

UNIVERSITA` DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SANITA` PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO IN SANITA` PUBBLICA VETERINARIA E PATOLOGIA COMPARATA

XIII CICLO

SEDE DI VERONA

Direzione di Safety Assessment

GlaxoSmithKline R&D

DETERMINAZIONE DI MARCATORI DI FOSFOLIPIDOSI E DI CARDIOTOSSICITA'

Direttore della Scuola:

Ch.mo Prof. Massimo MORGANTE

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Mauro DACASTO

Supervisore :

Ch.ma Dott.ssa Patrizia CRISTOFORI

Dottorando:

Nicola BOCCHINI

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

1. ESPOSIZIONE RIASSUNTIVA

1.1 Riassunto

Lo scopo principale di questo progetto prevede la determinazione di marcatori di due patologie: cardiotoxicità e fosfolipidosi.

Sono stati quindi pianificati ed effettuati studi di tossicologia, somministrando un composto cardiottossico (Isoproterenolo) e un composto fosfolipidogenico (Amiodarone) su ratti maschi di 9 settimane di età. Per l'Isoproterenolo sono stati condotti due studi:

1. una 'dose selection' in cui sono state utilizzate tre diverse concentrazioni (2, 1, 0.3 mg/Kg). Al termine di questo studio, tutti i dati raccolti (tra cui peso del cuore, valori di Troponina I cardiaca e severità delle lesioni a carico del miocardio) sono stati analizzati al fine di determinare la dose da utilizzare nel secondo studio.
2. 'definitive study', alla dose di 0.3 mg/Kg.

La somministrazione di Amiodarone, invece, è avvenuta a un unico dosaggio (300 mg/Kg).

A fine di ogni studio, infatti, si è proceduto alla diagnosi e conferma delle patologie attese. L'istopatologia ha evidenziato lesioni dei miocardiociti dovute alla somministrazione dell'Isoproterenolo. La lesione è stata confermata anche grazie all'analisi in chemiluminescenza della Troponina I Cardiaca (indicatore di necrosi) e di un pannello di altri biomarcatori di lesione a carico del miocardio (Troponina I e T cardiaca, Fatty Acid Binding Protein 3 e Myosin light chain 3) tramite un ELISA multi-spot.

La valutazione dell'accumulo di fosfolipidi dopo la somministrazione di Amiodarone è avvenuta mediante blood smear e microscopia elettronica. Una prima analisi mediante microscopia ottica sullo striscio di sangue ha permesso di evidenziare l'accumulo di vacuoli all'interno del citoplasma dei linfociti periferici. L'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica ha permesso di confermare l'accumulo di fosfolipidi nelle cellule del sangue e di evidenziarne la formazione anche a livello del tessuto cardiaco.

Il Microarray è stato effettuato solamente sul cuore per quanto riguarda lo studio Isoproterenolo, su cuore e sangue per lo studio Amiodarone. Il programma SAM

(Statistical Analysis of Microarray) è stato utilizzato per effettuare l'analisi statistica, al fine di identificare i geni modulati dal trattamento con le due molecole. Ogni normalizzazione dei controlli è stata analizzata con la rispettiva normalizzazione dei trattati. Si è proceduto poi a estrapolare quei geni che fossero significativamente modulati per tutte le quattro normalizzazioni.

L'analisi statistica effettuata ha permesso di identificare: per l'Isoproterenolo (cuore) un'induzione di 14 geni e un'inibizione di 62 geni, con un FDR (false DiscoveryRange) del 9%; per l'Amiodarone, nel cuore un'induzione di circa 231 geni e un'inibizione di 314 geni, con un FDR del 1%; nel sangue, un up-regulation di circa 2718 geni e un'inibizione di 5500 geni con un FDR sempre del 1%.

Per l'identificazione di un pannello di geni come markers della fosfolipidosi sono stati seguiti i seguenti criteri di selezione: geni possibilmente coinvolti nell'induzione della fosfolipidosi, fold change, letteratura e analisi mediante cluster. A tal fine, sono stati inoltre messi a confronto i geni modulati nel cuore e nel sangue dopo la somministrazione dell'Amiodarone e si è osservato che 41 geni tra gli indotti e 69 tra gli inibiti venivano modulati in entrambe le matrici.

L'interpretazione di queste valutazioni ha permesso di identificare un primo pannello di marcatori della fosfolipidosi comprendente i seguenti geni: Pla2g2a, Pla2g7, Gal, Il1b, Cebpb, Fcgr2b and Acer2.

Per confermare i dati di microarray, i livelli di espressione genica dei geni selezionati sono stati misurati in Real-Time PCR sugli stessi campioni (l'analisi per ogni campione è stata eseguita in triplice copia). Media e deviazione standard intra-campione e intra-gruppo sono state calcolate per confermare una buona correlazione dei nostri dati. E' stata effettuata inoltre l'analisi T-test dei valori di RQ del gruppo di controllo e del gruppo di trattamento per i 7 geni del pannello. Un $P < 0,01$ è stato determinato per tutte le analisi T-test di dati quantificati in Real-Time. Solo IL1B nel tessuto cardiaco ha mostrato un $P < 0,05$. Tutti i valori ottenuti sono stati infine identificati come inliers. Infatti, al fine di escludere i dati anomali, è stato utilizzato il Grubb test.

L'analisi di espressione genica mediante microarray, sui campioni trattati con Isoproterenolo, ha permesso di identificare la modulazione di 78 geni. Tali geni appartengono prevalentemente a proteine strutturali e, quindi, più facilmente

identificabili con saggi anticorpali su sequenze amminoacidiche del biomarcatore. Per il pannello dei marcatori molecolari di cardiotossicità, si è effettuata la validazione e l'analisi di microRNA in Real-Time PCR. La modulazione del *miR-21* è stata valutata sui campioni di controllo e di trattati con Isoproterenolo. Il miR-21 è un microRNA responsabile della 'sopravvivenza' dei Fibroblasti cardiaci in condizione di fibrosi, rimodellamento o disfunzioni cardiache. Le analisi effettuate hanno evidenziato un up-regulation di miR-21 dopo la somministrazione di Isoproterenolo, con un fold-change di circa 3 tra il gruppo dei controlli e il gruppo dei trattati.

Il pannello di marcatori biologici è stato completato con l'analisi dell'ANP sul siero di ratti Han Wistar (controlli) e ratti SHR (ceppo con ipertensione) di 10 settimane e 24 settimane di età. Le analisi hanno messo in evidenza un aumento rispettivamente di 2.4 e 5.2 fold-change tra i due ceppi. E' stata inoltre misurata la cTnI degli stessi campioni e non si è osservata nessuna differenza tra il ceppo normoteso e il ceppo iperteso. L'ANP permette quindi di identificare disfunzioni cardiache, come cambiamenti pressori, in cui non si presenta necrosi a carico dei miocardiociti.

Infine, tutti i metodi per la determinazione di marcatori biologici (kit elisa o sistemi automatizzati) sono stati validati, anche se specie-specifici, mediante prove di linearità, recupero, interassay, interassay e prove di stabilità fino a 6 mesi di congelamento. Per l'ANP e per la cTnI, infine, sono stati raccolti dati di background da 120 ratti di controllo al fine di determinare il loro *cut-off*.

1.2 Abstract

The main purpose of this project is the identification of biological and molecular markers specific of phospholipidosis, easily monitorable and thus applicable in preclinical as well as clinical screens.

Numerous drugs containing cationic amphiphilic structures are able to induce phospholipidosis (PL). This class of molecules, called CAD (Cationic Amphiphilic Drug), induces an intracellular accumulation of phospholipids within lysosomal compartments known as “lamellar bodies” in target organs. There are over 50 cationic amphiphilic drugs, of different pharmaceutical classes, including antidepressants as well as antibiotics, antiarrhythmics and antimalarials, that have been reported to induce phospholipidosis. Amongst these, the antidepressants are the most represented and liver, kidney and heart represent the main target organs of PLD.

In this project two toxicology studies have been conducted: the first one with Isoproterenol (cardiotoxicity compound) and the second one with Amiodarone (CAD). At the end of the Amiodarone study, optical microscopy and transmission electron microscopy examinations were evaluated to confirm phospholipids accumulation in heart and blood. Isoproterenol damage has been evaluated by optical microscopy examination on heart tissue and by Troponin I Cardiac, Troponin T Cardiac, Fatty Acid Binding Protein 3 and Myosin light chain 3 on serum samples.

At necropsy, heart and blood for Amiodarone study and only heart for Isoproterenol study from other animals have been removed to perform Microarray analysis.

Normalizations and statistical analysis allowed us to identify: for Isoproterenol study, induction of 14 genes and inhibition of 62 genes; for Amiodarone study, up-regulation of 231 genes and down-regulation of 314 genes in heart and an induction of 2718 genes and inhibition of 5500 genes in blood. Analysis of genes modulated in blood and heart of Amiodarone samples allowed us to identify 39 induced genes and 47 inhibited in both matrices.

Fold change analysis, literatures and cluster analysis allowed us to select the first panel of 7 genes as markers of phospholipidosis in heart and blood samples. These

genes have been evaluated and confirmed on the same samples with Real-Time analysis.

In addition, the validation and analysis of microRNAs was performed in Real-Time for the panel of molecular markers of cardiotoxicity. Modulation of miR-21 was evaluated on control and treated samples with Isoproterenol. The microRNA miR-21 is responsible for 'survival' of cardiac fibroblasts in conditions of fibrosis, remodeling or cardiac dysfunction. The analysis showed up-regulation of miR-21, with 3 fold-change between treated and control groups.

The panel of biomarkers has been completed with analysis of ANP on serum of Han Wistar rats (controls) and SHR (Spontaneously Hypertensive Rat). For these analysis 10 weeks and 24 weeks old rats had been used. The analysis showed an increase of 2.4 fold-change between the two strains at 10 weeks and 5.2-fold change at 24 weeks. cTnI values were also measured and no difference between population control and the treated rats was observed. These results allowed us to conclude that ANP is a biomarker of heart disease, like pressure changes, without necrosis of myocytes.

2. INTRODUZIONE

Lo scopo della ricerca prevedeva la determinazione di marcatori di due importanti patologie che stanno diventando di sempre più interesse negli studi pre-clinici.

Infatti, sempre più composti utilizzati nella ricerca farmaceutica, hanno mostrato la tendenza a manifestare eventi cardiotossici o cambiamenti strutturali e funzionali a carico del cuore. Vi è quindi la necessità di sviluppare sistemi diagnostici, sempre più precoci, per questi eventi in preclinica.

La fosfolipidosi, invece, si presenta come un accumulo di fosfolipidi in tessuti di composti fortemente irrorati a causa della somministrazione di composti cationi anfifilici (CADs). In letteratura sono presenti diverse fonti bibliografiche, sui CADs e sulla fosfolipidosi, che riguardano principalmente come specie di studio l'uomo e come organi fegato, reni, polmoni, cornea e cervello. Poco o nulla è riportato per quanto concerne il cuore e il sangue, e attualmente non esistono dei sistemi diagnostici specifici per confermare l'accumulo di fosfolipidi in questi due tessuti.

La fosfolipidosi si presenta come una patologia reversibile in caso di arresto nella somministrazione ma in presenza di dosaggi elevati o somministrazioni prolungate, l'accumulo di fosfolipidi può indurre stati infiammatori e necrosi. Lo studio di cardiotossicità e di fosfolipidosi nel cuore è stato effettuato, quindi, anche per poter identificare possibili meccanismi comuni di tossicità tra le due patologie a carico dei miocardiociti.

2.1 Studi di Tossicologia Generale

Il percorso che porta dallo studio iniziale alla disponibilità di un nuovo farmaco è molto dispendioso sia in termini di costi che di tempo. E' quasi sempre accompagnato da una valutazione preliminare delle proprietà farmacologiche di molte migliaia di composti chimici, seguita dalla selezione di un numero più ristretto di questi, tra i quali verranno selezionati pochi candidati per le sperimentazioni pre-cliniche e la successiva valutazione clinica.

La progettazione di un nuovo farmaco deve derivare da una necessità terapeutica e il processo di selezione della molecola adatta a questo scopo comprende una lunga serie di verifiche. Queste valutazioni comprendono sia prove *in vitro* che *in vivo* su modelli sperimentali che riproducono le complesse interazioni biologiche che avvengono nell'uomo.

Di fondamentale importanza, risultano gli studi di determinazione della sicurezza che hanno il ruolo di svelare gli effetti inattesi e indesiderati che possono manifestarsi in seguito a somministrazioni singole o ripetute del composto, come anche le proprietà mutageniche e carcinogeniche, nonché l'eventuale tossicità sull'apparato riproduttore. L'insieme di questi studi rientra nel grande gruppo del *Safety Assessment* (SA), ovvero la riprova della sicurezza di utilizzo di un farmaco prima che esso venga somministrato per la prima volta nell'uomo.

Gli studi di valutazione del profilo tossicologico di un composto candidato farmaco, si avvalgono sia di modelli sperimentali *in vitro* sia *in vivo*. Questi studi permettono di identificare le dosi e le condizioni migliori per la somministrazione di un farmaco in grado da garantirne la permanenza all'interno del corpo a concentrazioni ottimali. La fase preclinica serve anche per produrre tutta una serie di dati che sono richiesti dagli enti pubblici di controllo per approvare la sperimentazione di una nuova sostanza sull'uomo. Infatti, la fase successiva dello sviluppo di un farmaco è la sperimentazione clinica che può iniziare solo dopo che siano stati soddisfatti tutti i criteri stabiliti per legge perché un nuovo composto venga provato su esseri umani.

Gli studi pre-clinici vengono condotti su una specie selezionata tra i roditori (in genere il ratto e/o topo) ed un'altra specie tra i non roditori (in genere il cane o un primate non umano), in ogni caso selezionate in base alla similitudine fisiologica rispetto all'uomo. Gli studi *in vitro* sono condotti su preparati tissutali o colture cellulari di organi isolati. Spesso questi ultimi test vengono utilizzati a supporto degli studi *in vivo*, per investigare i meccanismi osservati nell'animale.

Il numero di animali o di preparati *in vitro* deve essere adeguato per dimostrare gli eventuali effetti tossici indotti dal farmaco. A tale proposito è importante sottolineare anche l'importanza di includere nello studio gruppi di controllo positivo o negativo. Generalmente uno studio prevede un numero di animali adatto per costituire tre gruppi a dosi diverse di trattamento e un gruppo di controllo. L'esposizione del

modello sperimentale al farmaco deve essere uguale, ma in genere maggiore rispetto a quella prevista nell'uomo, fino alla massima dose tollerata.

In corso di esperimenti in vivo, la via di somministrazione da preferire è quella prevista nell'utilizzo clinico del candidato farmaco. Nel caso di sostanze per cui si prevedono più modalità di somministrazione, potranno essere eseguiti più studi di sicurezza.

La durata dei trattamenti è solitamente di almeno 2 settimane, che permettono la prima somministrazione nel volontario sano.

Le dosi sono scelte sulla base di dati provenienti da esperimenti a breve termine e da studi di metabolismo, ponendo come dose più alta la dose capace di produrre alcuni segni minori di tossicità, senza indurre effetti letali. Le dosi più basse sono generalmente frazioni della più alta dose impiegata. La sostanza utilizzata come veicolo è variabile a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche del farmaco e della via di somministrazione scelta.

In generale i dati raccolti durante uno studio di tossicologia comprendono:

- valutazione dei segni clinici e incremento ponderale;
- peso degli organi ed esame macroscopico;
- esami istologici (su una lista di organi definita in base alla durata dello studio);
- esami di patologia clinica (ematochimici e chimico clinici) su liquidi biologici;
- esami specialistici (ad esempio elettrocardiogramma e oftalmoscopia).

A queste valutazioni, recentemente sono state aggiunte indicazioni provenienti dalla valutazione dell'espressione genica negli studi di tossicità a breve termine svolti su ratto, ovvero per la selezione tra i composti in via di sviluppo, candidati a diventare farmaci (*Pre-Candidate Selection Study, PRE-CS STUDY*).

2.2. Fosfolipidosi

Con il termine fosfolipidosi (*PL*) si definisce l'eccessivo accumulo di fosfolipidi nel citoplasma delle cellule a causa del danneggiamento del catabolismo lisosomiale dei fosfolipidi.

I fosfolipidi sono componenti essenziali delle membrane cellulari, composti da una molecola di glicerolo unita a due acidi grassi e a un gruppo fosfato, a sua volta legato a una base organica (colina), solitamente contenete azoto (figura 2).

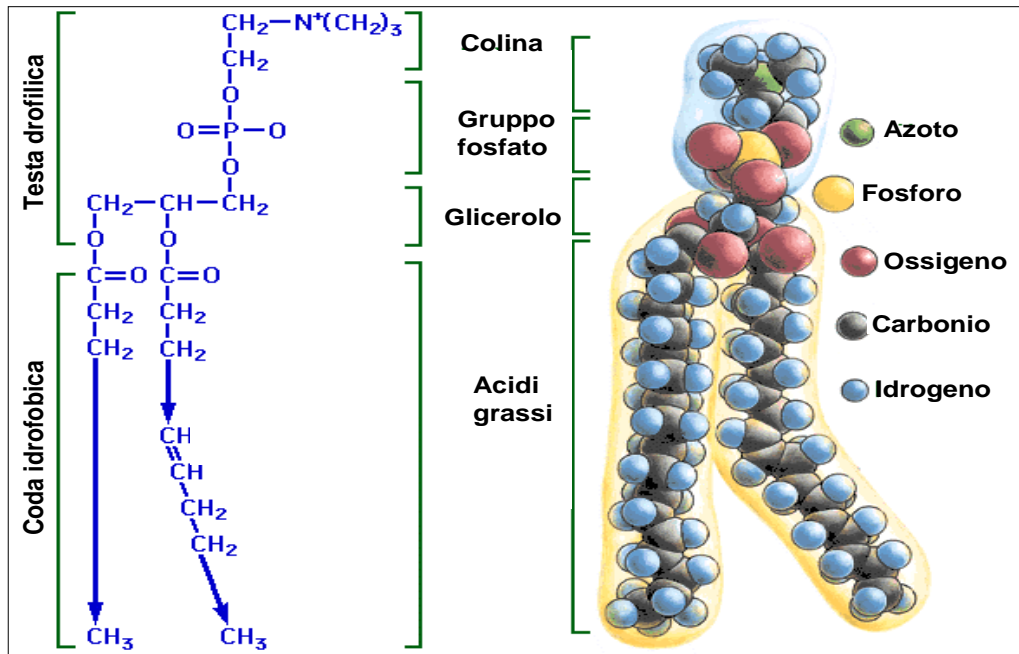


Figura 1. Rappresentazione della struttura di un fosfolipide: viene mostrata la suddivisione della molecola in testa idrofila e coda idrofobica. Immagine modificata tratta da: http://www.agen.ufl.edu/.../lect/lect_06/4_18.GIF

La molecola descritta risulta formata da una “testa” polare idrofila e una “coda” apolare idrofoba e perciò viene definita come anfipatica. I fosfolipidi sono suddivisi in varie classi e in presenza di fosfolipidosi si può osservare un incremento di varie classi, sebbene possa predominare l’accumulo di un solo tipo.

La loro sintesi e il loro metabolismo sono regolati in modo individuale da cellule e tessuti. I fosfolipidi hanno un continuo turnover all’interno delle cellule, le molecole da degradare vengono racchiuse in vescicole che poi si fondono con i lisosomi primari contenenti enzimi idrolitici. Alterazioni a carico di questi processi possono essere indotte o associate a disordini genetici (malattia di Niemann-Pick e di Tay-Sachs),

squilibri ormonali o somministrazione di farmaci. Quest'ultimo fattore indica il motivo per cui la fosfolipidosi è oggetto di studio da parte dell'industria farmaceutica.

Numerosi composti contenenti strutture cationiche anfifiliche sono in grado di indurre fosfolipidosi *in vivo* (somministrazione in modelli animali o nell'uomo) e *in vitro* (incubazione con determinate linee cellulari).

Questa classe di molecole, denominata CAD (*Cationic Amphiphilic Drug*), induce un accumulo di fosfolipidi all'interno della cellula sotto forma di corpi lamellari (*lamellar body*) lisosomiali in organi bersaglio.

Le sostanze classificate come CAD mostrano proprietà fisico-chimiche simili; la loro struttura molecolare infatti presenta una parte idrofila, contenente un gruppo aminico caricato positivamente, e una parte idrofoba ad anello. Queste due entità strutturali conferiscono l'amfifilicità. La struttura idrofoba accresce la capacità della molecola di attraversare le membrane citoplasmatiche non ionizzate. La porzione ionizzata della molecola tende a rimanere intrappolata nella membrana, causandone l'alterazione. Alla luce di quanto sopra esposto si ritiene che la causa della fosfolipidosi sia da attribuire alla struttura chimica piuttosto che all'attività farmacologica.

Le conseguenze della presenza di questi corpi multilamellari a livello cellulare non è conosciuta. In generale si ritiene che la PL sia una risposta adattativa piuttosto che un evento tossico, resta tuttavia un argomento da chiarire e per cui le agenzie regolatorie richiedono informazioni

Esistono più di 50 composti, di diverse classi farmacologiche, in grado di indurre fosfolipidosi. Alcune classi terapeutiche implicate sono: antibatterici, antimalarici, antiaritmici, antidepressivi, antipsicotici, agenti anoressizzanti e agenti riducenti il colesterolo. I più numerosi sono gli antidepressivi, che hanno come principale bersaglio organi metabolicamente attivi e fortemente irrorati, come fegato, rene e cuore.

- Inibizione dell'attività delle fosfolipasi (A e C) lisosomiali che sono responsabili del catabolismo dei fosfolipidi. (Questo viene considerato il principale meccanismo di induzione).
- Inibizione dei trasportatori degli enzimi lisosomiali.
- Aumento della biosintesi dei fosfolipidi.
- Aumento della biosintesi del colesterolo.

Attualmente la microscopia elettronica (EM) è il "gold standard" per l'identificazione dell'accumulo di lamellar body all'interno della cellula. Tuttavia l'EM richiede attrezzature specialistiche e una corretta raccolta dei tessuti. In aggiunta, è costosa, di difficile applicazione nella clinica e non quantitativa.

Classe	Farmaco
Antibatterici	Eritromicina Azitromicina Claritromicina
Antimalarici	Cloroquina
Antiarritmici	Amiodarone Chindina
Antidepressivi	Imipramina Fluoxetina
Antipsicotici	Clorpromazina

Tabella I. Esempi di farmaci cationico anfifilici (CAD).

2.2.1 Possibili meccanismi di induzione della Fosfolipidosi

Quattro principali meccanismi di fosfolipidosi CAD-indotta sono stati proposti in alcune pubblicazioni recenti:

- Diretta interazione tra CAD e i fosfolipidi intracellulari con formazione di complessi resistenti all'azione delle fosfolipasi. Tali complessi mostrano mancanza di stabilità e la sospensione del trattamento mostra regressione delle alterazioni;
- Azione inibitoria dei CAD verso le fosfolipasi lisosomiali di tipo A e C, deputate al catabolismo fosfolipidico;
- Impedimento della sua retrodiffusione nel citoplasma cellulare. I fosfolipidi legandosi a questa forma del farmaco, provocano uno spostamento dell'equilibrio favorendo la diffusione secondo gradiente di concentrazione del

farmaco nei lisosomi. L'accumulo di farmaco protonato nel lisosoma potrebbe essere così elevato da causare un aumento del pH, tale da inibire significativamente l'attività delle fosfolipasi.

- Il farmaco nella sua forma non ionizzata potrebbe penetrare nei lisosomi, dove a causa del basso pH verrebbe rapidamente protonato, con conseguente

Il contenuto di fosfolipidi intracellulari può subire un notevole incremento rispetto a quello di una cellula normale, ma non tutte le cellule sono ugualmente sensibili agli effetti dei CAD. Infatti sembrano maggiormente sensibili quelle cellule che mostrano un elevato metabolismo lipidico, come i macrofagi.

Molti sono i fattori che contribuiscono allo sviluppo della fosfolipidosi e alla sua gravità, tra questi ritroviamo formula di struttura dei farmaci, dose e durata del trattamento (esposizione), meccanismo d'azione sul metabolismo di specifici fosfolipidi, suscettibilità inter e intra-specie.

Accumulo e ritenzione di fosfolipidi ad opera di CAD possono svilupparsi idealmente in tutti gli organi e tessuti del corpo. Le manifestazioni più frequenti si hanno solitamente a carico di polmone, fegato, tiroide, cervello, rene, tessuti oculari, cuore, tessuti emopoietici, linfociti ed eritrociti.

Esiste una grande variabilità nella suscettibilità di specie alla fosfolipidosi tra animali e uomo. Allo stesso modo non è insolito rilevare differenze nella suscettibilità e nella severità di organi e tessuti quando si attuano delle comparazioni tra uomo e animale. Queste caratteristiche assumono particolare rilievo negli studi svolti per l'accertamento del rischio nell'uomo, causato dall'esposizione a sostanze xenobiotiche che destano il sospetto di possedere capacità fosfolipidogeniche.

La fosfolipidosi può essere indotta da esposizioni acute o croniche a sostanze classificate come CAD, ed il tempo necessario è variabile a seconda dell'affinità delle cellule esposte nei confronti del composto.

I cambiamenti cellulari indotti ad opera di CAD, come la comparsa di *LLBs*, sono generalmente reversibili, dopo sospensione della somministrazione; ciò dimostra che l'induzione della fosfolipidosi lisosomiale è reversibile.

2.3 Composti

2.3.1 Amiodarone

Scoperto nel 1961 Amiodarone è stato approvato da *FDA* per l'utilizzo clinico, come agente antiaritmico, nel Dicembre del 1985. Amiodarone, derivato del benzofurano, possiede sia proprietà antiaritmiche che vasodilatatrici. Viene utilizzato per correggere anomalie del ritmo cardiaco. Sebbene caratterizzato da molti effetti avversi, alcuni di questi particolarmente gravi e potenzialmente fatali, viene impiegato con successo nel trattamento di alcune aritmie in cui altri agenti antiaritmici falliscono. Amiodarone è considerato un farmaco antiaritmico ad ampio spettro, infatti possiede numerosi e complessi effetti sull'attività elettrofisiologica del muscolo cardiaco, responsabile del ritmo cardiaco. Nonostante il suo meccanismo d'azione non sia ancora completamente conosciuto riferendosi alla classificazione di Vaughn-Williams è considerato un antiaritmico di classe III.

Amiodarone agisce esplicando un' azione di:

- ritardo della fase di ripolarizzazione e prolungamento della durata del potenziale d'azione;
- debole blocco dei canali del sodio (Na^+), con conseguente riduzione del tasso di depolarizzazione della membrana;
- depressione dell'automaticità sia del nodo seno-atriale (SA) che del nodo atrio-ventricolare (AV), e rallentamento della conduzione nel sistema di His-Purkinje e nelle vie di conduzione accessorie;
- rilasciamento della muscolatura cardiaca e di quella liscia a cui segue diminuzione delle resistenze vascolari coronariche e periferiche e calo della pressione sanguigna.

Gli effetti avversi più severi correlati ad una terapia con Amiodarone si manifestano a carico del polmone. Le complicazioni polmonari comprendono fibrosi polmonare, presenza di infiltrato polmonare, infiammazione intralveolare e tosse cronica. A livello epatico Amiodarone induce segni di tossicità rappresentati da steatosi, dilatazione degli epatociti, infiammazione, fibrosi, inclusioni multilamellari (LLBs). Altri effetti avversi sono: atassia, disturbi visivi, fotosensibilizzazione, effetti gastrointestinali,

come costipazione, e interazioni con altri farmaci. Diversamente da altri antiaritmici l'incidenza degli effetti avversi aumenta nel corso di terapie croniche.

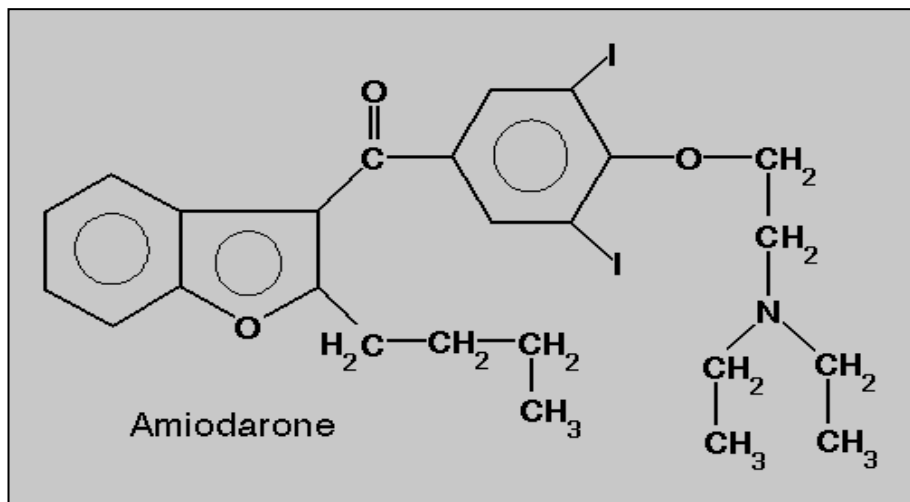


Figura 2. Formula di struttura di Amiodarone. La parte idrofobica promuove il passaggio della molecola attraverso le membrane quando la molecola si trova nella forma non ionizzata. La forma ionizzata invece, impedisce alla molecola di retrocedere una volta che ha attraversato la membrana e contribuisce allo sviluppo dei cambiamenti nella membrana stessa.

2.3.2 Isoproterenolo

L'Isoproterenolo, o Isoprenalina, è un farmaco adrenergico betastimolante (Figura). Non è un composto fosfolipidogenico ma è stato utilizzato in questa ricerca per confrontare ed individuare possibili analogie tra il meccanismo d'azione di questo composto e dell'Amiodarone nel tessuto cardiaco.

L'Isoproterenolo è sia *beta1-stimolante* (aumenta la forza di contrazione, la frequenza e la gettata cardiaca) che *beta2-stimolante* (vasodilatazione e broncodilatazione).

È strutturalmente simile all'adrenalina ma ha un'azione selettiva su tutti i beta-recettori, attivando in egual modo i recettori β_1 e β_2 .

È principalmente utilizzato per bradicardia e arresti cardiaci. Attivando i β_1 -recettori nel cuore, induce un effetto cronotropo, dromotropo e inotropo positivo.

La somministrazione può avvenire intravena, orale, intranasale, sottocutanea o intramuscolare, dipendentemente dall'uso.

L'half-life di questo composto è approssimativamente a 2 ore dalla somministrazione.

L'Isoproterenolo può produrre un'elevata tachicardia e predisporre quindi i pazienti ad aritmia cardiaca.

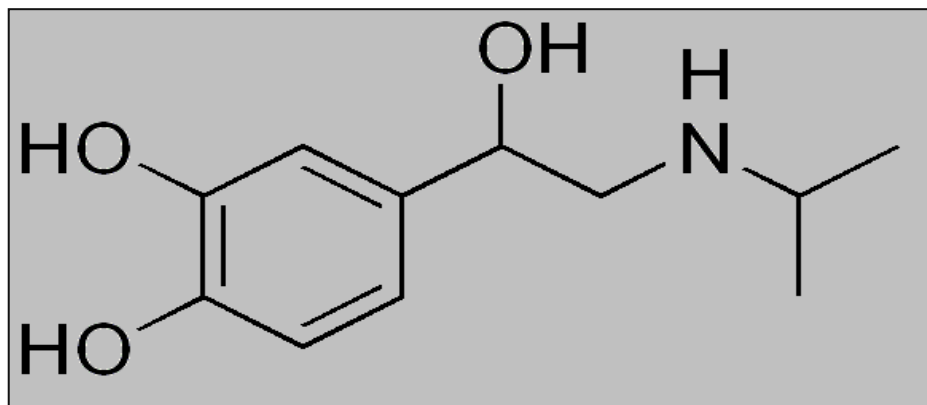


Figura 3. Struttura molecolare dell'Isoproterenolo.

2.4 Metodiche di Patologia Clinica

2.4.1 Determinazione della Troponina I cardiaca mediante ADVIA Centaur CP.

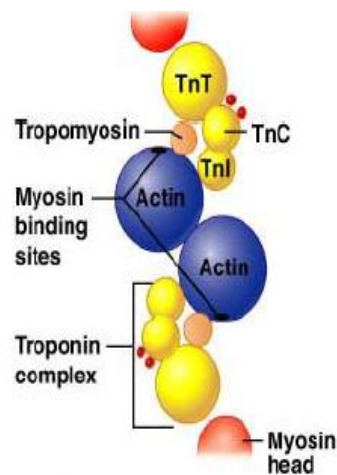
Il dosaggio ADVIA Centaur CP è un immunodosaggio sandwich a due o a tre siti che utilizza la tecnologia a chemiluminescenza diretta.

I principali vantaggi di questo tipo di strumentazione sono dati dalla metodica automatizzata, che riduce la possibilità di errore da parte dell'operatore, e la possibilità di abbassare notevolmente il *cut-off* dell'analita di interesse. Nella fase di sperimentazione pre-clinica, infatti, si possono presentare casi in cui un analita, in condizioni fisiologiche, sia presente in concentrazioni molto basse e non determinabili. In questi casi non vi è la possibilità di monitorare delle possibili variazioni temporali e la reale differenza con un campione patologico, rendendo quindi necessario l'utilizzo di queste apparecchiature.

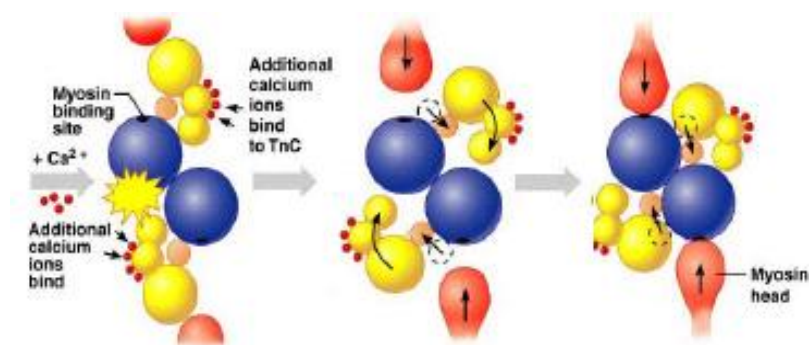
L'ADVIA Centaur CP è, da anni, lo strumento di riferimento per la determinazione delle troponine cardiache.

La Troponina è un complesso proteico che regola la contrazione della muscolatura striata. Consiste di tre subunità situate periodicamente lungo il filamento sottile delle miofibrille.

La Troponina C si lega al calcio, la Troponina T si attacca alla tropomiosina presente sul filamento sottile e la Troponina I inibisce la ATPasi dell'actomiosina.



(a)



(b)

Figura 4. (a) Complesso delle troponine e della tropomiosina nello stato inattivo. (b) Stato attivo del complesso. Gli ioni di calcio si legano ai siti regolatori della Troponina C, le troponine subiscono un cambiamento conformazionale spostando la tropomiosina e permettendo l'interazione tra actina e miosina.

La Troponina I (TnI), una proteina inibitrice del complesso troponina-tropomiosina, esiste in tre isoforme distinte: muscolo cardiaco, muscolo scheletrico lento e muscolo scheletrico veloce.

Ciascuna isoforma è codificata da un gene distinto, ciascuno dei quali caratterizzato da un'esclusiva sequenza di amminoacidi, che porta ad un tasso di diversità tra isoforme pari al 40%. La forma cardiaca della Troponina I è l'unica ad avere 31 aminoacidi residui sulla posizione terminale N, assenti nelle forme scheletriche, che permettono lo sviluppo di specifici anticorpi policlonali e monoclonali. La specificità cardiaca di questa isoforma migliora la diagnosi nei pazienti con lesioni acute o croniche alla muscolatura scheletrica e possibili lesioni concomitanti al miocardio ed è la base per la sua scelta come marker cardiaco nella diagnosi di infarto miocardico acuto.

Il principio del dosaggio ADVIA Centaur CP cTnI-Ultra prevede l'utilizzo di: due differenti anticorpi monoclonali che riconoscono la parte N-terminale della Troponina I cardiaca, di un anticorpo policlonale legato all'estere di acridinio e di particelle magnetiche a cui è stata legata la streptavidina.

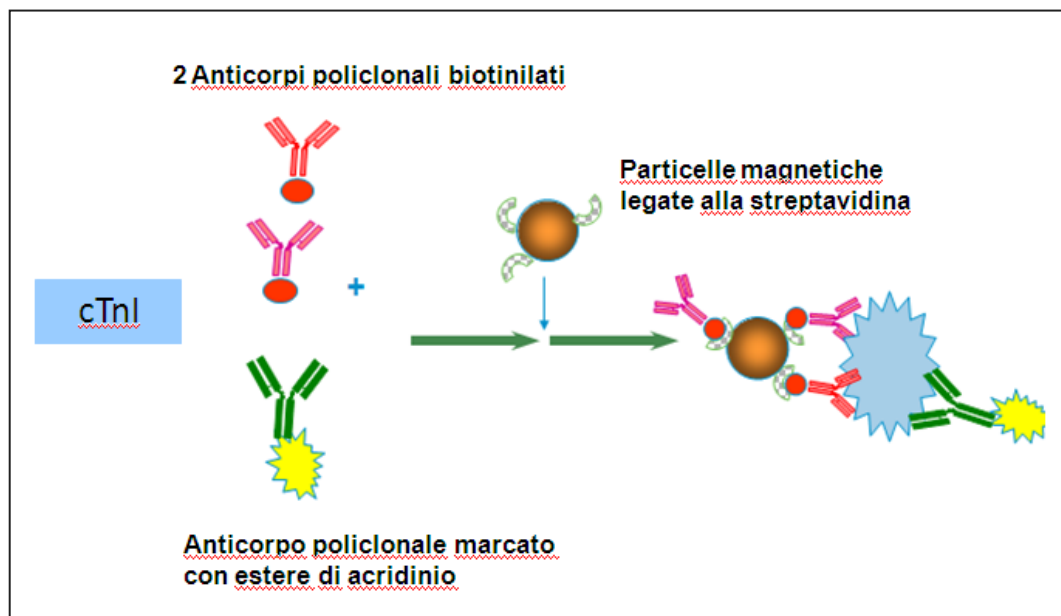


Figura 5. Rappresentazione della metodica di cattura e determinazione della cTnI mediante ADVIA Centar CP.

Questi reagenti, formano un sandwich a tre siti con l'analita. Successivamente, viene generato un campo magnetico per trattenere il complesso nelle cuvette di reazione e, grazie ad una variazione di pH generata dall'aggiunta di una base e un acido forte, avviene l'attivazione dell'enzima e quindi la generazione di un segnale in chemiluminescenza. L'intensità del segnale viene catturata dallo strumento e, grazie ad una curva standard di riferimento, viene determinata la concentrazione di Troponina.

2.4.2 Determinazione della Troponina I, Troponina T, Myl3 e FABP3 mediante strumentazione MesoScaleDiscovery.

La **catena leggera della miosina 3 (Myosin light chain 3, MYL3)** è una catena leggera della molecola di miosina che si trova nel muscolo cardiaco e nel muscolo scheletrico (a contrazione lenta).

La molecola di miosina consiste in un dominio di testa che "passeggia" lungo la catena di actina per la contrazione del muscolo e un dominio di coda che interagisce con un altro filamento di miosina. La Miosina è costituita da due subunità della catena pesante che si intrecciano a formare i domini della testa e della coda e da quattro subunità della catena leggera, due catene leggere (codificate dai geni MYL3) e altre due con siti di fosforilazione (codificate dai geni MYL2).

Le catene leggere e le catene pesanti si legano tra loro nella regione tra i domini della testa e della coda. Dopo un danno al tessuto muscolare, i filamenti di miosina si rompono e le concentrazioni di MYL3 diventano elevati nel sangue. MYL3 può essere utilizzato, in combinazione con altri biomarcatori di tossicità, per confermare lesioni cardiache o al muscolo scheletrico (a contrazione lenta)

La **proteina degli acidi grassi legame 3 (Fatty Acid Binding Protein 3, FABP3)** è una proteina monomerica che modula l'assorbimento di acidi grassi nelle cellule. FABP di tipo cardiaco è rilasciato in circolo dopo ischemia e/o necrosi del miocardio. FABP3 è presente soprattutto nel cuore e nel muscolo scheletrico, ma si può trovare anche nel cervello, nel fegato e nell'intestino tenue.

I saggi con la strumentazione Meso Scale Discovery (MSD) forniscono un metodo rapido e conveniente per la misurazione di diversi biomarkers all'interno di una piccola quantità di un singolo campione. La metodica utilizzata da MSD si basa sui principi e le strumentazioni degli ELISA-test, ovvero, utilizzando una piastra a 96 pozzetti, un primo anticorpo di cattura dell'analita e un secondo anticorpo legante un enzima per la quantificazione. Tuttavia, MSD fornisce sia test con spot singoli che a multi-spot. In un saggio a spot singolo, è presente un anticorpo per una specifica proteina; in un saggio di multi-spot, nella matrice di un pozzetto sono presenti anticorpi cattura contro diversi analiti.

L'assay per la determinazione dei marcatori cardiaci (Assay Panel 3) è un test immunologico sandwich (Figura 1).

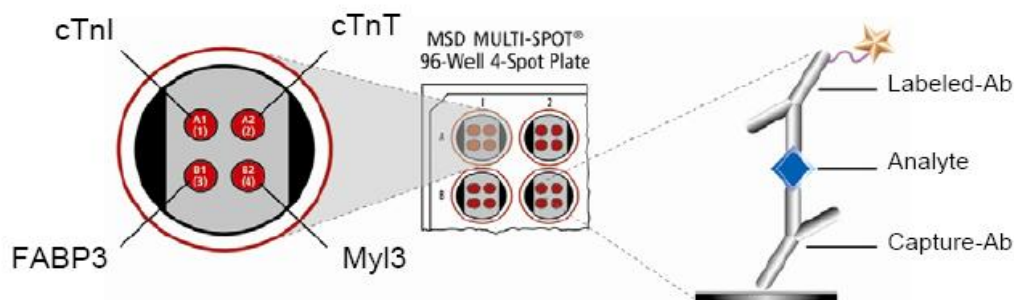


Figura 6. Dimostrazione del posizionamento degli anticorpi sulla piastra.

La posizione degli anticorpi è riportata nel software dello strumento, sulla confezione della piastra, e nel file dati. Un unico codice a barre su ogni piastra consente una completa tracciabilità.

