Sbobina patologia 17/04/17 1°ora
Sbobinatore: Hajar Benaly
Controllore: Giovanni Sernaglia

ACCUMULO DI SPECIE REATTIVE E DI RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO (STRESS OSSIDATIVO)

Riprendiamo i **radicali liberi** e lo stress ossidativo e continuiamo a parlare di **ROS**, specie reattive dell'ossigeno, prodotte da tutte le cellule con capacità fagocitica (neutrofili in grandissima parte). *Nella prossima lezione ci occuperemo di infiammazione e tratteremo il ruolo dei neutrofili e macrofagi.* I ROS sono uno strumento di distruzione di massa dei patogeni che cercano di infettarci. L'avvento dei ROS è legato sempre e comunque ad un danno.

I radicali liberi decadono spontaneamente sia perché sono altamente instabili avendo un singolo elettrone spaiato sull'orbitale esterno (è una situazione di poca stabilità, c'è tendenza a perdere questo elettrone per cui l'emivita dei ROS è abbastanza breve) sia perché vengono rimossi al termine dell'infiammazione da enzimi specifici come la superossido-dismutasi.

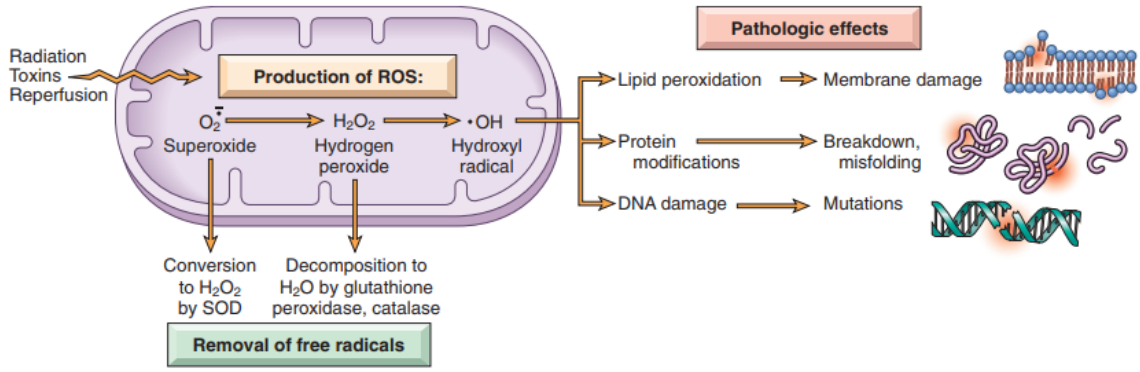


Fig. 2.17 The generation, removal, and role of reactive oxygen species (ROS) in cell injury. The production of ROS is increased by many injurious stimuli. These free radicals are removed by spontaneous decay and by specialized enzymatic systems. Excessive production or inadequate removal leads to accumulation of free radicals in cells, which may damage lipids (by peroxidation), proteins, and DNA, resulting in cell injury. *SOD*, Superoxide dismutase.

L'immagine soprastante tratta lo stress ossidativo a livello mitocondriale. La SOD, superossido dismutasi, converte l'anione superossido in perossido di idrogeno.
Vengono prodotti gli ioni superossido e perossido di idrogeno che viene portato via da catalasi[1] e perossidasi[2] specifiche.
I Radicali idrossilici (OH) se fuoriescono generano:

- **Perossidazione lipidica delle membrane:** "buchi" nelle membrane.
- **Modificazione delle proteine**: *misfolding*, stress del reticolo endoplasmatico.
- **Danni al DNA** e quindi mutazioni, a seconda di dove avvengono queste mutazioni si altereranno delle funzioni legate a proteine codificate da questi geni.

L'immagine quindi riassume che cosa succede quando abbiamo la fuoriuscita dei radicali liberi.
Da ricordare: 1) le ROS hanno una vita breve (che vedremo nell'infiammazione acuta) e 2) l'esistenza di enzimi deputati ad eliminarli.
Un difetto genetico (come nella sclerosi laterale amiotrofica) che causa la perdita della proteina superossido dismutasi comporta una patologia.

---

[1] la *catalasi*, presente all'interno dei perossisomi, converte H_2O_2 (2H2O2 → O2+ $2H_2O$);
[2] la *glutatione perossidasi* ha un effetto protettivo contro il danno,
catalizzando la degradazione dei radicali liberi (H_2O_2 + 2GSH → GSSG [omodimeri di glutatione] + $2H_2O$, oppure 2OH + 2GSH → GSSG + $2H_2O$).

DANNO CELLULARE CAUSATO DA TOSSINE

Una *injury* cellulare può essere causata da tossine. *Esempio: il botulino che ora è adoperato in medicina estetica per "stirare" le rughe ma che di fatto interferisce in maniera drammatica sulle sinapsi nervose (sui recettori acetil-colinergici).*
Le tossine sono di due tipi:

- Tossine che agiscono direttamente sulle cellule legandosi ad una componente di un determinato organismo cellulare o di una membrana. Ad esempio, negli avvelenamenti da cloruro di mercurio (nel pesce ad esempio), il mercurio si lega ai gruppi solfidrilici della membrana cellulare e delle membrane di organuli. Se si lega alle membrane inibisce i canali ionici ATP-dipendenti, se i canali ionici ATP-dipendenti non funzionano, la cellula si gonfia, aumentano di dimensioni gli organelli e questo manda la cellula poi in necrosi. Molte tossine sono prodotte da microrganismi. *Alcune le incontrerete facendo gli schemi in oncologia che lavora per protocolli quindi sarà importante conoscere come sono fatti gli agenti chemioterapici per conoscerne gli effetti indesiderati immediati e a lungo termine. In caso di un tumore non aggredibile chirurgicamente o con la radioterapia mirata, una chemioterapia efficace è quella che riesce, pagando piccoli prezzi quali piccole parestesie e mini-danni neurologici prolungati, a limitare o diminuire la massa tumorale. Abbiamo dei protocolli che ci diranno quando fermarci perché i chemioterapici hanno ovviamente degli effetti collaterali che possiamo rilevare tra le tossine che ci auto induciamo per curare delle patologie.*

- **Tossine latenti**[3]: la tossina inibisce i recettori e di conseguenza le vescicole che trasportano gli stimoli colinergici.
  Le sostanze tossiche che entrano nel nostro organismo pur non essendo di per sé citotossiche potrebbero essere oggetto di una sorta di riarrangiamento ad esempio a livello del fegato . Nel fegato vengono metabolizzate da parte del citocromo P-450 che ha come compito quello di degradare le molecole, questo suo processo però può portare alla produzione di radicali liberi.
  Ad esempio, il tetracloruro di Carbonio (CCL_4) è stato tolto dal commercio perché una volta processato dal citocromo P-450 comportava come risultato finale la produzione di specie instabili di radicali. Quindi va tenuta in considerazione una eventuale citotossicità che in questo caso viene definita come citotossicità post metabolica cioè post processamento da parte di un enzima specifico.
  Il CCL_4 causa la produzione di radicali liberi a livello epatico che determina la **perossidazione** dei fosfolipidi di membrana ovvero la membrana viene danneggiata, il reticolo endoplasmatico si gonfia e si staccano i ribosomi (danno a livello delle membrane).
  Questi radicali liberi possono interferire con la sintesi di apolipoproteine che servono per processare i trigliceridi, se viene diminuita la sintesi di apolipoproteine i trigliceridi non vengono più processati e vi sarà un accumulo di lipidi nel fegato.

STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Quando un injury colpisce i mitocondri, diminuisce la quantità di ATP, i canali ionici perdono funzione e la cellula si gonfia, questi rappresentano dei segnali pre-necrotici.

Non soltanto tossine ma anche proteine ***unfolded,*** ripiegate male, funzionano da agenti stressanti del reticolo endoplasmatico. Quando si ha una quantità piccola-media di proteine non foldate correttamente la cellula usa le **IRE:** le IRE sono proteine che se fosforilate si legano alle proteine mal ripiegate generando dimeri e creando una risposta adattativa a queste. Questa risposta, attraverso IRE, fa parte del *reverse injury*

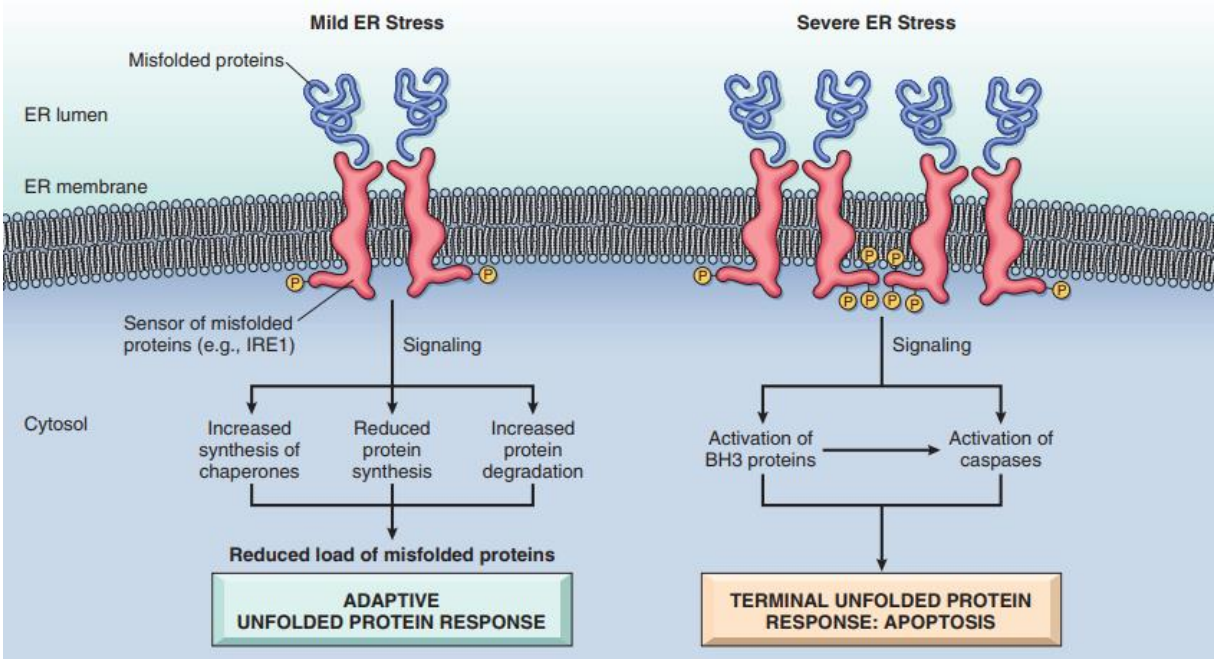
[3] Le sostanze chimiche tossiche, nella maggior parte dei casi, non sono biologicamente attive nella forma originaria e agiscono sulle molecole bersaglio solo dopo essere state convertite a metaboliti tossici reattivi. Queste reazioni di conversione sono solitamente svolte dalle ossidasi P-450 a funzione mista nel RE liscio del fegato e di altri organi

[*le basi patologiche della malattia. Robbins*]

mechanisms ovvero la cellula cerca di reagire a queste proteine mal foldate. Dunque abbiamo: trasduzione del segnale, riduzione della sintesi delle proteine, aumento della degradazione di queste, diminuzione del metabolismo cellulare e l'aumento della sintesi di chaperonine. La cellula targhetta queste proteine misfolding per demolirle con più efficacia. Quando queste proteine sono troppe le IRE-segnalatrici attiveranno le proteine BH3 che a loro volta attiveranno le caspasi che comporteranno l'apoptosi della cellula.

Quindi: troppe proteine → molte IRE fosforilate→BH3→ apoptosi.

Questo elemento responsivo IRE è di fondamentale importanza per limitare i danni dalle proteine unfolding che possono essere presenti a livello delle nostre cellule.



PATOLOGIE CAUSATE DA PROTEINE DIFETTATE (misfolding, carenza, mal funzionamento, ecc.)

Patologie legate a mancanza della proteina:

Disease	Affected Protein	Pathogenesis
Diseases Caused by Mutant Proteins That Are Degraded, Leading to Their Deficiency		
Cystic fibrosis	CFTR	Loss of CFTR leads to defects in chloride transport and death of affected cells
Familial hypercholesterolemia	LDL receptor	Loss of LDL receptor leads to hypercholesterolemia
Tay-Sachs disease	Hexosaminidase β subunit	Lack of the lysosomal enzyme leads to storage of GM2 gangliosides in neurons
Diseases Caused by Misfolded Proteins That Result in ER Stress-Induced Cell Loss		
Retinitis pigmentosa	Rhodopsin	Abnormal folding of rhodopsin causes photoreceptor loss and cell death, resulting in blindness
Creutzfeldt-Jacob disease	Prions	Abnormal folding of PrPsc causes neuronal cell death
Alzheimer disease	A_β peptide	Abnormal folding of A_β peptide causes aggregation within neurons and apoptosis
Diseases Caused by Misfolded Proteins That Result From Both ER Stress-Induced Cell Loss and Functional Deficiency of the Protein		
Alpha-1-anti-trypsin deficiency	α-1 anti-trypsin	Storage of nonfunctional protein in hepatocytes causes apoptosis; absence of enzymatic activity in lungs causes destruction of elastic tissue giving rise to emphysema

*Selected illustrative examples of diseases are shown in which protein misfolding is thought to be the major mechanism of functional derangement or cell or tissue injury.
CFTR, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; *LDL*, low-density lipoprotein.

