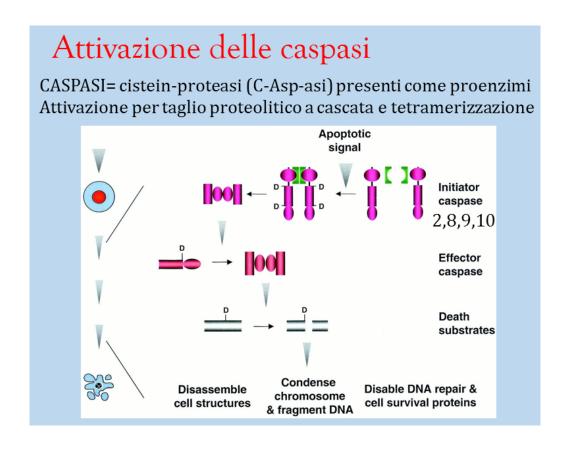
APOPTOSI: Sebbene la modalità di morte siano molteplici faremo l'esempio dell'apoptosi che è quella maggiormente conosciuta e a livello fisiologico più rilevante. L'apoptosi è una via di morte cellulare programmata, inoffensiva per il reso del tessuto, rigorosamente controllata, in cui le cellule destinate a morire attivano enzimi già presenti nel citoplasma come proenzimi, e che sono in grado di degradare il DNA, le proteine nucleari e quelle citoplasmatiche. L'apoptosi è un meccanismo presente solo negli organismi pluricellulari, in quelli unicellulari, non avviene. L'apoptosi è un evento continuamente applicato sia nell'adulto sia durante lo sviluppo. Serve per eliminare le cellule ridondanti, invecchiate, potenzialmente dannose e per il rimodellamento dei tessuti durante tutta la crescita. E' un processo importante nelle seguenti situazioni fisiologiche:

- -Distruzione di cellule durante l'embriogenesi: Per la formazione dell'arto di un embrione o per la separazione della dita della mano è necessaria una morte programmata, regolata con estrema precisione, che permette la morte solo delle cellule soprannumerarie senza danneggiare i tessuti e le altre cellule circostanti. -L'involuzione di tessuti dipendenti da ormoni in seguito a deprivazione ormonale: come accade nella eliminazione delle cellule endometriali al termine del ciclo mestruale, nella regressione delle ghiandole castrazione. mammarie ogob lo svezzamento е nell'atrofia prostatica dopo la -La perdita di cellule in popolazioni transitoriamente proliferanti: come accade a termine di una risposta immunitaria in cui le popolazioni monoclonali di leucociti andati incontro a proliferazione devono essere eliminati.
- **-L'eliminazione di linfociti auto-reattivi potenzialmente nocivi**: ha anche un ruolo fondamentale nella maturazione del sistema immunitario, negli organi linfoidi centrali, midollo osseo e timo, dove i linfociti autoimmuni vengono eliminati per apoptosi prima di lasciare gli organi linfoidi (fenomeno della selezione negativa nella tolleranza centrale)
- -L'adattamento dei tessuti in risposta ad un danno: la cellula possiede un certo grado di adattabilità, nel momento in cui questa soglia viene superata è preferibile che la cellula vada incontro ad un processo apoptotico, soprattutto quando è presente un danno irreparabile che se mantenuto tale potrebbe diffondere e causare danni anche a livello dell'organismo. Se pensiamo al DNA un danno associato a mutazione potrebbe propagarsi nelle cellule figlie e determinare un deficit funzionale oppure l'insorgenza di un tumore.

L'apoptosi è rilevante anche a scopi laboratoriali: se ad esempio sto studiando un farmaco antitumorale è bene che questo agisca a livello di morte programmata delle cellule tumorali proliferanti, suggerendo l'attivazione di un meccanismo molecolare paragonabile ad un tallone d'Achille del tumore. Per capire se l'apoptosi è stata indotta correttamente posso analizzare, tramite corse elettroforetica, le modificazioni della cromatina nella cellula. Normalmente il DNA genomico di una cellula sana genera una banda ad alto peso molecolare, se invece è in atto un programma apoptotico si forma una scala di DNA: la cellula taglia il DNA ogni 180 coppie di basi. Questo avviene perché all'interno del un DNA genomico potrebbe essere presente anche del DNA virale e che potenzialmente potrebbe essere ancora patogeno. Affinché la cellula che deve suicidarsi non crei danno e non vada incontro a necrosi secondaria, è importante la presenza di macrofagi, cellule ubiquitarie presenti in tutto il corpo che sono in grado di digerire i corpi apoptotici. Queste cellule del sistema immunitario sono così importanti a livello fisiologico che sono presenti numerose vie di segnalazione per permettere il riconoscimento della cellula apoptotica. Alcuni di questi segnali sono: la fosfatidil-serina che si posiziona nel versante esterno della membrana plasmatica della cellula (in generale è sempre presente nel versante interno della membrana plasmatica), la lisofosfatilil-colina e l'esposizione di carboidrati anomali che solitamente non sono presenti all'esterno della membrana. Sulla membrana plasmatica ritroviamo, inoltre, delle proteine:

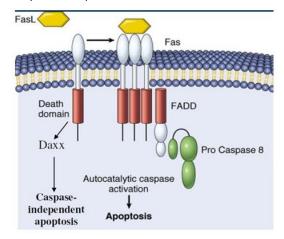
opsonine, fattori solubili che tendono a legarsi sulla membrana dei corpi apoptotici e facilitano il riconoscimento da parte del macrofago. la opsonizzazione è un meccanismo generale che viene adottato spesso dal sistema immunitario e che consiste nel rivestire l'agente da fagocitare con molecole che ne facilitano il riconoscimento da parte dei macrofagi.

Meccanismi di apoptosi: L'apoptosi è determinata dall'attivazione di enzimi denominati caspasi. Le prime fasi del processo sono quelle di iniziazione del segnale a cui segue l'esecuzione a cascata. Ci saranno quindi caspasi iniziatrici (a monte) e caspasi esecutrici (a valle). Le caspasi sono già presenti sotto forma di proenzimi (enzimi in forma inattiva) nel citoplasma, ma hanno bisogno di essere divise in due porzioni e poi formare un tetramero. Le caspasi acquisiscono l'attività proteolitica solo quando sono in forma tetramerica. Le caspasi iniziatrici hanno bisogno di un segnale extracellulare esogeno (esterno) o endogeno (interno), per avviare il primo taglio proteolitico. Il processo di apoptosi può essere suddiviso in una fase iniziale, durante la quale le caspasi iniziatrici (2-8-9-10) diventano cataliticamente attive e percepiscono il segnale di inizio del processo apoptotico grazie alla presenza di un dominio di regolazione, e una fase di esecuzione, durante la quale le caspasi effettrici avviano la degradazione dei componenti cellulari fondamentali. Le caspasi esecutrici non hanno un dominio di regolazione in quanto vengono attivate con un processo a cascata.



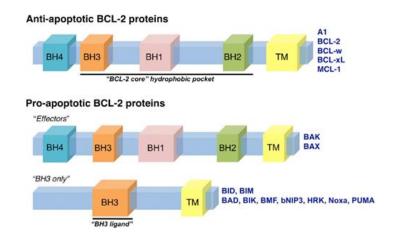
-Via estrinseca: Questa via viene attivata a partire dai recettori di morte presenti sulla membrana plasmatica su diverse cellule. I recettori di morte sono componenti della famiglia del TNFR (recettore per il tumor necrosis factor, TNF), normalmente espressi su tutte le cellule del nostro corpo in forma monomerica (inattiva), contengono un dominio citoplasmatico implicato nelle interazioni proteina-proteina denominato dominio di

morte. In presenza del ligando si forma un trimero che porta vicini i domini intra-citoplasmatici e dopo l'intervento di proteine adattatrici permettono il legame legare e l'attivazione delle caspasi iniziatrici, in particolare della caspasi 8. I recettori di morte meglio conosciuti sono i TNFR di tipo 1 e una proteina omologa chiamata Fas. Il ligando di Fas è chiamato Fas-ligando (FasL) ed è espresso dalle cellule del sistema immunitario (linfociti T, cellule NK ed altri tessuti) che lo sfruttano per indurre la morte delle cellule bersaglio. Quando una cellula bersaglio, ad esempio infettata da virus patogeno, deve essere indotta a morire per apoptosi, il FasL si lega al recettore Fas della cellula bersaglio, si uniscono 3 o più

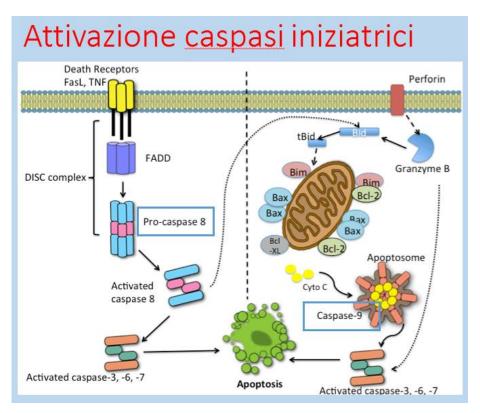


molecole di Fas e i loro domini di morte citoplasmatici formano un sito di legame per una proteina adattatrice FADD. Questa a sua volta contiene un dominio di legame attraverso cui si lega alla forma inattiva di caspasi 8 che si attiva in modo autocatalitico grazie all'avvicinamento di più procaspasi 8. Gli eventi successivi culminano nell'attivazione delle caspasi esecutrici. Questa via di segnalazione può essere inibita dalla presenza della proteina FLIP che permette la non attivazione della caspasi 8. Alcuni virus producono un omologo di FLIP (v-FLIP) che permette loro di proteggersi dal sistema immunitario (Herpes virus).

-Via intrinseca: È la via mitocondriale a rappresentare il meccanismo di apoptosi principale in tutte le cellule dei mammiferi. Il mitocondrio può essere usato dalla cellula come sensore di stress; infatti esso è il cuore energetico della cellula e il suo malfunzionamento compromette la sopravvivenza della stessa. A livello evolutivo si è formato un meccanismo che mantiene sotto controllo l'integrità mitocondriale. La via endogena è avviata da un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna con conseguente liberazione di molecole che inducono la morte. Tra le proteine rilasciate nel citoplasma dal mitocondrio il citocromo c va a formare un complesso chiamato apoptosoma che insieme alla caspasi 9 iniziatrice avvia il programma di morte cellulare. La liberazione di proteine mitocondriali che favoriscono l'apoptosi è strettamente controllata dalla famiglia di proteine BCL2. Questa prende il nome dall'omonimo oncogene, è una proteina espressa ad alto livello nei tumori ed è anti-apoptotica. Alti livelli di BCL2 impediscono l'apoptosi endogena regolando la permeabilità di membrana e il rilascio di citocromo c. Esistono oltre 20 componenti nella famiglia delle BCL2, che si possono classificare in tre gruppi in base alla loro funzione. \*Antiapoptotiche: (BCL2, BCL-XL, MCL1) Quando vengono espresse l'apoptosi viene repressa. Queste proteine risiedono nelle membrane mitocondriali esterne, nel citosol e nelle membrane del RE. Mantengono impermeabile la membrana mitocondriale esterna impedendo la dispersione di citocromo c. \*Proapoptotiche: (BAX, BAK) Quando vengono espresse favoriscono l'apoptosi. Formano degli oligomeri nella membrana mitocondriale esterna e favoriscono la permeabilità della membrana. Tra le pro-apototiche ci sono i membri che condividono un solo dominio di omologia (BH3-only) che fungono da modulatori più che da effettori sulla permeabilità mitocondriale.