MSD fornisce una piastra pre-rivestita con anticorpi monoclonali di cattura per cTnI, cTnT, FABP3 e MYL3 su spazialmente punti distinti spazialmente all'interno di ogni pozzetto. L'operatore aggiunge il campione e una soluzione contenente anticorpi policlonali anti-cTnI, anti-cTnT, anti-FABP3 e anti-MYL3 etichettati con un composto

electrochemiluminescente (MSD sulfo-TAG™). Gli analiti del campione si legano agli anticorpi di cattura immobilizzati sulla superficie del pozzetto, l'aggiunta degli anticorpi etichettati, infine, permette la formazione del complesso a sandwich. L'aggiunta di un *MSD read buffer* fornisce le adeguate condizioni per ottenere un segnale in electrochemiluminescenza. La piastra viene quindi caricata sul piatto di lettura dello strumento per l'analisi. All'interno dello strumento, viene applicata una tensione agli elettrodi presenti sulla piastra provocando l'emissione di luce da parte dell'enzima presente sugli anticorpi policlonali. Lo strumento misura di intensità della luce emessa per permettere una misura quantitativa di cTnI, cTnT, FABP3 e MYL3 presenti nel campione.

2.4.3. Determinazione dell' Atrial Natriuretic Peptide mediante EIA kit

L'Atrial Natriuretic Peptide è sintetizzato dai miociti atriali ed è secreto come un ormone costituito da 126 amminoacidi.

Una volta rilasciato, il proANP viene diviso in una parte biologicamente molto attiva (porzione 99-126), chiamata anche α -ANP, e in una porzione N-terminale (porzione 1-98).

L' α -ANP viene eliminato rapidamente dalla circolazione con una emivita di 3-4 minuti. Il proANP (1-98) ha una emivita molto più lunga (60-120 min) che porta a concentrazioni significativamente più alte nel sangue rispetto ad α -ANP. Pertanto, i livelli circolanti di proANP (1-98) possono meglio riflettere i livelli cronici della secrezione di ANP.

Il principale stimolo di rilascio dell'ormone è dovuto ad una ipercontrazione delle fibre dei miociti. Il proANP viene quindi indicato come marker per la disfunzione cardiaca o lo scompenso cardiaco.

L'immunoassay (EIA) per la determinazione dell'ANP, si basa sulla competizione tra l'ANP del campione e di un tracciante, costituito da ANP di ratto (tracciante) legato all'acetilcolinesterasi (AChE), verso i siti specifici di anticorpi di coniglio anti-ANP (l'antisiero).

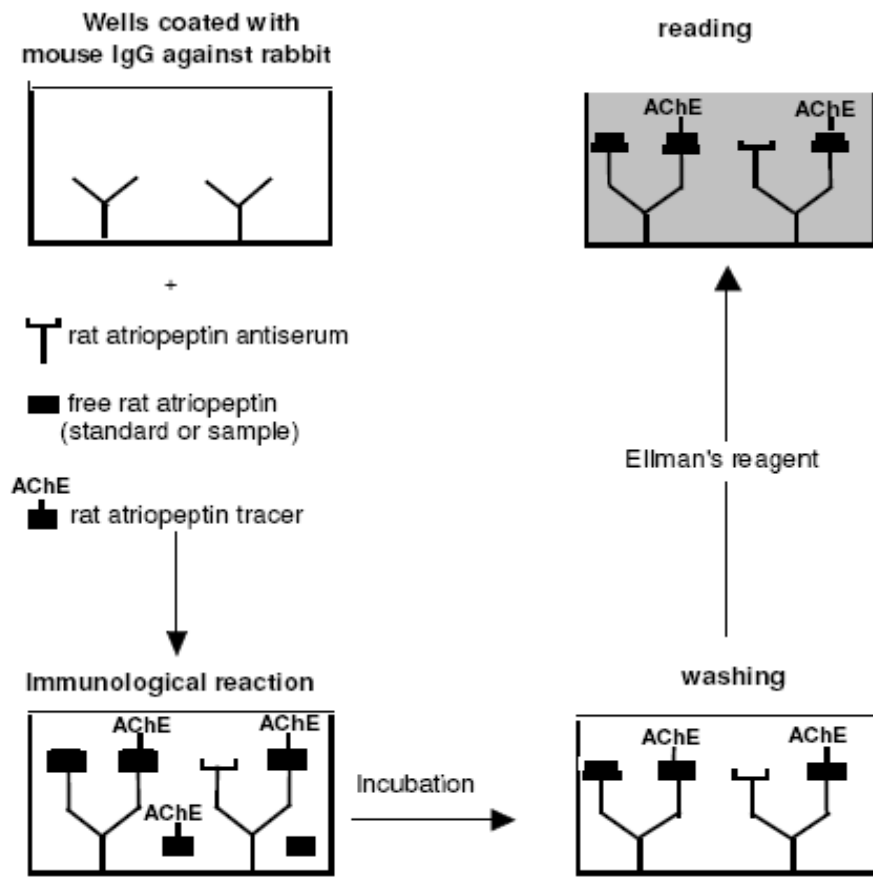


Figura 7. Principio dell'ANP Immunoassay.

Il complesso ANP-tracciante-antisiero si lega agli anticorpi monoclonali murini pre-immobilizzati all'interno dei pozzetti della piastra. La piastra viene poi lavata e viene aggiunto il reagente di Ellman (substrato enzimatico per AChE e cromogeno) all'interno dei pozzetti.

Il tracciante AChE agisce sul Reagente di Ellman formando un composto giallo. L'intensità del colore, che è determinato mediante spettrofotometria, è proporzionale alla quantità di tracciante legato ai pozzetti ed è inversamente proporzionale alla quantità di ANP del campione presente nel pozzetti durante l'incubazione immunologica.

2.5 Fasi di allestimento di un campione per microscopia ottica

2.5.1 Prelievo di tessuti

Il *prelievo di frammenti d'organo* va condotto al più presto sul materiale fresco. I metodi di osservazione delle cellule allo stato vitale sarebbero da preferirsi in quanto consentono uno studio dinamico della cellula, in assenza di artefatti di immagine prodotti dalle fasi successive di allestimento del campione. In realtà il loro impiego è limitato perché le cellule ed i tessuti isolati dall'organismo non sopravvivono che per tempi brevi (a meno che non siano coltivati in vitro) in quanto gli enzimi litici intracellulari si attivano rapidamente e distruggono la cellula (autolisi) provocando gravi alterazioni di struttura.

In secondo luogo, frammenti spessi di tessuto non permettono un'analisi citologica fine e quindi diventa necessario lavorare con tessuti uccisi chimicamente, prima che intervengano gli enzimi autolitici, e tagliarli in sezioni sottili che possano essere osservate al microscopio, eventualmente previa colorazione.

2.5.2. Fissazione

La *fissazione* consiste nel trattamento del frammento d'organo con procedimenti chimici o fisici capaci di preservare e stabilizzare i costituenti dei tessuti, inattivando nel contempo gli enzimi autolitici. La fissazione di organi interi non è in genere buona norma, in quanto, a parte l'impossibilità di alcune situazioni, la penetrazione lenta del liquido ha l'inconveniente di permettere l'autolisi delle parti che tardivamente vengono a contatto col fissativo.

La fissazione dura da pochi minuti fino a 24-48 ore a seconda della grandezza del frammento. Il rapporto fissativo/campione deve essere di 20:1. Ogni fissativo all'atto di provvedere alla stabilizzazione delle strutture provoca degli artefatti di struttura, ossia immagini inesistenti prima della fissazione. Ciò comporta che il metodo venga di volta in volta scelto opportunamente in rapporto al tipo di strutture che si desiderano studiare e, di conseguenza, alla colorazione da adottare. Nella scelta di

un fissativo va anche tenuto presente che esso non deve svolgere azione estrattiva sui componenti che si desiderano identificare. Così, ad esempio, i fissativi in soluzione acquosa sono controindicati quando si deve studiare la distribuzione del glicogeno, in quanto tale sostanza è solubile in acqua. In questa evenienza è indispensabile l'uso dell'alcool etilico assoluto che precipita il glicogeno. I fissativi maggiormente usati sono la formaldeide (o formalina) al 10% e l'alcool etilico a 90°. Soprattutto la prima viene particolarmente raccomandata in quanto consente la realizzazione dei più comuni metodi di colorazione per uso diagnostico. È maggiormente usata la formalina tamponata per evitare variazioni di pH che possano alterare le proprietà antigeniche di alcuni antigeni.

Altri fissativi sono: gluteraldeide, cloruro di mercurio, acido picrico. I migliori fissativi sono quelli che determinano una precipitazione dei componenti cellulari in minutissimi granuli. I fissativi contenenti acidi (come l'acido picrico) sono molto penetranti e molto rapidi, ma determinano l'addensamento della struttura nucleare.

Bisogna considerare che nel caso si vogliano effettuare studi immunoistochimici, la formalina richiede successive tecniche di smascheramento antigenico in quanto questo fissativo crea ponti metilenici con le proteine alterandone la struttura.

La formaldeide non permette di scendere all'individuazione di fini dettagli citologici, dato che le cellule vanno incontro a raggrinzamenti e retrazioni. Ne consegue che per indagini analitiche si consigliano altri fissativi o, meglio, miscele di fissativi. Alcuni fissativi fungono anche da coloranti come nel caso dell'acido osmico, usato per la dimostrazione dei lipidi.

Una tecnica di fissazione molto utilizzata è il congelamento-essiccamento: si ricopre il materiale da fissare con una resina e lo si espone a vapori di azoto liquido alla temperatura di -170 - -190 °C, completando l'operazione a -30 - -40 °C. Questa tecnica ha il vantaggio di una rapida fissazione e non necessita di una successiva fase di smascheramento antigenico se si vogliono usare tecniche immunoistochimiche.

Per fissare il tessuto, infine, spesso si usano miscele di varie sostanze; le più note sono: miscela di Bouin, di Zenker, di Susa, di Carnoy e di Orth.

2.5.3 Processazione ed Inclusione

L'**inclusione** consiste nel lasciar permeare il tessuto da una sostanza che solidifica a temperatura ambiente atta a consentire il taglio in sezioni sottili dello spessore di pochi micron. Essa è correntemente rappresentata dalla paraffina. Trattandosi di una sostanza idrofoba, la sua penetrazione richiede che dal tessuto venga allontanata l'acqua a mezzo di un disidratante. Si usa all'uopo una serie di soluzioni di alcool etilico a gradazione crescente fino a portare il pezzo in alcool assoluto. Da qui il tessuto viene trasferito in un solvente della paraffina che di solito è lo xilolo. Esso ha la funzione di consentire la penetrazione del mezzo includente. La paraffina, il cui punto di fusione varia tra 52 e 60 °C, è usata allo stato liquido, quindi l'operazione viene praticata in termostato. Una volta che la compenetrazione è avvenuta, il pezzo viene rapidamente raffreddato, così da acquistare la consistenza della paraffina solida.

Del tessuto incluso si ottengono fette di 3-10 µm, usando un microtomo a lama d'acciaio. Data la sottigliezza, queste risultano difficilmente maneggevoli, quindi vengono montate su un vetrino portaoggetto. Per provvedere alla loro colorazione si suole allontanare la paraffina e riportare il tessuto al suo primitivo stato d'idratazione. Così le sezioni vengono dapprima immerse in xilolo, quindi in una serie di soluzioni di alcool a gradazione decrescente fino all'acqua. A questo punto si può procedere alla colorazione e al montaggio, ossia all'applicazione di un vetrino coprioggetto che viene fatto aderire al primo mediante una resina naturale o sintetica.

Un'inclusione in un materiale più duro può essere ottenuta utilizzando plastiche quali resina epossidica. L'infiltrazione del frammento da includere viene fatta con plastica allo stato monometrico nel quale essa è fluida; viene quindi indotta la solidificazione del frammento infiltrato facendo polimerizzare la plastica mediante calore o raggi ultravioletti. Trattandosi di un materiale di inclusione molto duro, la plastica consente di ottenere sezioni sottili dello spessore di poche centinaia di nanometri che possono essere osservate al microscopio elettronico.

Nel caso di organi i cui componenti abbiano consistenza disomogenea, come il nevrasso e l'osso, si preferisce l'inclusione in celloidina o in resina. Solo nel caso di tessuti calcificati all'inclusione viene fatta precedere la decalcificazione, per la quale

si ricorre all'uso di acidi diluiti ovvero di chelanti, come l'acido tetracetico dell'etilendiamina (EDTA).

Vi sono poi eventualità nelle quali non è possibile l'uso dell'inclusione, per esempio quella in cui si vogliono studiare i grassi neutri, i quali sono solubili in alcool ed in xilolo. Si ricorre in tal caso all'uso del microtomo congelatore. Con questo strumento si conferisce al pezzo la durezza necessaria per essere sezionato a mezzo del congelamento estemporaneo con neve carbonica.

Trova anche largo impiego il criostato che consta di una camera termicamente isolata entro la quale è collocato il microtomo. La temperatura della camera è mantenuta tra i -15 ed i -30 °C.

2.5.4 Taglio

Il tessuto incluso viene tagliato mediante il **microtomo**, uno strumento per mezzo del quale vengono realizzate sezioni istologiche di campioni di tessuto animale o vegetale come pure di altri materiali anche non biologici, per esempio sezioni sottili di rocce e ghiacci, con appositi e diversi apparati.

Il sezionamento di un tessuto è una delle procedure più importanti per lo studio istologico. Perché un tessuto sia analizzabile tramite microscopio ottico, deve essere tagliato in fette molto sottili, in modo da permettere alla luce di attraversarlo. Con un microtomo, si riescono a realizzare sezioni di meno di 10 µm di spessore, in media 4. Esistono due tipi di macchinario per questo scopo a secondo della preparazione del tessuto: Microtomo e Criostato.

- Il microtomo che può essere costruttivamente rotatorio, a slitta o a cuscinetti lineari, manuale o motorizzato, è destinato a tagliare campioni precedentemente trattati e inclusi in paraffina o in resina sintetica (in genere poliestere, metacrilato o resina epossidica come l'araldite). Il processo di inclusione serve a rendere il tessuto maggiormente consistente al taglio.
- Il criostato, generalmente a meccanismo rotatorio, congela il campione di tessuto e permette in questo modo il taglio di questo in forma congelata. Gli

esami di tessuti sezionati col criostato vengono usati dove una risposta istologica a scopo medico-diagnostico è necessaria entro tempi brevi (ca. 30 minuti contro 1 - 2 giorni in paraffina) per permettere al chirurgo di definire la parte eventualmente da asportare durante il corso di un intervento.

2.5.5 Colorazione

La **colorazione** viene praticata principalmente per mettere in risalto singoli componenti strutturali. In altri casi viene eseguita al fine di identificare costituenti chimici particolari del tessuto. Se il tessuto da esaminare consiste in un monostrato di cellule (per esempio cellule coltivate in vitro, preparati per striscio di sangue circolante o preparati per schiacciamento), esso viene di solito osservato direttamente al microscopio. Negli altri casi, invece, si procede con la colorazione. I coloranti sono di due tipi: *naturali* e *sintetici*. I primi possono essere di origine tanto animale che vegetale. I secondi, prodotti in laboratorio, sono derivati dall'anilina. I coloranti, ancora, si distinguono in vitali e sopravitali.

I *coloranti vitali* hanno la proprietà di essere assunti attivamente da alcune cellule viventi permettendo così la loro identificazione o lo studio di funzioni particolari. Esempi di coloranti vitali sono:

- *Alizarina*, incorporata elettivamente nella sostanza fondamentale dell'osso in corso di calcificazione, colorandola di rosso.
- *Blu Triptan*, *litio carminio*, *blu pirrolo*, che sono fagocitati dai macrofagi permettendo così la loro individuazione.
- *Verde Janus*, che colora elettivamente i mitocondri in virtù delle proprietà ossido-riduttive di questi organuli.
- *Rosso neutro*, che colora i granuli specifici dei leucociti (in rosa quelli dei granulociti neutrofili, in giallo quelli degli eosinofili e in rosso mattone quelli dei basofili).
- *Blu di metilene*, che colora l'assone dei neuroni.

I *coloranti sopravitali*, invece, sono somministrati a cellule o a tessuti isolati dall'organismo.

I coloranti si legano ai tessuti mediante legami chimici con le proteine, gli acidi nucleici, le glicoproteine e le lipoproteine. Da un punto di vista chimico, quindi, i coloranti sono classificati in due categorie: *coloranti acidi*, nei quali il gruppo cromoforo è acido (anionico) e *coloranti basici*, nei quali il gruppo cromoforo è basico (cationico).

- I coloranti acidi più comuni sono: eosina, arancio G, verde luce.
- I coloranti basici più comuni sono: blu di metilene, blu di toluidina, tionina, verde di metile, pironina, azzurro B, fucisina basica.

I componenti dei tessuti che hanno affinità per i coloranti acidi sono detti *acidofili*; quelli che mostrano affinità per i coloranti basici sono detti *basofili*. Bisogna considerare, però, che l'acidofilia e la basofilia dei vari costituenti cellulari dipendono dal pH della soluzione colorante. Ai valori di pH comunemente impiegati per una determinata colorazione istologica (pH = 6), la cromatina del nucleo, l'ergastoplasma, le mucoproteine e i glicosaminoglicani assumono i coloranti basici, mentre gli eritrociti, i granuli dei granulociti eosinofili ed alcune parti del citoplasma legano coloranti acidi. I coloranti sono di regola indiretti in quanto la loro fissazione al tessuto necessita l'impiego di *mordenzatori*, ossia degli ossidanti (acido fosfomolibdico, acido picrico, acido fosfowolframico, acido cromico, permanganato di potassio, ecc.) che fungono da mezzo intermediario di collegamento tra struttura tissutale e colorante, fra i quali non esiste una particolare affinità.

Il vetrino si "monta" con una goccia di balsamo del Canada sopra alla fettina, quindi viene posto sopra la fettina il vetrino coprioggetto, premendolo delicatamente ed evitando di creare bolle d'aria al suo interno. I vetrini così preparati sono pronti per l'osservazione microscopica.

2.6 Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Il **microscopio elettronico a trasmissione** fa attraversare un campione molto sottile (da 5 a 500 nm) da un fascio di elettroni, quindi con un insieme di magneti (che funzionano come le lenti del microscopio ottico) ingrandisce l'immagine ottenuta che viene infine proiettata su uno schermo fluorescente rendendola visibile. Raggiungendo i nanometri, permette di vedere anche le molecole più piccole. Dà immagini della struttura interna dell'oggetto esaminato e permette di ottenere solo immagini 2D. Le fasi di preparazione di un campione per la microscopia elettronica differiscono rispetto alla preparazione di un campione per la microscopia ottica. Il campione per la microscopia elettronica deve essere processato al momento del prelievo. Il materiale viene messo in glutaraldeide tamponata al 2,5% per 2-3 ore e successivamente processato oppure temporaneamente conservato in glutaraldeide allo 0,6%. Dopo riduzione, il materiale viene osmicato, disidratato ed incluso in resina epossidica. Il campione incluso in resina viene tagliato per produrre sezioni semifini ed ultrafine:

- Le **sezioni semifini** sono spesse circa 1 micron. Vengono colorate con blu di toluidina al fine di poter osservare, mediante microscopia ottica, tutta la sezione per selezionare successivamente una zona di interesse. Sono preparate da un campione che deve essere osservato a microscopio elettronico a trasmissione (TEM), anche se la loro funzione non è quella di fungere da preparato vero e proprio, quanto piuttosto da "mappa" per la preparazione di una sezione ultrafine.
- La **sezione ultrafine** è di circa 70-80 nanometri. E' la sezione da vedere al microscopio elettronico e corrisponde ad una regione, a forma di trapezio, selezionata nella sezione semifine .

Le sezioni ultrafini vengono successivamente raccolte su retini di rame o nickel e colorate con acetato di uranile e citrato di piombo.

Sia le sezioni semifini che ultrafini, vengono prodotte mediante l'**ultramicrotomo**, uno strumento che permette di ottenere sezioni dei campioni di spessore compreso generalmente tra 50 e 100 nanometri.

2.7 Tecniche di Biologia Molecolare utilizzate

2.7.1 Estrazione RNA

In questa fase è stato utilizzato il reagente TRIzol.

Tale reagente permette l'estrazione di RNA totale da cellule e tessuti ed è costituito da una soluzione omogenea composta da fenolo e guanidina isotiocianato. Durante omogeneizzazione e lisi mantiene l'integrità di RNA mentre degrada e dissolve i vari componenti cellulari. La successiva addizione di cloroformio, seguita da centrifugazione, separa la soluzione in due fasi, acquosa e organica. L'RNA estratto rimane confinato all'interno della fase acquosa. La tecnica TRIzol può essere utilizzata sia con piccole quantità di tessuto (50-100 mg) o cellule (5×10^6), sia con quantità di tessuto maggiori (≥ 1 g) o cellule ($>10^7$). Un notevole vantaggio è rappresentato dalla rapidità del metodo.

La purificazione di RNA da eventuali sostanze contaminanti residue (DNA, proteine) viene eseguita mediante *RNeasy mini columns* (colonnine per estrazione RNA), le quali contengono al loro interno una resina capace di trattenere esclusivamente l'RNA, mentre le altre sostanze vengono eliminate con tamponi di lavaggio all'esterno della colonnina. Al termine l'RNA totale viene eluito in acqua nuclease-free.

2.7.2 Deossiribonuclease

Deossiribonuclease è un enzima che catalizza la reazione di idrolisi dei legami fosfodiesterici nella struttura portante del DNA. Il legame fosfodiesterico è un tipo di legame covalente, che unisce nucleotidi successivi in una catena di RNA o di DNA. Precisamente esso si forma tra un atomo di fosforo compreso nel gruppo fosforico legato al carbonio 3' della molecola di zucchero (ribosio per RNA, desossiribosio per DNA) di un nucleotide e l'atomo di ossigeno legato al carbonio 5' dello zucchero componente il nucleotide successivo. Quando il legame si forma viene espulsa una molecola di acqua (H_2O).

Le deossiribonucleasi sono enzimi che fanno parte della famiglia delle nucleasi. Sono conosciuti diversi tipi di deossiribonucleasi, che differiscono tra loro per specificità di substrato, meccanismo chimico e funzioni biologiche.

Nel nostro protocollo è stata utilizzata DNase 1 (purificata da RNA), che agisce come un endonucleasi aspecifica in grado di degradare DNA a doppio o a singolo filamento, ma anche cromatina. Questo particolare enzima agisce preferenzialmente accanto a nucleotidi di tipo pirimidinico. L'idrolisi del legame fosfodiesterico da essa operata porta alla produzione di mono e oligonucleotidi, con un gruppo fosfato in posizione 5' e un gruppo idrossilico in posizione 3'.

Nel protocollo il suo impiego è legato alla necessità di rimuovere l'eventuale DNA che contamina l'RNA estratto. Quando un campione di RNA risulta contaminato con DNA genomico, la PCR quantitativa rischia di amplificare anche il DNA genomico oltre che il cDNA di interesse.

2.7.3 Lettura in assorbanza

Una prima valutazione delle quantità di RNA estratto viene fatta attraverso la lettura dell'assorbanza ($A = \xi \times b \times c$ secondo la Legge di Lambert e Beer) del campione nello spettro dell'ultravioletto, precisamente ad una lunghezza d'onda (λ) di 260nm. Questa è la lunghezza d'onda di massimo assorbimento per gli acidi nucleici. Utilizzando una cuvetta con cammino ottico (b) pari a 1cm, il coefficiente di estinzione molare (ξ) per i nucleotidi, a questa lunghezza d'onda, è pari 20. Tenendo conto dei suddetti valori, cammino ottico pari a 1 cm e coefficiente di estinzione molare pari a 20, l'assorbanza a 260 nm di 40 $\mu\text{g/mL}$ di RNA assume valore pari a 1. La concentrazione di RNA nel campione può essere quindi calcolata attraverso la seguente formula:

$$\text{Concentrazione RNA } (\mu\text{g/mL}) = (A_{260}) \times (\text{fattore di diluizione}) \times (40 \mu\text{g RNA/mL}) \times (1 \text{ unità } A_{260})$$

Aggiuntivamente viene anche valutato il valore del rapporto tra le assorbanze rilevate a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) che deve essere compreso tra 1.6 e 1.8 per valutare la contaminazione dell'RNA estratto dovuta a proteine o DNA. Un rapporto con valore inferiore a 1.6 indica una scarsa qualità dell'estratto.

L'assorbanza alla lunghezza d'onda di 230 nm riflette la contaminazione del campione da parte di carboidrati, peptidi, fenolo, composti aromatici. Tracce di fenolo possono causare una sovrastima della quantità di RNA, poiché il fenolo assorbe luce nello spettro ultravioletto (UV). Campioni puri sono caratterizzati da un rapporto tra le assorbanze rilevate a 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}) approssimativamente pari a 2.2.

Quindi la lettura del valore di assorbanza del campione a queste tre lunghezze d'onda (260 nm, 280 nm, 230 nm) indica in modo più completo la purezza del campione. Campioni contenenti RNA sono giudicati come puri se caratterizzati da un rapporto tra le tre lunghezze d'onda di 1:2:1. Significativi discostamenti da questo rapporto indicano la presenza di contaminanti e la necessità di un'ulteriore purificazione del campione. In alcuni casi concentrazione e purezza del campione possono essere falsate da reagenti utilizzati durante il protocollo di estrazione di RNA.

La lettura dell'assorbanza viene effettuata anche dopo il trattamento con l'enzima DNase applicato per rimuovere la contaminazione da DNA genomico presente. Il rapporto (A_{260}/A_{280}) a questo punto dovrebbe essere superiore a 1.8. Un valore compreso fra 1.8-2.0 indica che l'RNA estratto è privo di contaminazione da parte di fenolo o proteine. Presenza di proteine o fenolo causa un calo significativo del rapporto (A_{260}/A_{280}).

Il rapporto A_{260}/A_{280} viene calcolato usando l'equazione:

$$(A_{260}/A_{280}) = \frac{(\xi_{260,p} \times (\%P) + \xi_{260,n} \times (\%N))}{(\xi_{280,p} \times (\%P) + \xi_{280,n} \times (\%N))}$$

dove:

- $\xi_{260,p} = 0.57$

- $\xi_{280,p} = 1.00$
- $\xi_{260,n} = 20$
- $\xi_{280,n} = 10$
- n e p si riferiscono rispettivamente ad acidi nucleici e proteine
- $\%N$ e $\%P$ si riferiscono rispettivamente a % di acidi nucleici e % di proteine.

In base all'equazione sopra presentata è possibile calcolare il valore del rapporto (A_{260}/A_{280}) in differenti condizioni (tab.II). I valori di $\xi_{260,n}$ e $\xi_{280,n}$ considerati si riferiscono a DNA, ma le conclusioni non sono sostanzialmente influenzate dai cambiamenti dei coefficienti di estinzione molare nel passaggio da DNA a RNA o ad altre proteine naturali. La ragione di questo è che i coefficienti di estinzione degli acidi nucleici sono molto alti rispetto a quelli delle proteine, ad entrambe le lunghezze d'onda, e il loro valore determina sostanzialmente il valore A_{260}/A_{280} almeno fino a quando la concentrazione degli acidi nucleici in soluzione non assume valori molto piccoli.

Il metodo spettrofotometrico è vantaggioso in quanto non è distruttivo e permette il recupero del campione e il suo utilizzo in ulteriori valutazioni. Lo spettrofotometro utilizzato in laboratorio è il biofotometro Eppendorf (figura 6) provvisto di una sorgente luminosa allo Xenon.

La tabella mostra chiaramente come in una soluzione contenente sia proteine che acidi nucleici in proporzioni variabili. Al crescere della quantità di acido nucleico rispetto a quella di proteine il rapporto tra le assorbanze valutate a 260 nm e a 280 nm (A_{260}/A_{280}) aumenta, oscillando da un valore minimo di 0.57, che indica la sola presenza di proteine, fino a un valore massimo di 2.00, che indica la presenza nella soluzione del solo acido nucleico.

Tabella II.

Valori teorici del rapporto (A_{260}/A_{280}) calcolati per soluzioni contenenti percentuali variabili di proteine e acidi nucleici.

%P	%N	(A_{260}/A_{280})
100	0	0.57
95	5	1.06
90	10	1.32
85	15	1.48
80	20	1.59
75	25	1.67
70	30	1.73
65	35	1.78
60	40	1.81
55	45	1.84
50	50	1.87
45	55	1.89
40	60	1.91
35	65	1.93
30	70	1.94
25	75	1.95
20	80	1,97
15	85	1.98
10	90	1.98
5	95	1.99
0	100	2.00



Figura 8. Rappresentazione del biofotometro Eppendorf.

2.7.4 Sistema Agilent 2100 Bioanalyzer

La valutazione qualitativa dell'RNA estratto costituisce un'altro parametro fondamentale da soddisfare per l'applicazione di analisi di espressione genica. Quest'analisi valuta l'integrità dell'RNA estratto attraverso separazione elettroforetica delle unità ribosomiali 18S e 28S contenute in esso.

Il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer con RNA 6000 Nano LabChip Kit è un sistema innovativo il cui uso viene raccomandato per adempiere a questo scopo, (figura 9). Sfruttando la tecnica dell'elettroforesi capillare applicata su chip, permette di valutare l'integrità dell'RNA (ma anche di DNA e proteine a seconda dei nostri scopi) analizzandone i componenti tramite fluorescenza e fornendo un elettroforegramma caratteristico. Nel nostro studio è stato utilizzato per testare l'integrità di RNA dopo il processo di estrazione e dopo il trattamento DNase. Esso permette di eseguire la separazione di campioni di RNA attraverso elettroforesi capillare applicata su chip. Il chip è il supporto nel quale vengono dispensati i campioni, ed è costituito da micro canali di vetro connessi tra loro (figura 10). Questo supporto miniaturizzato consente di ridurre drasticamente sia i tempi di separazione sia la quantità di campione necessario. Piccole quantità di RNA vengono separate all'interno dei microcanali a seconda del loro peso molecolare e successivamente individuate attraverso la determinazione della fluorescenza laser-indotta, rilevata tra 670-700 nm. Il colorante fluorescente utilizzato si intercala tra le basi azotate dei nucleotidi componenti le

molecole di RNA e la sua intensità di colorazione viene rivelata attraverso una fluorescenza laser-indotta. L'utilizzo del colorante capace di intercalarsi tra le basi azotate in combinazione con la determinazione di fluorescenza utilizzata dal sistema consente di rilevare differenza di concentrazione tra i vari campioni anche molto piccole, cosa che invece non è possibile fare utilizzando una tradizionale elettroforesi su gel.

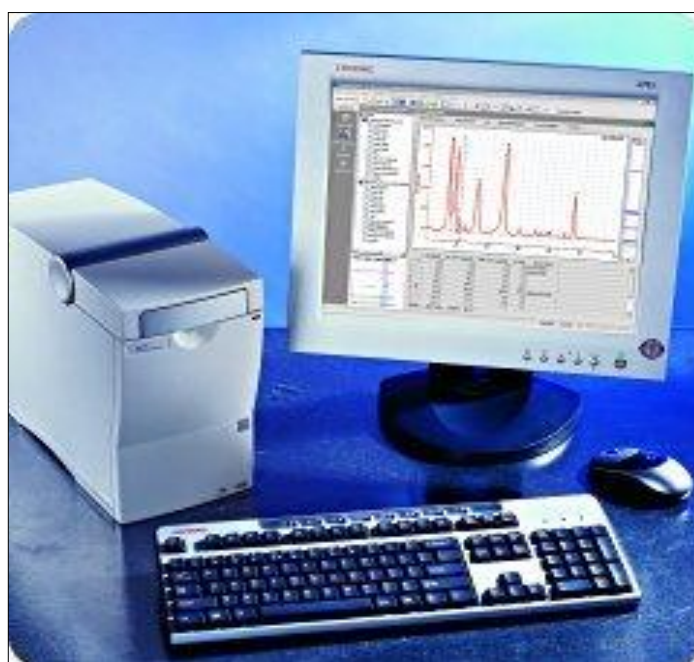


Figura 9. Sistema Agilent 2100 Bioanalyzer collegato a computer.

Nel chip vi è un pozzetto riservato al *ladder* che funge da marcatore di peso molecolare. Questo è composto da una miscela di sei trascritti di RNA delle dimensioni di 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 Kb e con concentrazione complessiva di 150 ng/ μ L. Il suo grafico deve presentare i sei picchi relativi ai frammenti di differente peso molecolare, e un picco relativo al *marker* (figura 11).

Il software 2100 Expert provvede automaticamente a comparare i campioni analizzati con il *ladder*, per determinarne la concentrazione e identificare i picchi ribosomiali presenti. Inoltre il *ladder* assolve anche ad un'altra funzione, assumendo il ruolo di controllo di qualità consente di valutare il corretto svolgimento dell'analisi.

Nei pozzetti dei campioni viene aggiunto anche un *marker* costituito da un frammento di DNA con dimensione pari a 50 bp. Questo frammento a doppio filamento si colloca al termine della corsa nella posizione assunta da un trascritto di RNA di 25 bp. La funzione del *marker* è quella di monitorare il corretto svolgimento della corsa elettroforetica, e quindi lo si può considerare come uno standard interno.

I risultati vengono presentati sia come bande separate sul gel, sia come grafico su assi cartesiane. La rappresentazione sul gel mostra due bande nettamente separate, che corrispondono alle unità ribosomiali 18S e 28S in funzione del tempo di separazione in secondi. Il grafico su assi cartesiane presenta sull'asse delle ascisse (x) il tempo in secondi e sull'asse delle ordinate (y) l'intensità del segnale di fluorescenza. La maggior parte di RNA contenuto nel campione è di origine ribosomiale.

Un grafico ottimale presenta tre picchi, il picco del *marker* e i picchi corrispondenti alle due unità ribosomiali (figura 12). A seconda del metodo di estrazione utilizzato (ad esempio metodo TRizol) altre molecole di RNA, come le unità ribosomiali 5S, 5.8S e tRNA possono essere presenti e apparire nell'elettroforegramma con un tempo di migrazione compreso tra i 24 e 27 secondi.

Per ogni campione vengono presentati dati inerenti alle singole unità ribosomiali e al campione nella sua totalità. Per le singole unità ribosomiali viene valutato il tempo in secondi al quale inizia e termina la rivelazione, l'area sottesa dal picco misurata in paia di basi e la percentuale dell'area totale (compresa sopra la linea di base) occupata dal picco stesso. Per il campione viene calcolata l'area sottesa dai picchi, la concentrazione di RNA in ng/ μ L e il rapporto tra le concentrazioni delle due unità ribosomiali 18S e 28S. Per calcolare la concentrazione di RNA l'area sotto l'intero elettroforegramma viene determinata e comparata con l'area del *ladder*. Il rapporto tra le due unità ribosomiali 18S/28S costituisce un'ulteriore informazione riguardo la qualità del campione. Una preparazione di RNA ideale è caratterizzata solitamente da un valore pari a 2. Variazioni di questo valore possono indicare una parziale degradazione del campione, causata da una contaminazione ribonucleasica avvenuta, durante il processo di purificazione.

La presenza di attività enzimatica ribonucleasica nel campione causa la degradazione dell'RNA. Questo può essere identificato attraverso una elettroforesi

con la comparsa di frammenti di RNA di dimensioni più piccole da cui si generano deboli segnali di fluorescenza (figura 13). Questa degradazione provoca uno spostamento, verso valori inferiori, nella distribuzione delle dimensioni delle molecole di RNA, un calo del segnale di fluorescenza. Inoltre i picchi relativi alle unità 18S e 28S non possono essere identificati in modo chiaro.

La comparsa di un *pattern* insolito implica la necessità di ripetere la corsa elettroforetica. Se il nuovo elettroforegramma conferma ciò che si è visto nel primo significa che l'estratto di RNA non è utilizzabile per ulteriori processazioni e quindi si deve ripetere l'estrazione di RNA dal tessuto di partenza o dall'omogenato conservato a -20°C.

La sensibilità nell'analisi qualitativa fornita dal sistema è elevata quando vengono utilizzati campioni con concentrazione di RNA compresa fra 5-500 ng/μL, mentre la sensibilità nell'analisi quantitativa è elevata per concentrazioni comprese tra 25-500 ng/μL. La riproducibilità della quantificazione è affetta da un coefficiente di variazione del 10%. La specificità del sistema nel rivelare l'integrità del campione è molto elevata.

La separazione di RNA totale attraverso il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer fornisce dei risultati comparabili, ma con migliore risoluzione rispetto a quelli che si ricavano attraverso una elettroforesi su gel, e inoltre i tempi sono decisamente ridotti.

E' stato inoltre valutato che differenze tra i campioni legate a specie, tessuto o concentrazione causano minime differenze nei tempi di migrazione di RNA totale.

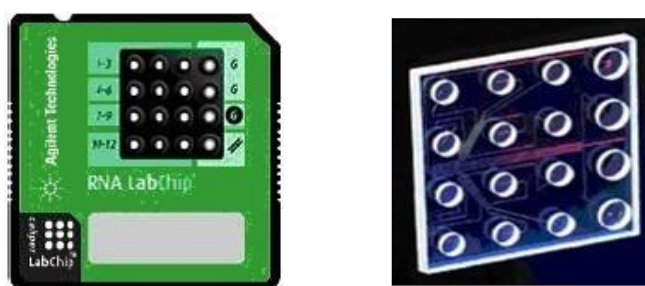


Figura 10. A sinistra rappresentazione dell'aspetto esterno del chip, mentre a destra rappresentazione della struttura interna del chip, formata da micro canali di vetro connessi fra loro.

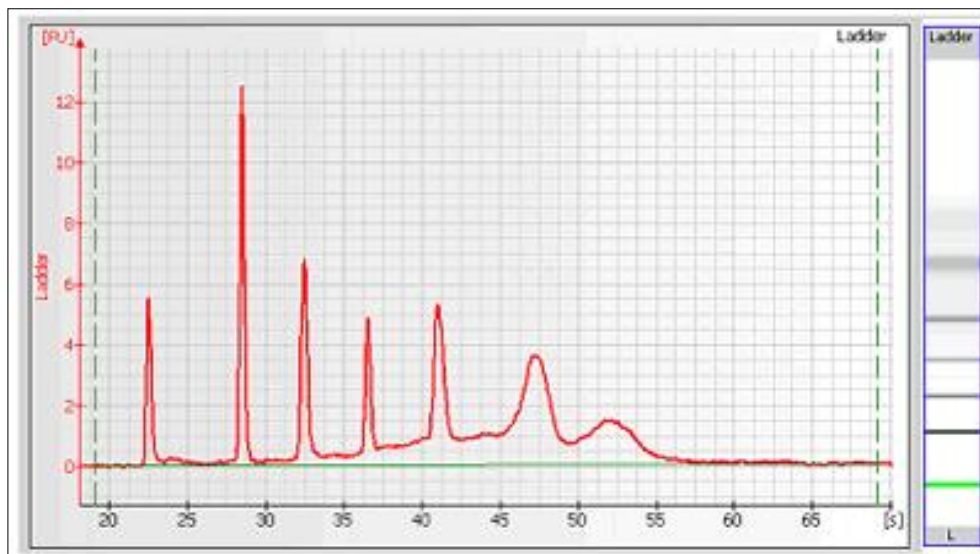


Figura 11. Grafico relativo al *ladder*.

I picchi rappresentati mostrano i trascritti di RNA separati secondo le loro dimensioni crescenti, nel seguente ordine: 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 e 6.0 Kb. A fianco del grafico è presente la riproduzione dell'immagine delle bande separate su gel. Il grafico presenta sei picchi relativi ai sei frammenti di differente peso molecolare che il *ladder* contiene e un picco, il primo relativo al *marker*.

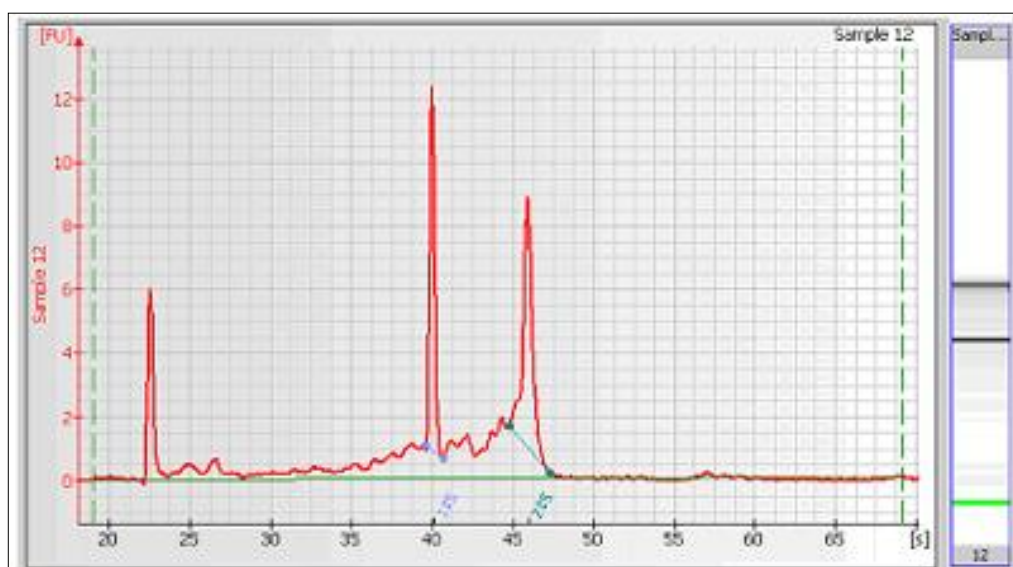


Figura 12. Grafico di un campione di RNA la cui integrità non è stata alterata. Sono presenti tre picchi. Il primo picco è relativo al *marker*. Il secondo e il terzo picco sono invece relativi al campione e rappresentano rispettivamente le unità ribosomiali 18S e 28S. A fianco del grafico è presente la riproduzione dell'immagine delle bande separate su gel.

