



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Capitani Silvano

IPOACUSIA NEUROSENSORIALE E DANNO ISCHEMICO.
MESSA A PUNTO DI UN MODELLO ANIMALE PER VALUTARNE
GLI EFFETTI VASCOLARI E OSSIDATIVI.

Settore Scientifico Disciplinare MED/32

Dottorando

Dott. Olivetto Elena

Tutore

Prof. Granieri Enrico

Tutore

Prof. Martini Alessandro

Tutore

Dott. Astolfi Laura

Anni 2010/2012

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1. LA COCLEA	6
1.1.1 La componente sensoriale: l'organo del Corti	8
1.1.1.1 <i>Pressione e volume dei fluidi labirintici</i>	9
1.1.2 La componente neuronale: il ganglio spirale	10
1.1.3 Trasduzione e trasmissione del suono	11
1.1.4 La Componente Vascolare.....	12
1.1.4.1 <i>Microcircolazione dell'orecchio interno</i>	12
1.1.4.2 <i>Regolazione del flusso sanguigno cocleare</i>	14
1.1.4.3 <i>Stria vascolare ed endolinfa</i>	15
1.2 IPOACUSIA	17
1.2.1 Ipoacusie di tipo traumatico: ischemia	18
1.2.2 Ipoacusia di tipo traumatico: danno da rumore	20
1.2.2.1 <i>Effetti ototossici del trauma acustico</i>	20
1.2.3 Ipoacusia di tipo citotossico: ototossicità da cisplatino	22
1.2.3.1 <i>Effetti ototossici del cisplatino</i>	26
1.3 INDAGINI UTILI A DESCRIVERE I DANNI UDITIVI.....	26
1.3.1 Elettrofisiologia: potenziali Evocati Uditivi Del Tronco Encefalico.....	27
1.3.2 studio dei pathways: ossidazione.....	29
1.3.3 Studio dei pathways: coagulazione	31
1.3.4 Studio dei pathways: ipossia	33
1.3.5 Studio dei pathways: apoptosi	34
1.3.5.1 <i>Via estrinseca o recettoriale</i>	35
1.3.5.2 <i>Via intrinseca o mitocondriale</i>	36
1.4 SCOPO DEL LAVORO	39
2. MATERIALI E METODI	41
2.1 MODELLO ANIMALE	41
2.2 DISEGNO SPERIMENTALE.....	41
2.3 VERIFICA DELLA CAPACITÀ UDITIVA: REGISTRAZIONI ABR	42
2.4 INDUZIONE DEL DANNO UDITIVO	43
2.4.1 Microchirurgia coronarica e carotidea	43
2.4.2 Danno da rumore	44
2.4.3 Somministrazione del cisplatino	44
2.5 VERIFICA DEL DANNO	45
2.5.1 Real Time PCR.....	45
2.5.2 Istologia	47
2.5.2.1 <i>Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina</i>	48
2.5.2.2 <i>Immunoistochimica</i>	49
2.6 Statistica	51
3 RISULTATI	52

3.1 ISCHEMIA CAROTIDEA	52
3.1.1 RegISTRAZIONI ABR	52
3.1.2 Real Time PCR.....	52
3.1.2.1 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	52
3.1.2.2 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α e JNK</i>	53
3.1.2.3 <i>Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB</i>	53
3.1.3 Istologia	53
3.1.3.1 <i>Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina</i>	53
3.1.3.2 <i>Analisi strutturali: NF200 e MYH-6</i>	54
3.1.3.3 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	54
3.1.3.4 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α, JNK e pJNK</i>	55
3.1.3.5 <i>Apoptosi: cyt-c</i>	55
3.2 INFARTO	56
3.2.1 RegISTRAZIONI ABR	56
3.2.2 Real Time PCR.....	56
3.2.2.1 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	56
3.2.2.2 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α e JNK</i>	57
3.2.2.3 <i>Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB</i>	57
3.2.3 Istologia	57
3.2.3.1 <i>Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina</i>	57
3.2.3.2 <i>Analisi strutturali: NF200 e MYH-6</i>	57
3.2.3.3 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	58
3.2.3.4 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α, JNK e pJNK</i>	58
3.2.3.5 <i>Apoptosi: cyt-c</i>	59
3.3 RUMORE	59
3.3.1 RegISTRAZIONI ABR	59
3.3.2 Real Time PCR.....	60
3.3.2.1 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	60
3.3.2.2 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α e JNK</i>	60
3.3.2.3 <i>Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB</i>	60
3.3.3 Istologia	60
3.3.3.1 <i>Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina</i>	60
3.3.3.2 <i>Analisi strutturali: NF200 e MYH-6</i>	61
3.3.3.3 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	61
3.3.3.4 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α, JNK e pJNK</i>	62
3.3.3.5 <i>Apoptosi: cyt-c</i>	62
3.4 CISPLATINO	62
3.4.1 RegISTRAZIONI ABR	62
3.4.2 Real Time PCR.....	63
3.4.2.1 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	63
3.4.2.2 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α e JNK</i>	63
3.4.2.3 <i>Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB</i>	63
3.4.3 Istologia	63
3.4.3.1 <i>Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina</i>	63

3.4.3.2 <i>Analisi strutturali: NF200 e MYH-6</i>	64
3.4.3.3 <i>Danno vascolare/coagulativo: TF e TM</i>	64
3.4.3.4 <i>Danno ipossico e ossidativo: HIF-1α, JNK e pJNK</i>	64
3.4.3.5 <i>Apoptosi: cyt-c</i>	65
4. DISCUSSIONE	66
4.1 Ischemia	66
4.2 Infarto	68
4.3 Rumore	70
4.4 Cisplatino	71
4.5 Confronti	73
5. CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI	75
6. GRAFICI E TAVOLE	76
7. BIBLIOGRAFIA	128

1. INTRODUZIONE

La sordità è una patologia sempre più diffusa, la WHO (World Health Organization) segnala che al 2005 più di 278 milioni di persone nel mondo ne sono affette. Solo in Italia è stato stimato dall'Associazione Italiana per la Ricerca sulla Sordità, che gli ipoacusici sono circa sette milioni di persone (\pm il 12 %, dati aggiornati al 2008), tra cui più di mezzo milione di adulti affetti da sordità invalidante e oltre mille nati all'anno con sordità congenita; questo causa difficoltà nell'integrazione nel mondo del lavoro per gli adulti e impedisce ai bambini un normale sviluppo del linguaggio (Fekete, 1999).

Considerando che i costi sostenuti per le terapie sono molto alti (negli Stati Uniti d'America si aggirano intorno a 154-186 miliardi di dollari l'anno) si deduce che l'aspettativa sociale per lo sviluppo di nuovi trattamenti per la perdita di udito è consistente e le patologie che portano a danni uditivi sono sempre più studiate sia dalla ricerca clinica che di base. Numerosi report clinici descrivono che nei pazienti affetti da sordità, essa può avere cause genetiche, legate all'invecchiamento o all'esposizione al rumore o a sostanze ototossiche la cui eziologia può essere attribuita a danni vascolari, traumi, neoplasie, infezioni o risposta autoimmune. Tutti questi fattori possono essere ricondotti a un'alterazione del microcircolo cocleare con conseguente ipossia, e, dato che le cellule cigliate e i neuroni cocleari danneggiati non sono in grado di rigenerarsi, la perdita uditiva che ne consegue è irreversibile.

Dal punto di vista morfologico l'apparato uditivo è composto da tre parti: l'orecchio esterno, l'orecchio medio e l'orecchio interno. L'orecchio esterno è formato dal padiglione auricolare, dal condotto uditivo esterno e dalla membrana timpanica. Tale struttura ha la funzione di far convogliare le vibrazioni sonore verso l'orecchio interno e di aumentarne l'intensità. L'orecchio medio, che si connette con l'orecchio interno attraverso le finestre rotonda e ovale, è costituito dalla tuba d'Eustachio e da una cavità (cassa del timpano) dove alloggiavano i tre ossicini costituenti la catena ossiculare (martello, incudine e staffa). La catena ossiculare amplifica le vibrazioni prodotte dalle onde sonore sulla membrana del timpano per trasmetterle all'orecchio interno. Quest'ultimo è formato dagli apparati cocleare e vestibolare: la coclea è deputata

1. Introduzione

all'acquisizione del suono e i canali semicircolari sono deputati al controllo dell'equilibrio (Grandori e Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi e Ricci, 1998) (Fig. 1.1).

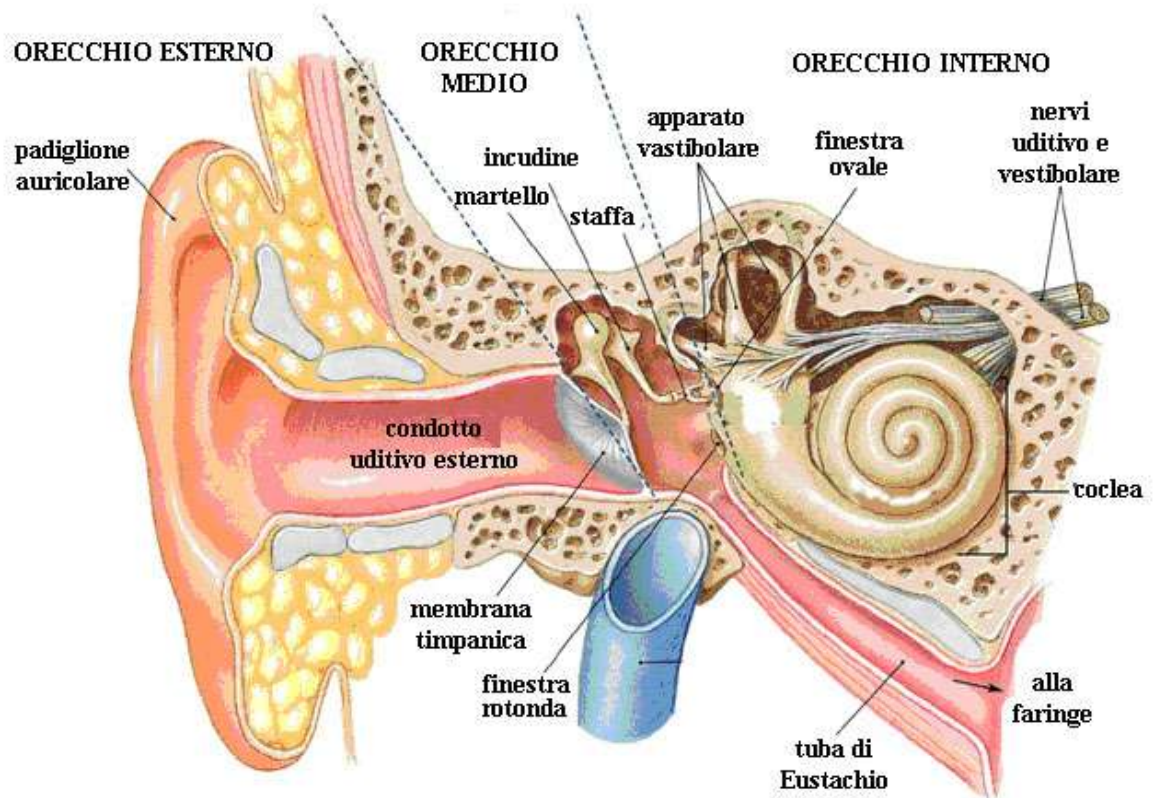


Figura 1.1 schema dell'apparato uditivo (da Simoni, 2009).

1.1. LA COCLEA

La coclea è una struttura a chiocciola lunga 35 mm che nell'uomo compie 2 giri e $\frac{3}{4}$ attorno ad una massa conica di tessuto fibroso, il modiolo. Essa è formata da un canale o labirinto osseo e da uno membranoso (interno al primo) che delimita una cavità detta condotto cocleare. Vista in sezione trasversale la coclea è divisibile in tre parti: la scala vestibolare, la scala media e la scala timpanica (Grandori e Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi e Ricci, 1998) (Fig.1.2).

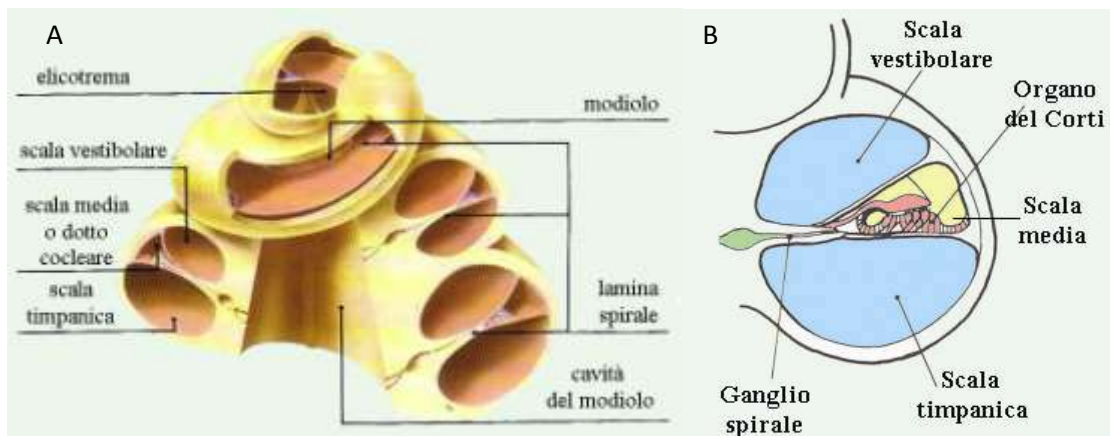


Figura 1.2 struttura della coclea. A: sezione trasversale della coclea; B: dettaglio del dotto cocleare (da Simoni, 2009).

La scala vestibolare e quella timpanica comunicano all'apice della coclea tramite un'apertura chiamata elicotrema e sono colme di perilinfa, un liquido con composizione ionica simile a quella del fluido extracellulare (alta concentrazione di Na^+ e bassa concentrazione di K^+).

La scala media o dotto cocleare è il vero e proprio labirinto membranoso, in sezione trasversale si presenta come un triangolo nel cui interno scorre l'endolinfa (simile al fluido intracellulare con bassa concentrazione di Na^+ e alta di K^+) e si trova l'organo del Corti (ODC). Il dotto cocleare è delimitato lateralmente dal ligamento spirale, composto da tessuto connettivo, che lo fissa alla parte esterna del labirinto osseo della coclea. Il ligamento è inoltre rivestito da tessuto altamente vascolarizzato, la stria vascolare. Superiormente la scala media è limitata dalla membrana del Reissner che unisce il ligamento spirale con la lamina spirale, mentre sotto l'ODC vi è la membrana basilare, questa ha proprietà che cambiano lungo la coclea, riducendo progressivamente la sua elasticità, è infatti corta e spessa alla base e lunga e stretta all'apice.

La membrana di Reissner, che separa la scala media dalla scala vestibolare, è composta da strati di cellule epiteliali e mesoteliali. La parte endoteliale è quella rivolta verso l'endolinfa, mentre quella mesoteliale è dal lato perilinfatico (Grandori e Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi e Ricci, 1998).

All'interno del modiolo, lungo il margine di attacco della lamina spirale scorre il canale del Rosenthal nel quale si trova un lungo ganglio nervoso, il ganglio spirale (GS) (Trevisi e Ricci, 1998) (Fig.1.2).

1.1.1 La componente sensoriale: l'organo del Corti

L'Organo del Corti (Fig.1.3) è la sede in cui ha luogo la trasduzione del segnale acustico (Sampaio e de Oliveira, 2006), è composto da cellule cigliate interne (IHC, inner hair cells), cellule cigliate esterne (OHC, outer hair cells) e cellule di supporto. I due tipi di cellule cigliate (HC, hair cells) hanno funzioni diverse, mentre le IHC svolgono la funzione sensoriale in senso proprio, le OHC possono cambiare le proprietà meccaniche della membrana basilare e dell'Organo del Corti permettendole di vibrare anche nel caso di un suono debole (Lim, 1986).

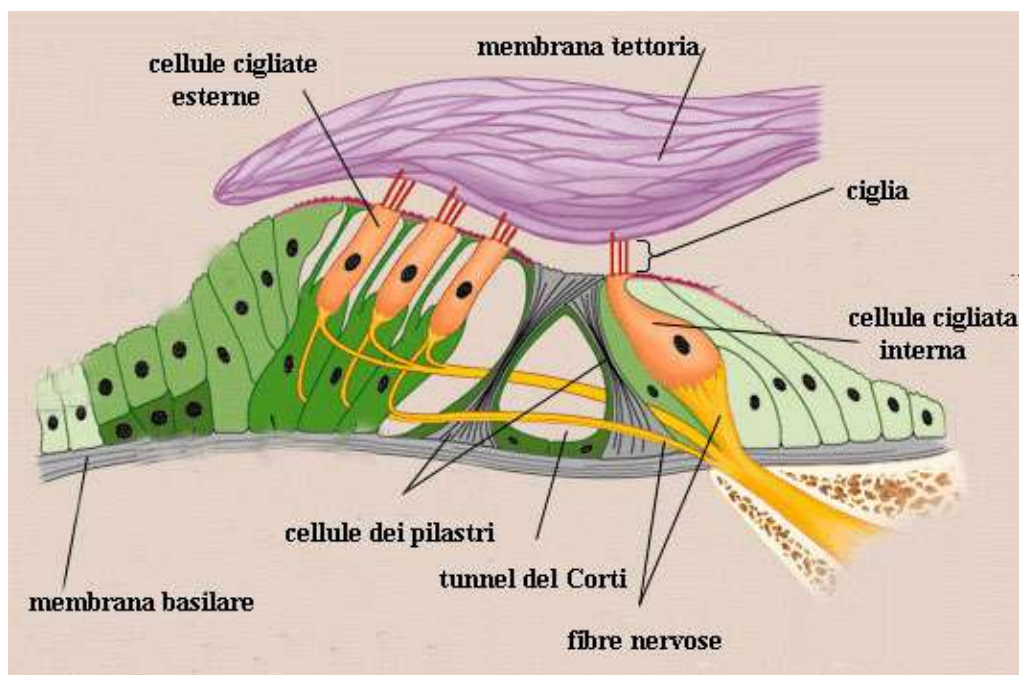


Figura 1.3 struttura dell'organo del Corti (Encyclopaedia Britannica Inc., 1997).

Le IHC hanno forma sferica con un nucleo centrale, e formano una singola fila lungo l'epitelio spirale sensoriale. Le stereociglia sono disposte a U nella superficie apicale della cellula e un ponte collega la più lunga di esse alla membrana tectoria. Le OHC

sono invece distribuite in tre file e hanno forma cilindrica e i loro nuclei sono localizzati nella parte basale della cellula. Sia alla base che all'apice cellulare sono interconnesse con le cellule di supporto. Le loro stereociglia sono disposte a W, formano tre o quattro file, e sono più larghe e più fine rispetto a quelle delle IHC. La membrana tectoria poggia sull'ODC ed entrando in contatto con le stereociglia gioca un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale (Sampaio e de Oliveira, 2006).

1.1.1.1 *Pressione e volume dei fluidi labirintici*

Il mantenimento della pressione a livelli fisiologici è molto importante nei fluidi cocleari, ma ci sono più fattori esterni che la possono influenzare, come la pressione del fluido cerebrospinale (CSF), dell'orecchio interno e la pressione arteriosa e venosa. La pressione del CSF è trasmessa attraverso l'acquedotto vestibolare alla perilinfa e può variare con respirazione, battito cardiaco, cambi posturali, tosse e starnuti (Rosingh et al., 1998).

Nell'uomo l'acquedotto agisce come un filtro che attenua le fluttuazioni dovute al CSF per frequenze sopra i 20 Hz, mentre non è in grado di attenuare frequenze più basse. L'acquedotto vestibolare è fondamentale per la normale fisiologia della pressione perilinfatica, infatti, se si verifica un'occlusione dell'acquedotto vestibolare, la pressione della perilinfa dipende totalmente dalla pressione sanguigna.

E' stato notato che la pressione endolinfatica non è diversa da quella perilinfatica e che è soggetta alle stesse fluttuazioni. Questo è molto importante per mantenere un'alta sensibilità allo stimolo acustico, perché una pressione differenziale andrebbe a diminuire la compliance della membrana basilare, è stato infatti dimostrato che la perilinfa trasmette all'endolinfa le variazioni pressorie attraverso la membrana che le separa (Salt, 2001).

Il volume della scala media deve rimanere costante. Si presume esista un sensore in grado di percepire l'entità del volume, l'equilibrio è mantenuto dalla secrezione e dal riassorbimento effettuati dall'epitelio della scala media, se si perde tale bilanciamento, si verifica un'espansione del compartimento endolinfatico (Salt, 2001).

Anche lo spazio intrastriale per essere mantenuto necessita di meccanismi secretori e di riassorbimento. L'accumulo di K^+ nel fluido intrastriale dovuto al fallimento del

rilascio di K^+ dalle cellule intermedie e alla secrezione dello stesso da parte delle cellule marginali potrebbe portare alla soppressione del potenziale endococleare.

1.1.2 La componente neuronale: il ganglio spirale

Nel modiollo è contenuto il ganglio spirale che è costituito dai corpi cellulari dei singoli neuroni afferenti. I loro assoni formano il nervo uditivo il quale assieme al nervo vestibolare costituisce il nervo acustico (VIII paio di nervi cranici) (Trevisi e Ricci, 1998). Il GS è simile ai gangli dei nervi cerebrospinali; dal punto di vista ultrastrutturale, in esso si riconoscono tre popolazioni di cellule, i neuroni di tipo I, II e III (Spoendlin 1972, 1973). I neuroni più numerosi sono quelli di tipo I (90-95%), grandi neuroni bipolari con nucleo rotondeggiante, nucleolo ben evidente e citoplasma ricco di reticolo endoplasmatico rugoso. Essi hanno terminazioni nervose ricoperte di mielina che perdono quando arrivano in prossimità dell'ODC. I neuroni di tipo II sono solo il 5% e sono più piccoli, sembrano essere neuroni pseudo-unipolari amielinici con il citoplasma ricco di neurofilamenti. I neuroni di tipo III (1%) sono simili a quelli di tipo I ma mancano di guaina mielinica (Grandori e Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi e Ricci, 1998).

Il 95% delle fibre nervose provenienti dal ganglio spirale prende contatto con le IHC, il restante 5% innerva le OHC (Spoendlin, 1972). Le cellule cigliate interne sono innervate da più fibre nervose per favorire una migliore discriminazione dei suoni; mentre più cellule cigliate esterne possono essere innervate da una sola fibra nervosa, per aumentare la sensibilità nel segnale. Le fibre dei neuroni di tipo I innervano principalmente le IHC, le cellule di tipo II invece innervano le OHC, infine, le cellule di tipo III collegano fra loro diverse cellule cigliate interne (Grandori e Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi e Ricci, 1998).

1.1.3 Trasduzione e trasmissione del suono

Le onde acustiche sono di tipo elastico e per essere trasdotte in segnali elettrici hanno bisogno di modificazioni meccaniche che permettano di amplificarle e di adattarne l'impedenza.

Le onde sono trasmesse dall'orecchio esterno e medio attraverso la finestra ovale alla scala vestibolare cocleare, generando delle onde fluide nella perilinfa, che durante questo percorso mettono in oscillazione la membrana basilare e nell'organo del Corti. Esse si propagano lungo la scala vestibolare raggiungendo l'apice cocleare e passano nella scala timpanica per poi dissiparsi quando raggiungono la finestra rotonda (Fig.1.4). La frequenza del movimento della membrana basilare è correlata alla frequenza dei suoni ed è il primo stadio della trasduzione. Il punto di maggiore spostamento della membrana basilare cambia in funzione della frequenza dello stimolo sonoro: alle basse frequenze lo spostamento massimo si verifica all'apice della coclea, alle alte frequenze verso la base (Grandori e Martini, 1995; Rossi; 1997; Trevisi e Ricci, 1998; Campbell 2004; Martini et al., 2011).

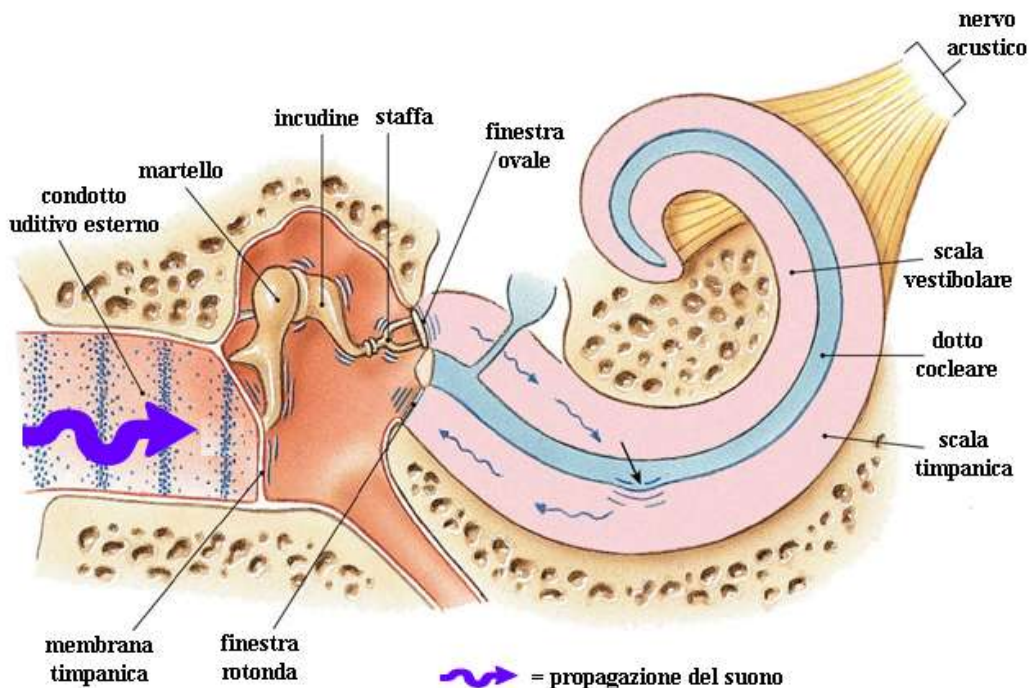


Figura 1.4 trasmissione del suono dall'orecchio esterno a quello interno (da Simoni, 2009).

La membrana tectoria sotto questo tipo di stimolo viene spinta in basso o in alto causando il movimento delle stereociglia delle HC, questo comporta la deformazione della loro membrana plasmatica con aumento della permeabilità cellulare agli ioni sodio. Il risultato è la depolarizzazione della cellula cigliata con il conseguente rilascio di neurotrasmettitori che giungono alle fibre nervose afferenti del ganglio spirale che le innervano; in questo modo un impulso meccanico viene trasdotto in uno elettrico, ovvero un potenziale d'azione che viene inviato alla corteccia uditiva attraverso la via nervosa ascendente (Grandori e Martini, 1995; Campbell, 2004).

1.1.4 La Componente Vascolare

La vascolarizzazione della coclea è molto sviluppata e molto complessa. I vasi sanguigni apportano il contributo metabolico necessario alle attività della coclea e sono inoltre molto sfruttati per la drug delivery.

Per mantenere un'adeguata perfusione di sangue, i vasi cocleari hanno meccanismi di regolazione molto fini che vengono attuati in diversi modi grazie a diversi attuatori del sistema simpatico e ai periciti posti sulle cellule endoteliali dei capillari.

La stria vascolare è un epitelio riccamente vascolarizzato e sembra essere responsabile della formazione del potenziale endococleare e della secrezione del K^+ dai suoi capillari all'endolinfa; è perciò fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cocleare.

1.1.4.1 Microcircolazione dell'orecchio interno

L'apporto ematico alle strutture cocleari è garantito dall'arteria labirintica, un ramo dell'arteria cerebellare anteriore inferiore (AICA), che assume il nome di arteria cocleare comune (ACC) nel suo ramo terminale. Dall'ACC si diramano tre vasi principali, l'arteria vestibolare inferiore, l'arteria vestibolo-cocleare e l'arteria spirale modiolare. L'arrivo del sangue al modiolare è garantito dall'arteria spirale modiolare, che nell'uomo irrori la parte apicale della coclea, mentre il giro basale è raggiunto dall'arteria vestibolococleare (Fig.1.5) (Axelsson e Ryan, 2001; Nakashima et al., 2001; Nakashima et al., 2003).

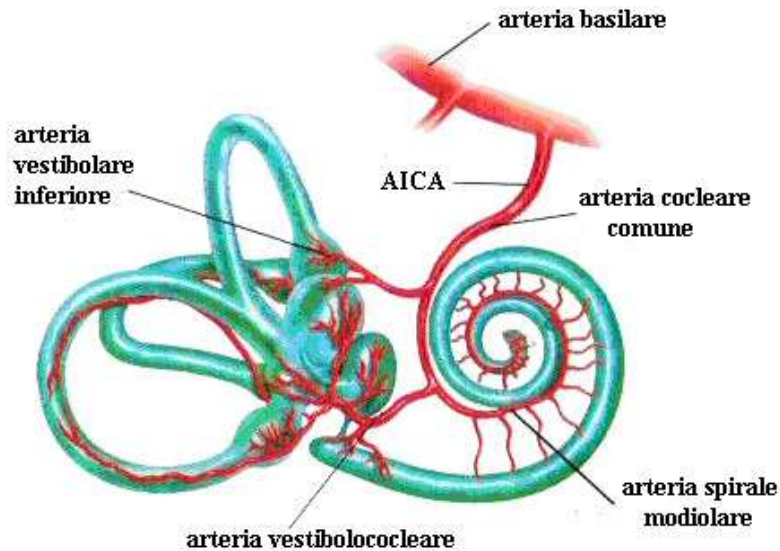


Figura 1.5 schema del microcircolo cocleare (da Casani et al., 2011; AICA = arteria cerebellare anteriore inferiore).

Le arterie sono tridimensionalmente ben separate dalle vene e formano due unità microvascolari: una nella parete laterale della coclea e una nella lamina spirale (Ritter, 1978). Le arteriole radiali (RALs, radiating arterioles) che nascono dall'arteria spirale modiolare seguono un percorso centrifugo che passa sopra la scala vestibolare e attraverso la lamina spirale.

Il drenaggio venoso è assicurato dalla vena spirale modiolare, che scende dall'apice alla base. Questa confluisce nella vena dell'acquedotto cocleare a livello del giro basale, e riceve il sangue dalle venule della scala timpanica, della lamina spirale e del modiolo (Harris et al., 1990).

E' interessante notare come il sistema venoso dell'uomo sia il più complesso tra i mammiferi, presenta, infatti, sistemi venosi separati per la scala timpanica e la scala vestibolare, che si dipartono spiralmente dal modiolo, mentre, ad esempio, nella cavia (importante modello animale per l'orecchio interno umano), esiste solo la vena spirale della scala timpanica. Il sistema venoso nell'uomo è anche più complesso del sistema arterioso, infatti, mentre la sola arteria labirintica irrora la coclea, il sistema venoso è composto dalla vena dell'acquedotto cocleare (VCAQ), la vena dell'acquedotto vestibolare e la vena del meato acustico interno (Nakashima et al., 2003).

Le venule collettrici (CVLs, collecting venules) decorrono in modo centripeto nella parete laterale e nella lamina spirale. Nella parete laterale, il sangue scorre dalla scala

vestibolare verso la scala timpanica e attraverso le reti capillari della stria vascolare verso la scala media. Nell'uomo e in molte altre specie animali, come bovini, cavie, maiali e ratti ci sono CVLs che arrivano fino allo spazio perilinfatico, tra la scala timpanica e il modiolo, e sono dette vene di sospensione (Kohllöffel, 1977; Tange e Bernard, 1981; Angelborg et al., 1984).

Nella parete laterale della scala media si trova la stria vascolare, formata da una ricca rete di capillari di piccolo calibro. La stria vascolare è irrorata da grandi RALs e drenata da CVLs. I capillari della stria vascolare sono composti solo da cellule endoteliali, senza presenza di cellule muscolari (Smith, 1951; Nakashima et al., 2003).

Nella parete laterale i capillari sono ricchi di periciti (Shi et al., 2008). Questi hanno processi citoplasmatici che integrano il segnale lungo il vaso, grazie a connessioni con le cellule endoteliali (Bergers e Song, 2005). Nella stria vascolare e nel ligamento spirale si ha un pericita ogni due cellule endoteliali, e il fatto che questo rapporto sia così elevato nella coclea rispetto agli altri distretti del corpo, sottolinea l'importanza di questa popolazione nell'orecchio interno (Shi et al., 2008). Questo tipo cellulare ha funzione contrattile, è multipotente e può differenziare in macrofagi, fagociti, fibroblasti e molti altri tipi cellulari (Sims, 2000; Dore-Duffy et al., 2006). E' da notare che alcune sue patologie sono state collegate all'eziopatogenesi di disturbi vascolari (von Tell et al., 2006; Shi, 2011).

1.1.4.2 Regolazione del flusso sanguigno cocleare

Il flusso sanguigno cocleare (CoBF, Cochlear Blood Flow) varia in funzione della domanda di ossigeno dei tessuti, ed è generalmente regolato con il controllo del diametro dei vasi, tramite la contrazione o la dilatazione delle cellule muscolari lisce. Una contrazione determina una diminuzione nel flusso sanguigno, mentre una dilatazione porta a un aumento del CoBF (Wangemann, 2002; Shi, 2011). Questa contrattilità è regolata da svariati meccanismi; i più rilevanti sono esercitati dalle fibre nervose simpatiche dell'arteria spirale modiolare (Rauchegger e Spoendlin, 1981; Brechtelsbauer et al., 1990; Carlisle et al., 1990) e dai periciti posti sulla superficie dei capillari che controllano in modo locale la perfusione (Peppiatt et al., 2006). Quest'ultimo effetto è garantito dalle proteine contrattili espresse dai periciti, actina e

tropomiosina, che conferiscono loro una vasocontrattilità sia *in vivo* quanto *in vitro* (Dai et al., 2009). Anche questa contrattilità può causare profonde modificazioni al CoBF, infatti, i lunghi processi citoplasmatici dei periciti si possono estendere lungo la rete capillare e si raggiungono vicendevolmente sulla superficie dei vasi, portando a modificazioni del loro diametro. Essi possono inoltre collegarsi per creare un “sistema a pompa” e regolare così direttamente il flusso sanguigno (Shi, 2011).

Peppiatt e colleghi hanno dimostrato che stimolando la retina con determinati neurotrasmettitori si provoca la costrizione dei capillari *in situ*, ed essendo che questa non si riscontra nelle aree prive di periciti, gli autori hanno confermato che questa azione è attuata dai periciti e non dalle cellule endoteliali. È stato inoltre notato che l’inibizione dell’influsso di Ca^{2+} porta alla dilatazione del diametro dei capillari e al conseguente aumento del flusso sanguigno (Peppiatt et al., 2006).

Il CoBF è regolato anche dai fibrociti della parete laterale della coclea. Si pensava che i fibrociti svolgessero solo la funzione di cellule di supporto, ma, recentemente, è stato provato che svolgono anche ruoli funzionali in condizioni fisiologiche e patologiche (Shi, 2011).

È stato dimostrato che i fibrociti, oltre a giocare un ruolo importante nel trasporto ionico (partecipano infatti alla generazione del potenziale endococleare mediante il riciclo del K^+), possono modificare il diametro dei capillari e il CoBF stimolando l’attività delle Cicloossigenasi 1 e il rilascio di molti metaboliti vasoattivi dell’acido arachidonico. Dai e Shi (2011) hanno rilevato che i fibrociti di tipo cinque, presenti nella zona sopra-striale, sono connessi ai capillari mediante i bottoni terminali e che l’aumento di Ca^{2+} in queste cellule causa vasodilatazione grazie alla propagazione del segnale del Ca^{2+} alle cellule vascolari (Shi, 2011).

1.1.4.3 Stria vascolare ed endolinfa

La stria vascolare, localizzata nella parete esterna del dotto cocleare, è un epitelio riccamente vascolarizzato ed è formato da tre tipi cellulari: cellule marginali, intermedie e basali (Fig.1.6). Le arteriole radiali della scala vestibolare sono responsabili dell’apporto sanguigno alla stria vascolare e la rete capillare è drenata dalle venule collettrici.

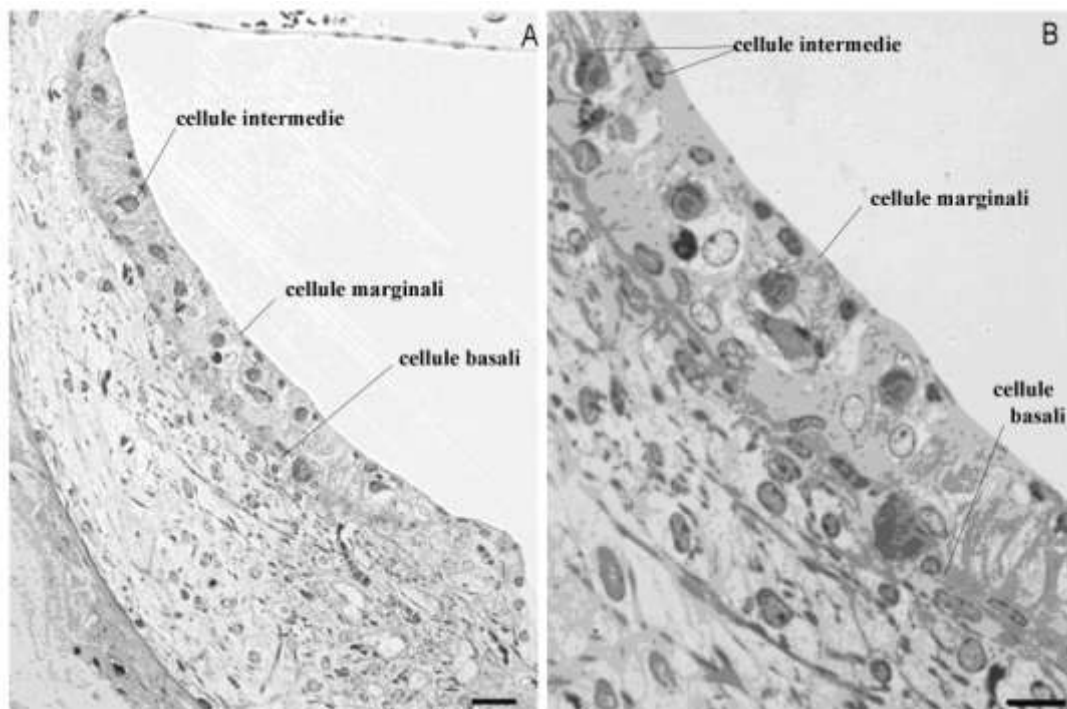


Figura 1.6 Stria vascolare di ratto da inclusione in resina che mostra i diversi tipi cellulari di cui è costituita (da Olivetto et al., 2012).

Le cellule marginali separano la stria dal dotto cocleare e giocano un ruolo chiave nella formazione dell'endolinfa e del potenziale endococleare (EP, il voltaggio positivo presente nel dotto cocleare che va dagli 80 ai 100 mV). Questo è dimostrato anche dalla loro morfologia che suggerisce un attivo trasporto ionico (Hibino et al., 2010).

Tra le cellule intermedie sono presenti capillari e uno spazio extracellulare detto intrastriale. Il meccanismo accettato per la formazione dell'EP è il modello a cinque compartimenti (Fig.1.7). In questo modello, nella membrana basolaterale delle cellule marginali, la Na^+/K^+ ATPase e il cotrasportatore Na-K-Cl (NKCC), per facilitare la diffusione di K^+ tramite i canali mantengono una bassa concentrazione di K^+ nel fluido intrastriale (Hibino et al., 2010).

E' stato documentato che il K^+ vascolare viene secreto nell'endolinfa dalle cellule della stria vascolare. Il K^+ passa dal compartimento perilinfatico ai fibrociti del ligamento spirale tramite una Na^+/K^+ -ATPase e arriva alle cellule basali della stria vascolare grazie a giunzioni gap, e quindi alle cellule intermedie e viene secreto nello spazio

1. Introduzione

intrastriale. Parte del trasporto è compiuta tramite il canale KCNJ10 (potassium inwardly-rectifying channel).

Il K^+ entra nel polo basolaterale delle cellule marginali mediante Na^+/K^+ -ATPase e NKCC. Dal polo apicale il K^+ è poi secreto dal canale KCNE1/KCNQ1 aiutato dal gradiente elettrochimico del K^+ (Wangemann, 2006).

Il potenziale endococleare può diventare negativo in caso di anossia, ipossia o trattamento con inibitori del trasporto ionico (Yamamoto e Makimoto, 1998).

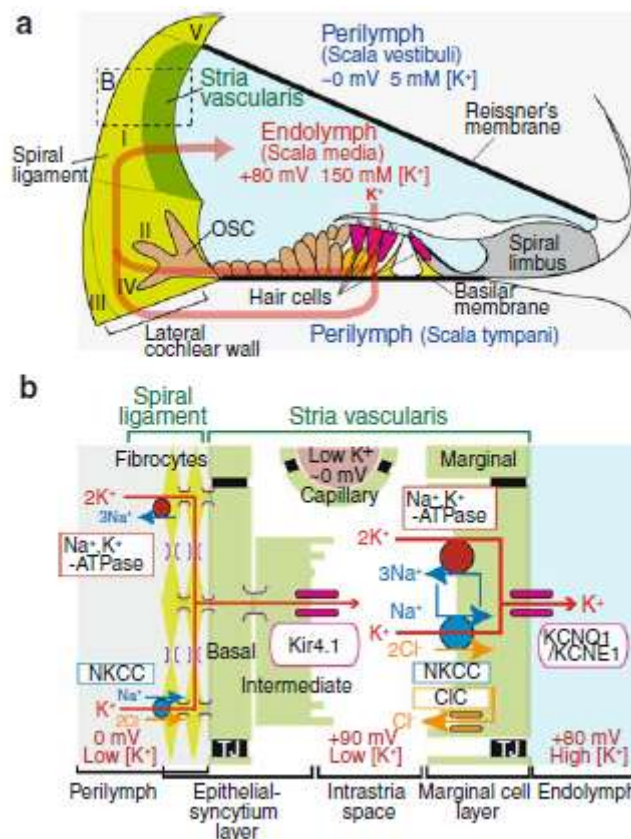


Figura 1.7 Meccanismo di formazione del potenziale endococleare: modello a cinque compartimenti (da Hibino et al., 2010).

1.2 IPOACUSIA

Una diminuzione unilaterale o bilaterale della capacità uditiva viene definita ipoacusia. Quando ci sono delle alterazioni a livello dell'orecchio esterno e medio si parla di ipoacusie di trasmissione o di conduzione, sono invece chiamate in generale neurosensoriali quando i deficit interessano l'orecchio interno (ipoacusie cocleari o di

percezione), le vie nervose e i centri cocleari (ipoacusie retro-cocleari o recettive), si possono, inoltre, avere delle ipoacusie miste (Rossi, 1997; Ekborn, 2003).

L'ipoacusia lieve o grave colpisce il 10% della popolazione mondiale e può essere dovuta a fattori congeniti ed ereditari che riguardano principalmente l'età infantile, o a fattori acquisiti che interessano anche l'adulto. Tra questi ultimi rientrano le forme tossiche endogene ed esogene, in particolare l'ipoacusia tossica esogena può essere dovuta a cause traumatiche, come l'ischemia, il rumore, le infezioni o può derivare da un danno citotossico (ad esempio dovuto ad utilizzo di farmaci ototossici). I farmaci ototossici sono sostanze che provocano la perdita o la disfunzione delle cellule uditive (cellule cigliate e neuroni), e causano un danno che può essere reversibile o irreversibile. Tra le sostanze ototossiche ci sono gli antibiotici, i diuretici, gli antimalarici, gli antinfluenzali, gli antineoplastici e altre sostanze come la nicotina, il cloroformio etc. (Rossi, 1997).

1.2.1 Ipoacusie di tipo traumatico: ischemia

Il termine ischemia indica i disturbi della circolazione sanguigna comportanti una riduzione dell'apporto di sangue e quindi di ossigeno ai tessuti. A differenza dell'ipossia, però (caratterizzata dalla sola carenza di ossigeno), nell'ischemia alla deprivazione di ossigeno si aggiunge anche la mancanza di glucosio e di altri nutrienti. L'ischemia può essere determinata da un'insufficienza generale della circolazione (shock, emorragie, arresto cardiaco), in questo caso provocando effetti su tutti i tessuti danneggiando maggiormente quelli che sono più sensibili alla riduzione dell'apporto di sangue. Nel caso in cui si manifesti localmente, ovvero circoscritta ad una parte dell'organismo, può dipendere da fenomeni che determinano un restringimento o un'occlusione del lume, come compressione dei vasi sanguigni, malattie della parete vasale (es. l'aterosclerosi), trombosi o embolie. Le conseguenze dell'ischemia dipendono dalla sua entità e dalla natura del tessuto interessato. Quando l'ischemia si manifesta improvvisamente ed è completa e permanente comporta la morte delle cellule nel tessuto colpito e la zona di tessuto morto prende il nome di infarto. Il danno ischemico porta inoltre all'attivazione delle cellule endoteliali che reclutano in loco

cellule infiammatorie circolanti come i neutrofili e i monociti, i quali una volta attivati rilasciano a loro volta grandi quantità di enzimi litici ma soprattutto possono essere fonte di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (King, 2008).

Ipossia e ischemia sono fattori che attivano importanti meccanismi di danno nell'orecchio interno, infatti, studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che l'ischemia può causare perdita di udito (Thorne e Nuttall, 1987; Scheibe et al., 1993, 1997; Lamm e Arnold, 1996; Orita et al., 2002). Si pensa inoltre che nell'eziologia di alcuni disturbi dell'udito, come ipoacusia improvvisa di tipo neurosensoriale indotta dal rumore e presbiacusia, siano coinvolte anche alterazioni nel flusso sanguigno.

Gli studi presenti in letteratura relativi alla perdita di cellule cigliate causata da ipossia e ischemia sono limitati e controversi. Shirane e Harrison (1987) hanno rilevato nel modello animale di cincillà sottoposto a ipossia disorganizzazione delle stereociglia e protrusioni citoplasmatiche nelle cellule cigliate. All'aumento del livello di ipossia questi cambiamenti avvenivano prima nelle cellule cigliate interne (IHC, inner hair cells) per poi diffondersi alle esterne (OHC, outer hair cells).

Cheng et al. (1999) in un esperimento *in vitro* hanno rilevato una diminuzione del numero di cellule cigliate nell'organo del Corti di ratto in seguito a dieci ore di ipossia. Tuttavia, in questo caso, sia IHC che OHC si erano dimostrate sensibili all'ipossia nello stesso modo, riportando una perdita delle ciglia che aumentava dall'apice verso la base. I fattori critici che potrebbero causare la perdita di cellule cigliate in ischemia sono poco conosciuti. Mazurek et al. (2003) hanno dimostrato che il deficit di glucosio non è sufficiente a causare perdita di cellule cigliate, mentre l'ipossia da sola può causare una perdita significativa in funzione del tempo di esposizione. Combinando la carenza di glucosio con quella di ossigeno aumenta drammaticamente la perdita di IHC e OHC. In topi knock-out per l'apolipoproteina E è stato visto che la presenza di placche aterosclerotiche può causare sordità, la quale tende a migliorare con il trattamento farmacologico delle placche stesse. Questi dati sono stati confermati da studi clinici sull'uomo, infatti, è stato visto che un inadeguato apporto di sangue dovuto all'aterosclerosi può essere una causa della perdita di udito nell'orecchio interno (Yoshioka et al., 2010).