- **Fibrosi cistica**: Manca la proteina **CFTR**[4] e quindi non funziona più il canale del cloro. Malattia autosomica recessiva

- **Ipercolesterolemia familiare**: la perdita del recettore **LDL** (Low Density Lipoprotein) comporta la ipercolesterolemia familiare. Manca il recettore per queste proteine che non saranno internalizzate e processate, determinando un aumento dei livelli di LDL (colesterolo cattivo). Malattia autosomica recessiva.
- **Tay-Sachs** è una malattia autosomica recessiva legata ad una mancanza di **esosaminidasi A** che è l'enzima che processa l'enzima lisosomiale. Quando non funziona porta all'accumulo di ganglioside GM2 a livello dei neuroni. È un esempio di malattia frequente in alcune popolazioni dove si sono fissate queste mutazioni (ebrei ashkenaziti).
  Gli ebrei ashkenaziti sono i più studiati per quanto riguarda questa patologia, tant'è che il centro di riferimento per la Tay-Sachs è a Tel Aviv. Gli ebrei aschenaziti sono ebrei di origine dei paesi dell'est. Gli ashkenaziti, sembra siano molto conservativi dal punto di vista delle unioni. Quindi c'è una consanguineità culturale che ha fatto sì che si fissasse la mutazione, tanto è che anche la diaspora degli aschenaziti è stata seguita ovviamente dalla mutazione.

Patologie causate da proteine misfolding:

- **Retinite pigmentosa**: la rodopsina è la proteina mal ripiegata che comporta la perdita di fotorecettori, morte cellulare e cecità.
- **Creutzfeldt-Jacob:** "la mucca pazza", *qual è la causa?* Malattia prionica.
  Risposta studente: Una proteina piegata male induce altre proteine a ripiegarsi male e quindi si formano degli ammassi proteici che portano alla morte della cellula a livello neuronale.
  La *mad cow* è stata legata a teorie relative al fatto che i mangimi per le mucche immobilizzate siano derivati dalle mucche stesse, al macello quello che viene scartato viene riutilizzato come mangime (proteico). Questo succede per qualsiasi altro animale.
  Il **kuru** è una malattia riscontrata nei papuasi della Nuova Guinea e che ha molte somiglianze con la malattia di Creutzfeldt-Jakob. Sono Popolazioni particolarmente primitive, guerriere e antropofaghe che avevano come credenza il fatto che se mangiavano il cervello di un nemico particolarmente forte ne acquisivano le capacità e quindi venne osservata in tempi storici per la medicina. Queste patologie sono legato ad una proteina misfoldata. *Creutzfeldt-Jacob ha origine genetica? A volte sì e altre no.* Ci sono forme genetiche che causano questo misfolding del prione (queste interessano la clinica) e altre come "*la mucca pazza*" legate all'ingestione del prione misfolding. Questo è un esempio abbastanza drammatico di come a livello del sistema nervoso centrale una piccola proteina mal foldata possa comportare dei danni neurologici.
- **Alzheimer:** causato da un folding anomalo del peptide amiloide che si aggrega e manda i neuroni in apoptosi (è una condizione lenta e progressiva). L'Alzheimer è anche legato a neuro-infiammazione. Il misfolding di una proteina targettizza direttamente i neuroni causando la patologia.
  Questo ci insegna che se noi abbiamo un difetto a livello dell'IRE avremmo tante proteine misfoldate e quindi passiamo dei guai.

Nelle malattie causate da proteine misfolding derivate sia dal reticolo endoplasmatico stressato, quindi IRE, che da deficienza funzionale, la diagnosi molecolare risulta essere difficile perché possono esserci delle mutazioni leggere che modificano sia la forma di alpha-1-anitripsina sia gli IRE.
Non molto tempo fa il deficit alpha-1-antitripsina era rappresentato solo come patologia genetica mentre ora vanno considerati anche gli IRE e quindi il reticolo endoplasmatico. Il deficit di alpha-1-antitripsina causa danni epatici (a causa di apoptosi) ma anche distruzione del tessuto elastico a livello polmonare comportando un enfisema e tutta una serie di complicanze muscolari.

[4] è una proteina di membrana che svolge la funzione di canale ionico per lo ione cloruro, presente nelle cellule dei vertebrati.

Nella Fibrosi cistica CFTR è il gene principale in quanto è un gene modificatore, a livello polmonare distrugge l'elastina e diminuisce la capacità polmonare. Se a parità di mutazione del gene CFTR si ha un fenotipo più grave allora un deficit di alpha-1-antitripsina può spiegare questo fenomeno.

Impariamo ad adoperare tutte le informazioni in maniera integrata

DANNI AL DNA

Dobbiamo pensare subito al guardiano del genoma, la **p53**. Siccome i ROS o altri tipi di *injuries* danneggiano il DNA, il p53 o blocca il ciclo cellulare in G1 concedendo del tempo alla cellula per ripararsi o, nel caso in cui la cellula subisce dei danni ai geni che codificano per proteine che riparano il DNA, induce l'apoptosi.
Quindi abbiamo tutte le peggio cose che ci possano capitare a livello cellulare ma anche tutti i sistemi per ripararle. Quando questi sistemi di riparazione che possono essere: genetici trascrizionali, post trascrizionali e post traduzionali funzionano tutto va bene, quando qualcosa non funziona ecco che compaiono le patologie.

DANNO AI MITOCONDRI

I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale.
-In condizioni di assenza di ossigeno e presenza di tossine il mitocondrio subisce un danno profondo che comporta: la riduzione degli ATP, l'aumento della produzione di ROS e infine necrosi.
-Pochi segnali di sopravvivenza, danni al DNA e alle proteine determinano invece l'aumento dell'espressione di proteine pro-apoptotiche e la diminuzione dell'espressione di proteine anti-apoptotiche.
Le cellule tumorali esprimono il gene PD1 che controlla in senso negativo l'apoptosi.
Segnali pro-apoptotici →leakage di citocromo → leakage protonico →apoptosi.
Se il mitocondrio non funziona cosa accade? La fosforilasi ossidativa non funziona più o potrebbe essere difettosa quindi si ha poco ATP con formazione di ROS. Quando il mitocondrio soffre, fa pori e si formeranno dei canali di membrana mitocondriale chiamati "pori di transizione e di permeabilità", questi comportano la perdita della matrice mitocondriale → cala il pH → la pompa protonica viene compromessa →citocromo-C esce fuori→ apoptosi.
Se la membrana mitocondriale viene danneggiate si assiste ad un calo di ATP che comporta la necrosi oppure apoptosi della cellula.
Se la membrana plasmatica viene danneggiata, la cellula si rigonfia, acquisisce acqua, potassio e perde sodio.
Condizione ancora più grave si ha nel caso di un injury a livello delle membrane lisosomiali: gli enzimi lisosomiali usciranno fuori, cambierà il pH a livello cellulare (lisosoma ha un pH 5 quindi acido) e ci sarà una distruzione della membrana citoplasmatica.