Non necessariamente il danno deve essere mitocondriale per far sì che si attivi la via intrinseca, ma essere la vie effettrice di altre condizioni d stress cellulare, come può attivarsi anche in presenza della via estrinseca. Quindi la vi a intrinseca può essere considerata come la modalità centrale per attivare/rinforzare il segnale apoptotico.



**Apoptosi patologica:** L'apoptosi elimina le cellule che sono state danneggiate in modo irreparabile senza scatenare una reazione dell'ospite, limitando quindi il danno tissutale collaterale. Ma l'apoptosi è anche alla base della perdita di cellule in tutta una serie di eventi patologici:

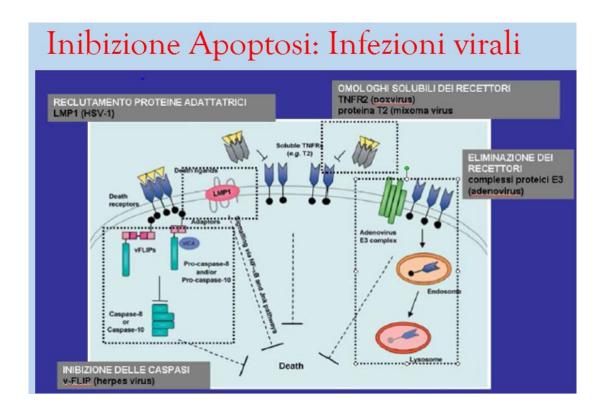
-Danno irreversibile al DNA: Le radiazioni, i farmaci citotossici, i chemioterapici e la produzione eccessiva di ROS sono tutte circostanze che possono danneggiare il DNA creando alterazioni non riparabili. In tali situazioni l'eliminazione della cellula può risultare la migliore alternativa per evitare rischiose mutazioni del DNA danneggiato, che potrebbero sfociare in una trasformazione maligna. I chemioterapici antitumorali agiscono andando a colpire il DNA, lo distruggono, così che la cellula è costretta a suicidarsi. Il problema dei

chemioterapici antitumorali è che non colpiscono solo il DNA della cellula tumorale, ma anche quello di cellule sane. Quindi il meccanismo fisiologico dell'apoptosi si verifica in tutte le cellule. Questo vale anche per la radioterapia, il DNA viene rotto, l'apoptosi avviene, ma la ritroviamo più nelle cellule sane che in quelle poiché queste ultime sono più forti e resistenti ai meccanismi tumorali, -Accumulo di proteine mal ripiegate: (stress del RE) Le proteine ripiegate impropriamente possono formarsi a causa di mutazioni nei geni che le codificano, o per fattori estrinseci, come un danno prodotto dai radicali liberi. Un accumulo eccessivo di tali proteine nel RE porta ad una situazione chiamata stress del RE che culmina con la morte per apoptosi. Allo stress del RE sono imputate varie malattie degenerative del SNC. -Acidificazione del citoplasma (ipossia): Un mancato apporto di ossigeno e nutrimento della cellula porta all'acidificazione del citoplasma all'induzione di un programma per il suicidio. -Morte cellulare in determinate infezioni: La ritroviamo nelle infezioni virali che essendo parassitosi intracellulari obbligati possono portare alla morte della cellula ospite in vari modi: 1) al termine del ciclo vitale del virus per facilitare il rilascio di nuovi agenti infettivi (virus influenza A, adenovirus). Tale fenomeno può compromettere quei tessuti che non hanno alta capacità rigenerativa 2) per indurre uno stato di immunodeficienza acquisita (HIV). 3) risposta immunologica dell'ospite mediata dai linfociti T citotossici specifici per le proteine virali che inducono apoptosi nelle cellule infette nel tentativo di eliminare i focolai di infezione. Il linfocita T citotossico è un particolare linfocita capace riconoscere le cellule infette e di ucciderle tramite due meccanismi:

\*Espressione di fas-ligand: la cellula bersaglio ha già sulla membrana il recettore quindi avviene il riconoscimento e l'apoptosi

\*Meccanismo meno specifico: si attua attraverso il rilascio dei granuli del linfocita t citotossico. I granuli contengono in particolare granzimi e perforina. Nel momento in cui c'è il riconoscimento della cellula bersaglio avviene la degranulazione nella zona di contatto tra le cellule. La perforina, come dice il nome stesso, si posiziona nella membrana della cellula bersaglio e forma dei buchi, mentre i granzimi sono degli enzimi che entrano all'interno della cellula bersaglio e funzionano come le caspasi iniziatrici e attivano le caspasi effettrici. È un meccanismo forzato di morte cellulare che non sfrutta né la via esogena, né quella endogena.

-Difesa antiapoptotica virale: L'agente patogeno può sfuggire alla morte programmata bloccando l'apoptosi, proteggendo La cellula che ha infettato. Sono diverse le strategie adottate dai virus per poter sfuggire alla morte indotta dei linfociti T citotossici, e la maggior parte interferisce con le vie di segnalazione apoptotiche: omologhi virali di proteine antiapoptotiche (v-FLIP, herpes virus); antagonisti solubili che i legano ai recettori di morte e non li fanno attivare (poxvirus); Complessi proteici che inducono l'endocitosi dei recettori di morte (Adenovirus).



- -Atrofia patologica in organi parenchimatosi: Gli ormoni regolano il funzionamento e l'integrità strutturale di vari tessuti. La loro disfunzione porta ad apoptosi patologica che è collegata ad atrofia e induzione dell'apoptosi (vedi endometrio e vagina in menopausa).
- -Apoptosi non voluta: La ritroviamo nelle malattie neurodegenerative del SNC in cui c'è morte dei neuroni:, a livello di patogenesi di malattie neurodegenerative quali Alzheimer, Parkinson c'è la morte della cellula neuronale dovuta all'accumulo di aggregati proteici. Nel primo caso, Alzheimer, questo accumulo avviene in un complesso che si chiama amiloide, nel Parkinson c'è la formazione dell'alfa-sinucleina. Questi complessi che si formano, precipitano all'interno delle cellule nervose, riducono la funzionalità, provocano stress da acumulo e inducono la morte della cellula. La mancata degradazione di questi complessi portano ad atrofia o apoptosi della cellula. Le conseguenze sono malattie molto invalidanti sia a livello cognitivo (demenza) che fisico (atassia, mancato controllo del movimento).
- -Apoptosi dovrebbe realizzarsi ma non avviene: è il caso della crescita tumorale. Displasia e neoplasia sono eventi in cui l'apoptosi è un meccanismo di difesa per proteggere dalla malattia. Uno dei motivi per cui esiste l'apoptosi è anche questo: evitare la crescita incontrollata della cellula. Nel tumore il controllo della proliferazione della cellula si perde. Se noi andiamo ad analizzare un tessuto tumorale, ci accorgiamo che è molto eterogeneo, le cellule di diverso genotipo riescono a crescere in situazioni che dovrebbero indurre apoptosi. Un tumore è portatore di molte mutazioni, e ricco di danni al DNA. Spesso al carcinoma è associata una condizione di ipossia, mancato apporto di  $O_2$  e uno scarso apporto di nutrienti e fattori di crescita. Fisiologicamente queste disfunzioni dovrebbero essere collegate all'apoptosi, ma nel tumore non avviene, o almeno ci sono sotto-popolazioni tumorali che riescono a sopravvivere comunque. Tra i meccanismi molecolari che permettono la progressione del cancro c'è l'espressione di BCL2, proteina antiapoptotica che blocca la via intrinseca. La crescita incontrollata di tipo neoplastico diventa possibile solo quando i meccanismi di difesa antiapoptotici sono compromessi.

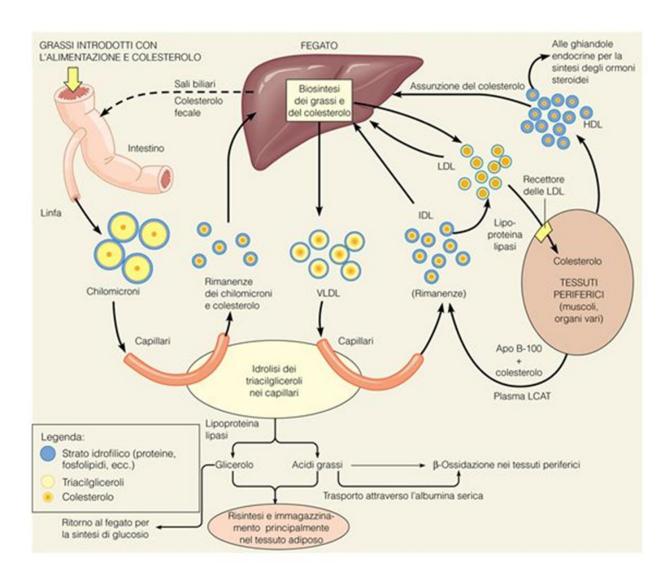
## 4. MALATTIE DA ACCUMULO

Solitamente il difetto di una singola cellula non può determinare una malattia, ma il difetto deve interessare il tessuto. Ci sono però dei casi particolari, come nelle malattie neurodegenerative in cui basta anche il deficit di un piccolo numero di cellule per causare un grande danno. Un altro caso particolare è rappresentato dalle neoplasie in cui il danno causato dalla crescita incontrollata di una massa cellulare origina dal danno su un unica cellula. Tra le varie situazioni che possono accadere a livello cellulare ma che frequentemente può essere riscontrata a livello tissutale c'è il **fenomeno dell'accumulo**, un difetto a livello cellulare in cui metaboliti o sostanze esogene possono accumularsi e determinare a livello tissutale una "malattia da accumulo" (tesaurismosi). Le sostanze che più frequentemente si accumulano in maniera aberrante nelle cellule sono i lipidi e gli zuccheri. Normalmente ogni cellula ha i propri depositi di lipidi e zuccheri che rappresentano sia i veri e proprie riserve energetiche sia sono necessari per la formazione di molte macromolecole. Una cattiva gestione metabolica di questi elementi può portare ad un deposito eccessivo nella cellula. Esistono quattro modalità patologiche che determinano un eccessivo accumulo intracellulare:

- -Produzione in eccesso: interessa spesso sostanze normalmente depositate nelle cellule (lipidi e zuccheri).
- -Produzione per un errore metabolico/catabolico: difetti genici possono alterare il metabolismo o interferire con le vie di degradazione dei prodotti di scarto (es: bilirubina, emosiderina, lipofuscina) Una malattia genetica che inattiva un enzima porterà all'accumulo del prodotto iniziale della reazione enzimatica. La bilirubina a valle della degradazione dell'eme presente nei globuli rossi. L'emosiderina per una cattiva gestione del ferro nelle cellule e la lipocuscina per l'accumulo di lipidi all'interno della cellula.
- -Accumulo di sostanze che non sono di per sé degradabili Un esempio è il tatuaggio, un accumulo di inchiostro nel derma che si va ad inserire nelle cellule, soprattutto nei macrofagi che non riescono a degradarlo e lo trattengono nel citoplasma. Un altro esempio lo ritroviamo in alcune sostante presenti nell'ambiente che noi inaliamo, e che non possiamo degradare con gli enzimi disponibili: carbonio, silice, ... (comportano tutta una serie di patologie anche molto gravi delle vie respiratorie, conosciute come pneumoconiosi). In molti casi, se il sovraccarico può essere controllato o arrestato, l'accumulo è reversibile.