1.2.2 Ipoacusia di tipo traumatico: danno da rumore

Il trauma acustico è per definizione l'esposizione a un rumore di intensità elevate, tale da determinare un danno uditivo. Il deficit uditivo che ne consegue può essere transitorio (TTS, temporary threshold shift) o permanente (PTS, permanent threshold shift). Il TTS è dovuto a un'esposizione a rumore intenso anche di breve durata che si risolve del tutto in poche ore, il PTS è invece irreversibile ed è causato da un'esposizione prolungata a rumore con intensità maggiore di 75 dB o da brevi ma ripetute esposizioni a rumori di maggiore intensità.

Il danno si manifesta quasi esclusivamente a livello cocleare, solo esposizioni a intensità maggiori di 120 dB possono portare ad altri tipi di danno quali lacerazioni della membrana timpanica o lussazioni della catena ossicolare. Inizialmente si manifesta con alterazioni morfologiche a carico delle cellule cigliate esterne, le quali possono successivamente andare incontro ad apoptosi o necrosi. Il danno si diffonde dalla prima fila di OHC, alla base, alle altre due file, per estendersi infine alle IHC.

Dopo un trauma acustico, le lesioni dell'ODC responsabili del TTS sono caratterizzate dalla deformazione delle cellule di sostegno e dal disaccoppiamento tra stereociglia e membrana tettoria (Grandori e Martini; 1995); mentre quelle all'origine dei PTS sono dovute alla perdita di cellule cigliate e di fibre uditive afferenti sulla zona frequenziale interessata (Grandori e Martini; 1995).

1.2.2.1 Effetti ototossici del trauma acustico

L'esposizione a rumori intensi induce *stress ossidativo* e può provocare ischemie cocleari che possono causare lesioni vascolari.

Henderson e collaboratori (2006) hanno dimostrato come l'esposizione al rumore porti non solo a un aumento della funzione mitocondriale, causando la produzione di ROS e la morte cellulare dell'ODC tramite necrosi o apoptosi (Hu et al.; 2000, Nicotera et al.; 2002), ma anche alla riduzione del flusso sanguigno cocleare, che può causare ipossia. Il rumore, oltre a provocare un aumento della liberazione del neurotrasmettitore glutammato, che può danneggiare le cellule cigliate per un'eccessiva penetrazione di ioni Ca^{2+} (eccitotossicità da glutammato), provoca un

aumento della produzione di ROS e perossidazione lipidica. I ROS vanno a danneggiare il metabolismo cellulare e il DNA mitocondriale.

Il danno da rumore si manifesta principalmente sulla coclea, e si localizza inizialmente a livello delle OHC, sul piano cuticolare e sulle stereociglia. In particolar modo il danno è rilevabile prima sulla fila più esterna di OHC del giro basale, per estendersi poi alle altre file, e solo in fasi avanzate coinvolge le IHC.

I ROS sono coinvolti nel processo apoptotico in modo diretto o addirittura come secondi messaggeri poiché mediano il rilascio del citocromo c (cyt-c) da parte dei mitocondri (Lander, 1997; Hu et al., 2000). Il cyt-c è una piccola emoproteina (12,4 kilodalton) essenziale per il trasporto di elettroni ed è localizzato sulla membrana interna dei mitocondri che lo rilasciano in risposta a stimoli pro-apoptotici (Liu et al.;1996). Il rilascio di piccole quantità di cyt-c provoca un'interazione con il recettore inositolo trifosfato (IP3), localizzato sul reticolo endoplasmatico, liberando così ioni calcio responsabili dell'attivazione della caspasi 9, una cistein-proteasi che una volta attivata innesca la cascata di attivazione delle caspasi 3 e 7 responsabili della distruzione delle cellule (Bertini et al.; 2006).

E' stato recentemente provato che l'ipoacusia dovuta al trauma acustico può insorgere anche per via di un meccanismo ischemico, causando danni vascolari. Il rumore rende, infatti, l'ambiente cocleare ipossico, caratteristica che si protrae anche una volta terminato il rumore, andando ad attivare pathways di sopravvivenza cellulare e di neoangiogenesi (Shi, 2009).

L'ipossia e l'ischemia che si verificano durante l'esposizione al rumore eccessivo possono in questo modo contribuire allo sviluppo del danno delle cellule cigliate (Hawkins, 1971; Maass et al., 1976). Questo sembra essere provocato dal calo del flusso di sangue e della pressione parziale di ossigeno nella coclea durante l'esposizione al rumore, in modo dipendente dall'intensità (Perlman e Kimura, 1962; Thorne e Nuttall, 1987, 1989; Haupt et al., 1991; Scheibe et al., 1992, 1993; Lamm e Arnold, 1996).

1.2.3 Ipoacusia di tipo citotossico: ototossicità da cisplatino

Una sostanza ototossica è definita come “ogni agente terapeutico o altra sostanza chimica che reca danni funzionali e cellulari ai tessuti dell’orecchio interno” (Johnsson e Hawkins, 1976).

Tra i farmaci particolarmente tossici per l'ODC (cocleotossici) ci sono gli antibiotici aminoglicosidici, i salicilati, il chinino e i suoi sostituti sintetici, i diuretici, l'acido etacrinico, la furosemide e gli antineoplastici (Rossi; 1997).

Tra i composti più studiati vi sono:

- Gli antibiotici aminoglicosidici in caso di sovradosaggio o di insufficienza renale possono dar luogo anche a nefrotossicità oltre che a ototossicità (Hall e Collis; 1998).

Tra gli antibiotici aminoglicosidici responsabili di ototossicità si riportano la streptomina, impiegata per il trattamento della tubercolosi, che può determinare tossicità a livello vestibolare, mentre la neomicina, la netilmicina, la tobramicina, la kanamicina, l'amikacina e la gentamicina causano principalmente danni al sistema uditivo.

- L'acido salicilico (principio attivo dell'aspirina) può portare a perdite di udito e tinnito causando alterazioni metaboliche nella coclea, ma contrariamente agli antibiotici aminoglicosidici con esiti reversibili (Falbe e Hansen, 1941; Brockenbrough et al.; 2001; Muller et al., 2003). Gli effetti ototossici a carico delle cellule cigliate cocleari sono riscontrabili prima di tutto a livello del giro basale e sulla prima fila di OHC. Le altre file, le cellule di supporto, la membrana di Reissner e la stria vascolare vengono coinvolte in seguito (Hayashida et al., 1989; Martini et al., 2011).

- Il cisplatino (cis-diamminadichloroplatino II, CDDP) è un potente farmaco antitumorale e antiproliferativo, largamente usato nel trattamento di tumori solidi del testicolo, cervice, ovaia, vescica, prostata e carcinoma squamoso del collo e della testa (Schweitzer, 1993; James et al., 1997; Sakamoto, 2000). Questo farmaco è stato utilizzato per la prima volta nel 1971 e in letteratura è riportato che come gli aminoglicosidi causa anche nefrotossicità (Hill et al., 1975; Taguchi et al., 2005).

Sebbene il CDDP venga spesso indicato come agente alchilante, non ha un gruppo alchile ed è quindi più correttamente identificato come un analogo degli alchilanti del

DNA. Esso è una piccola molecola costituita da uno ione platino centrale circondato da quattro ligandi, due gruppi amminici e due cloridrici. Quando questi ultimi sono disposti in posizione *cis* la molecola ha attività chemioterapica, se sono in posizione *trans* non ha attività (Andersson et al., 1994; Goodsell, 2006) (Fig.1.8).

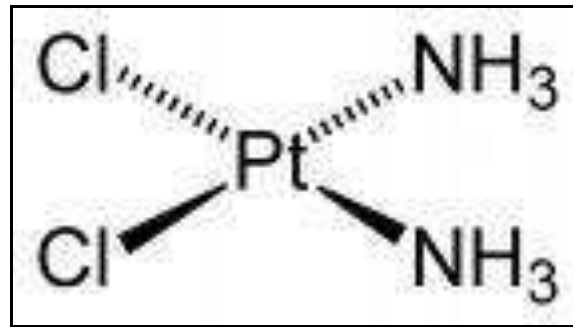


Figura 1.8 Struttura chimica del cisplatino.

La numerosità degli effetti collaterali rappresenta il maggiore ostacolo all'utilizzo di questo farmaco. Per quanto riguarda l'otossicità, essa si manifesta soprattutto nei bambini con perdita di udito neurosensoriale progressiva, bilaterale e irreversibile (Saito e Aran, 1994; Sone, 1998). I fattori che determinano l'incidenza di ototossicità comprendono: via di somministrazione, dose cumulativa, età, fattori dietetici, livelli di proteine sieriche, fattori genetici (Sakamoto; 2000).

Il CDDP entra nelle cellule o passivamente, per diffusione attraverso i canali transmembrana, o per diffusione facilitata, attraverso un sistema di trasporto di membrana non ancora identificato (Gately e Howell, 1990). In seguito alla diffusione cellulare i due atomi di cloro presenti nel CDDP vengono sostituiti da molecole di acqua, generando il cosiddetto complesso monoidrato che è una molecola carica positivamente e altamente reattiva (Fig.1.9). Quest'ultimo è l'addotto citotossico, in quanto è in grado di interagire con siti nucleofili come le proteine cellulari, la membrana fosfolipidica, i microfilamenti del citoscheletro, molecole contenenti gruppi tiolici, l'RNA e il DNA cellulare e mitocondriale (Fig.1.10) (Andrews e Howell, 1990). In letteratura è stato documentato che solo l'1% del CDDP intracellulare è in grado di

interagire con il DNA nucleare mediante legami crociati che vengono a formarsi tra i filamenti del DNA stesso e tra proteine e DNA.

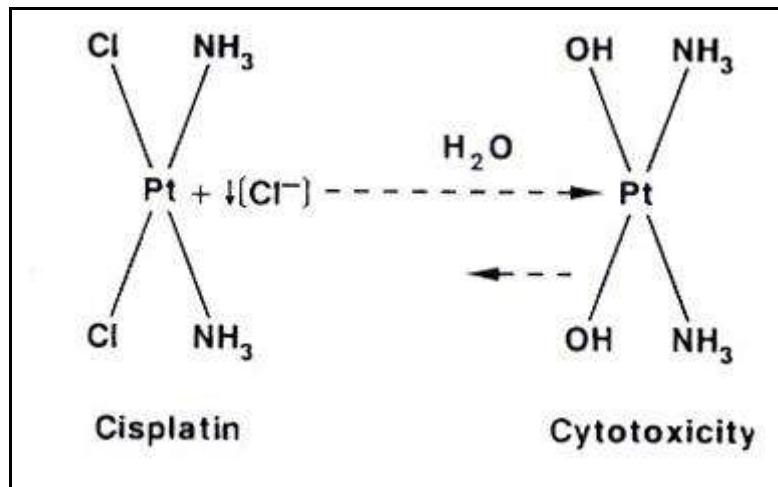


Figura 1.9 Formazione del complesso monidrato.

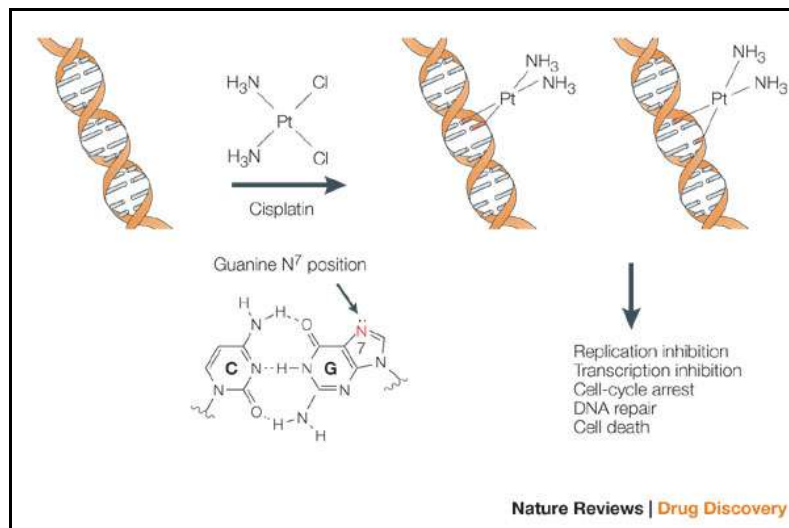


Figura 1.10 Legame del cisplatino con il DNA (da Wang e Lippard, 2005).

E' stato dimostrato inoltre che il CDDP tende preferenzialmente ad associarsi con la guanina e che tale interazione porta a modificazioni della struttura del DNA, alterando l'intero ciclo cellulare e in particolare la fase G1 (Sherman et al., 1988).

Per capire quali sono gli eventi iniziali che legano la morte cellulare con i danni al DNA indotti dal cisplatino molti studi si sono focalizzati sull'analisi e sulla caratterizzazione

di proteine in grado di riconoscere e riparare questi danni. Si conoscono quattro famiglie di proteine:

- 1- NER (nucleotide excision repair protein);
- 2- MMR (mismatch repair protein);
- 3- DNA-PK (DNA-dependent protein kinase);
- 4- HMG (high-mobility group proteins) (Gonzales et al., 2001).

I complessi del cisplatino sono riparati soprattutto dai NER. L'MMR è un sistema di riparazione post-replicazione che riconosce e corregge le sequenze errate nel filamento-complementare lasciando i complessi del cisplatino intatti. Questo è un ciclo inutile di riparazione che può generare delle rotture del DNA e attivare il processo di morte cellulare (Perez, 1998; Gonzales et al., 2001).

DNA-PK è un altro sistema di riparazione che serve per eliminare le parti di doppia elica interrotte, questo sistema interagisce con le lesioni al DNA indotte dal cisplatino (Turchi e Henkels, 1996). Le DNA-PK vengono attivate dal legame della loro subunità Ku con il DNA, acquisendo così la capacità di autofosforilarsi e di fosforilare altre proteine. In presenza di complessi cisplatino-DNA la subunità Ku fatica a traslocare sulla doppia elica e viene di conseguenza ridotta l'attività chinasi della proteina (Henkel e Turchi, 1997).

Le HMG sono una famiglia di piccole proteine multifunzionali coinvolte nella regolazione genica e nel mantenimento della struttura cromatinica. Le proteine HMG hanno un'alta affinità per il DNA modificato dal CDDP e sono in grado di proteggerlo dal meccanismo di riparazione (Jamieson e Lippard; 1999).

Anche se si considera come tappa critica dell'azione tossica del cisplatino l'attacco al DNA genomico, anche altri target intervengono nel processo citotossico del farmaco, infatti, esso danneggia il DNA mitocondriale, agisce sulla fosfatidilserina di membrana, distrugge il citoscheletro e altera la polimerizzazione dell'actina (Jamieson e Lippard, 1999). Tutto ciò può portare alla morte cellulare per apoptosi o necrosi. L'induzione dell'apoptosi sta alla base della sua funzione di antitumorale (Dive e Hickman, 1991).

1.2.3.1 Effetti ototossici del cisplatino

Gli effetti ototossici del CDDP nell'orecchio interno si manifestano soprattutto sull'ODC, sui neuroni del ganglio spirale e sulla stria vascolare causando alterazioni morfologiche e morte cellulare (Kohn et al., 1988; Taudy et al., 1992). L'ototossicità del CDDP si manifesta in particolare con la perdita sporadica delle IHC e la perdita progressiva delle OHC, dalla base all'apice della coclea, fino a determinare la perdita uditiva (Stadnicki et al., 1975; Moroso et al., 1983; Safirstein et al., 1986).

In studi condotti sull'uomo e sul Guinea pig, ai quali è stato somministrato CDDP, è stata riscontrata una significativa perdita delle OHC a livello del giro basale e una riduzione delle cellule del ganglio spirale (Melamed et al., 2000) con conseguente perdita uditiva bilaterale alle alte frequenze (Ozols et al., 1985; Anniko et al., 1986; Rybak et al., 1995; Cardinaal et al., 2000). In seguito la perdita progredisce verso le frequenze della parola, e si accompagna alla comparsa di tinnito transiente o permanente (Rademaker-Lakhai et al., 2006). Molti studi dimostrano che il CDDP esplica la sua citotossicità sia attraverso la formazione di addotti con il DNA che bloccano la progressione del ciclo cellulare sia interagendo con i tessuti cocleari generando ROS come l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) e l'ossido nitrico (NO) (Rybak et al., 1999). La produzione dei ROS entro la coclea avviene in seguito all'inibizione degli enzimi antiossidanti dovuta al legame del CDDP ai loro gruppi sulfidrilici; questo evento induce il processo apoptotico sia sulle cellule cigliate sia sui neuroni (Clerici et al., 1996, Rybak et al., 1997).

Il CDDP, inoltre, abbassa i livelli del rame e del selenio che sono essenziali per il funzionamento della superossidodismutasi e della glutatione perossidasi (DeWoskin e Riviere, 1992).

1.3 INDAGINI UTILI A DESCRIVERE I DANNI UDITIVI

Diverse metodologie d'indagine possono essere utilizzate per studiare il danno uditivo, in particolar modo quelle considerate in questa tesi sono l'elettrofisiologia, che permette di individuare la soglia uditiva e quindi di stabilire se un danno inferto sperimentalmente può aver causato uno spostamento di questa soglia rispetto alle

misurazioni precedenti; e lo studio dei pathways che, attivandosi, vanno a causare tale perdita. In questo studio i pathways analizzati in quanto coinvolti nell'eziologia del disturbo uditivo e del danno vascolare sono l'ossidazione, la coagulazione e l'apoptosi.

1.3.1 Elettrofisiologia: potenziali Evocati Uditivi Del Tronco Encefalico

Le risposte uditive del tronco encefalico, ABR (Auditory Brainstem Response), rappresentano una risposta elettrofisiologica a uno stimolo esterno di breve durata. Tale risposta prende origine dalle fibre nervose della via uditiva primaria del tronco encefalico e si propaga fino al collicolo inferiore.

E' un esame audiometrico non invasivo che permette di registrare l'attività elettrica del nervo cocleare e delle vie dei nuclei del tronco encefalico fino al collicolo inferiore, mediante l'applicazione di tre elettrodi a disco: uno al vertice (attivo), uno alla fronte (terra) e uno sulla mastoide (riferimento) (Grandori e Martini; 1995).

L'ABR viene visualizzato sottoforma di sette onde che compaiono dopo circa 10 millisecondi dallo stimolo acustico e vengono indicate con i numeri romani dalla I alla VII (Figg.1.11-1.12).

Secondo Moller (1983) nell'uomo ciascuna onda ha origine in zone ben precise e in particolare:

- la porzione distale del nervo cocleare per l'onda I;
- la porzione prossimale per l'onda II;
- i nuclei cocleari dorsale e ventrale per l'onda III;
- il complesso olivare superiore per la IV;
- il lemisco laterale per l'onda V;
- le onde VI e VII sono le meno studiate poiché le più difficili da visualizzare; la loro sede d'origine sarebbe posta a livello del collicolo inferiore e del corpo genicolato mediale (Picton et al., 1981).

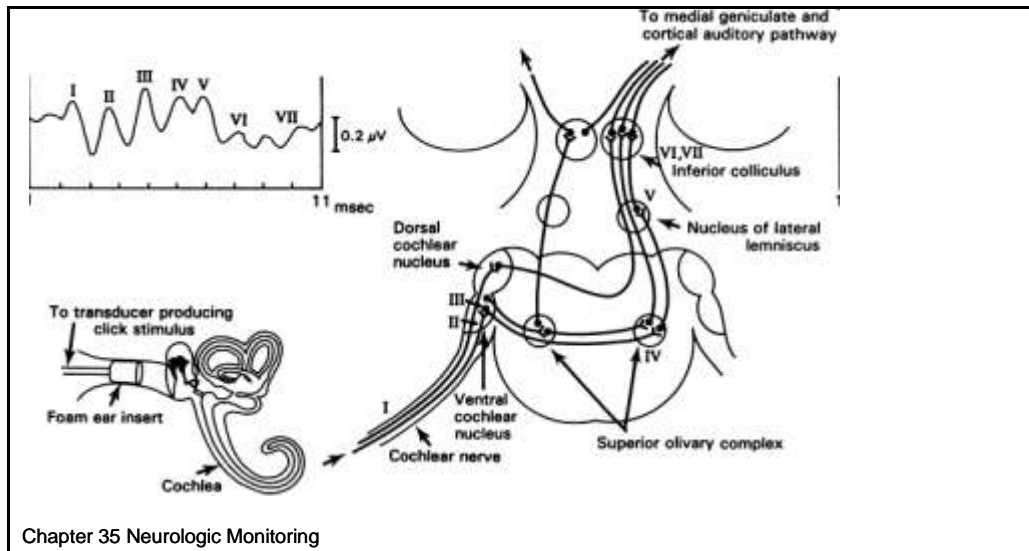


Figura 1.11 Risposta elettrofisiologica (ABR) in seguito allo stimolo click. (Black et al., 1994).

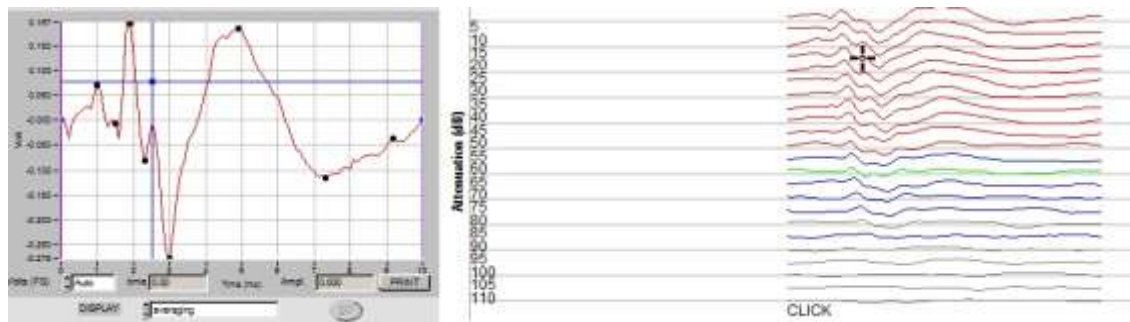


Figura 1.12 Rappresentazione di un potenziale evocato del tronco encefalico (ABR), in risposta allo stimolo click registrato su ratto normoudente.

Nel campo audiologico infantile di particolare importanza è la presenza dell'onda V che è la sola visualizzabile alle più basse intensità di stimolazione ed è quindi un buon indice della soglia uditiva nel range frequenziale 2-4 KHz. Quest'onda ha una latenza di circa 6 ms (a un'intensità di 70-80 dB HL) e talvolta compare assieme all'onda IV (complesso onda IV-V).

Una disfunzione dell'orecchio medio, qualunque ne sia la causa, porta a una riduzione dell'energia sonora che entra nella coclea con conseguente riduzione dell'onda V.

Nel ratto la risposta elettrofisiologica consiste di 5-7 picchi di onda misurati nei primi 10 ms dall'inizio di uno stimolo sonoro (Blatchley, 1987; Church et al., 1988; Burkard et al., 1990). L'onda III rappresenta l'onda di maggiore ampiezza ed è l'ultima a scomparire abbassando il livello di stimolo. Nell'analisi dei dati si misura la latenza di quest'onda poiché è il migliore indicatore della funzione uditiva centrale: è abbastanza

stabile negli animali sani, mentre aumenta sensibilmente in seguito a disfunzioni uditive come quelle provocate dalla somministrazione di farmaci ototossici (Starr et al., 1976).

1.3.2 studio dei pathways: ossidazione

L'ossigeno, VIII elemento della tavola periodica, può essere paradossalmente tossico per la sua capacità di generare specie radicaliche (Buonocore et al., 2001). Si definisce radicale qualsiasi specie chimica capace di esistenza indipendente e avente uno o più elettroni "spaiati" nell'orbitale atomico o molecolare.

Secondo il principio di esclusione di Pauli, un orbitale atomico può contenere al massimo due elettroni, aventi numero di spin opposto $+1/2$ e $-1/2$ ed è la presenza di questi due elettroni appaiati che conferisce stabilità alla molecola (specie diamagnetiche). Le specie reattive si formano a seguito di una scissione di un legame chimico: se un elettrone resta spaiato in un orbitale conferisce all'atomo o alla molecola una forma altamente instabile e un'altissima reattività. Nel caso semplificato di una molecola biatomica, in seguito alla scissione del legame formato da un doppietto elettronico, i due elettroni possono suddividersi o in modo asimmetrico per scissione eterolitica, ovvero collocandosi entrambi su uno dei due atomi e formando ioni; oppure in modo simmetrico per scissione omolitica, formando intermedi aventi un elettrone spaiato, ovvero i radicali. I radicali possono essere neutri o dotati di carica, sia positiva sia negativa. Le energie atte alla produzione di specie radicaliche sono sostanzialmente tre: irradiazione, temperature elevate e reazioni di ossidoriduzione.

Dal punto di vista biologico i radicali più importanti sono i ROS. Il termine comprende tutte le specie derivate dall'ossigeno, radicaliche oppure non radicaliche, ma generatrici di radicali. L'ossigeno molecolare (o più propriamente diossigeno) è una specie radicalica: ha, infatti, due elettroni spaiati, ciascuno localizzato in un diverso orbitale molecolare di antilegame; i due elettroni hanno lo stesso numero quantico di spin. Durante i processi di ossidazione l'ossigeno non è in grado di accettare una coppia di elettroni con spin antiparalleli poiché, in questo caso, un orbitale di

antilegame p^* della molecola di ossigeno risulterebbe occupato da una coppia di elettroni che non soddisfa il principio di esclusione di Pauli. I due elettroni spaiati dell'ossigeno formano una barriera all'inserimento di altre coppie di elettroni e rendono l'ossigeno capace di accettare un solo elettrone per volta: il fenomeno, detto "restrizione di spin", rende l'ossigeno molecolare meno reattivo di quanto ci si aspetterebbe dal punto di vista termodinamico.

L'ossigeno è in grado di accettare un elettrone per volta, tramite il processo detto "riduzione univalente dell'ossigeno", che porta alla formazione di specie radicaliche di elevata pericolosità dal punto di vista biologico (Bast et al., 1991, Gutteridge e Halliwell, 2000).

Il passaggio dal metabolismo anaerobico a quello aerobico ha determinato un maggiore successo evolutivo, favorendo gli organismi aerobi a causa della maggiore efficienza energetica della respirazione cellulare. Questa modalità di produzione dell'energia comporta però uno svantaggio fondamentale: l'esposizione agli effetti tossici dell'ossigeno (Gutteridge e Halliwell, 2000).

Lo stress ossidativo è la conseguenza dello spostamento dell'equilibrio biologico tra antiossidanti e ossidanti a favore di questi ultimi, dovuto a varie cause riconducibili ai ROS (Chow, 1991; Kehrer e Lund, 1994; Gutteridge e Halliwell, 2000). Nello stress ossidativo a livello cellulare sono coinvolti anche sistemi come quello delle "heat shock proteins" (HSP), una famiglia di proteine la cui produzione aumenta in corrispondenza di un incremento della temperatura, come avviene ad esempio durante gli stati infiammatori. Le HSP hanno diverse funzioni, molte delle quali finalizzate alla protezione diretta o indiretta di biomolecole.

In molti fenomeni di apoptosi (o morte cellulare programmata) sono coinvolti, direttamente o indirettamente, i radicali dell'ossigeno. Lo stress ossidativo può influenzare le vie di trasduzione del segnale e di risposta cellulare, ad esempio modulando i livelli intracellulari di calcio tramite proteine leganti quali la calmodulina e la calpaina, coinvolte nella regolazione dell'attività delle endonucleasi (Fu et al., 1998).

Negli ultimi anni sono state raccolte prove sempre più numerose del collegamento esistente tra stress ossidativo, stati infiammatori e danni al DNA indotti da radicali.

Con ogni probabilità, l'insorgenza di alcune forme tumorali è collegata al danno radicalico al DNA.

In tutti gli organismi esistono meccanismi di difesa in grado di contrastare i danni ossidativi a livello cellulare e tissutale. Questi meccanismi vengono generalmente indicati come "difese antiossidanti" dell'organismo (Gutteridge e Halliwell, 2000).

Lo stress ossidativo può causare danno alle cellule cigliate dell'organo del Corti in seguito a ischemia-riperfusion, trauma acustico e somministrazione di farmaci ototossici. Il danno può portare alla morte cellulare tramite apoptosi o necrosi, in base al grado di esposizione ai ROS. Recentemente è stato dimostrato che il trattamento di organocolture di ODC con basse concentrazioni di perossido di idrogeno (H_2O_2) si traduce in perdita di cellule cigliate esterne nel giro basale. Concentrazioni più elevate di perossido risultano in un maggior danneggiamento delle OHC così come nella perdita di IHC. La morte cellulare rilevata in presenza di basse concentrazioni di perossido di idrogeno sembra essere riconducibile a fenomeni apoptotici (Baker e Staecker, 2012).

1.3.3 Studio dei pathways: coagulazione

La cascata coagulativa consiste in una serie di conversioni enzimatiche a progressiva amplificazione, in cui ad ogni passaggio si assiste alla scissione proteolitica di un proenzima inattivo nella sua forma attiva e termina con la produzione di trombina (Fig.1.13). La trombina è il più importante fattore della coagulazione e può intervenire in fasi diverse del processo. Al termine della cascata proteolitica, la trombina trasforma la proteina plasmatica solubile chiamata fibrinogeno in monomeri di fibrina che polimerizzano in un gel insolubile. Questo gel di fibrina ingloba le piastrine e le altre cellule del tappo emostatico secondario definitivo, mentre i polimeri di fibrina vengono interconnessi con legami covalenti e stabilizzati dal fattore XIIIa (anch'esso attivato dalla trombina).

- le antitrombine, che inibiscono l'attività della trombina e di altre proteasi coinvolte nella coagulazione;
- le proteine C ed S, che inattivano i fattori Va e VIIIa. La proteina C deve essere attivata dalla trombomodulina (TM) per svolgere la sua azione;
- l'inibitore del fattore tissutale.

E' da sottolineare che la TM, macromolecola con importante attività anticoagulante grazie al suo ruolo di attivatrice della proteina C, tende a essere overespressa in condizioni patologiche, in particolar modo in caso di patologie vascolari, ma anche in molte reazioni infiammatorie o autoimmuni (Mercié et al., 1997).

L'attivazione della cascata coagulativa attiva a sua volta la cascata fibrinolitica, che limita le dimensioni del coagulo finale. La fibrinolisi si esplica principalmente grazie alla plasmina, che scinde la fibrina e interferisce con la sua polimerizzazione; essa deriva dal plasminogeno, suo precursore circolante inattivo, attraverso una via fattore XII-dipendente o mediante gli attivatori del plasminogeno (Kumar et al., 2009).

Adhami et al. (2006), hanno dimostrato *in vivo* che l'ischemia carotidea porta a una diminuzione del flusso sanguigno cerebrale e a squilibri nella cascata coagulativa che portano alla formazione incontrollata di trombi. Sembra, infatti, che l'ipossia vada ad alterare le proprietà coagulanti e anticoagulanti delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni cerebrali.

1.3.4 Studio dei pathways: ipossia

Hypoxia-inducibile factor 1 (HIF-1) è un fattore di trascrizione dipendente dall'ossigeno, che gioca un ruolo fondamentale nell'angiogenesi tumorale e nello sviluppo dei mammiferi. HIF-1 è costituito da una subunità espressa costitutivamente detta HIF-1 β , e da HIF-1 α , la cui attività è regolata da varie modificazioni post-traduzionali. In normossia, l'HIF-1 α è rapidamente degradato attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma. Al contrario, in condizioni di ipossia, HIF-1 α diventa stabile e quindi HIF-1 va ad agire come fattore di trascrizione. I geni bersaglio di HIF-1 sono in particolare quelli connessi con proliferazione cellulare, angiogenesi e sopravvivenza cellulare.

Inoltre, è stato riportato che l'attivazione di HIF-1 α è strettamente associata con una varietà di tumori e processi patologici (Lee et al., 2004).

E' stato recentemente dimostrato come HIF-1 sia un attivatore delle MAP chinasi. In particolar modo, Jeong e colleghi (2005), hanno osservato che in caso di ipossia, HIF-1 va ad attivare c-jun N-terminal kinase (JNK) tramite overespressione di vascular endothelial growth factor (VEGF).

JNK è un importante membro della superfamiglia delle MAP chinasi, e oltre ad essere attivato da HIF-1, è anche direttamente attivato dalla presenza di ROS e può portare, in base all'entità dello stress ossidativo, all'apoptosi, alla necrosi o alla sopravvivenza cellulare.

1.3.5 Studio dei pathways: apoptosi

Il processo apoptotico viene diviso in quattro fasi, una iniziatrice o di induzione, una esecutrice, una di riconoscimento e una di fagocitosi. La prima fase ha inizio con l'arrivo di segnali, interni o esterni alla cellula (mediati da recettori), altri fisici o genotossici (l'espressione di oncogeni etc.). In questa fase i segnali sono individuati dalla cellula che, come risposta, attiva vie multiple di trasduzione e amplificazione del segnale. Prende così inizio la fase esecutrice, durante la quale la macchina apoptotica agisce secondo diversi obiettivi portando a morte le cellule mediante l'attivazione di diverse proteine tra le quali le caspasi (cysteinyl aspartate prtoteinases). Infine, intervengono dei sistemi di riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche (Böhm e Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006).

Nelle prime fasi dell'apoptosi la membrana cellulare subisce delle alterazioni funzionali; la fosfatidilserina (phosphatidylserine= PS) che normalmente è localizzata sulla superficie interna della membrana citoplasmatica, viene esposta all'esterno (meccanismo a "Flip-Flop") e può essere riconosciuta con l'utilizzo dell'annessina-V in grado di legarla (Fig.1.14). La PS è uno dei vari segnali che le cellule adiacenti o altre con capacità fagocitaria riconoscono per distruggere i corpi apoptotici. La perdita di ioni K⁺ attraverso la membrana citoplasmatica insieme al taglio enzimatico del citoscheletro causa lo shrinkage cellulare. Simultaneamente aumenta l'entrata di ioni

Ca²⁺, importanti per l'attivazione degli enzimi della catena apoptotica (Böhm e Schild, 2003).

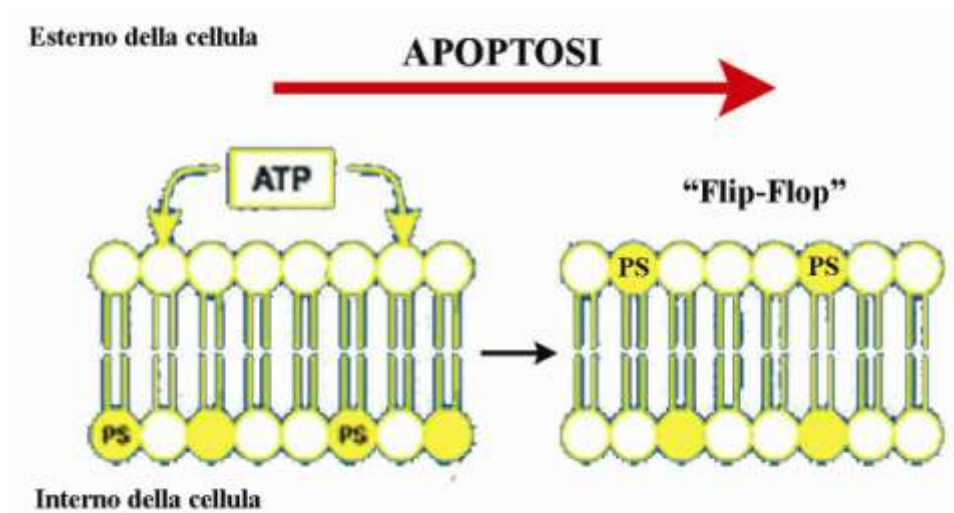


Figura 1.14 fasi iniziali dell'apoptosi; meccanismo a "Flip-Flop" con esposizione della fosfatidilserina (PS) sulla membrana citoplasmatica (da Simoni, 2009).

Nella fase iniziatrice l'apoptosi è regolata da due tipi di vie, una estrinseca (recettoriale) e una intrinseca (mitocondriale e del reticolo endoplasmatico) che sono reversibili e regolabili fino a quando non convergono alla attivazione delle caspasi, le principali esecutrici della morte cellulare (Böhm e Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006).

1.3.5.1 Via estrinseca o recettoriale

La via estrinseca comporta l'attivazione di specifici recettori di membrana chiamati recettori di morte, appartenenti alla famiglia del Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) tra i quali si conoscono il Fas (anche conosciuto come CD95 o Apo-1), il TNF-R1, TRAIL-R1 e il TRAIL-R2 e infine il DR3, il DR4, il DR5, e il DR6 (Sartorius et al., 2001; Ashkenazi, 2002). Questi recettori possiedono diversi domini, quello extracellulare ricco di cisteina, quello transmembrana e infine, quello citoplasmatico, chiamato dominio di morte (Death Domain= DD). Al legame specifico recettore-ligando segue la trimerizzazione del recettore e il reclutamento di proteine adattatrici (Fas-Associated Death Domain= FADD, TNFR-Associated Death Domain=TRADD e FLICE-Associated

Huge protein= FLASH) presenti nel citoplasma e che si vanno a legare ai DD formando un complesso chiamato DISC (Death-Inducing Signalling Complex) (Böhm e Schild, 2003; Mandic, 2003). Attraverso dei domini effettori di morte (Death Effector Domain = DED) presenti sulle molecole adattatrici, il DISC può legare proteine, come la procaspasi 8 per interazione omotipica DED-DED. La procaspasi 8 viene attivata proteoliticamente a caspasi 8 la quale è così in grado di attivare altre proteine tra le quali la caspasi 3; quest'ultima è indispensabile per l'esecuzione della morte cellulare programmata (Krammer, 2000; Böhm e Schild, 2003; Gewies, 2003; Mandic, 2003) (Fig.1.15).

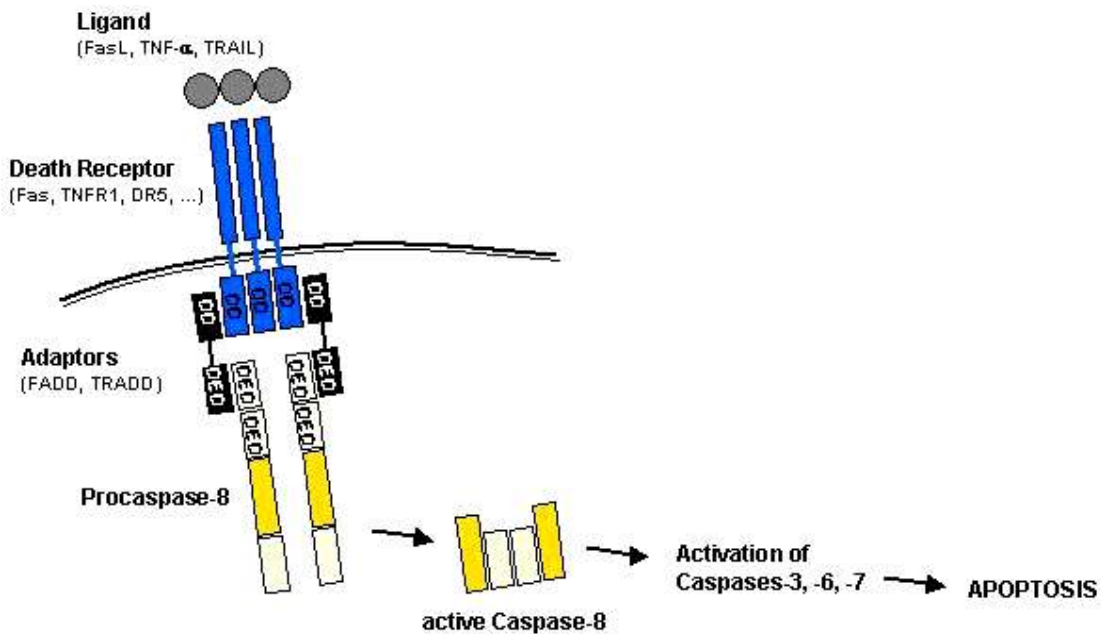


Figura 1.15 via estrinseca dell'apoptosi. DD= Death domain, DED= Death Effector Domain. (da Gewies, 2003).

1.3.5.2 Via intrinseca o mitocondriale

La via mitocondriale integra e propaga dei segnali di morte, alcuni dei quali si originano entro la cellula in conseguenza al danneggiamento del DNA, a uno stress ossidativo, allo shock termico, all'eliminazione di fattori di crescita, alla somministrazione di un chemioterapico o di radiazioni UV. Anche la via estrinseca può convergere su quella mitocondriale, indicando un'interazione tra i due pathway (Kaufmann e Earnshaw, 2000; Wang, 2001; Mandic, 2003; Fumarola e Guidotti, 2004).

1. Introduzione

Il mitocondrio è un organello con due compartimenti ben definiti; la matrice è circondata da due membrane, una interna (MI) e una esterna (ME) che delimitano uno spazio intermembrana contenente varie molecole come l'ATP sintetasi e le componenti della catena respiratoria. In condizioni fisiologiche queste molecole creano un potenziale di transmembrana (PT) o gradiente elettrochimico. Molte delle condizioni che inducono apoptosi intervengono sul mitocondrio alterando il PT oltre che la permeabilità delle membrane dell'organulo in questione. Ciò comporta l'induzione di una cascata di eventi, con formazione di pori sulla ME e conseguente rilascio nel citoplasma di proteine pro-apoptotiche presenti nello spazio tra le due membrane mitocondriali (Bernardi et al., 1999; Loeffler e Kroemer, 2000), oltre che al rilascio di ioni Ca^{2+} dalla matrice mitocondriale (Zoratti e Szabo, 1995). Tra le proteine rilasciate vi è anche il citocromo c, che normalmente è localizzato sulla porzione esterna della MI e nello spazio intermembrana, ha un'importante funzione nella catena di trasporto degli elettroni durante la produzione di ATP. Una volta rilasciato nel citoplasma, diverse molecole di citocromo c si legano a sette molecole di Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor); assieme ai dATPs reclutano altrettante molecole di procaspasi 9 tramite dei domini CARD (caspasi recruiting domain) e formano un complesso chiamato apoptosoma, il quale attiva la caspasi 9 (Li et al. 1997; Zou et al., 1997), quest'ultima è a sua volta in grado di attivare la caspasi-3 e indurre di conseguenza la morte cellulare (Slee et al., 1999; Van de Craen et al., 1999; Böhm e Schild, 2003) (Fig.1.16).

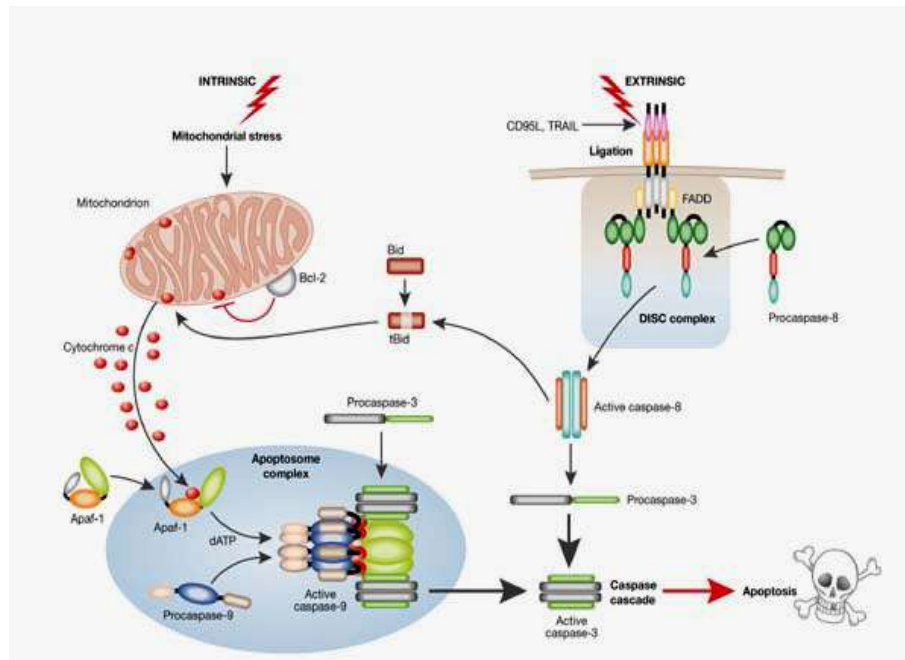


Figura 1.16 vie intrinseca ed estrinseca del processo apoptotico. (da MacFarlane e Williams, 2004).

Assieme al citocromo c il mitocondrio rilascia altre proteine che sono in grado di mediare l'apoptosi, alcune in maniera caspasi indipendente. Tra queste si conoscono il fattore AIF (apoptosis-inducing factor) il quale trasloca al nucleo e media la frammentazione del DNA in frammenti di 50kb (Susin et al., 1999) e la endonucleasi G la cui funzione non è ancora stata chiarita (Li et al., 2001). Tra caspasi-dipendenti si conoscono la proteina Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspasi/direct IAP-binding protein with low pI) che previene l'inattivazione della caspasi 3, della 7 e della 9 operata dalle IAP (proteine inibenti l'apoptosi) inibendo le IAP stesse (Verhagen et al., 2000; Srinvasula et al., 2001; Breckenridge e Xue, 2004) ed infine la serin proteasi HtrA2/Omi che ha un meccanismo simile alla Smac/DIABLO (Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2002).

Per quanto riguarda la convergenza delle due vie è documentato che la caspasi-8 attivata nella via estrinseca media il taglio di una proteina citosolica, il Bid. Dopo il taglio, Bid trasloca sulla membrana mitocondriale favorendo il rilascio del citocromo C e la successiva attivazione della caspasi e quindi la via intrinseca (Luo et al., 1998; Gross et al., 1999) (Fig.1.16).

1.4 SCOPO DEL LAVORO

La sordità è una patologia sempre più diffusa per via dell'aumento dell'età media della popolazione, dei livelli del rumore ambientale e dell'utilizzo di farmaci ototossici.

E' noto che l'invecchiamento può causare problemi vascolari, come ad esempio trombosi, ictus, infarto. Questo avviene perché nella senilità i tessuti vanno incontro ad alterazioni istologiche di tipo "ischemico".

Questo tipo di lesioni potrebbe andare a causare anche presbiacusia, la quale può avere infatti diverse cause, come l'accumulo di ROS che va a danneggiare il DNA mitocondriale, l'invecchiamento cocleare, l'esposizione al rumore, la predisposizione genetica e, per quanto riguarda i danni vascolari, l'aterosclerosi o il fumo (Yamasoba et al., 2013).

E' stato inoltre provato che l'acufene può essere un sintomo precoce di patologie maggiori del sistema cardiovascolare, come l'insufficienza cardiaca e l'infarto del miocardio, tanto da suggerire che potrebbe essere utilizzato come preavviso di scompenso cardiaco (Borghi et al., 2009).

Per questi motivi ipossia e ischemia potrebbero rappresentare importanti fattori patogenetici della presbiacusia e dei disturbi dell'udito in generale, ciò nonostante, gli effetti dell'ischemia a livello dell'orecchio interno sono poco studiati e gli unici lavori esistenti riportano danni conseguenti a ischemie insorte nel neonato durante o dopo il parto.

Lo scopo di questo lavoro è di mettere a punto dei modelli animali di infarto e di ischemia che siano utilizzabili per lo studio di danni ischemici e vascolari dell'orecchio interno, e di caratterizzarli mediante l'elettrofisiologia e l'analisi dell'espressione genica e proteica. Per questo motivo si è deciso di monitorare nel tempo gli effetti prodotti da un'ischemia provocata con un'ostruzione completa e temporanea delle carotidi per mimare le condizioni di occlusione tipiche delle persone che in età avanzata tendono a formare trombi e da un'ostruzione incompleta permanente della coronaria sinistra per mimare gli effetti di un infarto. In particolare lo studio si è focalizzato sull'analisi di fattori coinvolti nella struttura dell'organo del Corti e del ganglio spirale, nella coagulazione, nello stress ossidativo e nell'apoptosi.