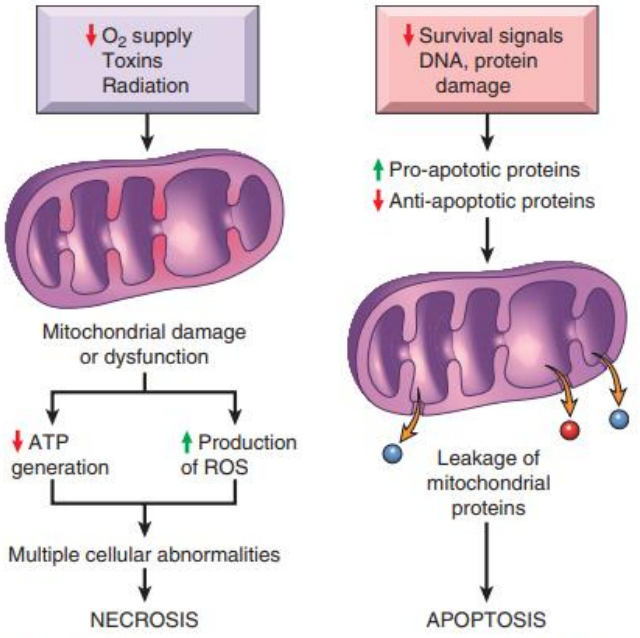


Fig. 2.19 Role of mitochondria in cell injury and death. Mitochondria are affected by a variety of injurious stimuli and their abnormalities lead to necrosis or apoptosis. This pathway of apoptosis is described in more detail later. *ATP,* Adenosine triphosphate; *ROS,* reactive oxygen species.

METAPLASIA[5]

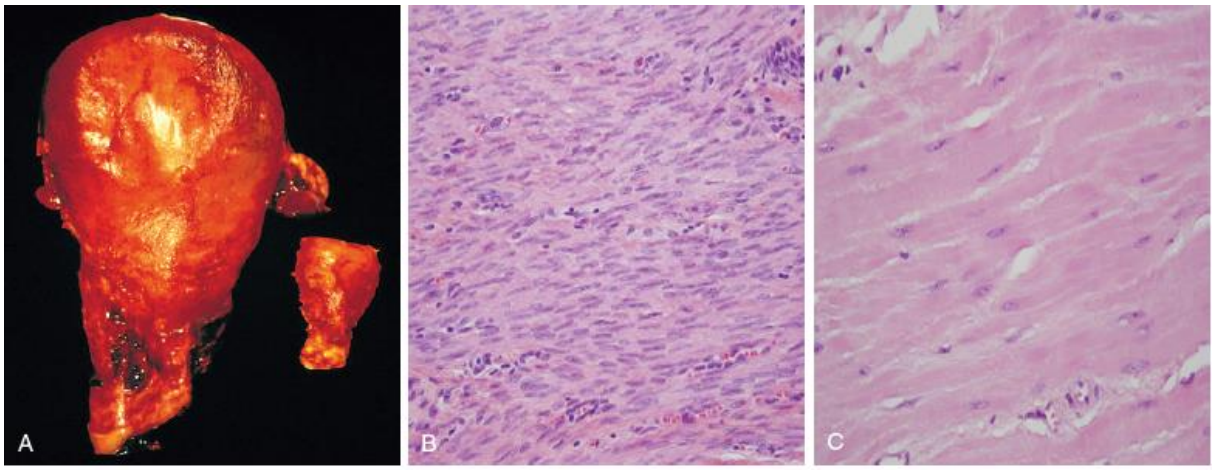


Fig. 2.20 Physiologic hypertrophy of the uterus during pregnancy. (A) Gross appearance of a normal uterus *(right)* and a gravid uterus *(left)* that was removed for postpartum bleeding. (B) Small spindle-shaped uterine smooth muscle cells from a normal uterus. (C) Large, plump hypertrophied smooth muscle cells from a gravid uterus; compare with B. (*B* and *C*, Same magnification.)

Come si adatta la cellula allo stress?
Gli adattamenti possono avvenire in maniera reversibile e quindi le cellule potrebbe fisiologicamente rispondere a ormoni diventando più grandi. È ciò che succede durante la gravidanza a livello delle ghiandole mammarie e dell'utero. Questo è uno stress buono che si adatta in maniera fisiologica.
Aumentando lo stress meccanico fino a un certo punto aumenteranno le masse muscolari. La massa muscolare interessata dipenderà dal tipo di sforzo e quindi di sport che può essere: maratona, ciclismo, sport esplosivi (basket, boxe, ecc.). La cellula si adatta e le masse muscolari aumentano in risposta ad uno stress meccanico.

In caso invece di stress patologico la cellula cerca di fuggire dal danno. A volte sfuggendo al danno paga un pegno che è la metaplasia, **la cellula perde delle sue caratteristiche principali** (che la rendono una cellula differenziata). È il caso dell'epitelio bronchiale dei fumatori[6] che si adatta ad uno stress ossidativo (a livello dell'epitelio polmonare si evidenziano adattamenti metaplastici allo stress).
Nell'immagine A sono messi a confronto un utero normale e un utero resecato per un sanguinamento durante la gravidanza. Così come l'aumenta del volume del seno è legato ad un aumento delle ghiandole mammarie che a loro volta rispondono al sistema ormonale che fa produrre latte alla futura madre.
A livello microscopico abbiamo le fibre muscolari lisce di un utero normale (immagine B) e in caso di ipertrofia (immagine B) abbiamo effettivamente un aumento di dimensioni.

---

[5] La metaplasia è una modificazione reversibile in cui un tipo cellulare differenziato (epiteliale o mesenchimale) viene sostituito da un tipo cellulare differente e può rappresentare una sostituzione adattativa di cellule sensibili allo stress con un tipo cellulare.