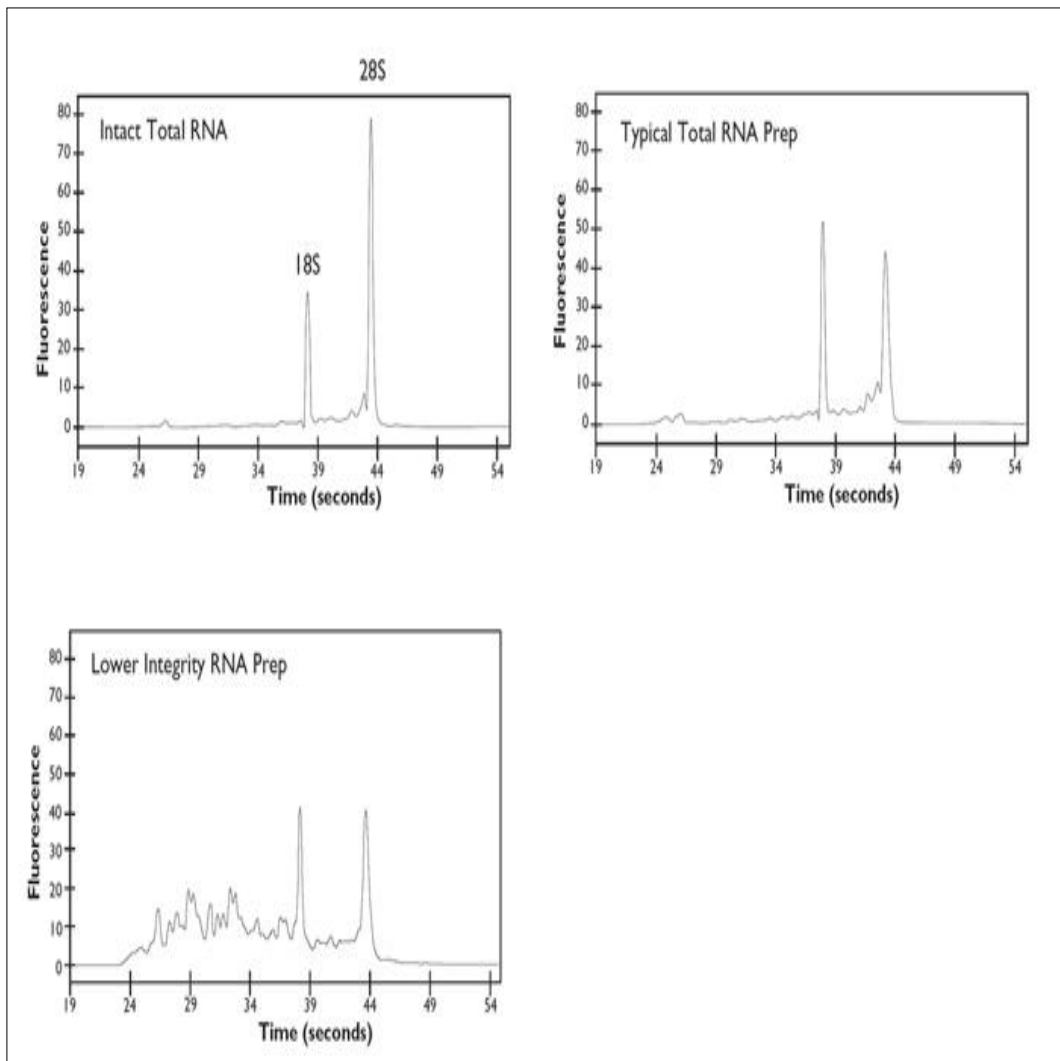


Figura 13. Rappresentazione di possibili grafici ottenuti con il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.7.5 Sonda fluorescente RiboGreen

Determinazione e quantificazione degli acidi nucleici sono fasi essenziali per l'applicazione di molti protocolli di biologia molecolare.

L'accurata quantificazione del template di RNA è un processo critico per l'ottenimento di risultati soddisfacenti mediante applicazione di complesse tecniche di biologia molecolare, quali per esempio la retrotrascrizione di mRNA in cDNA. L'utilizzo di coloranti fluorescenti per la determinazione degli acidi nucleici in soluzione è divenuta una tecnica comunemente impiegata e caratterizzata da maggior sensibilità e minor interferenza legata alla presenza di contaminanti, rispetto alla quantificazione tramite lettura dell'assorbanza a 260 nm.

Esiste un'ampia varietà di coloranti sviluppati per la determinazione basata sulla fluorescenza di DNA a doppio filamento, presente in concentrazioni dell'ordine dei nanogrammi (ng). Molti dei coloranti tradizionalmente usati per la quantificazione di DNA a doppio filamento in soluzione si legano anche a RNA, ma molti di questi mancano dell'aumento di fluorescenza, intensità, linearità di risposta necessarie per una determinazione sensibile. Questo ha perciò ridotto il numero dei coloranti selezionati per la quantificazione di RNA.

Il bromuro di Etidio viene utilizzato per quantificare RNA in soluzione, ma a causa della sua elevata fluorescenza intrinseca il suo uso è limitato a soluzioni con concentrazione superiore a 200 ng/mL. SYBR Green II ha un limite di detenzione di 2 ng/mL, ma manca della intensità di fluorescenza desiderabile per raggiungere lo scopo in modo ottimale. Il reagente RiboGreen permette la quantificazione di concentrazioni di RNA inferiori a 1 ng/mL utilizzando un fluorimetro. La lunghezza d'onda di massima eccitazione del colorante legato all'acido nucleico è di 500 nm, mentre quella di emissione è di 525 nm. È stato determinato che l'aumento di fluorescenza di RiboGreen quando si trova legato agli acidi nucleici è superiore di mille volte la fluorescenza intrinseca del colorante non legato. La sua sensibilità eccede rispetto a quella ottenuta con il bromuro di Etidio di circa duecento volte e rispetto a quella ottenuta determinando l'assorbanza nell'ultravioletto di circa mille volte.

Il metodo RiboGreen è stato comparato inoltre con la valutazione dell'abbondanza di rRNA 18 e ciò ha dimostrato che i dati ottenuti con RiboGreen sono affetti da un coefficiente di variazione minore rispetto ai dati ottenuti con la quantificazione di

rRNA18S, indicando infine un beneficio dell'utilizzo di RiboGreen nella normalizzazione dei dati ottenuti con *Real-Time PCR* in analisi di espressione genica. L'intervallo di linearità per la quantificazione di RNA con il reagente RiboGreen si estende sopra tre ordini di magnitudo, da 1 ng/mL a 1 ng/μL, usando due concentrazioni del colorante (1 μg/mL e 50 ng/mL), (figura 12). Con la concentrazione minore quantifichiamo concentrazioni di RNA comprese fra 1 ng/mL e 50 ng/mL, mentre con la concentrazione di colorante maggiore quantifichiamo concentrazioni di RNA variabili tra 20 ng/mL e 1 μg/mL. Questo metodo mantiene la sua linearità anche in presenza di sostanze che comunemente contaminano le preparazioni di acidi nucleici, quali nucleotidi liberi, detergenti, urea, agarosio, etanolo, cloroformio, proteine e altri ancora. Per consentire lo sviluppo di una quantificazione selettiva per RNA è necessario compiere un pretrattamento dell'acido nucleico con DNase, al fine di rimuovere la presenza di DNA dato che anch'esso viene legato dal reagente RiboGreen.

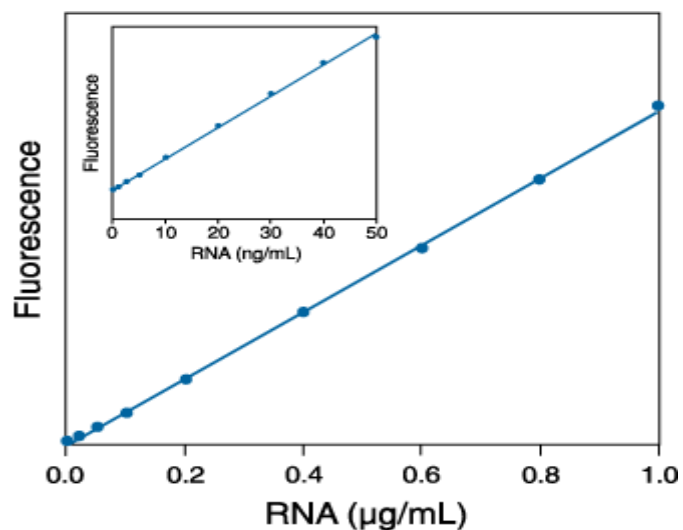


Figura 14. Intervalli dinamici e sensibilità del colorante RiboGreen nella quantificazione di RNA.

2.7.6 Polymerase Chain Reaction (PCR) e Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): principio di funzionamento

La reazione di polimerizzazione a catena, comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare, applicata in vitro, che consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali, partendo da una quantità molto esigua di materiale di partenza. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni. Tale metodica fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis, insignito poi con il premio Nobel per la chimica (1993). La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della riproduzione cellulare: la sintesi di un segmento di DNA a doppia elica a partire da un singolo filamento. Questa tecnica permette la selettiva amplificazione di una specifica sequenza bersaglio di DNA contenuta in un campione eterogeneo, come DNA genomico totale. Per permettere l'amplificazione selettiva è necessario disporre di alcune essenziali informazioni sulla sequenza bersaglio. Queste informazioni sono utilizzate per sintetizzare due sequenze oligonucleotidiche specifiche chiamate *primer*. La sintesi avviene utilizzando desossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), i quali vengono disposti seguendo le leggi della complementarità fra le basi azotate, sulla base della sequenza fornita dal filamento stampo. Questo processo sfrutta la capacità di enzimi chiamati DNA-polimerasi di catalizzare la sintesi di acidi nucleici a partire da una corta sequenza iniziatrice (*primer*) appaiata al filamento stampo. I *primer* sono costituiti da brevi sequenze oligonucleotidiche di DNA (15-25 nucleotidi), complementari agli estremi 5' e 3' del segmento da riprodurre. La scelta dei *primer* da utilizzare costituisce un aspetto essenziale per la buona riuscita della PCR. Essi, infatti, devono potersi ibridare in maniera specifica ed efficiente alla sequenza d'interesse, tralasciando quelle aspecifiche. Affinché la reazione avvenga è necessario che:

- siano disponibili desossiribonucleotidi trifosfati;
- il DNA presente nel campione di partenza sia denaturato;
- siano presenti i *primer* complementari alle estremità 5' e 3' della sequenza bersaglio che si desidera amplificare;
- siano rispettate le condizioni di temperatura e pH che favoriscono la reazione.

È possibile quindi ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA, ponendo in soluzione:

- una quantità anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre;
- una quantità opportuna di nucleotidi liberi per costituire i nuovi filamenti;
- opportuni *primer*;
- altri elementi di supporto necessari per costituire l'ambiente adatto alla reazione, ad esempio ioni magnesio;
- l'enzima DNA-polimerasi.

Schema di un ciclo di PCR:

La reazione si svolge per definizione in tre fasi (figura 15):

- I. Denaturazione;
- II. Appaiamento dei primer (*annealing*);
- III. Sintesi.

Per avviare la reazione è prima necessario provvedere alla separazione dei filamenti del DNA (fase di denaturazione), portando il DNA ad una temperatura compresa fra i 94° e i 99°C, quindi alla creazione del legame tra i *primer* e le regioni loro complementari nei filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*), abbassando la temperatura fino a 30-55°C. Infine la temperatura viene alzata fino a 65-72°C al fine di massimizzare l'azione della DNA-polimerasi, che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di sintesi). Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-30 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la reazione raggiunge un *plateau*. Ciò avviene per svariati motivi, tra i quali carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi oppure diminuzione dei dNTP. Bisogna inoltre considerare che aumentando in modo eccessivo il numero di cicli si potrebbe favorire l'amplificazione di eventuale materiale genomico contaminante. In linea teorica ogni ciclo dovrebbe raddoppiare la quantità di DNA, ciò tuttavia non si realizza. Per avere una stima sufficientemente attendibile del numero di filamenti di DNA ottenuti dopo n cicli si può ricorrere alla formula:

$$Y_n = A \times (1+E)^n$$

dove:

Y_n = DNA prodotto dopo n cicli

A = quantità iniziale di DNA presente

n = numero di cicli di PCR effettuati

E = efficienza dell'amplificazione (in genere compresa tra 0.7 e 0.8)

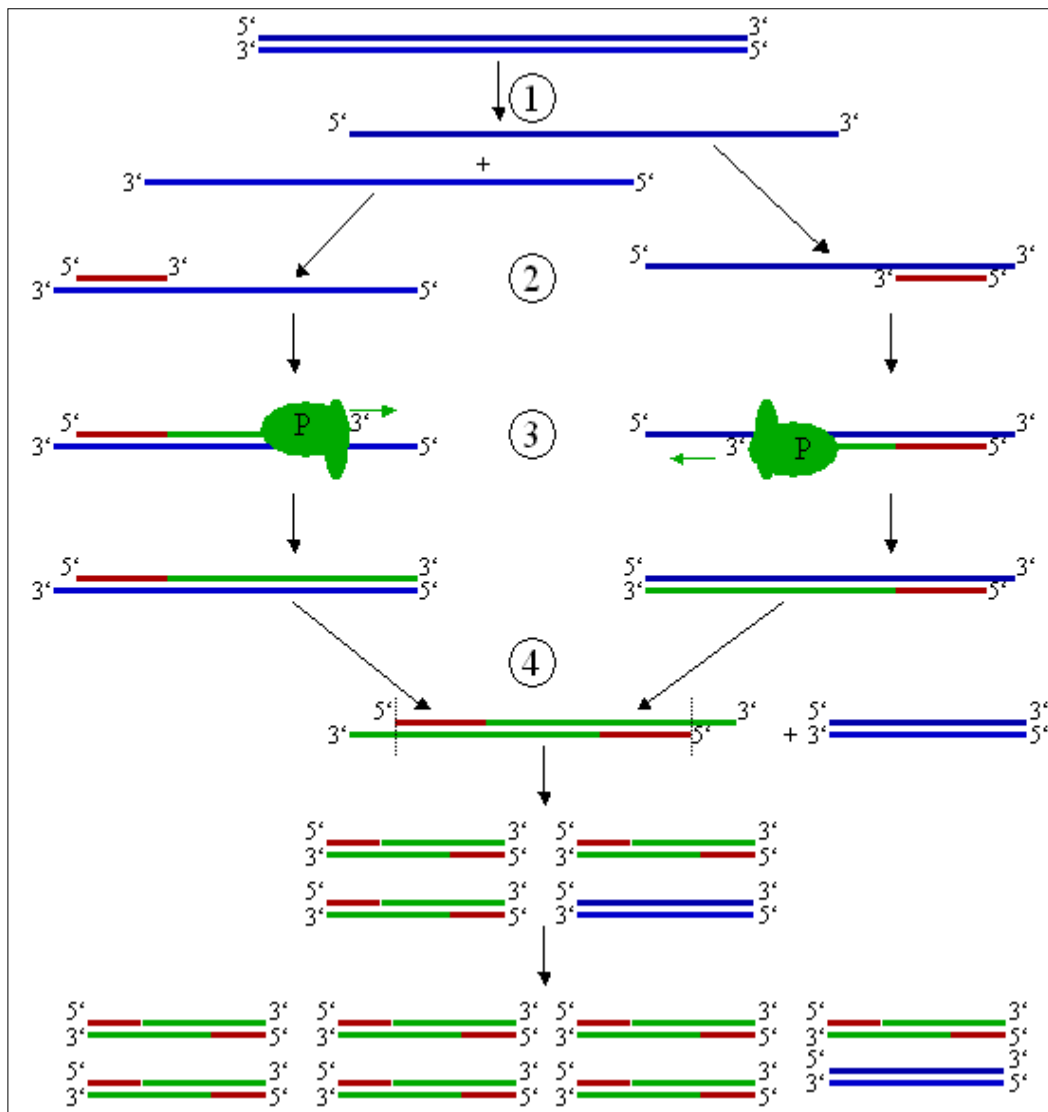


Figura 15. Rappresentazione delle fasi della reazione di PCR:

1) Denaturazione; 2) Appaiamento dei primer (*annealing*); 3) Sintesi; 4) Termine del ciclo.

In verde è rappresentato l'enzima DNA-polimerasi mentre catalizza la sintesi del frammento di DNA che si vuole amplificare, procedendo in direzione 5'-3'.

Il ricorso a *Polymerase Chain Reaction (PCR)* in diagnostica molecolare è aumentato al punto tale che essa è divenuta la tecnica principalmente e comunemente usata per determinare la presenza di acidi nucleici di varia origine in campioni biologici.

La retrotrascrizione è, in biologia, la capacità da parte di particolari enzimi di sintetizzare una molecola di DNA a partire da RNA. L'enzima provvisto di questa caratteristica viene chiamato Trascrittasi inversa, e deve il nome proprio al fatto che è in grado di compiere il passaggio inverso rispetto agli altri enzimi responsabili della trascrizione, che cioè sintetizzano RNA a partire da DNA. La Trascrittasi inversa viene anche chiamata DNA polimerasi RNA-dipendente e viene utilizzata nella *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*, che viene definita come la tecnica più sensibile per la determinazione di RNA messaggero (mRNA) presente in quantità molto esigua, spesso ottenuto tramite estrazione da piccole quantità di tessuto.

Questa tecnica rapida e versatile permette di ottenere e clonare tratti di RNA interessati o addirittura di generare librerie di cDNA. Viene inoltre largamente impiegata per valutare l'espressione genica tramite il contenuto di mRNA per il gene in esame.

2.7.7. Real-Time Polymerase Chain Reaction e tecnologia TaqMan®

La reazione di PCR quantitativa in tempo reale permette la rilevazione e la misura di prodotti generati durante ogni ciclo di PCR attraverso la valutazione di un segnale direttamente proporzionale alla quantità di template inizialmente presente nel campione di partenza. Per ottenere tutto ciò è necessario disporre di un metodo capace di rilevare un segnale proporzionale all'accumulo dei prodotti di PCR mentre tale reazione avviene, e di uno strumento in grado di registrare i risultati ad ogni ciclo di PCR in tempo reale. I dati vengono misurati direttamente durante la fase di amplificazione della reazione di PCR.

Le sue applicazioni sono svariate e diverse tra loro, e tra queste ritroviamo analisi di espressione genica partendo da mRNA.

Esistono diversi modi attraverso cui è possibile implementare questa tecnica, e tra questi i più diffusi sono:

- Fluorofori leganti il DNA;
- Molecular Beacons;

- Sonda TaqMan®.

Fluorofori leganti il DNA

Queste molecole sono in grado di legarsi al DNA intercalandosi tra le basi azotate che compongono i nucleotidi.

I fluorofori più usati sono bromuro di Etidio e soprattutto SYBR Green, (figura 14).

Il colorante si trova nella miscela di reazione per PCR e viene incorporato nelle molecole nascenti di DNA a doppio filamento, con il procedere dalla loro sintesi.

Il colorante non legato esibisce una debole fluorescenza.

L'incremento di fluorescenza può essere monitorato in tempo reale osservando la fase di polimerizzazione.

Questo metodo elimina la necessità di avere sonde specifiche per la sequenza bersaglio da amplificare tramite PCR, e in merito a questo aspetto è importante sottolineare che la specificità della reazione è determinata esclusivamente dai primers usati. Tra gli altri vantaggi del metodo ricordiamo la semplicità d'uso e la sensibilità.

Il maggiore svantaggio nell' utilizzo di SYBR Green è che esso genera un segnale di fluorescenza qualunque sia il doppio filamento di DNA al quale si trova legato, inclusi dimeri dei *primer* e altri prodotti di reazione non specifici.

Il metodo quindi conduce ad una sovrastima della quantità della sequenza bersaglio.

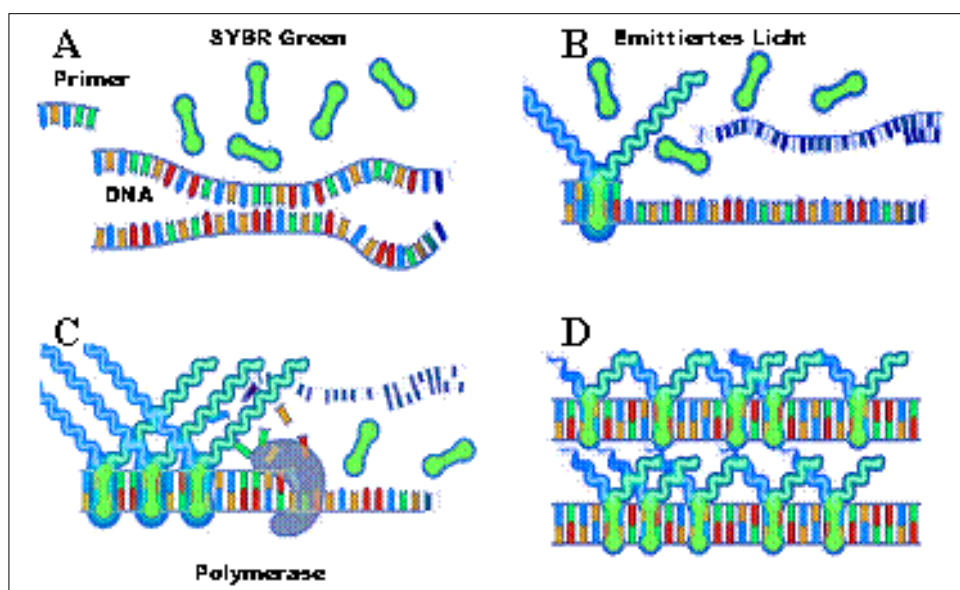


Figura 16. Rappresentazione schematica di un ciclo di PCR in presenza di SYBR Green. **A** denaturazione; **B** Annealing; **C** Polimerizzazione; **D** Prodotti di PCR.

Molecular Beacons

Le *Molecular beacons* sono sonde costituite da corti segmenti di DNA a singolo filamento.

Il loro utilizzo si basa sul principio della capacità delle sonde oligonucleotidiche di ibridare specificamente con sequenze a loro complementari, disegnate appositamente per la determinazione della sequenza bersaglio che desideriamo amplificare. Alle due estremità di ogni molecola si trovano delle sequenze di basi azotate, solitamente nove o dieci, complementari fra loro. Questo permette alla sonda di assumere una conformazione ripiegata, simile a quella di una forcina, quando non si trova appaiata alla sequenza bersaglio (figura 15). Nella porzione a forma di ansa è presente la sequenza di basi che consente l'ibridazione specifica al prodotto di PCR che desideriamo determinare e quantificare. Ancora alle due estremità *Molecular Beacon* presenta da una parte un colorante fluoroforo (*fluorescent reporter dye*) e dall'altra un *quencher*. Quando la sonda si trova ripiegata come una forcina, *quencher* e fluorocromo si trovano spazialmente molto vicini tra di loro, e in queste condizioni ogni segnale fluorescente emesso dal fluorocromo viene assorbito dal relativo *quencher*. Con il procedere della reazione di amplificazione i nuovi prodotti sintetizzati vengono denaturati dalle alte temperature esercitate durante la fase di denaturazione. Nello stesso istante anche la conformazione a forcina di *Molecular Beacon* è denaturata. Quando la temperatura scende per dare inizio alla fase di ibridazione dei primer, ogni *Molecular Beacon* è in grado di appaiarsi con l'appropriata sequenza complementare presente nel prodotto di PCR. In queste condizioni i segnali di fluorescenza emessi dal fluorocromo, dopo la sua eccitazione ad una appropriata lunghezza d'onda, non potranno più essere bloccati dal *quencher*. L'intensità di fluorescenza rilevata risulta quindi proporzionale alla quantità di prodotti di PCR sintetizzati ed in particolare aumenta in modo direttamente proporzionale al loro aumento.

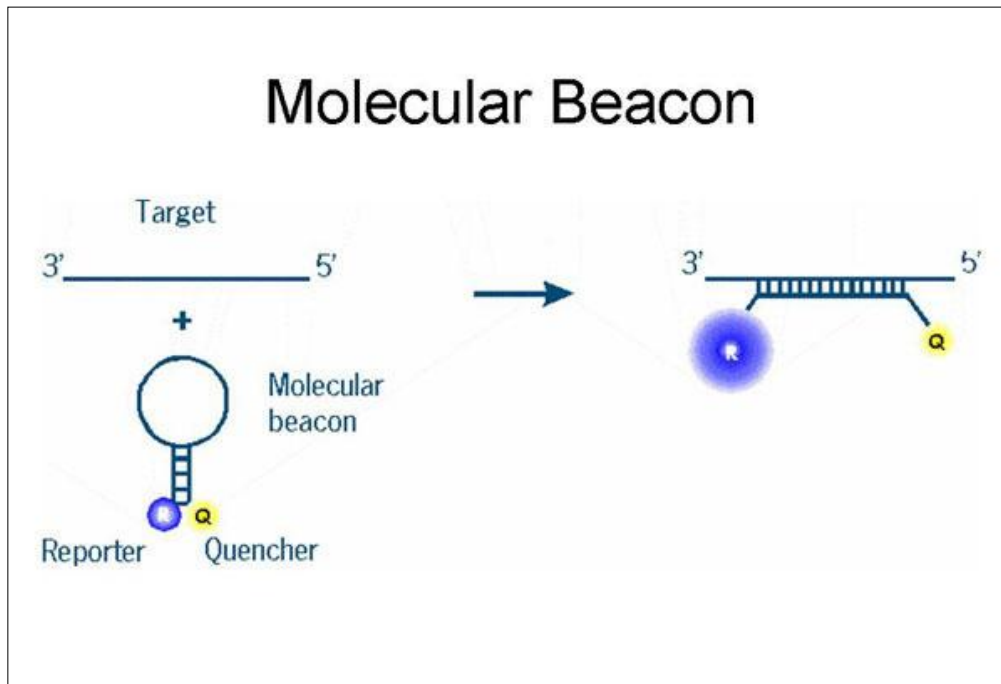


Figura 17. Meccanismo d'azione di *Molecular Beacon*.

Sonde TaqMan®

Queste sonde sono costituite da un oligonucleotide, di 20-30 basi azotate, contenente un colorante fluorescente detto *reporter*, tipicamente in posizione 5', ed un *quencher*, tipicamente in posizione 3'. La sonda si lega per complementarità ad una regione che si trova all'interno della sequenza da amplificare con la reazione di PCR.

La sequenza da amplificare è definita in modo molto preciso attraverso i *primers* (figura 18). L'ibridazione sequenziale inizialmente dei *primers* e successivamente della sonda TaqMan® consente di ottenere un aumento graduale del livello di specificità del processo di individuazione della sequenza bersaglio. Questo evita il bisogno di confermare la specificità del prodotto di amplificazione ottenuto, qualora la reazione di polimerasi a catena sia arrivata a termine.

La conformazione spaziale di una sonda intatta, ovvero la posizione reciproca del *quencher* e del *reporter*, permette di bloccare ogni emissione di fluorescenza, sia quando essa si trova legata alla sequenza da amplificare sia quando si trova libera nella miscela di reazione.

Il rilascio di fluorescenza avviene solamente quando ha inizio la reazione di amplificazione della sequenza bersaglio.

La sonda TaqMan® è caratterizzata da una temperatura di melting (T_m) approssimativamente superiore di 10°C rispetto alla temperature di melting dei *primer*; questo per permettere l'appaiamento della sonda stessa alla sequenza bersaglio durante la fase di sintesi della PCR che si svolge a 60°C.

Dopo l'ibridazione dei *primer* alla sequenza da amplificare l'enzima DNA-polimerasi inizia a sintetizzare la nuova sequenza, sulla base del disegno fornito dal filamento stampo. Con il procedere della sintesi l'enzima incontra la sonda TaqMan® e grazie alla sua attività 5' esonucleasica è in grado di rimuovere mentre avanza dei frammenti della sonda stessa.

Questo significa che prima verrà rimosso il *reporter*, ed una volta che ciò è avvenuto i segnali di fluorescenza emessi dal *reporter* stesso, opportunamente eccitato da radiazioni elettromagnetiche di una lunghezza d'onda prefissata, possono essere rilevati e quantificati dallo strumento.

L'incremento del segnale di fluorescenza avviene in modo direttamente proporzionale all'aumentare del numero di copie della sequenza bersaglio sintetizzate ad ogni ciclo.

I fattori che permettono alla sonda TaqMan® di svolgere il proprio ruolo sono tre:

- effettiva capacità del *quencher* di bloccare i segnali di fluorescenza emessi dal *reporter* quando la sonda è integra;
- effettiva capacità della sonda di ibridizzare efficientemente alla sequenza bersaglio;
- degradazione efficiente della sonda da parte della DNA-polimerasi.

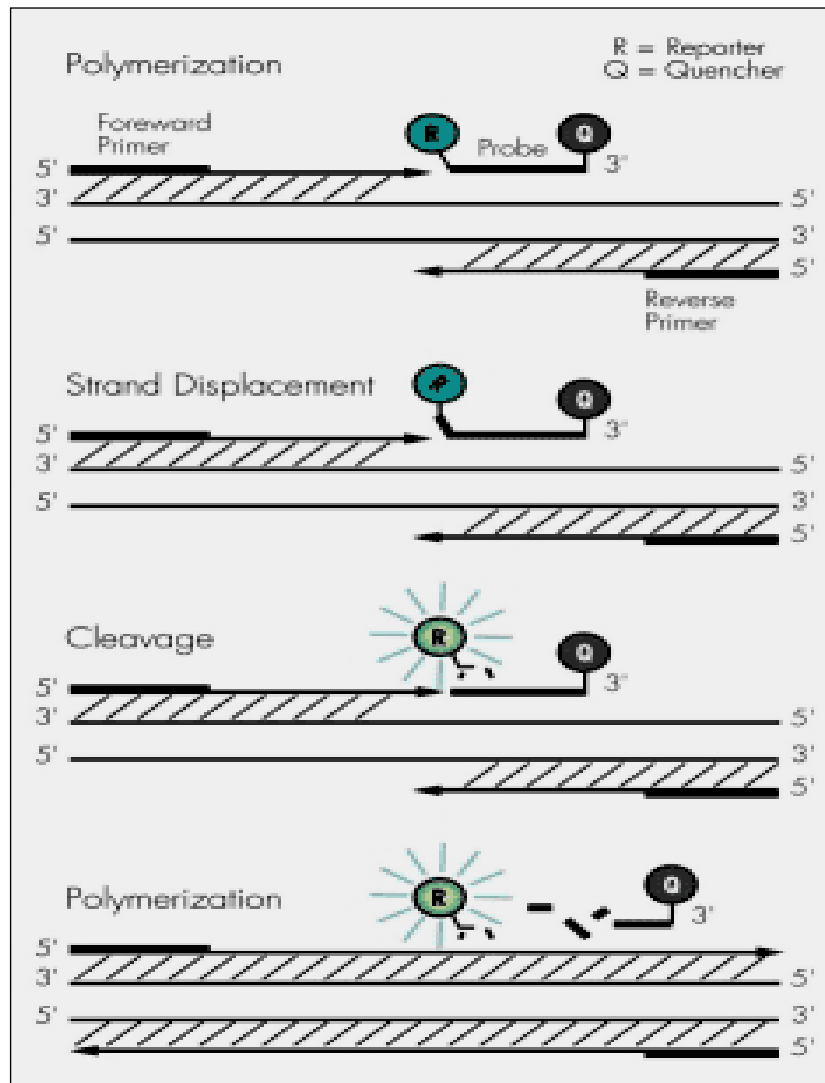


Figura 18. Meccanismo d'azione della sonda TaqMan®. Primer e sonda ibridano con la sequenza bersaglio. L'emissione di fluorescenza non può avvenire fino a quando la sonda è intatta. Durante la fase di amplificazione della reazione di PCR, la sonda viene frammentata per attività esonucleasica 5'–3' espressa dall'enzima Taq-polimerasi, e questo permette al *reporter* di emettere segnali di fluorescenza.

Coloranti fluorescenti

Il *reporter* viene legato covalentemente all'estremità 5' della sonda oligonucleotidica. Spesso come colorante fluorescente viene utilizzato *6-carboxy-fluorescein*, *FAM* (6-carbossi-fluoresceina), ma anche *tetrachloro-6-carboxy-fluorescein*, *TET* (tetrachloro-6-

carbocboradi-fluoresceina) o *Hexachloro-6-carboxy-fluorescein*, *HEX* (esacloro-6-carbossi-fluoresceina) possono essere utilizzati a questo scopo.

Come *quencher* viene utilizzato TAMRA (6-carbossi-tetrametil-rodamina) attaccato all'estremità 3' della sonda TaqMan®.

La sonda è chimicamente fosforilata all'estremità 5' per prevenire eventuali estensioni durante lo svolgimento della PCR. Quando la sonda è ancora intatta la vicinanza spaziale tra *reporter* e *quencher* consente la soppressione dei segnali di fluorescenza emessi dal *reporter*. Durante la PCR la sonda si appaia specificamente in una zona compresa tra i due primer e l'attività esonucleasica dell'enzima DNA-polimerasi permette la sua progressiva degradazione. Nel momento in cui il *reporter* viene rimosso si ha un incremento della fluorescenza che risulta proporzionale alla quantità di prodotto sintetizzato.

Ibridizzazione

Affinché la sonda TaqMan® venga degradata durante la fase di amplificazione è necessaria la sua ibridizzazione alla sequenza bersaglio. Per la sintesi delle sonde fluorogeniche vengono generalmente applicate le regole formulate per la sintesi delle sonde di ibridizzazione; ovvero si cercano di evitare:

- contenuti di guanina-citosina superiori al 50%
- formazione di strutture secondarie
- lunghe sequenze di adenina o guanina

Altrettanto importante è l'assenza di appaiamento tra la sonda e i *primer*. Eventuali appaiamenti sono responsabili di un calo nella concentrazione effettiva di sonda e *primer*, il che implica un calo nell'efficienza di ibridizzazione.

Sonda e *primer* devono appaiarsi al filamento stampo di DNA durante la prima fase di ogni ciclo di PCR, cioè durante la fase di ibridazione, pena il fallimento della reazione stessa.

Gli ibridi formati da *primer* e sequenza bersaglio sono resi maggiormente stabili dall'enzima DNA-polimerasi durante la fase di amplificazione, ciò non avviene per l'ibrido sonda TaqMan®-sequenza bersaglio poiché la sonda non è la diretta interessata nell'estensione. Questo fenomeno spiega il motivo per cui l'ibrido sonda TaqMan®-

sequenza bersaglio deve essere più stabile e avere una temperatura di *melting* (T_m) superiore rispetto all'ibrido *primer*-sequenza bersaglio. Generalmente il valore di T_m della sonda TaqMan® dovrebbe essere almeno 5-10°C superiore al valore di T_m dei primer. La stima del valore di T_m solitamente non riflette il suo effettivo valore nelle condizioni di reazione, ma viene comunque considerato adeguato per gli obiettivi preposti.

Il valore ottimale della temperatura di appaiamento dei *primer* viene ottenuto attraverso una serie di prove sperimentali in cui viene valutata la resa della reazione.

Idealmente le sonde TaqMan® sono composte almeno da 20-30 nucleotidi al fine di ottenere un'adeguata specificità. Sonde troppo lunghe sono caratterizzate da valori elevati di T_m e sebbene questo sia favorevole per la buona riuscita della reazione, un incremento nella lunghezza oltre i 30 nucleotidi comporta anche dei problemi. Tra questi problemi vi è una riduzione nella resa di reazione e con l'aumentare della lunghezza della sonda aumentano anche le probabilità di formazione di strutture inter o intra-molecolari.

Fattori da considerare per l'applicazione di Real-Time Polymerase Chain Reaction mediante sonde TaqMan®

I fattori determinanti la riuscita della reazione sono essenzialmente tre:

- ibridazione dei primer alla sequenza bersaglio e loro estensione;
- ibridazione della sonda TaqMan® in una zona interna alla sequenza delimitata dai primer;
- estensione dei primer completa e degradazione della sonda TaqMan®.

Il taglio della sonda e la generazione di fluorescenza avvengono durante la fase di amplificazione della reazione e solo se la sonda è appaiata alla sequenza bersaglio. Generalmente la fase di amplificazione viene condotta ad una temperatura non superiore ai 72°C, per favorire la stabilità del complesso sonda TaqMan®-sequenza bersaglio. Altri fattori che si possono modificare per favorire la riuscita della reazione sono la concentrazione di cloruro di magnesio (MgCl), operandone un incremento (3.5-

6 mM), e la durata della fase di appaiamento dei primer ad una temperatura inferiore alla T_m della sonda TaqMan®, attraverso il suo prolungamento.

La quantità di acido nucleico contenuto nel campione deve essere non inferiore ai 50-100 ng, indipendentemente dal fatto che si tratti di DNA o di RNA.

Nel nostro studio si è applicato il protocollo esclusivamente su campioni di RNA. L'amplificazione di RNA può svolgersi utilizzando la strategia a una fase o a due fasi. La prima prevede di utilizzare un enzima come rTth-polimerasi caratterizzato sia da attività retro-trascrittasi (RT), sia DNA-polimerasi. La seconda strategia invece prevede la separazione delle fasi di retro-trascrizione e di amplificazione, e utilizza prima un enzima quale Multi-Scribe RT capace di convertire RNA in cDNA e successivamente un secondo enzima quale DNA-polimerasi per compiere l'amplificazione. Il nostro protocollo prevede di usare la strategia a due fasi.

Rea-Time PCR richiede per essere sviluppata una strumentazione composta da un termociclatore, un computer, un fluorimetro, un sistema di acquisizione dei dati e un software di analisi dei dati. Nel laboratorio di *Molecular & Clinical Pathology* viene utilizzato il sistema AB 7900HT PCR Real-Time correlato al software Sequence Detection System 2.1 (figura 17).



Figura 19. Rappresentazione di AB 7900HT PCR Real-Time System.

Il sistema è composto da un termociclatore, un computer, un fluorimetro, un sistema di acquisizione dei dati e un software di analisi dei dati.

2.7.8 Presentazione dei risultati di Real-Time PCR e loro interpretazione

Il principio di base utilizzato nell'analisi dei dati ottenuti attraverso *Real-Time PCR*, si fonda sul fatto che il numero di cicli di reazione necessari per raggiungere una ben definita concentrazione di prodotto di amplificazione, costituiscono un accurato indicatore dell'iniziale concentrazione di sequenza bersaglio presente all'inizio della reazione.

Il dato da registrare è l'incremento di fluorescenza, che può essere rilevato utilizzando un fluorimetro. Il numero di cicli richiesti per raggiungere una definita intensità di fluorescenza correla con l'iniziale concentrazione di sequenza bersaglio presente, così come l'intensità di fluorescenza correla con la concentrazione dei prodotti di PCR presenti.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato il rilevatore di fluorescenza incluso nell'analizzatore AB 7900HT Real-Time PCR System.

Questo sistema permette una determinazione quantitativa dell'acido nucleico amplificato utilizzando un lettore di fluorescenza. Il lettore rileva contemporaneamente la fluorescenza emessa da tutti i 96 pozzetti di una micropiastra. L'incremento di fluorescenza viene determinato in un ben preciso momento durante ogni ciclo di reazione.

Quantificazione relativa

La quantificazione relativa è un metodo impiegato per accertare differenze nel contenuto di una o più definite sequenze di acido nucleico tra diversi campioni. Questo metodo assume particolare rilevanza qualora si vogliano accertare variazioni funzionali in molecole di RNA messaggero (mRNA).

L'obiettivo di esperimenti di questo tipo è determinare il rapporto tra un preciso mRNA bersaglio e altre molecole bersaglio, oppure tra una sola molecola di mRNA in diverse condizioni.

I risultati ottenuti sono poi normalizzati rispetto a un controllo endogeno, anche definito come gene di riferimento (*Reference gene*, *Housekeeping gene*).

Ci sono due metodi per ottenere la quantificazione relativa dei livelli di espressione di un determinato gene:

- metodo della curva standard;
- metodo della comparazione dei cicli soglia (*Cycling threshold, Ct*).

Il primo metodo prevede di costruire una curva standard sia per il controllo endogeno che per la sequenza di interesse. Successivamente per ogni campione vengono estrapolati i dati utilizzando l'appropriata curva standard.

Il secondo metodo, da noi utilizzato, prevede di ricavare dati quantitativi attraverso il valore di *Ct* generato durante la reazione di amplificazione.

Ct è definito come il ciclo di reazione al quale si rileva un incremento statisticamente significativo della quantità dei prodotti di PCR, la fluorescenza emessa dal campione in quel momento supera una soglia ben definita e scelta valutando la fluorescenza di fondo (*Background fluorescence*), (figura 18).

Ct costituisce anche un indicatore della riuscita della reazione, ovvero che la sonda si è ibridata in maniera specifica al bersaglio ed è stata poi frammentata dall'attività esonucleasica della DNA-polimerasi.

Il punto più critico del metodo risiede nella scelta del valore soglia partendo dal valore di fluorescenza di background, che non ha un valore costante, ma varia a seconda del variare delle condizioni di reazione.

I valori di *Ct* rilevati sono direttamente proporzionali alla quantità della sequenza bersaglio presente nel campione di partenza e costituiscono la base per il calcolo dei livelli di espressione di mRNA o del numero di copie di DNA. Per ogni campione viene fatta una comparazione tra il livello di espressione del gene di interesse e di un determinato gene di riferimento.

La quantificazione viene fatta sottraendo il valore di *Ct* del gene di riferimento dal valore di *Ct* del gene di interesse. Il valore risultante (ΔCt) viene usato come esponente della base 2. Il risultato rappresenta la differenza di espressione rilevata fra i due geni.

Il metodo della quantificazione relativa viene agevolmente applicato qual'ora il numero dei geni di cui venga valutata l'espressione sia elevato.

La quantificazione relativa si basa sull'assunto che il livello di espressione genica di un gene di riferimento non sia soggetto a variazioni nelle condizioni sperimentali.

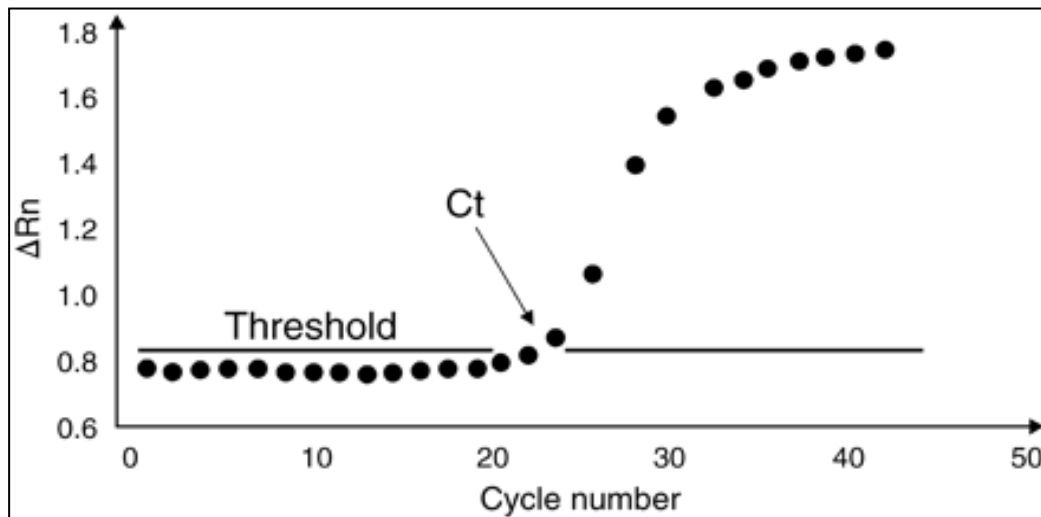


Figura 20. Rappresentazione grafica dei numeri di cicli di reazione

L'emissione di fluorescenza viene misurata in continuo durante la reazione di PCR. Il valore di ΔRn , ovvero il valore di incremento del segnale di fluorescenza da cui è stato sottratto il valore di fluorescenza di fondo, viene comparato in un grafico ad assi cartesiane con il numero di cicli di reazione. Ct rappresenta il ciclo al quale il segnale di fluorescenza oltrepassa una soglia prescelta.