1. Introduzione

Inoltre, un ulteriore obiettivo è stato quello di andare a confrontare i risultati ottenuti da questi modelli, con altri modelli di danno ototossico, come il rumore e il cisplatino. Questi modelli sono infatti sperimentalmente ben caratterizzati sia dal punto di vista elettrofisiologico, sia per quanto riguarda lo studio dello stress ossidativo e dell'apoptosi, ma non sono stati ancora indagati i possibili coinvolgimenti a livello vascolare. Questo confronto servirà inoltre a caratterizzare al meglio i nostri nuovi modelli di danno vascolare anche nel pattern di espressione delle vie apoptotiche e ossidative.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MODELLO ANIMALE

Sono stati utilizzati ratti di sesso maschile dei ceppi Sprague Dawley (175-200 gr; Charles River, Italia), stabulati con libero accesso ad acqua e cibo.

E' stato scelto il ratto come modello animale in quanto il suo orecchio interno ha molte somiglianze con quello umano, e inoltre presenta dei vantaggi pratici rispetto ad altri modelli animali. Rispetto al topo il ratto ha infatti delle dimensioni maggiori che favoriscono l'approccio chirurgico, e inoltre è stato visto che sostanze ototossiche tendono a non causare spostamenti di soglia significativi nel topo (Poirrier et al., 2010); mentre rispetto alla cavia, ha un'anatomia dell'orecchio interno più simile a quella umana. Anche l'organo del Corti presenta un pattern di distribuzione di OHC e IHC paragonabile a quello dell'uomo; per questo è molto adatto alla ricerca otologica (Albuquerque et al., 2009).

2.2 DISEGNO SPERIMENTALE

Sono stati utilizzati 64 ratti di sesso maschile suddivisi in 4 gruppi sperimentali e in 8 sottogruppi come riportato in tabella 2.1.

Gruppo A: animali sottoposti a ischemia carotidea completa, bilaterale e temporanea ottenuta mediante clamp per 5 (A1), 10 (A2) o 15 minuti (A3) e successiva ri-perfusione, con sacrificio dopo 3 ore.

Gruppo B: animali sottoposti a ischemia coronarica parziale e permanente eseguita mediante legatura della coronaria sinistra con filo di seta, con sacrificio dopo 3 ore (B1), 1 settimana (B2) o 1 mese (B3).

Gruppo C: animali esposti a rumore bianco (115 dB SPL) per 2h con sacrificio dopo 1 (C1), 14 (C2) o 21 giorni (C3).

Gruppo D: animali trattati con cisplatino (14 mg/kg diviso in tre somministrazioni giornaliere) per via intraperitoneale con sacrificio dopo 4 giorni.

Gruppo E: animali di controllo.

GRUPPO	TRATTAMENTO	NUMERO ANIMALI
A1	Ischemia carotidea 5 minuti	10
A2	Ischemia carotidea 10 minuti	10
A3	Ischemia carotidea 15 minuti	2
B1	Ischemia coronarica 3 ore	6
B2	Ischemia coronarica 1 settimana	5
B3	Ischemia coronarica 1 mese	6
C1	Rumore 1 giorno	5
C2	Rumore 14 giorni	5
C3	Rumore 21 giorni	5
D	Cisplatino	5
E	Controlli	5

Tabella 2.1 Suddivisione in gruppi degli animali con relativo trattamento.

2.3 VERIFICA DELLA CAPACITÀ UDITIVA: REGISTRAZIONI ABR

Per effettuare le registrazioni ABR tutti gli animali sono stati anestetizzati con un cocktail composto da 50 mg Zoletil 100 (Virbac) in 1-ml di soluzione salina, e 0.5 ml di Xylazina al 2% (Rompun, Bayer).

Le risposte uditive del tronco encefalico (ABR) sono state utilizzate per valutare la soglia uditiva prima e dopo i trattamenti, le operazioni, e prima dei sacrifici. Tutti i test ABR sono stati eseguiti nella camera da 1 m³ insonorizzata, con gli animali posti su di una coperta termica che garantiva il mantenimento costante della temperatura corporea a 37°C.

Le risposte ABR sono state registrate con 3 elettrodi di platino-iridio posto nella zona sub-cutanea del vertice (elettrodo positivo), della mastoide (elettrodo negativo) e nella zona del dorso (elettrodo di riferimento) dell'animale. Per la stimolazione uditiva è stato utilizzato un trasduttore di suono tweeter Motorola (flat response ± 1.5 dB;

4.0–35 kHz), connesso a un tubicino inserito nel condotto uditivo esterno di ciascun animale.

Le risposte ABR erano amplificate 20.000 volte e filtrate da 20-5000 Hz.

Ogni registrazione era la media di 1000 risposte individuali.

Le risposte ABR erano generate in risposta a un click di 100 μ s e a un tone burst di 2, 4, 8, 16, 32 kHz. Per i burst di 2, 4 e 8 kHz il plateau era di 8 ms e 1 ms di rise-fall time; per stimoli di 16 e 32 kHz il plateau era di 10 ms con rise-fall time di 0.5 ms.

I livelli di stimoli utilizzati andavano da 100 a 30 dB SPL, e l'intensità del suono è stata variata con intervalli di 5 dB.

Come riferimento è stata rilevata l'onda III che rappresenta l'onda di maggiore ampiezza ed è l'ultima a scomparire quando il livello di stimolo si riduce.

Per comodità le risposte ABR sono state registrate in termini di attenuazione.

Il rapporto tra soglia e attenuazione alla frequenza $F(x)$ è dato dalla seguente formula:

$$\text{Soglia } F(x) = 110 - \text{Attenuazione } F(x)$$

Per evitare una possibile stimolazione binaurale a intensità più alta di stimolo, sono stati utilizzati dei tappi per occludere l'orecchio controlaterale.

I dati ottenuti sono stati rappresentati graficamente in dB SPL, quindi un innalzamento di soglia indica una perdita di udito.

2.4 INDUZIONE DEL DANNO UDITIVO

2.4.1 Microchirurgia coronarica e carotidea

Per quanto riguarda l'ischemia carotidea, le carotidi comuni sono state prima esposte bilateralmente tramite l'utilizzo di tecniche asettiche, e in seguito occluse totalmente per 5, 10 o 15 minuti mediante l'uso di clamp. Al termine il clamp è stato rimosso e il sito d'incisione è stato suturato con un filo da sutura di seta 5-0. Dopo tre ore dalla riperfusione l'animale è stato sacrificato.

L'ischemia coronarica è stata invece provocata mediante occlusione parziale permanente della coronaria sinistra. Gli animali sono stati anestetizzati, intubati mediante tracheotomia e collegati a un respiratore per favorire la respirazione

artificiale. E' stata effettuata una toracotomia dal lato sinistro nello spazio intercostale tra la quarta e la quinta costa, e infine è stato esposto il cuore. L'ischemia miocardica è stata quindi causata con l'occlusione parziale della coronaria sinistra vicino alla sua origine, tramite un filo da sutura 6-0. In seguito il sito d'incisione è stato suturato e l'ischemia è stata in questo caso mantenuta fino al sacrificio dell'animale, dopo 3 ore, 1 settimana o 1 mese.

2.4.2 Danno da rumore

Ciascun animale sveglio è stato posto in una gabbia metallica che ne permetteva un'esposizione al trauma acustico di pari intensità a entrambe le orecchie. Gli stimoli venivano generati dal software Filtered Noise Generator (Timo Esser©), e amplificati da un amplificatore Harman Kardon (model 3390). Gli speakers erano centrati sugli animali a una distanza di 30 cm.

I livelli di stimolo sono stati calibrati in più posizioni all'interno della camera sonora per garantire l'uniformità dello stimolo (tipo 2.209 metro livello di precisione del suono, tipo 4.134 microfono Bruel e Kjar Instruments, Norcross, GA, USA). Durante l'esposizione al rumore, il livello di stimolo è stato monitorato da un microfono posizionato all'interno della camera insonorizzata.

Le misurazioni elettrofisiologiche post-trauma sono state effettuate dopo 1, 7, 14 e 21 giorni dall'esposizione, mentre il sacrificio è stato eseguito dopo 1, 14 e 21 giorni.

2.4.3 Somministrazione del cisplatino

Il cisplatino (1 mg/mL) fornito da Ebewe Pharma (Italy), è stato somministrato agli animali del gruppo D per via intraperitoneale alla concentrazione di 14 mg/kg totali, suddiviso in tre somministrazioni giornaliere consecutive ciascuna di 4,6 mg/kg. Gli animali sono stati sacrificati dopo 4 giorni.

2.5 VERIFICA DEL DANNO

2.5.1 Real Time PCR

Questa tecnica permette di quantificare in modo molto preciso la quantità di mRNA presente in un campione e di andarla poi a confrontare con quella presente in un controllo di riferimento.

I pathways ipossico e ossidativo sono stati studiati mediante ricerca di HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha) e di JNK (c-Jun N-terminal kinase), un importante fattore di trascrizione che viene attivato mediante fosforilazione in presenza di specie reattive dell'ossigeno o in situazioni di ipossia.

Eventuali modificazioni della cascata coagulativa sono state valutate andando a ricercare l'mRNA del fattore tissutale (TF), che codifica per una proteina procoagulante, e della trombomodulina (TM), ad attività anticoagulante.

L'apoptosi è stata indagata con la ricerca degli mRNA di caspasi 3 e nuclear factor kB (NF-kB) in quanto fattori proapoptotici, e di B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), ad attività antiapoptotica.

Le coclee per la Real-Time PCR sono state omogeneizzate dopo l'espianto, conservate in RNA later (Applied Biosystems) e l'RNA è stato quindi estratto tramite Trizol® (Life technologies). Esso è stato quindi incubato con Dnase I (New England Biolabs, Inc.) per eliminare l'eventuale presenza di DNA nel campione, ed è stato in seguito retrotrascritto a cDNA mediante iSCRIPT reverse transcription supermix (BIORAD). Dopo aver quantificato l'RNA mediante nanodrop® (Thermo scientific), è stata effettuata la quantitative real time PCR nel termociclatore Chromo-4 (BIORAD) mediante l'utilizzo dell'intercalante fluorescente Sso-fast eva-green supermix (BIORAD), e con i primer forward e reverse riportati in tabella (Tab.2.2), dei quali Actina- β (ACTB), tata-binding protein (TBP) e beta-2-microglobulina (B2M) sono i geni di riferimento utilizzati per la normalizzazione effettuata tramite il software Genex (BIORAD), che utilizza gli algoritmi di Vandesompele et al. (2002) e di geNorm. Il protocollo utilizzato per la reazione di RTPCR è riportato in tabella (Tab.2.3).

2. Materiali e Metodi

I dati sono stati rappresentati graficamente come fold increase, ovvero come aumento di espressione rispetto al non trattato posto uguale a 1.

PRIMER	DIREZIONE	SEQUENZA
Hif1a	F	GAGCCTTAACCTATCTGTCAC
	R	GTAACGTTCCAATTCCTGCTG
TF	F	AGACTCAAGCACAGGAAGGA
	R	CAATGATGAGTGTTCCTCCAG
NF-KB	F	GTTACACAGACAGTTTGCCA
	R	GTTCACTAGTTTCCAAATCCGA
JNK-1	F	TTCACACCACAGAAATCCCT
	R	ATTACTAGGCTTTAAGTCCCGA
CASPASE-3	F	GAACCAGATCAGAAGCTCCT
	R	CTTCCAAGTCCCCTGTG
TM	F	ATGAGTTGGTGGACGGAGAG
	R	AGTTGGGGTCACAGTCTGCT
Bcl-2	F	GCCTTCTTGAGTTCGGTG
	R	AGTTCCACAAAGGCATCCC
ACTB	F	CGTTGACATCCGTAAAGACC
	R	GATAGAGCCACCAATCCACAC
TBP	F	TCTTGGCTGTAACTTGACCT
	R	CTGGATTGTTCTTCACTCTTGG
B2M	F	CGAGACCGATGTATATGCTTGC
	R	GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA

Tabella 2.2. sequenze dei primers forward e reverse utilizzati per la real-time PCR dei geni di interesse.

Fasi del ciclo:	temperatura	Durata	cicli
Attivazione enzimatica	98°C	30''	1
Denaturazione	98°C	2''	39
Annealing/Estensione	60°C	7''	
Melt curve	65-95°C (0.5)	2-5''	1

Tabella 2.3. Protocollo di quantitative real-time PCR con relative fasi, temperature e durata.

2.5.2 Istologia

Gli animali sono stati anestetizzati nel modo descritto in precedenza e successivamente decapitati. A seguito della rimozione dell'osso temporale, è stata aperta la bulla per esporre la capsula otica. Parte delle coclee è stata processata per l'inclusione in paraffina: con l'ausilio dello stereomicroscopio, è stato praticato un foro all'apice della coclea per favorire la penetrazione del fissativo Glyofixx® (Thermo Scientific). Le coclee sono state immerse nel fissativo e sono rimaste overnight a 4°C e quindi lavate in 0,1M PBS pH 7,4. La decalcificazione delle coclee è stata effettuata con Decalcifier I (Leica) overnight a 4°C e in seguito con Decalcifier II (Leica) per 4 ore a T.A. Le coclee sono state quindi disidratate mediante scala ascendente di etanolo (Diapath), dal 70% fino all'etanolo assoluto. In seguito sono state diafanizzate in xilolo e incluse in paraffina (Diapath) tramite processatore automatico MTP (Slee). I campioni inclusi mediante centralina di inclusione MPS/P1 (Slee) sono stati poi tagliati tramite microtomo CUT 50 62 (Slee) in sezioni da 5 µm e raccolti in modo sequenziale su vetrini polarizzati (Diapath), in modo che su ciascuno di essi ogni sezione risulti distanziata dalla successiva di 50 µm, ottenendo 10 serie di vetrini per animale (Tab.2.4). Su queste sezioni sono state effettuate la colorazione ematossilina-eosina (EE) e le indagini immunohistochimiche.

	v.1	v.2	v.3	v.4.	v.5	v.6	v.7	v.8	v.9	v.10
s.1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
s.2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
s.3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
s.4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
s.5	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50

Tabella 2.4. Schema dei vetrini con sezioni raccolte in modo sequenziale (s= sezione, v= vetrino).

Altre coclee sono state invece processate per l'inclusione in resina: una volta estratte, esse sono state fissate in glutaraldeide (Electron Microscopy Science) per 2-4 ore e post-fissate in tetrossido di osmio (Electron Microscopy Science) al 2% per 2-3 ore, disidratate con una serie crescente di acetone (Sigma-Aldrich), e incluse in una miscela epossidica (Drucupan ACM Fluka, Sigma Aldrich).

I pezzi, una volta solidificati, venivano tagliati all'ultramicrotomo Reichert Om-U2 a lame di vetro in sezioni semifini e quindi colorate con blu di metilene per essere osservate al microscopio ottico.

2.5.2.1 Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina

L'ematossilina-eosina è una colorazione totale che consente di avere una visione globale dello stato dell'organo, colorando in blu i nuclei e in rosa il citoplasma.

Per ogni animale la prima serie di vetrini è stata colorata con EE: dopo la sparaffinatura mediante xilolo (Diapath), le sezioni sono state reidratate con la serie discendente di etanolo (100-50, Diapath), lavate in acqua e colorate con ematossilina di Mayer (Leica) e in seguito con eosina acquosa (Leica), e infine sono state nuovamente disidratate. Infine, dopo un passaggio in xilolo sono stati montati con Micromount (Diapath) e lasciati su una piastra riscaldata (Slee) a 37°C per 48 ore.

Su tutte le sezioni dove era presente l'organo del Corti, con l'ausilio del microscopio ottico Nikon ECLIPSE 50i e del software Nis-Elements D 3.2, sono state contate le cellule cigliate che avevano il nucleo, mentre quelle prive di esso sono state considerate mancanti. E' stata quindi calcolata la percentuale di cellule presenti sul totale di cellule attese.

2.5.2.2 Immunoistochimica

Questo tipo di indagine consente di verificare l'espressione e la localizzazione di proteine strutturali o legate a pathways di interesse, come nel nostro caso quello ipossico e ossidativo, coagulativo e apoptotico.

Oltre a HIF-1 α , JNK, TF e TM, con questa tecnica è stata indagata anche la presenza di pJNK (JNK fosforilato) e di altre proteine con funzioni strutturali o coinvolte nell'apoptosi.

Per la componente strutturale, è stata ricercata la presenza di neurofilamento (NF200, Sigma Aldrich), uno dei costituenti del citoscheletro della cellula nervosa e in particolare dell'assone, e quella della miosina 6 (MYH-6, Sigma Aldrich), una proteina contrattile che attua trasporti intracellulari e che nell'orecchio interno è specifica per le cellule cigliate.

Infine, per quanto riguarda l'apoptosi, è stato deciso di ricercare nelle sezioni il citocromo c (cyt-c, Santa Cruz), una delle proteine che caratterizzano la fase iniziale della via intrinseca dell'apoptosi.

L'indagine immunoistochimica ci permette quindi di discriminare la sua localizzazione a livello subcellulare e di capire se il pathway apoptotico mitocondriale sia stato attivato.

Dopo la sparaffinatura delle sezioni con xilolo, è stata effettuata la reidratazione con scala discendente di etanolo. Per gli anticorpi che necessitavano di smascheramento antigenico, questo è stato effettuato con esposizione al calore, ovvero i vetrini sono stati immersi per 40 minuti in soluzione smascherante (MS-Unmasker, Diapath) all'interno di un bagnetto (Water bath, Euroclone) pre-riscaldato a 95°C (Tab.2.5). In seguito le sezioni sono state permeabilizzate con una soluzione di Triton 0,1% (Sigma-Aldrich) in tampone fosfato (Lonza), hanno subito il bloccaggio delle perossidasi

2. Materiali e Metodi

endogene tramite acqua ossigenata (Marco Viti farmaceutici) e quindi il blocco dei siti aspecifici mediante incubazione con blocking buffer (Elite ABC kit, Vector). Si è quindi proseguito con l'incubazione con l'anticorpo primario (nelle concentrazioni indicate in tabella 2.5) overnight a 4°C.

Il giorno successivo sono state effettuate l'incubazione con l'anticorpo secondario tramite Elite ABC kit (Vector), l'amplificazione del segnale e la rivelazione mediante cromogeno SG (Vector). Infine, dopo la disidratazione con la serie ascendente di etanolo e un passaggio in xilolo, i vetrini sono stati montati con Micromount e osservati al microscopio ottico Nikon ECLIPSE 50i. Le immagini sono state acquisite con Nis Elements D 3.2.

Anticorpo primario	Ditta	Kit	Concentrazione	Smascheramento antigenico
Neurofilament 200	Sigma-Aldrich	Rabbit	1:600	
Myosin 6	Sigma-Aldrich	Rabbit	1:50	X
Thrombomodulin	Santa Cruz	Mouse	1:100	
Tissue Factor	Santa Cruz	Rabbit	1:50	
Hypoxia-inducible Factor 1 alpha	Santa Cruz	Rabbit	1:100	
c-Jun N-terminal Kinase	Santa Cruz	Mouse	1:50	
Phospo c-Jun N-terminal Kinase	Santa Cruz	Mouse	1:50	
Cytochrome- c	Santa Cruz	Goat	1:400	

Tabella 2.5 Anticorpi primari utilizzati per l'indagine immunostochimica e relative concentrazioni.

2.6 Statistica

Tutti i dati raccolti dalle registrazioni ABR e dalle indagini biometriche sono stati elaborati tramite ANOVA (test di Bonferroni), mentre i dati dei conteggi delle cellule cigliate sono stati analizzati mediante test t di student con l'ausilio del software STATISTICA 7.1 (Statsoft).

Valori di p value inferiori a 0,05 e 0,01 sono stati considerati significativi, mentre valori inferiori a 0,001 sono stati considerati altamente significativi.

Nei grafici le barre rappresentano l'errore standard della media.

3 RISULTATI

3.1 ISCHEMIA CAROTIDEA

Gli animali operati con microchirurgia a livello delle carotidi con occlusione per 5 e 10 minuti non presentavano sofferenze o anomalie comportamentali entro le 3 ore dopo le quali è avvenuto il sacrificio; mentre quelli che hanno subito un'occlusione di 15 minuti mostravano sofferenza e pertanto si è deciso di non continuare con quest'ultimo tempo sperimentale. Per questa ragione alcune analisi non sono state effettuate ma i dati ottenuti da questi due animali sono comunque stati oggetto di studio in questa tesi.

3.1.1 Registrazioni ABR

Come si può notare dai grafici (Fig.3.1, 3.2), analizzando il click e quindi lo stato generale della coclea, si nota che l'ischemia va a causare un innalzamento della soglia uditiva sia a 5 che a 10 minuti, rispettivamente di 7 e 6 dB SPL. Alle singole frequenze si ha una perdita uditiva di circa 5 dB che risulta essere significativa al tempo più basso tranne che ai 2 kHz (Fig.3.1). Con il prolungamento a 10 minuti dell'occlusione, lo spostamento di soglia resta di circa 5 dB, ed è significativo alle basse frequenze (Fig.3.2). E' interessante notare che provocando un'ischemia di 15 minuti sia al click, sia a tutte le frequenze si nota un innalzamento di soglia di più di 10 dB SPL, anche se non significativo probabilmente a causa del ridotto numero di animali. Si nota comunque che con questo tipo di trauma si ha una tendenza al peggioramento con il protrarsi del tempo di occlusione (Fig.3.3).

3.1.2 Real Time PCR

3.1.2.1 *Danno vascolare/coagulativo: TF e TM*

Per quanto riguarda i geni appartenenti alla cascata coagulativa, possiamo dire che si nota un lieve aumento nel tempo dell'mRNA sia del fattore tissutale (TF), ad attività

procoagulante, sia della trombomodulina (TM), ad attività anticoagulante. Essi, infatti, come si nota dal grafico (Fig.3.4) subiscono un primo lieve aumento dopo 5 minuti di ischemia, e un altro piccolo incremento dopo 10 minuti. In entrambi i casi si tratta comunque di una tendenza non significativa.

3.1.2.2 Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α e JNK

Come si può notare dal grafico (Fig.3.5), l'mRNA di hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) subisce un aumento significativo della sua espressione in caso di ischemia di 5 minuti, che permane anche dopo 10 minuti, ma che non risulta essere significativo.

Il JNK aumenta in modo più consistente di HIF-1 α e risulta essere significativo sia dopo 5 che dopo 10 minuti di ischemia (Fig.3.5).

3.1.2.3 Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB

Il pathway apoptotico presenta in questo caso un lieve aumento non significativo di mRNA per B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) dopo 5 minuti di ischemia, ad indicare una probabile risposta antiapoptotica che si attiva in seguito al danno. La caspasi 3 e Nuclear Factor kB (NF-kB) subiscono soltanto un lievissimo incremento (Fig.3.6).

Con l'aumento del tempo di occlusione l'espressione del Bcl-2 resta costante, mentre cresce leggermente anche quella della caspasi 3 e dell'NF-kB, anche se in modo non significativo (Fig.3.6).

3.1.3 Istologia

3.1.3.1 Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina

La conta effettuata sulle sezioni di coclea di animali che avevano subito ischemia non ha rilevato nessuna variazione significativa rispetto agli animali di controllo, né per quanto riguarda le cellule cigliate esterne, né per quanto riguarda le cellule cigliate interne (dati non mostrati).

3.1.3.2 Analisi strutturali: NF200 e MYH-6

La struttura neuronale non ha subito cambiamenti in nessuno dei tempi di occlusione, né per quanto riguarda il corpo cellulare, né per quanto riguarda le fibre nervose, che risultano infatti marcate con neurofilamento-200 (NF200). Dalle tavole 1-4 si possono osservare le fibre nervose integre nel canale del Rosenthal che innervano le IHC. In alcuni casi è possibile vedere anche l'innervazione delle OHC (Tav.3).

Dalle analisi immunohistochimiche per la miosina 6 (MYH-6) si è visto che negli animali di controllo (Tav.5), come in quelli con un'ischemia di 5 (Tav.6) e di 10 minuti (Tav.7) sono marcate le placche cuticolari di tutte le cellule cigliate; mentre in caso di ischemia di 15 minuti (Tav.8) la marcatura della fila esterna delle OHC risulta assente sia all'apice che alla base. Con l'inclusione in resina, che permette una maggior definizione dell'immagine, si è confermato che la parte apicale di quella fila di OHC manca solo nei ratti che avevano subito 15 minuti di occlusione a indicare un probabile danno strutturale correlato con il prolungamento dell'ischemia. Inoltre le cellule cigliate esterne si presentano rigonfie. (Tav.9).

3.1.3.3 Danno vascolare/coagulativo: TF e TM

Il fattore tissutale è un importante iniziatore della cascata coagulativa e viene esposto dall' endotelio solo in caso di danno vascolare, come si può notare dalle tavole non è presente negli animali di controllo (Tav.10A), ma lo diventa in caso di ischemia carotidea. La marcatura nella stria vascolare compare dopo 5 minuti di ostruzione (Tav.10B), e dopo 10 minuti sembra leggermente calare ma si mantiene sempre diffusa (Tav.10C), mentre si localizza solo nelle cellule basali e marginali dopo 15 minuti di occlusione (Tav.10D). Questo può indicare che ci sia un'immediata attivazione della cascata coagulativa dopo il danno, che poi tende ad autolimitarsi.

La proteina anticoagulante, la trombomodulina, ha un'espressione di base a livello dell'endotelio vasale (Tav.11A). Dopo 5 minuti di ischemia carotidea (Tav.11B) essa è ancora presente nell'endotelio, ma compare anche nelle cellule basali della stria vascolare e nelle cellule cigliate e dei pilastri nell'Organo del Corti. Analogamente a quanto accade per il fattore tissutale, la marcatura diventa più lieve a 10 minuti (Tav.11C) e tende quasi a scomparire dopo 15 minuti di ostruzione (Tav.11D), segno

appunto che l'attivazione della cascata coagulativa, anche per la componente anticoagulante, sta terminando.

3.1.3.4 Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α , JNK e pJNK

L'indagine immunohistochimica per la proteina HIF-1 α non ha rilevato alterazioni nel suo pattern di espressione in seguito a ischemia di 5, 10 o 15 minuti (Tav.12), questo può essere imputabile al fatto che questa proteina è sempre espressa nella membrana basilare dell'organo del Corti, l'unica differenza in caso di ipossia è che essa non viene ubiquitinata e quindi degradata.

E' stato quindi opportuno analizzare la presenza di c-Jun N-terminal kinase (JNK) e pJNK per valutare se l'infarto avesse portato all'attivazione dei pathways di ipossia e stress ossidativo. Dalla tavola 13 si nota che la forma inattiva è espressa lievemente nella stria vascolare dai ratti che avevano subito l'ischemia di 5, 10 e 15 minuti, mentre è assente nel controllo, ma è la forma fosforilata che presenta differenze più marcate rispetto al non trattato. E' interessante osservare che il fattore attivato pJNK nei tre tempi di indagine è presente in più zone della coclea come l'endotelio dei vasi sanguigni modiolari, le cellule basali e intermedie della stria vascolare e le cellule cigliate e dei pilastri all'interno dell'Organo del Corti con una marcatura molto evidente (Tav.14).

3.1.3.5 Apoptosi: cyt-c

Il citocromo c (cyt-c) si localizza nei mitocondri, quindi con l'indagine immunohistochimica negli animali di controllo si osserva una marcatura puntiforme. Sia a carico dei corpi cellulari dei neuroni (Tav.15B) che delle cellule della stria vascolare (Tav.15D) essa è distribuita nel citoplasma in modo omogeneo, in quanto questi tipi cellulari sono ricchi di mitocondri; mentre nelle cellule cigliate si localizza lungo il margine cellulare, attorno al nucleo e sotto la placca cuticolare (Tav.15C), zone di maggior attività della cellula. Negli animali che sono stati sottoposti a danno ischemico non si osservano variazioni rispetto al non trattato in tutti i tempi considerati (Tavv.16-18) Questo può significare che l'apoptosi non si attiva in caso di ischemia carotidea con ostruzione di 5, 10 o 15 minuti e successiva riperfusione.

3.2 INFARTO

Gli animali operati con microchirurgia coronarica erano in buone condizioni fisiche e continuavano ad alimentarsi correttamente fino al giorno del sacrificio. In alcuni casi è stata notata una leggera dispnea che non ha però compromesso lo stato di salute generale dell'animale.

3.2.1 Registrosioni ABR

L'occlusione delle coronarie per 3 ore causa un significativo innalzamento della soglia uditiva rilevato con il click di circa 10 dB. Questa lieve ipoacusia è confermata anche dalle registrosioni alle diverse frequenze, dove gli spostamenti più rilevanti si notano alle alte frequenze (Fig.3.7).

La perdita documentata dopo 3 ore dall'occlusione, sembra quasi annullarsi dopo 1 settimana, quando infatti si notano piccoli spostamenti di soglia di 2-3 dB non significativi (Fig.3.8).

E' interessante osservare come dopo 1 mese dall'occlusione la soglia uditiva torni ai livelli pre-operatori, con l'eccezione della frequenza più bassa, i 2KHz, dove si nota una perdita significativa di circa 15 dB (Fig.3.9).

3.2.2 Real Time PCR

3.2.2.1 *Danno vascolare/coagulativo: TF e TM*

Per quanto riguarda i geni appartenenti alla cascata coagulativa, possiamo dire che si nota un lieve aumento nel tempo dell'espressione sia del TF sia della TM dopo 3 ore e dopo 1 settimana di infarto (Fig.3.10). Questa tendenza si mantiene anche dopo 1 mese per quanto riguarda la TM, mentre il TF subisce un incremento ben più alto e altamente significativo.

3.2.2.2 Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α e JNK

Come si può notare dal grafico (Fig.3.11), l'mRNA di HIF-1 α non subisce particolari alterazioni di espressione in caso di occlusione delle coronarie per 3 ore, 1 settimana o 1 mese, è stato infatti documentato un lieve aumento che compare subito dopo 3 ore, si mantiene tale dopo 1 settimana e incrementa ulteriormente dopo 1 mese, ma sempre in modo non significativo.

Per quanto riguarda il JNK sono stati invece notati degli aumenti di espressione più consistenti: esso aumenta infatti dopo 3 ore di infarto, scende leggermente dopo 1 settimana ma diventa poi significativamente molto più espresso dopo 1 mese.

3.2.2.3 Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB

I fattori pro e anti-apoptotici mostrano un lievissimo incremento dopo 3 ore di occlusione, e mentre la caspasi 3 si mantiene sullo stesso livello anche dopo 1 settimana, Bcl-2 e NF-kB scendono fino a valori paragonabili a quelli del controllo. I cambiamenti più interessanti sono stati riscontrati dopo 1 mese di ischemia coronarica, infatti tutti e tre i geni indagati mostrano un incremento nel livello di mRNA, che risulta essere significativo per i fattori pro-apoptotici, ovvero la caspasi 3 e per NF-kB (Fig.3.12).

3.2.3 Istologia

3.2.3.1 Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina

La conta effettuata sulle sezioni di coclea di animali che avevano subito infarto non ha rilevato nessuna variazione significativa rispetto ai controlli, né per quanto riguarda le cellule cigliate esterne, né per quanto riguarda le cellule cigliate interne (dati non mostrati).

3.2.3.2 Analisi strutturali: NF200 e MYH-6

Tutti gli animali infartuati (3 ore, 1 settimana e 1 mese) non presentano differenze rispetto al controllo nella marcatura con NF200 e MYH-6. Infatti l'NF200 evidenzia che sia il corpo cellulare del neurone che le fibre nervose sono integre (Tavv.19-21), anche

nel caso della MYH-6 tutte le cellule cigliate presentano la placca cuticolare marcati (Tavv.22-24). Questo sta ad indicare come sia il ganglio spirale, che l'Organo del Corti, sottoposti a questo tipo di stress, non subiscano alterazioni morfologico-strutturali rilevanti.

3.2.3.3 Danno vascolare/coagulativo: TF e TM

Dalle indagini immunoistochimiche è stato rilevato che il TF non è normalmente presente in quantità rilevabili nelle sezioni di orecchio interno, e ciò non cambia dopo un infarto di 3 ore (Tav.25B). E' però evidente che con un tempo di occlusione prolungato esso va a localizzarsi su tutto lo spessore della stria vascolare dove è infatti presente dopo 1 settimana e dopo 1 mese (Tavv.25C-D).

La trombomodulina, oltre a essere presente in modo fisiologico nell'endotelio vasale (Tav.26A), già 3 ore dopo l'infarto compare nelle cellule basali della stria vascolare e nelle cellule dei pilastri dell'Organo del Corti (Tav.26B). La marcatura si mantiene costante fino a 1 mese (Tav.26C-D). In questo caso si può dire che ci sia stato un danno che ha portato a un lieve aumento dell'attivazione della cascata coagulativa sia nella parte procoagulante che in quella anticoagulante.

3.2.3.4 Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α , JNK e pJNK

Nelle sezioni dei ratti che hanno subito ostruzione coronarica, HIF-1 α è sempre presente nella membrana basilare dell'Organo del Corti, ma la marcatura non mostra grandi differenze rispetto al controllo (Tav.27).

E' stato quindi opportuno anche in questo caso verificare l'eventuale attivazione del pathway ipossico-ossidativo analizzando l'espressione di JNK, il quale è presente in modo lieve nella stria vascolare delle sezioni provenienti dagli animali che avevano subito l'infarto di durata 3 ore e 1 settimana, e scompare dopo 1 mese (Tav.28). Questo potrebbe essere dovuto a un incremento traduzionale di JNK che avviene in caso sia maggiormente richiesta la sua attivazione. Infatti si nota che il pJNK va ad attivarsi in modo molto evidente proprio a questi tempi e soprattutto nella stria vascolare (Tav.29). In particolar modo la marcatura del fattore attivato è visibile nell'endotelio vasale, nelle cellule basali della stria vascolare e nelle cellule cigliate e

dei pilastri dell'Organo del Corti. L'entità della marcatura presenta inoltre una tempodipendenza, sembra infatti diminuire con l'aumentare del periodo di occlusione.

3.2.3.5 Apoptosi: cyt-c

Come gli animali di controllo, quelli che hanno subito l'infarto a tutti i tempi testati (Tavv.30-32) mostrano una marcatura puntiforme che si distribuisce in modo omogeneo nel citoplasma neuronale e delle cellule della stria vascolare e in modo localizzato nelle cellule cigliate. Neanche questo tipo di danno vascolare va ad attivare l'apoptosi per via intrinseca.

3.3 RUMORE

Gli animali che sono stati esposti al rumore non presentavano sofferenze né anomalie comportamentali e sono arrivati al giorno del sacrificio in ottime condizioni e continuando ad alimentarsi correttamente.

3.3.1 Registrazioni ABR

Le soglie uditive sono state monitorate mediante le registrazioni elettrofisiologiche ABR prima e dopo l'esposizione al rumore e per circa un mese (pre, post1, post7, post14, post21).

Gli animali esposti al rumore con intensità di 115 dB SPL mostrano una TTS (temporary threshold shift) di 50 dB altamente significativa il giorno dopo il trauma (Fig.3.13), verificato sia con il click che a tutte le frequenze. Questo spostamento di soglia è parzialmente recuperato 7 giorni dopo l'esposizione, infatti il danno si stabilisce intorno ai 20 dB (Fig.3.14). Questa PTS (permanent threshold shift) rimane tale dopo 14 e dopo 21 giorni (Fig.3.15-3.16). E' importante sottolineare che a tutti i tempi testati la perdita uditiva più significativa è sempre localizzata alle alte frequenze.

3.3.2 Real Time PCR

3.3.2.1 *Danno vascolare/coagulativo: TF e TM*

L'mRNA dei geni della cascata coagulativa subisce un notevole aumento di espressione a 1 giorno dall'esposizione al rumore, significativo per TF e altamente significativo per la TM. Questi valori tendono a tornare ai livelli del controllo dopo 14 giorni per poi risalire dopo 21 giorni dal trauma(Fig.3.17).

3.3.2.2 *Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α e JNK*

Osservando il grafico in Fig.3.18 si nota come subito dopo 1 giorno dal rumore ci sia una overespressione del gene che codifica per i marcatori dell'ipossia e dello stress ossidativo, in particolar modo si vede come l'aumento sia significativo per JNK. Al post-14 l'mRNA di HIF-1 α si mantiene su livelli paragonabili con quelli di 1 giorno, mentre il JNK cala e torna a essere espresso come nel controllo. Dopo 21 giorni dal rumore entrambi i geni aumentano nuovamente la loro espressione, anche se in modo non significativo.

3.3.2.3 *Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB*

Come si nota dal grafico (Fig.3.19), l'esposizione al rumore causa al post-1 un incremento notevole dell'espressione dei geni sia pro- che anti-apoptotici. Infatti è stato rilevato un incremento dell'mRNA della caspasi 3 altamente significativo, e un aumento significativo di Bcl-2 ed NF-kB. Dopo 14 giorni dall'esposizione i livelli tornano a essere paragonabili con il non trattato, mentre dopo 21 giorni aumentano nuovamente, seppur non raggiungendo valori elevati come dopo 1 giorno.

3.3.3 Istologia

3.3.3.1 *Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina*

In caso di trattamento con il rumore, è stato notato un calo nella presenza di cellule cigliate esterne nucleate alla base della coclea (Fig.3.20), quindi il danno uditivo che gli

animali hanno presentato è da imputare a una perdita di funzionalità delle cellule cigliate, i veri e propri trasduttori del segnale acustico.

Come si può notare dal grafico, si vede come questo calo nella zona basale inizi già dopo un giorno dal rumore, vada ad aumentare dopo 14 e si mantenga stabile dopo 21 quando si instaura la PTS. Tramite il test t di student è stata verificata la significatività dei dati, e si è visto che la perdita diventa significativa dopo 14 giorni e lo resta anche dopo 21.

3.3.3.2 Analisi strutturali: NF200 e MYH-6

L'immunoistochimica per il neurofilamento 200 presenta una marcatura normale nelle sezioni dai ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 1, 14 e 21 giorni, indicando che la perdita uditiva non va a modificare la struttura dei neuroni e delle fibre nervose (Tavv.33-35).

L'anticorpo per la miosina 6, come detto in precedenza, marca la placca cuticolare delle cellule cigliate, anche nel caso in cui il nucleo risulta mancante o danneggiato. Per questa ragione è stata effettuata l'indagine immunoistochimica per questa proteina anche nelle sezioni dei ratti esposti al rumore, nonostante fosse stato rilevato un minor numero di cellule cigliate presenti.

Anche in questo caso si nota che la placca cuticolare viene sempre marcato, in tutti e tre i tempi di esposizione al rumore, e quindi non è danneggiato (Tav.36-38).

3.3.3.3 Danno vascolare/coagulativo: TF e TM

Negli animali esposti al rumore non si osserva nessuna marcatura per il TF, come osservato nei controlli (Tav.39).

Anche per la trombomodulina non si documentano cambiamenti rispetto al controllo, si nota infatti che la marcatura è presente solo a livello dell'endotelio vasale, e mostra solo un lieve aumento negli animali sacrificati dopo 14 giorni. Una cosa interessante si nota invece dopo 21 giorni dall'esposizione al rumore, infatti nelle sezioni di questi animali la marcatura scompare del tutto (Tav.40).

3.3.3.4 Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α , JNK e pJNK

Nelle sezioni cocleari dei ratti esposti al rumore, HIF-1 α è sempre presente nella membrana basilare dell'Organo del Corti, e non si evidenziano particolari cambiamenti rispetto al controllo (Tav.41). Si nota però che c'è un lieve incremento dell'espressione di JNK al post-21, in particolar modo nelle cellule basali della stria vascolare (Tav.42). Questo è indice di un lieve incremento traduzionale di JNK che compare solo quando il danno è irreversibile, quindi a 21 giorni. Per quanto riguarda il pJNK invece, vediamo che esso presenta una marcatura lievissima nelle cellule basali della stria vascolare e nelle cellule cigliate e dei pilastri dell'Organo del Corti dopo 1 giorno dal trattamento con il rumore, marcatura che diventa però molto più evidente, e presente anche nell'endotelio vasale dopo 14 giorni, e che sembra calare dopo 21 giorni (Tav.43).

3.3.3.5 Apoptosi: cyt-c

A tutti i tempi testati le sezioni di coclea degli animali esposti al rumore mostrano una marcatura mitocondriale, in quanto si nota anche qui il classico pattern puntiforme a carico delle cellule cigliate, e la distribuzione omogenea nei neuroni e nelle cellule della stria vascolare (Tavv.44-46).

3.4 CISPLATINO

Gli animali cui è stato somministrato il cisplatino non presentavano sofferenze né anomalie comportamentali e sono arrivati al giorno del sacrificio in ottime condizioni e continuando ad alimentarsi correttamente. L'approccio a 3 somministrazioni consecutive di cisplatino era stato scelto proprio per questo motivo, in quanto esperimenti precedenti avevano messo in luce come un'unica somministrazione di 14 mg/Kg aumentasse molto la mortalità degli animali e la tossicità del farmaco per gli organi interni (Cascella, 2012).

3.4.1 Registrazioni ABR

Come si nota dal grafico (Fig.3.21), il cisplatino causa una notevole perdita di udito, evidenziabile sia attraverso il click, che con le misurazioni alle diverse frequenze. In

particolar modo, si nota come alla fine del trattamento cumulativo con il chemioterapico ci sia una perdita di circa 15 dB alle basse frequenze e una di circa 30 dB alle alte, che risulta essere altamente significativa. Il danno sembra quindi essere localizzato prevalentemente alla base cocleare.

3.4.2 Real Time PCR

3.4.2.1 *Danno vascolare/coagulativo: TF e TM*

Il trattamento con il cisplatino causa un aumento altamente significativo dell'mRNA per il TF, mentre la TM resta su livelli paragonabili con quelli del non trattato (Fig.3.22). Questo farmaco sembra quindi stimolare in misura maggiore la trascrizione della componente procoagulante della cascata.

3.4.2.2 *Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α e JNK*

Nelle coclee degli animali cui è stato somministrato il cisplatino si nota un aumento dell'espressione dei geni coinvolti nei processi ipossici e ossidativi, il quale è evidente soprattutto per il JNK, che risulta essere più che duplicato (Fig.3.23).

3.4.2.3 *Apoptosi: Caspasi 3, Bcl-2 e NF-kB*

Il pathway apoptotico presenta molte modificazioni dopo il trattamento con il cisplatino, infatti si nota un aumento del trascritto di tutti e tre i geni analizzati, in particolar modo caspasi 3 e NF-kB aumentano in modo altamente significativo, mentre Bcl-2 aumenta in modo significativo, anche se molto meno rispetto agli altri due geni (Fig.3.24). Sembra quindi essere favorita la componente pro-apoptotica.

3.4.3 Istologia

3.4.3.1 *Conta delle cellule cigliate su sezioni colorate con ematossilina-eosina*

Anche il cisplatino causa un danno alle cellule cigliate esterne alla base della coclea, tanto da provocare una perdita di OHC nucleate pari al 30%, che risulta essere

altamente significativa (Fig.3.25) e che incide fortemente sull'ipoacusia documentata con l'ABR.

3.4.3.2 Analisi strutturali: NF200 e MYH-6

Il trattamento con il cisplatino non ha portato a modificazioni strutturali né per quanto riguarda la componente neuronale, né per quanto riguarda le cellule cigliate. Infatti, come si può notare dalle tavole (Tav.47) non ci sono cambiamenti nel pattern di espressione di NF200 nei neuroni e nelle fibre assonali, tanto che si osservano anche le fibre che giungono alle OHC. Anche l'espressione della miosina 6 nella placca cuticolare delle cellule cigliate rimane normale (Tav.48). Anche in questo caso è da ricordare che una diminuzione delle cellule cigliate nucleate contate sulle sezioni colorate con ematossilina-eosina non è direttamente correlata all'assenza o meno della placca cuticolare.

3.4.3.3 Danno vascolare/coagulativo: TF e TM

Il cisplatino induce un aumento della marcatura per il fattore tissutale nella stria vascolare in tutto il suo spessore, quindi coinvolge sia le cellule basali e marginali, sia quelle intermedie (Tav.49).

La trombomodulina mantiene la sua espressione di base nell'endotelio dei vasi come negli animali di controllo (Tav.50).

3.4.3.4 Danno ipossico e ossidativo: HIF-1 α , JNK e pJNK

Come tutti gli altri trattamenti sperimentali, anche quello con il cisplatino non ha portato a modifiche della marcatura rilevabili per la proteina HIF-1 α (Tav.51), ma a differenza degli altri casi, è da notare una variazione sostanziale nell'espressione del JNK. Infatti negli animali trattati con il chemioterapico si osserva una marcatura del JNK nelle cellule basali e marginali della stria vascolare, che si presenta anche sulle cellule cigliate interne ed esterne (Tav.52). Come conseguenza anche la sua forma attivata pJNK si ritrova nelle stesse zone, oltre a comparire nell'endotelio dei capillari modiolari (Tav.53).

3.4.3.5 Apoptosi: cyt-c

Come si osserva dalla tavola 54, nelle cellule cigliate la marcatura non è più puntiforme e localizzata, ma si diffonde in modo omogeneo in tutto il citoplasma, mentre nella stria vascolare si osservano degli accumuli di marcatura in particolare nelle cellule marginali. Questi fenomeni sono probabilmente imputabili alla fuoriuscita della proteina dai mitocondri, indice che il trattamento con il cisplatino attiva la via intrinseca dell'apoptosi.

4. DISCUSSIONE

L'ipoacusia è sempre più diffusa in Italia, ne consegue che il costo sociale di questa patologia è in costante aumento. Le cause sono principalmente i diversi fattori che causano stress ossidativo, come il rumore, le infezioni e i farmaci ototossici. Recentemente ipossia e ischemia sono state indicate come possibili fattori che concorrono nell'eziologia della sordità, ma nonostante questo non sono ancora state adeguatamente studiate a livello sperimentale.

Lo scopo del lavoro esposto in questa tesi è stato quello di mettere a punto dei modelli animali di danno ischemico utilizzabili per lo studio del danno vascolare dell'orecchio interno, e di caratterizzarlo al meglio sfruttando il confronto con altri modelli di danno ototossico, molto ben caratterizzati dal punto di vista delle vie apoptotiche e ossidative.

4.1 Ischemia

Dalla letteratura è noto che il danno ipossico-ischemico può andare a causare perdita di udito e altri disturbi all'orecchio interno come l'acufene, inducendo alterazioni del flusso sanguigno cocleare (Thorne e Nuttall, 1987; Scheibe et al., 1993, 1997; Lamm e Arnold, 1996; Orita et al., 2002). Nel modello animale di topo è stato dimostrato che disturbi del flusso sanguigno, provocati dalla presenza di placche aterosclerotiche, causano sordità, effetto che è stato confermato anche da studi clinici sull'uomo (Yoshioka et al., 2010). Con il presente studio si dimostra che l'ischemia carotidea può portare una perdita di udito significativa, seppur la differenza di soglia rimanga nell'ordine dei 5-10 dB. In particolare si può ipotizzare che il danno ischemico, causato da occlusione delle carotidi comuni, agisca soprattutto sulle frequenze più gravi, e quindi sulla zona apicale della coclea, in quanto lo spostamento di soglia risulta significativo alle basse e alte frequenze in caso di ischemia di 5 minuti, e alle basse frequenze dopo 10 minuti. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che il circolo cocleare è un sistema chiuso e terminale, che, durante condizioni ischemiche, potrebbe determinare un minor apporto sanguigno all'apice, ragion per cui questa

regione potrebbe risentire per prima della carenza di apporto di ossigeno e nutrienti. Tale ipotesi è rafforzata dal fatto che anche in seguito ad un'ischemia di 15 minuti si è notato un maggiore spostamento di soglia alle basse frequenze. Da notare che in questo caso i dati non risultano significativi probabilmente solo a causa del basso numero di animali impiegati per questo tempo.