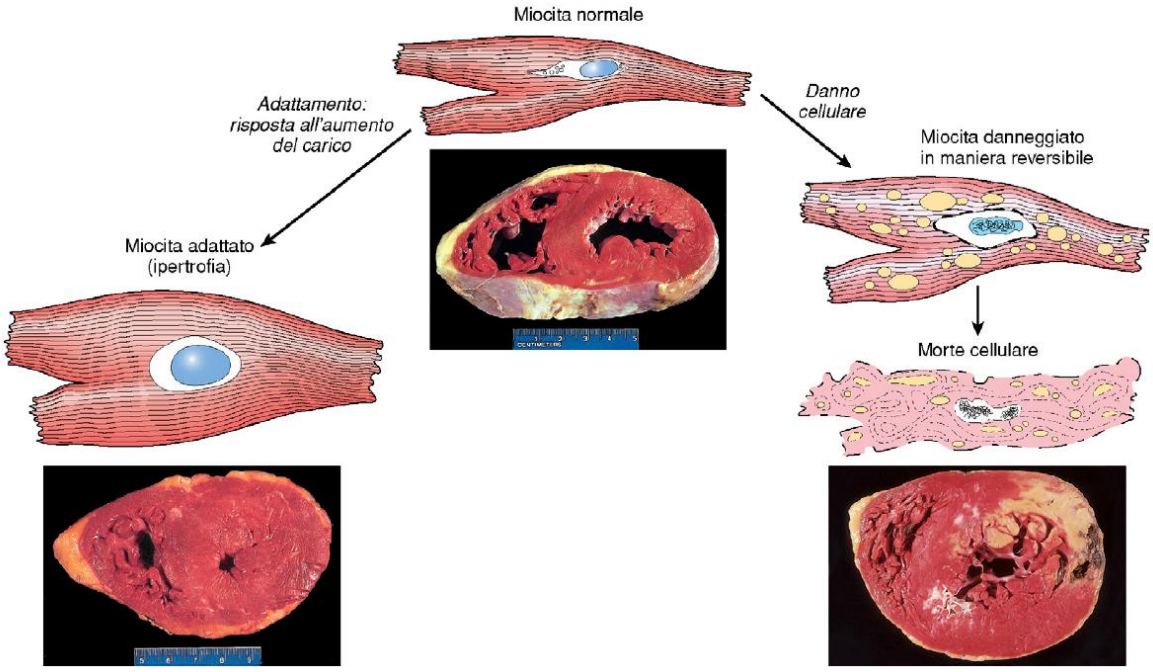
[6] Nei fumatori abituali, il normale epitelio cilindrico ciliato della trachea e dei bronchi viene spesso sostituito da un epitelio squamoso stratificato.

[le basi patologiche della malattia. Robbins]

Sbobina patologia 17/04/19 2° ora
Sbobinatore: Laura Trapani
Controllore: Engjell Shemshiri

Adattamento delle cellule allo stress

Ipertrofia cellulare. È la risposta adattativa allo stress che consiste nell'aumento delle dimensioni della cellula e, di conseguenza, dell'organo interessato. Questa condizione si manifesta ad esempio nel muscolo cardiaco (si parla di *ipertrofia cardiaca*) dove, in seguito a scompensi o quadri di ipossia e ischemia, viene indotta una risposta ipertrofica nel tentativo di far funzionare lo stesso il muscolo cardiaco anche con il poco ossigeno che arriva nonostante un'ischemia coronarica. L'ipertrofia è pertanto legata ad un tentativo delle cellule di adattarsi ad un'ischemia, e questo adattamento è reversibile: se, ad esempio durante una coronarografia, si eliminano con un palloncino i residui aterosclerotici nelle coronarie, si può far regredire l'ipertrofia cardiaca (a patto che questa non sia stata prolungata). Risposte ipertrofiche possono verificarsi anche in assenza di nutrienti.
Nell'*immagine* sottostante si vedono delle sezioni trasversali del miocardio. Nell'immagine in centro si vede un miocita normale, a sinistra un miocita ipertrofico, come si può vedere nell'immagine, che si è adattato ad una precedente ischemia (l'angina viene trattata con farmaci antianginici che possono contrastare queste ischemie).
A destra, è visibile un miocardio danneggiato in maniera drammatica in seguito ad una massiccia ischemia (infarto miocardico), in cui i miociti, in assenza di ossigeno per molto tempo, sono andati in necrosi.



Iperplasia cellulare. Mentre nel caso dell'ipertrofia si assiste ad un aumento di dimensioni delle cellule, come nel caso fisiologico di un utero in gravidanza, nell'iperplasia si assiste ad un aumento del numero di cellule che dipende da segnali di crescita (**growth factors**). Fenomeni di iperplasia si manifestano nei tessuti che possiedono una certa *staminalità*, ovvero in quei tessuti che possono replicare le proprie cellule -si prendano ad esempio gli strati mitogeni basali e parabasali degli epiteli-.
Si ha un'iperplasia fisiologica nel caso dell'◆**iperplasia ormonale**, in cui si ha ad esempio la proliferazione dell'epitelio ghiandolare della ghiandola mammaria durante la pubertà o la gravidanza, o di un'◆**iperplasia compensatoria**. Un fenomeno di iperplasia compensatoria si ha ad esempio in seguito alla resezione di una parte di fegato: il fegato possiede delle *stems cells* e pertanto, fino ad un certo punto, può rigenerarsi. Una volta che il fegato torna ad avere dimensioni fisiologicamente sufficienti, si avrà la produzione di inibitori dei fattori di crescita che bloccheranno la proliferazione, secondo dei meccanismi di feedback. Si può anche avere la coesistenza di ipertrofia e iperplasia cellulare.

Si possono anche avere forme di iperplasia patologica (in anatomia patologica si parlerà di *dis*plasia che, con vari stadi, precede l'insorgere di carcinomi in situ -vedi carcinoma della cervice uterina-), nel caso di eccesso di stimoli ormonali o di growth factors. Esempio è negli uomini l'*iperplasia prostatica benigna*, legata ad una reazione agli ormoni post andropausa.
A livello dell'epitelio uterino, gli ormoni della ghiandola pituitaria, gli estrogeni ovarici e il progesterone hanno un ruolo importante nella bilancia che regola la proliferazione dell'epitelio uterino. Pertanto, i quadri patologici si manifestano se i tessuti perdono la capacità di bilanciare la loro proliferazione, ad esempio in seguito ad una mancata compensazione ormonale.
L'iperplasia può anche essere dovuta ad una risposta ad alcune infezioni virali, come quelle provocate dall'HPV-Human Papilloma Virus. Questo virus, particolarmente malefico, si nasconde a livello dell'epitelio negli strati basali e parabasali, e, per replicarsi, stimola la replicazione cellulare. Alcune proteine, come E6 e E7, fungono da trigger per fattori di crescita: pertanto si ha un'iperproliferazione dell'epitelio, seguita da tagli e ferite da iperproliferazione. L'HPV è drammaticamente contagioso, tanto che nelle le linee guida per i sexual transmitted diseases viene indicato come nemmeno la doppia protezione con condom sia sufficiente per prevenire infezioni da HPV. Il virus, risiedendo a livello epiteliale, infetta facilmente altri soggetti (il condom non può proteggere tutto l'epitelio): potenzialmente basta quindi anche solo uno sfregamento per infettare un soggetto. Il sistema immunitario dell'infettato è generalmente capace di neutralizzare questo virus.
Inoltre, l'HPV è capace di rimanere silente per molto tempo prima di riattivarsi: è estremamente aggressivo e dotato di grande persistenza.
Per farsi un'idea di quanto un virus abbia la capacità di infettare altre cellule, si pensi anche solo al fatto che si possono prendere le verruche in piscina in seguito al semplice contatto con la cute infetta che si è desquamata.
Soprattutto in paesi poveri in cui non si ha nemmeno un alto livello di educazione e scolarità, risulta quanto mai importante istruire la popolazione (e in particolare le lavoratrici e i lavoratori del sesso) sui rischi delle malattie sessualmente trasmesse, come l'HPV e l'HIV.
Esiste un vaccino contro l'HPV che, oltre a risultare un farmaco salvavita, ha anche un impatto importante sulle ospedalizzazioni legate alle malattie sessualmente trasmesse e diminuisce l'insorgere di tumori alla cervice uterina. L'HPV nel maschio determina l'insorgere di tumori penieni molto invasivi a livello del glande, che determinano la presenza di tagli che vengono o trattati in maniera topica e "bruciati" chirurgicamente con l'impiego di un acido, o trattati chirurgicamente in maniera più invasiva.