Nelle malattie ereditarie da accumulo, questo è progressivo e il sovraccarico può provocare una lesione alcuni casi alla compromissione delle funzioni porta Malattie da accumulo clinicamente rilevanti sono dovute ad errori nel metabolismo dei lipidi. I lipidi vengono distribuiti in tutto il corpo per mezzo delle lipoproteine: complessi costituiti da varie macromolecole che viaggiano all'interno del circolo sanguigno. Per riuscire a fare ciò hanno una particolare struttura della membrana in cui la parte esterna è idrofilica formata da fosfolipidi e proteine, mentre la parte interna è idrofobica ed è formata da trigliceridi e colesterolo. Come avviene nelle membrane cellulari il colesterolo lo possiamo ritrovare anche nella parte esterna della superficie. Un'altra componente importante che ritroviamo nella superficie esterna della membrana sono le apoproteine, come le apoE, apoB, apoB100, che permettono il legame delle lipoproteine ai tessuti. Esistono diverse categorie di lipoproteine la cui differenza principale è nella densità data dal rapporto colesterolo/trigliceridi, quindi avremo lipoproteine a densità molto basse (VLDL), a densità intermedie (IDL), a densità basse (LDL) oppure a densità alte (HDL). Più trigliceridi sono presenti nella lipoproteina, più la densità è bassa. L'unico caso che sfugge a questa classificazione sono i chilomicroni: lipoproteine prodotte a valle dell'alimentazione e della digestione, dall'assorbimento dei lipidi nell'intestino tenue. La loro funzione è quella di trasportare principalmente trigliceridi e colesterolo. La prima fase del loro metabolismo è dunque l'assorbimento nell'intestino, poi avviene la diffusione in tutto il corpo. Dopo la prima fase possiamo ritrovare una prima rimanenza, associata anche ad un'idrolisi, che va a finire nel fegato, responsabile del controllo di biosintesi dei grassi e del colesterolo. Questo controllo avviene mediante

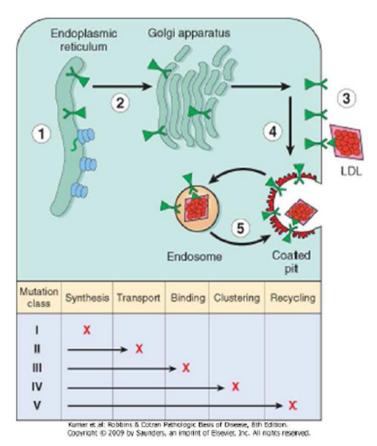
la produzione, se necessario, di altre lipoproteine come ad esempio le VLDL, molto ricche di trigliceridi, che svolgono una funzione simile a quella dei chilomicroni. Le VLDL grazie alla presenza di specifiche apoproteine sulla loro superficie riescono a determinare il loro destino cioè di rifornire continuamente i tessuti di trigliceridi e colesterolo per permettere a tutte le cellule del nostro corpo di avere sempre la giusta quantità di queste macromolecole. Così facendo le VLDL si trasformano in IDL e LDL che. In tutto questo processo qualcosa può andare male, come ad esempio la ri-captazione da parte del fegato delle lipoproteine.



Come principale centro di controllo della sintesi dei lipidi il fegato deve essere in grado di produrre e assorbire lipidi evitando le rimanenze. Questo assorbimento e rimodellamento dei contenuti nel caso delle LDL, ad esempio, è molto importante poiché se non avviene provocherà un accumulo in circolo che a lungo andare porterà a ipercolesterolemia. In questo passaggio, fondamentali sono anche le apoproteine poiché permettono la specifica captazione: le LDL sono riconosciute dai recettori degli epatociti grazie all'espressione della apoB100 sulla loro membrana. In particolare, una volta avvenuto il riconoscimento, l'epatocita, attraverso un processo di endocitosi forma un endosoma, una fossetta rivestita, il cui contenuto va sul lisosoma, si fondono e il lisosoma recupera amminoacidi, colesterolo, trigliceridi. Questo processo funge da feedback di controllo sull'epatocita che ha sentore della concentrazione ematica di trigliceridi e regola le fasi di neo-sintesi, sintesi di nuovi LDL, e lo stoccaggio. Infine il recettore viene riciclato: l'endosoma rilascia una

vescicola di riciclo che va sulla membrana e riporta il recettore. Questo meccanismo molto efficiente permette il mantenimento di un alto rapporto recettore/superficie. Parallelamente al riciclo c'è anche la possibilità di formare nuovi recettori. Nell'ipercolesterolemia familiare, dovuta ad un cattivo funzionamento dei recettori per LDL, si conoscono tantissime mutazioni del recettore, più di 900, ognuna delle quali può colpire una fase diversa della vita del recettore. In particolare i difetti associati a ipercolesterolemia possono essere distinti in 5 classi:

- -Classe 1: difficoltà nella sintesi del recettore
- -Classe 2: inibizione del trasporto verso il Golgi. Sono i difetti più frequenti che portano all'ipercolesterolemia
- -Classe 3: inibizione del legame tra recettore e lipide
- -Classe 4: deficit nella formazione delle vescicole rivestite
- -Classe 5: assenza di riciclo del recettore.



Questa serie di mutazioni hanno un unico effetto, quello di causare alti i livelli di LDL in circolo. L'apoproteina ApoE che si trova sulle lipoproteine è alla base evolutiva di alcune patologie. C'è una branca della medicina, Medicina evolutiva, che va a ricercare le cause delle patologie nella storia evolutiva degli organismi. Inizialmente l'uomo aveva una dieta più ricca di vegetali, ora più carnivora e ciò causa dei problemi nel nostro organismo che evolutivamente non si è ancora fisiologicamente adattato per questo tipo di dieta. La dimostrazione la ritroviamo su alcuni alleli di apoproteine. L'allele ancestrale apoE4 funziona normalmente molto bene nel mantenere bassi i livelli di LDL, ma nei soggetti che conducono una dieta molto ricca di grassi animali, questo vantaggio si perde poiché l'apoE4 è meno efficacie nel gestire una dieta carica di grassi rispetto agli altri alleli apoE2, apoE3. Quindi chi porta questo allele ancestrale è svantaggiato e a lungo andare avrà accumuli di alcuni tipi di LDL che saranno causa di patologie croniche cardiovascolari. Questa è la

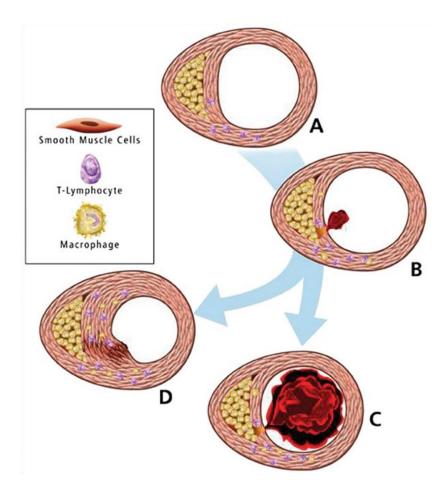
dimostrazione molecolare che spiega il motivo per cui bisogna considerare anche quello per cui l'uomo è evolutivamente adattato e riguarda sicuramente anche l'alimentazione.

Lipidi e accumulo di lipidi: tutte le principali tipologie di lipidi possono accumularsi nelle cellule: trigliceridi, colesterolo/esteri del colesterolo e fosfolipidi. Complessi anomali di lipidi e carboidrati, inoltre, si accumulano nelle malattie di accumulo lisosomiale. Questo avviene poiché il lisosoma è l'organello deputato alla degradazione del materiale non più utilizzato all'interno della cellula grazie ad un apparato enzimatico specifico. Quando c'è un deficit di uno specifico enzima dettato ad eliminare uno specifico lipide, avviene l'accumulo. Soprattutto in questo caso quando si ha un blocco della degradazione dei fosfolipidi abbiamo la formazione delle figure mieliniche: aspetti istologici colorati che si trovano nelle cellule necrotiche e stanno ad indicare l'accumulo fosfolipidico all'interno della cellula. La distruzione di un tessuto porta ad una disponibilità produzione di fosfolipidi molto alta la figure mieliniche. -Accumulo di colesterolo/esteri del colesterolo: Il metabolismo cellulare del colesterolo è strettamente regolato in modo tale che la maggior parte delle cellule utilizzi il colesterolo per la sintesi delle membrane cellulari. Accumuli rilevabili di questo lipide si possono osservare in vari processi patologici a monte dell'incidenza di mortalità delle malattie cardiovascolari come:

\*Aterosclerosi : è accumulo di colesterolo e lipidi nella parete delle arterie. La presenza nel sangue di livelli elevati di LDL in maniera cronica, determina un accumulo di trigliceridi e colesterolo nell'intima delle arterie. L'aterosclerosi è la prima causa di morte nei paesi occidentali ed è associata a infarto del miocardio, ictus, ostruzione di aorta e carotidi. Tutti questi fenomeni sono legati alla formazione di strutture chiamate ateromi (lettera A nella figura), al cui interno sono presenti tanti macrofagi che a causa dell'accumulo lipidico, assumono un aspetto diverso, diventano cellule schiumose. Le cellule coinvolte in questo fenomeno sono diverse: oltre i macrofagi, che si formano a partire dai monociti richiamati dal sangue, troviamo le cellule muscolari lisce e i fibroblasti. Il monocita viene richiamato nell'ateroma per inglobare e distruggere tutte le sostanze di scarto. (Stress + stato infiammatorio con produzione di alcune citochine + accumulo di LDL). Altri protagonisti che successivamente vengono, dalla parte interna del tessuto, a far parte dell'ateroma, sono i fibroblasti e le cellule muscolari lisce (miofibroblasti). Questi sono deputati al riparo delle ferite e vengono richiamati nella zona interessata perché questa situazione simula una ferita o un danno tissutale. A lungo andare la loro presenza crea un accumulo fibrotico che insieme alla deposizione di grassi determina la formazione della placca aterosclerotica, situazione finale, in cui ritroviamo matrice extracellulare prodotta da fibroblasti e cellule muscolari lisce, macrofagi schiumosi ricchi di acidi grassi, e tutta una serie di lipidi e cellule necrotiche. Nelle fasi iniziali c'è una risposta di adattamento dell'organismo con restringimento del lume e ispessimento della parete (lettera D nella figura). La progressione dell'ateroma può portare a diversi esiti patologicamente molto rilevanti. La placca è pericolosa perchè la sua presenza porta ad un restringimento dell'arteria, una perdita di elasticità, ma è anche potenziale sorgente di un evento traumatico acuto: la rottura. Là dove si forma la placca l'endotelio diventa più debole e nel momento in cui perde la propria integrità si crea un coagulo, che può con formare un trombo che può sia distaccarsi e causare un embolo, oppure portare a ischemia (interruzione del flusso sanguigno dovuta ad ostruzione del vaso) (lettera C nella figura). Un altro evento possibile associato all'indebolimento dell'arteria è la formazione di una estroflessione, che durante l'aneurisma si rompe determinando emorragia.

<sup>\*</sup>Ipercolesterolemia: aumento della concentrazione di colesterolo nel sangue e aumento di suscettibilità all'aterosclerosi.

<sup>\*</sup>Xantomi: Masse voluminose nel tessuto connettivo sub-epiteliale della cute e dei tendini dovuto ad un accumulo intracellulare di colesterolo nelle zone molto ricche di macrofagi.