E' inoltre provato che l'ipossia e l'ischemia causano sordità inducendo la perdita di cellule cigliate, anche se gli studi riportati in letteratura sono contraddittori. In caso di ipossia, infatti, alcuni autori sostengono che prima sono coinvolte le IHC e solo in seguito le OHC, mentre altri dimostrano come i due tipi di cellule cigliate vengano danneggiati contemporaneamente (Shirane e Harrison, 1987; Cheng et al., 1999). Tutti gli autori, invece, concordano sul fatto che se la sola ipossia o la semplice deprivazione di glucosio portano a danni in tempi molto lunghi (Cheng et al., 1999; Mazurek et al., 2003), la combinazione dei due fattori, che si ha nell'ischemia, aumenta drammaticamente la perdita di cellule cigliate e di conseguenza l'ipoacusia (Mazurek et al., 2003).

Il presente studio conferma che l'ischemia danneggia le cellule cigliate, infatti, anche se non è stata notata una vera e propria diminuzione del numero di queste cellule, dopo 15 minuti sono state documentate delle alterazioni morfologiche quali rigonfiamento delle cellule e danneggiamento della placca cuticolare sulla terza fila delle OHC, che non risultano marcati con l'anticorpo per la miosina 6. Perciò, si può affermare che nel modello animale sviluppato in questo studio la durata dell'ischemia ha un ruolo importante nel danneggiamento delle cellule cigliate, come già dimostrato da Chia-Der e collaboratori nel modello animale di Guinea pig sottoposti a ischemia (occludendo l'arteria labirintica) per tempi molto lunghi (Chia-Der et al., 2010).

Il danno strutturale a carico delle cellule cigliate è imputabile sia all'evento ipossico quanto allo stress ossidativo che si sviluppa in seguito alla riperfusione successiva all'ischemia temporanea. È stato infatti dimostrato che in caso di ischemia e riperfusione l'espressione dell'mRNA di hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) aumenta (Wang et al., 2012), e che questo, unitamente alla presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS), può indurre l'espressione delle mitogen-activated protein (MAP) Kinase e in particolar modo di JNK. In particolar modo, Jeong e colleghi (2005) hanno

documentato che l'ipossia causa un'overespressione degli mRNA di HIF-1 α e di c-Jun N-terminal kinase (JNK) in linee cellulari dell'orecchio interno. Quest'ultimo poi una volta fosforilato è in grado di attivare pathways apoptotici o di sopravvivenza cellulare. Il presente studio conferma questi dati, in quanto, sia nell'ischemia di 5 che in quella di 10 minuti, l'mRNA di HIF-1 α risulta incrementato rispetto al controllo, così come quello di JNK, a indicare la produzione di ROS. Inoltre tramite immunoistochimica è stata documentata una massiva fosforilazione di JNK, effetto che era stato rilevato anche da Kuan e colleghi (2003) in seguito ad un occlusione unilaterale della carotide comune nel topo. E' quindi probabile che l'attivazione del JNK favorisca la sopravvivenza cellulare, in quanto non sono state notate modificazioni nell'espressione dei geni coinvolti nell'apoptosi, né tramite Real-Time PCR, né mediante immunoistochimica.

In letteratura non sono presenti studi riguardanti il coinvolgimento nell'orecchio interno dei fattori della coagulazione in seguito ad un evento ischemico, in questo studio si osserva un lieve incremento sia del fattore tissutale (TF) che della trombomodulina (TM), a indicare un equilibrio tra la componente procoagulante e quella anticoagulante. L'aumento del fattore tissutale è indice di un probabile danno vascolare, mentre quello della TM suggerisce che in seguito a questo stress sia stata stimolata un'attivazione della via anticoagulante per permettere il ripristino delle condizioni fisiologiche.

4.2 Infarto

Il danno ischemico provocato da sutura parziale della coronaria sinistra presenta notevoli differenze rispetto all'ischemia carotidea presa in esame in questo studio, in quanto non vi è riperfusione e si tratta di un danno permanente che può essere definito come una condizione cronica dell'animale. Dall'indagine elettrofisiologica è emersa una significativa ma temporanea perdita di udito che si verifica appena si manifesta l'ischemia cardiaca (ovvero dopo un infarto di 3 ore), ma che viene recuperata in seguito con il cronicizzare del danno, come se si manifestasse una sorta di adattamento alla patologia. L'innalzamento di soglia che si presenta dopo un mese

alle basse frequenze potrebbe invece essere considerato permanente, e, come visto per l'ischemia, essere dovuto alla particolarità del circolo cocleare che è chiuso e terminale.

Bogdanov et al. (2003) hanno dimostrato che in condizioni patologiche pro-trombotiche, come infarto del miocardio e sepsi, si ha un'overespressione del TF a livello vascolare. Anche in questo modello di infarto si presume si sia instaurato un danno a livello endoteliale documentato da un aumento dell'mRNA e della proteina di TF già dopo 1 settimana dall'ischemia coronarica, che si accresce dopo 1 mese. Il lieve aumento della TM, sia dell'RNA che della proteina, potrebbe invece essere imputabile all'innesco della coagulazione da parte del TF, a cui consegue un processo di feedback negativo che porta all'attivazione delle componenti anticoagulanti.

Per quanto riguarda i danni dovuti ad ipossia e stress ossidativo si nota anche in questo tipo di danno ischemico un aumento di HIF-1 α che causa un incremento di JNK e della sua fosforilazione per innescare una risposta allo stress come documentato anche da Jeong et al. (2005). La cosa interessante è che i lievi aumenti dell'mRNA di JNK e della relativa proteina inattiva evidenziati entro una settimana dall'infarto potrebbero essere dovuti alla richiesta di proteina da fosforilare, infatti si nota contestualmente una massiccia fosforilazione di JNK nell'infarto dopo 3 ore e 1 settimana. Dopo un mese dall'induzione dell'infarto la richiesta tende probabilmente ad aumentare in quanto l'espressione della proteina è molto inferiore rispetto a prima sia nella forma inattiva che attivata, e per questo il gene viene trascritto in modo più consistente. In seguito l'mRNA prodotto sarà disponibile per la traduzione e quindi la proteina potrà svolgere le proprie funzioni.

Il JNK non è soltanto un attivatore dell'apoptosi, ma può essere esso stesso attivato dalle proteine del processo di morte programmata, ad esempio è stato dimostrato che la caspasi 3 può attivare delle chinasi specifiche per il JNK che ne incrementano l'attivazione (Cardone et al., 1997). Nel presente studio si può notare che la caspasi 3 aumenta significativamente dopo 1 mese di infarto, probabilmente per via della maggiore richiesta di JNK da attivare, e che anche un altro fattore pro-apoptotico, NF- κ B, mostra un incremento significativo dell'espressione di mRNA. L'aumento di questi due fattori, oltre a favorire l'espressione di JNK, indica l'attivazione del processo

apoptotico. Infine a rafforzare l'ipotesi dell'attivazione del processo apoptotico vi è il fatto che NF- κ B può essere attivato dall'ipossia, e quindi sembra suggerire che a tempi prolungati di ischemia, come appunto l'infarto di 1 mese, si possa attivare il pathway apoptotico (Fitzpatrick et al., 2011).

4.3 Rumore

Diversi autori hanno dimostrato che, in seguito a trauma acustico molto intenso, nella coclea vengono prodotti ROS in grado di danneggiare le cellule cigliate e di innescare meccanismi ischemici (Hu et al.; 2000; Nicotera et al., 2002; Henderson et al., 2006).

Nel presente studio la perdita di udito rilevata mediante elettrofisiologia denota un TTS dopo un giorno dal rumore, quando in effetti raggiunge picchi di circa 50 dB. Nei giorni successivi diventa permanente (PTS) ma di minore gravità. Infatti, dopo 7 giorni, restando comunque significativa, si stabilisce intorno ai 20 dB, e rimane tale anche dopo 14 e 21 giorni. È noto che le prime cellule cigliate a essere colpite sono quelle esterne del giro basale, e solo in un secondo momento il danno coinvolge anche le interne (Martini et al, 2011). Anche nel presente lavoro (a conferma dei risultati elettrofisiologici che mostravano come la perdita di udito più consistente si localizzava alle alte frequenze, e quindi proprio alla base della coclea) è stata dimostrata una significativa perdita di cellule cigliate esterne nel giro basale, che inizia già dopo 1 giorno dall'esposizione al rumore, per aumentare dopo 14 giorni e stabilizzarsi dopo 21. Si può quindi dire che c'è un'iniziale perdita di OHC quando si manifesta il danno temporaneo, che peggiora quando si ha una perdita di udito permanente.

È stato recentemente provato che il trauma acustico da cui può insorgere l'ipoacusia può derivare da un meccanismo ischemico, causando danni vascolari. Il rumore rende infatti l'ambiente cocleare ipossico, effetto che si protrae anche una volta terminato il rumore, e che attiva pathways di sopravvivenza cellulare e di neoangiogenesi (Shi, 2009).

Nel presente studio è stato rilevato un danno vascolare mediante Real-Time PCR, in quanto si nota un aumento della trascrizione di TF e TM dopo 1 giorno dall'esposizione al rumore, che però non si traduce anche in un aumento della proteina. Questo può

essere dovuto al fatto che il danno iniziale causa un utilizzo delle proteine della cascata coagulativa rendendo necessaria la produzione di altro mRNA, che può servire nelle fasi successive. Infatti si nota anche un lieve aumento della proteina TM dopo 14 giorni dall'esposizione. Dopo 21 giorni l'mRNA della trombomodulina subisce un altro aumento, che corrisponde alla totale mancanza di proteina nella sezione istologica, suggerendo un nuovo bisogno di proteina disponibile. Anche in questo studio sperimentale l'ipoacusia potrebbe avere quindi un'eziologia vascolare e ischemica.

L'ambiente cocleare è ipossico e questo è dimostrato dall'aumento progressivo dell'mRNA di HIF-1 α che si nota dopo l'esposizione al rumore e fino ai 21 giorni successivi. Si nota inoltre che vi è un aumento della presenza del trascritto del JNK già dopo 1 giorno dall'esposizione, che poi torna a calare nel tempo. È interessante notare che lo stesso andamento si ha nell'espressione della proteina, anche se più ritardato temporalmente, infatti l'aumento del JNK attivato si ha 14 giorni dopo il rumore, e torna a calare dopo 21: probabilmente l'overespressione dell'mRNA notata dopo un giorno era necessaria per avere maggiore disponibilità di questo fattore da attivare. Inoltre il pJNK è coinvolto nel pathway dell'apoptosi e l'aumento del suo trascritto dopo 1 giorno si può correlare con l'incremento degli mRNA di caspasi 3, NF- κ B, e in modo più consistente di Bcl-2, che sembrano suggerire un'attivazione del pathway dell'apoptosi già dopo 1 giorno dal rumore. L'aumento della trascrizione della proteina antiapoptotica Bcl-2 potrebbe suggerire un ruolo di pJNK nell'attivazione di questa via verso la sopravvivenza cellulare, riscontrabile anche nel parziale recupero dell'udito.

4.4 Cisplatino

Il cisplatino (CDDP) è uno dei farmaci più tossici per l'orecchio interno, provoca sordità soprattutto nei bambini con perdita di udito neurosensoriale progressiva, bilaterale e irreversibile (Saito e Aran, 1994; Sone, 1998). I fattori che determinano l'incidenza di ototossicità comprendono: via di somministrazione, dose cumulativa, età, fattori dietetici, livelli di proteine sieriche, fattori genetici (Sakamoto, 2000). Anche in questo studio sperimentale il cisplatino ha causato una notevole perdita di udito, con un calo

medio di circa 15 dB, che però raggiunge i 30 dB alla base. Come verificato precedentemente da Schacht e colleghi (2012), l'ototossicità del CDDP si manifesta in particolare con la perdita progressiva delle OHC, dalla base all'apice della coclea, che determina la perdita uditiva. Le presenti analisi hanno confermato questi dati, rilevando una perdita delle cellule cigliate alla base, come atteso dai dati elettrofisiologici.

Il cisplatino, oltre ad essere tossico per diversi distretti dell'organismo, causa danni a livello vascolare, come ad esempio trombosi o altri disturbi della coagulazione (Dieckmann et al., 2011).

Anche nel presente studio è stata rilevata una anomalia nello stato coagulativo del sangue, infatti sia mediante quantitative Real-Time PCR che mediante immunoistochimica si nota come ci sia un aumento dell'espressione di TF, ad attività procoagulante. Inoltre, la TM subisce una lieve diminuzione per quando riguarda il livello di mRNA, mentre la proteina non presenta variazioni rispetto al controllo. Questo suggerisce che il cisplatino potrebbe causare nella coclea un ambiente protrombotico che può influire sulla trasduzione del segnale acustico.

E' noto che il cisplatino esercita la sua tossicità anche mediante la formazione di ROS come l'anione superossido (O_2^-) e l'ossido nitrico (NO), a causa della soppressione che esercita sull'attività degli enzimi antiossidanti (Clerici et al., 1996; Rybak et al., 1999); e anche nella nostra analisi è risultato che vi è un incremento dell'attività dei ROS. Infatti, sebbene HIF-1 α non subisca incrementi né a livello di mRNA né di proteina, vi è un'aumentata trascrizione e traduzione di JNK, che si traduce in un incremento della sua fosforilazione e attivazione. Questo fattore, come menzionato in precedenza, è coinvolto nell'apoptosi, sia in quanto la può stimolare in situazioni di stress, sia in quanto può essere fosforilato da MAP chinasi attivate dalla caspasi 3 (Cardone et al., 1997). In effetti, dai nostri studi è emersa anche una massiva attivazione del pathway apoptotico, verificato con un aumento altamente significativo della trascrizione di caspasi 3 e NF- κ B, contrastato da un incremento significativo ma molto inferiore del fattore anti-apoptotico Bcl-2. E' stato inoltre possibile stabilire che l'apoptosi è stata attivata mediante la via intrinseca o mitocondriale, in quanto il citocromo c ricercato mediante immunoistochimica si presenta diffuso a livello citosolico.

4.5 Confronti

Si può affermare che sia l'infarto quanto l'ischemia vanno a causare una significativa, seppur lieve, perdita di udito, che si localizza per entrambi all'apice della coclea.

In entrambi i casi si ha una lieve induzione della cascata coagulativa, sia nella sua parte procoagulante che in quella anticoagulante, e un'attivazione del JNK, fattore di trascrizione che si attiva in caso di stress e che sembra portare in questo caso a meccanismi di sopravvivenza in quanto non vi è induzione di apoptosi. In particolar modo è in caso di infarto di un mese che si ha un maggiore incremento del TF ad attività procoagulante, che indica come il cronicizzare del danno porti a un'attivazione patologica della cascata coagulativa. Si nota anche un maggiore aumento del trascritto di JNK e dei geni coinvolti nell'apoptosi, indice che con il prolungarsi della condizione ischemica potrebbe essere stata indotta la morte cellulare programmata.

Solo nel caso dell'ischemia si ha un danneggiamento delle cellule cigliate, che perdono la placca cuticolare, mentre in caso di infarto non ci sono danni alle stesse. Questo può essere dovuto al fatto che l'ischemia carotidea che abbiamo indotto è un'occlusione completa e temporanea, mentre quella coronarica è parziale e permanente, cosa che può indurre fenomeni di adattamento o portare a danni strutturali in modo più lento.

Anche i danni da rumore e da cisplatino presentano una componente vascolare, ma mentre nel rumore l'aumento di espressione dei geni coinvolti si presenta solo a livello di mRNA e solo a un giorno dall'esposizione, dopo somministrazione di cisplatino si nota un aumento del TF sia a livello di mRNA, sia di proteina, che comporta un'alterata attivazione della cascata coagulativa.

In questi due tipi di danno si ha, a differenza dell'ischemia e dell'infarto, un'attivazione dell'apoptosi, rilevata con l'aumento del trascritto dei geni coinvolti. E' però da notare che, mentre nel rumore viene favorita la parte anti-apoptotica e quindi la sopravvivenza cellulare, nel cisplatino si ha una consistente attivazione dei fattori pro-apoptotici, come confermato anche dalla migrazione del citocromo c dai mitocondri al citosol, soprattutto nelle cellule cigliate. L'attivazione dell'apoptosi si traduce infatti

4. Discussione

anche in una consistente perdita delle OHC rilevata dalle sezioni istologiche, che portano a una ipoacusia molto più consistente rispetto ai modelli di ischemia.

5. CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI

Concludendo si può affermare che i due modelli di ischemia da noi messi a punto sono validi per lo studio del danno vascolare nell'orecchio interno, che sono in grado di indurre un danno uditivo e una modificazione dell'espressione genica di fattori coinvolti nello stress ossidativo e nella coagulazione. Inoltre, il confronto con altri due modelli molto utilizzati per lo studio della sordità ci ha permesso di individuare in modo più specifico i pathways coinvolti, di effettuare confronti mirati e di studiare in modo più approfondito e con approcci diversi i due modelli già esistenti .

Possiamo quindi dire che tutti i tipi di danno vanno ad agire sull'orecchio interno con dei meccanismi vascolari e ossidativi, seppur in modi diversi tra loro. Lo stress che ne deriva può portare alla sopravvivenza cellulare o all'apoptosi se il danno è troppo ingente e quindi non recuperabile.

In futuro sarà opportuno andare a studiare l'attivazione dell'apoptosi, della coagulazione e dei fattori coinvolti nello stress ossidativo anche mediante Western Blot, in modo da quantificare la presenza delle proteine di interesse.

6. GRAFICI E TAVOLE

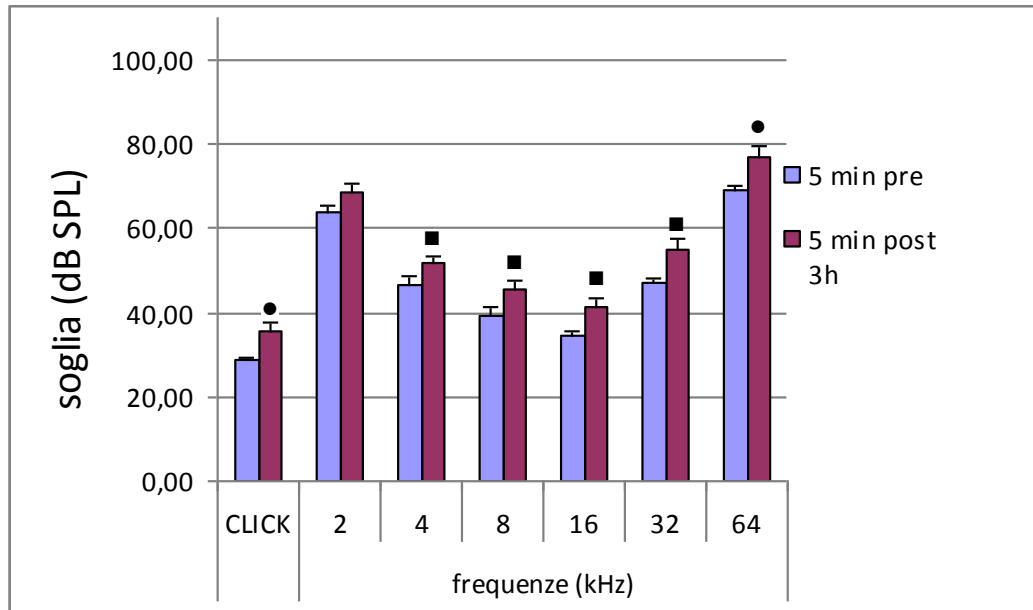


Figura 3.1 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'occlusione di 5 minuti delle carotidi comuni e dopo 3 ore dalla riperfusione. Significatività calcolata rispetto al valore pre: ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$); ● = valori statistici significativi ($p < 0,01$).

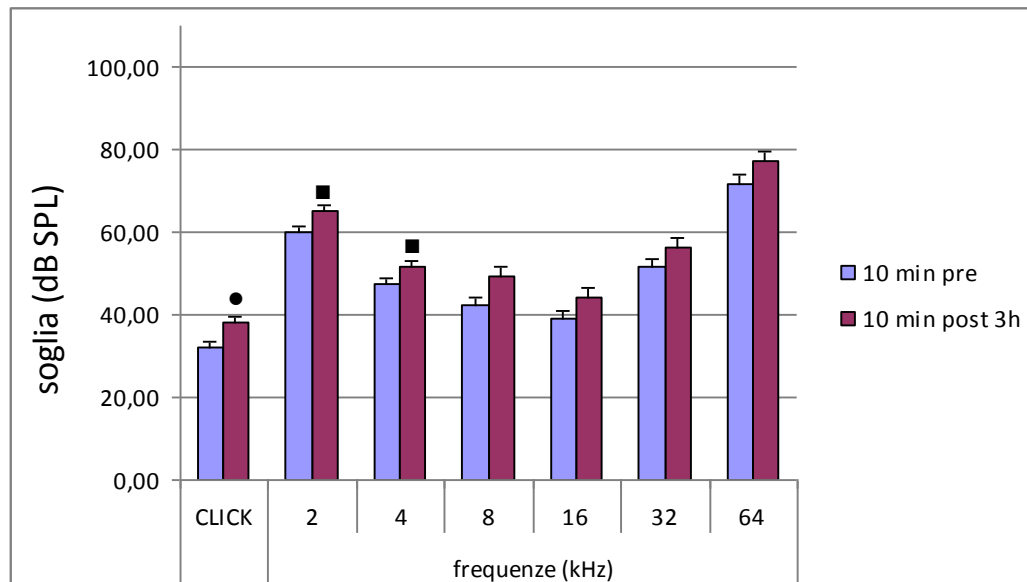


Figura 3.2 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'occlusione di 10 minuti delle carotidi comuni e dopo 3 ore dalla riperfusione. Significatività calcolata rispetto al valore pre: ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$); ● = valori statistici significativi ($p < 0,01$).

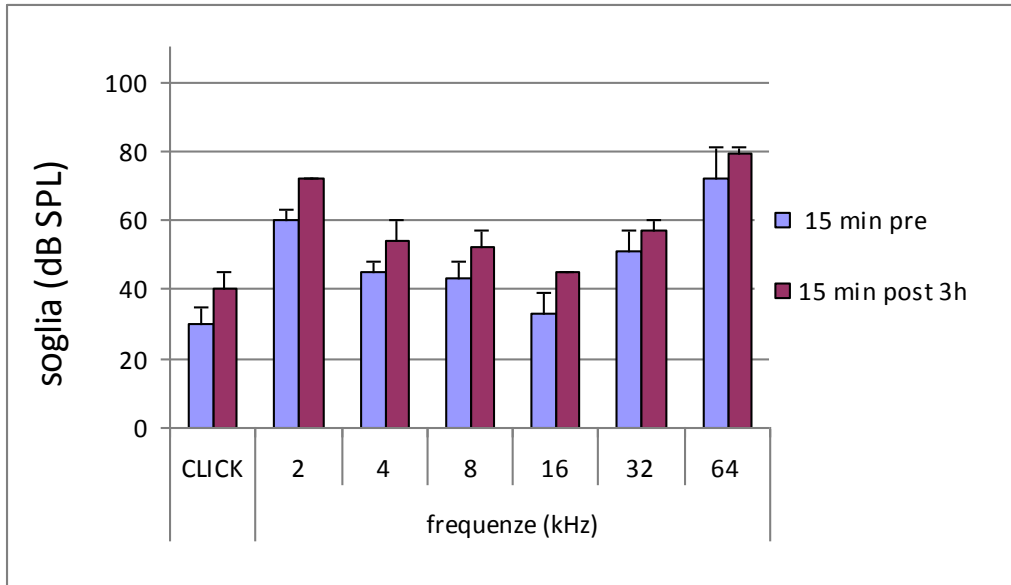


Figura 3.3 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'occlusione di 15 minuti delle carotidi comuni e dopo 3 ore dalla riperfusione.

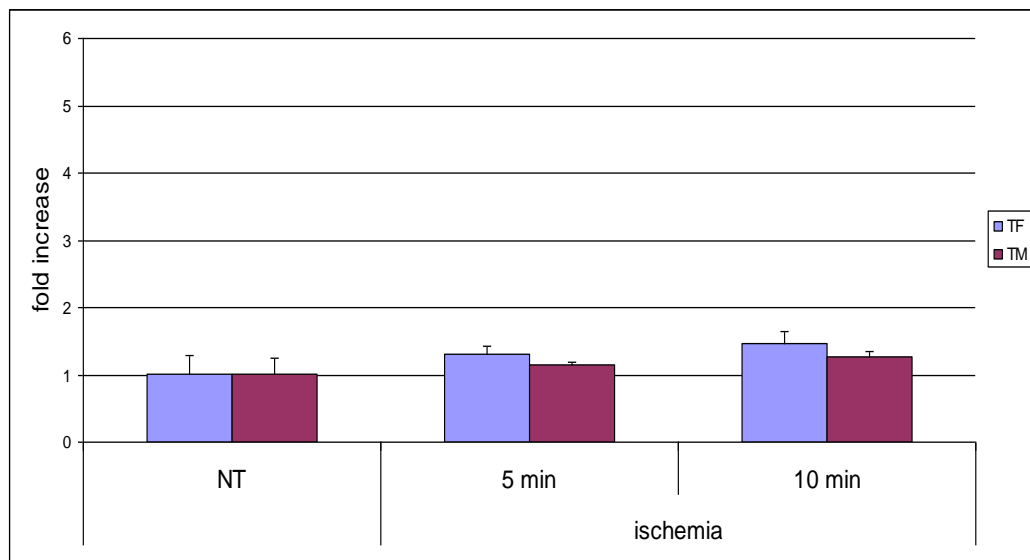


Figura 3.4 Espressione genica delle proteine coinvolte nell'ipossia e nello stress ossidativo rilevata mediante Real-Time PCR in caso di ischemia. I valori sono relativi al NT (=1).

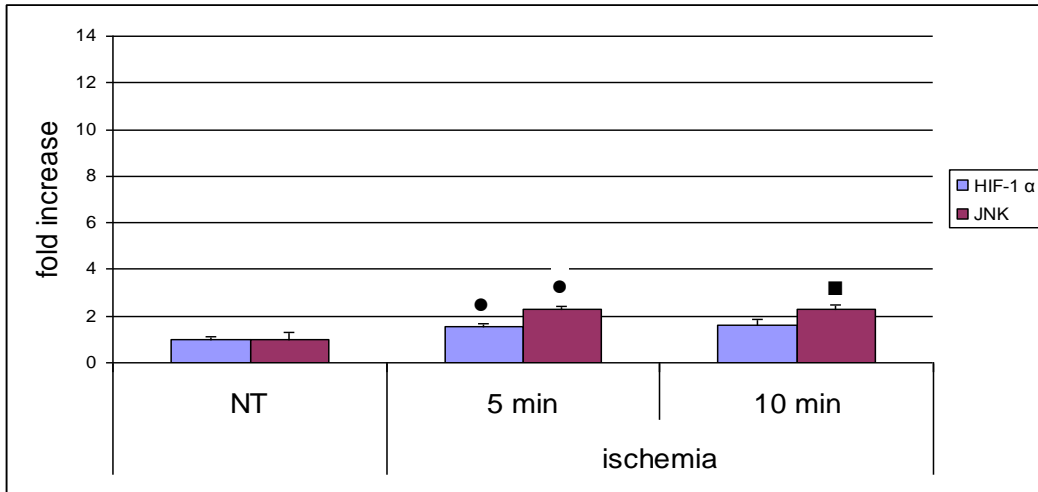


Figura 3.5 Espressione genica delle proteine coinvolte nell'ipossia e nello stress ossidativo rilevata mediante Real-Time PCR in caso di ischemia. I valori sono relativi al NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: ● = valori statistici significativi ($p < 0,01$); ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

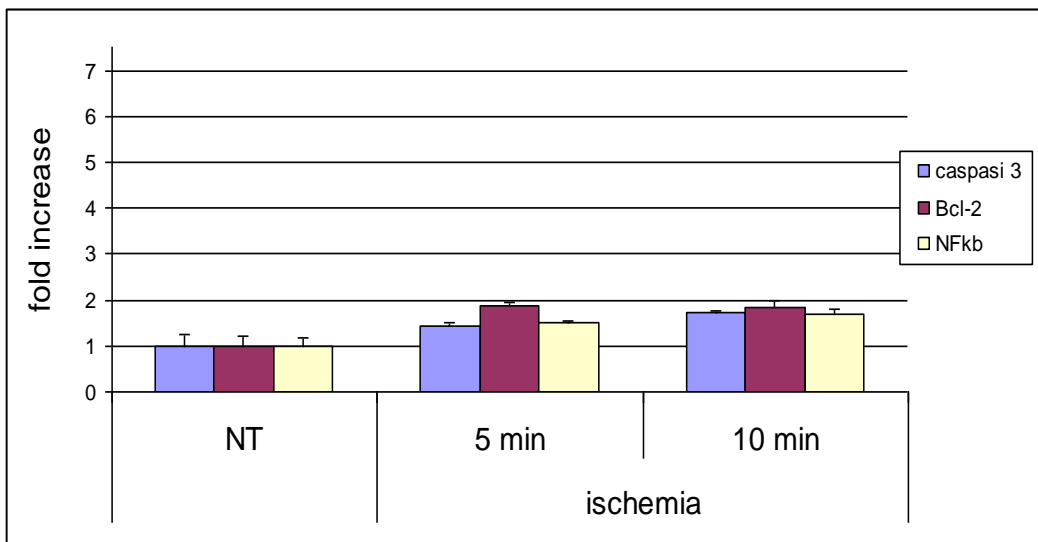


Figura 3.6 Espressione genica delle proteine apoptotiche rilevata mediante Real-Time PCR in caso di ischemia. I valori sono relativi al NT (=1).

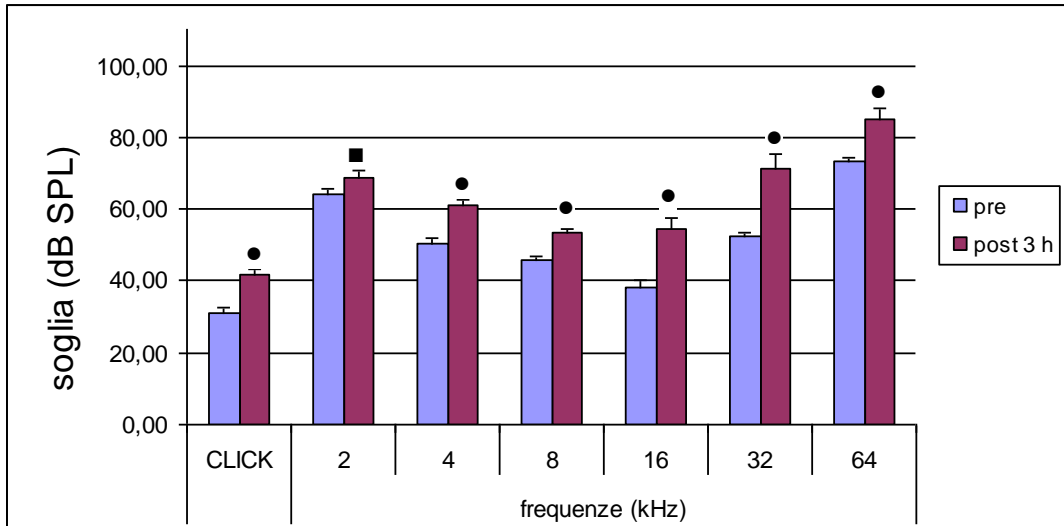


Figura 3.7 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'occlusione permanente della coronaria sinistra e dopo 3 ore. Significatività rispetto al valore pre: ● = valori statistici significativi ($p < 0,01$); ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

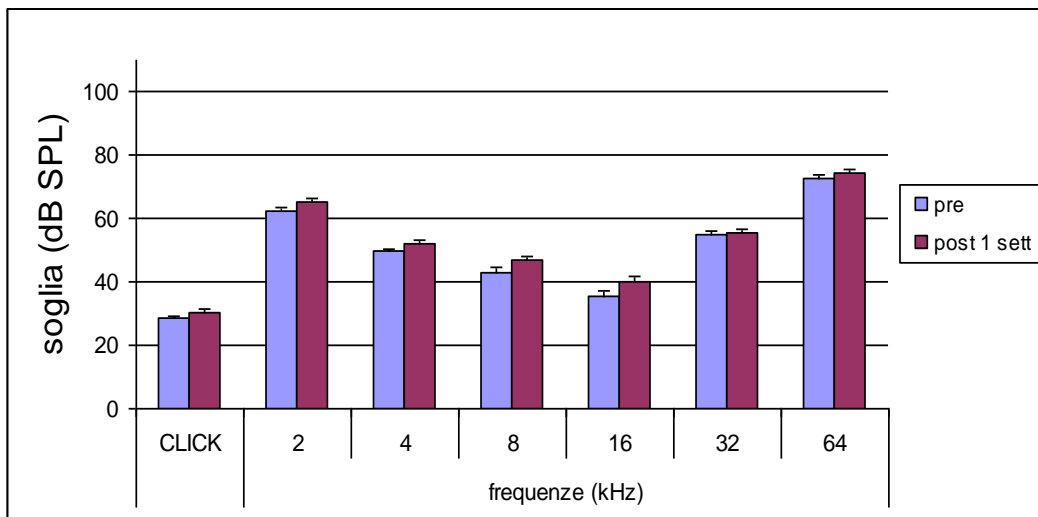


Figura 3.8 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'occlusione permanente della coronaria sinistra e dopo 1 settimana.

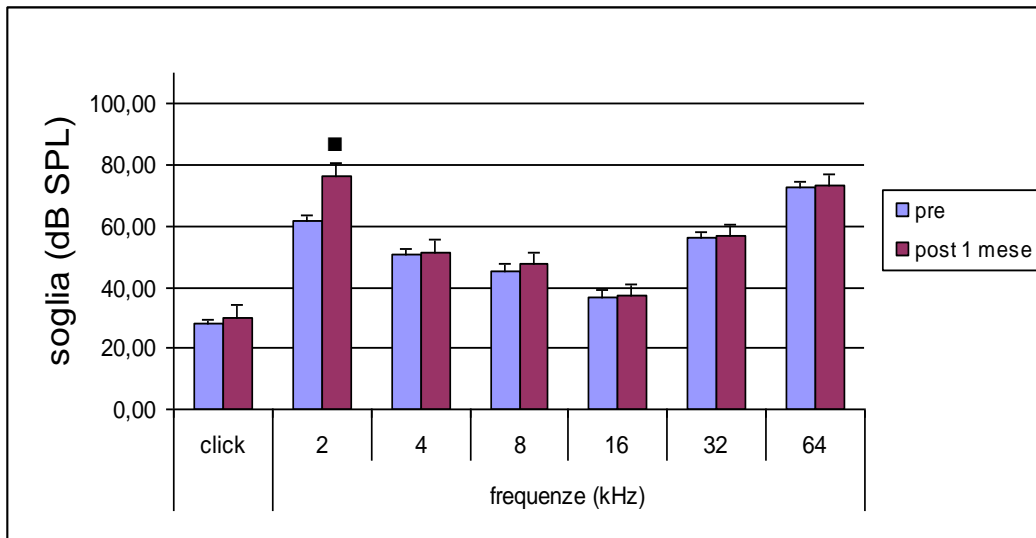


Figura 3.9 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'occlusione permanente della coronaria sinistra e dopo 1mese. ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

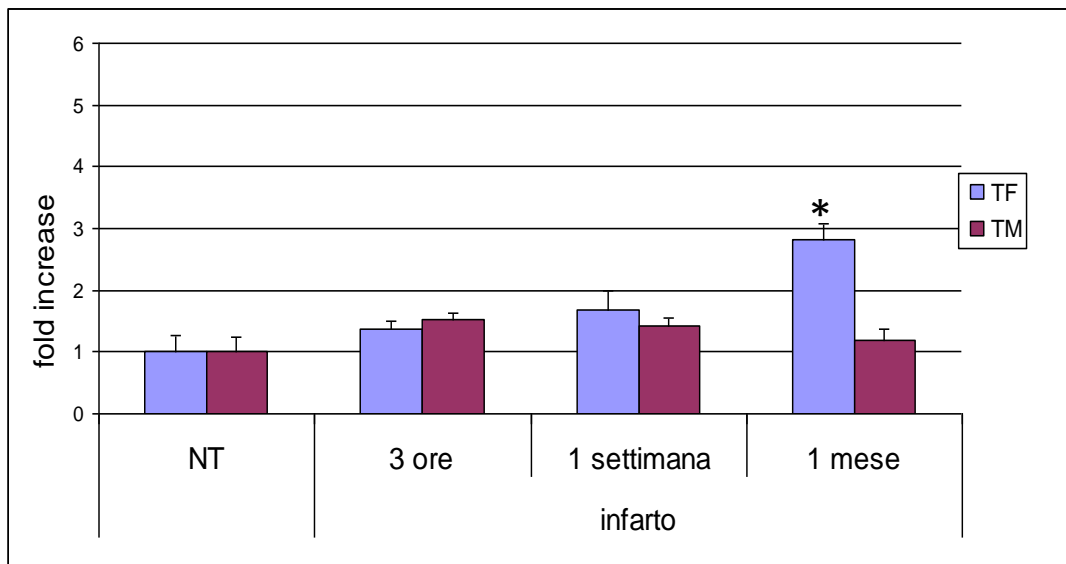


Figura 3.10 Espressione genica delle proteine della coagulazione rilevata mediante Real-Time PCR in caso di infarto. I valori sono relativi al NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: *= valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$).

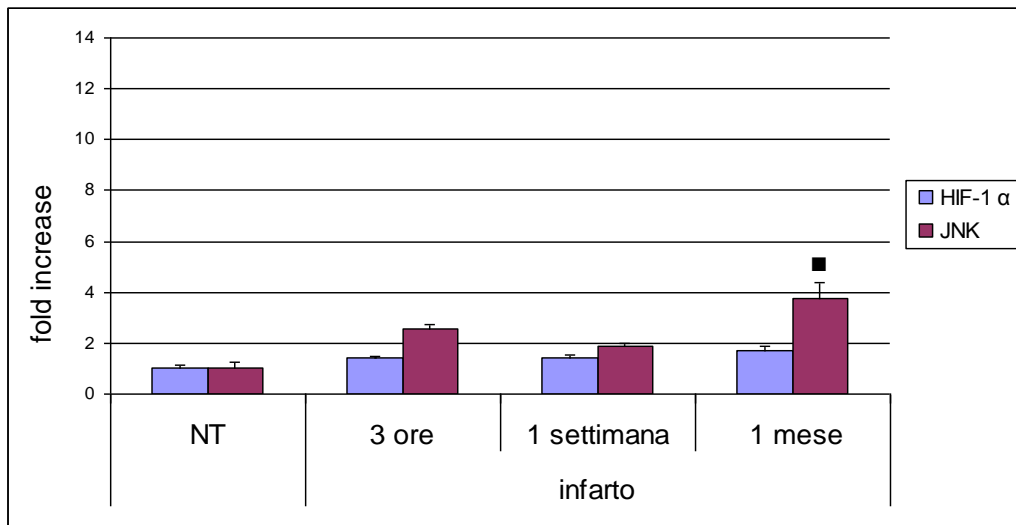


Figura 3.11 Espressione genica delle proteine coinvolte nell'ipossia e nello stress ossidativo rilevata mediante Real-Time PCR in caso di infarto. I valori sono relativi al NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: ■= valori statistici significativi ($p < 0,05$).

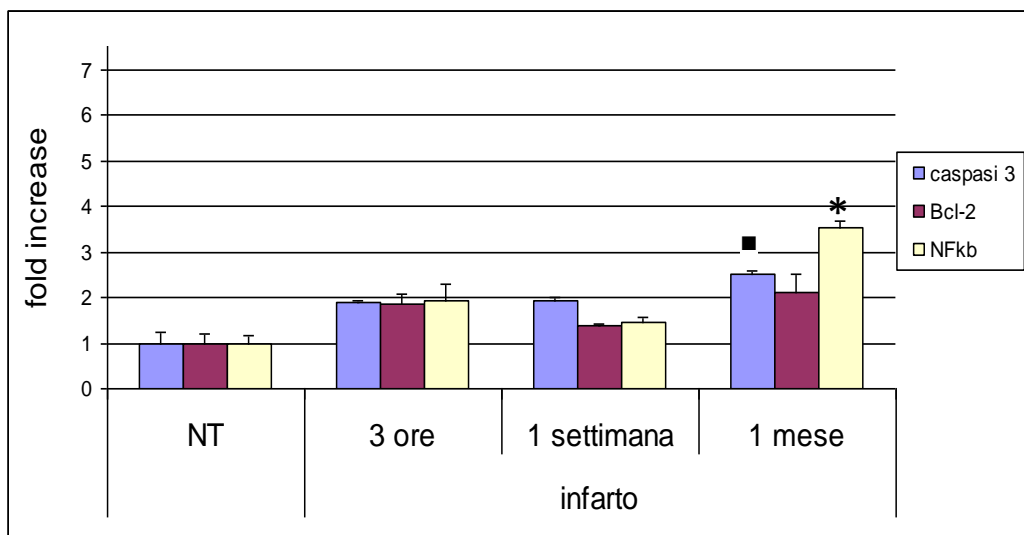


Figura 3.12 Espressione genica delle proteine apoptotiche rilevata mediante Real-Time PCR in caso di infarto. I valori sono relativi al controllo NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: * = valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$); ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

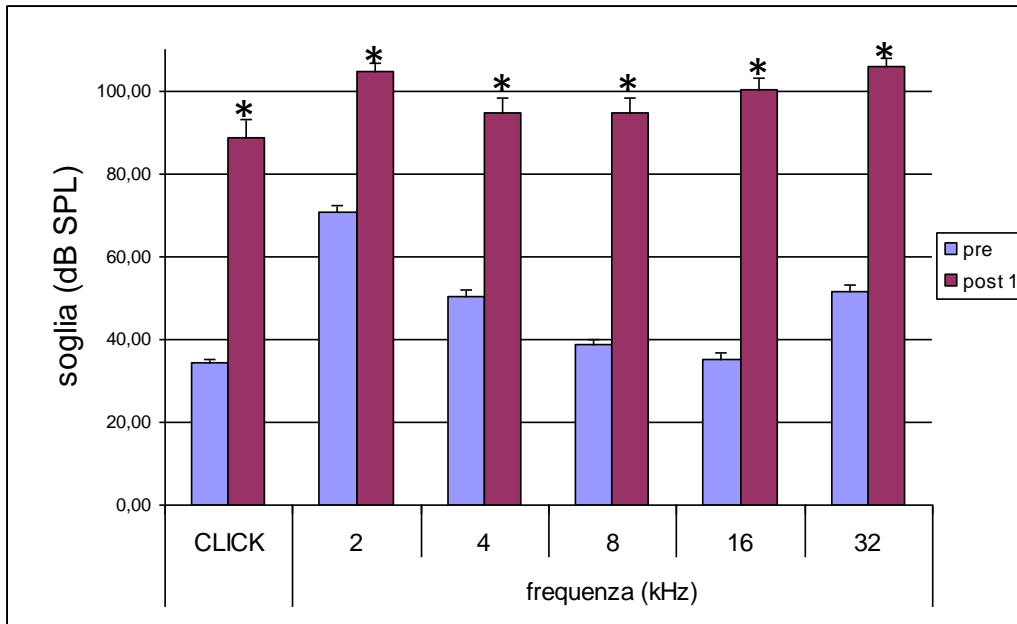


Figura 3.13 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'esposizione al rumore e dopo 1 giorno. Significatività rispetto al valore pre: *= valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$).

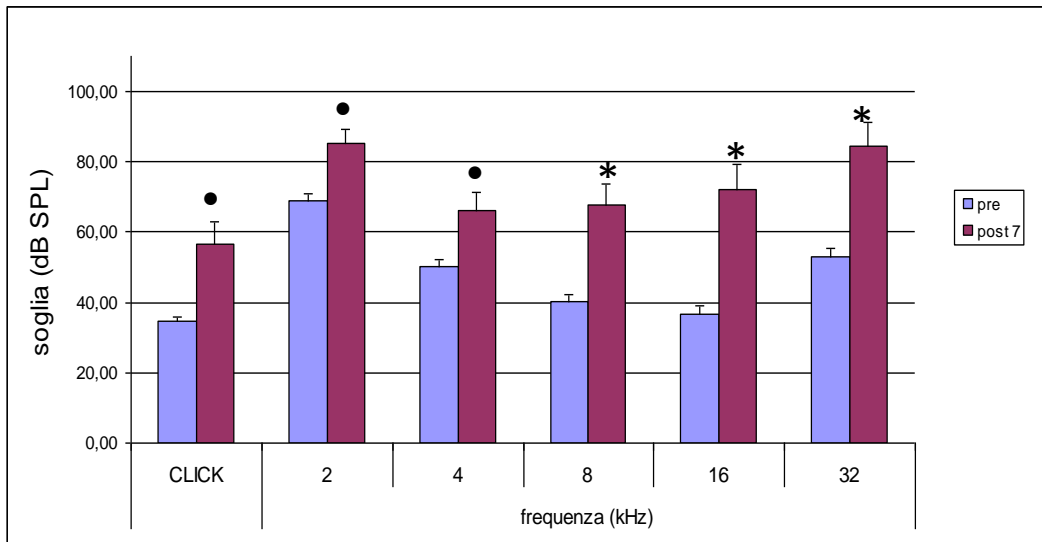


Figura 3.14 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'esposizione al rumore e dopo 7 giorni. Significatività rispetto al valore pre: *= valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$); • = valori statistici significativi ($p < 0,01$).

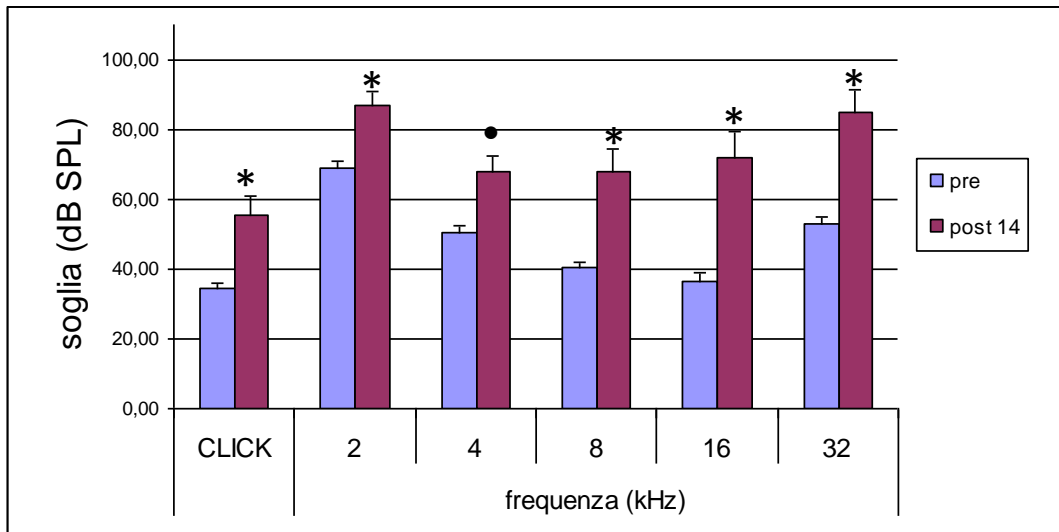


Figura 3.15 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'esposizione al rumore e dopo 14 giorni. Significatività rispetto al valore pre: * = valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$); • = valori statistici significativi ($p < 0,01$).