Atrofia. L'atrofia cellulare è legata ad una diminuita sintesi proteica e ad un'aumentata degradazione delle proteine a livello cellulare.
Esempio è l'*atrofia muscolare*¸ che si manifesta ad esempio in seguito alla rottura di un arto che non viene conseguentemente utilizzato. Le persone anziane presentano un'atrofia muscolare legata alla senescenza.
L'atrofia può anche essere un meccanismo di difesa della cellula a situazioni scomode, quali possono essere dei danni, l'esposizione a sostanze dannose. In molti casi si verifica la *macroautofagia*, fenomeno che determina l'autofagia nelle cellule private ad esempio di nutrimenti.
La presenza di cellule muscolari atrofiche, assieme alla presenza di ischemia o mancata perfusione tissutale e stress pressori può determinare ad esempio l'insorgenza delle piaghe da decubito in persone allettate.
L'atrofia si manifesta anche a livello cerebrale, in quando in seguito a riduzioni dell'apporto ematico inducono un'*atrofia senile* (che tuttavia è in parte anche geneticamente determinata).

Metaplasia. Con metaplasia si indica una modificazione reversibile in cui un tipo cellulare differenziato (epiteliale o mesenchimale) viene rimpiazzato da un tipo cellulare differente. Questo fenomeno si manifesta perché il tipo cellulare preesistente non era in grado di resistere alle condizioni avverse e viene pertanto sostituito: risulta quindi essere una sostituzione adattativa di cellule sensibili allo stress con un tipo cellulare più adatto a sopportare condizioni ambientali favorevoli. La metaplasia si manifesta nei punti in cui ci sono delle nicchie di cellule staminali che permettono di usare altri tipi di cellule per rispondere ad un danno.
Quindi, in corrispondenza dei punti in cui è avvenuta metaplasia c'è stato un danno.
Fenomeni di metaplasia possono verificarsi da un epitelio squamoso stratificato al cilindrico, come nel caso dell'esofago di Barrett, in cui in seguito al reflusso gastro-esofageo cronico l'epitelio del tratto inferiore dell'esofago diviene un epitelio colonnare intestinale o gastrico. Nel caso in cui si abbia la trasformazione in

cellula tipica dello stomaco aumenta la produzione di enzimi gastrici, ma questi vengono prodotti in una sede atipica, e pertanto potranno verificarsi fenomeni di erosione esofagea o gastrica.
La metaplasia rappresenta quindi un tentativo estremo di difendere da danni i nostri tessuti usando cellule staminali multipotenti per rispondere ad uno stimolo[7].
La dimensione della lesione metaplasica rappresenta un campanello d'allarme: rappresenta infatti già una trasformazione di una cellula che di **de-differenzia**. Una cellula non differenziata posta in una sede atipica potrebbe essere prona a una trasformazione maligna.
Infatti, si osserva micro e macroscopicamente che nelle zone in cui è presente una metaplasia spesso ci sono anche lesioni neoplastiche.

Si verifica frequentemente metaplasia anche nell'epitelio bronchiale di un fumatore in risposta a stimoli irritativi cronici, in cui l'epitelio cilindrico ciliato della trachea e dei bronchi viene spesso sostituito da un epitelio squamoso stratificato.
Dal punto di vista istologico, nell'immagine si vede l'epitelio normale colonnare, che poggia sulla propria lamina basale, e a lato una metaplasia squamosa, costituita da cellule non più differenziate che derivano dagli strati basali e parabasali mitotici che proliferano.
Nei vetrini la metaplasia risulta particolarmente semplice da individuare, in quanto si vede prima l'epitelio colonnare, e poi il fondo della lamina basale.

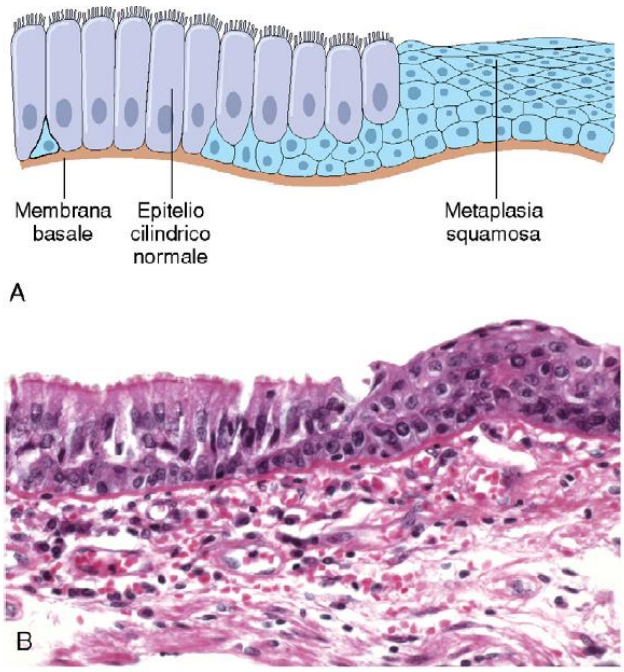


FIGURA 1.6 Metaplasia da epitelio cilindrico a epitelio squamoso. **A.** Raffigurazione schematica. **B.** Metaplasia da epitelio cilindrico (*sinistra*) a epitelio squamoso (*destra*) in un bronco.

Domanda: Come si fa a capire se in un vetrino si è di fronte ad un fenomeno metaplasico o a un primordio di un tumore?
Risposta: Non si capisce. L'ematossilina-eosina evidenzia una metaplasia, e questo è sicuramente un campanello d'allarme. Tuttavia, non può essere predittivi di un tumore -tanto che in anatomia patologica si procede con l'immunoistochimica[8]*-, però si capisce che c'è qualcosa che non va. Le dimensioni della lesione sono importanti: se tutto l'epitelio fosse interessato dalla metaplasia allora si avrebbe un carcinoma in situ. Le citocheratine, le vimentine e altre proteine espresse in determinate linee cellulari, se alterate, sono dei* ***marcatori*** *che indicano la perdita di capacità di differenziamento delle cellule che da metaplasiche si trasformano in potenzialmente cancerogene.*
Il vetrino pertanto può solo suggerire una potenziale evoluzione del tessuto in senso neoplastico; nell'immagine, in aggiunta, si vede inoltre come la lamina basale sia intatta.
Pertanto, una semplice ematossilina-eosina può fornire molte informazioni sullo stato del tessuto.