Geni di riferimento

Un gene di riferimento (*Housekeeper gene*) è definito come un gene la cui espressione è essenziale affinché la maggior parte delle cellule svolgano la loro funzione. Tale gene consente di compensare l'alta variabilità nell'efficienza della *Real-Time PCR*. Questa tecnica permette di quantificare i prodotti ottenuti dalla PCR durante la sua fase di amplificazione, ma per farlo in modo accurato richiede un'uguale quantità di RNA in tutti i campioni da cui si parte. In qualsiasi protocollo sperimentale di *Real-Time PCR* una certa aliquota di ogni campione viene valutata in modo quantitativo rispetto all'espressione di un gene di riferimento prescelto, quale può essere GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi). Questo viene fatto al fine di normalizzare eventuali differenze nella quantità di RNA di partenza o inefficienze nella sintesi di cDNA. Dal rapporto tra il numero di copie del gene di controllo stimata per ogni campione e il valore più alto tra questi, risulta un fattore di correzione, che può essere

applicato per normalizzare i risultati ottenuti dalla PCR quantitativa. L'utilizzo di un gene di riferimento che sia aggiuntivamente di tipo endogeno consente inoltre di prevenire eventuali errori dovuti ad una inaccurata stima della concentrazione di RNA totale e della sua qualità nel campione di partenza.

La selezione di un gene di riferimento deve essere molto attenta, poichè la sua espressione può variare da tessuto a tessuto o anche in base alle differenti fasi del ciclo cellulare. Infine l'espressione di un gene di riferimento può essere molto elevata rispetto a quella dei geni da valutare, ed in alcune circostanze l'efficienza di amplificazione tra questi può differire considerevolmente. Uno dei presupposti che un gene di riferimento deve soddisfare è che il suo livello di espressione non deve variare tra i vari campioni dello studio sperimentale (campioni trattati e campioni di controllo). I geni di riferimento utilizzati nel nostro protocollo sono:

- *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH* (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi);
- *Ribosomal Protein L32, RPL32* (Proteina Ribosomiale L32);
- *Ribosomal Protein L27, RPL27* (Proteina Ribosomiale L27);
- *18S mRNAs*.

Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH)

L'RNA codificante per *GAPDH* viene frequentemente usato come controllo endogeno nelle analisi di *RT-PCR*, poichè in sistemi sperimentali la sua espressione è costante a tempi differenti e dopo manipolazioni sperimentali.

2.7.9 Valutazione della contaminazione da DNA genomico su RNA estratto da sangue

Nei campioni di RNA estratti da sangue è stata valutata la contaminazione da DNA genomico. L'obbiettivo era quello di ottenere un confronto fra l'effettiva efficienza del trattamento DNase in colonna (applicato nel processo di estrazione di RNA da sangue con utilizzo di PAXgene Blood RNA kit) e del trattamento DNase in piastra.

Si è quindi sottoposto parte del campione ad un nuovo trattamento DNase in piastra e valutando successivamente i livelli di contaminazione da DNA genomico per entrambe le porzioni di ogni campione. Il metodo di valutazione della contaminazione prevede di suddividere nuovamente le due porzioni di ogni campione (frazione di campione sottoposta al trattamento DNase in colonna e frazione sottoposta a trattamento DNase in colonna e in piastra) e di sottoporre la prima ad un trattamento con enzima capace di retrotrascrivere RNA in cDNA, e le altre allo stesso trattamento, ma in assenza del suddetto enzima. Nella porzione sottoposta alla reale reazione si è ottenuta la retrotrascrizione di tutto l'RNA presente in cDNA, mentre nella porzione sottoposta alla reazione in assenza di enzima non si è avuta nessuna retrotrascrizione e il numero di copie di DNA stimate era legato solamente a contaminazione genomica non rimossa dal trattamento con enzima DNase.

2.7.10 Microarray

I microarrays, o matrici ad alta densità, sono la più recente di una serie di tecniche che sfruttano le caratteristiche peculiari della doppia elica del DNA, ovvero la natura complementare delle due catene e la specificità dell'accoppiamento delle basi.

Questa tecnica applicata per la prima volta da Ed Southern nel 1975, ha aperto di fatto la strada alla possibilità di analizzare i profili di espressione genica di un intero organismo.

Per studiare gli mRNA, essi vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA, con l'uso di un enzima chiamato *trascrittasi inversa* e allo stesso momento marcati con una sonda fluorescente. Quando si fa avvenire l'ibridazione fra la sonda presente sulla matrice e il cDNA target, quest'ultimo rimarrà legato alla sonda e può essere identificato semplicemente rilevando la posizione dove è rimasto legato.

Le principali applicazioni dei microarray sono l'analisi dei polimorfismi SNP, il confronto di popolazioni di RNA di cellule diverse e l'utilizzo per nuove metodologie di sequenziamento del DNA, nonché per lo screening di sequenze senso e antisense nella ricerca degli oligonucleotidi usati in campo farmaceutico.

Il segmento di DNA legato al supporto solido è noto come probe. Migliaia di probe sono usati contemporaneamente in un array. Questa tecnologia è nata da una tecnica più

semplice nota come Southern blotting, dove frammenti di DNA attaccati ad un substrato sono testati da sonde geniche aventi sequenze conosciute.

La misura dell'espressione genica mediante microarrays ha un notevole interesse sia nel campo della ricerca di base che nella diagnostica medica, in particolare di malattie a base genetica, dove l'espressione genetica di cellule sane viene comparata con quella di cellule affette dalla malattia in esame.

Esistono di fatto due tecnologie per la produzione di microarrays: la prima denominata a spotting e la seconda detta in situ. Nella tecnologia spotting, le sonde da ancorare al supporto solido, normalmente un vetrino da microscopia, sono sintetizzate a parte e quindi depositate sul supporto.

Tali sonde possono essere costituite da molecole di cDNA lunghe alcune migliaia di paia di basi le cui sequenze possono essere ricavate da banche dati genomiche (GenBank, dbEST o UniGene) o da librerie costituite da cDNA non ancora completamente sequenziato. Nello studio dell'espressione di organismi eucarioti, le sequenze delle sonde sono normalmente ricavate dalle cosiddette Express Sequence Tags (EST), ovvero dalle porzioni codificanti identificate dai singoli progetti genoma. Tali banche dati contengono, assieme alle sequenze, anche tutta una serie di informazioni bibliografiche necessarie, oltre che per la scelta delle porzioni di DNA da depositare sulla matrice, anche per la successiva valutazione dei profili di espressione. Nel caso dei lieviti o di organismi procarioti le sonde sono generate per amplificazione diretta, con primers specifici, del DNA genomico.

Selezionate le sequenze da studiare, il cDNA relativo viene prodotto mediante PCR ottenendo così sonde della dimensione da 600 a 2400 bps.

Più recentemente, le sonde che vengono depositate sono rappresentate non tanto da frammenti di materiale genomico ottenuto via PCR, quanto piuttosto da sequenze sintetiche di oligonucleotidi lunghe 50-70 paia di basi.

Una volta prodotte, le sonde vengono depositate sul supporto solido, in genere costituito da un vetrino. La deposizione viene effettuata da sistemi robotizzati che mediante l'utilizzo di pennini prelevano le sonde direttamente dalle piastre utilizzate per la PCR e le depositano sul vetrino formando spots di circa 100-150 μm di diametro, distanziati l'uno dall'altro 200-250 μm . Durante la deposizione, il sistema di controllo del robot registra automaticamente tutte le informazioni necessarie alla caratterizzazione ed alla completa identificazione di ciascun punto della matrice (identità del cDNA,

coordinate sul supporto, ecc.). Una volta sul vetrino, il probe viene legato covalentemente ai gruppi amminici del supporto attraverso una reazione innescata dall'irraggiamento con luce ultravioletta, mentre il cDNA in eccesso viene rimosso con semplici lavaggi dell'array. Infine, il cDNA sul supporto viene reso a catena singola attraverso una denaturazione termica o chimica.

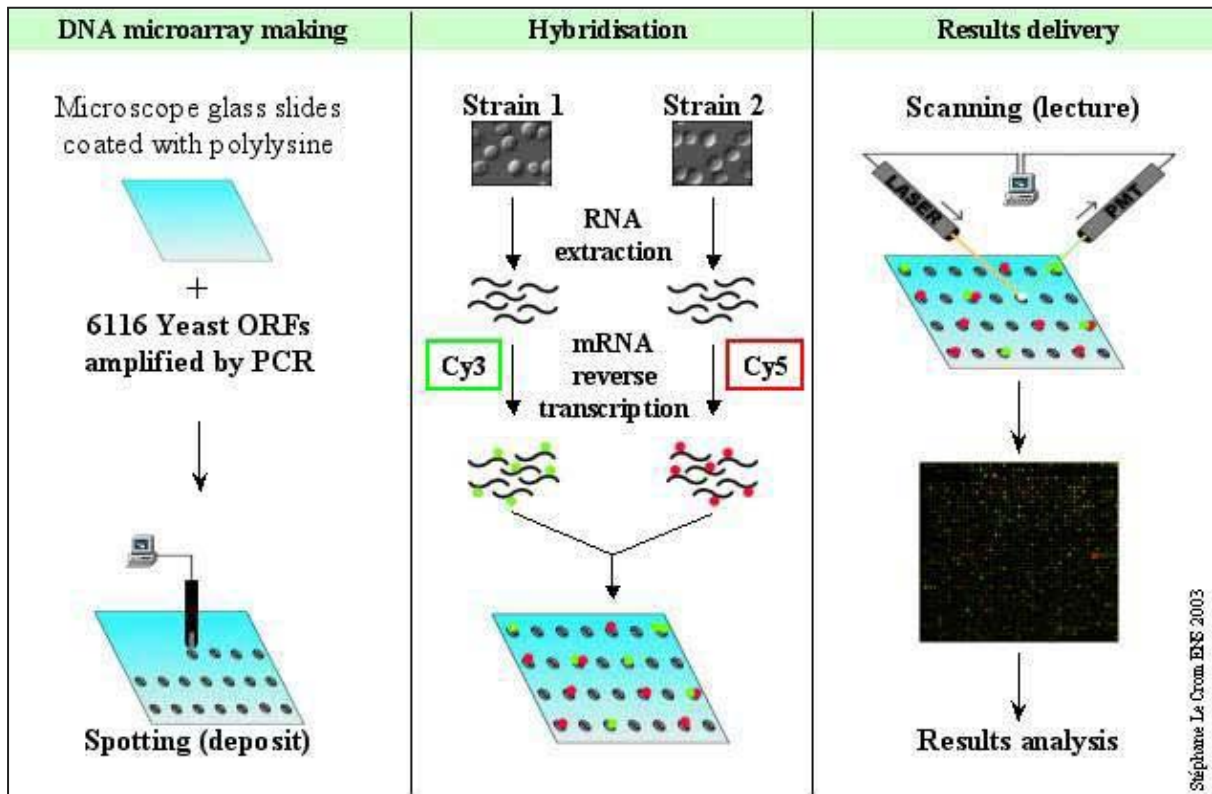


Figura 21. Rappresentazione tecnica Microarray.

L'altra tecnica utilizzata per la produzione di microarrays è quella detta in situ che, sviluppata da Affimetrix, è frutto dell'interazione di due tecnologie particolari, la fotolitografia e la sintesi diretta in fase solida di oligonucleotidi. La sintesi delle sonde avviene direttamente sulla superficie del supporto solido. In particolare, il supporto costituito da un wafer di silicio viene ricoperto con piccole sequenze di oligonucleotidi (oligo-starter). Questi oligo hanno la caratteristica di avere il gruppo reattivo protetto da gruppi fotosensibili e quindi, grazie ad una maschera fotolitografica, è possibile indirizzare la luce in specifiche posizioni dell'array e liberare i siti necessari per la sintesi

della sequenza. Una volta deprotetti selettivamente i siti reattivi, è sufficiente incubare la superficie con desossiribonucleotidi protetti per allungare la catena in fase di sintesi. Ripetendo il ciclo di deprotezione grazie all'applicazione di maschere fotolitografiche diverse e di incubazione è quindi possibile aggiungere nucleotidi diversi in posizioni diverse e sintetizzare tutte le sonde necessarie per l'analisi di un dato genoma.

I targets, ovvero gli acidi nucleici da ibridizzare alle catene di cDNA ancorate al supporto solido, sono normalmente ottenuti dalla marcatura dell'mRNA proveniente da un dato organismo per mezzo di molecole fluorescenti. Probes e targets vengono poi messi a contatto per fare avvenire la reazione di ibridazione e dopo alcuni lavaggi per rimuovere i prodotti aspecifici, l'array viene passato attraverso uno scanner per la misura dei segnali fluorescenti. L'intensità dei pixel di ciascuna immagine è proporzionale al numero di molecole di tracciante presenti sullo spot e quindi al numero di probes che hanno ibridizzato le sonde ancorate al supporto. Di fatto, livelli diversi di fluorescenza indicano livelli diversi di ibridizzazione e quindi di espressione genica. Il segnale rilevato dallo scanner viene poi sottoposto ad algoritmi di filtrazione e di pulizia del segnale e convertito in valori numerici .

L'analisi di espressione genica può essere eseguita mediante un microarray 'one color' (basato sull'intensità del segnale) o 'two color' (basato sul rapporto del segnale). L'approccio tradizionale a due colori è ben fondato sia da un punto di vista storico che scientifico; l'approccio ad un colore, se abbinato con i microarrays di alta qualità e da un adeguato numero di campioni, offre flessibilità nel disegno sperimentale. In commercio, sono disponibili diversi fluorescenti per un'analisi mediante microarray. La maggior parte degli esperimenti 'two color' usano la cianina 3 e la cianina 5. Per la procedura "Gene Expression Platform One Color" dell'Agilent, è stata scelta la cianina 3 perché è meno suscettibile alla degradazione da parte di fattori ambientali come l'ozono, il pH, e solventi organici rispetto alla cianina 5.

3. MATERIALE E METODI

3.1 Animali

I campioni di cuore e sangue sono stati prelevati da ratti Sprague Dawley (CD) maschi di età pari a 10 settimane (290-320 g di peso corporeo), ottenuti da Charles River Laboratories (Calco, Lecco, Italia).

Amiodarone

Gli animali sono stati trattati con un composto noto, l'Amiodarone (Sigma), per via orale. La dose utilizzata era di 300 mg/Kg/die (dose/volume=10mL/Kg). La durata del trattamento è stata di dieci giorni.

Lo studio prevedeva un gruppo di controllo, che ha ricevuto il veicolo, e un gruppo di trattamento (15 animali/gruppo). Gli animali sono stati così divisi:

- 5 animali per esami istopatologici e di biomarcatori
- 10 animali per analisi di espressione genica

Come veicolo è stata utilizzata metilcellulosa 1% (peso/volume, p/v) sciolta in acqua sterile per iniezione.

Isoproterenolo

Gli animali sono stati trattati con un composto noto, l'Isoproterenolo (Sigma), con una dose singola per via sottocutanea e con sacrificio alla ventiquattresima ora dopo la somministrazione. Come veicolo è stata utilizzato PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7.4.

Per questo composto sono stati effettuati 2 studi:

Fase A. Una "dose range", in cui sono state somministrate dosi di Isoproterenolo pari 2, 1 e 0.3 mg/Kg/die al fine di determinare la dose più tollerabile dagli animali. Lo studio prevedeva un gruppo di controllo, che ha ricevuto il veicolo, e tre gruppi di trattamento (6 animali/gruppo).

Fase B. Lo studio prevedeva un gruppo di controllo, che ha ricevuto il veicolo, e un gruppo di trattamento (10 animali/gruppo). La somministrazione della dose è stata scelta dopo aver osservato i dati clinici della Fase A (0.3 mg/Kg/die).

I cinque animali trattati a 0.3 mg/Kg/die nella fase A, sono stati utilizzati, inoltre, per prelevare campioni di tessuti al fine di effettuare esami di istopatologia e di chimica-clinica. I tessuti per effettuare l'analisi dell'espressione genica sono stati invece prelevati dagli animali della Fase B.

Il sacrificio degli animali è avvenuto mediante dissanguamento dell'aorta addominale, mentre gli animali si trovavano in uno stato di anestesia profonda indotta da isofluorano.

3.2 Prelievo dei campioni

Dal momento del sacrificio, tutte le operazioni devono essere eseguite nel minor tempo possibile, facendo inoltre attenzione ad evitare qualsiasi eventuale contaminazione del campione che potrebbe danneggiare o degradare l'RNA.

Il prelievo di campioni di dimensioni simili tra loro, per volume o peso, è il primo passo per contenere l'errore sperimentale.

Raccolta dei campioni di sangue:

1. Gene expression

I campioni di sangue sono stati raccolti al momento della necropsia, attraverso puntura della aorta addominale, raccogliendolo in apposite provette PAXgene Blood RNA tube (Qiagen) in ragione di 2.5mL, e conservato a -20°C. Queste provette di raccolta del sangue contengono un additivo che stabilizza l'RNA cellulare e lo protegge dalla degradazione ad opera di ribonucleasi, minimizzando eventuali variazioni nell'espressione genica.

2. Analisi cliniche

I campioni sono stati raccolti in provette *Vacutainer* da 2 mL contenenti gel separatore per siero. Le provette sono conservate in luogo fresco e al riparo dalla luce, e dopo almeno 30 minuti dal prelievo, si è provveduto a centrifugarle a 1850 RCF per 10 minuti a 4°C. Dopo di che, il siero è stato utilizzato per l'analisi dei biomarcatori. Il siero rimanente è stato aliquotato in provette da 1,5 mL e conservato a -80°C.

3. Striscio di sangue (Blood Smear)

I campioni sono stati raccolti in provette *Vacutainer* da 0.5 mL contenenti K2 EDTA. Le provette sono state conservate a temperatura ambiente ed in agitazione fino al momento dell'utilizzo. Dalla provetta sono stati raccolti 0.9 μ L di sangue intero per effettuare lo striscio di sangue su vetrini SuperFrost® mediante il coloratore automatico ADVIA S60. Il coloratore utilizza un kit di colorazione contenente eosina e blue di metilene. L'analisi dei linfociti è avvenuta classificando quest'ultimi in base all'accumulo di vacuoli all'interno del loro citoplasma. La classificazione è avvenuta indicando: con il simbolo -\- i linfociti normali, che presentavano un citoplasma molto ridotto e nessun vacuolo; con il simbolo +\- quelli che presentavano un aumento di citoplasma con delle zone nelle quali non poteva essere confermato l'accumulo di vacuoli; ed, infine, con simbolo +\+ i linfociti che presentavano un aumento del citoplasma e, al loro interno, la presenza evidente di vacuoli.

Raccolta dei campioni di cuore:

1. Gene Expression

Alle necropsie è stata effettuata l'esportazione del cuore. I campioni sono stati prelevati con lame monouso e pesati su piastre sterili.

Per ogni singolo animale, si è prima diviso il cuore nei due atri e due ventricoli e, successivamente si è passati a tagliare le 4 sezioni in frammenti più piccoli.

Tutti i frammenti di uno stesso tipo di sezione sono stati posti in un'unica provetta contenente 3.5 mL di RNALater. Il rapporto tra volume di RNALater e quello del campione deve essere almeno di 5:1. La provetta è stata poi agitata vigorosamente a mano per 30 secondi, quindi posta in ghiaccio e successivamente conservata a -20°C. I campioni di tessuto in RNALater possono essere conservati a -70°C per un tempo indefinito.

2. Istopatologia

In fase di necropsia, il cuore è stato prelevato, pesato su piastre sterili e posti in vasetti di plastica con identificativo del campione contenente formalina al 10% per essere conservato a temperatura ambiente.

E' stato poi ruotato orizzontalmente sul tavolo ed effettuato un taglio longitudinale a circa 1 millimetro sul lato destro in parallelo alla linea mediana al fine di esporre le quattro camere cardiache (Figura 22).

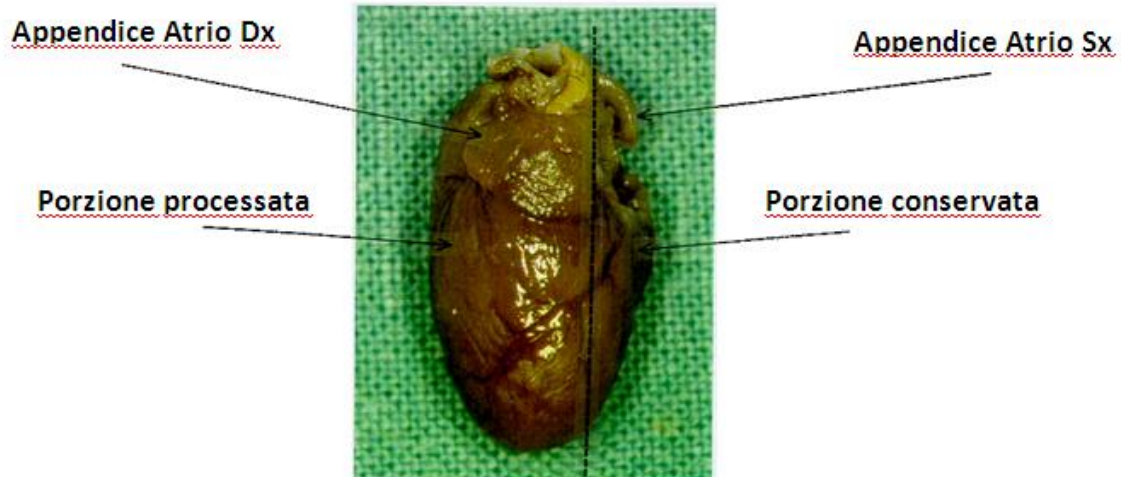


Figura 22. Approccio standard per la sezione del cuore di ratto.

La porzione maggiore del cuore ottenuta è stata processata mediante l'utilizzo del processatore automatico VIP 5 (TissueTek, Sakura Finetek, USA) con il seguente programma: 6 stazioni di Alcool a concentrazione crescente (75%-80%-95%-3x100%) per 1h e 15 min ciascuna, 3 stazioni di Toluene 100% a 1h ed, infine, 3 stazioni di Paraffina a 58°C di 1h e 15 min.

Al termine del ciclo di processazione i campioni sono stati inclusi in Paraffina utilizzato piattaforma di inclusione Tissue Embedding Console System (Tissue Tek). I campioni sono stati inclusi longitudinalmente rispetto alla superficie di taglio.

I blocchetti di cuore inclusi in Paraffina sono stati raffreddati e/o conservati a -20°C fino al momento del taglio con Microtomo Rotativo Manuale HM 325 (Microm, Bio-Optica S.p.A., Milano, Italy) per ottenere sezioni dello spessore di 5 µm.

La colorazione delle sezioni è avvenuta mediante coloratore automatico Leica AutoStainer XL (Leica Microsystem SRL, Milano, Italy) mediante il seguente protocollo: 3 passaggi in Xilene per 2 min, passaggi in Alcool Etilico decrescente (100%, 95%, 70% per 2 min ciascuno), acqua distillata per 3 min, Ematossilina di Mayer per 6 min, acqua di fonte per 10 min, Eosina 1% per 2 min, acqua di fonte per lavaggio, 2 passaggi in

Alcool Etílico 95% per 30 sec, 2 passaggi in Alcool Etílico 100% per 1 min ed, infine, 3 passaggi di Xilene per 1 min.

Microscopia Elettronica (TEM)

Sono stati raccolti 3 mL di sangue intero in vials contenenti EDTA. Entro 30 min dal prelievo, le vials sono state centrifugate a 3000g per 10 min a TA. e il plasma è stato rimosso.

I campioni sono stati fissati con 1% di glutaraldeide e 4% di formaldeide. Per il cuore è stato, inoltre, utilizzato un buffer di formalina al 10% a TA. I campioni di sangue e cuore sono stati poi post-fissati con 2.5% di glutaraldeide per 1 ora a TA, processati con osmio al 1%, deidratati con acetone ed inclusi con resina epossidica. Le sezioni semifini sono state tagliate mediante l'utilizzo dell'Ultramicrotomo PT-PC (RMC, Emme 3, Mazza di Rho, Milano, Italy) con uno spessore di circa 500nm, raccolte su vetrino e colorate con blu di toluidina per valutare la qualità di processazione e l'orientamento del blocchetto di resina. Le sezioni ultrafini sono state invece tagliate ad uno spessore di circa 80 nm e raccolte su retini.

La colorazione con Acetato di Uranile e Citrato di Piombo è stata effettuata mediante il coloratore Leica Microsystem EM Stain (Leica Microsystem) con il seguente protocollo: 1h a 25°C in Acetato di Uranile, 20 min a 25°C in Citrato di Piombo, lavaggio in acqua distillata e incubazione a TA per l'asciugatura dei retini.

3.3 Analisi Chimico-cliniche

Quantificazione della cTnI mediante ADVIA Centaur CP

Il dosaggio ADVIA Centaur CP TnI-Ultra è un immunodosaggio sandwich a tre siti che utilizza la tecnologia a chemiluminescenza diretta. Un reagente ausiliario è incluso per ridurre il legame non specifico. Il reagente Binario Lite include un anticorpo policlonale caprino anti-troponina I marcato con estere di acridinio e 2 anticorpi biotinilati monoclonali murini anti-troponina I.

Il reagente fase solida è costituito da particelle di lattice magnetiche coniugate con streptavidina.

Tutti i reagenti sono contenuti nella confezione di reagente ReadyPack.

Gli anticorpi nel reagente Binario Lite si legano alla Troponina I nel campione.

La biotina contenuta nel complesso immune si lega quindi alle particelle magnetiche marcate con streptavidina.

Il sistema esegue automaticamente le seguenti procedure:

- eroga 100 µl di campione in una cuvetta e incuba per 4,7 minuti a 37 °C
- eroga 50 µl di reagente ausiliario più 100 µl di Reagente Binario Lite e incuba per 3,0 minuti a 37 °C
- eroga 150 µl di Reagente Fase Solida e incuba per 6,3 minuti a 37 °C
- separa, aspira e lava le cuvette con Lavaggio 1
- eroga 300 µl di reagente acido (R1) e di reagente basico (R2) per dare inizio alla reazione chemiluminescente
- elabora i risultati in base all'opzione selezionata, come indicato nelle modalità d'uso del sistema o nella guida in linea.

Per la quantificazione della cTnI viene utilizzata una curva standard di riferimento. Esiste quindi una relazione diretta tra la quantità di Troponina I presente nel campione e le unità di luce relativa (RLU) rilevate dal sistema.

Determinazione cTnI, cTnT, FABP e Myl3 mediante strumentazione MesoScaleDiscovery

Il pannello di lesione cardiaca di tipo 3 (ratto) è un test immunologico a sandwich. Prevede l'utilizzo di una piastra da 96 in plastica scura che presenta all'interno di ogni pozzetto quattro anticorpi di cattura contro cTnI, cTnT, FABP e Myl3; un diluente costituito da EDTA e additivi; quattro stock di calibratori (uno per ogni analita) che subiscono una prima diluizione 1:20 e poi sei diluizioni seriali 1:4; diluente per la diluizione degli anticorpi (Diluent 30), anticorpi contro gli analiti cTnI, cTnT, FABP e Myl3; un wash buffer costituito da PBS pH 7.4 e 200 µL di Tween 20; un Read Buffer per innescare la reazione in elettrochemiluminescenza.

Il protocollo sperimentale invece presenta i seguenti passaggi:

- Diluizione dei calibratori e ricostituzione dei reagenti

- Dispensazione, all'interno di ogni pozzetto, di 25 μ L dell'additivo presente nel kit. Per procedere subito dopo ad un' incubazione della piastra di 30 minuti a T.A. e in agitazione (300–1000 rpm)
- Aggiunta di 25 μ L dei calibratori diluiti, dello standard zero (solo diluente), dei campioni e di un controllo di qualità. Questa fase è seguita da un' incubazione della piastra di 30 minuti a T.A. e in agitazione (300–1000 rpm)
- Lavaggio della piastra con 300 μ L di PBS-Tween 20 per 3 volte e aggiunta di 25 μ L dei quattro anticorpi di quantificazione. La piastra viene incubata per 2 ore a T.A. e in agitazione (300–1000 rpm)
- Lavaggio della piastra con 300 μ L di PBS-Tween 20 per 3 volte
- Aggiunta di 150 μ L di Read Buffer ad ogni pozzetto
- Lettura immediata della piastra tramite strumentazione MSD

Determinazione dell'ANP mediante Immunoassay (EIA)

L'immunoassay (EIA) per la determinazione dell'ANP, si basa sulla competizione tra l'ANP del campione e di un tracciante, costituito da ANP di ratto (tracciante) legato all'acetilcolinesterasi (AChE), verso i siti specifici di anticorpi di coniglio anti-ANP (l'antisiero).

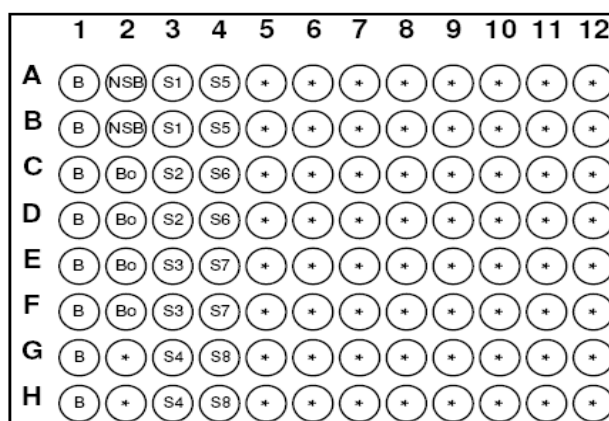


Figura 23. Schema di una piastra SpiBio per la determinazione dell'ANP. B=Blank; NSB=Non Specific Binding; S1-S8= Standard 1-8; * = Campione o controllo qualità.

La procedura del protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Dispensare 100 μ l di EIA Buffer nei pozzetti NSB e 50 μ l in quelli Bo
- Dispensare 50 μ l di standard ANP di ratto negli otto pozzetti degli standard (S1-S8) cominciando dalla concentrazione più bassa a quella più alta.
- Dispensare 50 μ l di campioni e del controllo qualità in duplicato. Concentrazioni alte di ANP del campione possono essere diluite con EIA Buffer.
- Dispensare 50 μ l del tracciante AChE in tutti i pozzetti escluso il Blank (B)
- Dispensare 50 μ l di antisiero dell'ANP di ratto in tutti i pozzetti escluso il Blank (B) e NSB.
- La piastra deve essere quindi coperta con un nastro adesivo di plastica e incubato per 16-20 ore a 4°C.
- Effettuare 5 lavaggi con 300 μ l di Wash Buffer (costituito da PBS e Tween 20)
- Dispensare 200 μ l del reagent di Ellman.
- Incubazione di 1 ora al buio e a temperatura ambiente.
- Lettura della piastra mediante spettrofotometro ad una lunghezza d'onda compresa tra 405 e 414 nm.

3.4 Gene Expression

Processazione dei campioni di cuore

Alle necrosopie è stato prelevato il cuore per essere diviso e conservato in atrio destro, atrio sinistro, ventricolo destro e ventricolo sinistro.

L'analisi dell'espressione genica sul cuore, è avvenuta sul ventricolo sinistro. In quanto questa porzione è la più soggetta a manifestare le lesioni indotte dai composti utilizzati.

Reagenti

I campioni di fegato e polmone sono stati conservati in RNALater (Ambion).

L'estrazione di RNA totale dai campioni è stata eseguita con il reagente TRIzol (Invitrogen), cloroformio (Sigma-Aldrich), acqua nucleare-free (Ambion) ed utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen).

Nella reazione di rimozione del DNA genomico sono stati utilizzati gli enzimi Dnase 1, Rnase-free e Superase 1 (Ambion).

La valutazione quantitativa dell'RNA è stata effettuata utilizzando il biofotometro Eppendorf.

La valutazione qualitativa dell'RNA è stata effettuata utilizzando il kit RNA 6000 Nano Reagents & Supplies (Agilent).

Per la quantificazione di RNA con la sonda RiboGreen è stato utilizzato il kit RiboGreen[®] assay (Molecular Probes).

La retrotrascrizione a cDNA è avvenuta utilizzando il kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). I primers utilizzati nelle reazioni di PCR (reazione di polimerizzazione a catena) sono stati sintetizzati dalla Proligo, mentre le sonde da Applied Biosystems.

Le reazioni di Real-Time PCR sono state effettuate utilizzando Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Omogeneizzazione

Per ogni campione si è proceduto a pesare una quantità di tessuto di circa 60 mg.

Questo è stato omogeneizzato in 450 µL TRIzol utilizzando un omogeneizzatore automatico Tyssue Lyser (Qiagen) per 1 minuto alla frequenza di 30 Hz. È seguita un'incubazione a 4°C per 30 minuti, successivamente sono stati aggiunti altri 450 µL TRIzol ed è stata ripetuta l'omogeneizzazione alle stesse condizioni.

Estrazione di RNA

In una nuova provetta contenente un gel separatore sono stati trasferiti 450 µL di omogeneato, a cui sono stati aggiunti 100 µL di acqua e 100 µL di cloroformio.

Il campione è stato prima agitato per 30 secondi manualmente in modo vigoroso e poi centrifugato per 2 minuti alla massima velocità (corrispondente a 20817 RCF con Eppendorf Centrifuge 5417R).

La fase acquosa limpida separata è stata trasferita in una nuova provetta a cui si è poi aggiunto un ugual volume di etanolo 70%.

Il tutto è stato trasferito in colonnine RNeasy in cui sono stati effettuati due lavaggi con 500 µL di tampone RPE. Ogni lavaggio prevede di centrifugare la colonnina per 2 minuti a 10621 RCF e quindi di scartare il liquido di lavaggio.

L'RNA totale è stato infine eluito da ogni colonnina con 50 µL di acqua nuclease-free.

Valutazione quantitativa dell'RNA estratto

La concentrazione di RNA totale di ciascun campione è stata registrata utilizzando uno spettrofotometro (Eppendorf) misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. È stato inoltre valutato il valore del rapporto tra le assorbanze rilevate a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

Valutazione qualitativa dell'RNA estratto

La valutazione qualitativa di RNA totale di ciascun campione è stata effettuata utilizzando il bioanalizzatore 2100 (Agilent Technologies).

Ogni volta che si utilizza il bioanalizzatore è necessario decontaminare gli elettrodi con RNaseZap e acqua RNase-free, prima e dopo ogni corsa elettroforetica.

Per la preparazione del chip è indispensabile lasciar equilibrare preventivamente la temperatura di RNA 6000 Nano LabChip Kit (conservato a 4°C) con quella ambientale per 30 minuti.

La preparazione del gel prevede una sua prima centrifugazione a 5950 RCF per 10 minuti in apposite provette provviste di filtro, quindi l'aggiunta del colorante RNA 6000 Nano dye concentrate ed infine una centrifugazione della miscela gel-colorante a 20817 RCF.

Ogni chip è provvisto di sedici pozzetti, tre sono dedicati al gel, uno al *ladder* e i restanti dodici ai campioni. Affinchè il gel si distribuisca in modo corretto in tutti i micro-canali del chip viene utilizzato un apposito supporto. Tale supporto chiamato *Chip Priming Station* è composto da una stazione dove viene accomodato il chip e una siringa. Il gel viene deposto nel pozzetto e successivamente con la siringa viene esercitata un'adeguata pressione per distribuirlo in modo uniforme, evitando la formazione di bolle d'aria.

Una volta completato il caricamento del gel si procede con il *marker* che viene caricato in tutti i pozzetti dei campioni, anche quelli che non verranno utilizzati, e nel pozzetto del *ladder*. Infine il chip viene completato con il *ladder* e campioni, che prima di essere caricati devono essere denaturati a 70°C per 2 minuti. Il chip viene posto per un minuto nel vortex a 2400 rpm (vortexer IKA® WORKS, con adattatore appositamente disegnato sulla base della forma del chip) e poi nel bioanalizzatore Agilent 2100 per compiere l'analisi. Il tempo necessario per completare la valutazione si aggira sui venti minuti circa.

Il bioanalizzatore è provvisto del software 2100 Expert per l'estrapolazione dei risultati.

Trattamento DNase

Sulla base delle quantificazioni fatte, 20 µg di RNA estratto sono trattati con 4 U DNase1 per rimuovere eventuali contaminazioni da DNA genomico. Ad ogni campione sono stati aggiunti 20 U di Superase 1 e acqua nuclease-free per portarli ad un volume finale di 50 µL. I campioni sono stati incubati a 37°C per 10 minuti e successivamente a 70°C per 5 minuti per inattivare l'enzima.

Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto post-DNase

La concentrazione di RNA totale di ciascun campione è stata valutata nuovamente utilizzando lo spettrofotometro, misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e di 280 nm e calcolando il rapporto tra questi due valori (A_{260}/A_{280}).

Si è quindi proceduto a valutare la qualità dell'RNA post-DNase con il bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies). Le considerazioni sull'elettroforegramma fatte precedentemente valgono anche per questo punto.

Quantificazione di RNA post-DNase con sonda

L'RNA è stato inoltre quantificato utilizzando la sonda fluorescente RiboGreen.

Aliquote di buffer TE 1X sono state distribuite negli appositi pozzetti di una piastra da 96. Come standard è stato utilizzato RNA ribosomiale (100 µg/mL) opportunamente diluito per creare una curva standard con un range di concentrazione tra 0 e 2000 ng/mL. Per la costruzione della curva sono state preparate tre diluizioni con concentrazione di 2000 ng/mL, 500 ng/mL, 62 ng/mL. Le aliquote dei campioni di RNA diluiti 1:40 con buffer TE 1X sono state dispensate nella piastra. Secondo discrezione dell'analista possono essere preparate delle diluizioni addizionali di ogni campione, le quali devono essere testate secondo diluizione 1:40.

A queste aliquote è stata aggiunta un'opportuna quantità di buffer TE 1X al fine di ottenere un'ulteriore diluizione 1:20 del campione.

A tutti i pozzetti sono stati aggiunti 100 µL di sonda RiboGreen preparata diluendo 1:200 la soluzione madre in buffer TE 1X.

La piastra a lettura ottica è stata sigillata e incubata per 3 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce. La fluorescenza emessa dal campione di ogni pozzetto è stata misurata utilizzando un fluorimetro. La lunghezza d'onda (λ) selezionata per l'eccitazione è di 480 nm quella per l'emissione è di 520 nm.

Valutazione No-RT

Per valutare l'efficienza del trattamento DNase è stata quantificata l'attività del gene housekeeping *GAPDH*.

Per la valutazione servono 40 ng di RNA.

Una quantità pari a 20 μ g di RNA post-DNase si trova in 50 μ L e la concentrazione finale è di 400 ng/ μ L. Si deve quindi procedere preparando una diluizione 1:50 di RNA post-DNase per avere una concentrazione finale di 8 ng/ μ L.

A 5 μ L della diluizione di RNA post-DNase sono stati aggiunti 20 μ L della master mix (2.5 μ L *GAPDH* Probe/Primer 10X mix, 5 μ L acqua nuclease-free e 12.5 μ L Taqman Universal PCR Master Mix).

Come controllo positivo è stato utilizzato cDNA di ratto 1 ng/ μ L eluito in acqua nuclease-free, mentre come controllo negativo è stata usata acqua nuclease-free.

La piastra è stata sigillata e centrifugata per 2 minuti a 188 RCF.

La reazione di PCR quantitativa è avvenuta utilizzando lo strumento AB 7900HT, ed è stata condotta secondo i seguenti parametri:

- I step: 50°C per 2 minuti
- II step: 95°C per 10 minuti
- III step: 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto

Il terzo step è stato ripetuto per 40 volte.

I valori di *Ct* ottenuti per ciascun campione e controllo sono stati analizzati utilizzando il software Sequence Detection System 2.1, per confermare che ogni possibile contaminazione causata da DNA genomico sia stata rimossa con il trattamento DNase.

Sintesi di cDNA attraverso Retro-Trascrizione mRNA

La sintesi di cDNA dai campioni di RNA è stata ottenuta utilizzando il protocollo fornito con il kit ABI High Capacity cDNA Archive. Sulla base della quantificazioni di RNA fatte per ogni campione con la sonda RiboGreen, a 10 µg di RNA, portati ad un volume di 70 µL con acqua nuclease-free, sono stati aggiunti 30 µL della master mix (10 µL di tampone RT 10X, 10 µL RT Random Primers 10X, 4 µL dNTPs 100 mM, 5 µL Multi-Scribe RT 50 U/µL e 1 µL Superase Inhibitor 20 U/µL).

I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e successivamente a 37°C per 2 ore.

Sintesi di cDNA attraverso Retro-Trascrizione microRNA

I microRNA, non presentando la poliadenilazione in 3', non possono utilizzare lo stesso kit per la retro-trascrizione degli mRNA.

Bisogna quindi utilizzare dei kit e dei primers specifici per ogni microRNA che si vuole analizzare per convertirli in cDNA.

Per le sue caratteristiche, quindi, l'RT PCR per i microRNA prevede 2 step:

1. Nel primo step, avviene l'estensione del miRNA e la sintesi del primo strand di cDNA (3'-5') utilizzando specifici *miRNA primers* presenti nel *Taqman MicroRNA Reverse Transcription kit*.
2. Nel successivo e ultimo strand, avviene la sintesi del secondo strand di cDNA (5'-3') e quindi del prodotto finale della retro-trascrizione.