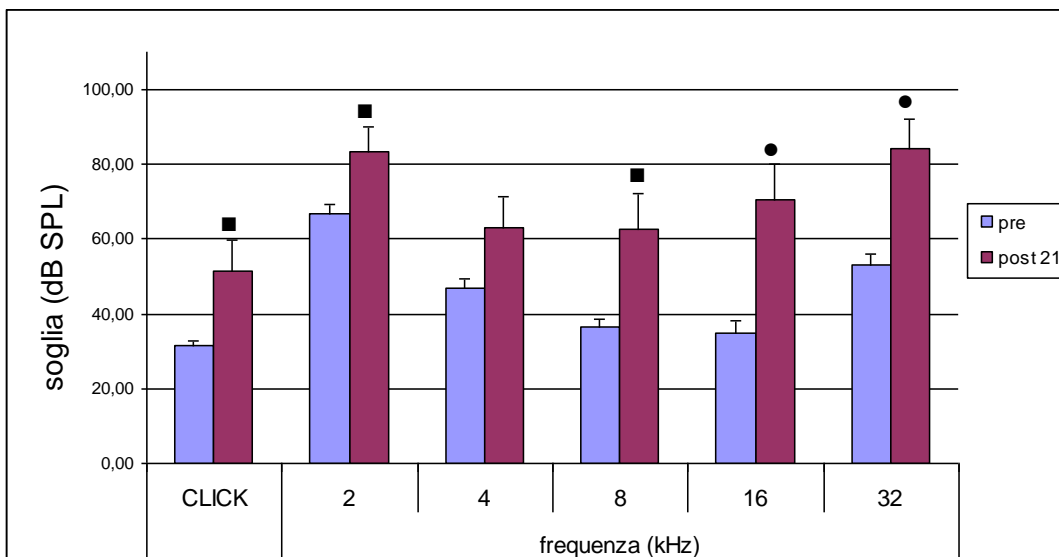


Figura 3.16 Soglie uditive misurate tramite ABR prima dell'esposizione al rumore e dopo 21 giorni. Significatività rispetto al valore pre: • = valori statistici significativi ($p < 0,01$); ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

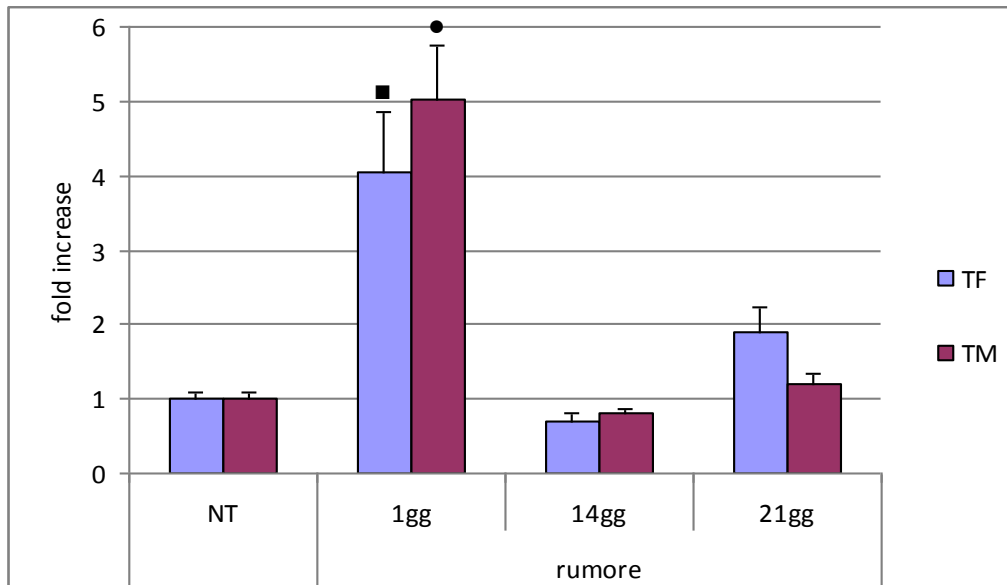


Figura 3.17 Espressione genica delle proteine della coagulazione rilevata mediante Real-Time PCR dopo esposizione al rumore. I valori sono relativi al NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: ●= valori statistici significativi ($p < 0,01$); ■= valori statistici significativi ($p < 0,05$).

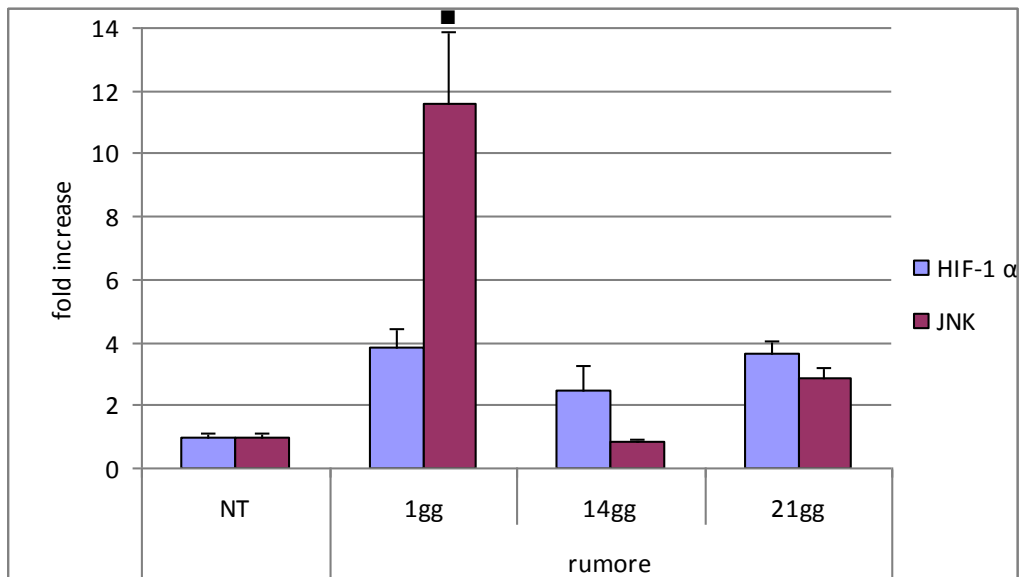


Figura 3.18 Espressione genica delle proteine coinvolte nell'ipossia e nello stress ossidativo rilevata mediante Real-Time PCR dopo esposizione al rumore. I valori sono relativi al NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: ■= valori statistici significativi ($p < 0,05$).

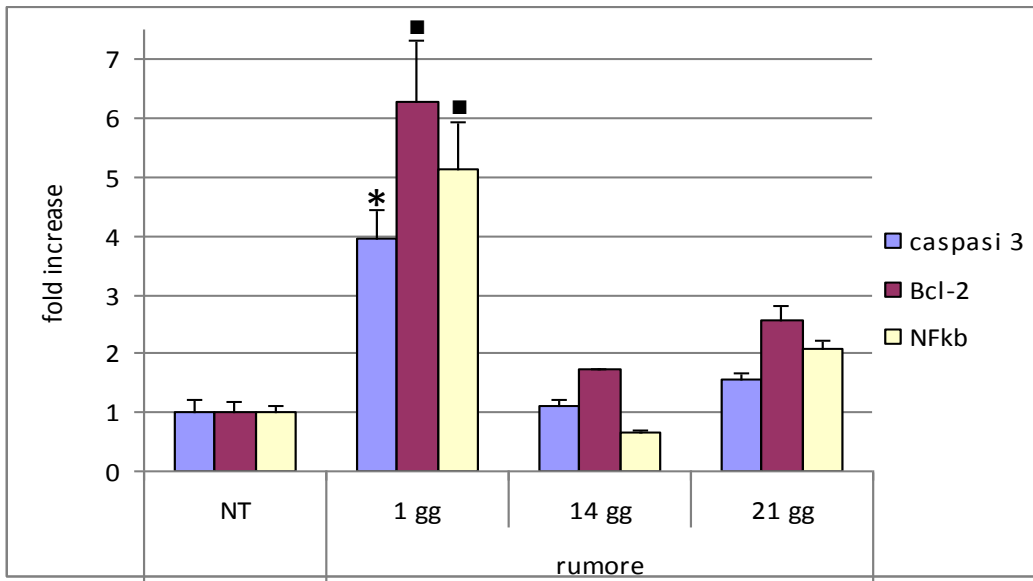


Figura 3.19 Espressione genica delle proteine apoptotiche rilevata mediante Real-Time PCR dopo esposizione al rumore. I valori sono relativi al controllo NT (=1). Significatività calcolata rispetto al NT: *= valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$); ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

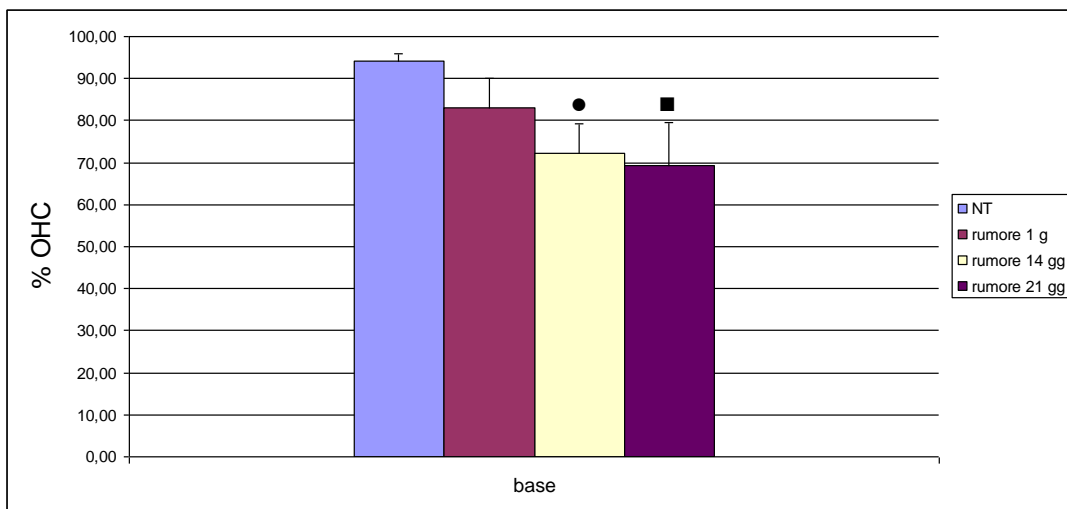


Figura 3.20 Percentuale di cellule cigliate esterne presenti alla base della coclea, rilevate tramite conteggio sulle sezioni istologiche prima e dopo esposizione al rumore. Significatività calcolata rispetto al NT: ● = valori statistici significativi ($p < 0,01$); ■ = valori statistici significativi ($p < 0,05$).

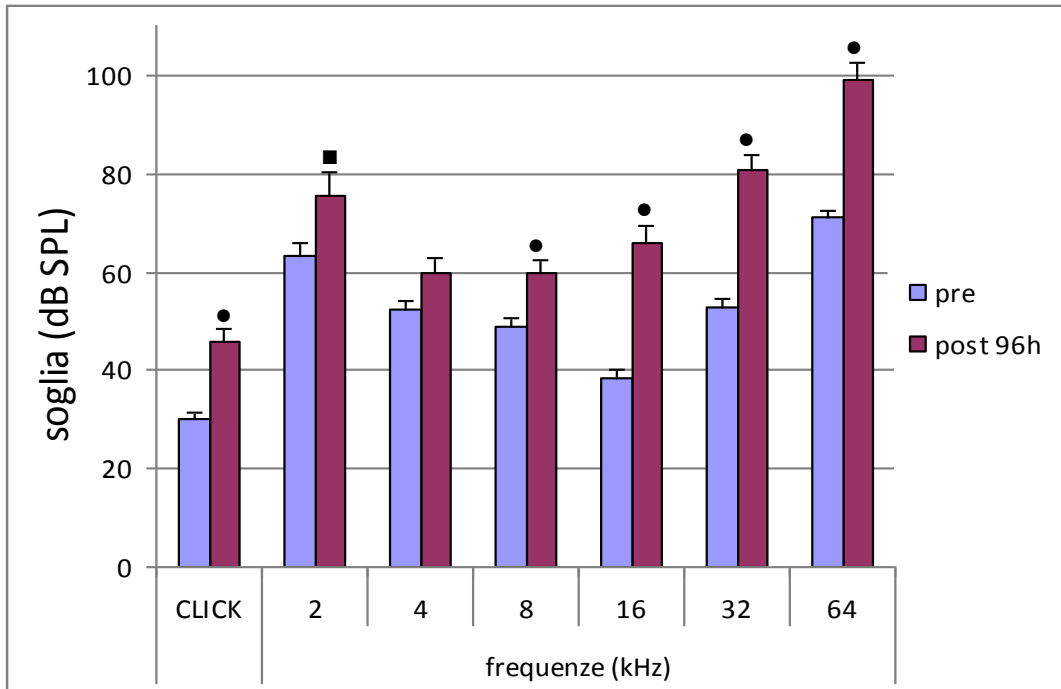


Figura 3.21 Soglie uditive misurate tramite ABR prima e dopo la somministrazione di cisplatino. Significatività rispetto al valore pre: ●= valori statistici significativi ($p < 0,01$); ■= valori statistici significativi ($p < 0,05$).

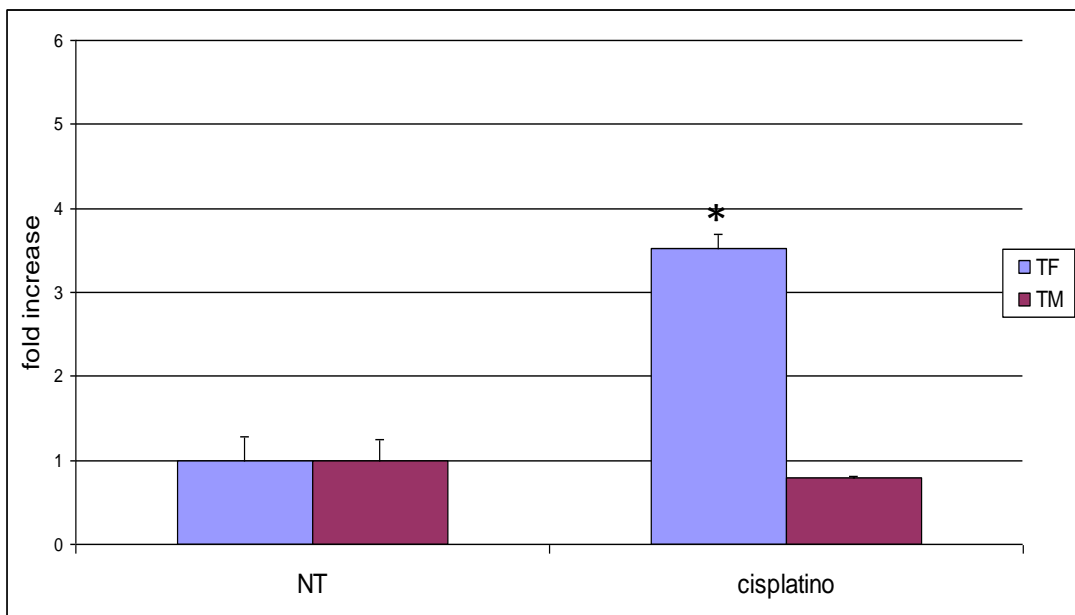


Figura 3.22 Espressione genica delle proteine della coagulazione rilevata mediante Real-Time PCR in seguito a trattamento con cisplatino. I valori sono relativi al NT (=1) Significatività calcolata rispetto al NT: *= valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$).

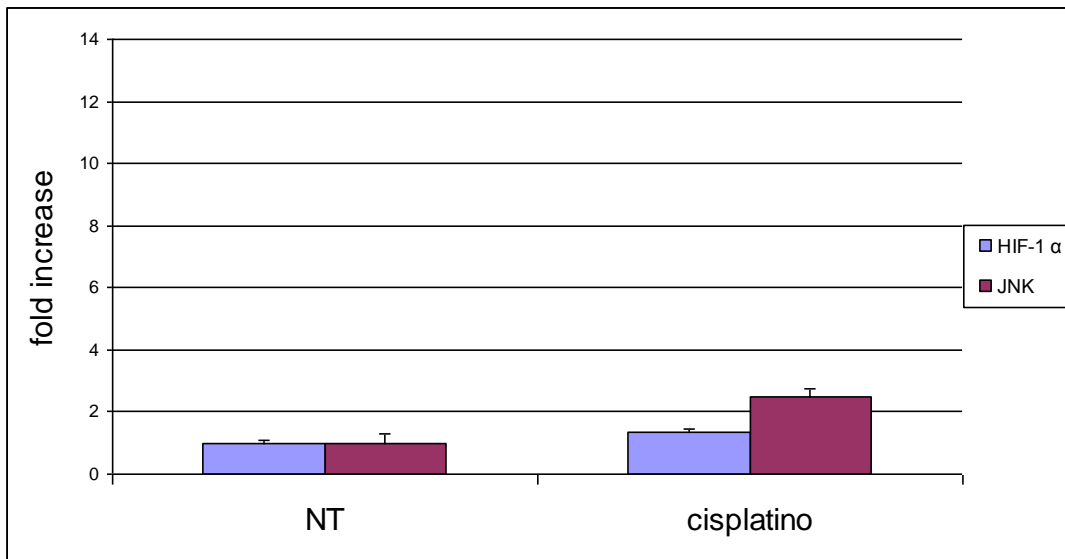


Figura 3.23 Espressione genica delle proteine coinvolte nell'ipossia e nello stress ossidativo rilevata mediante Real-Time PCR in seguito a trattamento con cisplatino. I valori sono relativi al NT (=1).

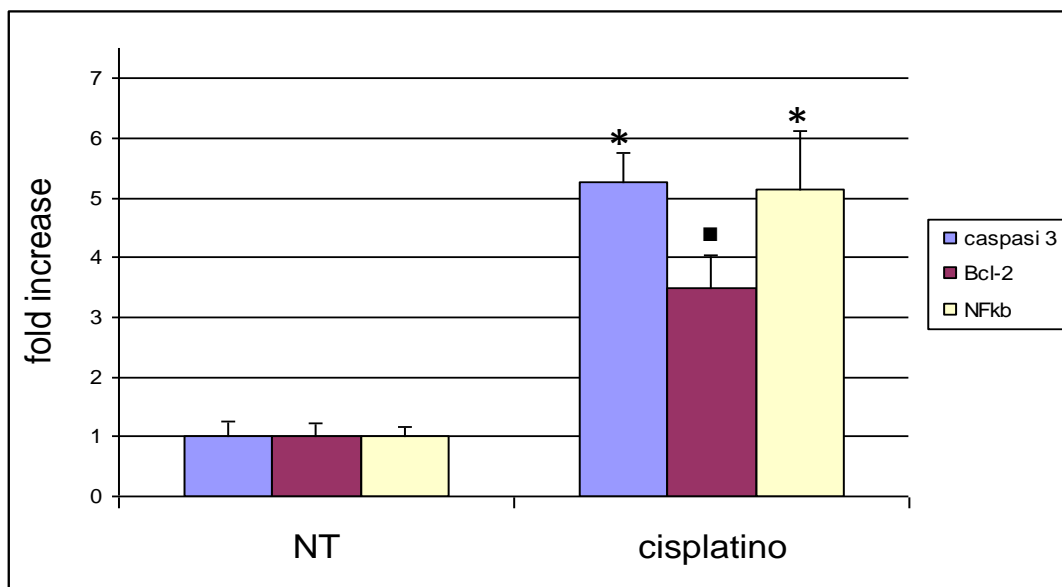


Figura 3.24 Espressione genica delle proteine apoptotiche rilevata mediante Real-Time PCR in seguito a trattamento con cisplatino. I valori sono relativi al NT (=1) Significatività calcolata rispetto al NT: *= valori statistici altamente significativi ($p < 0,001$); ■= valori statistici significativi ($p < 0,05$).

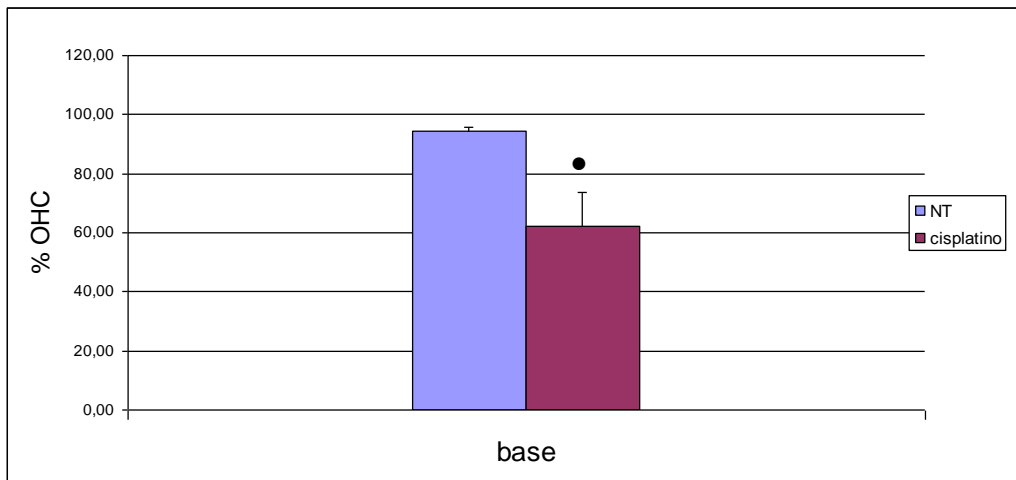


Figura 3.25 Percentuale di cellule cigliate esterne presenti alla base della coclea, rilevate tramite conteggio sulle sezioni istologiche prima e dopo somministrazione di cisplatino. Significatività calcolata rispetto al NT: ●= valori statistici significativi ($p < 0,01$).

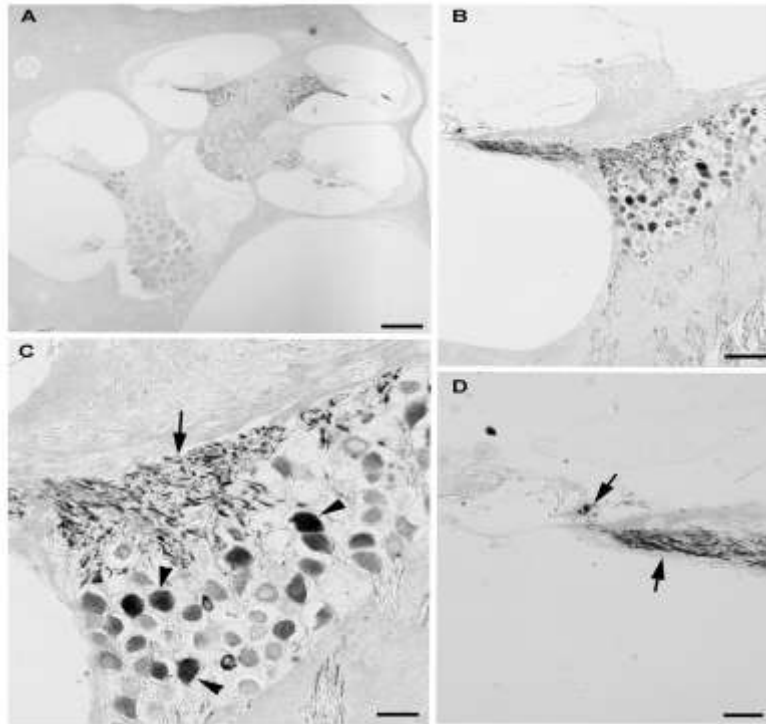


Tavola 1 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di controllo. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

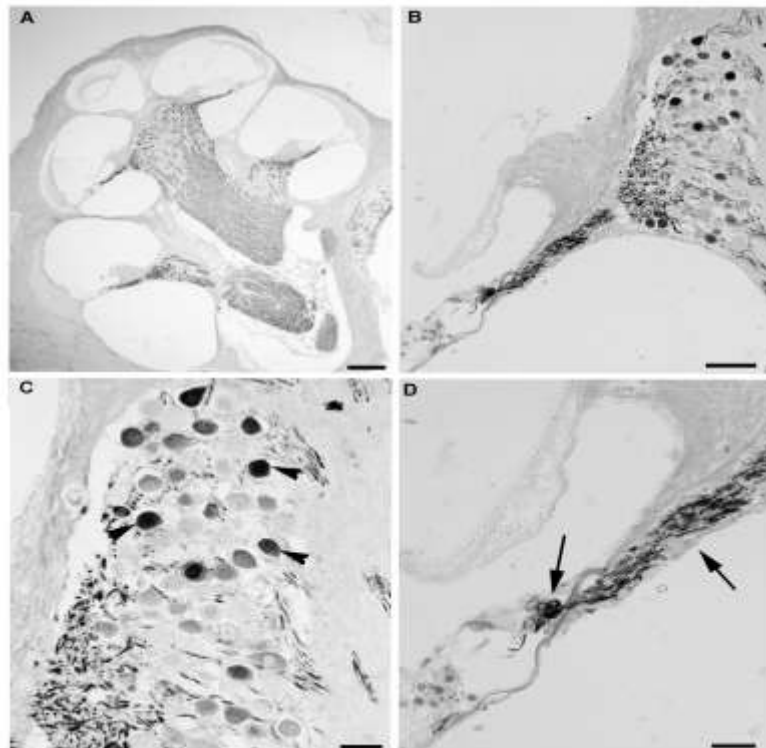


Tavola 2 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia carotidea di 5 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

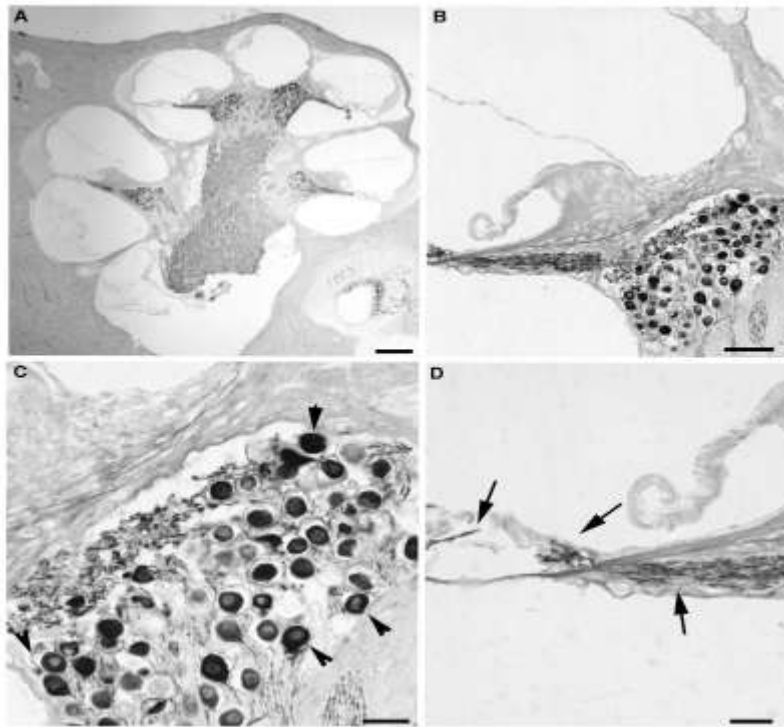


Tavola 3 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia carotidea di 10 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 μ m), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 μ m), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 μ m), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 μ m). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

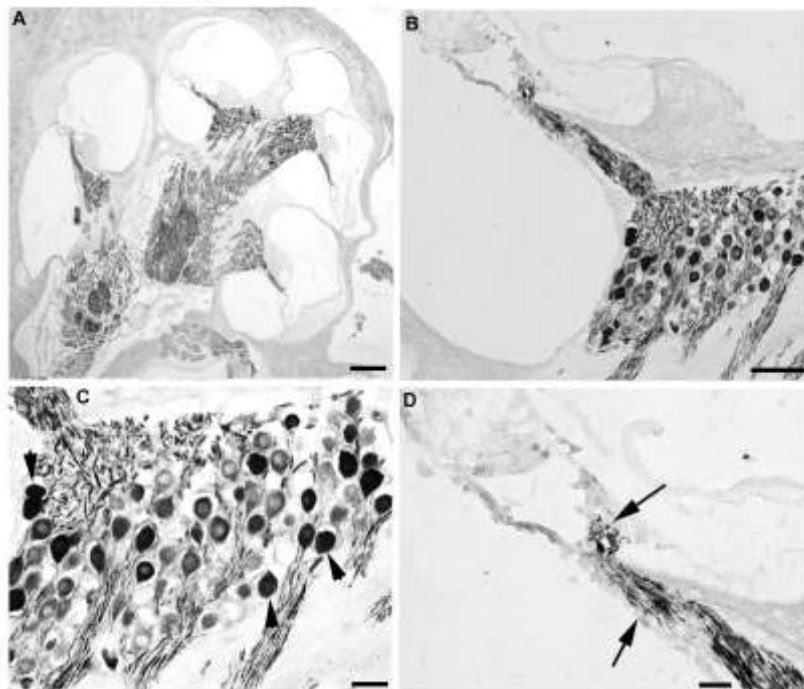


Tavola 4 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia carotidea di 15 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 μ m), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 μ m), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 μ m), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 μ m). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

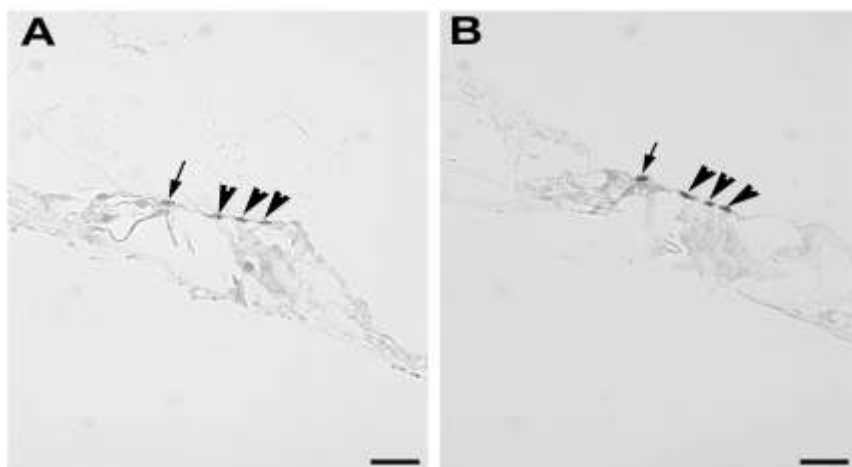


Tavola 5 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di controllo. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

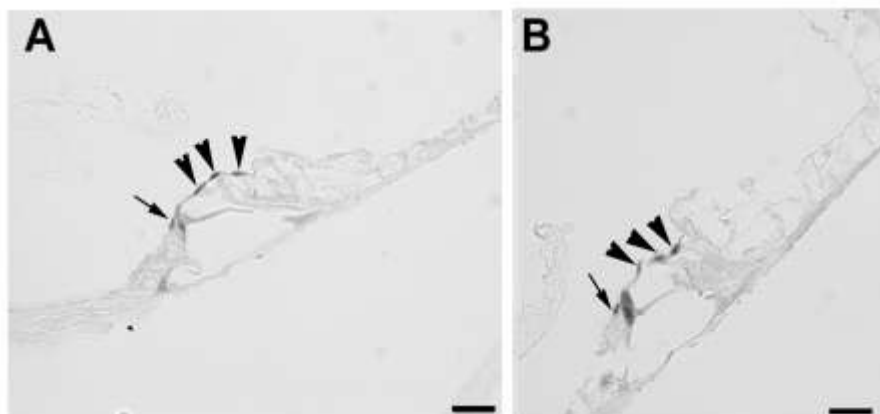


Tavola 6 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti con ischemia carotidea di 5 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

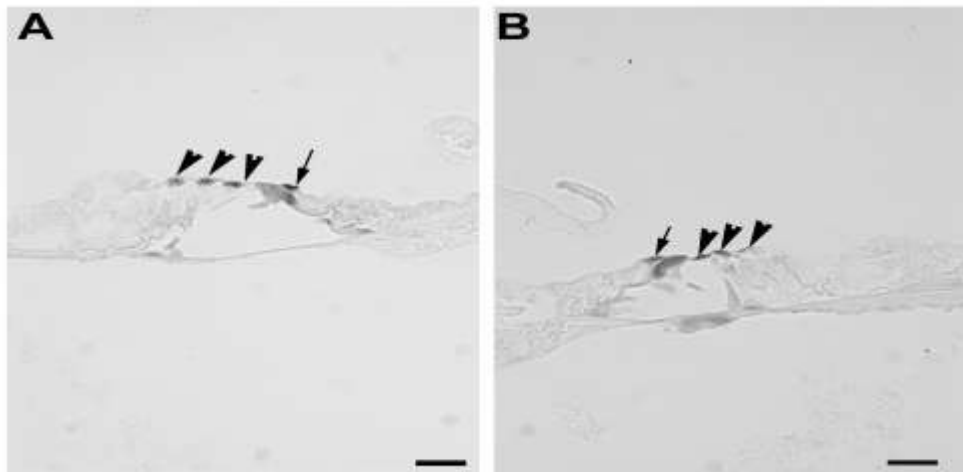


Tavola 7 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti con ischemia carotidea di 10 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

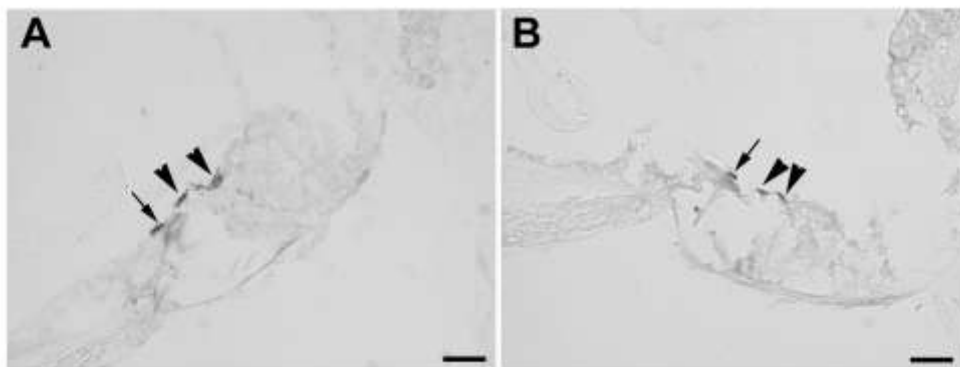


Tavola 8 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti con ischemia carotidea di 15 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

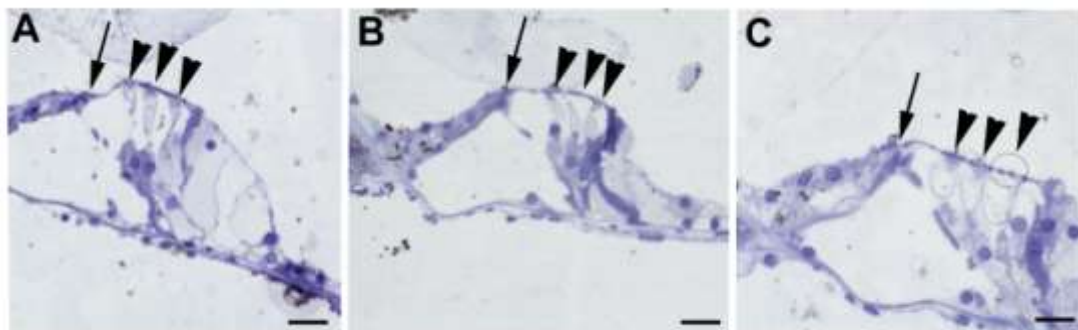


Tavola 9 Organi del Corti di sezioni cocleari incluse in resina e colorate con blu di metilene. A= ischemia 5 minuti, B= ischemia 10 minuti, C= ischemia 15 minuti(scale bars= 20 μ m). Freccce= cellule cigliate interne, teste di frecce= cellule cigliate esterne.

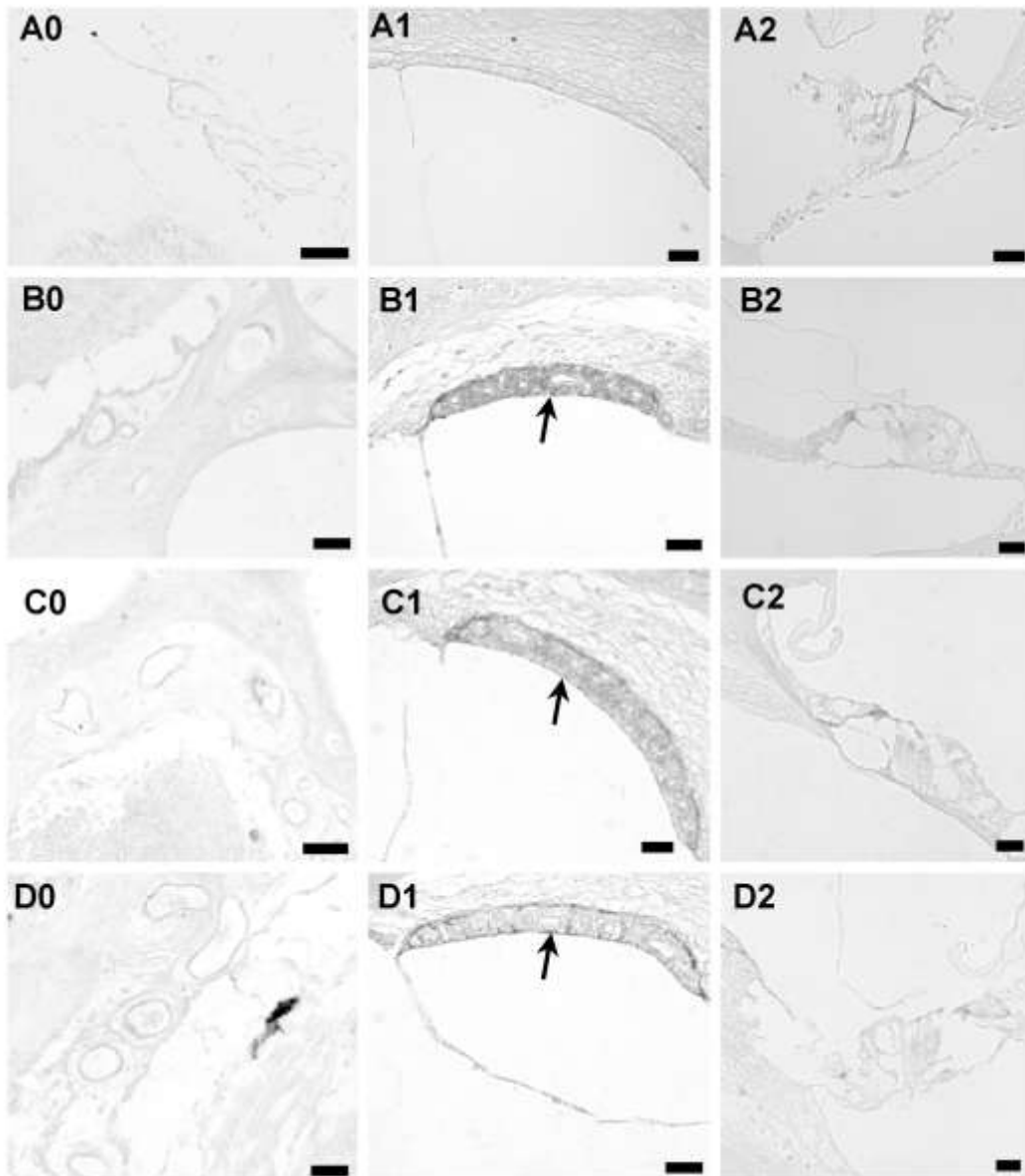


Tavola 10 Immunoistochimica per TF. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= ischemia 5 minuti, C= ischemia 10 minuti, D= ischemia 15 minuti, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG.

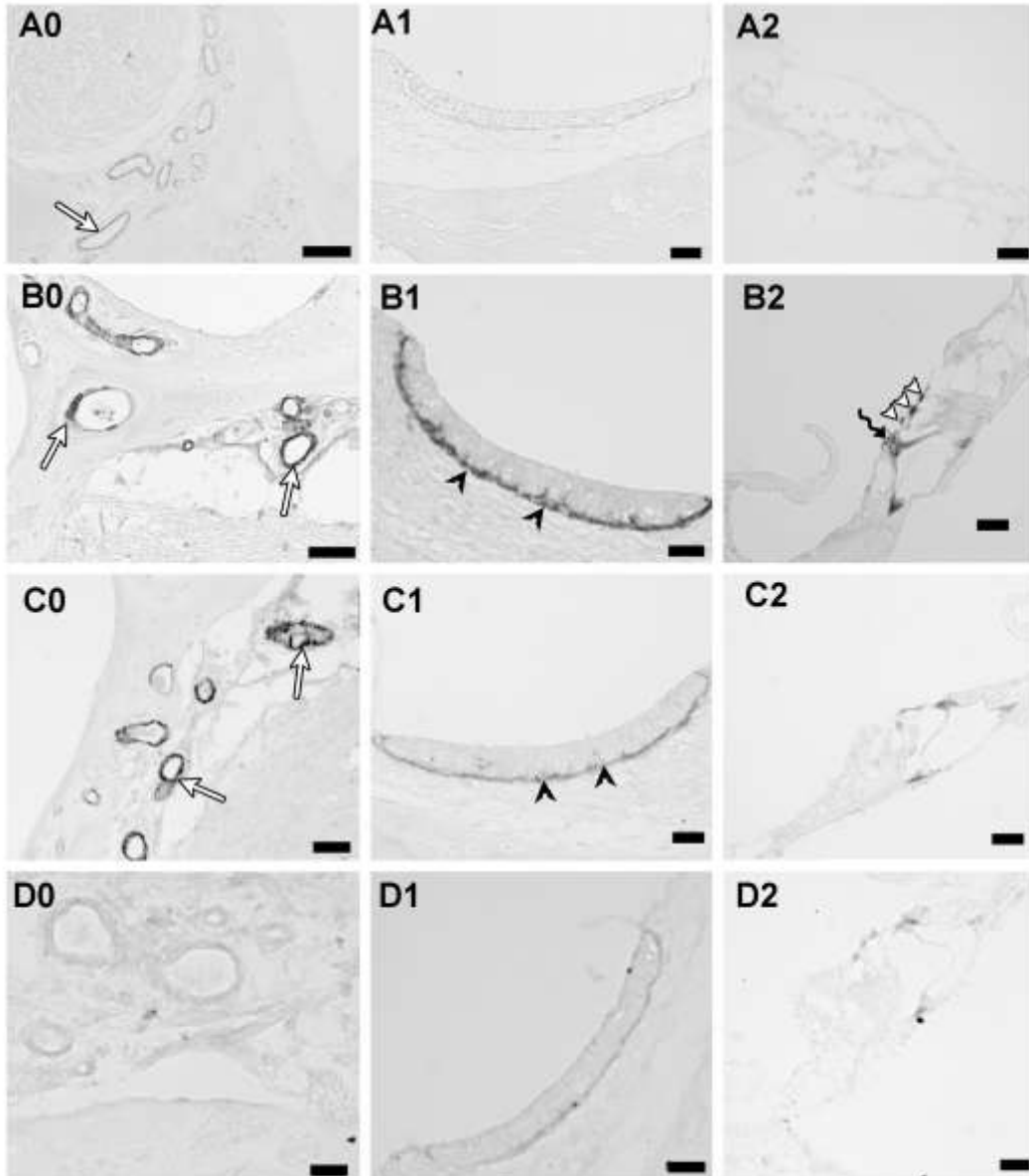


Tavola 11 Immunoistochimica per TM. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= ischemia 5 minuti, C= ischemia 10 minuti, D= ischemia 15 minuti, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca=vasi sanguigni modiolari marcati con SG, testa di freccia= cellule marginali della stria vascolare marcate con SG, testa di freccia bianca= OHC marcate con SG, freccia curva= cellule dei pilastri marcate con SG.

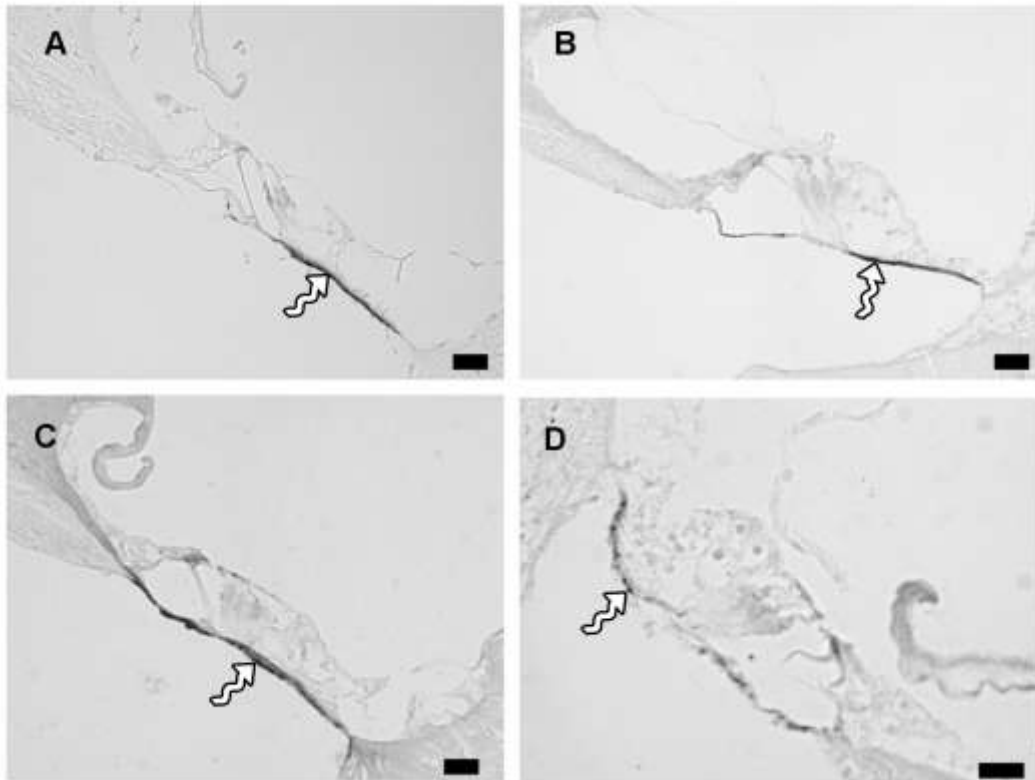


Tavola 12 Immunoistochimica per HIF-1 α su sezioni di coclea di ratti con ischemia carotidea. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= ischemia 5 minuti, C= ischemia 10 minuti, D= ischemia 15 minuti. Freccie curve=membrana basilare marcata con SG (scale bars= 20 μ m).