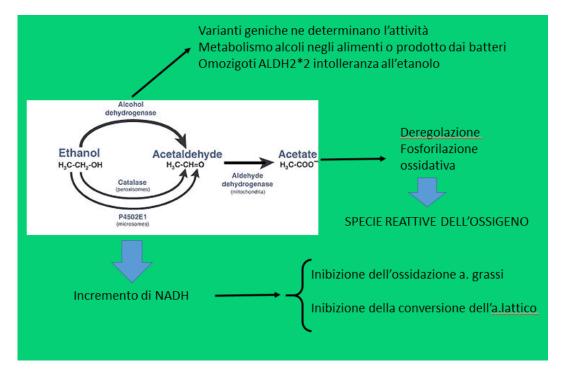
L'Accumulo di trigliceridi nei tessuti è denominato steatosi, il cui caso più noto è la steatosi epatica: accumulo eccessivo di trigliceridi nelle cellule epatiche. La steatosi si osserva spesso nel fegato, poiché è l'organo principale impegnato nel metabolismo dei grassi. Può avvenire anche nel cuore, nei muscoli e nei reni. Quando parliamo di steatosi epatica ci riferiamo a un deficit nel meccanismo di gestione fisiologica dei livelli di trigliceridi:

- 1) assorbimento eccessivo dei grassi dovuto ad una cattiva dieta: si formano troppi chilomicroni che non riescono ad essere più gestiti dal fegato.
- 2) difetto nel metabolismo: Gli acidi grassi possono subire diverse sorti negli epatociti: essere usati per la sintesi di colesterolo, fosfolipidi, corpi chetonici oppure formare i trigliceridi. Se vengono impediti i normali metabolismi si può avere un accumulo di trigliceridi.
- 3) blocco della sintesi delle lipoproteine (produzione e secrezione).

L'etanolo è una comune causa di steatosi epatica ed è così importante clinicamente che tutte le altre steatosi sono classificate come non alcoliche. Steatosi non alcolica: è spesso associata con la sindrome metabolica, malattia causata da una elevata concentrazione di trigliceridi nel sangue. I soggetti più colpiti da questa sindrome sono spesso obesi e l'obesità spesso è associata a diabete e ipertensione. La steatosi epatica non alcolica può derivare anche a causa della presenza di una serie di sostanze ambientali steatogene, come ad esempio il tetracloruro di carbonio, le aflatossine (presenti nei cereali, dopo crescita di funghi del genere Aspergillus) o alcuni chemioterapici, che inibiscono la produzione delle lipoproteine e creano di conseguenza

accumuli. Altre sostanze o condizioni dell'organismo che possono portare a un sovraccarico di acidi grassi nel fegato sono: il diabete, il cortisone e la caffeina che fanno aumentare la lipolisi, e i barbiturici che aumentano la biosintesi degli acidi grassi.

Steatosi alcolica: la principale causa la ritroviamo nell'etanolo, una componente non abituale degli alimenti, ma un prodotto culturale dell'uomo. Il fegato riesce a sopportare l'assunzione di una limitata quantità di alcol grazie alla presenza di enzimi deputati alla detossificazione degli xenobiotici. Questi trasformano l'etanolo (tossico) in acido acetico, prodotto innocuo per l'organismo che si trasforma e diventa un intermedio utile nelle vie metaboliche. Se la soglia limite viene superata, gli enzimi predisposti per la conversione dell'etanolo esauriscono la loro capacità di trasformazione e si creano prodotti di accumulo tossici nel fegato. (Nel dettaglio la via principale di catabolismo dell'etanolo è: da etanolo si passa ad acetaldeide tramite l'alcol deidrogenasi, poi c'è l'aldeide idrogenasi che trasforma in acetato). L'alcol deidrogenasi, enzima necessario per la conversione dell'etanolo, è presente in molte varianti alleliche e ciò comporta che ognuno di noi ha un enzima che lavora in maniera diversa, con diversa capacità detossificante. Questo giustifica la tolleranza all'alcol che varia da individuo a individuo. Esistono alcuni organismi che sono completamente intolleranti all'alcol: non possiedono gli enzimi necessari per poterlo tollerare e metabolizzare. Esiste anche una seconda via per il metabolismo dell'etanolo che si attiva a lungo termine nei microsomi e nei citocromi. Questa è una via di adattamento cronico all'assunzione di alcol, negativa a livello clinico perché fa aumentare la soglia di tolleranza dell'alcol. Anche questo metabolismo funziona bene entro certi limiti di assunzione, dopo di che vi può essere l'accumulo di acetaldeide (tossica) e l'acido acetico può portare alla formazione di specie reattive dell'ossigeno. Un altro fondamentale problema di questa reazione è il consuma di NAD che si riduce in NADH. L'aumento del NADH è a sua volta responsabile dell'inibizione dell'ossidazione degli acidi grassi e della conversione dell'acido lattico, quindi abbiamo steatosi con accumulo di acidi grassi nel fegato ed aumento di stress metabolico all'interno della cellula.



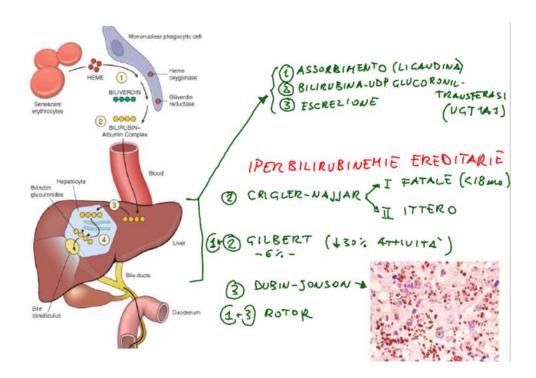
La steatosi epatica è largamente reversibile nelle fasi iniziali. Se l'assunzione di alcool non viene interrotta si può andare incontro a 2 possibili esiti: -1 La continua esposizione cronica prolungata produce cirrosi epatica, fase irreversibile che porta alla morte cellulare e alla mancata rigenerazione del fegato (organo con alte capacità rigenerative). La cirrosi è un termine specifico che indica uno stato di fibrosi: sostituzione di

componente cellulare con matrice extracellulare, che a sua volta comporta la perdita di funzione e di capacità di rigenerazione del tessuto. Avviene il deposito di collagene su tutto il fegato, è un'iperplasia di compensazione con formazione di noduli iperplastici lì dove ci sono ancora delle cellule sane.

-2 La continua assunzione di grandi quantità di alcol porta all'epatite, infiammazione importante associata a necrosi delle cellule epatiche. Non solo la cronicità di esposizione a l'alcol ma anche la quantità giornaliera può determinare un'impossibilità di ritorno allo stato fisiologico. L'epatite a sua volta può evolvere in cirrosi.

L'eccessivo consumo di alcol determina tutta una serie di altre patologie: deficit vitamina B1 (porta a neuropatia periferica e atrofia cerebrale), cardiomiopatia alcolica, ipertensione, sindrome alcolica fetale (nelle donne in gravidanza è assolutamente vietata l'assunzione di alcol perché parte dell'alcol va nel feto e li interferisce con lo sviluppo del sistema nervoso), tumori (riguardano i tessuti che vanno a diretto contatto con l'alcol, come la cavità orale, l'esofago, il fegato ma una buona correlazione la ritroviamo anche con lo sviluppo del tumore della mammella).

Un'altra malattia di accumulo dovuta a una disfunzione del fegato è l'ittero. Questo è dovuto all'accumulo di bilirubina che deriva dalla degradazione e recupero degli eritrociti, sacchetti ricchi di emoglobina che vivono in media 120 giorni dopo di che vengono rimpiazzati. Bisogna recuperare le parti da riciclare oppure detossificare e eliminare le parti che non servono più. Il primo passo di questo processo avviene nella milza, un importante filtro del nostro sangue, composta da due regioni: polpa bianca, sede del sistema immunitario (organo linfoide secondario) e polpa rossa, zona ricca di macrofagi che possono fagocitare gli eritrociti. In essi prima della degradazione, avviene il riciclo e ciò che può essere recuperato è il ferro, sostanza fondamentale del nostro organismo che va nel midollo osseo e forma nuovi eritrociti. Il metabolismo del ferro nel nostro corpo è molto conservativo, riusciamo facilmente a riciclarlo e questo è il motivo per cui ne abbiamo bisogno di piccole quantità nella nostra dieta. Nella fase di riciclo riusciamo a recuperare anche le proteine, ma non una molecola che il nostro organismo non riesce né a riciclare, né a degradare: l'eme. Questa struttura complessa è tossica poiché insolubile in acqua, quindi deve andare incontro ad una serie di trasformazioni: I primi macrofagi della milza lo trasformano in bilirubina, questa viene veicolata dalla milza al fegato dove viene resa solubile tramite delle transferasi che uniscono acido glucuronico alla bilirubina. Una volta resa solubile la sostanza può essere rilasciata nella bile. La parte pericolosa di questo processo è il trasporto in circolo della bilirubina insolubile dalla milza al fegato. In piccole quantità è accettabile in quanto è veicolata da proteine ed inoltre si dimostra essere un forte antiossidante, ma è sicuramente tossica superati certi livelli. Se immaginiamo una situazione di emorragia, in cui si ha la necessità di detossificare l'eme proveniente da numerosi globuli rossi distrutti, la bilirubina che viene veicolata da proteine verso il fegato è in maggiore quantità rispetto al normale e si mette in equilibrio con i tessuti dove di accumula e crea danni. In tutto il complesso processo in cui l'eme passa dalla milza al fegato dove diventa solubile ed infine nella bile, ci possono essere numerose situazioni patologiche. Possiamo avere un deficit sull'escrezione, sull'assorbimento o sul funzionamento degli enzimi coinvolti. Quelli più frequenti sono a carico dell'enzima glucuronil-transferasi, tanto è vero che si conoscono una serie di patologie ereditarie, le iperbilirubinemie associate ad un aumento dei livelli sierici di bilirubina che derivano da un deficit genico a carico delle transferasi. Alcune iperbilirubinemie sono molto frequenti, colpiscono il 6% della popolazione, ma le conseguenze cliniche a volte sono irrilevanti o alcuni soggetti possono avere maggiore propensione all'affaticamento sotto sforzo. Ci sono altre tipologie della malattia molto più invalidanti in cui il deficit enzimatico è totale, come la patologia Criglernajjar che può portare alla morte entro 18 mesi.



Uno degli esempi più frequenti di ittero è quello neonatale ed è pericoloso poiché può colpire il sistema nervoso centrale. In questi casi bisogna abbassare i livelli di bilirubina e c'è un modo fisico per farlo: il neonato viene posto in una speciale culla che presenta nella parte inferiore una lampada UV che interagisce con la bilirubina, la trasforma e la rende solubile. Il fatto che l'ittero neonatale sia così frequente pone dei problemi evolutivi. La sua causa è molto chiara, avviene un cambiamento di mioglobina da fetale ad adulta che porta alla distruzione di un gran numero di globuli rossi. Ma perché, evolutivamente parlando, il nostro organismo non ha creato un sistema efficiente nell'eliminare la bilirubina, dal momento che può essere anche pericolosa a livello del sistema nervoso centrale dove può accumularsi e portare a ritardo mentale? Sembra anzi che a livello evolutivo la presenza di elevati livelli di bilirubina nel neonata sia stata favorita: le transferasi neonatali sono poco funzionali e Il latte materno contiene degli inibitori di questi enzimi. Qui la medicina evolutiva cerca di dare una risposta sebbene non possiamo essere sicuri di questo. L'aspetto vantaggioso di avere livelli più elevati di bilirubina nel neonato è che questa è una molecola fortemente antiossidante e considerando che il il feto viene alla luce in un ambiente che è molto più ricco di ossigeno, ha bisogno di una maggiore protezione verso la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Un antiossidante naturale può proteggere l'omeostasi dei tessuti da una produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno in un ambiente più ricco di ossigeno.