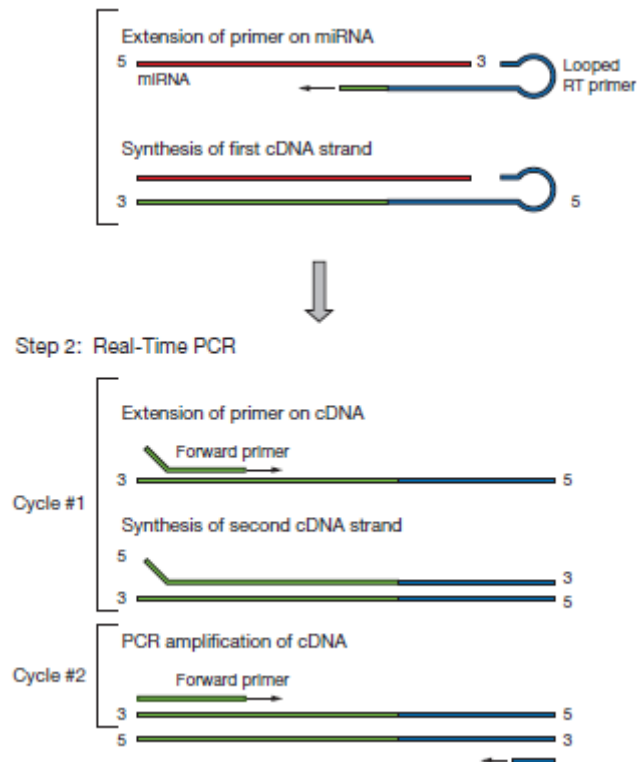


Figura 24. Rappresentazione dei 2 step del RT-PCR per microRNA.

La sintesi di cDNA dai campioni di RNA è stata ottenuta utilizzando il protocollo fornito con il kit Taqman MicroRNA Assay e applicata solo ai campioni di RNA estratti dal cuore.

Sulla base della quantificazioni di RNA fatte per ogni campione con la sonda RiboGreen, a 8 µg di RNA, portati ad un volume di 5 µL con acqua nuclease-free, sono stati aggiunti 10 µL della master mix (1 µL di Buffer RT 10X, 3 µL RT Primers 10X, 0.15 µL dNTPs 100 mM, 1 µL Multi-Scribe RT 50 U/µL e 0.19 µL Superase Inhibitor 20 U/µL e 4.16 µL di acqua nuclease-free).

I campioni sono stati incubati a 16°C per 30 min, a 42°C per altri 30 min ed, infine, a 85°C per 5 min.

Valutazione dell'espressione dei geni di riferimento

Per valutare la reazione di retro-trascrizione di RNA messaggero (mRNA) a cDNA, sono stati utilizzati 3 *Housekeeper genes*: *RPL32*, *RLP27* e *18S mRNAs*.

E' stata preparata una master mix per ogni *Housekeeper genes* in un volume di

20 μL (12.5 μL Taqman Universal Master Mix PCR 2X, 2.5 μL Probe/Primers mix 10X e 5 μL acqua nuclease-free).

Come controllo positivo è stato utilizzato cDNA di ratto (1 ng/ μL), e come controllo negativo acqua nuclease-free.

La piastra è stata sigillata e centrifugata per 2 minuti a 188 RCF.

La reazione di real-time PCR è avvenuta utilizzando lo strumento AB 7900HT, ed è stata condotta secondo i seguenti parametri:

- I step: 50°C per 2 minuti;
- II step: 94.5°C per 10 minuti;
- III step: 97°C per 30 secondi e 59.7°C per 1 minuto.

Il terzo step è stato ripetuto per 40 volte.

I valori dei cicli soglia, *Ct*, ottenuti per ciascun *Housekeeper genes* in ogni campione e controllo sono stati analizzati utilizzando il software Sequence Detection System 2.1, per verificare che ogni campione di RNA sia stato convertito in modo efficace a cDNA.

Processazione dei campioni di sangue

Reagenti

L'estrazione di RNA totale dai campioni di sangue è stata eseguita utilizzando PAXgene Blood RNA kit (Qiagen), (figura 25).

Nella reazione di rimozione del DNA genomico sono stati utilizzati gli enzimi DNase 1 e RNase-free e Superase1 (Ambion).

La valutazione quantitativa dell'RNA è stata effettuata utilizzando il biofotometro Eppendorf.

La valutazione qualitativa dell'RNA è stata effettuata utilizzando il kit RNA 6000 Nano Reagents & Supplies (Agilent) e il bioanalizzatore Agilent 2100 Expert.

Per la quantificazione finale di RNA con la sonda RiboGreen è stato utilizzato il kit RiboGreen[®] assay (Molecular Probes).

La retrotrascrizione a cDna è avvenuta utilizzando il kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). I primers utilizzati nelle reazioni di PCR (reazione di polimerizzazione a catena) sono stati sintetizzati dalla Proligo, mentre le sonde da Applied Biosystems.

Le reazioni di Real-Time PCR sono state effettuate utilizzando Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

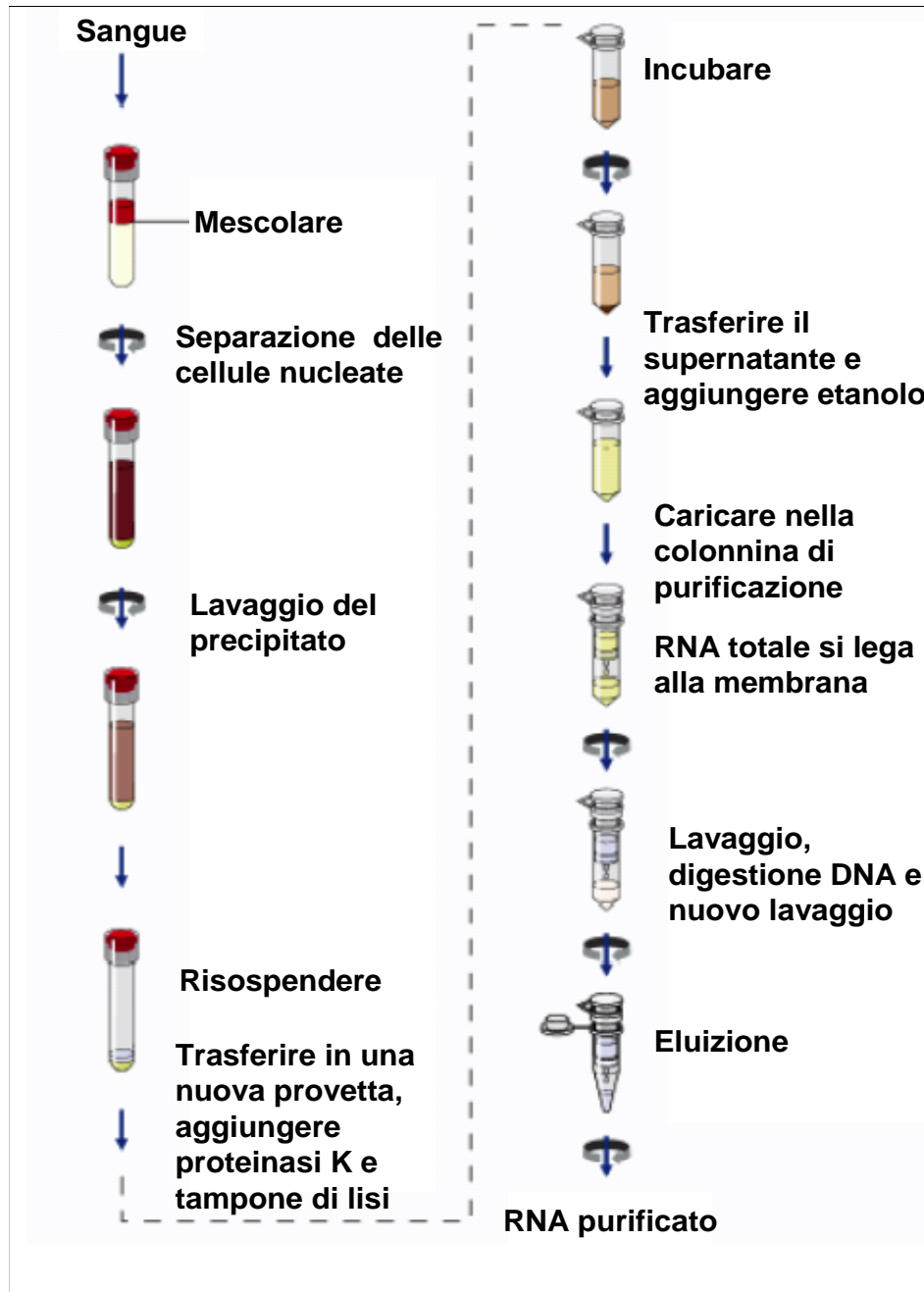


Figura 25. Schema semplificato delle operazioni da svolgere durante l'estrazione di RNA da campioni di sangue mediante PAXgene Blood RNA kit (Qiagen).

Separazione delle cellule nucleate

Al fine di assicurare la completa lisi delle cellule, i campioni sono stati incubati per almeno due ore a temperatura ambiente.

La provetta contenente il campione è stata centrifugata per dieci minuti a 3000-5000 × g, usando un rotore con porta-provette basculanti.

Il supernatante è stato rimosso e si sono aggiunti al precipitato 4 mL di acqua RNase-free.

Il precipitato è stato dissolto per agitazione tramite vortex e quindi sottoposto nuovamente a centrifugazione per 10 minuti a 3000-5000 × g.

Il supernatante deve essere completamente rimosso.

Estrazione di RNA

Il precipitato è stato risospeso con 360 µL di tampone BR1.

Successivamente si sono aggiunti 300 µL di tampone BR2 e 40 µL di proteinase K. I campioni sono stati poi incubati a 55°C per 10 minuti usando un incubatore che permetta la continua agitazione del campione.

Il lisato è stato centrifugato per 3 minuti alla massima velocità.

Si è poi trasferito il supernatante in una nuova provetta e si sono aggiunti 350 µL di etanolo.

Il campione è stato trasferito alla colonna PAXgene spin e centrifugato a 8000-20000 × g per 1 minuto. Sono stati aggiunti in seguito 350 µL di tampone BR3 e si è centrifugato il tutto a 8000-20000 × g per 1 minuto.

Sono stati quindi eseguiti dei lavaggi sequenziali con diversi tamponi, prima BR3 poi BR4, centrifugando i campioni a 8000-20000 × g per 1-3 minuti.

Al termine del processo l'RNA è stato eluito nel tampone BR5.

In questo passaggio è molto importante deporre il tampone direttamente sulla membrana senza toccarla per fare in modo che l'eluizione risulti il più efficiente possibile.

L'RNA eluito viene prima incubato a 65°C per 5 minuti e successivamente posto in ghiaccio.

Valutazione quantitativa dell'RNA estratto pre-DNase

I campioni di RNA sono stati valutati quantitativamente con lo spettrofotometro (Eppendorf) misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm, seguendo le indicazioni precedentemente esposte.

Trattamento DNase in piastra

La reazione di rimozione del DNA genomico è stata ripetuta su 20 µg di RNA utilizzando l'enzima DNase 1. Ad ogni campione sono stati aggiunti 20 U di Superase 1 e acqua nuclease-free per arrivare ad un volume finale di 50 µL.

Al termine del trattamento DNase in piastra sono state ripetute valutazione *No-RT*, con *GAPDH*, e valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto post-DNase.

Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA estratto post-DNase

La concentrazione di RNA totale di ciascun campione è stata valutata nuovamente utilizzando lo spettrofotometro, misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e di 280 nm e calcolando il rapporto tra questi due valori (A_{260}/A_{280}).

Si è quindi proceduto a valutare la qualità dell'RNA post-DNase con il bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies). Le considerazioni sull'elettroferogramma fatte precedentemente valgono anche per questo punto.

Valutazione No-RT

Per valutare l'efficienza del trattamento DNase è stata quantificata l'attività del gene di controllo *GAPDH*, seguendo le indicazioni precedentemente esposte.

Quantificazione di RNA post-DNase con sonda

L'RNA è stato quantificato utilizzando la sonda fluorescente RiboGreen, seguendo il protocollo precedentemente descritto.

Sintesi di cDNA attraverso Retro-Trascrizione

La conversione di RNA in cDNA è avvenuta in cDNA seguendo il protocollo descritto precedentemente per i campioni del tessuto cardiaco

Valutazione dell'espressione dei geni di riferimento

Per valutare la reazione di retro-trascrizione di RNA messaggero (mRNA) a cDNA, sono stati utilizzati 3 *Housekeeper genes* come indicato precedentemente.

3.5 Microarray

L'analisi di espressione genica dei campioni trattati con Isoproterenolo e Amiodarone, è avvenuta mediante il Kit Agilent "*Quick Amp Labeling*".

Il protocollo del Kit Agilent prevede i seguenti passaggi:

Preparazione della MIX Spike

La Mix Spike è una soluzione contenente 10 trascritti poliadenilati sintetizzati in vitro, con concentrazioni che si presentavano da 1 a 6 in scala logaritmica.

Il kit viene, essendo conservato a -80°C, viene fatto sciogliere a temperatura ambiente. La soluzione stock dello spike viene vortexata, incubata per 5 minuti a 37°C e, infine, diluita nel seguente modo:

1. Prima diluizione (1/20)*: 2µl di Spike + 38µl di Dilution buffer
2. Seconda diluizione (1/25): 2µl della diluizione 1/20 + 48 µl di Dilution buffer
3. Terza diluizione (1/10): 4 µl della diluizione 1/25 + 36µl di Dilution buffer

Le diluizioni da utilizzare variano a seconda dei ng di RNA di partenza. A seconda della quantità di RNA che si intende utilizzare nell'array variano le diluizioni della Spike Mix e il volume delle stesse da utilizzare nell'array. In caso di variazioni nelle quantità di RNA di partenza fare riferimento al protocollo Agilent.

Preparazione dei campioni (200 ng)

Una volta estratti, gli RNAs sono stati analizzati qualitativamente mediante BioAnalyzer Agilent 2100 che permette di osservare la qualità dell'RNA estratto attribuendogli un

valore compreso tra 0 e 10 (RIN: RNA Integrity Number). Per la costruzione del microarray vanno utilizzati solo RNAs con un RIN $\geq 7,5$ se estratti da tessuti, $\geq 8,5$ se estratti da colture cellulari.

Il protocollo per la preparazione dei campioni prevedeva quindi i seguenti passaggi:

- Preparare delle diluizioni degli RNA/pool
- Quantificare mediante NanoDrop le concentrazioni delle diluizioni (in duplicato e poi farne la media).
- Prelevare dalle diluizioni esattamente 200 ng di RNA
- Aggiungere a ciascun campione l'H₂O necessaria a portare a un volume totale di 8,3 μ l
- Aggiungere 1,2 μ l di T7 Promoter Primer e 2 μ l della terza diluizione della Spike Mix.

Sintesi del cDNA a doppio filamento

L'RNA estratto viene quindi convertito a cDNA a doppio filamento mediante l'utilizzo di una trascrittasi inversa (MMLV RT). La sintesi a cDNA prevedeva:

- Incubazione del 5X First Strand Buffer per 4 min a 80°C ; Vortexare e spinnare e poi attendere 1 minuto (min) che torni a T° Ambiente (TA)
- Denaturazione: 10 min 65°C
- Raffreddamento: 5 min in ghiaccio
- Spinnata (\approx 20 sec)
- Preparazione della Master Mix:

Master Mix	1x	4,5x	9x	Note
5x First Strand Buffer	4	18	36	Prelevare dalla superficie perchè viscoso
0,1 M DTT	2	9	18	
10 mM dNTPs	1	4,5	9	
MMLV RT	1	4,5	9	A -20°C fino all'ultimo momento
RNase OUT	0,5	2,25	4,5	A -20°C fino all'ultimo momento
Volume TOT (μl)	8,5	38,25	76,5	

- Aggiungere 8,5 µl di Mix per campione
- Incubazione: 2h a 40°C a Bagno Maria
- Denaturazione: 15 min a 65°C in Blocco riscaldante per eppendorf (*non occorre spinnare*)
- Raffreddamento: 5 min in ghiaccio
- Spinnata: 20 sec a 10000 x g (centrifuga a TA)
- Mettere in ghiaccio

Sintesi del cRNA marcato

In questa fase il cDNA, prodotto nel passaggio precedente, viene convertito in cRNA marcato. La marcatura viene fatta mediante Cyanina 3 (Cy3).

E' consigliabile conservare la Cyanina a +4°C; se non si pensa di congelarla e scongelarla troppo spesso è, invece, consigliabile tenerla a -20°C e al riparo dalla luce.

Da quando si comincia a lavorare con la cianina bisogna evitare il più possibile l'esposizione alla luce, evitando l'illuminazione elettrica nella stanza e coprendo con alluminio i campioni. La sintesi di cRNA avviene seguendo questi passaggi:

- Una volta scongelato, incubare il PEG 50% 1 min a 40°C, vortexarlo e spinnarlo a TA.
- Agitare e spinnare tutti i reagenti a T° ambiente per poi conservarli in ghiaccio.
- Aggiungere a ciascun campione 2,4 µl di Cy3
La Cy3 viene:
 - *Sempre prelevata dal fondo del tubino e non dalle pareti in quanto potrebbe essere secca.*
 - *Depositata in un lato dell'eppendorf (nella superficie del campione)*
- Viene quindi preparata la MIX:

Master Mix	1x	4,5x	9x
Nuclease Free H2O	15,3	68,85	137,7
4X Transcription Buffer	20	90	180
0,1 DTT	6	27	54
1.1.1.1. NTP mix	8	36	72
50% PEG	6,4	28,8	57,6
RNase OUT	0,5	2,25	4,5
Inorganic Pyrophosphatase	0,6	2,7	5,4
T7 RNA Polymerase	0,8	3,6	7,2
Volume TOT (µl)	57,6	259,2	518,4

- Aggiungere 57,6 µl di MIX per campione
- Incubazione: 2h a 40°C a Bagno Maria
- Spinnare per depositare tutto sul fondo
- Congelare a -80°C

Purificazione del cRNA marcato

La purificazione del cRNA marcato avviene mediante il kit “*Rneasy miniKit*” della QiAgen. Anche durante questa fase i campioni vanno protetti dall’esposizione alla luce. Una volta ricostituiti i reagenti vengono effettuate le seguenti fasi:

- Aggiungere ai campioni 20 µl di H2O nucleasi Free per ottenere un volume di 100µl. L’acqua dev’essere aggiunta nel bordo, senza spipettare per non toccare la cianina.
- Aggiungere 350 µl di Buffer RLT e vortexare mano a mano i campioni e poi effettuare una piccola spinnata.
- Aggiungere 250 µl di Etanolo 96-100%.
- Trasferire i 700 µl in colonnina con tubo da 2 ml.
- Centrifugare a 4°C – 13000 rpm per 30 sec.

Dopo la centrifugazione, la membrana deve risultare colorata. Altrimenti significa che l'RNA non è stato marcato.

- Spostare la colonna in un nuovo tubo collettore e gettare l'eluato.
- Aggiungere 500 µl di Buffer RPE.
- Centrifugare a 4°C a 13000 rpm per 30 sec e gettare poi l'eluato.
- Aggiungere nuovamente 500 µl di Buffer RPE.
- Centrifugare a 4°C a 13000 rpm per 30 sec e gettare poi l'eluato.
- Centrifugare nuovamente a 4°C a 13000 rpm per 30 sec per seccare la colonna.
- Posizionare la colonna in un'eppendorf da 1,5 ml
- Aggiungere 30 µl di H₂O RNasi Free e attendere 60 sec.
- Centrifugare a 4°C a 13000 rpm per 30 sec.
- L'eluato viene conservato
- Aggiungere altri 30 µl di H₂O RNasi Free e attendere 60 sec
- Centrifugare a 4°C a 13000 rpm per 60 sec
- Raccogliere i 60 µl tot di eluito contenente il cRNA marcato.
- Mettere i campioni in ghiaccio.
- Quantificare ciascun RNA in duplicato al NanoDrop.
- Conservare a -80°C.

Quantificazione del cRNA marcato e dell'incorporazione della Cy3

Mediante Nanodrop viene effettuata la quantificazione del cRNA marcato e dell'incorporazione della Cyanina3.

La quantificazione del cRNA può essere facoltativa; il protocollo prevede di utilizzare 1,3 µl di campione per entrambe le misurazioni.

Per ogni campione, le quantificazioni vengono fatte in duplicato e poi viene fatta una media dei due valori.

Viene quindi calcolato il volume esatto di ciascun campione e quindi diluito per ottenere 1,65 µg di RNA marcato.

Il NanoDrop restituisce anche i rapporti di assorbanza 260/280 (misura della contaminazione proteica) e 260/230 (misura contaminazione di solventi); questi si

devono avvicinare il più possibile a 2, altrimenti la qualità dei campioni non è ottimale per procedere con l'ibridizzazione.

Le misurazioni per l'incorporazione della Cy3 vengono espresse in pmol/μl; per un RNA che abbia concentrazione 100 ng/μl, sono considerati buoni valori di incorporazione compresi tra 0,8 e 1,6, ottimi per valori pari a 2

Calcolare l' *Attività Specifica di Cy3*:

$$(conc\ di\ Cy3\ (pmol/\mu l)) / (conc\ del\ cRNA\ (ng/\mu l)) * 1000 = pmol\ Cy3\ per\ \mu g\ di\ cRNA$$

Se l'attività specifica di Cy3 è al di sotto delle 8 pmol per μg di cRNA non procedere all'ibridizzazione.

Ibridazione

La fase di ibridazione dei campioni sui vetrini contenenti le sonde prevede l'utilizzo del *Gene Expression Hybridization Kit*.

Essendo il kit nuovo, il protocollo prevedeva di aggiungere 500 μl di H₂O nucleasi free al 10X Blocking Agent (liofilizzato) e di vortexare per risospendere il pellet

Nel caso in cui il pellet non fosse completamente disciolto, viene suggerito di incubare a 37°C per 4-5 min e di centrifugare 5-10 sec per far precipitare tutta la soluzione sul fondo.

La soluzione di ibridazione viene preparata aggiungendo in un'unica eppendorf 1,65 μg di cRNA marcato, 11 μl di Blocking Agent e H₂O ottenendo come volume finale 52,8 μl.

Aggiungendo 2,2 μl di 25X Fragmentation Buffer, si effettua la fase di frammentazione (30 min a 60°C) che permette di frammentare le molecole di cRNA marcato. In questa fase è molto importante non esporre i campioni alla luce e non eccedere con in 30 min di incubazione, al termine dei quali verranno aggiunti 55 μl di 2X GEx Hybridization Buffer per bloccare la reazione.

A questo punto avviene la fase di ibridazione del campione sul vetrino Agilent. Il kit di ibridazione prevede l'utilizzo di un vetrino contenente le sonde (active slide) ed un copri vetrino (inactive slide). Questi, verranno poi posizionati all'interno di una camera di ibridazione che li terrà uniti e che servirà come supporto per la rotazione durante la fase di incubazione.

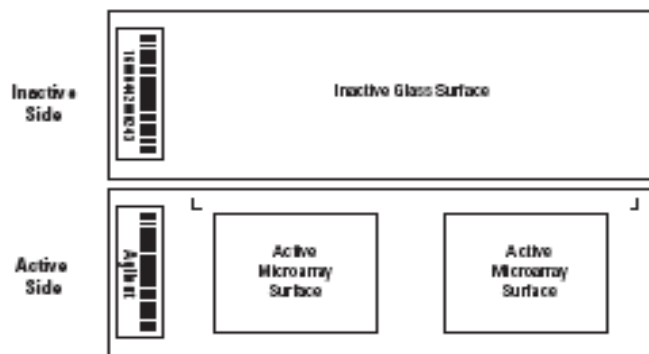


Figura 26. Vetrino e copri vetrino Agilent. La scritta Agilent nel codice a barre viene presa come riferimento per individuare il lato “attivo”.

La camera di ibridazione, contenente il vetrino di incubazione, deve essere posizionato su una superficie piana. Vengono quindi depositati 100 µl di campione di ibridazione sulla superficie attiva del vetrino, versandoli goccia a goccia. E' molto importante non toccare la zona attiva e non depositare bolle, è quindi preferibile trattenere l'ultima gocciolina all'interno del puntale.

Viene, quindi, posizionato il copri vetrino e chiusa la cameretta di ibridazione mediante rotazione della rotella. La rotella viene fatta girare finché non si chiude da sole e viene poi effettuato un ulteriore ¼ di giro

La cameretta viene infine fatta ruotare manualmente (il primo giro molto lentamente) per verificare che il livello della soluzione sia uguale in tutte e 4 le zone (circa un dito). E' molto importante osservare la presenza di bolle all'interno delle zone di incubazione. Se si dovessero osservare bolle, ma queste si spostano alla rotazione della cameretta, non è un problema. Queste si sposteranno durante la fase di rotazione permettendo comunque la reazione di ibridazione. Se ci fossero bollicine adese alla superficie cercare di staccarle dando un colpetto alla cameretta.

Le camerette di ibridazione vengono quindi messe in un fornetto per essere incubate in rotazione (10 rpm) a 65°C per 17 h. E' importante accertarsi che avvenga il riparo dalla luce e che le camerette all'interno del rotore siano in posizione bilanciata.

Lavaggi

Tutta la vetreria e i supporti utilizzati per i lavaggi devono essere puliti e sterilizzati. La fase di lavaggi prevede l'utilizzo di:

- GE Wash Buffer 1
- GE Wash Buffer 2
- Acetonitrile 100%
- Stabilization and Drying Solution

I vetrini di ibridazione vengono smontati dalle camerette e reagenti per i lavaggi vengono posti all'interno di vaschette fino quasi a riempirle.

La procedura di lavaggio viene eseguita con *un array alla volta* per essere certi di rispettare i tempi di incubazione e prevede:

Vasca	Buffer	Agitazione	T°	Tempo	Processo
Vasca 1	GE Wash Buffer 1	-	RT	/	Disassemblaggio vetrino/coprivetrino
Vasca 2	GE Wash Buffer 1	+	RT	1 min	1° lavaggio
Vasca 3	GE Wash Buffer 2	+	37°C	1 min	2°lavaggio
Vasca 4	Acetonitrile 100%	+	RT	1 min	lavaggio
Vasca 5	Stabilization and Drying Solution	+	RT	30 sec	lavaggio

Tabella III. Schema delle fasi di lavaggio

- Estrarre le camerette dal forno e ruotarle per ricontrollare il livello della soluzione di ibridazione
- Appoggiare la cameretta in un panno assorbente e aprirla delicatamente
- Estrarre l'array dalla cameretta prendendo le *slide* dalle estremità (dal codice a barre)

- Immergere completamente le *slide* nella **Vasca 1** (contenente GE Wash Buffer 1) e separare con la pinza le 2 *slide* facendo delicatamente leva nel lato del codice a barre
- Trasferire la *slide* con gli oligo nella **Vasca 2** (contenente GE Wash Buffer 1) limitandone il più possibile l'esposizione all'aria e incubare **1 min** (Buffer in agitazione)

Nota. Durante il minuto di incubazione versare il GE Wash Buffer 2 (37°C) nella Vasca 3
- Trasferire velocemente la *slide* nella **Vasca 3** (contenente GE Wash Buffer 2) e incubare **1 min** (Buffer in agitazione)
- Trasferire velocemente la *slide* nella **Vasca 4** (contenente Acetonitrile 100%) cercando di limitare il più possibile la quantità di buffer che ci si trascina e incubare **1 min** (Buffer in agitazione). *Fase facoltativa*
- Trasferire velocemente la *slide* nella **Vasca 5** (contenente Stabilization and Drying Solution) e incubare **30 sec** (Buffer in agitazione). *Fase facoltativa*
- Con 2 pinzette monouso prelevare lentamente il vetrino dalla griglia cercando di non trascinarsi dietro bolle e appoggiare delicatamente il vetrino (in verticale) in un panno assorbente per far colare il buffer in eccesso
- Se possibile eseguire immediatamente la scansione al fine di minimizzare l'impatto degli ossidanti ambientali nei confronti dell'intensità di segnale. Se non è possibile la scansione immediata, conservare le *slide* in una *slide box*, al riparo dalla luce e dall'umidità.

Scansione ed estrazione dei dati mediante Feature Extraction 9.1

Il software Feature Extraction (versione 9.5.1) di Agilent è in grado di convertire le immagini acquisite e generate dallo scanner in dati quantitativi come intensità di segnale. La scansione dei dati prevede quattro steps:

1. Determinazione di ogni segnale e di ogni posizione presenti sul vetrino;
2. Utilizzo di un template della griglia per la localizzazione di ogni spot;

3. Localizzazione del centro perfetto di ogni spot, permettendo così di definire i segnali di background;
4. Generazione di un *Quality Control Report* per ogni immagine del Microarray durante il processo di estrazione.

Il software, utilizzando una popolazione statistica, è in grado di determinare quali pixel siano al di fuori del range di intensità ottenuti. Vengono definiti all'interno dei range di intensità, i pixel che mostrano un segnale entro ± 2 volte la deviazione standard (SD) della media dell'intera popolazione di pixel. Quelli che risultano essere *'outliers'* vengono rimossi e non considerati per le successive analisi.

Infine, viene calcolato il *p-value* per valutare se il segnale ottenuto per uno spot è differente in modo significativo dal segnale del background.

Quality Control Report

La strumentazione Agilent per l'analisi di espressione genica mediante Microarray, fornisce un Quality Control (QC) Report per ogni area del vetrino in cui viene posizionato un campione. Il report fornisce diversi dati e parametri per permettere di verificare la corretta ibridazione del cRNA marcato con le sonde presenti sul vetrino e per osservare la qualità.

Tra questi dati che il Report fornisce, sono stati presi in considerazione principalmente:

1. *Bright Corners*. Ogni area del vetrino per l'ibridazione del campione, presenta sui suoi quattro angoli degli spot per il controllo dell'ibridazione. E' quindi necessario verificarne la presenza nel report.

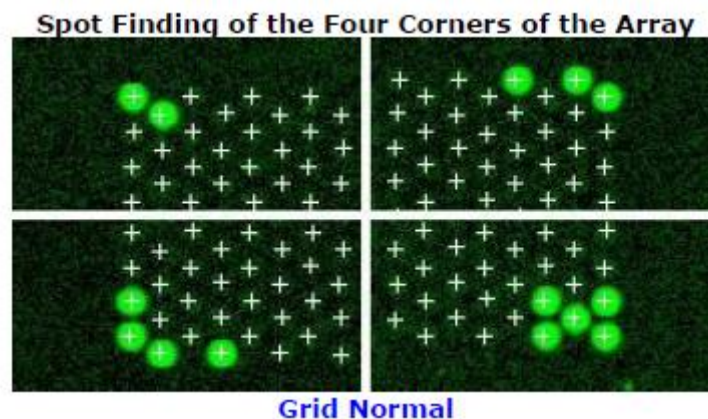


Figura 27. Bright Corners. L'immagine, fornita dal QC Report, mostra con degli spot verdi i bright corners per un area del vetrino dell'array.

2. *Istogramma.* Il software elabora un istogramma tra il logaritmo del segnale di background e il numero di punti presenti. Per definire un corretto e ottimale segnale, l'istogramma deve avere un andamento gaussiano.

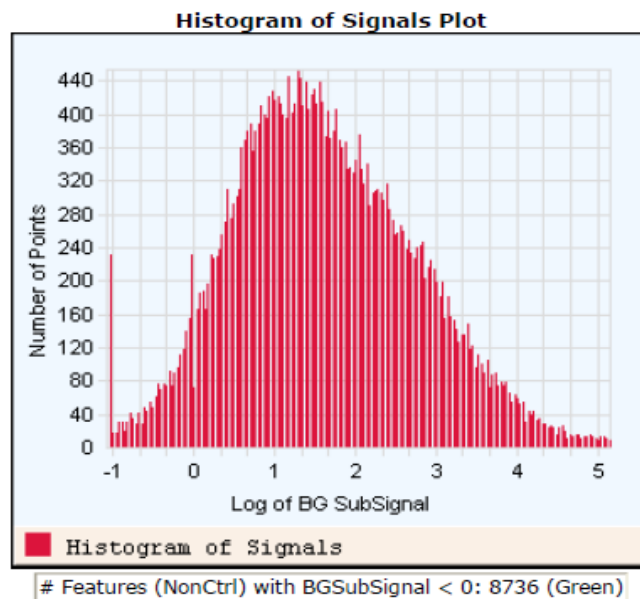


Figura 28. Istogramma dei segnali.

3. *Local Background.* Per valutare sempre il segnale determinato, vengono presi in considerazione altri parametri. Graficamente vengono illustrati le distribuzioni spaziali del segnale medio delle righe e delle colonne dell'array (Figura 29).

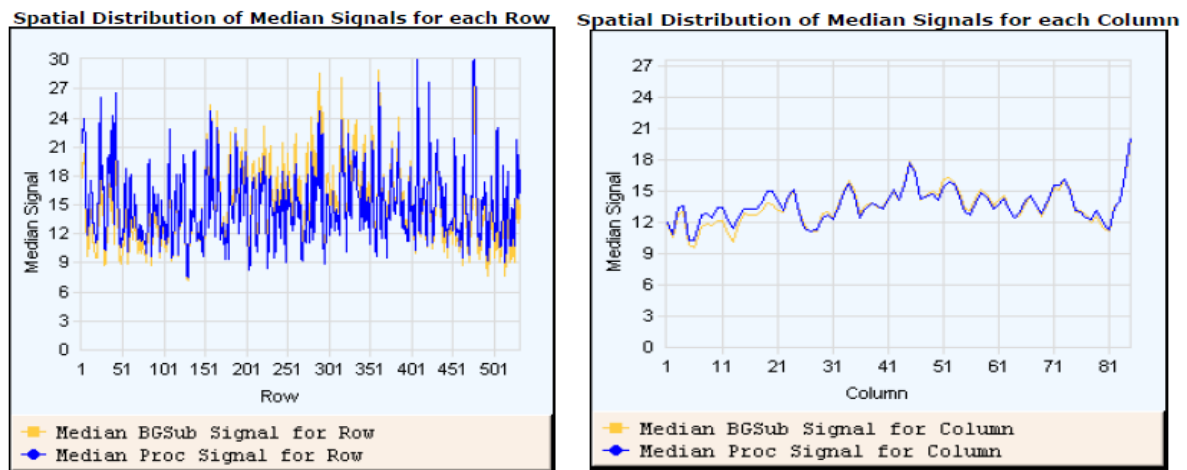


Figura 29. (Sx) Distribuzione spaziale del segnale medio delle righe, (Dx) Distribuzione spaziale del segnale medio delle colonne

La mediana del segnale per le righe e per le colonne deve essere compreso quanto più possibile all'interno dello stesso range. Ed infine vengono osservate media e SD del background. La media viene considerata molto buona per valori inferiori a 50, ed è comunque accettabile per valori inferiori ad 80. La SD deve invece essere compresa tra 2 e 3.

4. *Spike*. Gli spike, essendo presenti in dieci concentrazioni diverse ed avendo ognuno più copie, devono presentare una buona linearità e corretta pendenza tra loro. Per questo vengono osservati l' R^2 e lo slope, che devono essere il più possibile prossimi a 1.

3.6 Normalizzazione e analisi statistica dei dati del Microarray

Le sonde *not found* sono state individuate e quindi filtrate, in quanto il software Agilent Feature Extraction 9.5.1 segnala queste sonde con il flag "glsFound" (viene assegnato il valore 1 se lo spot ha un valore di intensità significativamente differente dal local background, 0 in caso opposto). Per incrementare la qualità dell'analisi statistica, le sonde con un'alta proporzione di 'missing value' sono state rimosse dal dataset. Sono infatti stati considerati solo le sonde con almeno 2 flag positivi nel gruppo di controllo e 2 nel gruppo di trattamento.

Infine, i segnali di 'Spike-In' sono stati utilizzati per la normalizzazione. I campioni di cuore e sangue sono stati normalizzati separatamente.

Analisi di filtraggio e normalizzazione sono state effettuate utilizzando il programma statistico R (software gratuito disponibile al sito <http://www.rproject.org>).

L'analisi Cyclic loess è stata utilizzata per la normalizzazione dei dati. Il programma statistico SAM, **S**tatistical **A**nalysis of **M**icroarray (two-class unpaired) ha permesso l'identificazione della modulazione dei geni nel gruppo di trattamento rispetto al gruppo di controllo, con un fold change > 2 e un false discovery rate (FDR) range fra 0.01 and 0.05.

3.7 Gene Ontology Clustering

Il 'functional annotation tool', disponibile nel database DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) è stato utilizzato per effettuare la classificazione Gene Ontology (GO) dei geni up-e down-regolato dopo entrambi i trattamenti. Per l'analisi del KEGG Pathway Database, i parametri utilizzati sono stati i seguenti: gene count 6 e 8 rispettivamente per cuore e sangue; ease 0.05. Per il GO Biological Process Database, le impostazioni sono state BP_5, gene count di 8 e 10 per cuore e sangue, rispettivamente, ease 0.1.

3.8 Real-Time

L'analisi in Real-Time è stata effettuata in triplicato per ogni campione andando poi a valutare le medie e le deviazioni standard intra-campione e tra la popolazione di controllo e quella di trattamento con i composti.

La valutazione del livello di espressione di mir-21 (microRNA 21), Pla2g2a, Pla2g7, Gal, Il1b, Cebpb, Fcgr2b, Arntl e Acer2 è avvenuta mediante analisi real-time relativa. Come gene Housekeeper di riferimento è stato utilizzato il 18s; per l'analisi del mir-21 è stato invece utilizzato *sno-RNA*.

E' stata preparata una master mix per ogni gene da analizzare e per ogni Housekeeper genes in un volume di 20 μ L (12.5 μ L Taqman Universal Master Mix PCR 2X, 2.5 μ L Probe/Primers mix 10X e 5 μ L acqua nuclease-free).

Come controllo positivo è stato utilizzato cDNA di ratto (1 ng/ μ L), e come controllo negativo acqua nuclease-free.

La piastra è stata sigillata e centrifugata per 2 minuti a 188 RCF.

La reazione di real-time PCR è avvenuta utilizzando lo strumento AB 7900HT, ed è stata condotta secondo i seguenti parametri:

- I step: 50°C per 2 minuti;
- II step: 94.5°C per 10 minuti;
- III step: 97°C per 30 secondi e 59.7°C per 1 minuto.

Il terzo step è stato ripetuto per 40 volte.

La valutazione dell'espressione genica è stata eseguita quindi mediante una quantificazione relativa utilizzando la *real-time PCR*. La quantificazione relativa determina il cambiamento nell'espressione di una sequenza *target* in un campione in relazione alla stessa sequenza in un campione calibratore. Il campione calibratore può essere il campione non trattato (controllo) o il campione al tempo iniziale in uno studio *time-course*. Per ogni campione è stato analizzato un gene endogeno (18s o sno-RNA), grazie al quale è possibile normalizzare la quantificazione del cDNA target per le differenti quantità di cDNA aggiunte ad ogni reazione. Ogni campione è stato analizzato in triplicato per ciascun gene.

I dati sono stati espressi utilizzando il metodo:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ (dove } \Delta\Delta C_t = (C_{t, target} - C_{t, endogeno})_{\text{campione trattato}} - (C_{t, target} - C_{t, endogeno})_{\text{campione controllo}} \text{)}$$

(Livak K.J et al. 2001)

Per i campioni trattati la valutazione di RQ indica il *fold change* nell'espressione genica rispetto al controllo ed è stata determinata utilizzando il software Sequence Detection System 2.1.

L'analisi di espressione genica è stata effettuata in triplicato. Media e deviazione standard (SD), intracampione ed intragruppo, sono state calcolate per confermare la significatività dei dati ottenuti.

Il test T di Student è stato utilizzato per valutare la differenza di significatività fra i gruppi, e un P value < 0.05 è stato considerato significativo. Il T-test è stato effettuato fra i valori di RQ dei controlli e dei trattati per tutti i 7 geni del pannello della fosfolipidosi. Infine, per identificare possibili outliers, è stato utilizzato il test di Grubb.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Isoproterenolo

La fase A dello studio Isoproterenolo ha permesso di determinare una dose da somministrare che permettesse all'evento cardi tossico di manifestarsi in modo riproducibile ma senza che si presentasse mortalità degli animali o che quest'ultimi non arrivassero alla fine del trattamento in *poor conditions*.

Al termine dello studio, sono state raccolte e analizzate le età degli animali, i volumi di composto somministrato, i pesi corporei, i pesi del cuore, i valori di cTnI e la severità della lesione cardiaca per tutte e tre le dosi utilizzate.