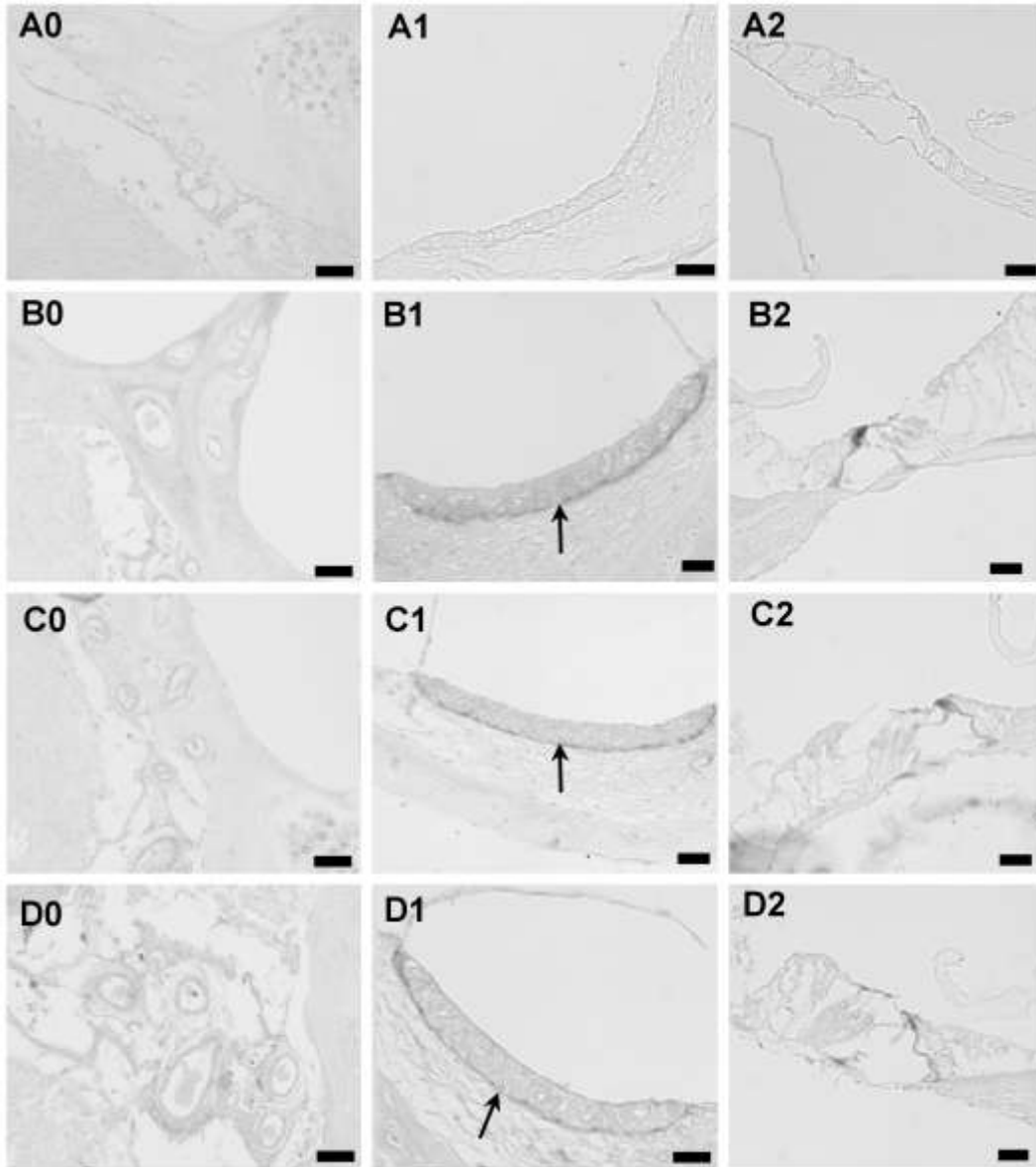


Tavola 13 Immunoistochimica per JNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= ischemia 5 minuti, C= ischemia 10 minuti, D= ischemia 15 minuti, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG.

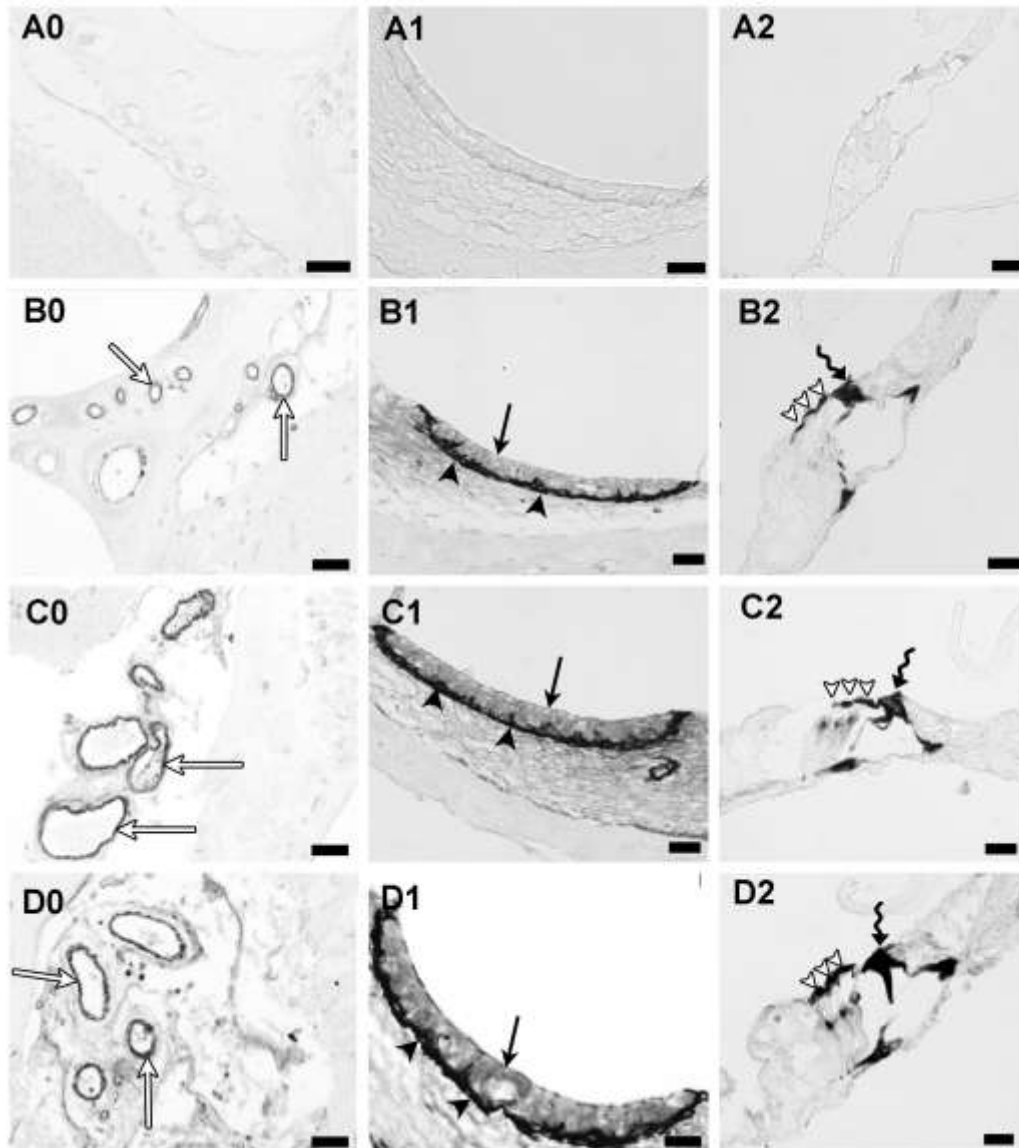


Tavola 14 Immunoistochimica per pJNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= ischemia 5 minuti, C= ischemia 10 minuti, D= ischemia 15 minuti, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca= vasi sanguigni modiolari marcati con SG, freccia= stria vascolare marcata con SG, testa di freccia= cellule marginali della stria vascolare marcate con SG, testa di freccia bianca= OHC marcate con SG, freccia curva= cellule dei pilastri marcate con SG.

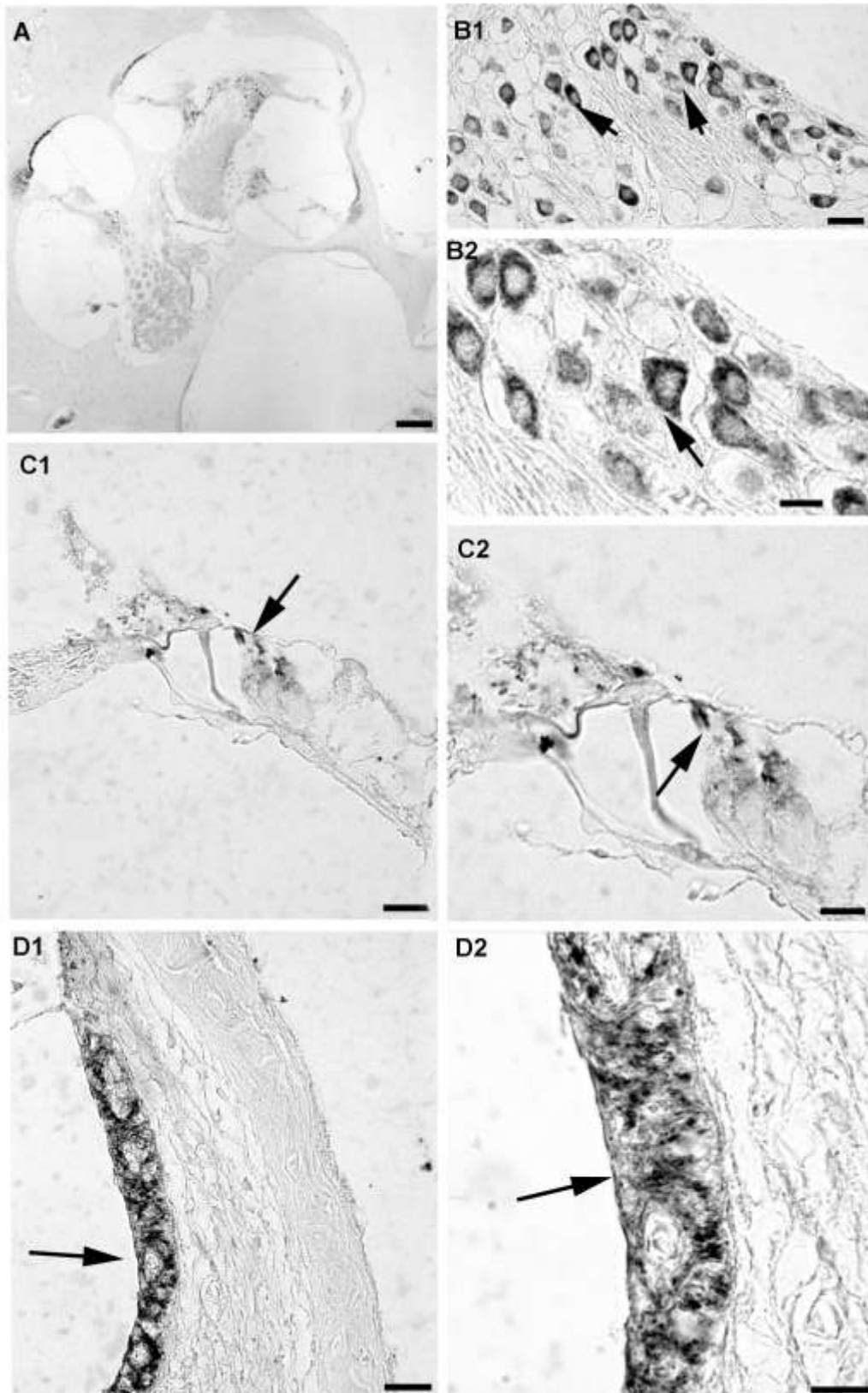


Tavola 15 Immunistoichimica per cyt-c su sezioni di controllo. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B= neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm).

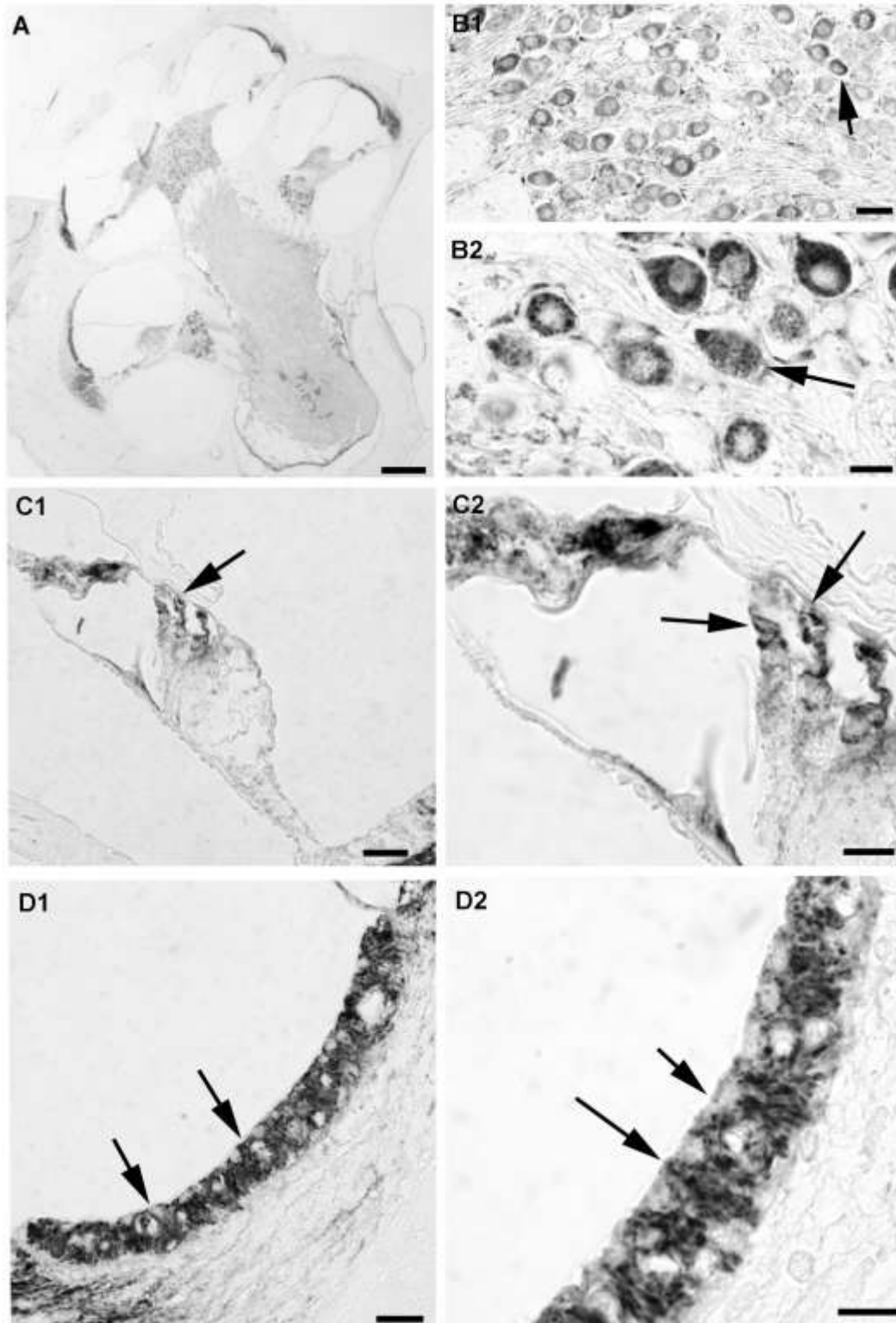


Tavola 16 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia di 5 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B= neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm).

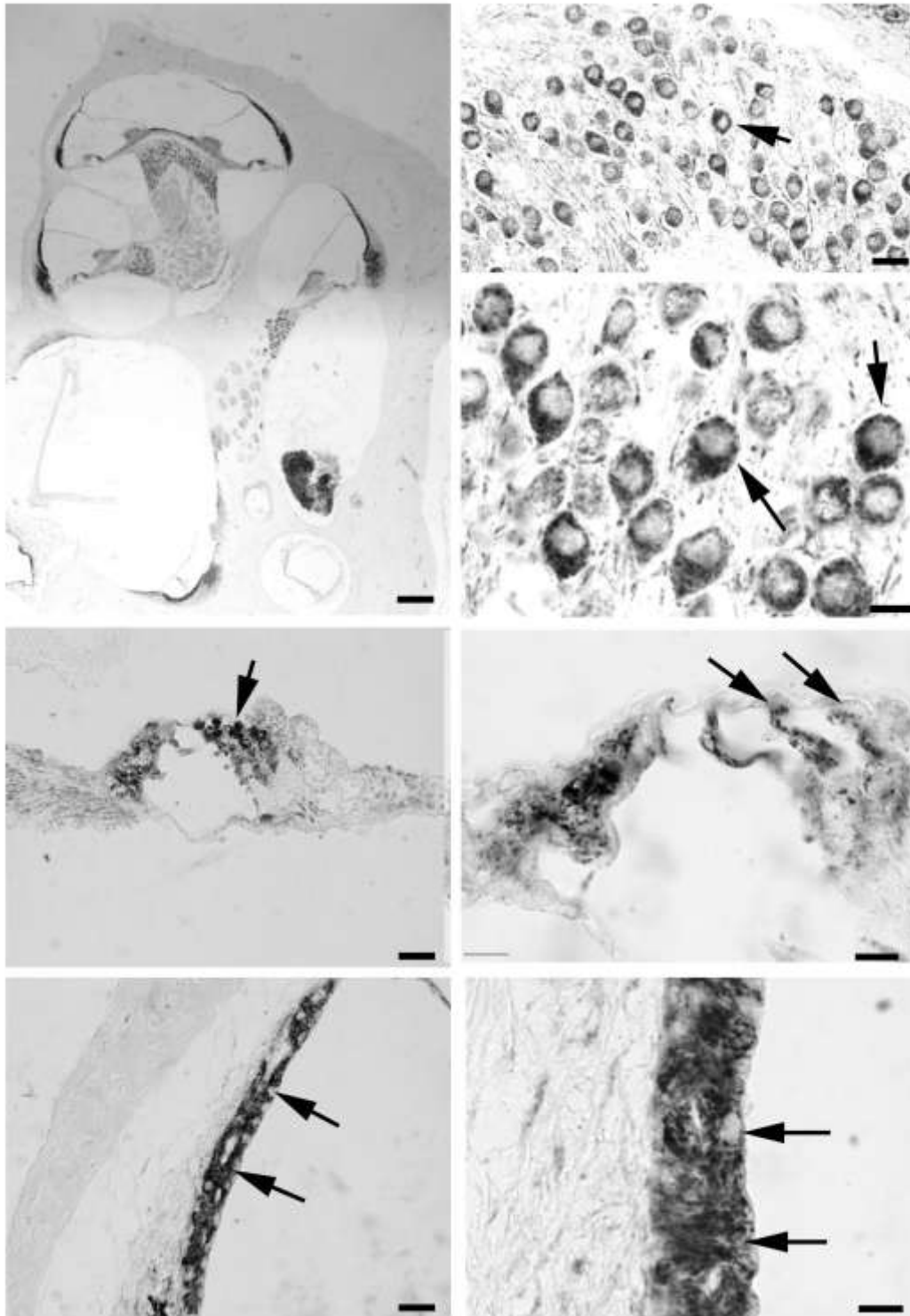


Tavola 17 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia di 10 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea(scale bar=200 μ m), B= neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 μ m, 2= scale bars 10 μ m).

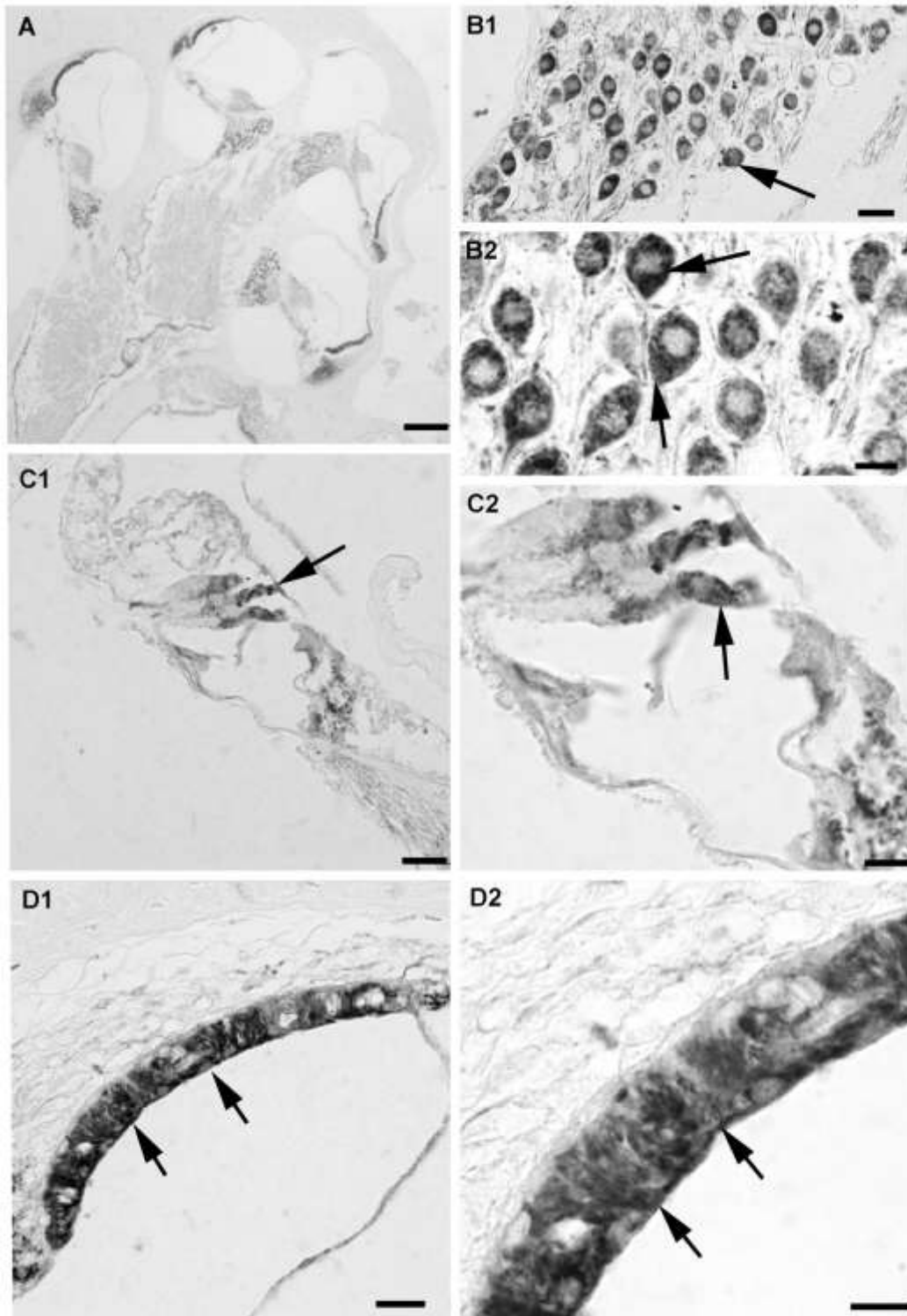


Tavola 18 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia di 15 minuti. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B= neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm).

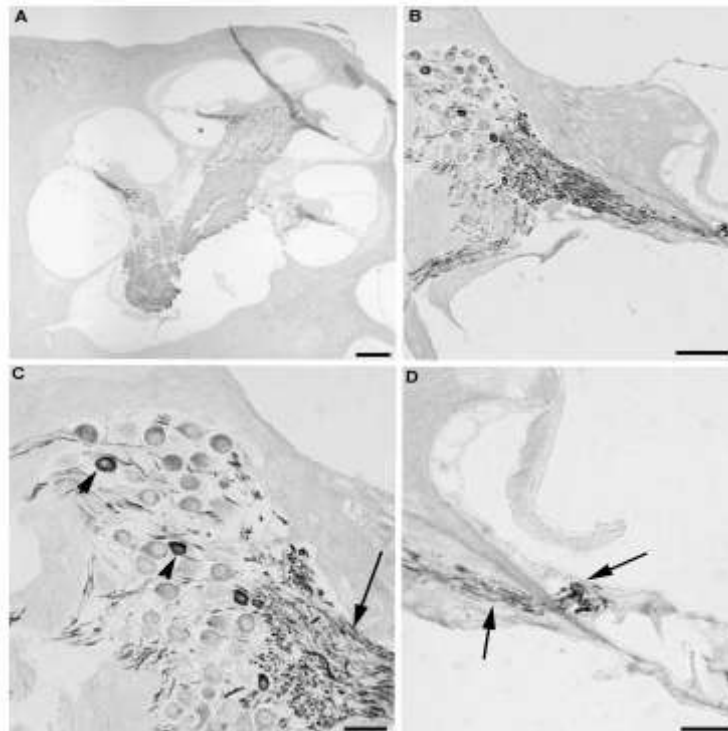


Tavola 19 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 3 ore. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

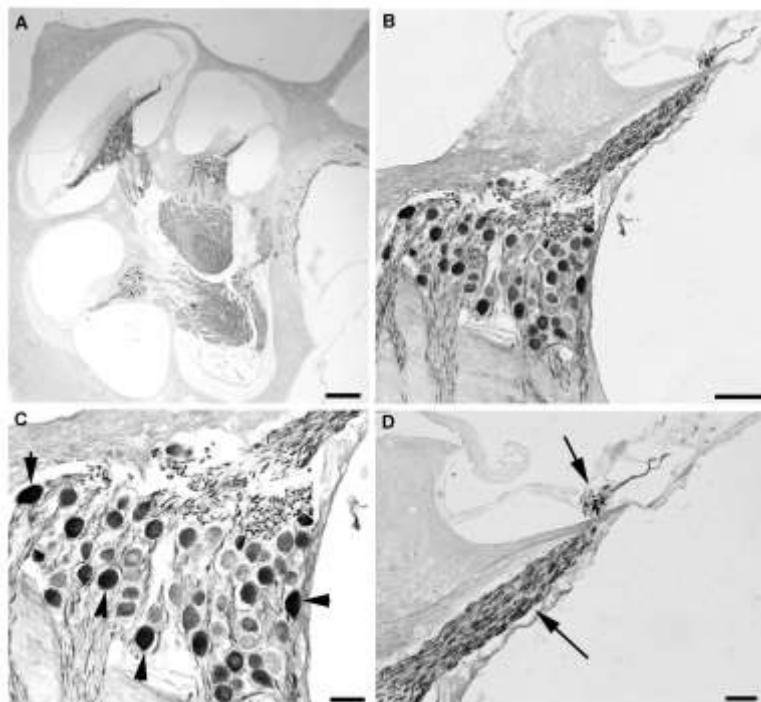


Tavola 20 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 1 settimana. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

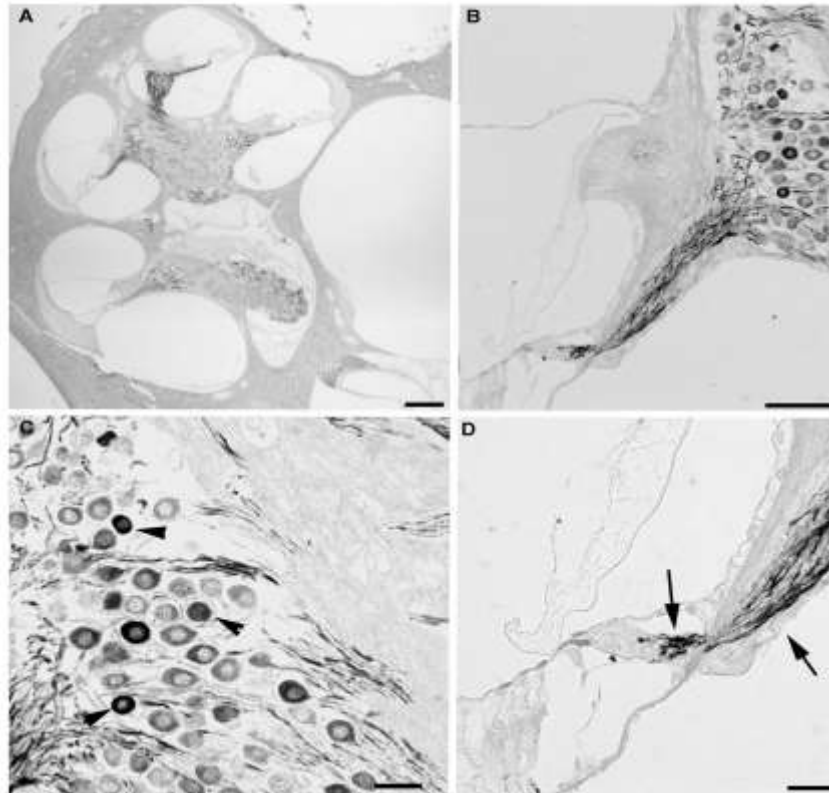


Tavola 21 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 1 mese. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

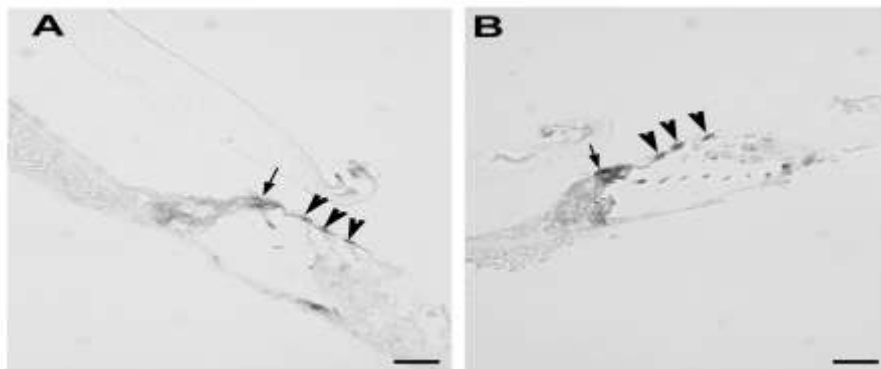


Tavola 22 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 3 ore. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B=organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 µm).

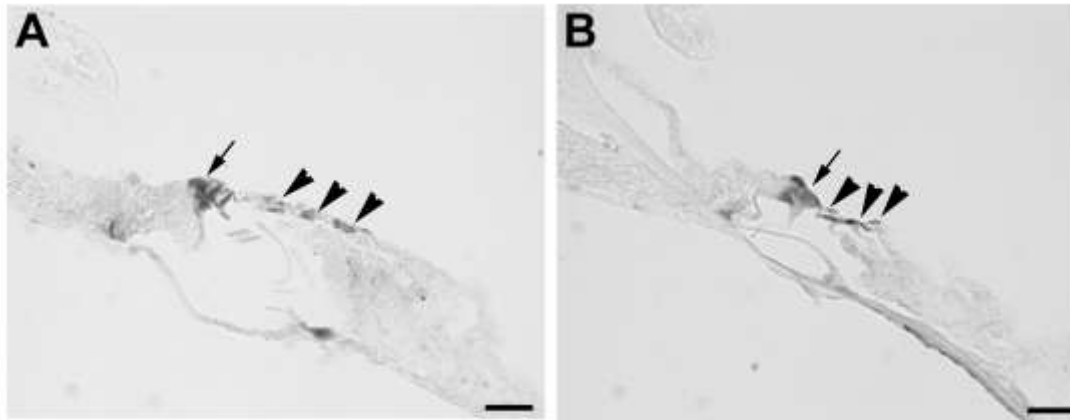


Tavola 23 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 1 settimana. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B=organo del Corti alla base. Frecce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

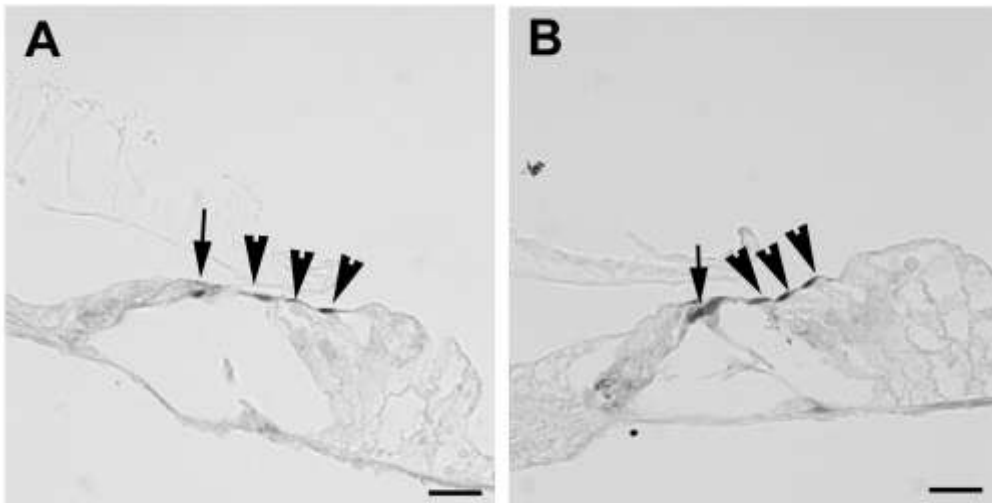


Tavola 24 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 1 mese. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B=organo del Corti alla base. Frecce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

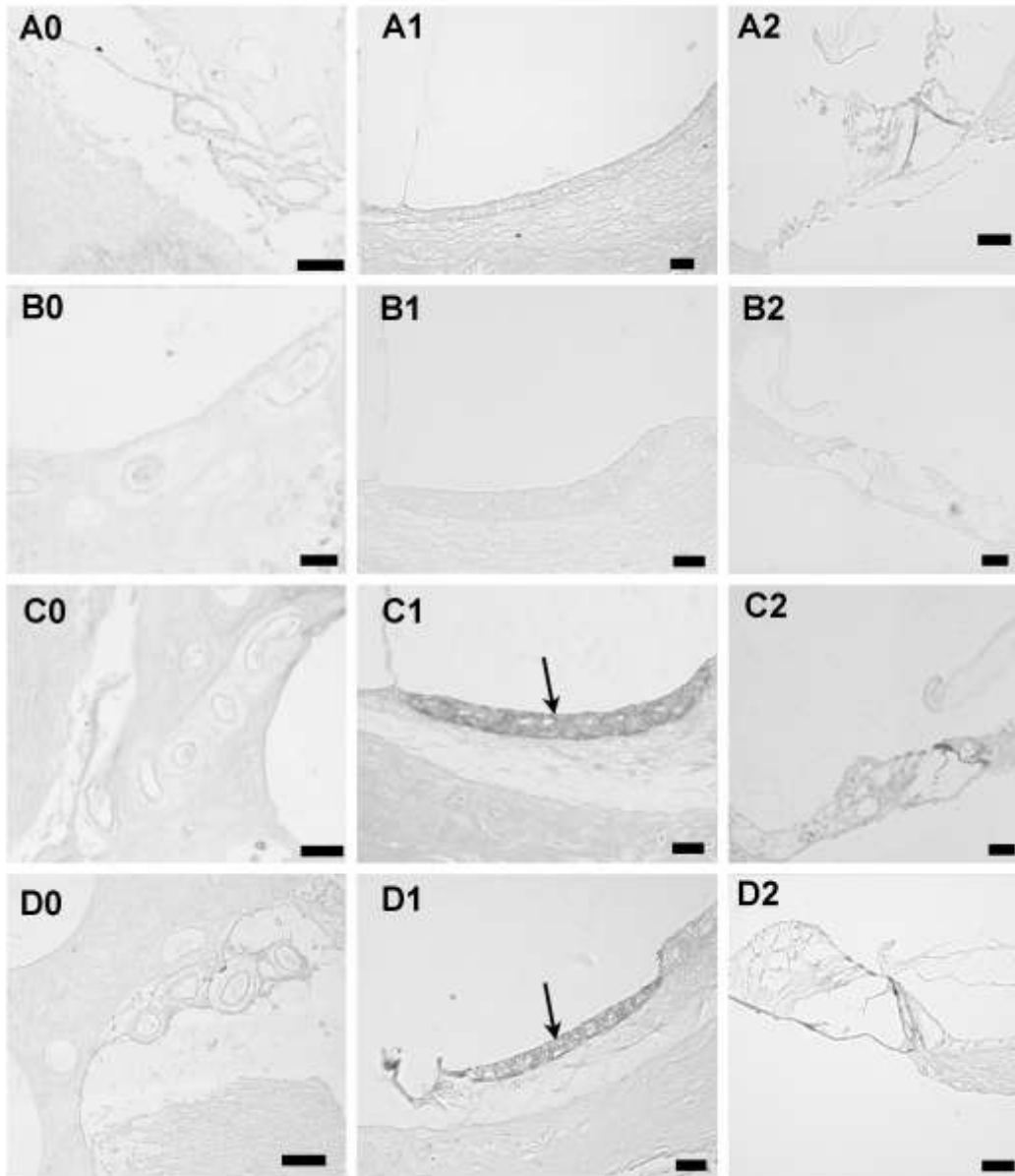


Tavola 25 Immunoistochimica per TF. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= infarto 3 ore, C= infarto 1 settimana, D= infarto 1 mese, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG.

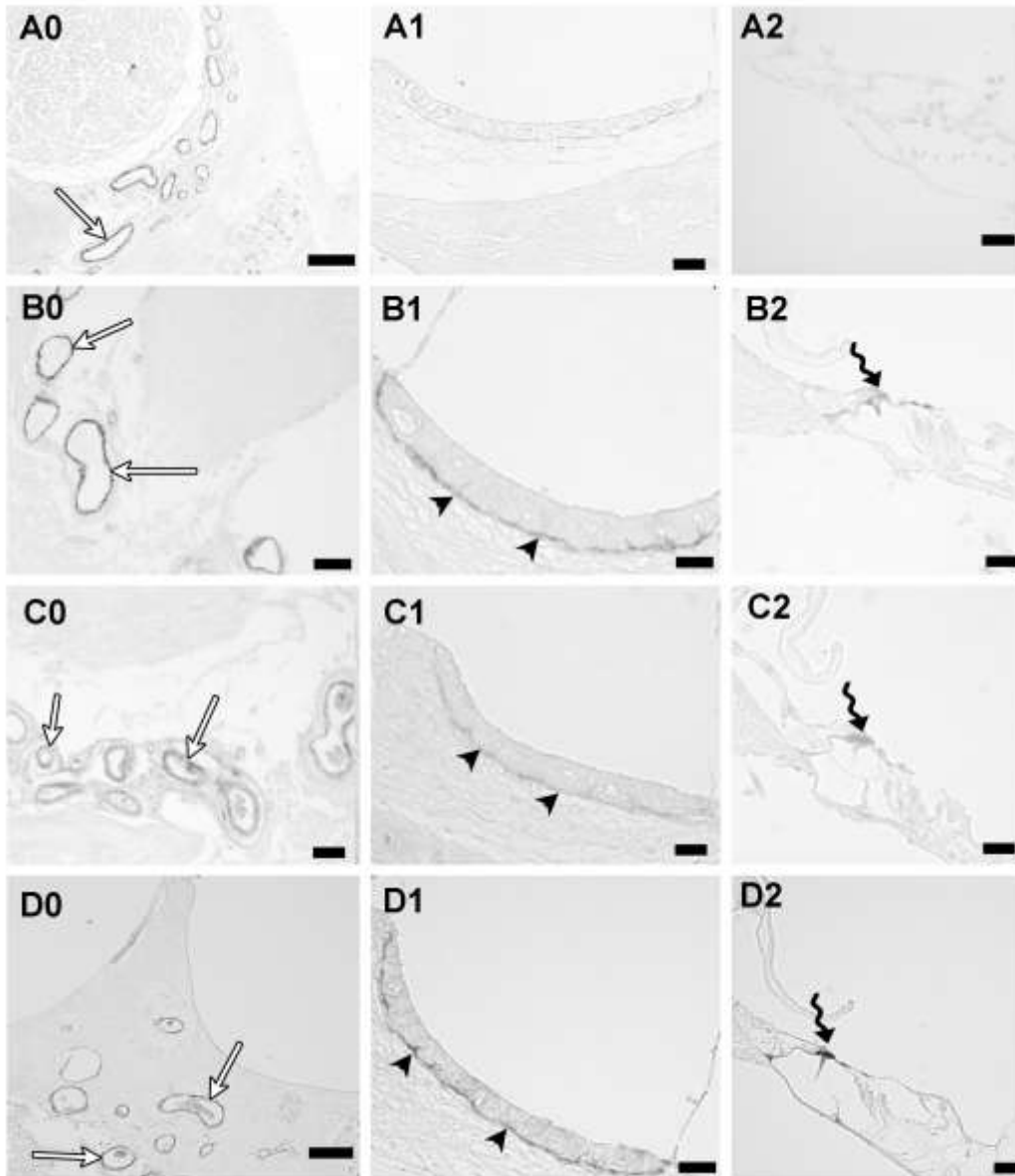


Tavola 26 Immunoistochimica per TM. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= infarto 3 ore, C= infarto 1 settimana, D= infarto 1 mese, 0= vasi sanguigni modiolaris (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca=vasi sanguigni modiolaris marcati con SG, testa di freccia= cellule marginali della stria vascolare marcate con SG, freccia curva=cellule dei pilastri marcate con SG.

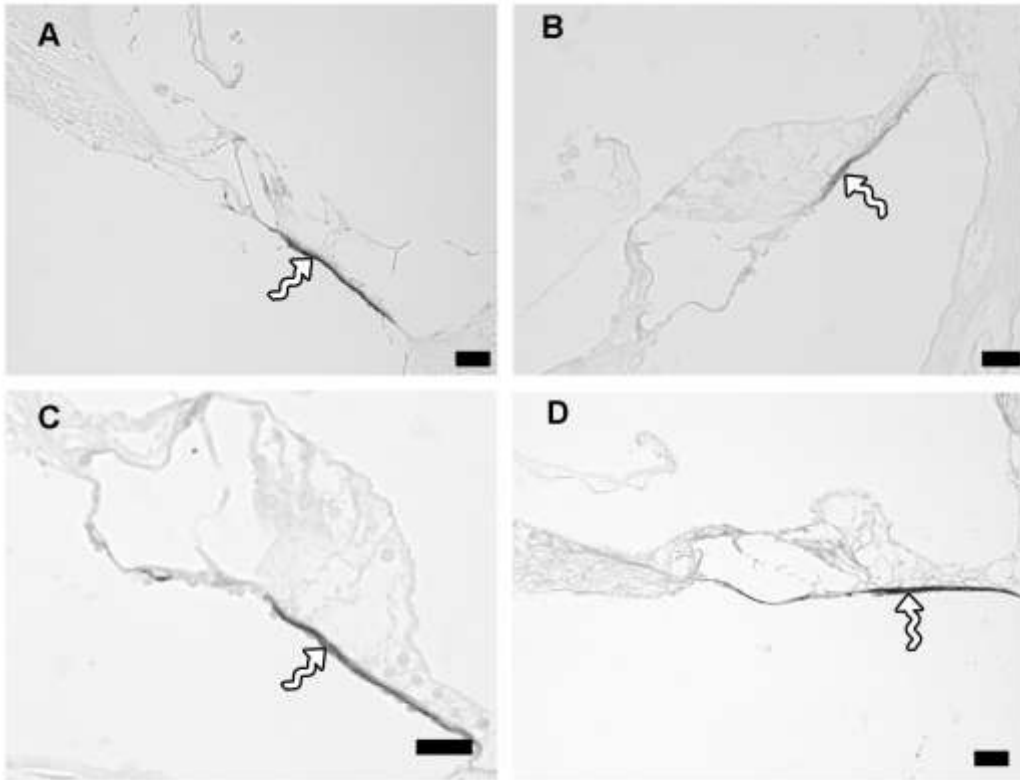


Tavola 27 Immunoistochimica per HIF-1 α su sezioni di coclea di ratti infartuati. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= infarto 3 ore, C= infarto 1 settimana, D= infarto 1 mese. Frecche curve= membrana basilare marcata con SG (scale bars= 20 μ m).

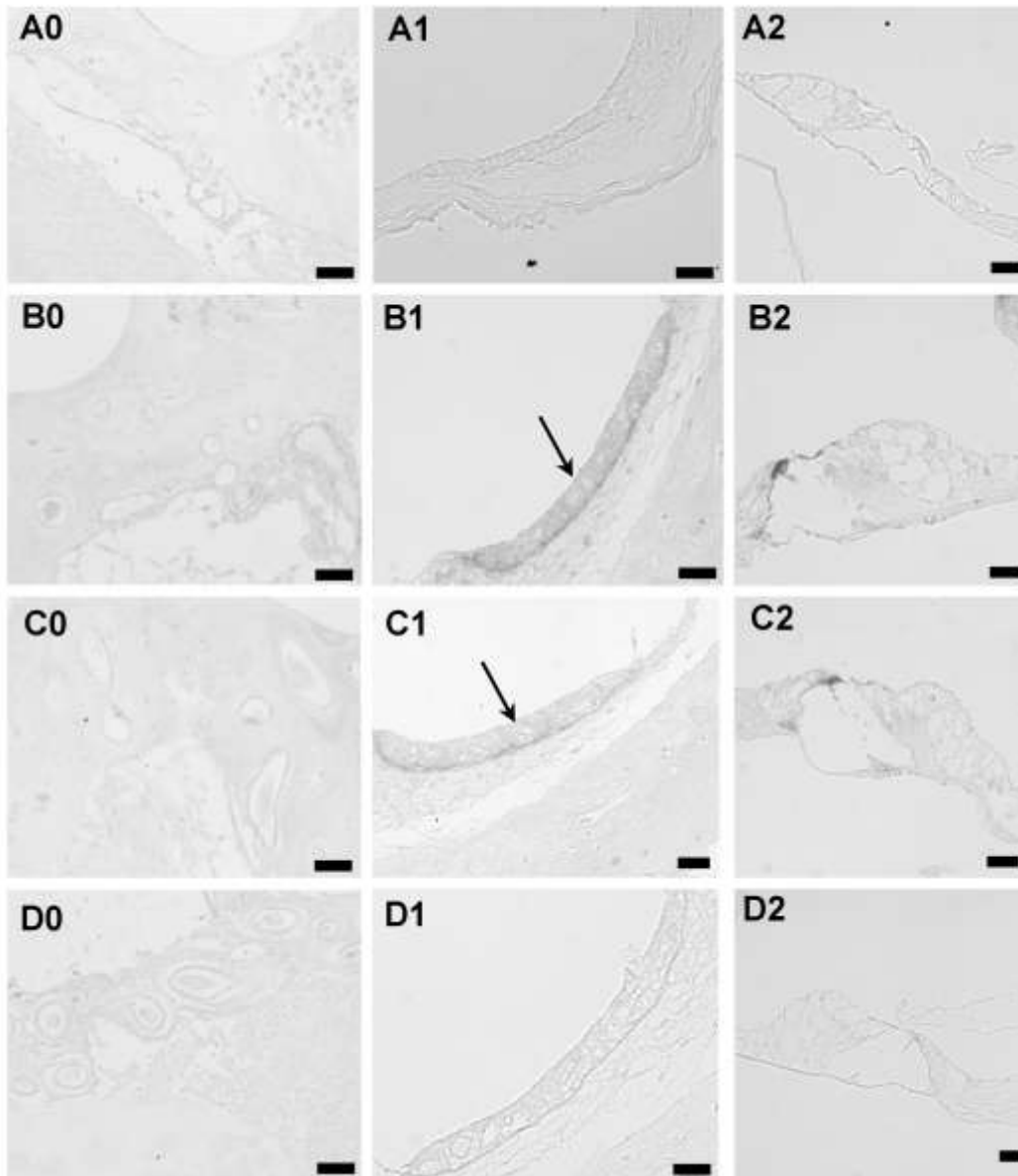


Tavola 28 Immunoistochimica per JNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= infarto 3 ore, C= infarto 1 settimana, D= infarto 1 mese, 0= vasi sanguigni modulari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG.