Accumuli intracellulari

A livello cellulare possono accumularsi varie sostanze, che saranno direttamente correlati con lo sviluppo di diverse patologie. Le sostanze si accumulano in seguito a:

- un metabolismo anormale (vedi fatty liver, in cui si ha un accumulo di lipidi nel fegato);

[7] **Nota dello sbobinatore**: Il persistere dello stimolo che predispone alla metaplasia può indurre la trasformazione neoplastica nell'epitelio metaplasico (Robbins).

[8] **L' immunoistochimica** permette all'anatomo-patologo di chiarire, tramite la valutazione della espressione di specifiche proteine presenti nei tessuti, la natura di strutture cellulari. Il prof consiglia di consultare il sito https://webpath.med.utah.edu/ per aggiuntive informazioni isto-patologiche.

- a difetti nel folding delle proteine o nel trasporto delle stesse -e pertanto si avrà un accumulo intracellulare di queste sostanze-;
- alla mancanza o alla non funzionalità di enzimi che processano alcune sostanze che, non essendo processate, si accumulano nei lisosomi: vedi le *malattie lisosomiali* da accumulo; malattie gravi
- accumulo massiccio di sostanze esogene che, nel citoplasma, non sono tutti processati dai lisosomi. Si prenda ad esempio l'antracosi, in cui si ha accumulo di polvere di carbonio dopo esservi esposti ad esempio lavorando in miniera.

Sbobina patologia *17/04/19* *3° ora*
Sbobinatore: Francesca Senn
Controllore: Camilla Sgambaro

Domanda: Non ho capito la differenza fra accumulo nei lisosomi ed accumulo di sostanze esterne (esempi 3 e 4)?
Risposta: Nel caso dei lisosomi essi sono saturi di elementi tanto da non funzionare più, invece nel caso dell'antracosi c'è talmente tanto accumulo di sostanza a livello citoplasmatico che i lisosomi non riescono ad eliminare tutto. Vale anche per l'asbesto.

- **Accumulo di trigliceridi**: come esempi citiamo l'aterosclerosi, oppure la steatosi epatica, dove c'è accumulo di grassi nelle cellule parenchimali; anche la presenza di troppi adipociti, se associati ad alcol, genera patologie sclerosanti epatiche;

- **Colesterolo ed esteri del colesterolo**: generalmente è buono perché è parte costituente della membrana. Se ci sono troppe LDL, quindi ipercolesterolemia, i fagociti non riescono più a processare questi grassi in eccesso e diventano "overloaded"; ci sarà quindi aumento dell'accumulo dei grassi e diminuito catabolismo dei lipidi, con aterosclerosi: il risultato finale sono ipossia e ischemia;

- **Proteine:** danno ad esempio sindrome nefrotica: è una sindrome infiammatoria che genera edema, e quindi un accumulo di liquidi a livello delle gambe. Questo si può osservare in esame oggettivo poiché c'è parecchio gonfiore, soprattutto alle caviglie, per la funzionalità renale compromessa. Nella sindrome nefrotica infatti si perdono proteine a livello del glomerulo che poi si accumuleranno, e in laboratorio si studieranno i livelli di albumina per valutare questo "leakage";

- **Glicogeno**: può accumularsi a livello dei tubuli dell'epitelio renale, nei miociti cardiaci e nelle isole ß delle cellule del Langherans. Questi sono luoghi estremamente importanti, tanto che difetti genetici che comportano un errato processamento del glicogeno, determinando il suo accumulo negli organi, sono accumunati nei "glycogen storage diseases": malattie da accumulo di glicogeno. Sono drammatiche per le tre localizzazioni che assume questo accumulo;

- **Pigmenti**: come la melanina o lipofuscina, possono fare *antracosi*.
- Il *carbone*, se ingerito, viene catturato dai macrofagi e si troverà a livello dei linfonodi, ma anche nei bronchi e polmoni, essendo questi le zone più esposte all'inalazione;
- La ***lipofuscina*** è importante per l'anatomia patologica; è un pigmento insolubile giallo-marroncino che si accumula nei tessuti post-atrofia o post-senescenza: sono lipidi e proteine prodotti dalla perossidazione di lipidi polinsaturi delle membrane cellulari da parte di proteine specializzate. Non fa male, ma è importante nei reperti citologici autoptici per dire che c'è stato un **danno** in **passato**. Non ha quindi alcun valore diagnostico o prognostico, dice solo cosa è successo nel passato;
- La *melanina* è un pigmento che si accumula a livello dell'epidermide e ha a che fare con la protezione dai raggi UV;
- L'*emosiderina* è coinvolta nell'emocromatosi, malattia legata a mutazioni note sul gene HFE, vicino al locus delle HLA, dove il ferro si accumula nel fegato. È una malattia che fa accumulare ferro, che quindi viene tolto al normale metabolismo, facendolo accumulare negli organi solidi, e principalmente nel fegato: porterà prima a fibrosi, poi a cirrosi epatiche. È un fenomeno più marcato

negli uomini rispetto alle donne perché le donne perdono sangue ogni mese, perdendo anche ferro che quindi non si accumulerà;

- **Calcificazioni patologiche**: vedono la deposizione anomala di sali di calcio con altri metalli pesanti. Può essere:
- *Calcificazione distrofica* (il metabolismo del calcio rimane normale) dove i depositi di calcio sono a livello di tessuto danneggiato; ad esempio succede nelle arterie: è un sintomo di una injury ischemica arteriosa che comporta la perdita di capacità contrattile, causando ischemia e ipossia agli altri organi. Se avviene a livello delle valvole cardiache, è necessario un intervento di sostituzione. Una volta l'intervento era a cuore aperto, adesso è più simile ad una laparoscopia. La calcificazione distrofica dice quindi che il metabolismo del calcio è normale, tuttavia il calcio si accumula in zone necrotiche, visibili in anatomia patologica e segnalatrici di danni di cui non ci si era accorti;
- *Calcificazione metastatica*: sono associate all'ipercalcemia, quindi metabolismo del calcio aumentato. Le cause possono essere: aumento della secrezione di ormoni paratiroidei, o degli ormoni che aumentano la produzione degli ormoni paratiroidei (anche magari causati da tumori maligni); osteoclasti che distruggono l'osso senza il necessario ricircolo di calcio; malattie legate alla vitamina D (come intossicazione da vitamina D e sarcoidosi); difetti a livello del recettore della vitamina D, il VDR; failure a livello renale, che genera ipertiroidismo dove diminuiscono i fosfati e aumenta il calcio;