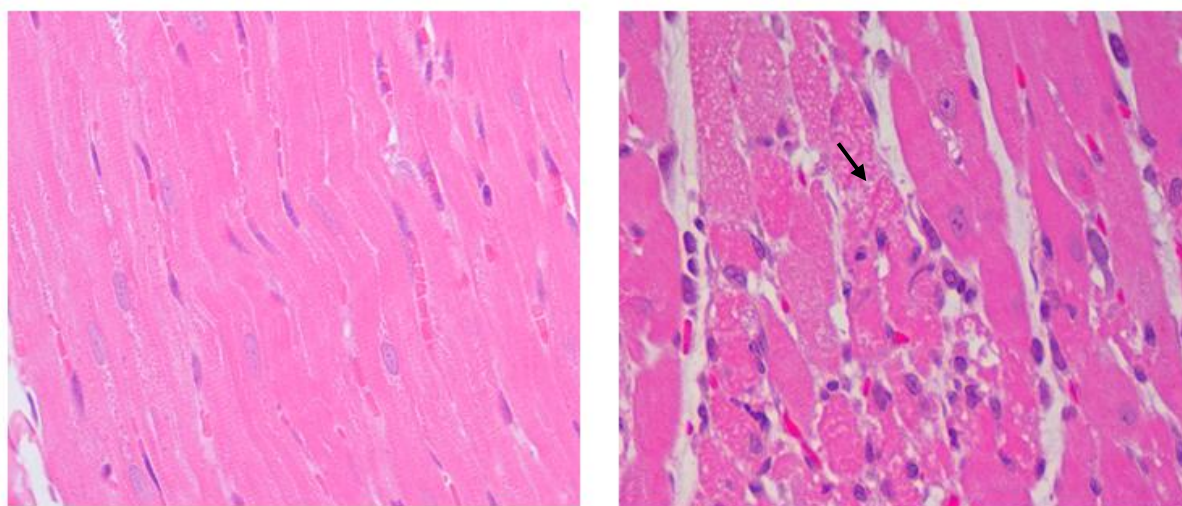
Anim. Num.	Age (week)	Dose (mg/Kg)	Volume (mL)	Study Date	Necropsy (hours)	Hours of Treatment	Animal weight	Heart weight	cTnI (ng/mL)	Histology
1	9	0	1,6	04.02.09	24 h	24 h	320,5	1,06	0,004	-
2	9	0	1,5	04.02.09	24 h	24 h	316,7	1,25	0,02	-
3	9	0	1,5	04.02.09	24 h	24 h	305,9	1,2	0,006	-
4	9	0	1,6	04.02.09	24 h	24 h	325,1	1,19	0	-
5	9	0	1,5	04.02.09	24 h	24 h	317,2	1,2	0	-
6	9	0	1,5	04.02.09	24 h	24 h	311,1	1,1	0,006	-
45	9	2	1,5	04.02.09	24 h	24 h	281,4	1,32	6,112	+++
8	9	2	1,6	04.02.09	24 h	24 h	300,6	1,23	2,45	++++
9	9	2	1,5	04.02.09	24 h	24 h	266	1,34	11,016	+++
10	9	2	1,5	04.02.09	24 h	24 h	292,4	1,37	8,74	+++
11	9	2	1,6	04.02.09	24 h	24 h	284,2	1,51	24,223	++++
12	9	2	1,5	04.02.09	24 h	24 h	278,1	1,44	5,282	+++
46	9	0,3	1,6	06.02.09	24 h	24 h	321,4	1,48	6,642	+++
14	9	0,3	1,6	06.02.09	24 h	24 h	311,7	1,181	0,653	++
15	9	0,3	1,5	06.02.09	24 h	24 h	291,4	1,137	3,945	++++
16	9	0,3	1,6	06.02.09	24 h	24 h	314	1,121	0,313	++
17	9	0,3	1,7	06.02.09	24 h	24 h	-	-	NSR	-
18	9	0,3	1,4	06.02.09	24 h	24 h	285,2	1,189	1,095	+++
19	9	1	1,6	06.02.09	24 h	23 h	296,8	1,389	36,438	++++
20	9	1	1,7	06.02.09	24 h	24 h	321,6	1,242	3,46	+++
21	9	1	1,5	06.02.09	24 h	24 h	-	-	NSR	-
22	9	1	1,5	06.02.09	24 h	24 h	293,1	1,182	6,378	+++
23	9	1	1,7	06.02.09	24 h	24 h	-	-	NSR	-
24	9	1	1,6	06.02.09	24 h	24 h	304,1	1,23	2,142	+++

Tabella IV . Fase A studio Isoproterenolo. La tabella presenta il numero degli animali, l'età, la dose somministrata, il volume somministrato, giorno del trattamento, durata del trattamento, peso dell'animale, peso del cuore, valori di cTnI, severità del danno cardiaco. La severità del danno cardiaco è indicata con: - Normale; + lesione leggera; ++ lesione media; +++ lesione accentuata; ++++ Molto accentuata.

Dall'analisi effettuata, e osservando tutti i dati raccolti dallo studio, la dose 0.3 mg/Kg è stata ritenuta la dose migliore da utilizzare. Come viene illustrato nella tabella IV, i valori di cTnI oscillano da un minimo di 0.313 ng/mL a un massimo di 6.642 ng/mL. Questi valori sono accompagnati da moderate lesioni a carico dei miocardiociti, con un bassissimo tasso di mortalità. In un gruppo di sei animali infatti, è stato riscontrato un solo decesso che è avvenuto alla ventiquattresima ora dalla somministrazione. Gli altri animali hanno invece tollerato il trattamento senza manifestare alcun sintomo.

Alle dosi di 1 e 2 mg/Kg, invece, sono stati determinati elevati aumenti di cTnI, rispettivamente di 36.438 ng/mL e di 24.223 ng/mL. Gli animali hanno poi mostrato una difficoltà nel tollerare il trattamento, presentando, all'esame istopatologico, evidenti e accentuate lesioni ai miocardiociti.

Due animali su sei, infine, sono deceduti dopo circa 6 ore dalla somministrazione di 1 mg/Kg di Isoproterenolo.



A) Controllo

B) Iso 0.3 mg/Kg

Figura 30. Preparato istologico osservato in microscopia ottica a 40X. A) Veicolo, (B) Isoproterenolo 0.3 mg/Kg. La freccia indica una zona ipercontratta.

La figura 30 mostra una sezione del ventricolo sinistro di un animale di controllo trattato con PBS (A) e di un animale trattato alla dose di 0.3 mg/Kg (B). Gli animali trattati con Isoproterenolo presentavano un stato di degenerazione, necrosi e infiammazione dei miocardiociti. Questi eventi si presentavano in modo evidente sulla parete del ventricolo sinistro, sull'apice e sul setto interventricolare. Si è osservato inoltre la presenza di zone ipercontratte, denominate '*contraction band*' dovute ad un maggior afflusso di calcio.

La fase B ha quindi visto l'utilizzo di due gruppi di trattamento da 10 animali l'uno. Al primo gruppo è stato somministrato il veicolo (PBS), mentre al secondo 0.3 mg/Kg di Isoproterenolo.

Al termine dello studio sono stati determinati i valori di cTnI e di ANP per avere una conferma del danno al miocardio, mentre il cuore è stato prelevato per l'analisi dell'espressione genica.

I valori di cTnI hanno evidenziato un forte aumento negli animali trattati rispetto agli animali di controllo. La media degli animali trattati con il veicolo è risultata essere pari a 0.002 ng/mL ed inferiore al L.O.D. (limit of detection) dello strumento (0.006 ng/mL), con una SD di 0.003. Gli animali trattati con il composto, presentavano una media di 1.107 ng/mL e quindi superiore di oltre 50 volte rispetto agli animali di controllo e con una SD di 0.786.

L'analisi della Troponina I Cardiaca ha quindi permesso di confermare un danno a carico dei miocardiociti e si conferma come biomarker precoce, visto anche la durata del trattamento, di lesione a carico del miocardio.

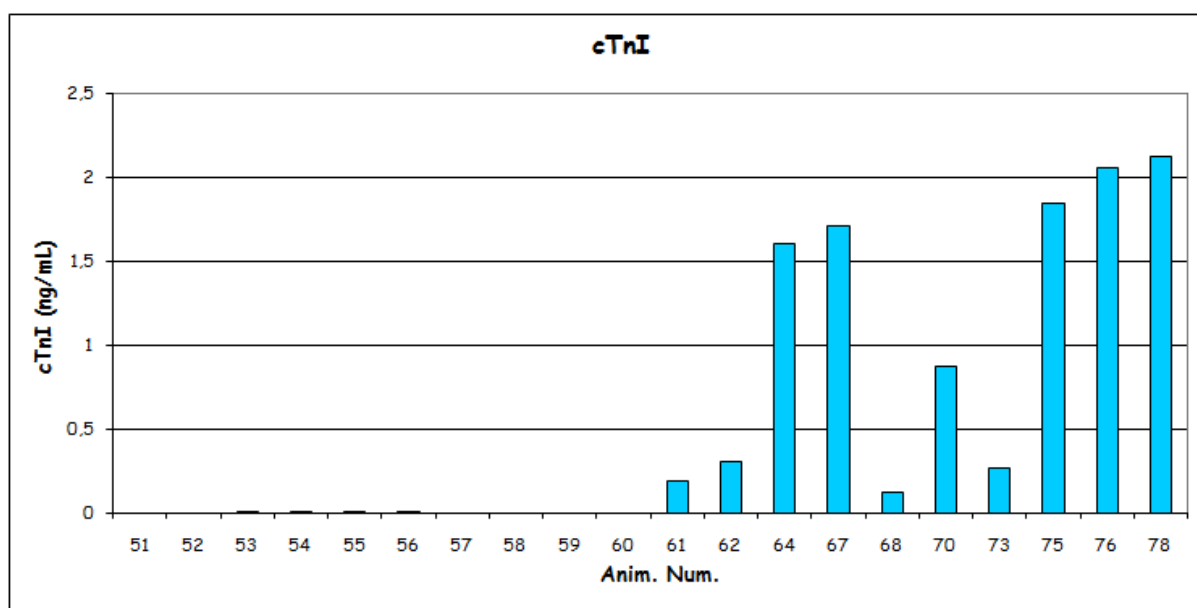


Figura 31. Valori di cTnI determinati negli animali trattati con PBS e Isoproterenolo. Agli animali dal n.51 al n. 60 è stato somministrato il veicolo, agli animali dal n.61 al n.78 il composto.

Nonostante la cTnI sia una proteina esclusivamente strutturale, è possibile osservare dei movimenti, se pur piccoli, negli animali di controllo e una differenza tra i sessi.

Questo in quanto nel turnover dei miocardiociti, avviene un rilascio di cTnI nella circolazione che può essere determinata con le strumentazioni ultra-sensitive. La presenza di una massa maggiore del miocardio nei ratti maschi, invece, fa sì che in questi animali vengano quantificati valori leggermente maggiori di analita.

La conferma di necrosi dei miocardiociti di ratto trattati con una singola dose di 0.3 mg/Kg di Isoproterenolo, è avvenuta anche grazie all'analisi di un pacchetto di marcatori determinati mediante la strumentazione MesoScaleDiscovery (MSD). Questo tipo di strumentazione, che presenta protocolli e metodiche simili ad un test ELISA, presenta diversi vantaggi se applicate a specie pre-cliniche come il ratto. Un primo vantaggio è dato dal fatto di poter determinare più analiti, fino ad un massimo di otto, con un unico test. Questo comporta un risparmio di tempo e di risorse, e permette di quantificare gli analiti sullo stesso campione dell'animale, evitando quindi dover effettuare più prelievi o congelare il campione per effettuare le analisi. Un secondo e importante vantaggio, soprattutto quando si lavora con animali di piccola taglia, è rappresentato dalla piccolissima quantità di campione di siero o plasma richiesto dal protocollo sperimentale. Con un minimo di 40 µl ad un massimo di 100 µl di campione, considerando anche le repliche, si può determinare fino a otto analiti differenti. La ridotta richiesta di siero o plasma per svolgere le analisi, permette di effettuare anche prelievi intercorrenti e di monitorare molti parametri senza obbligatoriamente arrivare al sacrificio dell'animale.

Con la strumentazione MSD abbiamo effettuato l'analisi di quattro marcatori di necrosi dei miocardiociti: Troponina I cardiaca (cTnI), Troponina T cardiaca (cTnT), Fatty Acid Binding Protein (FABP) e la catena leggera mielinica di tipo 3 (Myl3).

Le analisi sono state effettuate su tutti gli animali a cui è stato somministrato il veicolo e su tutti gli animali che hanno ricevuto una singola dose di 0.3 mg/Kg di Isoproterenolo.

Per la cTnI è stato osservato un forte aumento dell'analita tra gli animali di controllo e gli animali trattati, presentando rispettivamente una media di 0.001 e 1,261 ng/mL. L.O.D del MesoScale per la cTnI è di 0.011 ng/mL e deve quindi essere utilizzato questo valore di riferimento quando si ottengono valori inferiori. I dati per i singoli animali e le deviazioni standard ottenuti con la strumentazione MSD sono risultati essere paragonabili con quelli ottenuti inizialmente con il sistema in chemiluminescenza.

La possibilità di disporre di due strumentazioni ci permette di usufruire dei vantaggi che i due strumenti presentano e di scegliere il più adatto alle esigenze e in base alle circostanze sperimentali: il sistema ADVIA Centaur presenta una migliore sensibilità ed

è un sistema automatizzato ma richiede una quantità di campione non indifferente; il MSD richiede invece una minor quantità di campione e permette di determinare con una singola analisi più analiti a nostra scelta ma presenta una minor sensibilità, principalmente per la cTnI, ed è un sistema manuale.

L'analisi della cTnT ha invece evidenziato un minor movimento tra il gruppo a cui è stato somministrato il veicolo e quello che ha ricevuto la dose di 0.3 mg/Kg di Isoproterenolo. Il gruppo di controllo ha presentato una concentrazione media dell'analita pari a 0 ng/mL ma è stato utilizzato come valore di riferimento 0.117ng/mL, L.O.D. per questo parametro. Il gruppo di trattamento ha presentato invece un valore medio di cTnT pari a 0.196 ng/mL.

Dai dati ottenuti e dalle fonti bibliografiche presenti in letteratura, è possibile affermare come la cTnI sia un miglior candidato come marker di necrosi cardiaca rispetto alla cTnT.

Infatti, l'isoforma I permette di ottenere una maggiore differenza di valori tra le due popolazioni di trattamento, presenta una miglior corrispondenza con le severità dei danni diagnosticati in istopatologia e permette di determinare valori molto più bassi dell'analita. Infine, la cTnI presenta una minor omologia con le sue isoforme presente nel tessuto muscolare scheletrico rispetto alla cTnT. Questo riduce la possibilità che anche piccole lesioni del tessuto muscolare non cardiaco influiscano sui valori di troponina determinati. Anche se il sito di legame degli anticorpi primari è specifico per l'isoforma cardiaca, è possibile osservare piccole interferenze dall'isoforma scheletrica se presente in grande concentrazione.

Gli altri due analiti determinati mediante MSD non possono essere definiti marker specifici di necrosi cardiaca, in quanto sono presenti sia nel tessuto muscolare cardiaco sia nel tessuto muscolare scheletrico. La catena leggera della miosina 3 (MYL3) è infatti una catena leggera della molecola di miosina che si trova sia nel muscolo cardiaco che nel muscolo scheletrico a contrazione lenta. Mentre la proteina degli acidi grassi di legame 3 (FABP3) è presente nel cuore e nel muscolo scheletrico, ma si può trovare anche nel cervello, nel fegato e nell'intestino tenue.

Questi due analiti sono comunque utili al fine diagnostico se inseriti in un pannello di markers cardiaci. Osservando infatti i valori di tutti gli analiti presi in esame in questo studio è possibile discriminare se siamo in presenza di una lesione muscolare a carico del miocardio o a carico della muscolatura scheletrica.

I valori determinati per FABP e Myl3 sono risultati essere rispettivamente, per il gruppo di controllo, 0.868 e 0.2 ng/mL, per il gruppo di trattamento 6.039 e 7.228 ng/mL.

Possiamo quindi arrivare alla conclusione che movimenti statisticamente significativi di tutti e quattro i parametri, ci avrebbero permesso di far propendere ad una lesione dei miocardiociti anche in assenza dell'esame istologico. Un movimento significativo di FABP e Myl3 accompagnato da valori pressoché normali di troponina, ci avrebbe fatto propendere invece ad una diagnosi di lesione alla muscolatura scheletrica.

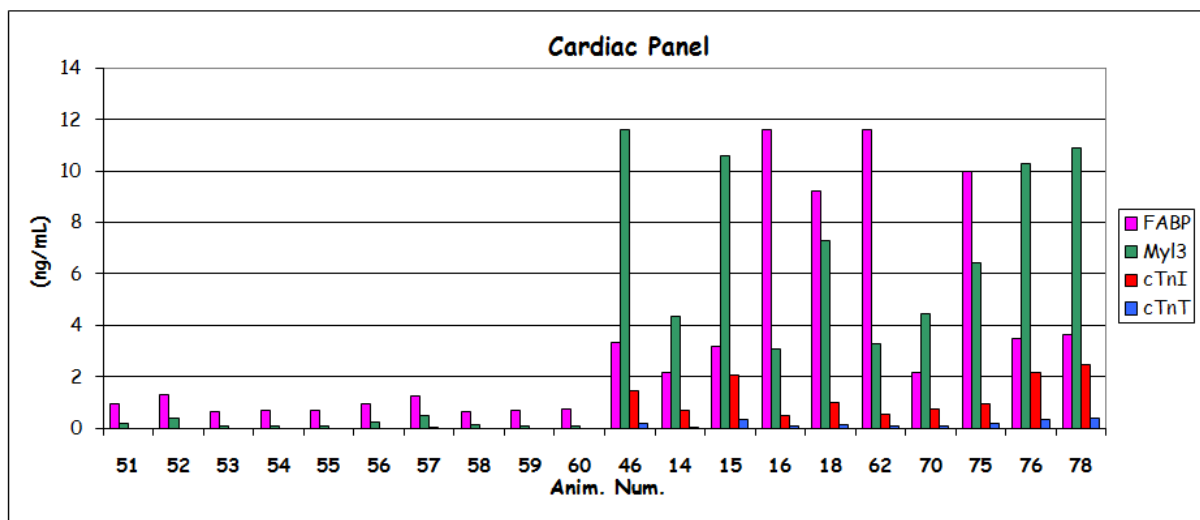


Figura 32. MesoScaleDiscovery. Valori di cTnI, cTnT, FABP e Myl3 determinati nella popolazione di controllo (da n.51 a n.60) e nella popolazione a cui è stata somministrata la dose di 0.3 mg/Kg di Isoproterenolo.

Sugli stessi animali è stata effettuata anche la determinazione dell'ANP. Questo marcatore permette di individuare stress del miocardio. Livelli elevati si presentano quindi in presenza di un aumento della pressione sanguinea o delle contrazioni cardiache. In presenza di lesioni, invece, l'ANP non presenta movimenti immediati e precoci, come la cTnI, ma progressivi e nel tempo.

I valori medi dell'ANP degli animali trattati, infatti, sono di circa 2 volte superiori rispetto agli animali di controllo. I ratti a cui è stato somministrato l'Isoproterenolo presentavano una media di 5515 pg/mL, di 2965 pg/mL invece quelli che hanno ricevuto il veicolo.

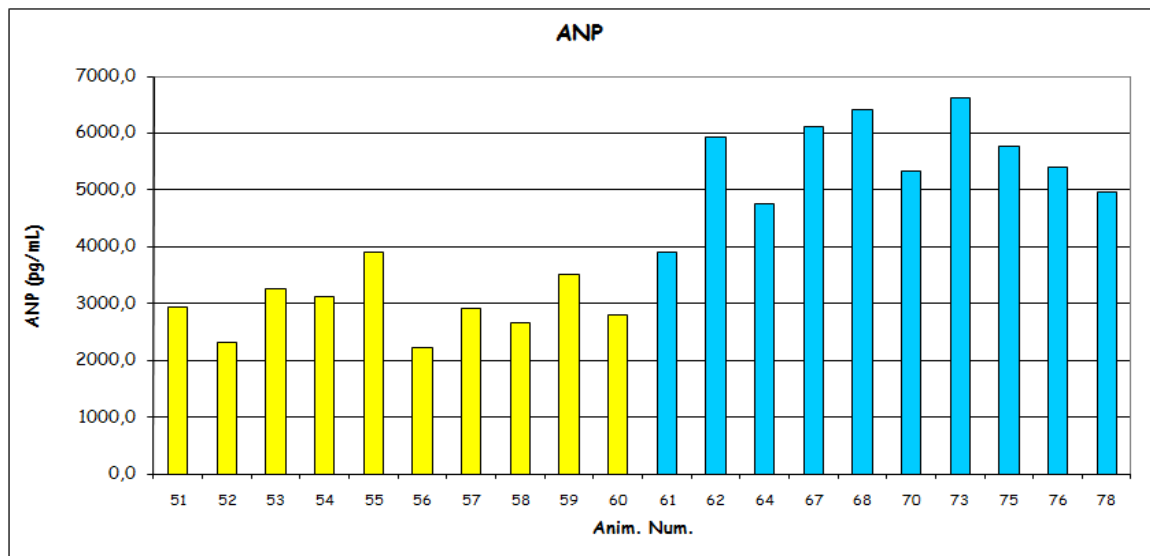


Figura 33. Valori di ANP determinati negli animali trattati con PBS e Isoproterenolo. Agli animali dal n.51 al n. 60 è stato somministrato il veicolo, agli animali dal n.61 al n.78 il composto.

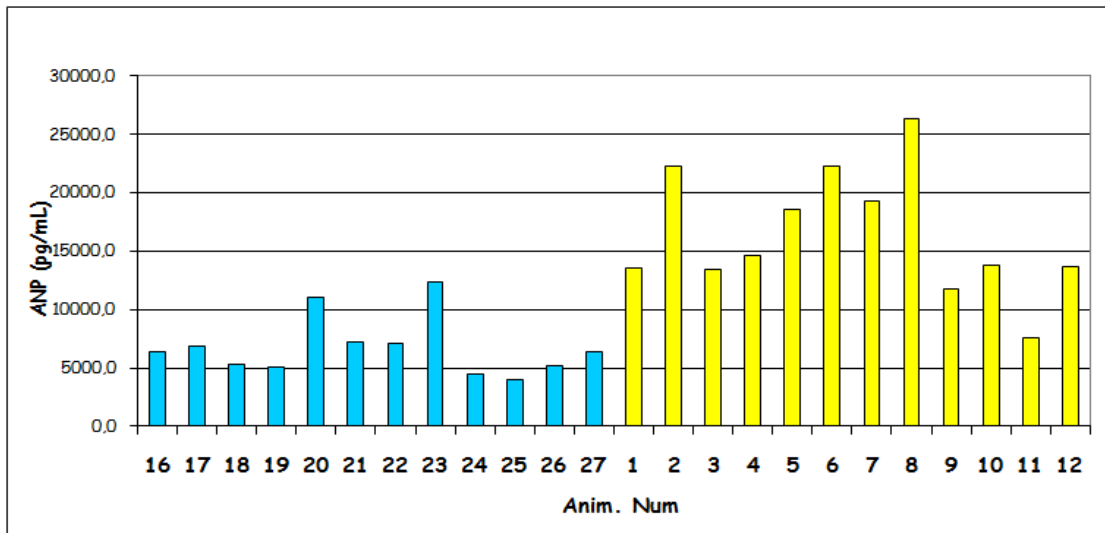
Per dimostrare l'efficacia di questo analita come marcatore di variazioni pressorie e ipercontrattilità del cuore, è stato determinato l'ANP su ratti che presentavano un'ipertensione spontanea (SHR) di 10 e 26 settimane di età, e confrontati con il ceppo normoteso, gli Wistar-Kyoto (WKY).

I ceppi di ratto SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) sono geneticamente affetti da patologie del sistema cardiovascolare, in cui il difetto genetico riguarda diversi fattori del sistema renina-angiotensina e presentano scompensi emodinamici.

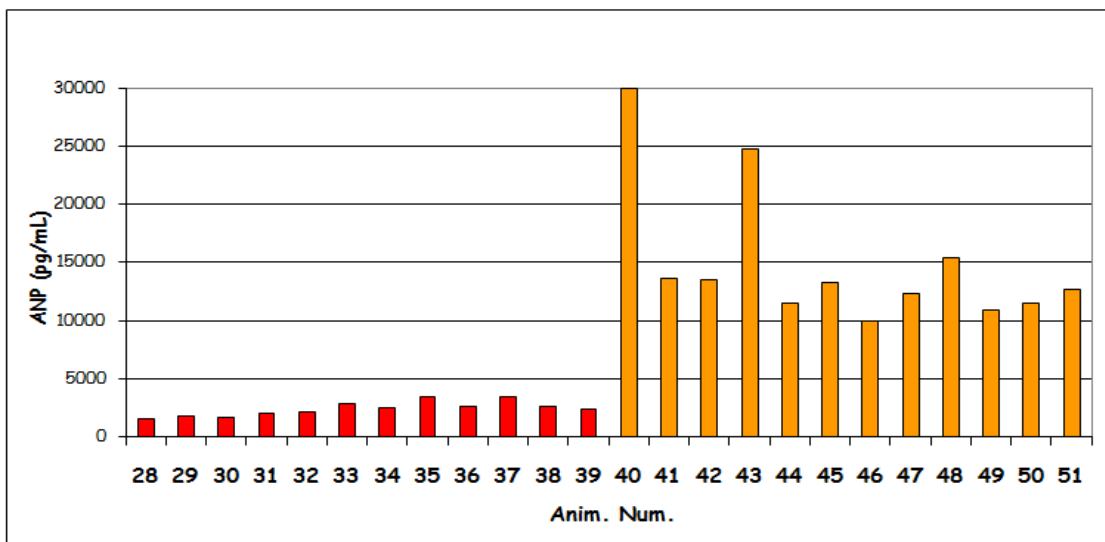
L'analisi dell'ANP ha permesso di osservare negli animali ipertesi valori da 3 a 5 volte superiori rispetto agli animali normotesi sia a 10 che a 26 settimane di età.

A 10 settimane di età, la media dei valori di ANP nel ceppo WKY è risultata essere di 6796 pg/mL (6.8 ng/mL), nel ceppo SHR, invece, pari a 16095 pg/mL (16.0 ng/mL), ovvero, di circa 2.3 fold-change superiore.

La stessa analisi è stata ripetuta su altri animali degli stessi ceppi ma di età pari a 26 settimane. In questo caso, la media era pari a 2587 pg/mL (2.6 ng/mL) per gli animali WKY e di 13596 pg/mL (13.6 ng/mL) per gli animali SHR. La media differiva quindi di oltre 5 fold-change tra le due popolazioni.



(a)



(b)

Figura 34. Analisi ANP (pg/mL) di ratti SHR e WKY. (a) Valori di ANP in ratti WKY ■ e di ratti SHR ■ di 10 settimane di età. (b) Valori di ANP in ratti WKY ■ e di ratti SHR ■ di 26 settimane di età.

Questi risultati confermano quanto l'ANP sia un ottimo marcatore per diagnosticare cambiamenti pressori e di ipercontrattibilità del miocardio.

Un'analisi che preveda determinazione combinata di cTnI e di ANP permette quindi di identificare un danno al livello del miocardio e di propendere a diagnosticare dei fenomeni di 'stress' del miocardio piuttosto che una possibile necrosi dei miocardiociti.

4.2 Amiodarone

Le informazioni bibliografiche presenti in letteratura e l'esperienza maturata in gsk con studi di tossicità dell'Amiodarone, ha permesso di individuare la dose da somministrare senza dover effettuare prima uno studio di *dose-selection*.

La dose di 300 mg/Kg è stata scelta al fine di osservare l'accumulo di fosfolipidi nel cuore e nei linfociti degli animali trattati, senza che quest'ultimi presentassero segni clinici durante il trattamento o intollerabilità al composto.

Dopo le necrosopie, sono stati quindi effettuati diverse analisi per confermare gli effetti dovuti alla somministrazione di Amiodarone sul gruppo di 5 animali impiegati per questo scopo.

Si è inizialmente effettuata la preparazione dello striscio di sangue su vetrino al fine di osservare e contare i linfociti circolanti al microscopio ottico.

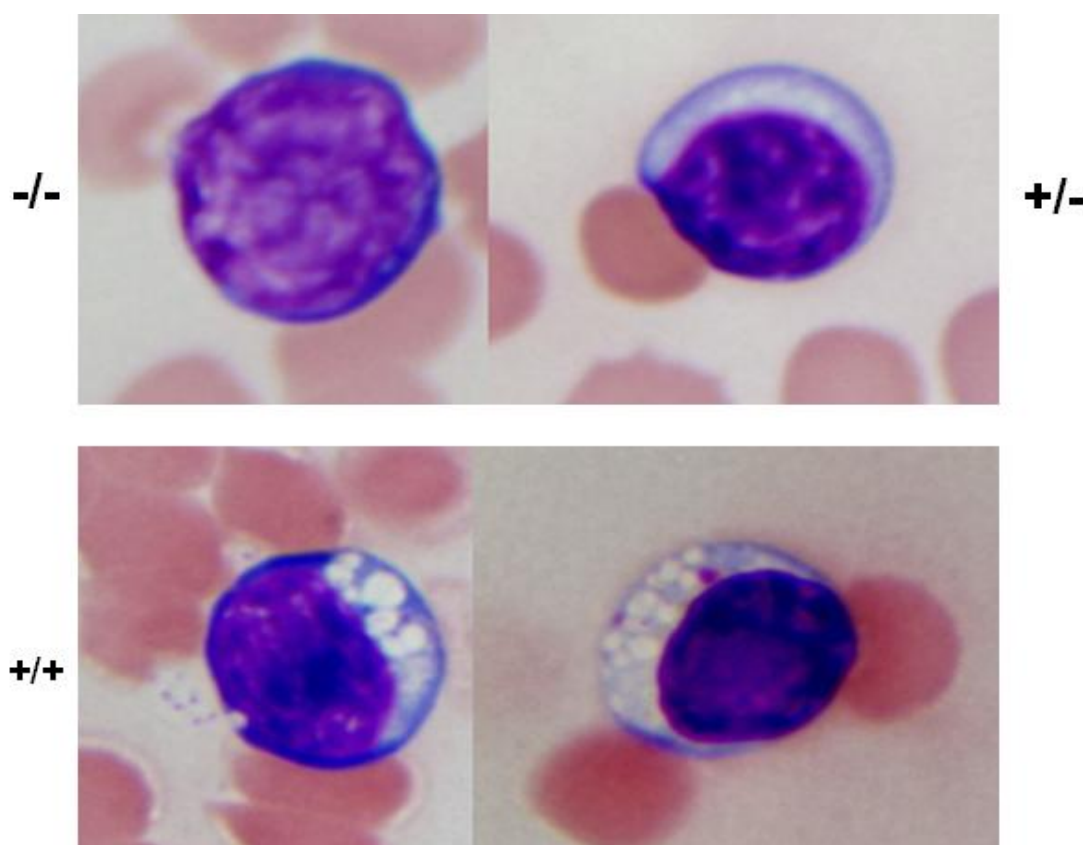


Figura 35. Immagini di linfociti osservati al microscopio ottico (100x). In alto a sinistra, linfociti normali (-/-). In alto a destra, linfociti che presentano un aumento del citoplasma nel quale non è possibile confermare la presenza di vacuoli (+/-). In basso, linfociti vacuolati (++)

L'analisi dello striscio di sangue ha permesso di evidenziare che il gruppo di controllo presentava circa il 96% di linfociti normali e un 3.2% di linfociti indicati con il simbolo +\-. Solo il 2.5% presentava un aumento del citoplasma con vacuoli al suo interno. La presenza di vacuoli negli animali di controllo, oltre ad essere molto ridotta, è dovuto al fatto che il ratto è soggetto ad un accumulo spontaneo di vacuoli nei linfociti. Accumulo spontaneo che interessa comunque un piccola percentuale della popolazione linfocitaria con la presenza di pochi vacuoli, come nel nostro caso.

Nel gruppo trattato con Amiodarone è stata riscontrata una situazione inversa. Solo il 12% della popolazione linfocitaria è stata classificata come normale. L'8.2% invece ha presentato un aumento del citoplasma (+\-) e il 79% presentava aumento del citoplasma con la presenza evidente di vacuoli al suo interno.

	- -	+ -	+ +	
6	99	1	-	
7	97	2	1	- - No vacuoles
8	98	2	-	
9	89	7	4	+ - Slight vacuoles
10	96	4	-	+ + Vacuoles
Mean	95.8	3.2	2.5	
Sd	4.0	2.4	2.1	
	- -	+ -	+ +	
26	16	2	82	
27	5	5	90	
28	20	9	72	
29	17	13	69	
30	6	12	82	
Mean	12.8	8.2	79.0	
Sd	6.8	4.7	8.5	

Tabella V. Conta e classificazione dei linfociti circolanti. In giallo viene classificato il gruppo di controllo, in arancione il gruppo trattato con Amiodarone.

Quest'analisi ha permesso quindi di osservare e diagnosticare l'accumulo di fosfolipidi nel citoplasma dei linfociti circolanti. Le informazioni bibliografiche e interne di gsk riguardanti l'Amiodarone, i suoi metaboliti e il suo meccanismo di azione, ci permettono

di affermare che i vacuoli siano costituiti da lipidi carichi negativamente e quindi che si tratti di fosfolipidosi e non di steatosi.

La fosfolipidosi indotta da CAD è una patologia reversibile se viene interrotta la somministrazione del composto. Se viene invece mantenuta la somministrazione per lungo tempo, l'accumulo di fosfolipidi nelle cellule di organi, come il cuore, può portare a fenomeni di lesioni, accompagnati da uno stato infiammatorio. Essendo lo scopo della tesi, quello di identificare marcatori di accumulo di fosfolipidi e non di necrosi indotta dal loro accumulo nel tempo, sono stati determinati i valori di cTnI e di ANP per escludere possibili lesioni a carico del miocardio.

L'analisi di questi biomarcatori è stata effettuata su tutti gli animali dei gruppi di trattamento, sia sui 15 trattati con il veicolo, sia sui 15 trattati con l'Amiodarone.

Per quanto concerne la cTnI non è stata osservata nessuna variazione significativa tra il gruppo di controllo, che presentava una media di 0.006 ng/mL, e il gruppo dei trattati, che presentava a sua volta una media di 0.010 ng/mL.

L'analisi dell'ANP, invece, ha permesso di osservare un lieve aumento dell'analita nel gruppo di trattamento ma comunque non significativo. La media è risultata essere di 4224 pg/mL (4.2 ng/mL) nei controlli e di 4849 pg/mL nei trattati (4.8 ng/mL). Osservando i valori di ANP per ogni singolo animale, è stato possibile inoltre osservare che il gruppo di controllo presentava valori pressoché identici. Mentre un animale del gruppo di trattamento presentava un valore di ANP pari a 7350 pg/mL (7.3 ng/mL). Valore che si discosta di molto dai valori determinati negli altri animali (~4000 pg/mL), portando quindi ad un lieve aumento della media di gruppo.

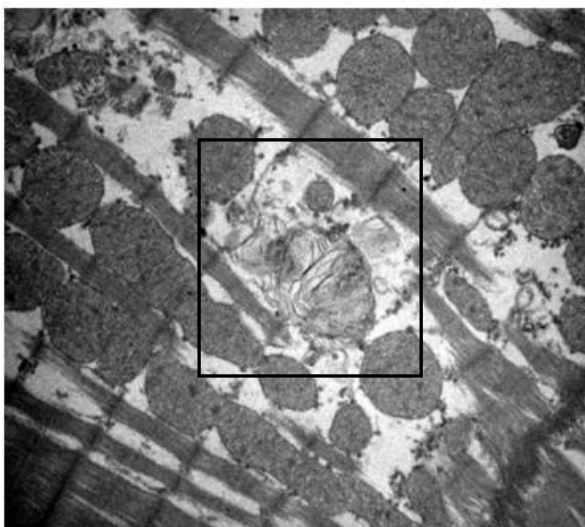
Attualmente la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è ancora considerata come il "gold standard" per l'identificazione e la caratterizzazione di accumuli intracitoplasmatici di fosfolipidi caratterizzati all'esame ultrastrutturale da corpi multi lamellari di origine lisosomiale ed identificati in genere con il termine di "lamellar body". Tuttavia questa tecnica richiede particolari attrezzature, competenze adeguate e specifiche procedure per la raccolta e la fissazione dei tessuti. E' in genere piuttosto costosa, di difficile applicazione nella clinica e non sempre permette una semplice analisi quantitativa. E' da considerarsi inoltre, che l'identificazione di una condizione di accumulo intracitoplasmatico di fosfolipidi in cellule di diversi organi quali ad esempio cuore, fegato e polmoni, richiede necessariamente il sacrificio dell'animale. In questo

progetto si è voluto identificare principalmente marcatori e tecniche diagnostiche pre-cliniche facilmente monitorabili nel tempo e che non richiedano necessariamente il sacrificio dell'individuo.

La microscopia elettronica a trasmissione è stata utilizzata in questo lavoro al fine di ottenere una conferma diagnostica circa l'accumulo intracitoplasmatico di fosfolipidi caratterizzato all'ultrastruttura dalla presenza di corpi lamellari intrasarcoplasmatici in miocardiociti di ratti trattati con Amiodarone, una molecola di comprovata attività fosfolipidogenica in diversi organi e tessuti. La valutazione ultrastrutturale è stata eseguita sia su un gruppo di cinque animali di controllo che hanno ricevuto quindi il solo veicolo che su cinque animali trattati con il composto in esame somministrato per via orale in ragione di 300mg/kg/day per 10 giorni.

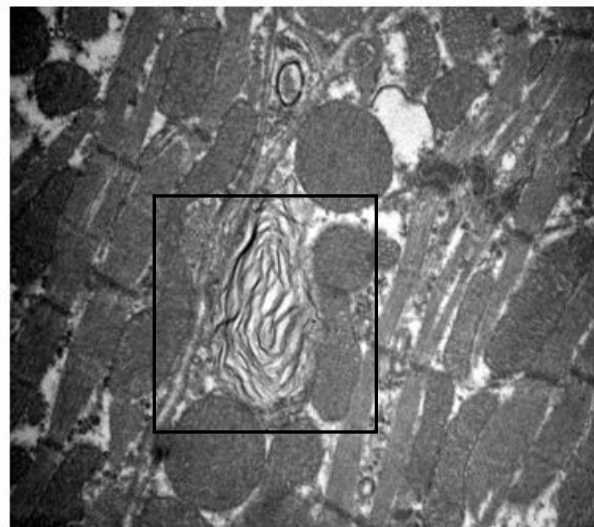
L'esame ultrastrutturale dei campioni di tessuto cardiaco provenienti dagli animali trattati con di Amiodarone, ha infatti evidenziato la presenza di strutture lamellari intracitoplasmatiche di origine lisosomiale in diversi stati di organizzazione all'interno dei miocardiociti. Le immagini raccolte testimoniano la presenza delle diverse fasi che portano alla formazione finale di corpi lamellari lisosomiali caratterizzate da una prima fase di occasionale presenza di strutture membranose irregolarmente distribuite, che successivamente tendono ad organizzarsi in strutture concentriche fino a raggiungere la tipica regolare organizzazione a bulbo di cipolla che caratterizza i corpi lamellari e che nel contempo identifica una condizione di accumulo di fosfolipidi

Fase di organizzazione



(a)

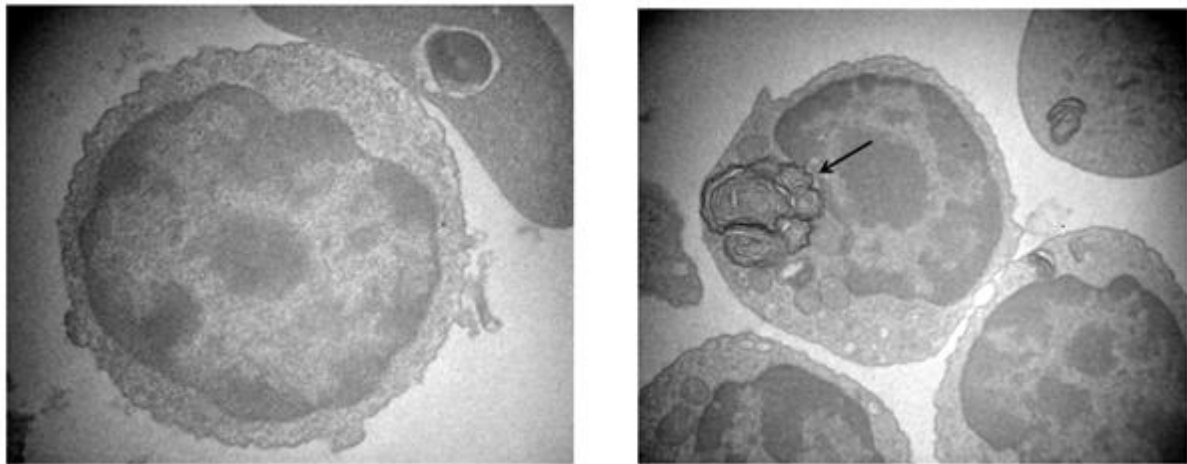
Lamellar Body



(b)

Figura 36. Miocardiocita di ratto trattato con Amiodarone osservati al microscopio elettronico a trasmissione. (a) Fase iniziale di organizzazione di un corpo multilamellare intrasarcoplasmatico (x8900). (b) Presenza di un corpo lamellare ben organizzato (x11000).

Esami ultrastrutturali sono stati utilizzati anche per confermare l'accumulo di fosfolipidi e la presenza di corpi lamellari nei linfociti di ratti trattati con Amiodarone. La Figura 37 A mostra un linfocita normale di un ratto di controllo, mentre la Figura 37 B mostra un linfocita di un ratto trattato contenente corpi lamellari multipli intracitoplasmatici. Nel suo complesso, questi sono costituiti da membrane lamellari concentriche o irregolari in uno stato organizzato o disorganizzato.



(a)

(b)

Figura 37. Microscopia elettronica di linfociti di ratto. (a) Linfocita normale di un ratto di controllo (trattato con il veicolo; 11000x). (b) La freccia indicata l'accumulo di fosfolipidi nel citoplasma di un ratto trattato con Amiodarone alla dose di 300 mg/Kg/day per 10 giorni (8900x).

4.3 Espressione genica

4.3.1 Estrazione ed analisi qualitative e quantitative del RNA

Estrazioni e quantificazioni pre-DNAse

Per i campioni di cuore, prelevati dagli animali sia dello studio Isoproterenolo sia dello studio Amiodarone, le quantità di tessuto pesato erano mediamente comprese tra 20-

25 ng (Tabelle VI e VII). Mentre per il sangue il volume sottoposto ad estrazione era di 2.5mL (Tabella VIII).

Si è cercato di processare con il protocollo una quantità/volume di campione costante per tutti i tessuti.

Numero del campione	Trattamento	Peso del campione analizzato (mg)
51	PBS	21,8
52	PBS	22,3
53	PBS	22,1
54	PBS	24,1
55	PBS	24,2
56	PBS	23,0
57	PBS	24,2
58	PBS	22,1
59	PBS	24,5
60	PBS	23,8
61	Iso	24,0
62	Iso	22,4
64	Iso	25,4
67	Iso	22,9
68	Iso	24,3
70	Iso	22,7
73	Iso	25,0
75	Iso	23,4
76	Iso	24,2
78	Iso	24,9

Tabella VI. Studio Isoproterenolo. Presentazione dei dati relativi ai campioni di tessuto cardiaco nelle fasi precedenti l'estrazione di RNA.

Numero del campione	Trattamento	Peso del campione analizzato (mg)
11	Metilcellulosa	24,3
12	Metilcellulosa	24,0
13	Metilcellulosa	21,3
14	Metilcellulosa	23,3
15	Metilcellulosa	25,0
16	Metilcellulosa	22,6
17	Metilcellulosa	23,5
18	Metilcellulosa	23,3
19	Metilcellulosa	21,8

20	Metilcellulosa	23,3
31	Amiodarone	22,3
32	Amiodarone	24,9
33	Amiodarone	24,8
34	Amiodarone	22,6
35	Amiodarone	21,8
36	Amiodarone	23,6
37	Amiodarone	22,0
38	Amiodarone	21,0
39	Amiodarone	24,7
40	Amiodarone	21,4

Tabella VII. Studio Amiodarone. Presentazione dei dati relativi ai campioni di tessuto cardiaco nelle fasi precedenti l'estrazione di RNA.