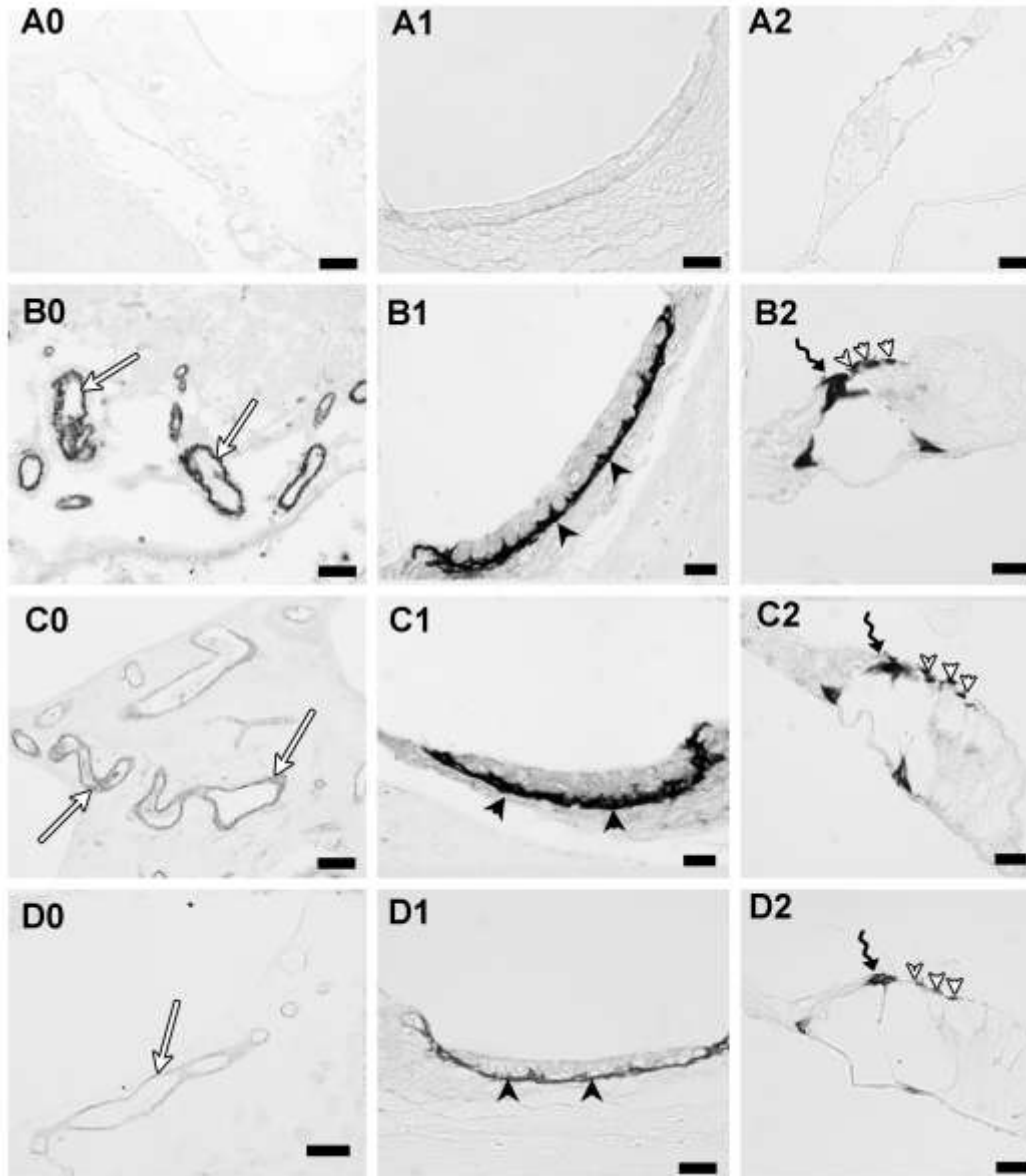


Tavola 29 Immunoistochimica per pJNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= infarto 3 ore, C= infarto 1 settimana, D= infarto 1 mese, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca=vasi sanguigni modiolari marcati con SG, freccia= stria vascolare marcata con SG, testa di freccia= cellule marginali della stria vascolare marcate con SG, testa di freccia bianca= OHC marcate con SG, freccia curva= cellule dei pilastri marcate con SG.

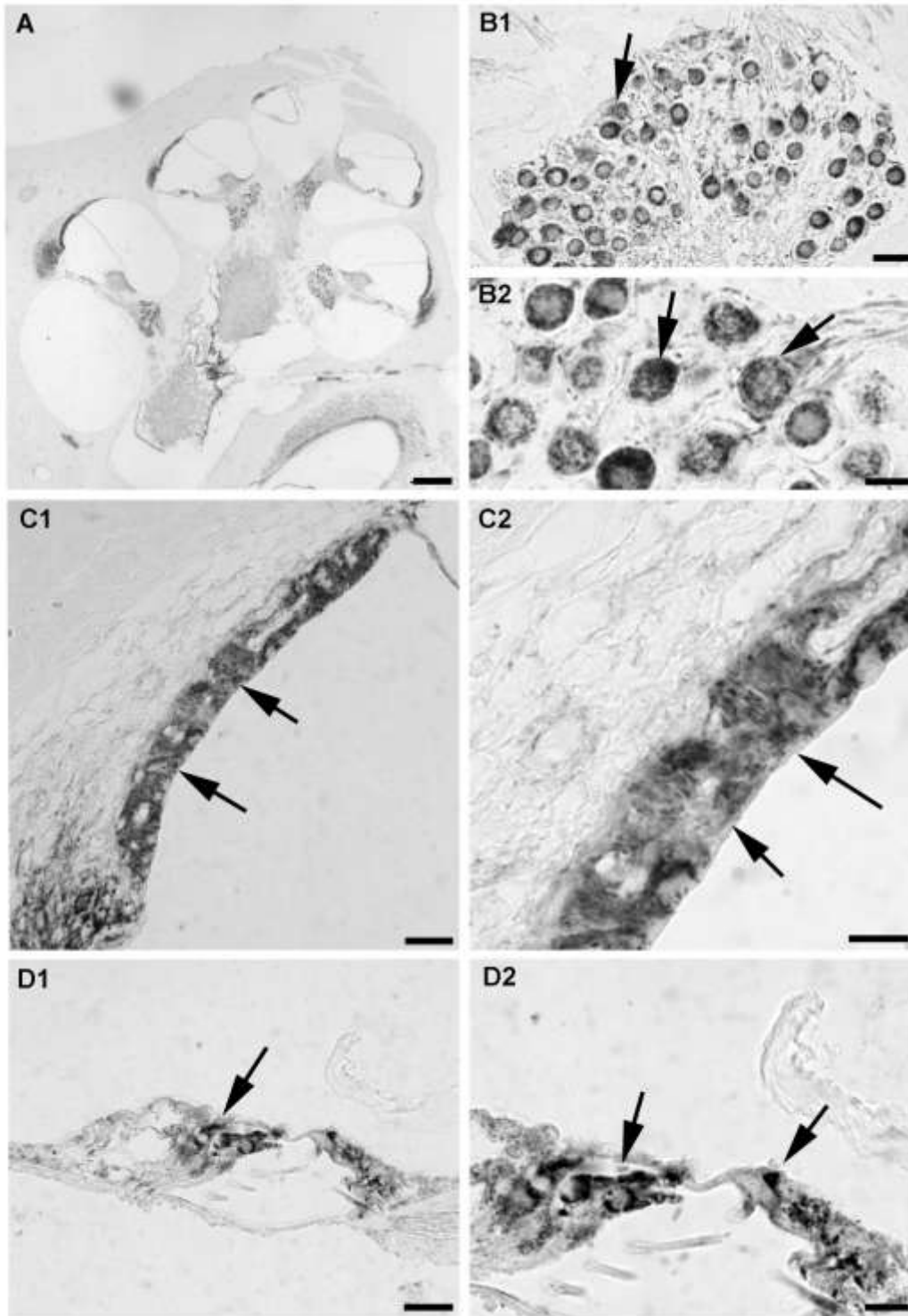


Tavola 30 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 3 ore. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 μ m), B=neuroni del ganglio spirale, C=organo del Corti, D=stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 μ m, 2= scale bars 10 μ m).

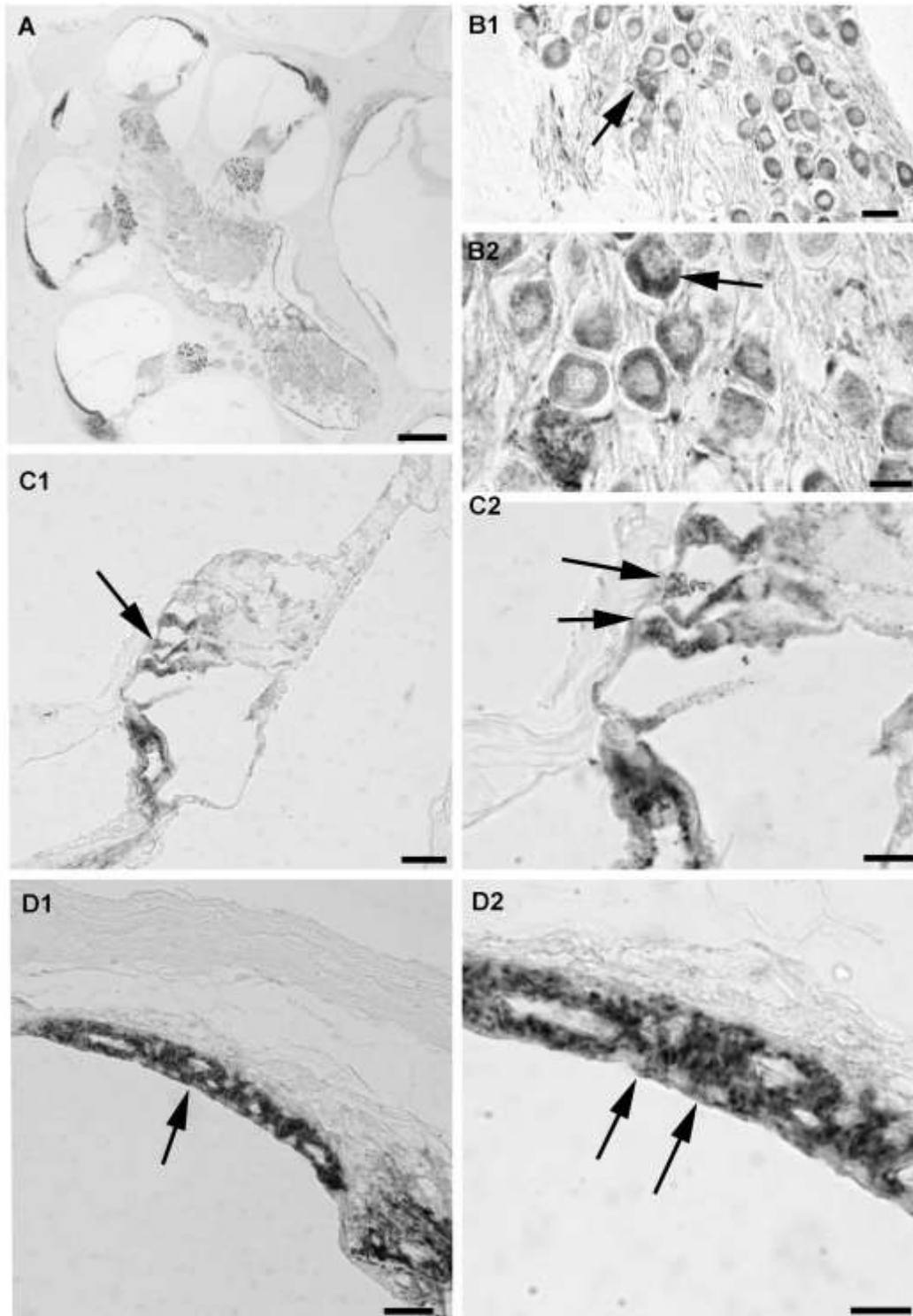


Tavola 31 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 1 settimana. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B=neuroni del ganglio spirale, C=organo del Corti, D=stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm).

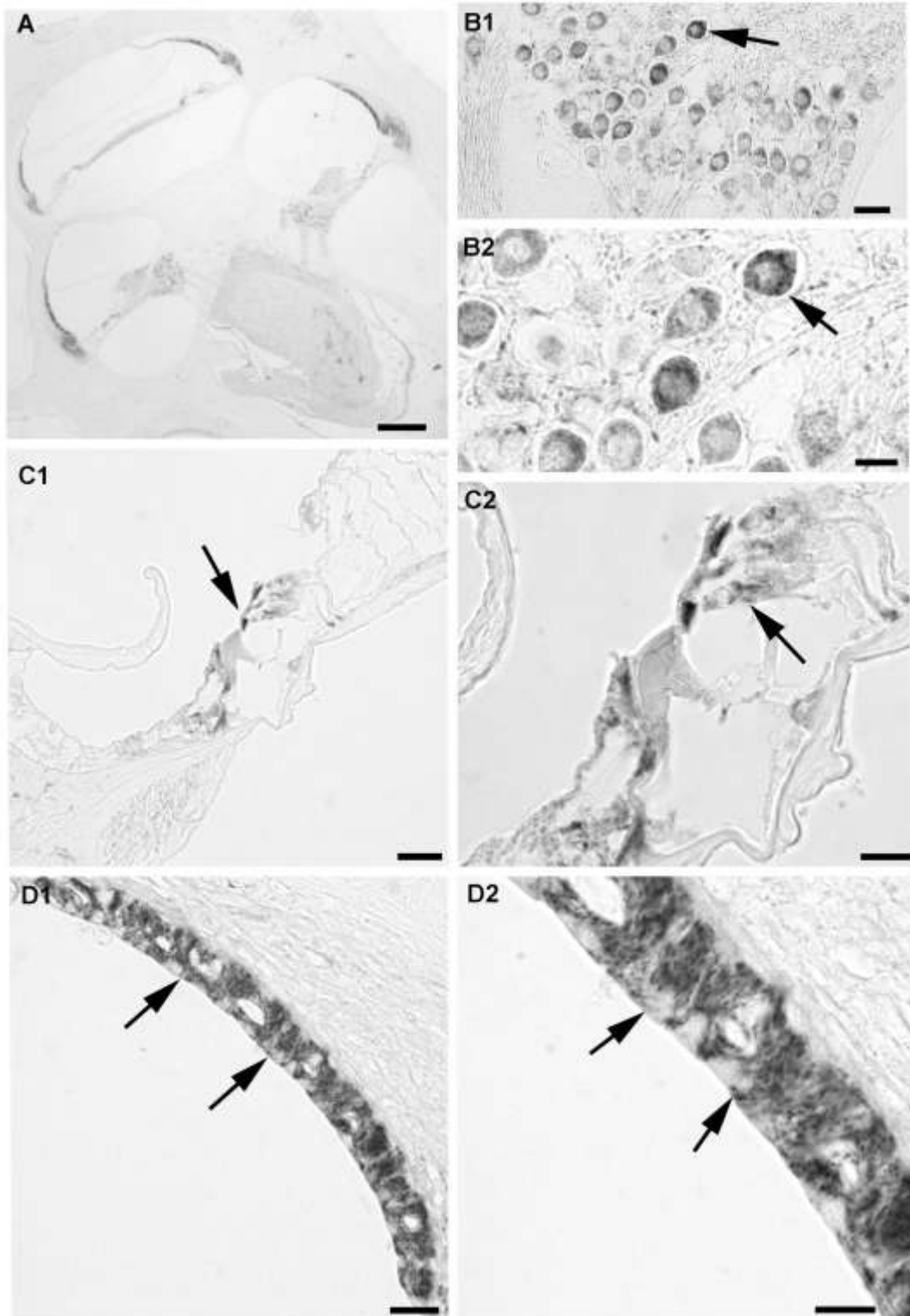


Tavola 32 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti che hanno subito ischemia coronarica di 1 mese. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 μ m), B= neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 μ m, 2= scale bars 10 μ m).

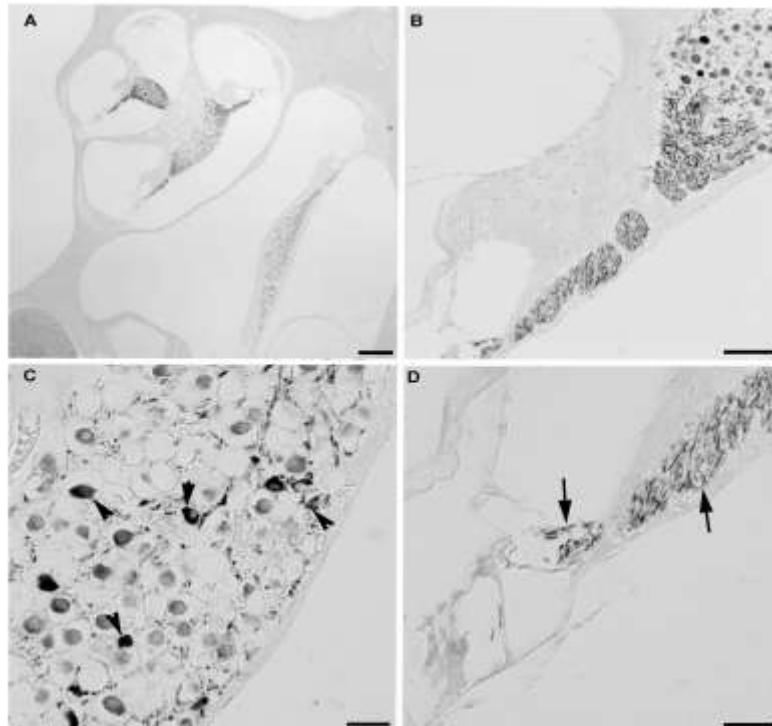


Tavola 33 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 1 giorno. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

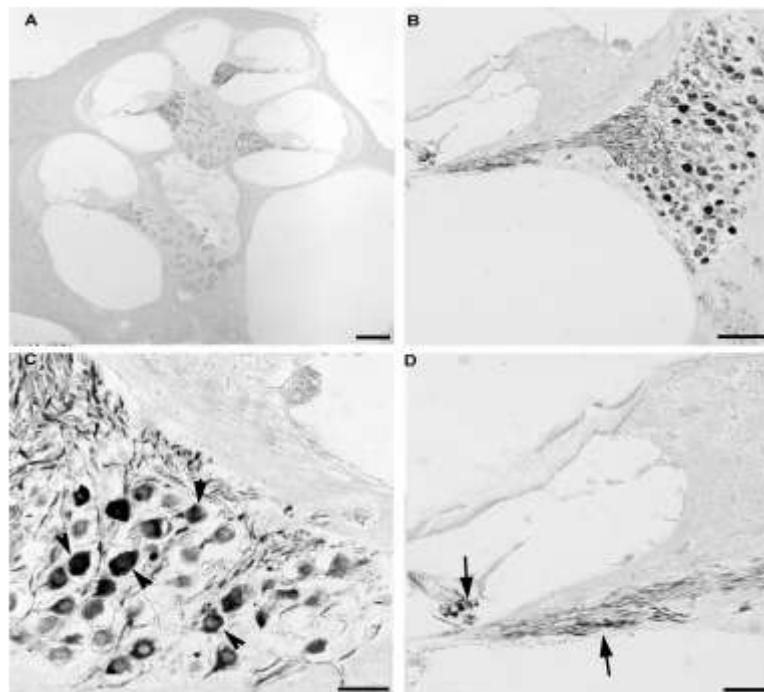


Tavola 34 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 14 giorni. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 µm), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 µm), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 µm), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 µm). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

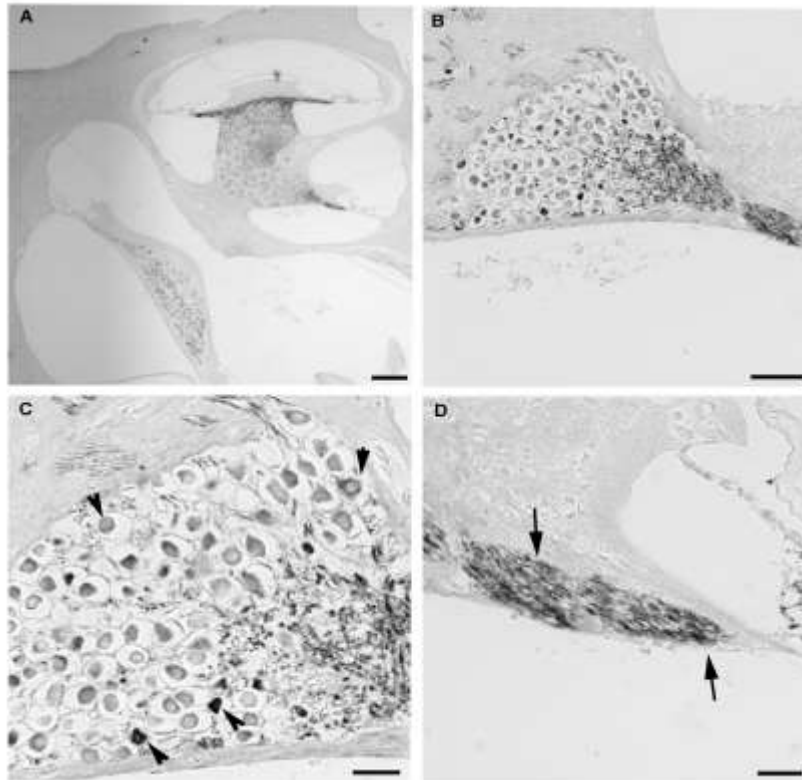


Tavola 35 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 21 giorni. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 μ m), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 μ m), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 μ m), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 μ m). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

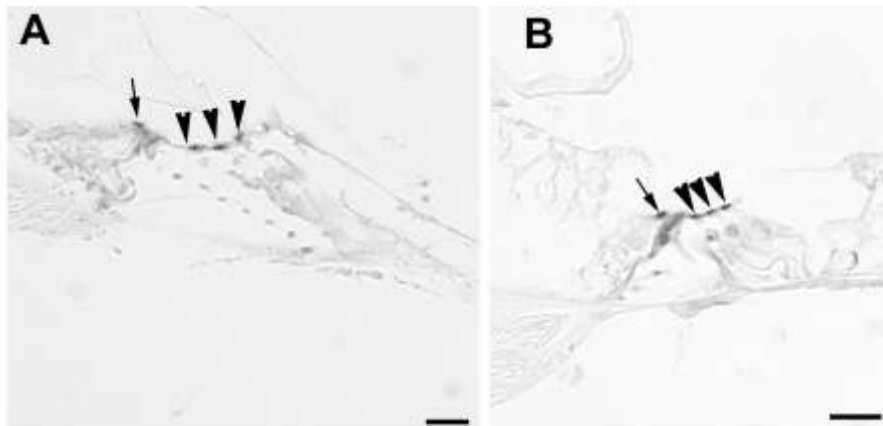


Tavola 36 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 1 giorno. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccie= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

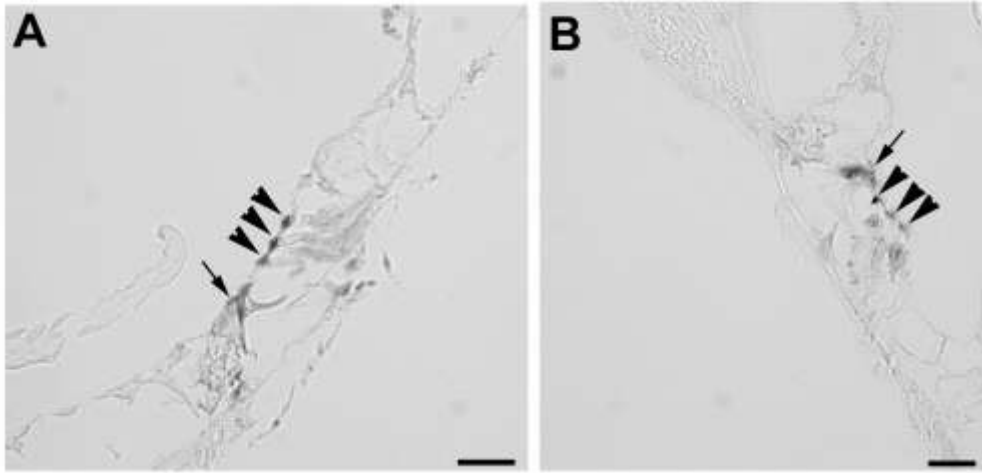


Tavola 37 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 14 giorni. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

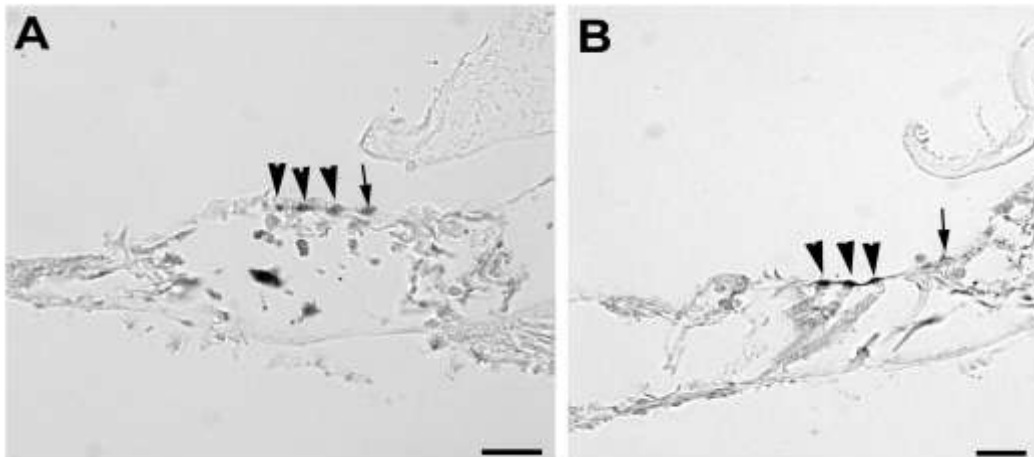


Tavola 38 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 21 giorni. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B=organo del Corti alla base. Freccce= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

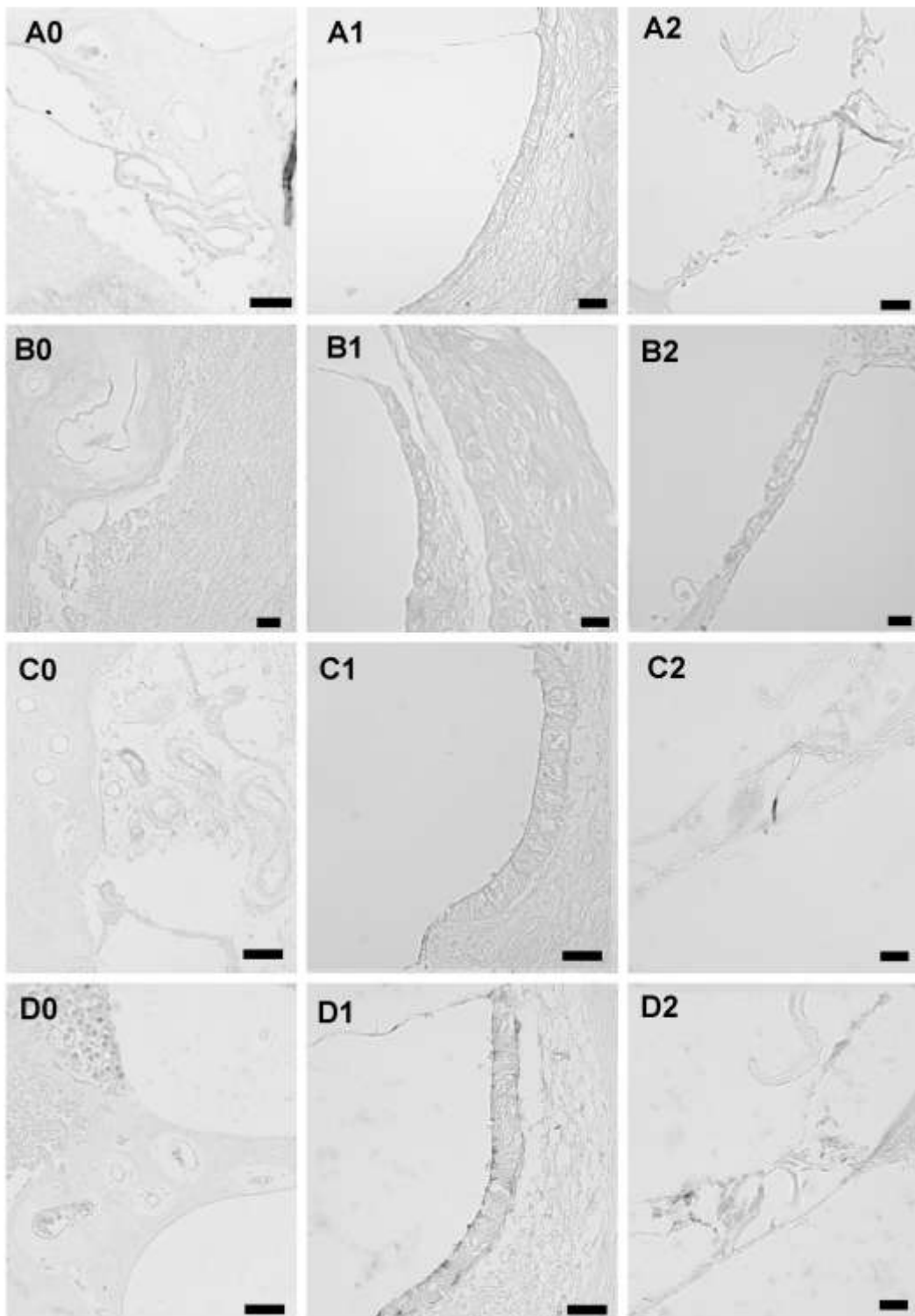


Tavola 39 Immunohistochimica per TF. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= rumore 1 giorno, C= rumore 14 giorni, D= rumore 21 giorni, 0= vasi sanguigni modulari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG.

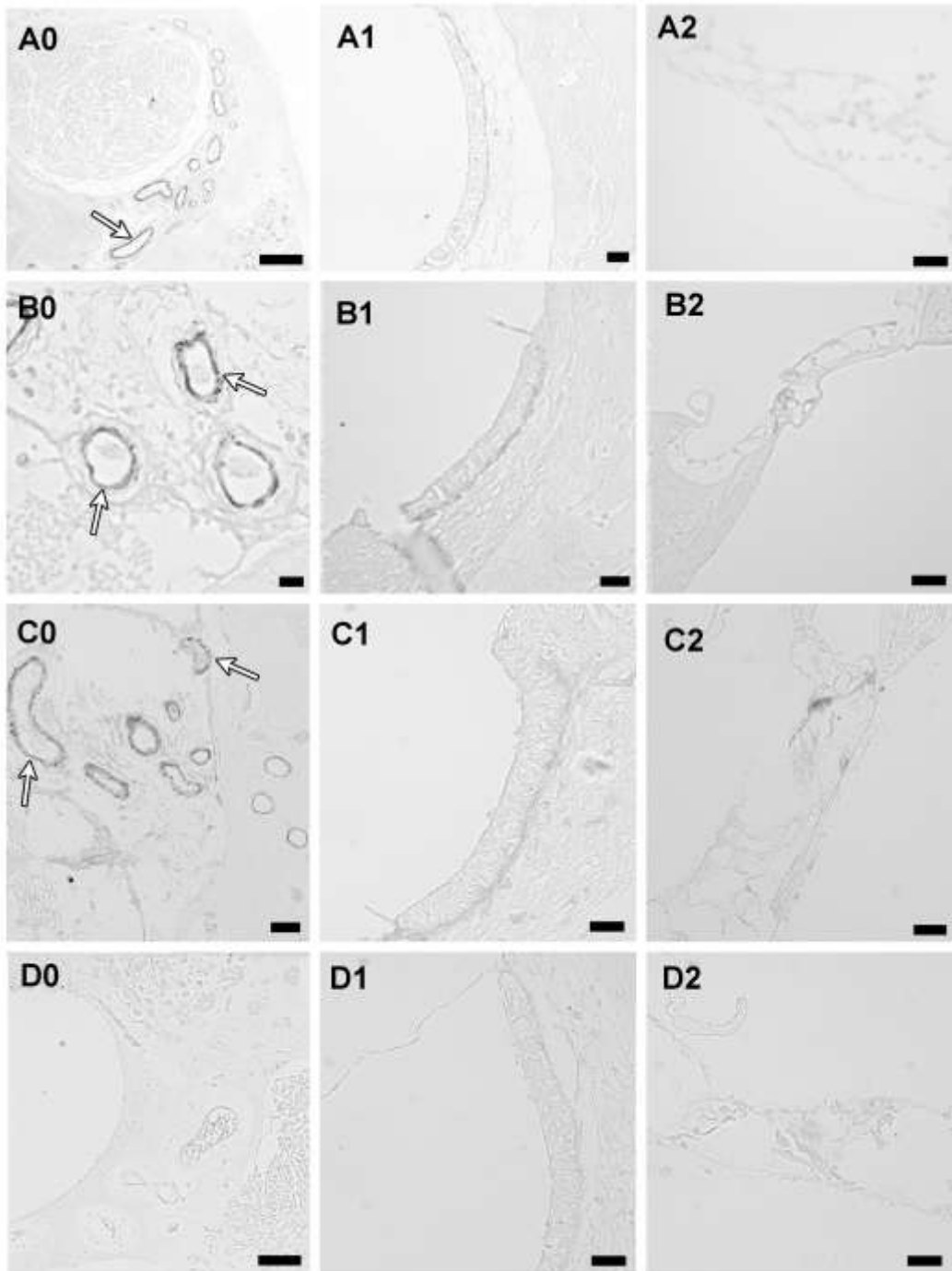


Tavola 40 Immunoistochimica per TM. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= rumore 1 giorno, C= rumore 14 giorni, D= rumore 21 giorni, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca= vasi sanguigni modiolari marcati con SG.

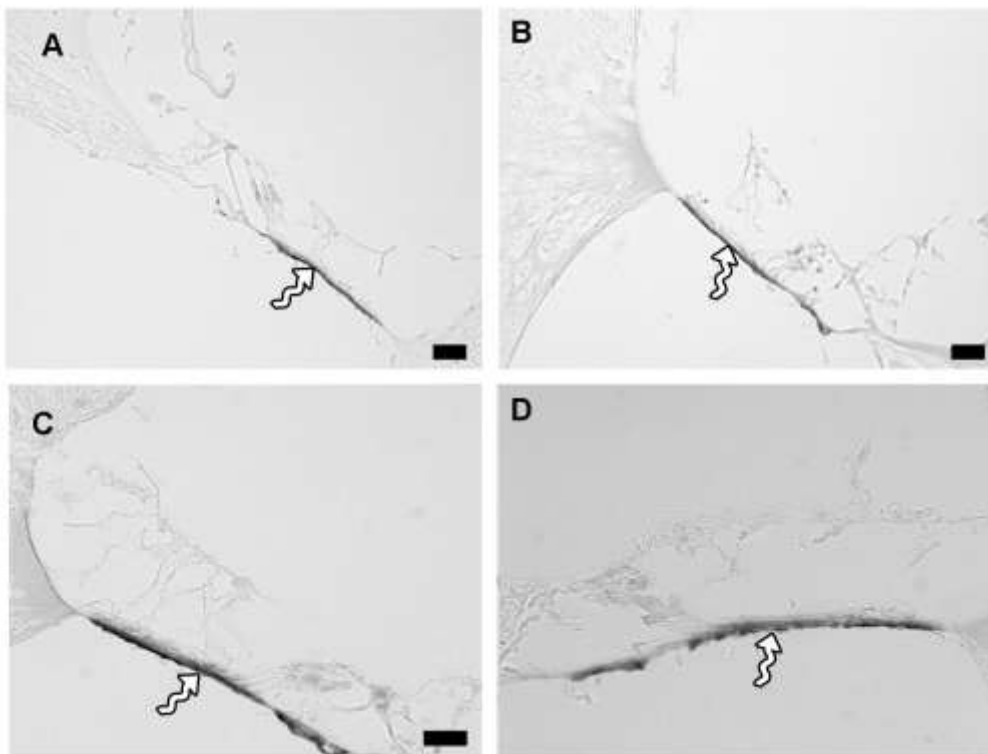


Tavola 41 Immunoistochimica per HIF-1 α su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= rumore post-1, C= rumore post-14, D= rumore post-21. Freccie curve= membrana basilare marcata con SG (scale bars= 20 μ m).

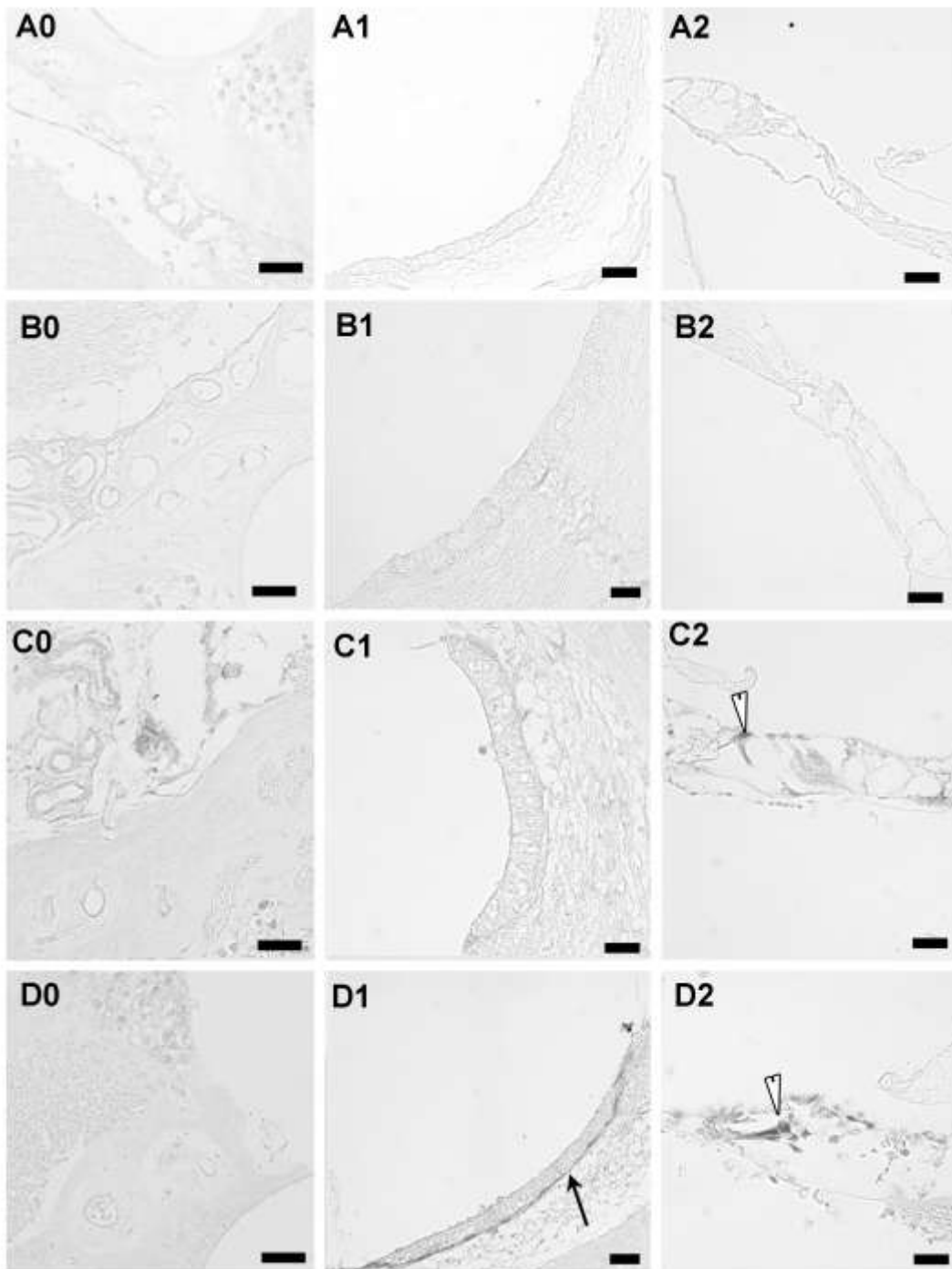


Tavola 42 Immunoistochimica per JNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= rumore 1 giorno, C= rumore 14 giorni, D= rumore 21 giorni, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG. Testa di freccia bianca: cellule dei pilastri marcate con SG.

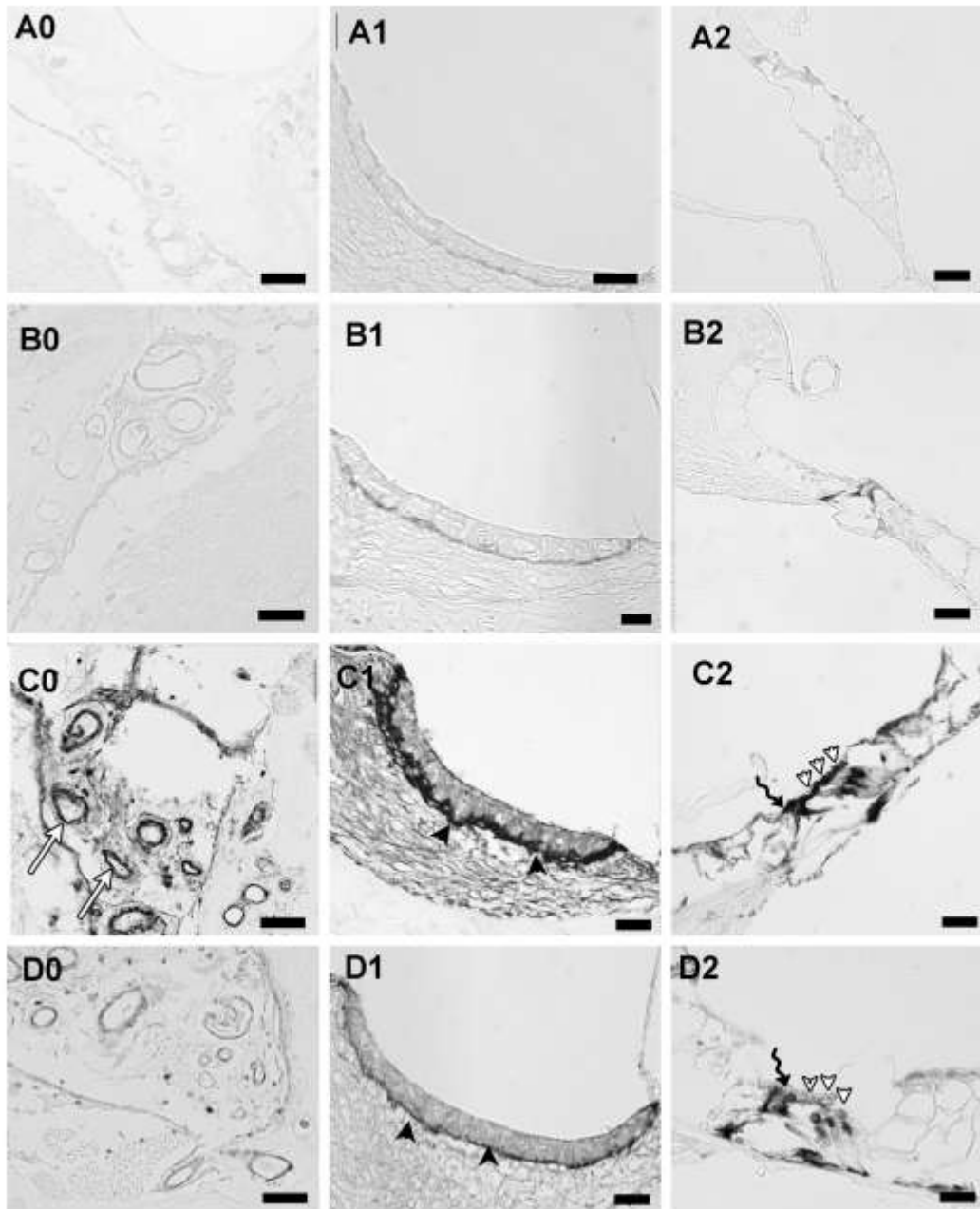


Tavola 43 Immunoistochimica per pJNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= rumore 1 giorno, C= rumore 14 giorni, D= rumore 21 giorni, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca=vasi sanguigni modiolari marcati con SG, freccia= stria vascolare marcata con SG, testa di freccia= cellule marginali della stria vascolare marcate con SG, testa di freccia bianca= OHC marcate con SG, freccia curva= cellule dei pilastri marcate con SG.

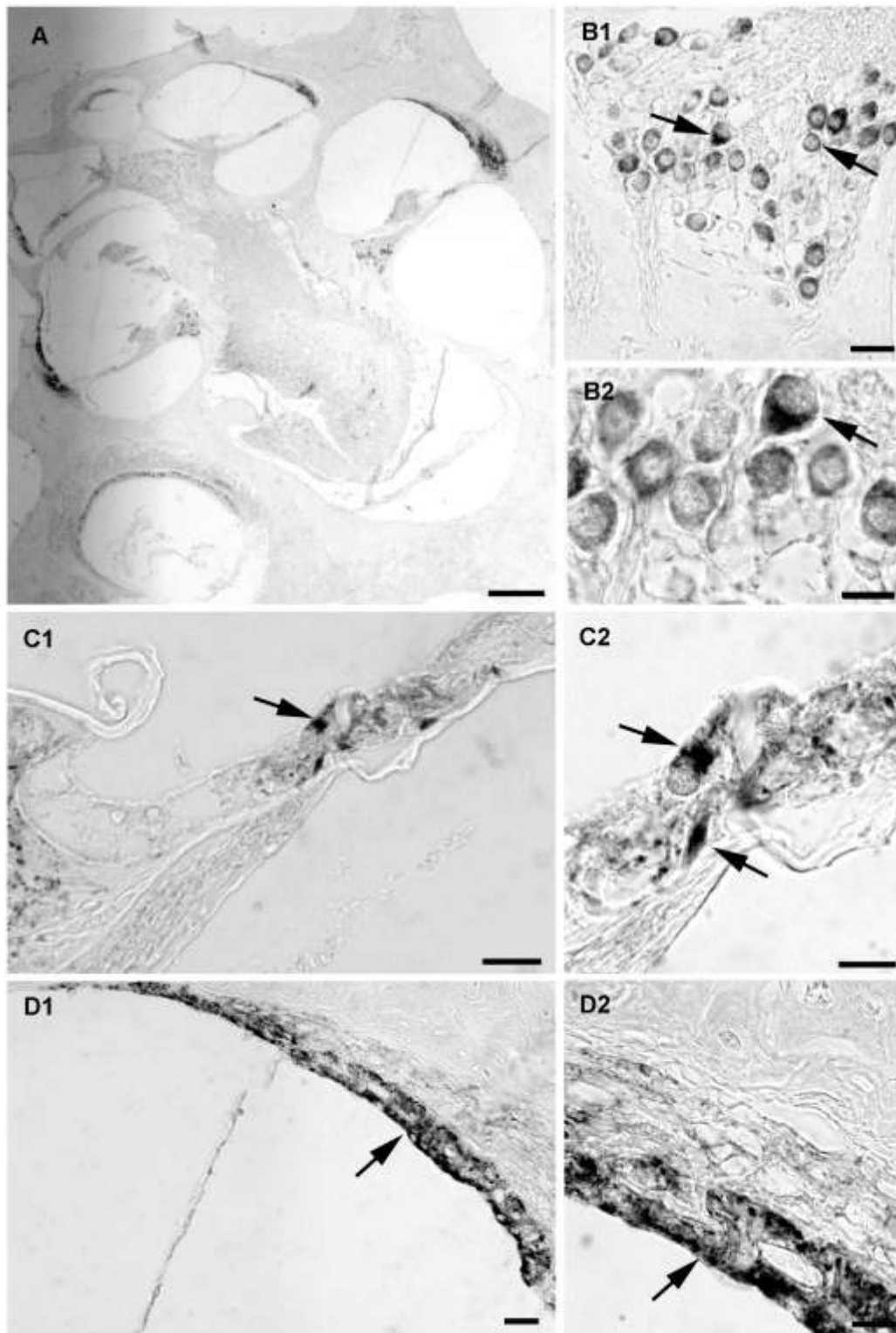


Tavola 44 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 1 giorno. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B=neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm).