Aging cellulare

Alla base dell'aging cellulare ci sono danno al DNA, senescenza, minor produzione di proteine e accumulo di proteine misfolded. Anche la restrizione calorica è importante per l'invecchiamento cellulare. L'aging può essere causata da:

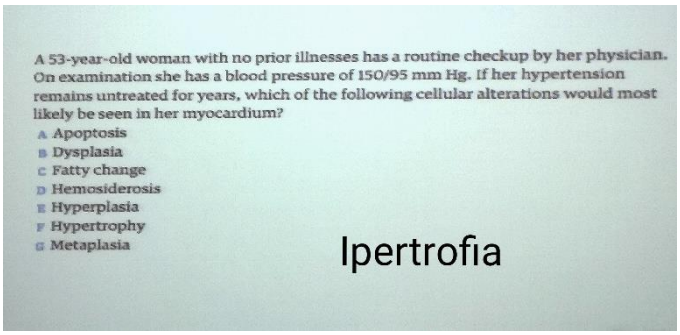
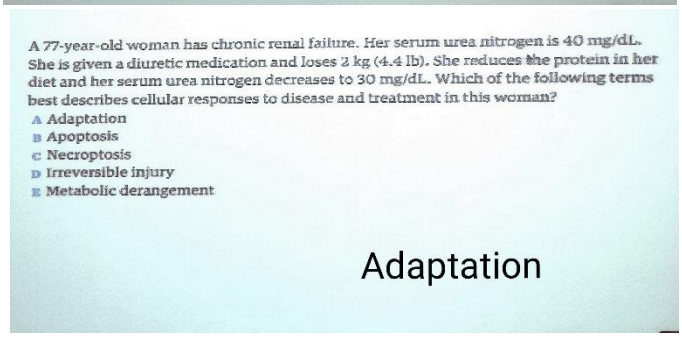
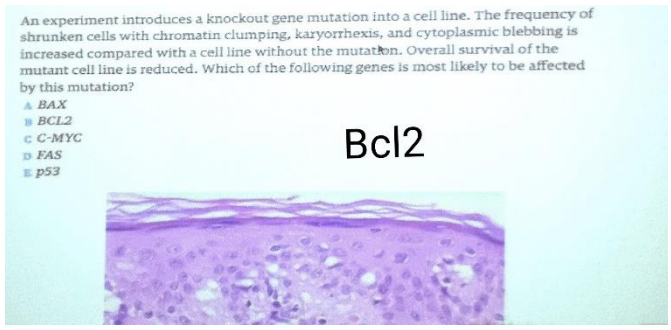
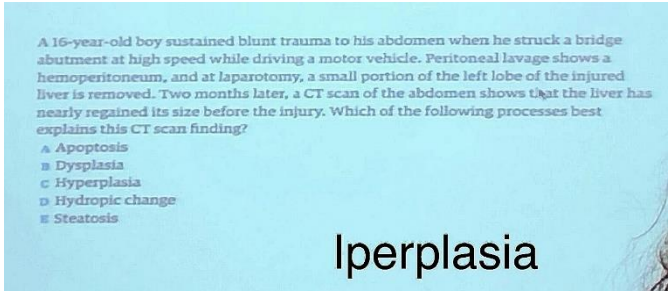
- danni metabolici come mutazioni di P53 o perdita di altre funzioni cellulari;
- accorciamento dei telomeri che generano invecchiamento cellulare precoce;
- omeostasi delle proteine non funzionante, e che fa quindi funzionare meno la cellula;
- restrizione calorica, quindi diminuzione di TOR e diminuzione dei segnali insulinici, quindi trascrizione alterata di geni riparatori del DNA (parliamo di restrizione calorica patologica come l'anoressia, andando avanti è sempre più difficile revertire il cellular aging, processo che avviene a livello di DNA);
- agenti fisici;

Amiloide β: causa malattia di Parkinson e Alzheimer, per il misfolding. Il Parkinson ha anche la Tau, l'alpha sinucleina, quindi il Parkinson è molto più multifattoriale, e le proteine misfoldate sono molte di più. La sua eziopatogenesi molto spesso è legata a mutazioni di grandi famiglie in comune in certi paesi (es. Grecia-Italia-Francia) causata da una migrazione di certe famiglie partite dalla Grecia e dal Canada. Quindi non si può offrire una diagnosi con consulenza genetica perché ci sono troppi elementi coinvolti.

Quindi, quando ci sono troppe proteine misfolded - tanto che gli IRE non sanno più dimerizzare, fosforilarsi e mandare vie di traduzione del segnale che diminuiscano il metabolismo cellulare - avvengono queste patologie. Le proteine malfoldate inoltre causano sia danni al RE, sia danni per accumulo: es. nella Corea di Huntington si accumulano le poliglutammine.

Gaucher's disease

Il **Gaucher's disease** (GD) è uno dei disordini da accumulo lisosomiale più comuni. In questa malattia succede che, a causa di mutazioni recessive, l'enzima gluco-cerebrosidasi non funziona e si crea un accumulo di *ß-glucocerebroside*. I macrofagi non riescono a processarlo, quindi ci saranno stimoli infiammatori; a livello di milza ci sarà iperplasia, organomegalia e produzione di citochine pro-infiammatorie. Questo succede in qualsiasi malattia da accumulo lisosomiale. Nel GD ci sarà distruzione delle ossa, danni neuronali, trombocitopenia e disfunzione alla microglia per le eccessive citochine. Il fenotipo neuronale è la versione peggiore delle varie tipologie di GD.

Nel macrofago la sostanza da processare è internalizzata nel lisosoma, tuttavia il macrofago non riesce "sputarla" fuori, quindi si accumulerà. Causerà una serie di reazioni importanti che vanno dall'iperplasia all'eccessiva infiammazione con conseguenze disastrose per l'organismo.

La terapia è una terapia di rimpiazzo dell'enzima (ERT), ma è molto costosa. È infatti detta "terapia orfana" in quanto molto cara e quindi poco prodotta. Si parte dalla glicosilazione del mannosio-6-fosfato che avviene nei lisosomi: in pratica si restaura la capacità di *mannosare* la gluco-cerebrosidasi, risolvendo i problemi del macrofago. È una terapia efficace, ma come già detto molto costosa. I successi sono alterni, ma sono comunque successi.
La terapia di sostituzione enzimatica è efficace, ma potrebbe essere più efficace una terapia con l'uso di chaperoni farmacologici che targettizzano ciò che non funziona e mandano in distruzione le proteine accumulate: è il futuro della farmacologia molecolare. È un processo che ricorda l'autofagia legata ai chaperoni.