Accumulo di proteine. Gli accumuli intracellulari di proteine di norma si presentano come goccioline eosinofile, vacuoli o aggregati nel citoplasma. Al microscopio possono avere un aspetto amorfo fibrillare o cristallino. In alcune patologie come in certe forme di amiloidosi, le proteine anomale si depositano principalmente negli spazi extracellulari. In generale accumuli proteici sono meno frequenti di quelli lipidici per 2 motivi:

- -1 sono macromolecole idrosolubili nella conformazione terziaria e quando denaturate possono essere legate a proteine accessorie che ne aumentano la solubilità
- -2 Sono facilmente degradabili attraverso i normali meccanismi di riciclo degli aminoacidi.

La proteina si genera dal DNA e forma una conformazione avvolta definitiva che ne permette la funzionalità. Questo processo è possibile grazie alla presenza di chaperonine, proteine accessorie, che aiutano il corretto

avvolgimento e sono anche in grado di veicolare le proteine nel nei vari organelli cellulari. Una classe importanti di chaperonine sono le Heat Shock-Protein (HSP), particolarmente specializzate nel riuscire a mantenere la maggiore stabilità possibile della struttura di una proteina quando avviene un repentino aumento della temperatura che porta ad una maggiore suscettibilità per la denaturazione. Fonti di stress di varia natura: UV, calore, stress ossidativo, radicali liberi, possono causare la denaturazione della proteina. Proteine denaturate che non hanno più la conformazione appropriata possono accumularsi, precipitare e formare degli aggregati insolubili. In realtà prima di arrivare ad accumulo patologico esistono molte strade di difesa da parte dell'organismo, esiste un range di adattamento. Aumentano le chaperonine prodotte per cercare di mantenere la corretta struttura terziaria, oppure in caso di impossibilità di riavvolgimento, le macromolecole vengano degradate tramite il proteasoma, una macina presente in tutte le cellule che riconosce le proteine che presentano la coda di ubiquitina e le degrada fino al livello degli amminoacidi che poi vengono riciclati. Tramite questo meccanismo le proteine denaturate possono essere riciclate. Se questo processo non avviene, il nostro organismo si difende ulteriormente portando le cellule in apoptosi. Eccessi di proteine all'interno delle cellule, sufficienti a provocare accumuli morfologicamente osservabili, hanno varie cause:

-Si osservano in malattie renali associate a perdita di proteine nell'urina. Piccole quantità di proteine filtrate nel rene attraverso il glomerulo sono di norma riassorbite mediante pinocitosi, ma nelle malattie caratterizzate da un ingente fuoriuscita di proteine attraverso il filtro glomerulare causano un aumento del riassorbimento delle proteine nelle vescicole che assumono l'aspetto di goccioline rosa ialine.

-Le proteine accumulate possono essere normali proteine prodotte in quantità eccessive, come accade nella sintesi delle immunoglobuline. Il RE si gonfia producendo ampie inclusioni eosinofile chiamate corpi di Russel -In caso di deficit dell' $\alpha$ 1-antitripsina si generano delle mutazioni a carico di tale proteine che ne rallentano notevolmente il ripiegamento, determinando l'accumulo di intermedi parzialmente ripiegati che si aggregano nel RE del fegato e non vengono secreti. Il conseguente deficit causa l'enfisema, dilatazione patologica degli alveoli polmonari con alterazioni delle loro pareti e perdita di elasticità dell'organo. In gran parte di queste malattie la patologia non deriva solo da una perdita di funzione, ma anche da uno stress del RE che causa apoptosi delle cellule coinvolte

-Accumulo di proteine citoscheletriche. Vi sono diversi tipi di proteine citoscheletriche, tra le quali ritroviamo i filamenti intermedi che forniscono una flessibile impalcatura intracellulare, sono suddivisi in 5 tipi: filamenti di cheratina (epitelio), neurofilamenti (neuroni), filamenti di desmina (muscolo), filamenti di vimentina (connettivo) e filamenti gliali (astrociti). Accumuli di filamenti di cheratina e neuro filamenti sono associati a determinati tipi di lesione cellulare. Ad esempio i grovigli neuro-fibrillari riscontrati nel cervello di individui affetti da Alzheimer contengono accumuli di neurofilamenti e altre proteine.

Gli accumuli proteici possono autoalimentarsi a partire dalla presenza di copie iniziali con conformazione alterata. Ne sono un esempio alcune tra le più frequenti malattie neurodegenerative (Alzheimer e Parkinson) la cui patogenesi può essere replicata sperimentalmente iniettando proteine (beta-amiloide, alfa-sinucleina) a conformazione patologica nel sistema nervoso centrale.

Un esempio eclatante della possibilità dell'amplificazione di una conformazione proteica patologica è l'encefalopatia spongiforme (malattia prionica). Le malattie prioniche sono l'unico caso di patologie trasmissibili basate su proteine. Sono infettive e l'agente infettivo è la proteina prionica. Di questa classe tra quelle che colpiscono l'uomo ritroviamo: kuru, creutzefeldt-Jakob e la malattia spongiforme bovina (malattia della mucca pazza). Quest'ultima è chiamata così perché la mucca impazzisce, non riesce a stare più in piedi e ha una grave perdita cognitiva. Il deficit di queste malattie lo ritroviamo nell'accumulo delle proteine nel sistema nevoso centrale, in particolare della proteina prionica che non viene normalmente degradata, ma assume una conformazione diversa che non solo tende ad accumulare, ma trasmette la propria conformazione generando

repliche patologiche di sé stessa. Il problema oltre all'accumulo è che non può essere nemmeno degradata. Questa malattia ha avuto importanza soprattutto gli anni scorsi con epidemie europee della malattia della mucca pazza. La trasmissibilità di questa malattia venne scoperta tramite la patologia kuru in Nuova Guinea in cui soggetti che praticavano il cannibalismo si ammalavano dopo il consumo del cervello di soggetti infetti. I segni clinici della malattia si manifestano anche molti anni dopo l'infezione.

## 5. Rinnovamento rigenerazione e riparazione

Tutti i tessuti hanno la necessità di "manutenzione" che ne assicuri l'omeostasi. Non tutti però condividono le stesse strategie di mantenimento e capacità di riparazione.

Per entrare a pieno in questi argomenti dobbiamo partire dal concetto di "attività proliferativa" di tessuti e cellule. Uno schema di interpretazione prevede tre tipologie di cellule che hanno differente capacità proliferativa e diverso grado di differenziamento. Le tre tipologie possono essere rappresentate da un processo consequenziale in tre stadi A, B, C, che parte da (A) un pool di cellule staminali multipotenti (basso differenziamento, alta proliferazione potenziale) che possono produrre (B) una popolazione cellulare di base già indirizzata verso uno specifico tipo cellulare ma ancora con attività proliferativa (differenziamento+proliferazione) e poi in un terzo step (C) di cellule differenziate non più proliferanti. Possiamo distinguere almeno tre tipologie di tessuti in base all'abbondanza di ognuna delle tre tipologie:

- -1 Tessuti proliferanti: in cui è preponderante la componente A e il processo A, B, C si attua come modalità standard di omeostasi ES: cute e tessuto emopoietico. Quest'ultimo nel midollo osseo, in cui sono presenti un gran numero di cellule staminali, produce tutte le cellule del sangue (a vita breve), che in molti casi sono già terminalmente differenziate (eritrociti) o possono ulteriormente differenziare (monociti).
- -2 Tessuti quiescenti: in cui è prevalente la componente B e abbiamo una componente cellulare quiescente e differenziata che in caso di necessità può proliferare. In caso di necessità, cioè a seguito di un depauperamento significativo della popolazione possono intervenire cellule staminali, normalmente però non residenti nel tessuto. Questa situazione viene adottata dalle cellule dell'endotelio che normalmente non hanno nessun interesse a proliferare, ma in alcuni casi formano nuovi vasi e danno vita a nuove cellule. Qui possono intervenire sia le stesse cellule endoteliali sia in caso di necessità cellule staminali derivanti dal circolo sanguigno (precursori delle cellule endoteliali). Stessa situazione la ritroviamo per le cellule muscolari lisce, per gli epatociti e i linfociti. Questi emergono dal timo maturi, ma hanno ancora capacità proliferante dopo attivazione dando vita a popolazioni linfocitarie terminali effettrici che sono destinate ad essere eliminate.
- -3 Tessuti perenni: Prevale la situazione C, in cui vi è scarsa o assente capacità proliferativa. Esempi sono il tessuto muscolare striato che è un tessuto difficilmente coinvolto nei processi di rigenerazione e che normalmente va incontro a riparazione, o il tessuto nervoso. Al giorno d'oggi non si parla più di tessuto completamente perenne poiché ci sono delle possibilità di rigenerazione, ad esempio nella cellula satellite della muscolatura striata, o anche nel tessuto nervoso centrale, in cui è possibile una certa capacità di rigenerazione. Però questi sono casi che si osservano molto raramente.

In caso di perdita di cellule il ritorno ad uno stato di equilibrio si può avere con uno dei seguenti processi

\*Rinnovamento: è un processo che avviene **fisiologicamente**, continuamente, in molti dei nostri tessuti. Mira al mantenimento del numero delle cellule e dell'anatomia del tessuto. Un esempio lo ritroviamo nelle cellule della cute che hanno la funzione di proteggere l'organismo attraverso un differenziamento terminale associato ad una perdita di grandi quantità di cellule ed un conseguente rimpiazzo grazie alla componente staminale.

- \*Rigenerazione: con questo termine entriamo già in un evento patologico. Parliamo di rigenerazione nel caso in cui si verifica un danno, ma questo è associato ad un **ripristino completo** di tutte le componenti del tessuto.
- \*Riparazione: anche questo è un termine che ritroviamo nell'ambito patologico. Rappresenta un **ripristino** parziale delle strutture danneggiate. È un evento di adattamento che si realizza solo quando l'evento dannoso ha un termine, invece quando c'è un evento dannoso cronico, la riparazione rimarrà irrealizzata.
- Le cellule staminali sono fondamentali nell'ontogenesi dei tessuti ma giocano un ruolo chiave anche nei processi di rigenerazione nell'adulto. Possiamo ritrovare 3 livelli di intervento delle cellule staminali: (1) nell'embrione le cellule staminali riescono a differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula specializzata, nell'adulto invece hanno capacità (2) di mantenimento dei tessuti proliferanti e (3) rigenerazione dei tessuti danneggiati. In un individuo il pool staminale non viene mai completamente esaurito, deve durare decenni e questo è possibile grazie al fenomeno dell'auto-rinnovamento. Con il passare del tempo e con i fenomeni legati all'invecchiamento dell'individuo, si assiste ad una diminuzione del numero delle cellule staminali e della loro funzionalità. Quando parliamo di cellula staminale torna molto utile riferirsi al concetto di potenza della cellula. Per potenza noi indichiamo il numero di tipi cellulari diversi verso cui la cellula staminale può differenziare. Le cellule staminali possono essere:
- -Totipotenti: sono le più potenti poiché riescono a differenziare in qualsiasi tipo cellulare necessario allo sviluppo dell'individuo, compresi i tessuti extraembrionali. Le uniche cellule totipotenti le ritroviamo nello zigote fino alla 4° divisione, dopo di che assistiamo ad una graduale perdita di potenza delle cellule staminali che fino al qualche anno fa si pensava fosse irreversibile. Durante l'ontogenesi si perde la potenza e si passa da totipotenza a pluripotenza.
- -Pluripotenti: sono le cellule in grado di generare tutti i tipi di cellule specializzate presenti nell'organismo in accordo con i tre strati embrionali. Le ritroviamo nell'embrione e la loro potenza rigenerativa è molto elevata. Problematiche di natura etica non permettono di utilizzare cellule embrionali pluripotenti per la ricerca in molte nazioni.
- -Multipotenti: sono le cellule staminali presenti nell'individuo adulto e riescono a generare molti tipi di cellule dell'organismo, ma non tutte quelle generate dalle pluripotenti. Queste sono quelle più frequentemente utilizzate per la ricerca. Tra queste troviamo le cellule mesenchimali staminali (MSC), che in opportune condizioni, sono in grado di differenziare in tipi cellulari molto diversi fra di loro: Osteoblasti, condrociti, adipociti, periciti (cellule che aiutano l'angiogenesi), supportandone la rigenerazione e la riparazione. Le MSC sono oggetto di intenso studio per la loro capacità di differenziamento e negli ultimi anni si è appurato che possono essere prelevate non solo dal midollo osseo, ma anche in altre localizzazioni, come il tessuto adiposo e dalla polpa dentaria.
- -Oligopotenti: sono cellule staminali presenti nell'individuo adulto e riescono a generare pochi tipi di cellule presenti nel tessuto associato. Ad esempio, la cellula staminale dell'intestino tenue può generare vari tipi cellulari della parete intestinale quali enterocita, cellula endocrina, cellula goblet e cellula di Paneth. Quest'ultime sono importati nella difesa antimicrobica e antibatterica, poiché producono proteine che attaccano i batteri. Le cellule ematopoietiche che producono cellule della linea mieloide e linfoide appartengono anche a questa categoria.
- **-Unipotenti:** sono le cellule staminali presenti nell'individuo adulto che riescono a generare un solo tipo cellulare. Ad esempio gli epatociti e le cellule basali della cute.