Numero del campione	Trattamento	Peso del campione analizzato (mL)
11	Metilcellulosa	2,5
12	Metilcellulosa	2,5
13	Metilcellulosa	2,5
14	Metilcellulosa	2,5
15	Metilcellulosa	2,5
16	Metilcellulosa	2,5
17	Metilcellulosa	2,5
18	Metilcellulosa	2,5
19	Metilcellulosa	2,5
20	Metilcellulosa	2,5
31	Amiodarone	2,5
32	Amiodarone	2,5
33	Amiodarone	2,5
34	Amiodarone	2,5
35	Amiodarone	2,5
36	Amiodarone	2,5
37	Amiodarone	2,5
38	Amiodarone	2,5
39	Amiodarone	2,5
40	Amiodarone	2,5

Tabella VIII. Studio Amiodarone. Presentazione dei dati relativi ai campioni di sangue nelle fasi precedenti l'estrazione di RNA.

Di seguito sono stati riportati i valori di assorbanza espressi in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Si può notare che il valore del rapporto tra le assorbanze rilevate a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) nei campioni di RNA provenienti dai tre tessuti, prima che fossero sottoposti al trattamento DNase, era mediamente superiore a 1.6 e ciò indicava una buona qualità dell'estratto (tabelle IX, X, XI).

La testimonianza da parte di tali dati di un livello qualitativo accettabile, avrebbe consentito di procedere al trattamento con enzima DNase, invece la presenza di una degradazione del campione, avrebbe reso necessaria una nuova estrazione di RNA.

Numero del campione	Letture Assorbanza pre-DNase ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rapporto tra A_{260}/A_{280}	Agilent (pre-DNase)	10 μg RNA (μL) per trattamento con DNase	Volume H ₂ O (μL) per trattamento DNase
51	0,432	1,69	√	23,15	21,85
52	0,555	1,65	√	18,02	26,98
53	0,459	1,66	√	21,79	23,21
54	0,458	1,69	√	21,83	23,17
55	0,421	1,65	√	23,75	21,25
56	0,431	1,68	√	23,20	21,80
57	0,349	1,62	√	28,65	16,35
58	0,313	1,64	√	31,95	13,05
59	0,276	1,34	√	36,23	8,77
60	0,225	1,52	√	44,44	0,56
61	0,519	1,75	√	19,27	25,73
62	0,466	1,69	√	21,46	23,54
64	0,569	1,70	√	17,57	27,43
67	0,622	1,64	√	16,08	28,92
68	0,464	1,66	√	21,55	23,45
70	0,505	1,65	√	19,80	25,20
73	0,472	1,68	√	21,19	23,81
75	0,439	1,69	√	22,78	22,22
76	0,783	1,68	√	12,77	32,23
78	0,466	1,69	√	21,46	23,54

Tabella IX. Studio Isoproterenolo. Presentazione dei dati relativi ai campioni di tessuto cardiaco nelle fasi precedenti al trattamento DNase.

Numero del campione	Letture Assorbanza pre-DNase ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rapporto tra A_{260}/A_{280}	Agilent (pre-DNase)	10 μg RNA (μL) per trattamento con DNase	Volume H ₂ O (μL) per trattamento DNase
11	0,465	1,72	√	21,51	23,49
12	0,407	1,89	√	24,57	20,43
13	0,586	1,67	√	17,06	27,94
14	0,404	1,82	√	24,75	20,25
15	0,427	1,78	√	23,42	21,58
16	0,442	1,79	√	22,62	22,38
17	0,453	1,80	√	22,08	22,92
18	0,600	1,67	√	16,67	28,33
19	0,564	1,72	√	17,73	27,27
20	0,415	1,73	√	24,10	20,90
31	0,231	1,81	√	43,29	1,71
32	0,303	1,45	√	33,00	12,00
33	0,414	1,65	√	24,15	20,85
34	0,455	1,60	√	21,98	23,02
35	0,269	1,79	√	37,17	7,83
36	0,499	1,56	√	20,04	24,96
37	0,225	1,74	√	44,44	0,56
38	0,394	1,62	√	25,38	19,62
39	0,455	1,60	√	21,98	23,02
40	0,499	1,56	√	20,04	24,96

Tabella X. Studio Amiodarone. Presentazione dei dati relativi ai campioni di tessuto cardiaco nelle fasi precedenti al trattamento DNase.

Numero del campione	Letture Assorbanza pre-DNase ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rapporto tra A_{260}/A_{280}	Agilent (pre-DNase)	10 μg RNA (μL) per trattamento con DNase	Volume H ₂ O (μL) per trattamento DNase
11	1,393	1,83	√	7,18	39,82
12	1,322	1,80	√	7,56	39,44
13	1,194	1,80	√	8,38	38,62
14	1,175	1,80	√	8,51	38,49
15	1,456	1,84	√	6,87	40,13
16	1,546	1,77	√	6,47	40,53
17	1,059	1,77	√	9,44	37,56
18	1,433	1,77	√	6,98	40,02
19	1,212	1,76	√	8,25	38,75
20	1,51	1,73	√	6,62	40,38
31	0,220	1,54	√	45,45	1,55
32	0,284	1,63	√	35,21	11,79
33	0,328	1,66	√	30,49	16,51

34	0,315	1,62	√	31,75	15,25
35	0,303	1,63	√	33,00	14,00
36	0,330	1,58	√	30,30	16,70
37	0,226	1,47	√	44,25	2,75
38	0,351	1,61	√	28,49	18,51
39	0,214	1,51	√	46,73	0,27
40	0,216	1,42	√	46,30	0,70

Tabella XI. Studio Amiodarone. Presentazione dei dati relativi ai campioni di sangue nelle fasi precedenti al trattamento DNase.

I campioni di sangue di animali trattati con Amiodarone alla dose 300 mg/Kg/die presentavano una concentrazione di RNA estratto inferiore di circa cinque volte rispetto ai campioni di controllo. La spiegazione di questo fenomeno è riconducibile al fatto che, in condizioni fisiologiche, i linfociti periferici nel ratto costituiscono circa l'80% dell'intera popolazione leucocitaria, il rimanente 20% è costituito principalmente da neutrofili. Mentre, come riportano fonti bibliografiche e dati di analisi ematologiche, effettuati in studi precedenti, la formula WBC (White Blood Cell) di animali trattati con Amiodarone si presenta invertita rispetto agli animali di controllo: 50-60% costituita da neutrofili; 40-60% da linfociti.

Non è chiaro il motivo per cui l'Amiodarone porti ad avere questo quadro clinico, probabilmente la causa è legata al meccanismo d'azione del farmaco o dagli stati infiammatori localizzati che esso comporta.

Risultati ottenuti per i tessuti di cuore e sangue dopo trattamento DNasi

Una volta eseguito il trattamento DNase l'assorbanza è stata nuovamente misurata alla lunghezza d'onda di 260 nm e di 280 nm. Il rapporto (A_{260}/A_{280}), registrato per i campioni di RNA di tutti i tipi di tessuto e trattamento, si è dimostrato mediamente superiore a 1.5 (tabelle XII, XII, XIV). È risaputo che quanto più questo valore si avvicina a 2.0 tanto più l'RNA estratto dimostra di essere privo di contaminazione.

Dopo aver valutato l'idoneità dei risultati ottenuti attraverso la lettura dell'assorbanza, si è passati ad una valutazione qualitativa dell'RNA post-DNasi mediante il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer. La qualità dei campioni confermando osservando i valori di R.I.N. (RNA Integrity Number) forniti dal sistema. I valori R.I.N. permettono di attribuire un indice qualitativo all'RNA totale esaminato. Tale parametro presenta una scala che

va da 10, RNA di ottima qualità, a zero che indica invece RNA completamente degradato. Nel caso di un'analisi di espressione genica su campioni di RNA mediante Microarray, è consigliabile ottenere R.I.N. ≥ 7 .

Di seguito sono state riportate delle immagini (figura 38) ottenute dall'analisi con Agilent 2100 Bioanalyzer dei campioni di RNA estratti da tessuto cardiaco in seguito al loro trattamento con enzima DNase.

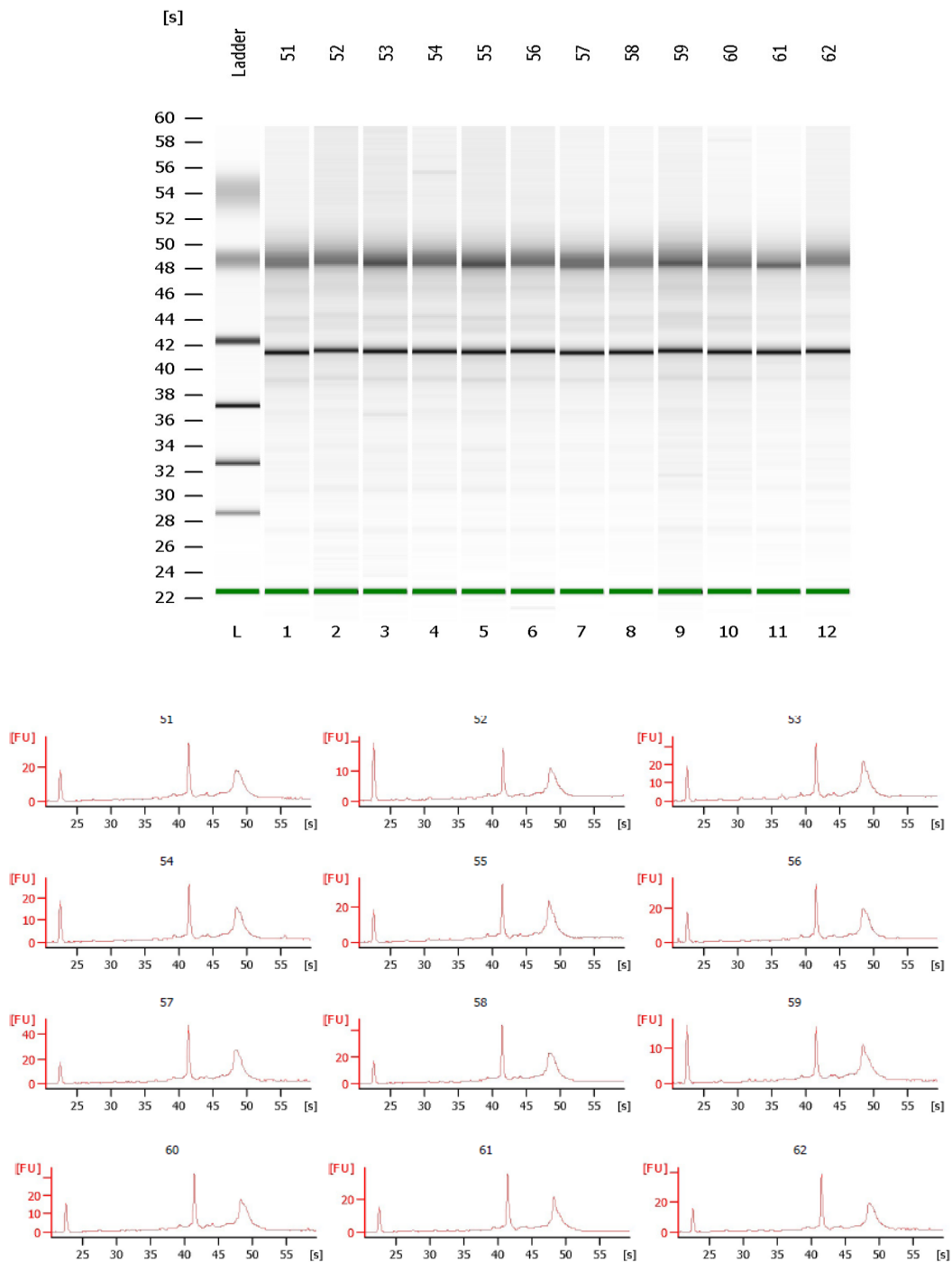


Figura 38. Esempio dati ottenuti con Agilent 2100 Bioanalyzer. Le figure riportano i risultati ottenuti per i campioni di RNA estratti da tessuto cardiaco e già sottoposti a trattamento con enzima DNase.

Dai grafici ottenuti si è potuto verificare che la qualità dell'RNA estratto nei tre tessuti soddisfaceva i criteri di valutazione spiegati in precedenza. Attraverso una loro analisi è stato possibile capire, inoltre, che tutti i campioni di RNA di ogni tessuto presentavano in modo ben definito i picchi relativi alle due unità ribosomiali 18S e 28S. Questo, assieme ai valori di R.I.N. ottenuti, ci ha permesso di dire che i campioni di RNA mostravano una buona qualità, che soddisfaceva i criteri richiesti per l'esecuzione di analisi di espressione genica.

Numero del campione	Lettura Assorbanza pre-DNase (ng/ μ L)	Rapporto tra A_{260}/A_{280}	Agilent (RIN)
51	239	1,64	8,7
52	242	1,65	9,4
53	268	1,62	9,2
54	253	1,63	9,2
55	243	1,66	8,9
56	256	1,63	9,1
57	259	1,58	9,2
58	253	1,60	8,8
59	174	1,46	9,2
60	233	1,51	8,5
61	196	1,43	9,3
62	273	1,66	9,4
64	220	1,69	9,2
67	258	1,83	9
68	217	1,81	8,1
70	204	1,75	7,7
73	215	1,81	8
75	207	1,88	7,9
76	188	1,60	9,1
78	230	1,40	8,2

Tabella XII. Studio Isoproterenolo. Presentazione dei dati relativi ai campioni di tessuto cardiaco nelle fasi post-DNA

Numero del campione	Lettura Assorbanza pre-DNase (ng/ μ L)	Rapporto tra A_{260}/A_{280}	Agilent (RIN)
11	223	1,88	8,6
12	202	1,57	8,7
13	140	1,38	7,7
14	202	1,40	8,7
15	205	1,43	7,8
16	203	1,47	7,1
17	190	1,43	8,7
18	196	1,63	8,2
19	191	1,60	8,4
20	180	1,44	8,7
31	226	1,52	8,9
32	120	1,31	9,2
33	233	1,49	8,3
34	229	1,42	8,9
35	197	1,40	7,5
36	189	1,45	8,6
37	234	1,46	8,1
38	223	1,60	8,9
39	164	1,36	9
40	170	1,32	9

Tabella XIII. Studio Amiodarone. Presentazione dei dati relativi ai campioni di tessuto cardiaco nelle fasi post-DNase.

Numero del campione	Lettura Assorbanza pre-DNase (ng/ μ L)	Rapporto tra A_{260}/A_{280}	Agilent (RIN)
11	220	1,86	7,0
12	181	1,87	7,3
13	214	1,82	8,3
14	254	1,75	8,6
15	195	1,88	7,0
16	205	1,92	8,3
17	220	1,89	7,8
18	261	1,84	8,7
19	240	1,83	8,6
20	226	1,75	8,7
31	168	1,63	7,3

32	198	1,70	7,6
33	204	1,71	7,1
34	214	1,70	7,0
35	214	1,67	7,0
36	256	1,50	7,2
37	222	1,39	7,5
38	227	1,60	7,6
39	185	1,58	7,5
40	179	1,49	7,7

Tabella XIV. Studio Amiodarone. Presentazione dei dati relativi ai campioni di sangue intero nelle fasi post-DNase.

Quantificazione RNA mediante sonda Ribogreen

Il valore R^2 che caratterizzava la curva standard costruita si è dimostrato superiore a 0.99. Un valore inferiore sarebbe stato indicativo di imprecisioni nella conduzione del test, che in tal caso, avrebbe dovuto essere ripetuto.

La concentrazione di RNA totale presente in ogni campione è stata ricavata dalla curva standard, ponendo attenzione a correggere il dato ottenuto per il fattore di diluizione applicato, 1:800.

Complessivamente le concentrazioni di RNA post-DNase quantificate con la sonda RiboGreen si sono dimostrate adatte all'applicazione delle analisi di espressione genica, in quanto per tutti i campioni era presente una sufficiente quantità di acido nucleico che permetteva di condurre sia un'analisi di espressione genica mediante Microarray, sia una reazione di retro-trascrizione su 5 µg di RNA.

Le concentrazioni di RNA post-DNase ottenute con la sonda RiboGreen, rimangono comunque molto più specifiche e sensibili, sono state inoltre comparate alle stesse ottenute attraverso la lettura OD.

Nonostante le tecniche applicate per la quantificazione siano molto diverse tra loro, le differenze tra i risultati ottenuti hanno consentito una buona correlazione tra essi

Numero del campione	Lettura Assorbanza pre-DNase (ng/ μ L)	Ribogreen (ng/ μ L)
51	239	169
52	242	157
53	268	169
54	253	169
55	243	167
56	256	179
57	259	177
58	253	189
59	174	83
60	233	111
61	196	144
62	273	157
64	220	153
67	258	148
68	217	160
70	204	153
73	215	161
75	207	143
76	188	118
78	230	174

Tabella XV. Studio Isoproterenolo. Confronto concentrazioni RNA post-DNasi determinate mediante lettura O.D. e sonda Ribogreen nel tessuto cardiaco.

Numero del campione	Lettura Assorbanza pre-DNase (ng/ μ L)	Ribogreen (ng/ μ L)
11	223	147
12	202	201
13	140	132
14	202	163
15	205	211
16	203	200
17	190	192
18	196	114
19	191	87
20	180	163

31	<i>226</i>	204
32	<i>120</i>	109
33	<i>233</i>	125
34	<i>229</i>	110
35	<i>197</i>	144
36	<i>189</i>	116
37	<i>234</i>	233
38	<i>223</i>	126
39	<i>164</i>	111
40	<i>170</i>	125

Tabella XVI. Studio Amiodarone. Confronto concentrazioni RNA post-DNAsi determinate mediante lettura O.D. e sonda Ribogreen nel tessuto cardiaco.

Numero del campione	Letture Assorbanza pre-DNase (ng/μL)	Ribogreen (ng/μL)
11	<i>220</i>	204
12	<i>181</i>	139
13	<i>214</i>	227
14	<i>254</i>	208
15	<i>195</i>	213
16	<i>205</i>	174
17	<i>220</i>	202
18	<i>261</i>	244
19	<i>240</i>	163
20	<i>226</i>	228
31	<i>168</i>	109
32	<i>198</i>	142
33	<i>204</i>	170
34	<i>214</i>	155
35	<i>214</i>	147
36	<i>256</i>	129
37	<i>222</i>	81
38	<i>227</i>	122
39	<i>185</i>	88
40	<i>179</i>	83

Tabella XVII. Studio Amiodarone. Confronto concentrazioni RNA post-DNAsi determinate mediante lettura O.D. e sonda Ribogreen su sangue intero.

Risultati ottenuti attraverso valutazioni No-RT (No Reverse Trascrizione controls)

Per valutare l'efficienza del trattamento DNase è stata quantificata l'attività del gene di controllo *GAPDH* valutando i valori di Ct ottenuti forniti dal software Sequence Detection System 2.1.

I valori di Ct riferiti ai campioni di cuore e sangue si sono rivelati quasi tutti approssimativamente uguali a 40 (interpretato dal software come valore indeterminato) e in qualche caso compresi tra i 37 e i 40 Ct. Questo è prova dell'avvenuta reazione di rimozione del DNA dai campioni di RNA estratti. Valori inferiori ai 36 Ct sono infatti sintomo di una contaminazione di DNA genomico.

Come controllo positivo è stato usato cDNA di fegato di ratto che soddisfaceva il requisito di bassi valori di Ct. Un valore Ct per il controllo positivo superiore a 36 avrebbe indicato una scorretta preparazione dei reagenti o l'uso di un materiale di controllo positivo inappropriato. Pertanto sarebbe stato necessario ripetere l'analisi con una nuova master mix e un nuovo controllo.

Il controllo negativo utilizzato era composto da acqua nuclease-free. Questo viene anche chiamato *No Template Control (NTC)* e fornisce un sistema di controllo della presenza di contaminazioni esterne o di altri fattori, che comunque possono causare un aumento della fluorescenza non specifico. In condizioni ideali in questi pozzetti non si deve rilevare alcun segnale di amplificazione, così come è avvenuto nelle nostre valutazioni.

Valori Ct superiore a 40 sarebbero stati espressi dal software come valore di Ct indeterminato. Il nostro protocollo accettava valori di $Ct \geq 36$.

Se i campioni di RNA post-DNase avessero mostrato un valore Ct inferiore a 36 questo avrebbe indicato la non completa rimozione del DNA genomico durante il trattamento con DNase. Pertanto sarebbe stato necessario ripetere l'analisi e se si fossero ottenuti dei valori di Ct simili si sarebbe dovuto ripetere il trattamento dei campioni con DNase.

Se tutti i valori di Ct avessero mostrato un valore inferiore a 36 questo avrebbe indicato la presenza di contaminazione nei reagenti o nell'acqua nuclease-free utilizzati. In questo caso sarebbe stato necessario ripetere l'analisi con una nuova master mix e dell'acqua nuclease-free fresca.

I valori di Ct indeterminati sono indice di un non significativo sviluppo di fluorescenza misurabile dallo strumento, ovvero in nessuno dei 40 cicli di reazione avvenuti non si è verificata amplificazione apprezzabile della sequenza di DNA bersaglio.

4.3.2 Microarray

Per l'analisi di espressione genica mediante Microarray, i campioni di RNA estratti da tessuto cardiaco e da sangue intero sono stati organizzati in pool.

Per ogni gruppo di trattamento, inizialmente composto da dieci animali, sono stati formati 3 pool di RNA. Due pool contenevano RNA di tre animali, mentre il terzo pool conteneva l'RNA di quattro animali.

Quantificazione dei campioni singoli e dei pool mediante Nanodrop

I singoli campioni di RNA e i successivi pool sono stati quantificati mediante letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e di 280 nm utilizzando lo strumento Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington UK).

La prima quantificazione del RNA, ripetuta in doppio, è avvenuta sui singoli campioni e ha confermato le concentrazioni (ng/mL) ottenute precedentemente con la sonda Ribogreen. Dalle concentrazioni ottenute, sono stati calcolati i volumi al fine di prelevare da ogni campione 500 ng di RNA. I volumi calcolati sono stati utilizzati per la formazione dei pool, le cui concentrazioni sono state quantificate mediante Nanodrop. In seguito, sono stati calcolati i volumi per ottenere dei pool finali di 200 ng di RNA in un volume di 8.3 μ l.

Di seguito, sono riportati i valori di assorbanza, i rapporti A_{260}/A_{280} ottenuti e i volumi utilizzati (Tabelle XVIII, XIX, XX).

Pool ID	Campione	Conc pool ng/ μ l	Vol x 500 ng	Vol pool	Conc pool ng/ μ l	Vol x 200 ng	Vol H2O μ l
Pool KISO1	53	146,75	3,41	13,42	111,74	1,79	6,51
	55	145,25	3,44				
	59	76,05	6,57				
Pool KISO2	52	139,05	3,60	10,99	136,48	1,47	6,83
	58	164	3,05				
	60	115,05	4,35				
Pool KISO3	51	148,2	3,37	13,22	151,28	1,32	6,98
	54	150,1	3,33				
	56	150,75	3,32				
	57	156,3	3,20				
Pool ISO1	64	150,45	3,32	11,22	133,74	1,50	6,80
	70	133,9	3,73				
	76	120,25	4,16				
Pool ISO2	62	149,45	3,35	10,37	144,68	1,38	6,92
	67	146	3,42				
	73	139	3,60				
Pool ISO3	61	140,95	3,55	13,81	144,78	1,38	6,92
	68	144,75	3,45				
	75	128,6	3,89				
	78	170,95	2,92				

Tabella XVIII. Studio Isoproterenolo. Nella tabella vengono elencati i nomi dei pool, il numero di animali che li costituiscono, i volumi e le concentrazioni utilizzate per RNA estratto da tessuto cardiaco.

Pool ID	Campione	Conc pool ng/ μ l	Vol x 500 ng	Vol pool	Conc pool ng/ μ l	Vol x 200 ng	Vol H2O μ l
Pool KAM1	11	147,05	3,40	11,26	133,21	1,50	6,80
	14	151,2	3,31				
	18	109,8	4,55				
Pool KAM2	12	187,85	2,66	8,60	174,44	1,15	7,15
	17	172,7	2,90				
	20	164,35	3,04				
Pool KAM3	13	143,1	3,49	14,86	134,59	1,49	6,81
	15	178,3	2,80				
	16	171,7	2,91				
	19	88,5	5,65				
Pool AM1	35	134,4	3,72	12,66	118,46	1,69	6,61
	39	105,5	4,74				
	40	118,95	4,20				
Pool AM2	32	96,3	5,19	14,88	100,78	1,98	6,32
	33	105,35	4,75				
	36	101,1	4,95				
Pool AM3	31	187,15	2,67	15,05	132,87	1,51	6,79
	34	95,6	5,23				
	37	184,4	2,71				
	38	112,65	4,44				

Tabella XIX. Studio Amiodarone. Nella tabella vengono elencati i nomi dei pool, il numero di animali che li costituiscono, i volumi e le concentrazioni utilizzate per RNA estratto da tessuto cardiaco.

Pool ID	Campione	Conc pool ng/ μ l	Vol x 500 ng	Vol pool	Conc pool ng/ μ l	Vol x 200 ng	Vol H2O μ l
Pool KAM1	11	173,2	2,89	7,96	188,43	1,06	7,24
	14	184,5	2,71				
	18	211,55	2,36				
Pool KAM2	12	127,9	3,91	9,38	160,00	1,25	7,05
	17	182,75	2,74				
	20	183,15	2,73				
Pool KAM3	13	195,9	2,55	11,53	173,39	1,15	7,15
	15	185,65	2,69				
	16	156,4	3,20				
	19	161,7	3,09				
Pool AM1	35	153,05	3,27	14,49	103,52	1,93	6,37
	39	90,5	5,52				
	40	87,75	5,70				
Pool AM2	32	146,55	3,41	10,75	139,56	1,43	6,87
	33	152,15	3,29				
	36	123,45	4,05				
Pool AM3	31	97,95	5,10	18,92	105,71	1,89	6,41
	34	141,4	3,54				
	37	83	6,02				
	38	117,5	4,26				

Tabella XX. Studio Amiodarone. Nella tabella vengono elencati i nomi dei pool, il numero di animali che li costituiscono, i volumi e le concentrazioni utilizzate per RNA estratto da sangue intero.

Sintesi e quantificazione del cRNA marcato

I campioni di pool, contenenti 200 ng di RNA, hanno visto l'aggiunta di una mix di 'Spike', una soluzione contenente 10 trascritti poliadenilati sintetizzati in vitro, con concentrazioni che si presentavano da 1 a 6 in scala logaritmica.

Gli spike sono stati utilizzati come controllo positivo dei nostri campioni di RNA per la fase di amplificazione e per la fase di ibridazione sui chip del microarray. Il report Agilent QC per il protocollo one-color calcola e riporta graficamente le quantificazioni degli spike, calcolando H.D.L. (Higher Detection Limits) e L.D.L. (Lower Detection Limits) e il coefficiente di variazione percentuale di tutti i 10 spike nell'esperimento.

I campioni, contenenti l'RNA estratto e gli spike, hanno subito in seguito la sintesi del primo filamento a cDNA. La sintesi è avvenuta utilizzando primers poli-T e la polimerasi T7, i quali si sono appaiati alla sequenza poli-A presenti all'estremità 3' dell'RNA. L'aggiunta dell'enzima trascrittasi inversa (RT) ha permesso la sintesi del primo e del secondo filamento di cDNA. La formazione di cRNA marcato è avvenuta grazie all'RNA polimerasi T7 che contemporaneamente ha incorporato la Cyanina 3.

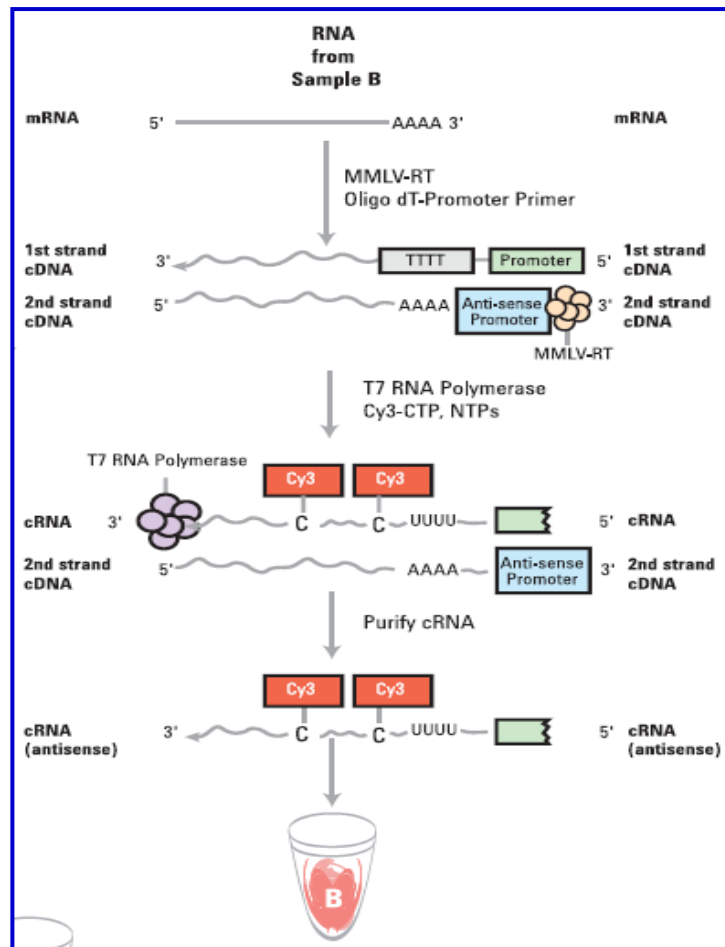


Figura 39. Fasi di sintesi di una molecola di cRNA marcato par da una molecola di RNA.

Il cRNA marcato e la quantità di Cyanina 3 incorporata è stata quantificata mediante Nanodrop. Per un segnale ottimale dell'ibridazione è richiesto che l'attività specifica del fluoroforo non sia inferiore a 8 pmoli per μg di cRNA (in caso contrario è necessario ripetere la fase di sintesi e di marcatura) e che la quantità di cRNA da utilizzare sia pari a 1.65 μg . Di seguito, vengono riportati i dati relativi alle quantificazioni effettuate mediante Nanodrop e i volumi da prelevare per ogni pool al fine di utilizzare le concentrazioni richieste.

Ogni chip per l'analisi di espressione genica mediante Microarray presenta 4 aree su cui far ibridare 4 differenti campioni. Le tabelle sono state organizzate per riflettere le disposizioni dei campioni su ogni chip.

Sample ID	ng/ μ l	Media	260/280	Cy3 (pmol/ μ l)	Media	Attività specifica	Vol / 1,65 μ g
Pool KAM1	132,3	132,5	2,33	1,2	1,25	9,43	12,45
	132,7		2,3	1,3			
Pool KAM2	139,1	138,65	2,3	1,5	1,5	10,82	11,90
	138,2		2,3	1,5			
Pool AM1	110,4	109,85	2,32	0,8	0,85	7,74	15,02
	109,3		2,33	0,9			
Pool AM2	143,8	143,2	2,29	1,8	1,8	12,57	11,52
	142,6		2,31	1,8			

(a)

Sample ID	ng/ μ l	Media	260/280	Cy3 (pmol/ μ l)	Media	Attività specifica	Vol / 1,65 μ g
Pool KAM3	94,9	96,55	2,36	0,92	0,88	9,11	17,09
	98,2		2,34	0,84			
Pool AM3	101	100,7	2,37	0,84	0,845	8,39	16,39
	100,4		2,36	0,85			
Pool KIS01	94,2	94,4	2,37	0,85	0,86	9,11	17,48
	94,6		2,37	0,87			
Pool ISO1	97,4	98,05	2,33	0,83	0,845	8,62	16,83
	98,7		2,33	0,86			

(b)

Sample ID	ng/ μ l	Media	260/280	Cy3 (pmol/ μ l)	Media	Attività specifica	Vol / 1,65 μ g
Pool KIS02	134,9	133,1	2,34	1,43	1,425	10,71	12,40
	131,3		2,32	1,42			
Pool KIS03	116,6	119,5	2,33	1,29	1,33	11,13	13,81
	122,4		2,32	1,37			
Pool ISO2	133,8	134,15	2,26	1,03	1,055	7,86	12,30
	134,5		2,26	1,08			
Pool ISO3	114,1	114,25	2,29	0,83	0,8	7,00	14,44
	114,4		2,24	0,77			

(c)

Sample ID	ng/ μ l	Media	260/280	Cy3 (pmol/ μ l)	Media	Attività specifica	Vol / 1,65 μ g
Pool B_KAM1	110,8	110,4	2,33	1,57	1,57	14,22	14,95
	110		2,26	1,57			
Pool B_KAM2	103,2	103,6	2,31	1,32	1,325	12,79	15,93
	104		2,28	1,33			
Pool B_AM1	110,7	110,6	1,88	3,73	3,725	33,68	14,92
	110,5		1,81	3,72			
Pool B_AM2	108,9	108,65	2,19	1,07	1,085	9,99	15,19
	108,4		2,23	1,1			

(d)

Sample ID	ng/ μ l	Media	260/280	Cy3 (pmol/ μ l)	Media	Attività specifica	Vol / 1,65 μ g
Pool B_KAM3	119,3	119,6	2,26	2,16	2,18	18,23	13,80
	119,9		2,27	2,2			
Pool B_AM3	99,9	99,55	2,31	1,84	1,855	18,63	16,57
	99,2		2,37	1,87			

(e)

Tabella XXI. La tabella riporta le concentrazioni di cRNA (calcolate in doppio), i rapporti 260/280, l'attività specifica di Cy3 incorporata (calcolate in doppio) e i volumi da prelevare da

ogni campione al fine di avere una concentrazione di cRNA pari a 1.65 µg. Le tabelle rappresentano lo schema dei chip: (a) i primi due pool di controllo (Kam 1 e Kam 2) e i primi due pool di trattati (Am 1 e Am 2) del cuore dello studio Amiodarone. (b) il terzo pool dei controlli (Kam 1 e Kam 2) e dei trattati (Am 1 e Am 2) del cuore dello studio Amiodarone e il primo pool di controlli (Kiso 1) e di trattati (Iso 1) del cuore dello studio Isoproterenolo. (c) il secondo e il terzo pool di controlli (Kiso 1 e Kiso 2) e di trattati (Iso 1 e Iso 2) del cuore dello studio Isoproterenolo. (d) i primi due pool di controllo (B_Kam 1 B_Kam 2) e i primi due pool (B_am 1 B_am 2) di trattati di sangue intero dello studio Amiodarone. (e) il terzo pool di controlli (B_Kam 3) e di trattati (B_Kam 3) di sangue intero dello studio Amiodarone.

Frammentazione ed Ibridazione

La fase di ibridazione è preceduta da una fase di frammentazione del cRNA marcato con Cy3. La frammentazione dei campioni viene eseguita in quanto permette di migliorare e facilitare l'ibridazione del cRNA sulle sonde presenti nel chip dell'array.

Ogni campione ha quindi ricevuto l'aggiunta del *Fragmentation buffer* per permettere la reazione di frammentazione. Prima di procedere con la fase di ibridazione, però, i campioni di cRNA marcato hanno subito l'aggiunta dell'*Hybridization Buffer* per interrompere la fase di frammentazione e per favorire la reazione di ibridazione.

A questo punto, i campioni sono stati depositati nelle aree dei chip che presentavano le sonde e di seguito si è passati all'assemblaggio delle camere di reazione, supporto dei vetrini e dei copri-vetrini per l'array, e all'incubazione dei preparati.

La fase di incubazione è stata seguita da dei lavaggi con wash buffer, acetonitrile al 100% e *Stabilization and Drying Solution* per permettere di separare ogni vetrino dal suo copri-vetrino e per eliminare il residuo dei campioni sui chip.

Ibridazione ed elaborazione dati Microarray

Ottenuto il cRNA marcato, i campioni sono stati fatti ibridare alle sonde presenti nei chip per poi effettuare la scansione dei vetrini per elaborare i dati ottenuti.

Il primo passaggio è stato quello di verificare la qualità dell'ibridazione valutando quindi tutti i QC Report forniti dallo strumento. I dati presentati nei report rispecchiavano tutti i criteri o i valori che sono stati fissati prima di questa parte sperimentale. Quest'analisi ha permesso di osservare la presenza dei bright corner in ogni area dei chip, permettendo

quindi di confermare una corretta ibridazione del campione in tutta l'area di ibridazione. L'andamento degli istogrammi, assieme alla mediana del segnale longitudinale e verticale, ha permesso poi di evidenziare una corretta distribuzione del segnale. Infatti, l'istogramma presentava un andamento gaussiano e la mediana dei segnali rimanere sempre all'interno di uno stesso range. Per quanto concerne il background, è stato confermato che la media del Local Background della popolazione inliers fosse inferiore a 50 e non oltre comunque 80, e che la SD fosse sempre compresa tra 2 e 3. Infine, la valutazione degli R^2 e delle slops, relativi agli spike, ha permesso di confermarne la loro linearità e pendenza dato che i valori ottenuti sono sempre stati attorno ad 1. La seguente tabella riporta tutti i dati per singolo campione raccolti dai QC Report.

Sample ID	Bright Corner	Istogramma e mediana segnale	Local Background		Spike	
			Avg	SD	R^2	Slop
Pool KAM1	√	√	45.9	2.07	1	0.90
Pool KAM2	√	√	46.8	2.06	1	0.96
Pool AM1	√	√	46.9	2.1	1	0.97
Pool AM2	√	√	45.5	2.1	1	0.97
Pool KAM3	√	√	41.9	1.8	1	0.97
Pool AM3	√	√	42.7	1.7	1	0.97
Pool KISO1	√	√	42.8	1.7	1	0.97
Pool ISO1	√	√	42.8	1.8	1	0.97
Pool KISO2	√	√	41.3	1.7	1	0.95
Pool KISO3	√	√	42.2	1.8	1	0.94
Pool ISO2	√	√	42.4	1.8	1	0.97
Pool ISO3	√	√	42.2	1.8	1	0.96
Pool B_KAM1	√	√	41.6	1.7	1	0.96
Pool B_KAM2	√	√	42.1	1.7	1	0.97
Pool B_AM1	√	√	42.4	1.8	1	0.95
Pool B_AM2	√	√	42.1	1.8	0.99	0.96
Pool B_KAM3	√	√	40.6	1.7	1	0.98
Pool B_AM3	√	√	41.1	1.7	1	0.96

Tabella XXII. La tabella riporta i dati raccolti dai QC Report per ogni campione. Vengono indicati nome del campione, presenza dei bright corner e dell'andamento corretto

dell'istogramma, i valori medi e le deviazioni standard del local background ed infine i valori di linearità e pendenza delle rette degli spike.

Analisi statistica e risultati Microarray

Una volta verificata la qualità dei Microarray, i dati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma R. Questo passaggio ha permesso di escludere i geni che non sono stati quantificati in almeno 2/3 dei pool di un gruppo di trattamento.

Si è passati quindi alla normalizzazione dei dati utilizzando due diverse normalizzazioni: Quantile e Ciclelowess.

Utilizzando il programma SAM è stato possibile elaborare i dati ed ottenere i valori in *fold-change* di geni indotti ed inibiti tra gli animali trattati e quelli di controllo, normalizzandoli con diversi geni housekeeping. Il programma SAM (Statistical Analysis of Microarray) è stato utilizzato per effettuare l'analisi statistica, al fine di identificare i geni modulati dal trattamento con le due molecole. Ogni normalizzazione dei controlli è stata analizzata con la rispettiva normalizzazione dei trattati. Si è proceduto poi ad estrapolare quei geni che risultassero essere significativamente modulati per tutte le quattro normalizzazioni. L'analisi statistica effettuata ha permesso di identificare: per l'Isoproterenolo (cuore) un'induzione di 14 geni ed un'inibizione di 62 geni, con un FDR (false DiscoveryRange) del 9% ; per l'Amiodarone, nel cuore un'induzione di 231 geni e un'inibizione di 314 geni, con un FDR del 1%; nel sangue, un up-regulation di circa 2718 geni e un' inibizione di 5500 geni con un FDR sempre del 1% (Tabella XXIII).

Composto	Matrice	FDR %	Up-regulation	Down-regulation
<u>Isoproterenolo</u>	Cuore	~ 9%	14	62
<u>Amiodarone</u>	Cuore	1%	231	314
<u>Amiodarone</u>	Sangue	1%	2718	5500

Tabella XXIII. Nella tabella vengono indicati il composto e il tessuto in cui è stata effettuata l'analisi di espressione genica mediante Microarray con il rispettivo FDR (False Discovery Rate) e il numero di geni up o down regolati.

E' consigliabile utilizzare un FDR del 5% per valorizzare i dati ottenuti di espressione genica. Per quanto concerne lo studio Amiodarone è stato possibile abbassarlo fino all'1%, consolidando quindi maggiormente il numero di geni ottenuti.

Per lo studio Isoproterenolo è stato necessario alzarle il FDR fino al 9% per ottenere un numero di geni sufficiente da valutare.

Un numero così ridotto di geni modulati per lo studio Isoproterenolo, rispetto allo studio Amiodarone, è spiegabile osservando la durata del trattamento e la somministrazione. Il sacrificio degli animali nello studio Isoproterenolo è avvenuto alla ventiquattresima ora dopo una singola somministrazione, a differenza dell'undicesimo giorno per lo studio dell'Amiodarone con somministrazione giornaliera.

4.4 Selezione geni per la Fosfolipidosi

Analisi dei cluster

I geni modulati per il trattamento con Amiodarone sono stati analizzati mediante il programma DAVID per raggrupparli in cluster. L'analisi è stata effettuata inizialmente su cuore e sangue e poi su entrambe le matrici.

Per quanto concerne il cuore, è stato possibile determinare 38 cluster differenti (Tabella XIV). Essi appartengono a diversi pathway cellulari, tra cui proliferazione cellulare, apoptosi, ciclo e morte cellulare, meccanismi di regolazione della proliferazione e della trascrizione, regolazione dei processi metabolici della cellula e biosintesi dei lipidi. Proprio quest'ultimo è risultato essere quello di maggior interesse. I geni coinvolti in questo pathway fanno parte di un processo di sintesi e degradazioni dei lipidi e degli acidi grassi. Viene citato in letteratura, che è ipotizzabile pensare, anche se non è noto come avvenga, che l'accumulo all'interno di lipidi all'interno della cellula porti ad avere un feed-back positivo sulla loro produzione e regolazione.