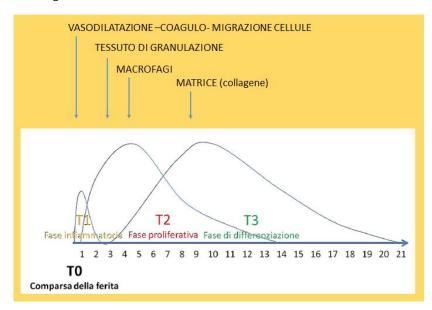
\_

Il dogma biologico della irreversibilità verso la pluripotenza è stato infranto recentemente grazie a **Shinya Yamanaka** (premio Nobel 2012), i cui studi nel 2006, hanno permesso di accertare che cellule differenziate di topo (epidermiche) possono revertire verso un fenotipo di cellule staminali pluripotenti (cellule staminali pluripotenti indotte, iPSC). Egli prese cellule adulte, le riprogrammò inserendo geni, di cui molti sono fattori di trascrizione e una volta fatti esprimere forzatamente alla cellula, la fanno tornare staminale. La scoperta fondamentale non è stata solo quella di capire che il processo di differenziamento è reversibile, ma anche quella di andare a capire che i fattori trascrizionali necessari al mantenimento delle caratteristiche staminali sono in numero relativamente piccolo. Il problema fondamentale ancora da risolvere è che ogni volta che si vuole riprogrammare una cellula c'è un rischio molto grosso di trasformarla in tumorale. Ci sono stati alcuni casi riportati in questo senso, ma si sta studiando per capire come fare per limitare il più possibile questo problema.

## 6. Riparo delle ferite

La riparazione delle ferite è costituita da 3 fasi principali che non si susseguono in maniera netta, ma che si sovrappongono in larga parte:

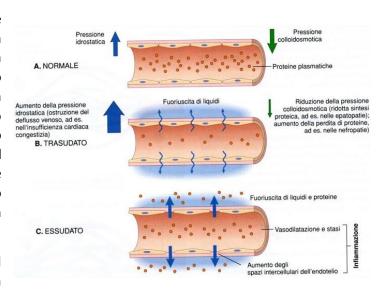
- -1 Fase infiammatoria. È la fase iniziale e dura pochi giorni. Si ha vaso-dilatazione, formazione del coagulo e migrazione di cellule, dal sistema circolatorio al tessuto danneggiato. In questa fase i neutrofili sono i primi protagonisti capaci di proteggere l'organismo dagli agenti infettivi, "disinfettando" la ferita.
- -2 Fase proliferativa. E' la seconda fase in cui si ha l'arrivo e la proliferazione di diversi tipi cellulari, tra cui fibroblasti e cellule endoteliali, che vanno a costituire un tessuto transitorio, chiamato tessuto di granulazione in cui è evidente il fenomeno dell'angiogenesi con la formazione di nuovi vasi sanguigni.
- -3 Fase di differenziamento. E' la fase finale in sui si ha il ripristino dell'aspetto iniziale del tessuto danneggiato, con la rigenerazione del tessuto sostenuta dal rimodellamento della matrice extracellulare. Per quanto riguarda i tempi passiamo da una prima fase in cui sono necessarie ore/giorni, fino all'ultima fase che si completa anche nell'arco di mesi, a seconda dell'entità del danno. Negli esempi che faremo ci riferiremo principalmente ad un prototipo di ferita cutanea dovuta a taglio superficiale con i margini vicini. Sebbene anche tali reazioni locali possano avere qualche manifestazione sistemica, la reazione è largamente confinata al sito interessato.



-1 Fase infiammatoria: L'infiammazione è una risposta stereotipata (sempre simile) dei tessuti vascolarizzati alle infezioni e ai danni tissutali, che richiama le cellule e le molecole dei sistemi di difesa dell'ospite, dal circolo sanguigno fino ai siti dove sono necessarie, per eliminare gli agenti causali. Sebbene nel linguaggio comune il termine "infiammazione" suggerisca un'accezione negativa, in realtà si tratta di una risposta protettiva essenziale per la sopravvivenza. L'infiammazione può essere acuta oppure cronica. La rapida risposta iniziale alle infezioni e al danno tissutale è chiamata infiammazione acuta. Si sviluppa tipicamente entro minuti o ore ed è di breve durata. Le sue caratteristiche principali sono la formazione di edema e la migrazione dei leucociti nel sito di infezione. Quando l'infiammazione acuta raggiunge l'obiettivo prefissato di eliminare gli agenti causali, la reazione diminuisce. Se questo obiettivo non riesce ad essere portato a termine, la reazione può progredire in una frase prolungata detta infiammazione cronica. Quest'ultima dura più a lungo ed è associata ad una distruzione patologica dei tessuti, alla presenza di linfociti e macrofagi, alla proliferazione dei vasi sanguigni e alla deposizione di tessuto connettivo. L'infiammazione acuta è una delle reazioni di difesa dell'ospite ed è parte attiva dell'immunità innata. Il riconoscimento e il contenimento degli agenti causali è il primo passo in tutte le reazioni infiammatorie. Diversi recettori e proteine circolanti sono in grado di riconoscere prodotti danno cellulare innescare Infiammazione acuta: Serve per proteggere l'ospite sia dalla causa iniziale del danno cellulare, sia dalle sue conseguenze. È deputata al contenimento dei danni e ciò è possibile grazie alle reazioni vascolari nell'infiammazione acuta che consistono nella variazione del flusso sanguigno e della permeabilità dei vasi, entrambe finalizzate a massimizzare il movimento delle proteine plasmatiche e dei leucociti al di fuori della circolazione verso il sito di infezione o lesione. La fuoriuscita di liquido, proteine e cellule dal sistema vascolare nel tessuto interstiziale nelle cavità corpo chiamata essudazione.

-Un essudato è un fluido extra-vascolare che ha un'alta concentrazione proteica. La sua presenza implica un aumento permeabilità dei capillari sanguigni innescato da qualche tipo di danno tissutale o da una infiammatoria reazione atto -Un trasudato è un fluido a basso contenuto di proteine. Si tratta di un ultra-filtrato del plasma sanguigno che viene prodotto come risultato di uno squilibrio osmotico o idrostatico senza aumento della permeabilità.

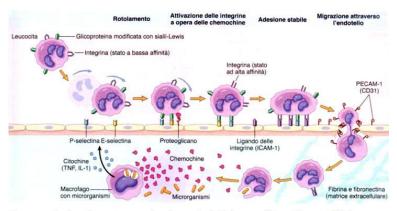
L'edema indica un eccesso di liquido nel tessuto interstiziale e può essere sia un essudato che un trasudato.



I cambiamenti nel flusso e nel calibro vascolare hanno inizio sin dalle prime fasi successive al danno. La vaso-dilatazione è indotta da mediatori vaso-attivi come l'istamina. Questa reazione ha come risultato un aumento del flusso sanguigno che causa calore e arrossamento (eritema) nel sito di infiammazione. La vaso-dilatazione è seguita da un aumento della permeabilità del microcircolo con fuoriuscita di fluido ricco di proteine. La perdita di liquidi e l'aumento del diametro dei vasi portano al rallentamento del flusso sanguigno (stasi), alla concentrazione dei globuli rossi nei vasi capillari e all'aumento della viscosità del sangue. I cambiamenti nel flusso sanguigno e nella permeabilità vascolare sono rapidamente seguiti da un afflusso di leucociti nel tessuto. Il passaggio dei leucociti dal lume fino al tessuto interessato è un processo a più fasi, mediato e controllato da molecole di adesione e da citochine di richiamo chiamate chemochine:

#### -1 Migrazione, rotolamento e adesione nel vaso del lume: l'endotelio vascolare nel suo stato inattivo non lega

le cellule circolanti, con l'infiammazione si attiva e lega i leucociti per consentirne la fuoriuscita dai vasi sanguigni. L'attacco dei leucociti alle cellule endoteliali è mediato da molecole adesione complementari la espressione viene aumentata dalle citochine. Quest'ultime sono secrete dalle cellule che riconoscono il danno, in modo tale da assicurare che i leucociti arrivino ai tessuti in cui sono presenti gli stimoli lesivi. Le reazioni iniziali sono mediate dalle selectine: L-selectina espressa dai



Processo di migrazione attraverso i vasi sanguigni. Qui sono raffigurati i neutrofili, le selectine, le chemochine, le integrine ecc.

leucociti, E-selectina espressa dall'endotelio e la P-selectina espressa dalle piastrine dell'endotelio. I loro ligandi sono oligosaccaridi e loro espressione, insieme all'espressione delle selectine è regolata da citochine. I macrofagi tissutali e le cellule endoteliali che incontrano i microrganismi e i tessuti necrotici rispondono secernendo diverse citochine che agiscono sulle cellule endoteliali adiacenti all'infezione e inducono l'espressione coordinata di molecole di adesione. Entro qualche ora le cellule endoteliali esprimono la Eselectina e i ligandi per la L-selectina. Altri mediatori come l'istamina stimolano la ridistribuzione della Pselectina sulla superficie delle cellule. I leucociti esprimono la L-selectina sull'estremità dei loro microvilli, e i ligandi per le E- e P- selectine, ognuno dei quali si lega alle molecole complementari delle cellule endoteliali. Si tratta di interazioni a bassa affinità che vengono distrutte facilmente dalla forza del flusso sanguigno. Come risultato abbiamo che i leucociti si staccano e si legano nuovamente sulla superficie endoteliale così da poter rotolare. Queste interazioni deboli nel rotolamento rallentano i leucociti e creano le condizioni per l'istaurarsi di un legame più saldo tra il leucocita e l'endotelio. Ciò è mediato ed è possibile grazie alle integrine. I leucociti normalmente esprimono le integrine in uno stato di bassa affinità. Le chemochine, che sono state prodotte nella sede del danno, si legano ai proteoglicani delle cellule endoteliali, vengono esposte ad alte concentrazioni sulla superfice endoteliale e legano e attivano i leucociti in fase di rotolamento. Una delle conseguenze di attivazione è il passaggio ad uno stato di alta affinità delle integrine espresse sui leucociti. La combinazione: espressione dei ligandi delle integrine sull'endotelio e aumento dell'affinità delle integrine sui leucociti, si traduce in un legame stabile tra leucocita ed endotelio. I leucociti, quindi, smettono di rotolare, il loro citoscheletro viene riorganizzato e vanno incontro ad un processo noto come spreading. -2 Migrazione attraverso l'endotelio e la parete del vaso: il passo successivo nel reclutamento dei leucociti è la loro migrazione attraverso l'endotelio chiamata trasmigrazione (diapedesi). Avviene principalmente nelle venule post-capillari. Le chemocrine agiscono sui leucociti adesi e li stimolano a migrare attraverso gli spazi endoteliali seguendo il loro gradiente di concentrazione. Molte molecole di adesione presenti nelle giunzioni intracellulari sono coinvolte nella migrazione, ma le principali le proteine CAM (cellular adhesion molecule) e in particolare **PECAM-1** di tipo immunoglobulinico. I leucociti dopo aver attraversato l'endotelio, perforano la membrana basale ed entrano nel sito extra-vascolare dove si accumulano

-3 Migrazione nei tessuti verso lo stimolo chemiotattico: dopo essere usciti dalla circolazione, i leucociti si muovono nei tessuti verso la sede del danno attraverso un processo chiamato chemiotassi, definito come il movimento lungo gradiente chimico. Sia sostanze esogene che endogene possono agire come fattori chemiotattici. Gli agenti esogeni più comuni sono i prodotti batterici, invece i fattori chemiotattici endogeni includono diversi mediatori chimici. Questi legano degli specifici recettori con 7 domini transmembrana accoppiati a proteine presenti sulla superfice dei leucociti. I segnali che partono da questi recettori attivano una serie di eventi a cascata che si concludono con il leucocita che si muove estendendo i filopodi che tirano la parte posteriore della cellula nella direzione dell'estensione. Il risultato è che i leucociti migrano verso lo stimolo infiammatorio nella direzione dei fattori chemiotattici prodotti localmente. Una volta che i leucociti sono stati richiamati nel sito di infezione o di morte cellulare devono essere attivati per svolgere le loro funzioni. La fuoriuscita di liquidi e leucociti dal circolo sanguigno verso il tessuto interessato porterà alla formazione di un edema ricco di acqua e di altri fattori provenienti dal circolo sanguigno, come, immunoglobuline, anticorpi e granulociti neutrofili. I granulociti sono le prime cellule che arrivano alla zona interessata e hanno il compito di sterilizzare il punto di ferita utilizzando specie reattive dell'ossigeno. Hanno attività fagocitica, sono carichi di granuli e riescono a tamponare rapidamente la potenziale infezione. La fagocitosi prevede tre passaggi sequenziali: (1) riconoscimento e attacco della particella che deve essere ingerita dal leucocita; (2) ingestione con conseguente formazione di un vacuolo fagocitico attorno al microrganismo; (3) uccisione e degradazione del materiale ingerito nel fagolisosoma. Quest'ultima è compiuta dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dalle specie reattive dell'azoto, derivate principalmente dall'ossido nitrico (NO). Questi insieme agli enzimi lisosomiali distruggono i detriti fagocitati. Il neutrofilo non dura molto nel sito di infiammazione, qualche ora o al massimo 1 giorno, dopo di che abbiamo l'intervento dei macrofagi che hanno il compito di difendere l'organismo e di dare inizio alle reazioni successive. L'edema che si forma verrà poi drenato attraverso il circolo linfatico, filtro fondamentale del sistema immunitario, contenente linfonodi ricchi di linfociti T e B. Questo processo descritto è importante, in quanto, con il drenaggio dell'edema, si avrà la raccolta di tutti i fattori estranei eventualmente entrati nella ferita ed una conseguente risposta immunitaria. In questa fase di infiammazione svolgono un ruolo fondamentale anche le trappole extracellulari dei neutrofili (NET) che sono reti fibrillari extracellulari che forniscono un'elevata concentrazione di sostanze antimicrobiche nei siti dell'infezione e prevengono la diffusione dei microrganismi intrappolandoli nelle fibrille. Sono prodotte dai neutrofili in risposta agli agenti patogeni e sono costituite da un reticolo viscoso di cromatina che lega e concentra le proteine dei granuli. I leucociti possono diventare essi stessi importati cause di danno alle cellule e ai tessuti sani come:

\*In alcune malattie infettive croniche la risposta prolungata dell'ospite contribuisce alla patologia più del microorganismo stesso (infiammazione granulomatosa nella tubercolosi)

In tutte queste situazioni, i meccanismi mediante i quali i leucociti danneggiano i tessuti sani sono gli stessi meccanismi coinvolti nella difesa antimicrobica, il problema patologico nasce dalla permanenza di una risposta che necessariamente deve essere limitata nel tempo per non creare danni al tessuto. L'infiammazione termina quando l'agente causale è stato eliminato. La reazione si arresta perché i mediatori vengono inattivati e i leucociti che sono stati reclutati nel sito infetto, muoiono. Vengono attivati meccanismi antiinfiammatori che servono a controllare la risposta e ad evitare che essa causi un danno eccessivo all'ospite. Una volta che l'infiammazione ha raggiunto il suo obiettivo mette in moto il processo di riparazione tissutale. In questo processo il tessuto leso è sostituito attraverso la rigenerazione delle cellule sopravvissute e il

<sup>\*</sup>Quando la risposta infiammatoria è diretta conto i tessuti dell'ospite (malattie autoimmuni)

<sup>\*</sup>Oppure quando l'ospite reagisce eccessivamente contro le sostanze ambientali non pericolose (malattie allergiche)

riempimento degli spazi con il tessuto connettivo (cicatrizzazione). Parte fondamentale della fase infiammatoria non è solo la vaso-dilatazione, ma anche l'emorragia e la formazione di un coagulo di fibrine che formeranno la crosta sulla parte superiore della ferita.

-Infiammazione cronica: è una risposta di durata prolungata, in cui l'infiammazione, il danno tissutale e i tentativi di riparazione coesistono. Può seguire all'infiammazione acuta, quando il riparo del tessuto non viene portato a termine, oppure può essere causato da un agente non eliminabile. Questo tipo di infiammazione può presentarsi nelle seguenti situazioni: Infezioni persistenti, malattie da ipersensibilità (malattie autoimmuni), esposizione prolungata dell'organismo ad agenti tossici, ed infine in malattie neurodegenerative (Alzheimer). L'infiammazione cronica è caratterizzata da infiltrazione di cellule mononucleate che comprendono macrofagi, linfociti e plasmacellule; distruzione tissutale indotta dall'agente causale persistente; ed infine dai processi di riparazione rappresentati dalla sostituzione dei tessuti danneggiati con tessuto connettivo.

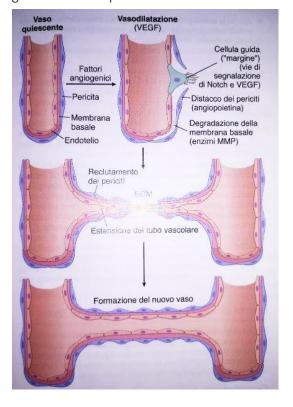
-2 Fase proliferativa: Dobbiamo aspettare 2/3 giorni affinché inizi la fase di granulazione. Alcuni tessuti sono in grado di sostituire i propri componenti danneggiati per tornare all'assetto originario. Questo processo prende il nome di rigenerazione e può avvenire tramite due eventi: 1- la rigenerazione mediante proliferazione delle cellule residue (danneggiate) che sopravvivono a stimoli lesivi e mantengono la capacità di proliferare, per esempio, negli epiteli in rapida divisione della cute e dell'intestino e in alcuni organi parenchimali, in particolare il fegato.

2- la maturazione delle cellule staminali del tessuto contribuisce al ripristino dei tessuti danneggiati. Tuttavia i mammiferi hanno una limitata capacità di rigenerare tessuti e organi danneggiati e solo alcuni tessuti sono in grado di rigenerare, e spesso solo se il danno non è molto esteso. Se i tessuti danneggiati non sono in grado di rigenerarsi completamente, la riparazione avviene attraverso la deposizione di matrice extracellulare (fibrosi del tessuto) che può causare la formazione di una cicatrice. Sebbene la cicatrice fibrosa non rappresenti una condizione di normalità, comunque è in grado di fornire una sufficiente stabilità strutturale che generalmente permette al tessuto danneggiato di funzionare. Per la rigenerazione dei tessuti danneggiati è fondamentale la proliferazione cellulare che è guidata da fattori di crescita ed è dipendente dall'integrità della matrice extracellulare. Il tessuto di granulazione permette la rigenerazione e riparazione del tessuto anche

grazie alla formazione di nuovi fasi sanguigni, **l'angiogenesi**. La formazione di nuovi vasi è un processo che nell'adulto non avviene frequentemente, ma solo in quelle situazioni in cui il tessuto viene danneggiato. Nuovi vasi sanguigni possono essere creati tramite due processi: \*Vasculogenesi: formazione di un vaso a partire da precursori, che possono derivare ad esempio dal midollo osseo, vengono rilasciati in circolo arrivano nel centro di riparazione, extravasano e contribuiscono alla realizzazione di nuovi vasi.

<u>\*Angiogenesi:</u> Prevede la formazione di una gemma da un vaso preesistente.

Il fenomeno più importante della riparazione è quello dell'angiogenesi, processo relativamente complesso in cui sono coinvolti diversi fattori di crescita. Un esempio che può essere applicato, anche se non riguarda una ferita, è quello che avviene nei tumori, una massa di cellule che crescendo ha bisogno di nuovi vasi che portino ossigeno e nutrimento. In questo caso il principale stimolo che fa produrre i fattori di richiamo delle cellule endoteliali è l'ipossia (questa è una



regola generale). La dove c'è un tessuto ipossico nelle cellule ancora vive di quel tessuto si assiste alla stabilizzazione del fattore di trascrizione HIF1, fattore indotto dall'ipossia che a sua volta induce l'espressione di fattori pro-angiogenesi come il VEGF. Quest'ultimo è controllato a livello del promotore dalla presenza nel nucleo di HIF1. HIF1 ha una modalità di regolazione molto particolare: in normossia viene degradato continuamente, ma nel momento in cui c'è carenza di ossigeno si stabilizza e diventa fattore trascrizionale. VEGF viene rilasciato nella zona ipossica e determina una stimolazione delle cellule dell'endotelio già esistenti che formano una gemma (sprouting) e grazie alla migrazione e alla divisione delle cellule endoteliali, costituiranno una nuova diramazione del vaso. Un aspetto inziale importante è anche quello della degradazione della membrana basale che permette la migrazione delle cellule endoteliali. L'evento è relativamente complesso poiché non è sufficiente che le cellule endoteliali si orientino e migrino, ma devono essere anche stabilizzate. Cioè un vaso non può essere formato solo da cellule endoteliali, ma anche da altri tipi cellulari. I periciti sono cellule necessarie per il mantenimento dell'integrità del vaso, sono sotto il controllo di altri fattori di crescita come il TGF- $\beta$  e soprattutto il PDGF che ne permette la migrazione e l'adesione del pericita sull'endotelio.