	PATHWAY
1	'second-messenger-mediated signaling
2	'ion homeostasis
3	'lipid biosynthetic process
4	'neuron differentiation
5	'skeletal development
6	'M phase of mitotic cell cycle
7	'muscle development
8	'regulation of cell size
9	'interphase of mitotic cell cycle
10	'inorganic anion transport
11	'regulation of progression through cell cycle
12	'interphase
13	'anion transport
14	'cell morphogenesis
15	'mitosis
16	'positive regulation of transcription
17	'negative regulation of cell proliferation
18	'positive regulation of cell proliferation
19	'cellular cation homeostasis
20	'cell death
21	'regulation of blood pressure
22	'positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
23	'RNA biosynthetic process
24	'microtubule-based process
25	'cellular chemical homeostasis
26	'steroid metabolic process
27	'positive regulation of cellular metabolic process
28	'negative regulation of cellular metabolic process
29	'neurogenesis
30	'regulation of transcription, DNA-dependent
31	'positive regulation of programmed cell death
32	'transcription, DNA-dependent
33	'regulation of programmed cell death
34	'positive regulation of apoptosis
35	'phosphorylation
36	'apoptosis
37	'regulation of cell growth
38	'M phase

Tabella XXIV. Analisi dei cluster mediante DAVID effettuata su geni modulati nel cuore per lo studio Amiodarone.

L'analisi effettuata sui geni modulati nel sangue ha invece permesso di identificare 51 pathway (Tabella XXV). Alcuni di essi appartengono agli stessi identificati nel cuore, come ad esempio l'apoptosi e la morte cellulare, altri invece appartengono a meccanismi specifici delle cellule del sangue, come la morfogenesi dei vasi sanguinei, sviluppo della vascolarizzazione, attivazione di proteine plasmatiche durante la fase infiammatoria acuta e sviluppo dei vasi sanguinei. Alcuni, infine, sono risultati essere appartenenti ad altri pathway non identificati nel cuore, quali regolatori della risposta immunitaria, regolatori della risposta infiammatoria ed implicati nel metabolismo lipidico.

	PATHWAY
1	'organ morphogenesis
2	'second-messenger-mediated signaling
3	'activation of immune response
4	'angiogenesis
5	'positive regulation of endocytosis
6	'positive regulation of immune response
7	'regulation of immune response
8	'positive regulation of Wnt receptor signaling pathway
9	'B cell mediated immunity
10	'positive regulation of lyase activity
11	'regulation of adenylate cyclase activity
12	'regulation of Wnt receptor signaling pathway
13	'protein modification process
14	'regulation of inflammatory response
15	'positive regulation of immune system process
16	'nitric oxide biosynthetic process
17	'Wnt receptor signaling pathway
18	'blood vessel morphogenesis
19	'actin filament-based movement
20	'positive regulation of transcription
21	'regulation of neuronal synaptic plasticity
22	'actin filament-based process
23	'cell death
24	'positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
25	'negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
26	'positive regulation of signal transduction
27	'cell maturation
28	'activation of plasma proteins during acute inflammatory response
29	'positive regulation of cellular metabolic process
30	'negative regulation of cellular metabolic process
31	'acute inflammatory response
32	'positive regulation of smooth muscle cell proliferation
33	'regulation of cell migration
34	'regulation of smooth muscle cell proliferation
35	'neurogenesis
36	'negative regulation of transcription
37	'lymphocyte mediated immunity
38	'synaptic transmission
39	'regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
40	'positive regulation of cyclase activity
41	'protein kinase cascade
42	'positive regulation of transcription, DNA-dependent
43	'complement activation, classical pathway
44	'negative regulation of transcription, DNA-dependent
45	'phospholipid metabolic process
46	'cytokine and chemokine mediated signaling pathway
47	'vasculature development
48	'chemotaxis
49	'dephosphorylation
50	'blood vessel development
51	'apoptosis

Tabella XXV. Analisi dei cluster mediante DAVID effettuata su geni modulati nel sangue per lo studio Amiodarone.

Per studiare una possibile correlazione dell'effetto dell'Amiodarone su entrambi i tessuti, è stata effettuata l'analisi dei cluster per i geni modulati sia nel sangue che nel cuore.

Questo approccio ha permesso di identificare 23 pathway (Tabella XVI) che sono stati poi analizzati al fine di trovare delle omologie. E' stato possibile osservare innanzitutto la mancanza dei pathway riguardante la sintesi e il metabolismo lipidico determinate nel cuore e nel sangue. Tuttavia, queste vie, sono diverse e coinvolgono geni diversi nelle due matrici ed era quindi auspicabile non ritrovarle in questo tipo di approccio.

I pathway, invece, che sono risultati essere di maggior interesse riguardano l'apoptosi, la morte cellulare e la risposta infiammatoria acuta.

E' noto come l'Amiodarone, oltre che a portare l'accumulo di fosfolipidi, porti a presentare stati infiammatori in diversi organi e come, in dosaggi elevati e duraturi, a fenomeni di morte della cellula.

	PATHWAY
1	'M phase
2	'positive regulation of transcription
3	'acute inflammatory response
4	'positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
5	'regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
6	'regulation of transcription, DNA-dependent
7	'M phase of mitotic cell cycle
8	'transcription, DNA-dependent
9	'RNA biosynthetic process
10	'G1 phase of mitotic cell cycle
11	'mitosis
12	'negative regulation of cell proliferation
13	'interphase of mitotic cell cycle
14	'regulation of translation
15	'regulation of transcription
16	'cell death
17	'positive regulation of cellular metabolic process
18	'apoptosis
19	'interphase
20	'neuron differentiation
21	'G1 phase
22	'neurogenesis
23	'regulation of cell growth

Tabella XXVI. Analisi dei cluster mediante DAVID effettuata su geni modulati nel cuore e nel sangue per lo studio Amiodarone.

Selezione dei geni

Al fine di individuare un pannello specifico e con un numero ristretto di geni come marcatori della fosfolipidosi e di cardiotoxicità, è stato necessario fare una selezione accurata di tutti i dati ottenuti con il Microarray.

La selezione ha permesso di identificare un pannello di 8 *geni* e ha tenuto in considerazione diversi aspetti, quali: fold-change, geni modulati in entrambe le matrici, geni modulati per entrambi i composti, analisi dei cluster e bibliografia:

1. **Pla2g2a**, una *fosfolipasi di classe II*. La fosfolipasi lisosomiale A gioca un ruolo importante nel catabolismo lisosomiale dei glicerolfosfolipidi nelle cellule dei mammiferi. Le informazioni sui PLD e il suo meccanismo d'azione suggeriscono che lo sviluppo di accumulo di fosfolipidi è legato alla inibizione dell'attività della fosfolipasi sia attraverso la generazione di complessi CAD-fosfolipasi o attraverso l'inibizione diretta della attività della fosfolipasi. Il complesso potrebbe essere generato anche da un metabolita dei CAD. In questo caso, la cellula aumenta l'espressione delle fosfolipasi per ridurre la quantità di fosfolipidi.

2. **Pla2g7**, un altro fosfolipasi di classe II. Pla2g7 è stato modulato come Pla2g2a dopo il trattamento con Amiodarone.

3. **Gal**, *galanin pre-pro peptide*. Gal è un neuropeptide di 29-aminoacidi presente in fibre nervose di diversi organi nei mammiferi. La letteratura indica Galanin come potente inibitore della secrezione di insulina. E' possibile che la cellula aumenti i livelli di Gal per ridurre la concentrazione di glucosio come risposta di adattamento al fine di ridurre la concentrazione dei lipidi. Infatti, è noto come una bassa presenza di glucosio induca le cellule ad aumentare la produzione di lipidi per l'apporto di energia. In presenza di accumulazione di fosfolipidi, è possibile che le cellule inducano Gal per ridurre i livelli di glucosio e che utilizzino i lipidi intracellulari

Per soddisfare il fabbisogno energetico.

Gal è stato aggiunto al pannello per la sua importante up-regulation dopo il trattamento con Amiodarone. L'analisi in Microarray ha determinato un aumento di espressione > 100 fold change nei gruppi trattati e confermato con l'analisi in Real-Time.

4. **IL1B**, *l'interleuchina 1b* 5. **Cebpb**, *CCAAT / beta proteina enhancer-binding* 6. **Fcgr2b**, *immunoglobuline gamma bassa affinità dei recettori Fc regione II-b*, sono i geni che appartengono alla risposta infiammatoria acuta, necrosi e morte cellulare. Questi geni sono stati individuati dopo l'analisi dei cluster in entrambi i tessuti. La fosfolipidosi indotta da farmaci è caratterizzata da accumulo intracellulare di fosfolipidi con corpi lamellari e negli organi colpiti da fosfolipidosi possono verificarsi reazioni infiammatorie

e cambiamenti istopatologici. La fosfolipidosi è considerata una patologia reversibile se il trattamento viene sospeso, ma le cure lunghe o alte dosi possono indurre uno stato infiammatorio e può causare la necrosi o morte della cellula.

CEBP e IL1B appartengono al percorso della risposta infiammatoria acuta, la necrosi e la morte cellulare. Fcgr2b è presente solo nel percorso di infiammazione acuta. Un'analisi contemporanea di questi tre geni può permettere di capire lo stato della cella dopo una somministrazione a lungo di CAD.

7. **Acer2**, *Alkaline ceramidasi 2*. Acer 2 è una proteina di 275 aminoacidi, con un peso molecolare di 31.3 kDa e il suo mRNA è ubiquitariamente espresso. Le ceramidasi costituiscono una famiglia eterogenea di enzimi la cui funzione principale è quella di formare sfingosine e acidi grassi a partire dalle ceramidie. La sfingomielina fosfodiesterasi può sintetizzare le sfingomieline fosfolipidiche in ceramidie (Mao 2008). E' possibile che i CAD inducano un accumulo intracellulare di sfingomielina fosfolipidica che a sua volta porta ad un aumento dei livelli di ceramidie. L'up-regulation dei Acer2 può rappresentare una risposta adattativa per ridurre i livelli intracellulari di ceramidie.

Real-time

Per confermare i dati di microarray, i livelli di espressione genica di geni selezionati sono stati misurati su campioni di sangue e cuore con Real-Time PCR (RQ valori sono riportati in Tabella XXVII e XXVIII; Figura 40 e 41). L'analisi per ogni campione è stata eseguita in triplice copia, e media e deviazione standard intra-campione e intra-gruppo sono state calcolate per confermare una buona correlazione dei nostri dati. E' stata effettuata inoltre l'analisi T-test tra i valori di RQ del gruppo di controllo e del gruppo di trattamento per i 7 geni del pannello. Un $P < 0,01$ è stato determinato per tutte le analisi T-test di dati quantificati in Real-Time. Solo IL1B nel tessuto cardiaco ha mostrato un $P < 0,05$. Tutti i valori dati sono stati identificati come inliers, infatti, abbiamo valutato anche il coefficiente di correlazione di Spearman al fine di escludere i dati anomali.

	Pla2g2a	Pla2g7	Gal	Il1b	Cebpb	Fcgr2b	Arntl	Acer2
Control group								
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0,933	0,694	0,7	0,85	0,78	0,73	1,26	1,8
3	0,854	0,637	3,95	0,59	0,64	1,12	1,03	0,65
4	0,813	0,635	3,9	0,86	0,91	0,95	1,9	0,48
5	1,096	0,578	2,4	0,67	0,57	0,64	1,4	1,2
6	0,682	0,618	1,2	0,88	0,47	0,76	1,1	0,74
7	0,883	0,594	1,3	1,02	0,58	0,94	0,87	0,67
8	0,67	0,516	0,69	0,68	0,72	0,98	1,12	0,76
9	0,864	1,04	1,3	1,16	0,75	0,92	1,66	0,87
10	1,15	0,767	1,17	0,72	0,64	0,45	0,77	1,47
Mean	0,89	0,71	1,76	0,84	0,71	0,85	1,21	0,96
SD	0,16	0,18	1,23	0,18	0,16	0,20	0,35	0,41
Treated group								
1	12,1	5,68	7,17	4,48	4,55	5,52	1,38	2,23
2	4,27	10,8	3,42	10,7	7,2	7,35	4,6	2,93
3	3,56	14,4	8,88	11,02	5,2	10,2	3,2	2,2
4	4,34	9,8	10,8	8,32	5	10	1,69	3
5	4,97	19,9	6,46	11,8	6,07	12,4	5,3	2,4
6	9,76	6,2	6,34	4,08	3,63	6,07	5,6	6,63
7	7,75	12,1	15,8	8,22	5,96	5,25	3	6,9
8	6,45	9,7	6,44	4,61	5,32	9,86	3,1	6,8
9	4,98	23,8	11,5	17,2	10,4	19,7	2,2	2,7
10	3,92	8,7	3,42	6,8	4,5	4,42	3,7	5,15
Mean	6,21	12,11	8,02	8,72	5,78	9,08	3,38	4,09
SD	2,83	5,81	3,83	4,10	1,90	4,57	1,44	2,03
	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>

Tabella XXVII. Valori RQ dei singoli animali determinati in Real-Time su Sangue

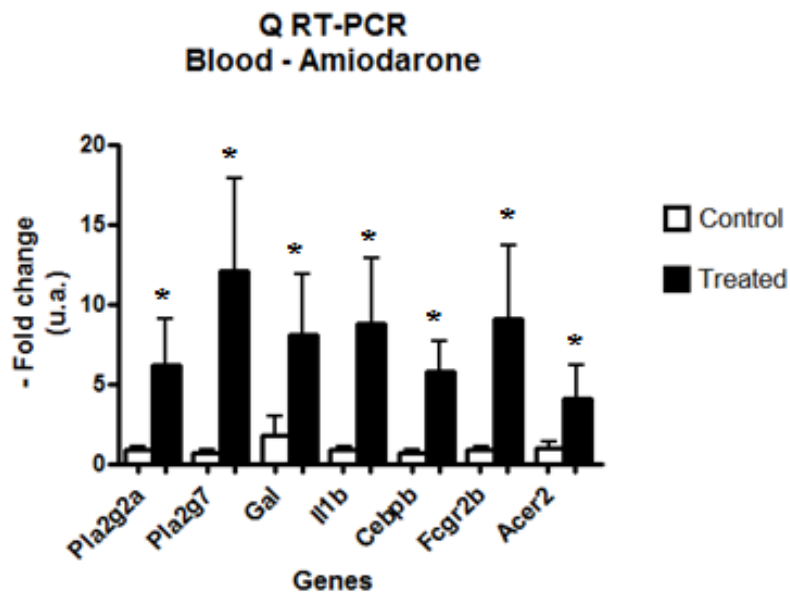


Figura 40. Valori RQ medi determinati in Real-Time su Sangue.

		Pla2g2a	Pla2g7	Gal	Il1b	Cebpb	Fcgr2b	Arntl	Acer2
Control group	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	0,865	1,07	0,505	1,026	1,219	1,04	1,48	1,5
	3	0,255	0,57	0,234	0,447	0,84	0,611	0,585	0,91
	4	0,893	0,524	0,563	0,637	0,858	0,97	1,47	1,03
	5	1,62	0,776	0,279	0,656	0,904	0,87	1,73	1,05
	6	0,33	0,754	0,511	1,567	1,01	1,33	2,14	1,35
	7	0,576	0,754	1,121	1,395	1,182	1,77	0,98	1,17
	8	0,541	1,178	0,548	1,243	1,749	1,29	1,51	1,31
	9	0,682	1,41	2,152	1,097	1,458	1,75	1,13	1,19
	10	2,44	0,565	2,89	0,791	0,787	1,32	0,87	1,28
Mean		0,92	0,86	0,98	0,99	1,10	1,20	1,29	1,18
SD		0,66	0,29	0,88	0,36	0,31	0,37	0,46	0,18
Treated group	1	6,067	4,025	94,1	0,7867	3,78	4,26	0,46	3,23
	2	6,185	2,343	31,1	3,7	4,101	4,03	0,49	2,28
	3	6,01	6,932	374,5	2,715	4,188	5,148	1,07	2,67
	4	3,858	3,33	141,8	3,713	3,83	6,36	1,55	2,84
	5	5,078	1,903	68,3	1,983	2,05	7,04	0,5	1,94
	6	9,991	2,014	90,4	2,071	2,15	4,88	0,6	2,13
	7	4,762	1,218	168	1,107	2,35	9,1	0,92	1,89
	8	5,623	2,497	48,9	1,845	3,44	6,26	0,95	1,98
	9	1,672	1,918	85,9	1,235	2,49	4,2	4,09	1,76
	10	3,354	1,334	47	0,796	1,74	2,38	0,2	1,43
Mean		5,26	2,75	115,00	2,00	3,01	5,37	1,08	2,22
SD		2,19	1,70	100,54	1,09	0,94	1,89	1,13	0,55
		<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,05</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,01</i>	<i>p<0,05</i>	<i>p<0,01</i>

Tabella XVIII. Valori RQ determinati in Real-Time su Cuore

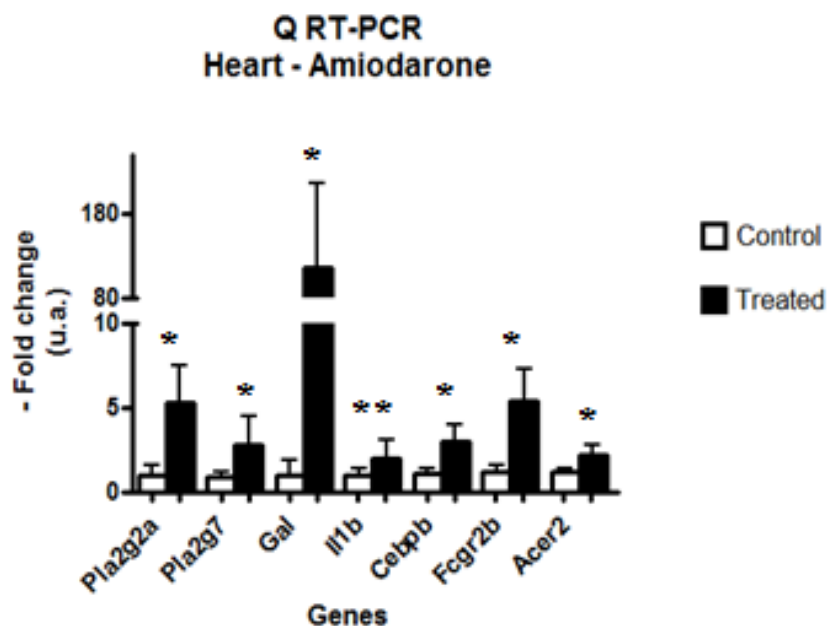


Figura 41. Valori RQ medi determinati in Real-Time su Cuore.

L'approccio tossicogenomico utilizzato in questo studio ha permesso di individuare una prima serie di marcatori molecolari della fosfolipidosi. Il pannello dovrebbe fornire un utile strumento per il monitoraggio dell'accumulo di fosfolipidosi nel cuore e / o nel sangue. La determinazione dei marcatori nel sangue ci permette di avere un sistema diagnostico non-invasivo e nei ratti senza necessariamente sacrificare quest'ultimi. Infine, l'accumulo di fosfolipidi nel tessuto cardiaco è stato osservato solamente con la nuova generazione di CAD e pochi studi tossicologici sono stati condotti in questo tessuto e l'identificazione di questi marcatori molecolari potrebbero rappresentare uno strumento innovativo per la diagnosi del PLD nel cuore di ratto.

4.5 Selezione geni di cardiotossicità

I risultati dell'analisi di espressione genica, tramite Microarray, sui campioni di RNA estratti dal cuore di ratti trattati con Isoproterenolo ha permesso di identificare 14 geni indotti e 62 inibiti. Questi geni codificano per lo più per proteine strutturali che possono essere identificate mediante esami di chimico-clinica, richiedendo una minore quantità di siero o plasma. Inoltre, i geni modulati, non risultano essere più precoci della troponina I cardiaca per la diagnosi di un 'danno' al miocardio. Tuttavia, i dati ottenuti, assieme alle informazioni bibliografiche effettuate, ci hanno spinto ad investigare su un marcatore appartenente ad un'altra classe di molecole di RNA, i *micro-RNA*.

Dalle informazioni raccolte, abbiamo rivolto la nostra attenzione verso un micro-RNA che presenta dei livelli di espressione ridotti o assenti nel tessuto cardiaco in condizioni fisiologiche: il ***microRNA 21***.

La modulazione del *miR-21* è stata valutata sui campioni di controllo e trattati con Isoproterenolo. Il miR-21 è un microRNA responsabile della 'sopravvivenza' dei Fibroblasti cardiaci in condizione di fibrosi, rimodellamento o disfunzioni cardiache. In condizioni di funzionalità normale del miocardio l'espressione del microRNA 21 viene inibita da Antagomir-21, il suo inibitore. In presenza di segnali di stress al miocardio, quali cambiamenti pressori, disfunzioni cardiache, ipertrofia, il microRNA viene espresso andando ad inibire un inibitore di un map-chinasi la cui azione è responsabile della sopravvivenza dei fibroblasti cardiaci.

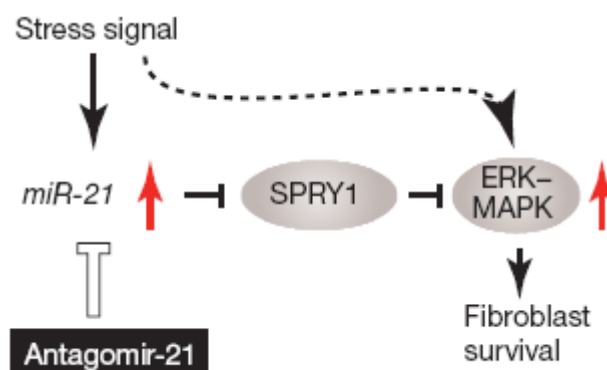


Figura 42. Meccanismo di azione di miR-21.

Le analisi in Real-Time, per valutare i livelli di espressione del micro-RNA 21, hanno evidenziato un up-regulation nei campioni di ratti trattati con Isoproterenolo. E' stato possibile osservare un fold-change di circa 3 tra il gruppo dei controlli e il gruppo dei trattati. Le figure sottostanti mostrano i valori di RQ determinati per singolo animale (Figura 43) e come media tra i due gruppi di trattamento (Figura 44).

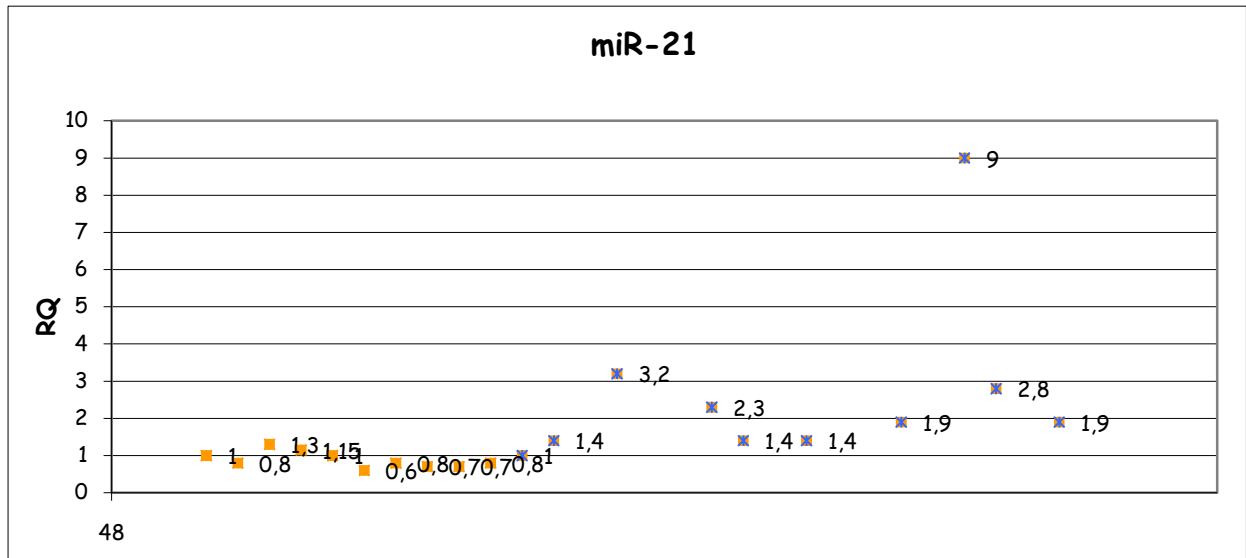


Figura 43. Valori RQ dei singoli campioni determinati in Real-Time su cuore.



Figura 44. Valori RQ medi determinati in Real-Time su Sangue.

5. CONCLUSIONI

Il progetto di ricerca ha permesso di identificare marcatori di cardiotoxicità e di fosfolipidosi.

Per quanto concerne la cardiotoxicità è stato possibile identificare il miR-21 come marcatore genetico. I risultati ottenuti dall'analisi del Microarray hanno permesso di rafforzare l'efficienza di miR-21 come gene-marcatore di disfunzioni e lesioni cardiache. Infatti, quasi tutti i geni identificati dall'analisi in Microarray, che prevedeva una valutazione della modulazione dei soli RNA messaggeri, codificano per proteine strutturali dei miocardiociti. Quindi, facilmente identificabili a livello di proteina, rispetto all'espressione genica, mediante test immunologici su sequenze amminoacidiche che richiedono meno campione e tempi di analisi più ridotti. A livello di proteine, invece, è stato possibile identificare un pannello di marcatori di lesione dei miocardiociti costituito dalla cTnI, cTnT, FABP3 e Myl3 mediante l'utilizzo della strumentazione MesoScaleDiscovery. Tale analizzatore richiede volumi di siero o plasma molto ridotti, e questo rappresenta un forte vantaggio quando si lavora con animali di piccola taglia. L'utilizzo del bioanalizzatore automatizzato ADVIA Centaur CP permette poi di aumentare la sensibilità di quantificazione della cTnI permettendo di identificare anche valori basali e piccole variazioni dell'analita. Infine, la determinazione dell'ANP, mediante kit elisa, permette di individuare cambiamenti funzionali a carico del cuore senza che avvenga una necrosi dei miocardiociti. La sua efficienza come marcatore è stata confermata mediante determinazione dell'ANP e della cTnI in ceppi di ratti normotesi e ipertesi.

Per quanto concerne la fosfolipidosi, l'analisi di espressione genica mediante l'utilizzo del Microarray dopo la somministrazione di Amiodarone, ha permesso l'identificazione di un pannello di 7 geni come marcatori dell'accumulo di fosfolipidi nel cuore e nel sangue. Tali geni sono identificabili e hanno presentato modulazioni significative, confermate in seguito in Real-Time, in entrambi i tessuti. In aggiunta, vi è la possibilità di utilizzare il sangue come tessuto surrogato per la diagnosi di un possibile accumulo di fosfolipidi nel cuore. Ciò permette il monitoraggio degli animali durante uno studio di tossicologia, che preveda la somministrazione di CAD, senza necessariamente richiedere il loro sacrificio.

6. RINGRAZIAMENTI

La ricerca e la preparazione della tesi sono state svolte presso i laboratori del Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università di Padova e presso i laboratori di Patologia Clinica&Molecolare della Direzione Safety Assessment di GlaxoSmithKline di Verona. Questa esperienza mi ha dato la possibilità di approfondire le conoscenze e le capacità lavorative e, soprattutto, di acquisire e sviluppare le principali caratteristiche di un ricercatore: lavoro in team, orientamento al risultato, capacità di organizzazione, gestione delle attività, entusiasmo, determinazione e autonomia.

Per questo, ringrazio il Prof. Mauro Dacasto per aver sostenuto questo progetto. Gli sono infine grato per la stima che mi ha sempre dimostrato.

Ringrazio la Dott.ssa Patrizia Cristofori che mi ha dato la possibilità di inserirmi nell'azienda; la ringrazio inoltre per il supporto, la supervisione, la costante disponibilità e cortesia avute nei miei confronti.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Mery Giantin per i consigli, la disponibilità e il contributo alla preparazione della tesi; particolarmente preziose sono risultate le sue indicazioni e le aperture di ricerca che mi hanno costantemente guidato durante tutto lo svolgimento del lavoro.

Un particolare ringraziamento va a Luca Vandin e la Dott.ssa Federica Crivellente per la preziosa collaborazione offerta in ogni momento per la realizzazione di questa ricerca e per l'aiuto e l'incoraggiamento in alcuni momenti difficili.

Voglio infine esprimere la mia gratitudine al Prof. Luca Bargelloni e alla Dott.ssa Serena Ferrareso (Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università di Padova) per il valido contributo nell'approfondimento delle conoscenze applicative del Microarray.

7. BIBLIOGRAFIA

Anderson N., Borlak J. (2006) drug-induced phospholipidosis. *Febs lett.* **580**(23):5533-40.

Atienzar F., Gerets H., Dufrane S., Tilmant K., Cornet M., Dhalluin S., Ruty B., Rose G., and Canning M. (2006). Determination of phospholipidosis potential based on gene expression analysis in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.* **96**, 101–114.

Apple F.S., Falahati A-, Paulsen P.R., Miller E.A., Sharkey S.W. 1997. Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin Chem*; **43**:2047–51.

Bandyopadhyay S., Klaunig J.E., Somani P. 1990. Cytotoxic interactions of cardioactive cationic amphiphilic compounds in primary rat hepatocytes in culture. *Hepatology*, **12** (1): 48-58.

Borowski G.D., Garofano C.D., Rose L.I. et al. 1985. Effect of long-term amiodarone therapy on thyroid hormone levels and thyroid functions. *American Journal of Medicine*, **78**: 443-450.

Burlina A, Zaninotto M, Secchiero S, Rubin D, Accorci F. 1994. Troponin T as a marker of ischemic myocardial injury. *Clin Biochem* **27**:113–21.

Bustin S.A., Nolan T. 2004 Pitfalls of quantitative Real Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, **15**: 155-166.

Bustin S.A., Mueller R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, **109**: 365-379.

Carraro L., Ferraresso S., Cardazzo B., Romualdi C., Montesissa C., Gottardo F., Patarnello T., Castagnaro M., Bargelloni L. (2009) Expression profiling of skeletal

muscle in young bulls treated with steroidal growth promoters. *Physiol Genomics*. **38** (2): 138 – 148.

Cartwright M., Janet Petruska J., Arezzo J., Frank D., Litwak M., Morrissey R., MacDonald J. and Thomas E. Davis T. (2009) Phospholipidosis in Neurons Caused by Posaconazole, without Evidence for Functional Neurologic Effects. *Toxicol Pathol* **37**: 902-910.

Casartelli A., Bonato M., Cristofori P., Crivellente F., Dal Negro G., Masotto I., Mutinelli C., Valko K., and Bonfante V. (2003). A cell-based approach for the early assessment of the phospholipidogenic potential in pharmaceutical research and drug development. *Cell Biol. Toxicol.* **19**,161–176.

Charness M.E., Morady F. & Scheinman M.M: Frequent neurology toxicity associated with amiodarone therapy. *Neurology* 1984, **34**: 669-671.

Chen G.L., Sutrina S.L., Frayer K.L., Chen W.W. 1986. Effects of lysosomotropic agents on lipogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **245**: 67-75.

Contran R.S., Kumar V., Robbins S.L. 1994 Genetic disorders. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 5[^] edizione: 138-143. Editori: Contran R.S., Kumar V., Robbins S.L. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA.

Edwards DR., Denhardt DT. 1985. A study of mitochondrial and nuclear trascription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Experimental Cell Research*, **157**: 127-143.

Fanger N.A., Wardwell K., Shen L., Tedder T. F., Guyre P. M.. (1996) Type I (CD64) and Type II (CD32) Fcy Receptor-Mediated Phagocytosis by Human Blood Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, **157**, 541-548.

Fredman P., Klinghardt G, Nilsson T. and Vennerholm L (1982) Lipid accumulation in liver, spleen, lungs and kidneys of miniature-pigs after chloroquine treatment. *Biochem. J.* **201**, 581-588

Gibson U., Heid C., Williams P. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, **6**: 995.

Gilbert S. F. 2000. *Genes and development: Techniques and ethical issues. Developmental Biology, parte1: Principles of development in biology cap.4*,. Editore: Sinauer Associates, INC., Publishers.

Giles J., Hardick J., Yuenger J., Dan M., Reich K., Zenilman J. 2004. Use of Applied Biosystem 7900HT Sequence Detection System and TaqMan Assay for Detection of Quinolone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** numero 7: 3281-3283.

Gizinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, **30**:503-512.

Glasel J.A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Bio Techniques*, **18**: 62-63.

Gregersen S., Stefan Lindskog S., Land T., Langel U., Bartfai T., Ahren B. 1993. Blockade of galanin-induced inhibition of insulin secretion from isolated mouse islets by the non-methionine containing antagonist M35. *European Journal of Pharmacology*. **232**, 35-39.

Grimm D, Elsner D, Schunkert H et al. 1998. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*; **37**:91–100.

Halliwell, W. H. (1997). Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicol. Pathol.* **25**, 53–60.

Hashimoto J.G., Beadles-Bohlig A.S. Wiren K.M. 2004. Comparison of RiboGreen® and 18S rRNA Quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *Bio Techniques*, **36**: 54-60.

Hiroshi S., Takami K., Asahi S. 2005. A Toxicogenomic Approach to Drug-Induced Phospholipidosis: Analysis of Its Mechanism and Establishment of a Novel *in Vitro* Screening System. *Toxicological Sciences*, **83**: 282-292.

Honegger, U. E., Zuehlke, R. D., Scuntaro, I., Schaefer, M. H., Toplak, H., and Wiesmann, U. N. (1993). Cellular accumulation of amiodarone and desethylamiodarone in cultured human cells. Consequences of drug accumulation on cellular lipid metabolism and plasma membrane properties of chronically exposed cells. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 349–356.

Horn J.W., Jensen C.B., White S.L., Laska D.A., Novilla M.N., Giera D.D., Hoover D.M. (1996) *In vitro* and *in vivo* ultrastructural changes induced by macrolide antibiotic LY281389. *Fund. Appl. Toxicol.* **32**:205-216.

Hostetler K. Y., and Matsuzawa Y. (1981). Studies on the mechanism of drug-induced lipidosis. Cationic amphiphilic drug inhibition of lysosomal phospholipases A and C. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1121–1126.

Hostetler K.Y., Giordano J.R., Jellison E.J. (1988) *In vitro* inhibition of lysosomal phospholipase A of rat lung by amiodarone and desethylamiodarone. *Biochim Biophys Acta.* **959**, 316-321.

Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. 2005. Real-Time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*: 1-6.

Ingram D.V. 1983. Ocular effects in long terms amiodarone therapy. *American Heart Journal*, **106**: 902-905.

Jane D., William A. Neville, Aubrey S., Adam M., Michael S. Leonard and Catherine J. Waterfield (2004) Phenylacetyl glycine, a putative biomarker of phospholipidosis: Its origins and relevance to phospholipid accumulation using amiodarone treated rats as a model. *Biomarkers.* **9**(3):271-90.

Jones L.J., Yue S.T., Cheung C.-Y., Singer V.L. 1998. RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization. *Analytical Chemistry*, **265**: 368-374.

Jonnalagedda S. M. S., Hong P., Venkataraman (1997) K. Role of Oxidative Stress in Amiodarone-induced Toxicity. *J CARDIOVASC PHARMACOL THER.* **2**: 53-59.

Joshi U.M., Rao P., Kodavanti S., Coudert B., Dwyer T.M., Mehendale H.M. 1988. Types of interaction of amphiphilic drugs with phospholipids vesicles. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, **246**: 150-157.

Joshi U.M., Mehendale H.M. 1989. Drug-induced pulmonary phospholipidosis. *Comm. Toxicol.*, **3**: 91-115.

Kannan R., Sarma J.S.M. , M. Guha M. and Venkataraman K. (1991) Amiodarone toxicity : Desethylamiodarone-induced phospholipidosis and ultrastructural changes during repeated administration in rats. *Fundamental and Applied Toxicology.* **16** (1), 103-109.

Kodavanti U.P., Mehendale H.M. 1990. Cationic amphiphilic drugs and phospholipidic storage disorder. *Pharmacology Reviews*, **42**: 327-354.

Kubo M., Gardner M.F., Hostetler K.Y. 1986. Binding of propranolol and gentamicin to small unilamellar phospholipids vesicles. Contribution of ionic and hydrophobic forces. *Biochemical Pharmacology*, **27**: 1103-1108.

Kushel M.: Analysis of total RNA using the Agilent 2100 Bioanalyzer and the RNA 6000 LabChip® kit. Http: www.agilent.com/chem/labonachip_2000, pubblicazione numero 5968-7493E.

Kushel M., Ausserer W.: Characterization of RNA quality using the Agilent 2100 Bioanalyzer. Http: www.agilent.com/chem/labonachip_2000, pubblicazione numero 5980-0472E.

Laurent G., Carlier M.B., Rollman B., Van Hoof F., Tulkens P. (1982) mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *biochem pharmacol.* **31**(23):3861-70.

Lee , Oh, Park, Kim, Lee, Kim, Kwon and Yoon (2010) Simultaneous gene expression signature of heart and peripheral blood mononuclear cells in astemizole-treated rats. *Arch Toxicol.* **84**(8):609-18.

Mao C., L. M. Obeid L. M. (2008) Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**, 424–434.

Martinon F., Burns K., Tschopp J.. (2002) The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell.* **10**, 417–426.

Monteith D.K., Morgan R.E., Halstead B. (2006) In vitro assays and biomarkers for drug-induced phospholipidosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **2**, 687-696.

Nioi P., Perry B.K., Wang E., Gu Y., Snyder R. (2007) In vitro detect of drug-induced phospholipidosis using gene expression and fluorescent phospholipidosis-based methodologies. *Toxicological sciences.* **99**(1), 162-173.

O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML et al. 1997. Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sci*; **47**:486–95.

O'Leary J.J., Sheils O., Martin C., Crowley A. 2003. TaqMan Technology and Real-Time Chain Reaction. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Editore: Crocker J., Murray P.G. Wiley J. & Sons, capitolo **12**: 251-268.

Ohkuma S., Poole B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Luglio, **75** (7): 3327-3331.

Overbergh L., Valckx D., Waer M., Mathieu C. 1999. Quantitation of murine cytokine mRNAs using Real Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR. *Cytokine* (Aprile), volume **11** numero 4: 305-312.

Overbergh L., Giulietti A., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2003. The use of Real-time Reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of Biomolecular Techniques*, **14**: 33-43.

Pahl A., Brune K. 2002. Stabilization of Gene Expression Profiles in Blood after Phlebotomy. *Clinical Chemistry*, **48** numero 12: 2251-2253.

Rainen L., Oelmueller U., Jurgensen S., Wyrich R., Ballas C., Schram J., Herdman C., Bankaitis-Davis D., Nicholls N., Trollinger D., Tryon V. 2002. Stabilization of mRNA expression in whole blood sample. *Clinical Chemistry*, **48**: 1883-1890.

Rapley R., Heptinstall J. 1998. UV Spectrophotometric Analysis of Ribonucleic Acids. *Methods in Molecular Biology*, **86**: 65-68.

Reasor M J, Kenneth L H (2006) Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert Opinion Drug Saf.* **4**: 567-583.

Reasor M.J., Hasting K.L., Ulrich R.G. (2006) Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert Opin Drug Saf.* **5**, 567-583.

Reasor, M. J., and Kacew, S. (2001). Drug-induced phospholipidosis: Are there functional consequences? *Exp. Biol. Med.* **226**, 825–830.

Reasor M.J., McCloud C.M., Beard T.L., Ebert D.C., Kacew S., Gardner M.F., *et al.* (1996) Comparative evaluation of amiodarone-induced phospholipidosis and drug accumulation in Fisher-344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicology*. **106**, 139-147.

Reasor, M. J. (1989). A review of the biology and toxicologic implications of the induction of lysosomal lamellar bodies by drugs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **97**, 47–56.

Sawada H., Takami K., Asahi S. (2005) A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system. *Toxicological sciences*. **83**, 282-292.

Shaikh N.A., Downar E., Butany J. (1987) Amiodarone – an inhibitor of phospholipase activity: a comparative study of the inhibitor effect of amiodarone, chloroquine and chlorpromazine. *Mol Cell Biochem*. **76**, 163- 172.

Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G., Gorn V., Singer M.J., Reed M.W. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, **285**: 194-204.

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, **7**: 3.

Spijker S., Houtzager S.W., De Gunst M., De Boer W.P., Schoffelmeer A.N., Smith A.B. 2004. Morphine exposure and abstinence define specific change of gene expression in the rat nucleus accubens. *The FASEB Journal*, **18**: 848-850.

Spijker S., Van de Leemput J. C. H, Hoekstra C., Boomsma D.I., Smit A.B. 2004. Profiling gene expression in whole blood sample following an in-vitro challenge. *Twin Research*, **7**: 564-570.

Strachan T., Red A.P. 1999. PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis. *Human Molecular Genetics* 2 cap.6,. Editore: Fran Kingston.

Suzuki m. and O'neal rm. (1964) Accumulation of lipids in the leukocytes of rats fed atherogenic diets. *J lipid res*. **5**:624–627

Tyagi S., Kramer F.R. 1996. Molecular beacons: probes that fluorescence upon hybridization. *Nature Biotechnology*, **14** (3):303-308.

Vitale D.: The Total RNA Story. [Http: www.agilent.com/chem/labonachip](http://www.agilent.com/chem/labonachip) 2001, pubblicazione numero 5988-2281EN.

Winer J., Jung CK., Shackel I., Williams PM. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry*, **270**: 41-49.

Wladyslawa A.D. and J.W. 1997. Contribution of lysosomal trapping to the total tissue uptake of psychotropic drugs. *Pharmacology and Toxicology Journal*, **80**: 62-68.

Xia Z., Ying G., Hansson A.L., Karlsson H., Xie Y., Bergstrand A., DePierre J.W., Nassberger L. 2000. Antidepressant-induced lipidosis with special reference tricyclic compounds. *Progress in Neurobiology*, **60** (6): 501-512.

Yin J.L., Shackel N.A., Zekry A. et al. 2001. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and Cell Biology*, **79**: 213-221.

Yeager JC, Iams SG. 1981. The hemodynamics of isoproterenol-induced cardiac failure in rats. *Circ Shock*; **8**:151–163.