- -formazione del tessuto di granulazione: una modificazione istologica del tessuto connettivo che prende il nome dalla presenza di granuli, osservabili al microscopio, dovuti alla formazione di abbozzi dei vasi sanguigni. Il suo aspetto istologico è caratterizzato dalla proliferazione di fibroblasti e dai nuovi delicati capillari a parete sottile (angiogenesi). Il tessuto di granulazione invade progressivamente il sito danneggiato e la quantità di tessuto di granulazione che si forma dipende dalle dimensioni del deficit tissutale creato dalla ferita e dall'intensità di infiammazione. Dopo 3/7 giorni scompaiono i neutrofili, abbiamo i macrofagi e vengono richiamati nella zona i fibroblasti. I macrofagi hanno un ruolo fondamentale nella riparazione in quanto eliminano gli agenti dannosi e il tessuto danneggiato, forniscono i fattori di crescita per la proliferazione di varie cellule e rilasciano le citochine che regolano l'infiammazione.
- -3 Fase di differenziamento: In quest'ultima fase avviene la formazione della cicatrice tramite deposizione del tessuto connettivo nelle zone in cui non è avvenuta la rigenerazione completa del tessuto precedente. Questo evento si completa in due fasi: 1 migrazione e proliferazione dei fibroblasti nel sito della lesione, 2 deposizione di proteine ECM. Questi processi sono coordinati da citochine e fattori di crescita le cui fonti principali solo le cellule infiammatorie, in particolare i macrofagi presenti nei siti di lesione e nel tessuto di granulazione. Le sedi di infiammazione sono anche ricche di mastociti e qualche linfocita. Ognuno di questi tipi cellulari può secernere citochine e fattori di crescita che contribuiscono alla proliferazione e alla crescita dei fibroblasti. Il fattore di crescita trasformante  $TGF-\beta$  è il più importante per la sintesi e la deposizione delle proteine del tessuto connettivo. È prodotto dalla maggior parte delle cellule del tessuto di granulazione e ha la funzione di stimolare la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti, l'aumento della sintesi di collagene e di fibronectina. Il TGF-β non è coinvolto solo nella cicatrizzazione, ma anche nello sviluppo della fibrosi nei polmoni, nel fegato e nei reni a seguito di infiammazione conica. Man mano che la guarigione procede, il numero di fibroblasti proliferanti e di nuovi vasi sanguigni diminuisce. In ultimo il tessuto di granulazione evolve in una cicatrice composta da fibroblasti fusiformi, gran parte inattivi, da denso collagene, frammenti di tessuto elastico e altri componenti ECM. Con la maturazione della cicatrice c'è una progressiva regressione vascolare che alla fine trasforma il tessuto di granulazione altamente vascolarizzato in una cicatrice in gran parte non vascolarizzata (rosea). Alcuni dei fibroblasti acquisiscono le caratteristiche delle cellule muscolari lisce, i miofibroblasti, e contribuiscono, nel tempo, alla contrazione della cicatrice.

Il fatto che il **tessuto di granulazione sia molto più vascolarizzato** della cicatrice dipende dal fatto che il la fase della proliferazione ha bisogno di più energia per realizzarsi, per sostenere l'attività di diverse cellule. Alla fine della riparazione, invece, i nuovi vasi non sono più utili e avviene la regressione dell'angiogenesi, deposizione di collagene di tipo 1 e di seguito altre proteine di matrice. Occorrono tre settimane, o mesi per avere una riparazione terminata.

Abbiamo visto e parlato di ferite i cui i margini sono molto vicini fra di loro, tipica ferita da taglio, in cui la lesione interessa solo lo strato epiteliale e il principale meccanismo di riparazione è la rigenerazione epiteliale, anche detta unione primaria o guarigione di prima intenzione. L'incisione provoca l'interruzione localizzata della continuità della membrana basale epiteliale e la morte di un numero relativamente ridotto di cellule. La riparazione consiste in tre processi collegati: infiammazione, proliferazione di cellule e formazione della cicatrice. Non tutte le ferite sono così, ci possono essere anche quelle che hanno margini più ampi e la perdita cellulare e tissutale è maggiore. Esempi sono le ferite estese, gli ascessi, l'ulcerazione e la necrosi ischemica (infarto) di organi parenchimali. In questi casi il parleremo di riparazione di seconda intenzione che comprende una combinazione dei processi di rigenerazione e cicatrizzazione. In questi casi c'è bisogno dell'attivazione di nuovi processi, rispetto a quelli visti precedentemente, come quelli che avvicinano i margini della lesione. Questa attività viene svolto dai miofibroblasti, un tipo cellulare che deriva dai fibroblasti, ma somigliano a cellule muscolari lisce poiché hanno componenti come l' $\alpha$ -actina che permette la contrazione. Questi si dispongono uno vicino all'altro per cercare di avvicinare più possibile i margini della lesione. (I miofibroblasti si possono ottenere facilmente in coltura partendo dai fibroblasti e utilizzando il fattore di crescita TGF-β che nella ferita determina la formazione e il differenziamento dei miofibroblasti) Queste cellule non corrispondono ad un fenotipo terminale, quindi possono tornare indietro, oppure nel momento in cui l'organismo non ne ha più bisogno, muoiono.

Cose che possono andare male. La riparazione dei tessuti può essere influenzata da molteplici fattori, che spesso riducono la qualità o l'efficacia del processo riparativo. Le variabili che modificano la guarigione possono essere estrinseche o intrinseche al tessuto danneggiato, sistemiche o locali: -Fattore meccanico: una ferita soggetta a continuo movimento ripara più lentamente. Inconsciamente noi sappiamo come comportarci quando ci feriamo: cerchiamo di isolare la lesione, di proteggerla e di limitare la mobilità di quel tessuto. La ferita però possiamo procurarcela anche nei tessuti che sono in continuo movimento, ad esempio agli angoli della bocca, in questi casi la lesione sarà continuamente sotto stress e non riuscirà a rimarginare con le tempistiche attese. Anche con l'aumento della pressione locale o la torsione, possiamo avere il distacco della ferita la sua deiscenza.

- -Disidratazione: nei soggetti disidratati ci sarà una maggiore difficoltà nella riparazione della lesione.
- -Infezione: ferite cutanee ci dimostrano come sia importante l'integrità della cute per proteggerci dagli agenti patogeni, batteri, virus. Nel momento in cui perdiamo l'integrità della cute siamo soggetti a grandi quantità di infezione, clinicamente una delle cause di ritardo più importanti nella guarigione. L'infezione se particolarmente abbondante trova terreno fertile nella ferita, prolunga l'infiammazione, aumenta il danno tissutale locale e rallenta notevolmente la capacità dell'organismo di rimarginare la ferita.
- -Diabete: è una malattia metabolica che compromette la riparazione tissutale ed è una delle cause sistemiche più importanti della cicatrizzazione anomala delle ferite. Soggetti diabetici hanno una minore capacità nel riparare le ferite.
- -Glucocorticoidi (steroidi) rallentano la riparazione della ferita poiché hanno effetti antinfiammatori e la loro somministrazione può alterare la formazione della cicatrice in seguito all'inibizione della produzione di TGF-β e alla diminuzione della fibrosi. In alcuni casi però gli effetti antinfiammatori di questi steroidi sono benefici. L'infiammazione non è una parte della malattia, ma una risposta dell'organismo per cercare di riparare più velocemente, se inibiamo l'infiammazione, diminuiamo la velocità di riparazione.
- **-L'età:** sappiamo quanto sia più semplice riparare le ferite nei soggetti più giovani. Ciò è dovuto alla perdita di staminalità, di alcuni tessuti o tipi cellulari, alla riduzione nel numero di neutrofili e miofibroblasti.
- -Carenza nutritiva: carenza di proteine e soprattutto di alcune vitamine come la vitamina C, fondamentale per la formazione e la maturazione del collagene. (Il Lime è il nome di un limone particolarmente aspro ed è anche

il nomignolo dato in passato ai marinai inglesi (Limeys). Questo perché anticamente chi si imbarcava oltre alla paura del naufragio, correva il rischio di contrarre una malattia che causava affaticamento, sanguinamento ed emorragie che non guarivano e portano alla morte (scorbuto). Questo succedeva perché per più di un mese i marinai non assumevano vitamina C e a causa della sua carenza non si aveva più la formazione di collagene. Gli inglesi furono i primi a cercare il motivo di queste continue morti e scoprirono che somministrando succo di limone ai marinai, le morti diminuivano notevolmente e gli ammalati guarivano. La marina inglese decise così di imbarcare ogni volta casse di limoni e lime.

Rimanendo nell'ambito patologico, può avvenire una **rottura della ferita** a seguito di svariate condizioni: \*Pressione idrostatica al di sotto della lesione a seguito di interventi chirurgici, come ad esempio a livello intestinale si accumula pressione idrostatica e si ha la rottura della ferita (deiscenza). \*Ulcerazione (formazione di ulcere) ferite che non riparano, spesso dovuto ad una cattiva perfusione: non arriva abbastanza sangue e liquidi all'interno della ferita.

\*Eventi di ipertrofia, nella cicatrice ipertrofica si assiste ad un aumento di volume a ridosso della ferita. L'aspetto più eclatante è il cheloide, una formazione cutanea estroflessa che va al di là del margine della cute. È molto frequente nelle persone di colore, non si sa per quale motivo, ma è collegata ad un'eccessiva deposizione di collagene che porta ad un aumento dello spessore della cute, sopra viene riepitelizzata. Ci può essere anche un'ipertrofia del tessuto di granulazione a causa soprattutto dei fibroblasti, con significativo aumento del loro numero.

Possiamo riscontrare un ultimo evento che è quello patologicamente più rilevante: la fibrosi. È legato ad uno stato di infiammazione cronica e ad un evento dannoso persistente. Nel danno continuo non c'è la possibilità di concludere l'infiammazione, il primo stadio, e ciò provoca la non possibilità di completare l'evento di riparazione. A questo punto l'organismo sceglie la strada che porta ad un danno minore: deposizione di matrice extracellulare. La malattia fibrosi prende il nome da questa deposizione di matrice extracellulare al posto delle cellule, del parenchima. Abbiamo parlato di steatosi epatica e abbiamo visto che questa può evolvere in cirrosi perché il danno continuo indotto non può essere riparato e le cellule epatociti vengono sostituiti da matrice extracellulare. La cirrosi epatica è uno stato particolare di fibrosi. La fibrosi può interessare diversi tessuti. Il diabete di tipo 2 è una patologia cronica ad alta prevalenza in Europa, la cui causa è il mancato controllo di glucosio nel sangue. Elevati livelli di glucosio nel sangue danneggiano l'endotelio, conferendo rigidità alle arterie che tendono a stringersi. Gli elevati livelli di glucosio nel sangue portano anche a neuropatia: danneggiano delle terminazioni nervose che provoca una diminuzione della sensibilità al dolore e alla percezione del danno. Si perde la sensibilità alla ferità. I meccanismi comportamentali evolutivi portano l'organismo a sapere che quando ci feriamo dobbiamo mettere in atto comportamenti che facilitano il riparo della ferita. Il diabetico perde questa percezione perché le terminazioni nervose sulla ferita non gli danno più lo stimolo alla percezione del danno. È infatti molto frequente nel diabetico l'ulcerazione dei piedi poiché questi non vengono controllati frequentemente, manca il segnale di pericolo e la ferita si ulcera nel tempo. Un altro aspetto che proviene sempre dagli alti livelli di glucosio nel sangue è il danneggiamento di arterie e capillari che portano meno ossigeno. La ferita ha bisogno di ossigeno e nutrienti, se arteriole non sono funzionanti, ci sarà uno scarso apporto di ossigeno. Alti livelli di glucosio quindi compromettono anche l'attività del sistema immunitario, i neutrofili hanno una ridotta reattività nel combattere la ferita. Se non funziona il sistema immunitario si avrà un riparo più lento dell'infezione. Ferita più lenta nel riparo può portare ad uno stato infiammatorio cronico legato a fibrosi e a una compromissione dei normali processi di riparazione.