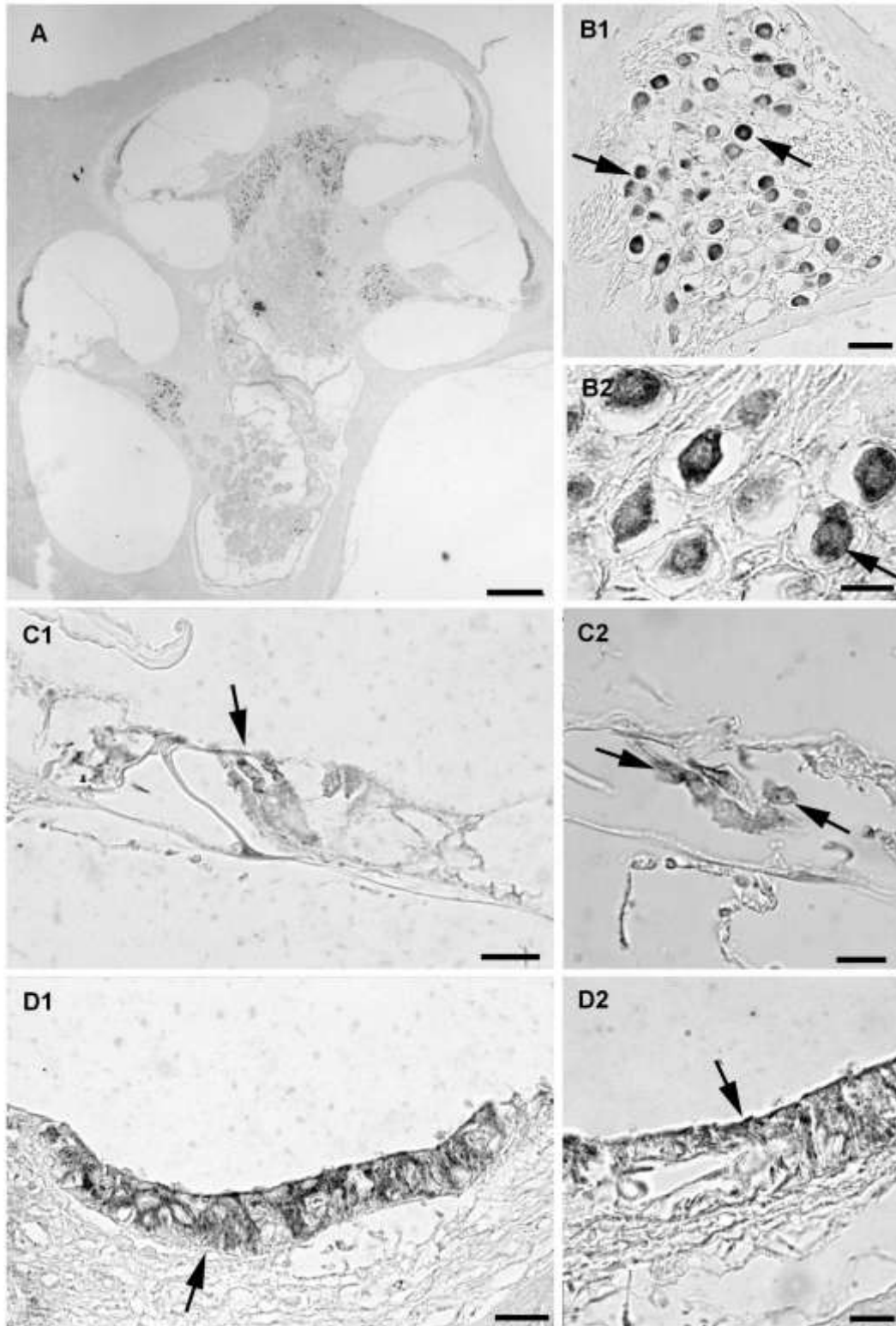


Tavola 45 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 14 giorni. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B=neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm).

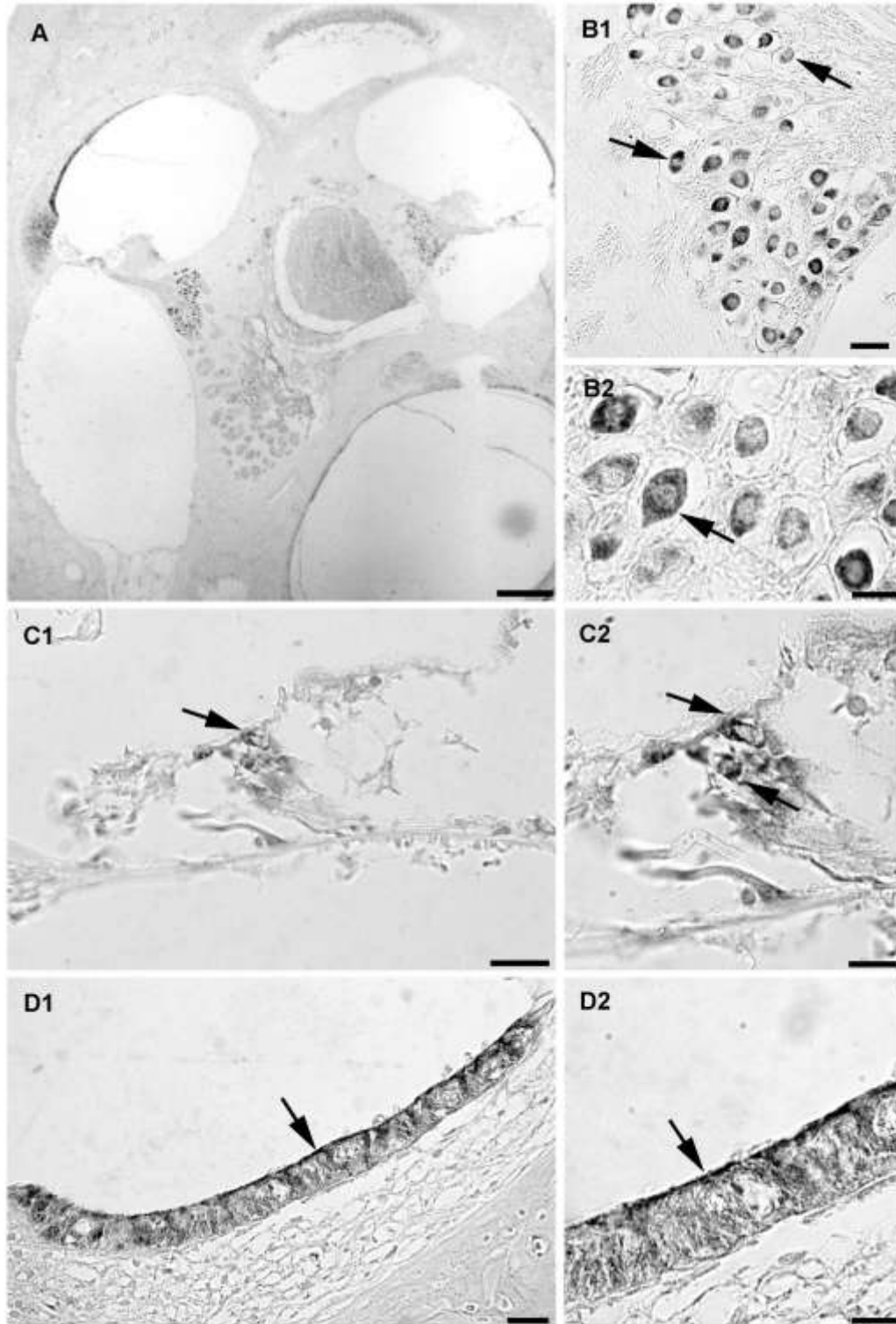


Tavola 46 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti esposti al rumore e sacrificati dopo 21 giorni. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 µm), B=neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccia= marcatura puntiforme mitocondriale. (1= scale bars 40 µm, 2= scale bars 10 µm, 3= scale bars 20 µm).

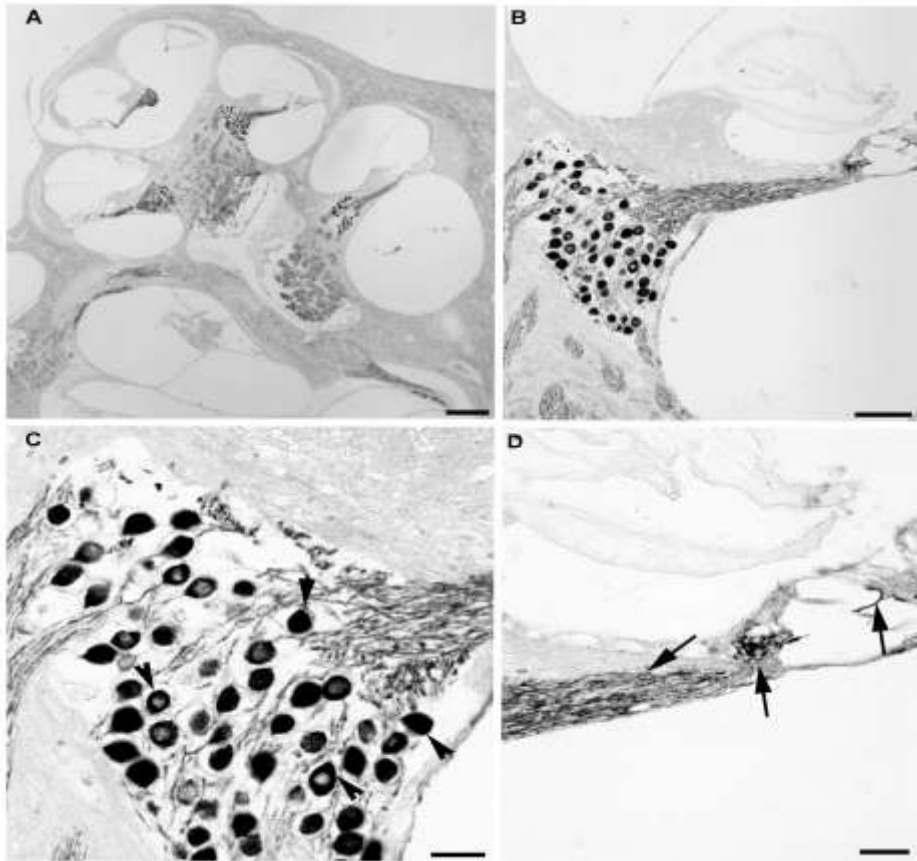


Tavola 47 Immunoistochimica per NF200 su sezioni di coclea di ratti trattati con cisplatino. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar= 200 μ m), B= ganglio spirale e fibre nervose (scale bar= 50 μ m), C= dettaglio dei neuroni (scale bar= 20 μ m), D= dettaglio delle fibre nervose (scale bar= 20 μ m). Testa di freccia= marcatura nei neuroni, freccia= marcatura nelle fibre nervose.

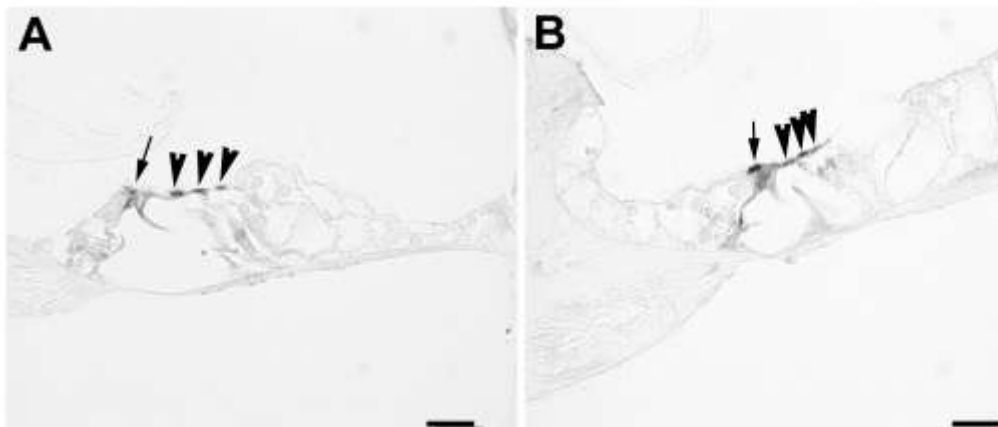


Tavola 48 Immunoistochimica per MYH-6 su sezioni di coclea di ratti trattati con cisplatino. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= organo del Corti all'apice, B= organo del Corti alla base. Freccie= cellule cigliate interne marcate con SG, teste di frecce= cellule cigliate esterne marcate con SG (scale bars= 20 μ m).

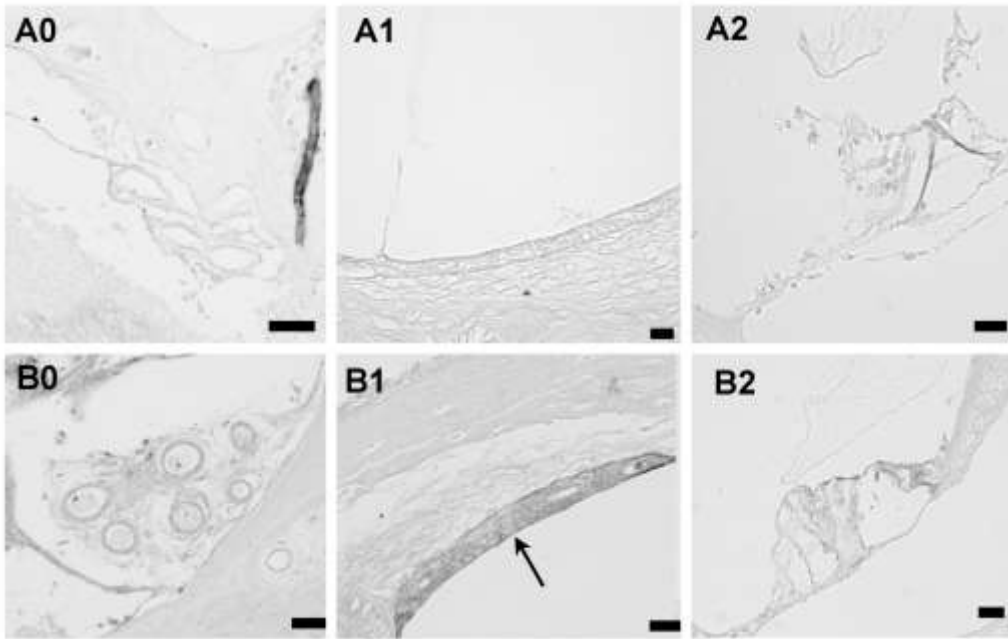


Tavola 49 Immunoistochimica per TF. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= cisplatino, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG.

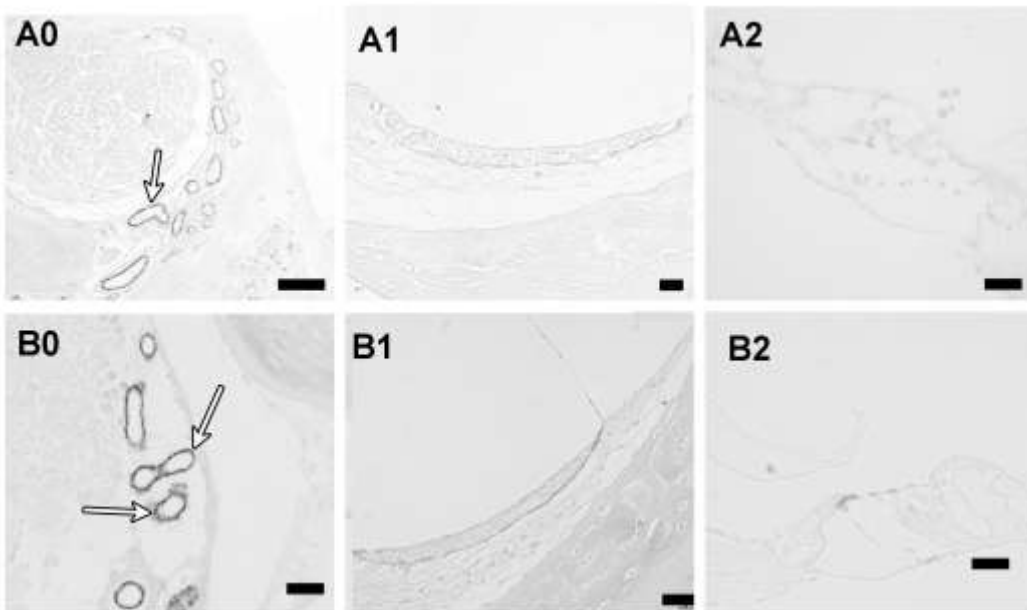


Tavola 50 Immunoistochimica per TM. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= cisplatino, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia bianca= vasi sanguigni modiolari marcati con SG.

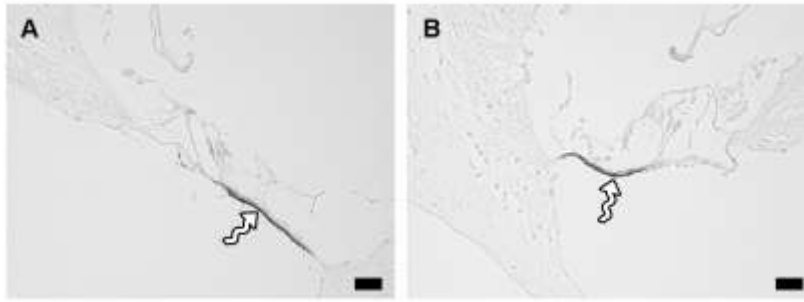


Tavola 51 Immunoistochimica per HIF-1 α su sezioni di coclea di ratti trattati con cisplatino. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= cisplatino. Freccie curve= membrana basilare marcata con SG (scale bars= 20 μ m).

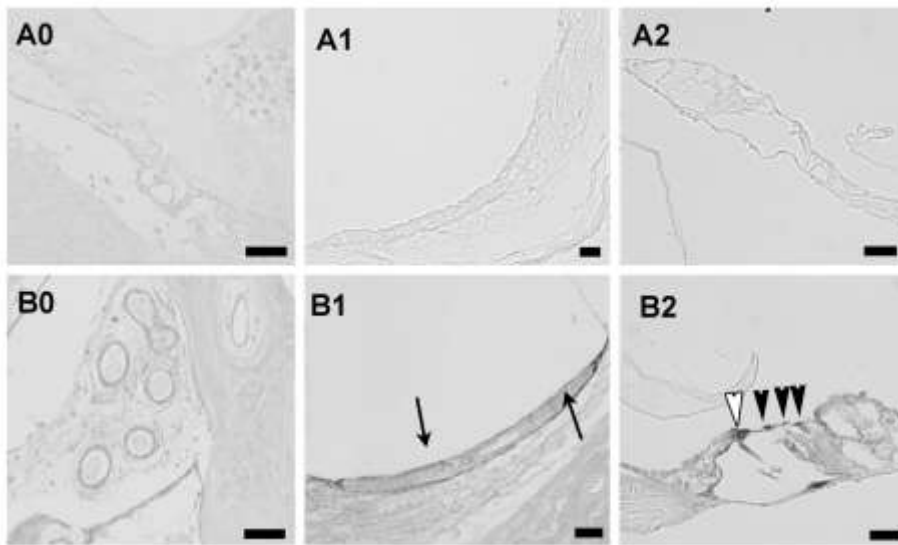


Tavola 52 Immunoistochimica per JNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B=cisplatino, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG. Testa di freccia bianca: cellule dei pilastri marcate con SG, testa di freccia nera: cellule cigliate marcate con SG.

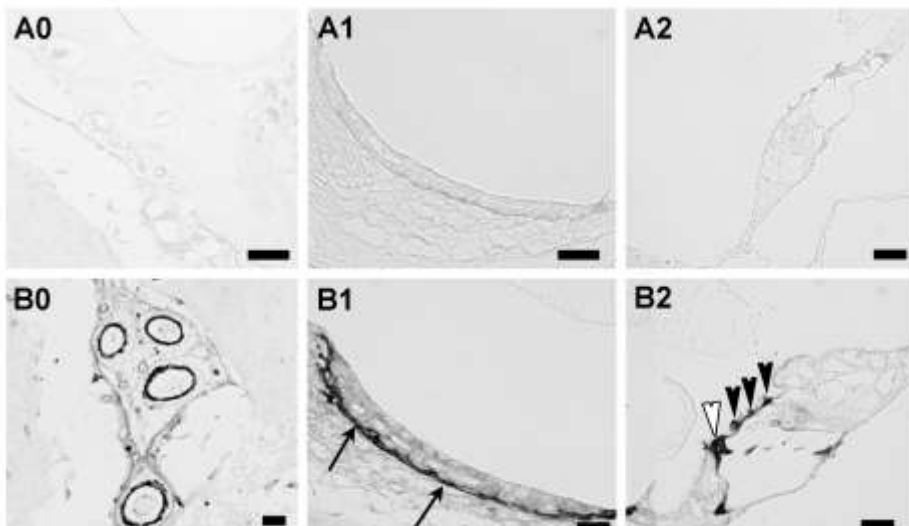


Tavola 53 Immunoistochimica per pJNK. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= controllo, B= cisplatino, 0= vasi sanguigni modiolari (scale bar= 50 μ m), 1= stria vascolare (scale bar= 20 μ m), 2= Organo del Corti (scale bar= 20 μ m). Freccia= stria vascolare marcata con SG. Testa di freccia bianca: cellule dei pilastri marcate con SG, testa di freccia nera: cellule cigliate marcate con SG.

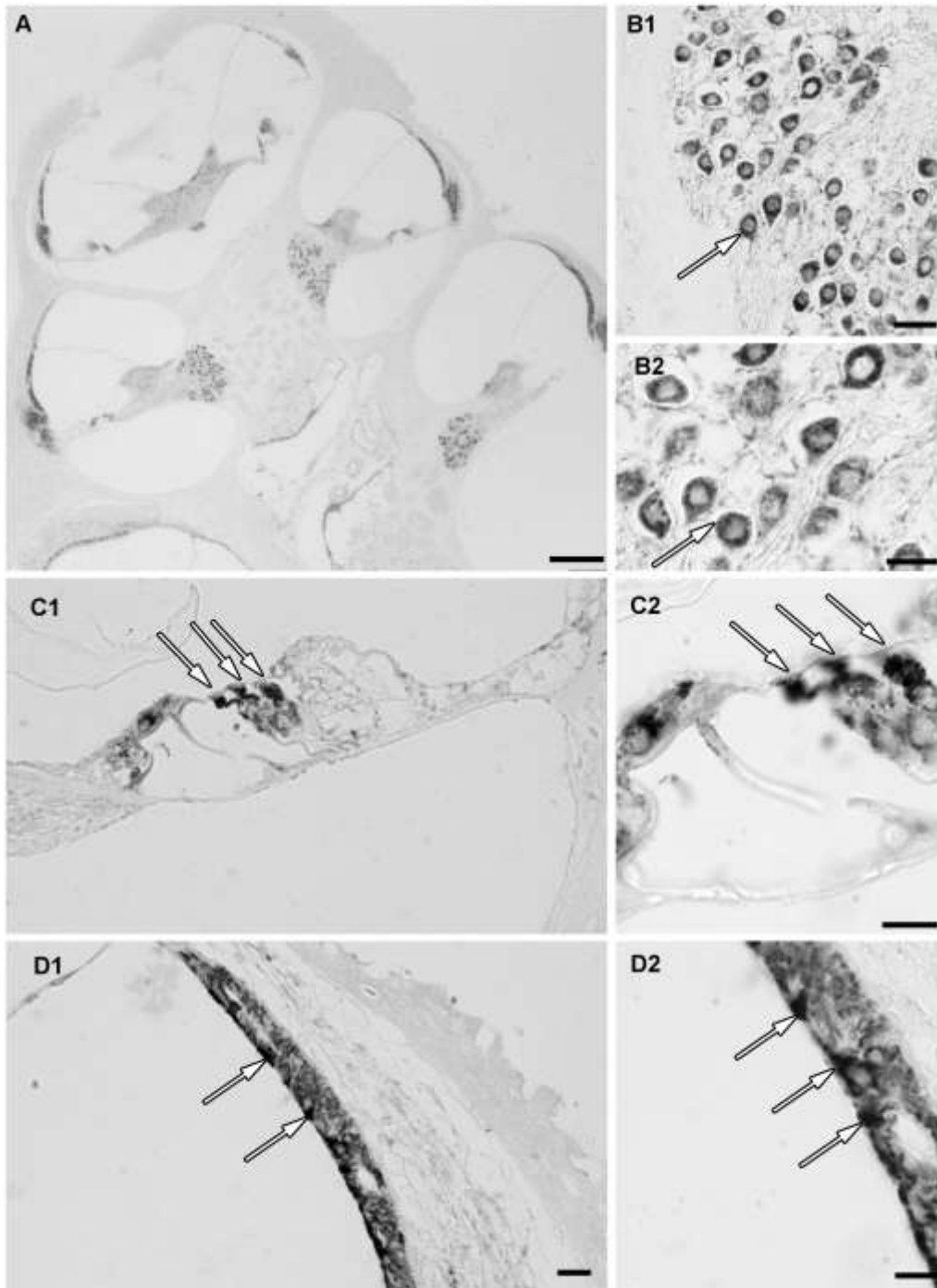


Tavola 54 Immunoistochimica per cyt-c su sezioni di coclea di ratti trattati con il cisplatino. In grigio si evidenzia la marcatura ottenuta con cromogeno SG. A= coclea (scale bar=200 μm), B= neuroni del ganglio spirale, C= organo del Corti, D= stria vascolare. Freccie bianche= marcatura diffusa. (1= scale bars 40 μm, 2= scale bars 10 μm).

7. BIBLIOGRAFIA

- Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, Dunn RS, Vorhees CV, Wills-Karp M, Degen JL, Davis RJ, Mizushima N, Rakic P, Dardzinski BJ, Holland SK, Sharp FR e Kuan C. Cerebral Ischemia-Hypoxia Induces Intravascular Coagulation and Autophagy. *Am J Pathol*; 169(2):566-583, 2006.
- Albuquerque AA, Rossato M, Oliveira JA e Hyppolito MA. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. *Braz J Otorhinolaryngol*; 75(1):43-49, 2009.
- Andersson A e Ebrsson H. Determination of cisplatin and cisdiammineaquachloroplatinum (II) ion by liquid chromatography using post-column derivatization with diethyldithiocarbamate. *J Chromatogr*; 652: 203-210, 1994.
- Andrews PA e Howell SB. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*; 2: 35-43, 1990.
- Angelborg C, Axelsson A e Larsen HC. Regional blood flow in the rabbit cochlea. *Arch Otolaryngol*; 110: 297-300, 1984.
- Anniko M e Sobin A. Cisplatin: evaluation of its ototoxic potential. *Am J Otol*; 7: 276-93, 1986.
- Ashkenazi A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*, 2 (6): 420-430.
- Axelsson A e Ryan AF. Circulation of the inner ear (I): Comparative study of the vascular anatomy in the mammalian cochlea. In *Physiology of the Ear*, ed. Jahn AF and Santos-Sacchi J, Singular, Thomson learning: pp 301-320, 2001.
- Baker K e Staecker H. Low Dose Oxidative Stress Induces Mitochondrial Damage in Hair Cells. *Anat Rec*; 295(11): 1868-1876, 2012.
- Bergers G e Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*; 7(4): 452-464, 2005.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronili V e Di Lisa F (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 264 (3): 687-701.
- Bertini I, Cavallaro G e Rosato A. Cytochrome c: occurrence and functions, *Chem. Rev.* 106: 90-115, 2006.
- Black S, Mahla ME e Cucchiara RF. Neurologic Monitoring. In: Miller RD ed. *Anaesthesia*. New York: Churchill Livingstone. Cap.35, 1994.
- Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M e Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* ;9(4): 458-462, 2003.

7. Bibliografia

- Böhm, I e Schild H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imag Biol*; 5 (1): 2–14, 2003.
- Borghi C, Modugno CG, Brandolini C e Pirodda A. Is tinnitus useful in early detection of incoming heart decompensation? *Med Hypotheses*; 67(3): 437-439, 2006.
- Brechtelsbauer PB, Prazma J, Garrett CG, Carrasco VN e Pillsbury HC 3rd. Catecholaminergic innervation of the inner ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 103: 566-574, 1990.
- Breckenridge DG e Xue D. (2004). Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16 (6): 647-52.
- Brockenbrough JM., Rybak LP And e Matz GJ. Ototoxicity. *Head and neck surgery – otolaryngology* In B. J. Bailey Ed. pp: 1893-1898, 2001.
- Cai Q, Du X, Zhou B, Cai C, Kermany MH, Zhang C e Yoo T. Effects of simvastatin on plasma lipoproteins and hearing loss in apolipoprotein E gene-deficient mice. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 71(5): 244-250, 2009.
- Campbell NA. *Biologia*. Zanichelli Editore pp. 1465, 2004.
- Cardinaal RM, Groot JCMJ, Huizing EH, Veldman JE e Smoorenburg GF. Dose-dependent effect of 8-day CDDP administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear Res*; 144: 135–146, 2000.
- Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G e Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*; 90: 315-323, 1997.
- Carlisle L, Aberdeen J, Forge A e Burnstock G. Neural basis for regulation of cochlear blood flow: peptidergic and adrenergic innervation of the spiral modiolar artery of the guinea pig. *Hear Res*; 43: 107-113, 1990.
- Casani AP. Fisiologia del microcircolo e dell’endotelio, in *NEOS nuove evidenze, orientamenti e strategie*, ed. Casani AP, Guidetti G, Manfrin M, Messina A. Mediserve; p. 39.
- Cascella V. Studio del danno uditivo causato da rumore o da cisplatino: effetto protettivo di Acuval 400 ed N-Qter. Tesi di dottorato, Università degli studi di Ferrara, 2012.
- Cheng AG, Huang T, Stracher A, Kim A, Liu W, Malgrange B, Lefebvre PP, Schulman A e Van de Water TR. Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res*; 850: 234-243, 1999.
- Clerici WJ, Hensley K, Dimartin DL e Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlea explants. *Hear Res*, 98: 116-124, 1996.
- Dai M e Shi X. Fibro-Vascular coupling in the control of cochlear blood flow. *PLoS One*; 6(6): e20652. doi:10.1371/journal.pone.0020652

7. Bibliografia

- Dai M, Nuttall A, Yang Y e Shi X. Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. *Hear Res*; 254: 100-107, 2009.
- Dewoskin RS e Riviere JE. Cisplatin-induced loss of kidney copper and nephrotoxicity is ameliorated by a single dose of diethyldithiocarbamate but not mesna. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112: 182-189, 1992.
- Dieckmann KP, Struss WJ, e Budde U. Evidence for acute vascular toxicity of cisplatin-based chemotherapy in patients with germ cell tumour. *Anticancer Res*; 31(12): 4501-4505, 2011.
- Dive C e Hichman JA. Drugs-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br. J. Cancer*; 64: 192-196, 1991.
- Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X e van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*; 26: 613-624, 2006.
- Ekborn A, Laurell G, Ehrsson H e Miller J. Intracochlear administration of thiourea protects against CDDP-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hear Res*; 181:109–15, 2003.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*; 35(4): 495–516, 2007.
- Encyclopaedia Britannica Inc., Organ of Corti, 1997. Available from <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/431888/organ-of-Corti>.
- Falbe Hansen J. Clinical and experimental Histological studies on effects of salicylates and quinine on the ear. *Acta Otolaryngol*; 44: 1-216, 1941.
- Fitzpatrick SF, Tambuwala MM, Bruning U, Schaible B, Scholz CC, Byrne A, O'Connor A, Gallagher WM, Lenihan CR, Garvey JF, Howell K, Fallon PG, Cummins EP e Taylor CT. An intact canonical NF- κ B pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia. *J Immunol*; 186(2): 1091-1096, 2011.
- Fumarola C e Guidotti GG. (2004). Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*, 9 (1): 77-82.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C e Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*; 13: 1423–1433, 2006.
- Gately DP e Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer*, 67: 1171-1176, 1993.
- Gewies A. Introduction to apoptosis. *ApoReview*; pp. 26, 2003.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C e Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*;59(4):657-663. 2001
- Goodsell DS . The molecular perspective: Cisplatin. *The Oncologist*; 11: 316-317, 2006.
- Grandori F. e Martini A. Potenziali evocati uditivi. Basi teoriche e applicazioni chimiche. Ed. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova: pp. 635, 1995.

7. Bibliografia

- Gross A., Yin X. M., Wang K., Wei M. C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P. e Korsmeyer S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.*, 274: 1156-1163.
- Guenzi S. (2006). Kit e prodotti per lo studio dell'apoptosi. *Biotechnologie 2000*: 8-15.
- Hall RM e Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat.* 1: 109-19, 1998.
- Harris JP, Fukuda S e Keithley EM. Spiral Modiolar vein: its importance in inner ear inflammation. *Acta Otolaryngol*; 110: 357-365,1990.
- Haupt H, Scheibe F, Ludwig C e Petzold D. Measurement of perilymphatic oxygen tension in guinea pigs exposed to loud sound. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 248: 413-416, 1991.
- Hawkins JE. The role of vasoconstriction in noise-induced hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol*; 80:903-913, 1971.
- Hayashida T, Hiel H, Dulon D e Erre J. Dynamic changes following combined treatment with gentamicin and ethacrynic acid with and without acoustic stimulation. *Acta Otorinolaryngol*; 108(5-6): 404-413, 1989.
- Henkels KM e Turchi JJ. Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*; 57: 4488-4492, 1997.
- Hibino H, Nin F, Tsuzuki C e Kurachi Y. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflügers Arch*; 459(4): 521-533, 2010.
- Hill JM, Loeb E, Maclellan A, Hill NO, Khan A e King JJ. Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases. *Cancer Chemother*; 59: 647-59, 1975.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM e Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J*; 23: 2134-2145, 2004.
- Hu S, Haj-Yehia A e Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*; 5: 415-418, 2000.
- Jamieson ER e Lippard SJ. Structure, recognition and processing of cisplatin DNA adducts. *Chem Rev*; 99: 2467-2498, 1999.
- Johnsson LG e Hawkins JE Jr Degeneration patterns in human ears exposed to noise. *Ann Otol Rhinol Laryngol*; 85(6 PT 1): 725-739, 1976.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G e Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*; 410: 549-554, 2001.

7. Bibliografia

- Kaufmann SH e Earnshaw W. C. (2000). Induction of apoptosi by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.*, 256 (1): 42-49.
- King TC. *Patologia, collana percorsi integrati*. Ed. Elsevier Masson; pp 383, 2008.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH e Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*; 14: 5579–5588, 1995.
- Kohllöffel L. On the connection membrane Corti-organ of Corti. In *Les Colloqiles de l'institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, ed M.Portmann, J.M.Aran, Paris, France, pp. 15-24, 1977.
- Kohn SM, Fradis J, Zidan L, Podoshin E, Robinson E e Robinson I. Cisplatin ototoxicity in guinea pigs with special reference to toxic effects in the stria vascularis. *Laryngoscope*; 98(8 Pt 1): 865-71, 1988.
- Krammer PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune. System. *Nature*, 407: 789-795.
- Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ e Rakic P. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100(25): 15184-9, 2003.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N e Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease Elsevier Health Sciences*, pp. 117-119, 2009.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N e Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; 171: 4672–4679, 2003.
- Lamm K e Arnold W. Noise-induced cochlear hypoxia is intensity dependent, correlates with hearing loss and precedes reduction of cochlear blood flow. *Audiol Neurootol*; 1: 148-160, 1996.
- Lamm K e Arnold W. Noise-induced cochlear hypoxia is intensity dependent, correlates with hearing loss and precedes reduction of cochlear blood flow. *Audiol Neurootol*; 1: 148-160, 1996.
- Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*; 11: 118-124, 1997.
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*; 36(1): 1-12, 2004.
- Li G, Frenz DA, Brhmlblatt S, Feghali JG, Ruben RJ, Berggren D, Arezzo J e Van De Water TR. Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemoteraperutic efficacy. *Neurotoxicology*; 22: 163-176, 2001.
- Li P, Nijhawa D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES e Wang X. Cytochrome c and dATPdependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479-489, 1997.

7. Bibliografia

- Lim DJ. Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res*; 22: 117-146, 1986.
- Liu X, Kim C, Yang J, Jemmerson R e Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*; 86: 147-57, 1996.
- Locksley RM, Killeen N e Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; 104: 487–501, 2001.
- Loeffler M. e Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell. Res.*, 256 (1): 19-26, 2000.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C e Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490, 1998.
- Maass B, Baumgartl H e Lubbers DW. Lokale pO₂- und pH₂-Messungen mit Nadelelektroden zum Studium der Sauerstoff-versorgung und Mikrozirkulation des Innenohres. *Arch Otorhinolaryngol*; 214: 109-124, 1976.
- MacFarlane M e Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep*; 5(7): 674–678, 2004.
- Mandic A. Elucidation of pro-apoptotic signalling induced by cisplatin. (Tesi). pp.46. Department of Oncology-Patology, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, 2003.
- Martini A, Prosser S, Aimoni C, Bovo R, Ciorba A e Trevisi P. *Audiologia e Foniatria*. Omega Edizioni, 2011.
- Mazurek B, Winter E, Fuchs J, Haupt H e Gross J. Susceptibility of the hair cells of the newborn rat cochlea to hypoxia and ischemia. *Hear Res*; 182: 2-8, 2003.
- Melamed SB, Kaltenbach JA, Church MW, Burgio DL e Afman CE. Cisplatin-induced increases in spontaneous neural activity in the dorsal cochlear nucleus and associated outer hair cell loss. *Audiology*; 39 (1), 24–29, 2000.
- Mercié P, Seigneur M, Constans J, Boisseau M e Conril C. Dosage plasmatique de la thrombomoduline dans les maladies systemiques, *Rev Med Interne*; 18:126-131, 1997.
- Moroso MJ, Blair RL. A review of Cis-platinum ototoxicity. *J Otolaryngol*; 12 (6), 365–369, 1983.
- Müller M, Klinke R, Arnold W e Oestreicher E. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited. *Hear Res*; 183: 37-43, 2003.
- Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Tominaga M, Hayashi H, Yamamoto H, Liu X, e Nuttall AL. Disorders of cochlear blood flow. *Brain Res Rev*; 43(1): 17-28, 2003.
- Nakashima T, Suzuki T, Iwagaki T e Hibi T. Effects of anterior inferior cerebellar artery occlusion on cochlear blood flow—a comparison between laser-Doppler and microsphere methods. *Hear Res*; 162: 85–90, 2001.

7. Bibliografia

- Nicotera T, Henderson D, Hu BH e Zheng XY. Noise exposure and mechanisms of hair cell death. In: Prasher D, Henderson D, Kopke R, Salvi R, Hamernik R. Noise Induced Hearing Loss: Advances in Basic Science and Clinical Application. NRN Publications, Cambridge, England, 2002.
- Norbury CJ e Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 41:367–401, 2001.
- Olivetto E, Simoni E, Guaran V, Astolfi L e Martini A. Morphological and functional structure of the inner ear: Its relation to Ménière's disease. *Audiological Medicine*; 10: 160–166, 2012.
- Orita Y, Sando I, Miura M, Haginomori S e Hirsch BE. Cochleosaccular pathology after perinatal and postnatal asphyxia: histopathologic findings. *Otol Neurotol*; 23: 34-38, 2002.
- Ozols RF e Young RC. High-dose cisplatin therapy in ovarian cancer. *Semin Oncol*; 12:21–30, 1985.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P e Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*; 443: 700-704, 2006.
- Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer*; 34: 1535-1542, 1998.
- Perlman HB e Kimura R. Cochlear blood flow in acoustic trauma. *Acta Otolaryngol*; 54: 99-110, 1962.
- Poirrier AL, Van den Ackerveken P, Kim TS, Vandenbosch R, Nguyen L, Lefebvre PP e Malgrange B. Ototoxic drugs: difference in sensitivity between mice and guinea pigs. *Toxicol Lett*; 193(1): 41-49, 2010.
- Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnem JH, Simis YJW, Van Zandwijk N e Schellens JHM. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J. Clin. Oncol*; 24(6): 918-924, 2006.
- Rauchegger H e Spoendlin H. Damage of the basilar membrane by acoustic stimulation. *Arch Otorhinolaryngol*; 232: 117-122, 1981.
- Ritter K. The vessels of the inner ear. *Arch Otorhinolaryngol*; 219(1): 115-177, 1978.
- Rosingh HJ, Wit HP e Albers FW. Perilymphatic pressure dynamics following posture change in patients with Menière's disease and in normal hearing subjects. *Acta Otolaryngol*; 118(1): 1-5, 1998.
- Rossi G. Trattato di otorinolaringoiatria. Ed. Minerva Medica S.p.A., Torino: pp. 622, 1997.
- Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ e Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*; 106: 3214–3222, 2005.

7. Bibliografia

- Rybak LP e Somani S. Ototoxicity amelioration by protective agents. *Ann NY Acad Sci*; 884, 143–151, 1999.
- Rybak LP, Husain K, Evenson L, Morris C, Whitworth C e Somani SM. Protection by 4-methylthiobenzoic acid against cisplatin induced ototoxicity: Antioxidant system. *Pharmacol. Toxicol*; 81: 173-179, 1997.
- Rybak LP, Ravi R e Somani SM. Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Fundam Appl Toxicol*; 26: 293–300, 1995.
- Safirstein R, Winston J, Goldstein M, Moel D, Dikman S e Guttenplan J. Cisplatin nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis*; 8:3 56–67, 1986.
- Saito T e Aran Jm. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 56 (6): 315–320, 1994.
- Sakamoto M, Kaga K e Kamio T. Extended high-frequency ototoxicity induced by the first administration of cisplatin. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 122 (6): 828-33, 2000.
- Salt AN. Dynamics of the inner ear fluids, in *Physiology of the Ear*, ed. Jahn AF and Santos-Sacchi J. Singular, Thomson learning: pp 333-355, 2001.
- Sampaio ALL e de Oliveira CACP. Structure and Ultrastructure of the Mammalian Inner Ear with Emphasis in the Cochlea. *International Archives of Otorhinolaryngology*; 10(3): 228-240, 2006.
- Santos-Sacchi J. Cochlear physiology, in *Physiology of the Ear*, ed. A.F. Jahn and J. Santos-Sacchi. Singular, Thomson learning: pp 357-391, 2001.
- Sartorius U, Schmitz I e Krammer, PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.*, 2: 20–29, 2001.
- Saville e Fadok,; Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*; 407: 784–788, 2000.
- Schacht J, Talaska AE, e Rybak LP. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec (Hoboken)*; (11): 1837-1850, 2012.
- Scheibe F, Haupt H e Baumgartl H. Effects of experimental cochlear thrombosis on oxygenation and auditory function of the inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 254: 91-94, 1997.
- Scheibe F, Haupt H e Baumgärtl H. Effects of experimental cochlear thrombosis on oxygenation and auditory function of the inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 254: 91-94, 1997.
- Scheibe F, Haupt H e Ludwig C. Intensity-related changes in cochlear blood flow in the guinea pig during and following acoustic exposure. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 250: 281-285, 1993.
- Scheibe F, Haupt H e Ludwig C. Intensity-related changes in cochlear blood flow in the guinea pig during and following acoustic exposure. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 250: 281-285, 1993.

7. Bibliografia

- Schweitzer VG. Cisplatin-Induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope*; 103(4 Pt 2): 1-52, 1993.
- Sherman S, Gibson D, Wang AH-J e Lippard SJ. Crystal and Molecular Structure of cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))], the Principal Adduct Formed by cis-Diamminedichloroplatinum (II) with DNA. *J Am Chem Soc*; 110: 7368-7381, 1988.
- Shi X, Han W, Yamamoto H, Tang W, Lin X, Xiu R, Trune DR e Nuttall AL. The cochlear pericytes. *Microcirculation*; 15: 515-529, 2008.
- Shi X. Cochlear Pericyte Responses to Acoustic Trauma and the Involvement of Hypoxia-Inducible Factor-1 and Vascular Endothelial Growth Factor, *Am J Pathology*; 174(5): 1692-1704, 2009.
- Shi X. Physiopathology of the cochlear microcirculation. *Hear Res*; 282(1-2): 10-24, 2011.
- Shirane M e Harrison RV. The effects of hypoxia on sensory cells of the cochlea in chinchilla. *Scanning Microsc*; 1: 1175-1183, 1987.
- Simoni E. Analisi della morte cellulare indotta dal cisplatino e studio di eventuali sostanze protettive su modelli in vitro. Tesi di dottorato, Università degli studi di Ferrara, 2009.
- Sims DE. Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 27: 842-846, 2000.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR e Martin, SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 144 (2): 281-92, 1999.
- Slee EA, Adrain C e Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*; 276: 7320-7326, 2001.
- Smith CA. Capillary areas of the cochlea in the guinea pig. *Laryngoscope*; 61: 1073-1095, 1951.
- Sone M, Schachern PA e Paparella MM. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hear Res*; 115: 217-223, 1998.
- Spendlin H. Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol*; 73: 234-248, 1972.
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y e Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410: 112-6, 2001.
- Stadnicki SW, Fleischman RW, Schaeppi U e Merriam P. Cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875): hearing loss and other toxic effects in rhesus monkeys. *Cancer Chemother*; 59 (3): 467-480, 1975.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zampami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R,

7. Bibliografia

- Siderovski DP, Penniger JM e Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397(6718): 441-446, 1999.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K e Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*, 8: 613-21, 2001.- Taguchi T, Nazneen A, Abid MR e Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol*; 148: 107-121, 2005.
 - Tange RA e Bernard JL. A cochlear vascular anomaly in a patient with hearing loss and tinnitus. *Arch of Otorhinolaryngol*; 233:117-125, 1981.
 - Taudy M, Sika J, Popelar J e Ulehlova L. Carboplatin and cisplatin ototoxicity in guinea pigs. *Audiology*; 31(5): 293–299, 1992.
 - Thorne PR e Nuttall AL, Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res*; 27(1):1-10, 1987.
 - Thorne PR e Nuttall AL. Alterations in oxygenation of cochlear endolymph during loud sound exposure. *Acta Otolaryngol*; 107: 71-79, 1989.
 - Thorne PR e Nuttall AL. Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res*; 27, 1-10, 1987.
 - Tilley R e Mackman N. Tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*; 32(1): 5-10, 2006.
 - Trevisi M e Ricci D. Anatomia funzionale dell'apparato audio-fonatorio. Casa Editrice Ambrosiana, Milano: pp. 129, 1998.
 - Turchi JJ e Henkels K . Human KU autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. *J Biol Chem*; 271: 13861-13867, 1996.
 - Van de Craen M, Declercq W, Van den Brande I, Fiers W e Vandenabeele P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ*, 6: 1117-24, 1999.
 - Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A e Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*; 3(7) research0034.1–research0034.11, 2002.
 - Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ e Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promote apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102 (1): 43-53, 2000.
 - Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufman H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ e Vaux DL. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*, 277 (1): 445-454, 2002.
 - von Tell D, Armulik A e Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res*; 312: 623-629, 2006.

7. Bibliografia

- Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*; 296: 1635–1636, 2002.
- Wang D e Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* ;4: 307-320, 2005.
- Wang D e Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 307-320, 2005.
- Wang X, Ma S e Qi G. Effect of hypoxia-inducible factor 1-alpha on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in primary neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 17(4): 1227-1234, 2012.
- Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Anticancer Res.*, 19 (6a): 4759-4771, 2001.
- Wangemann P. Cochlear blood flow regulation. *Adv Otorhinolaryngol*; 59: 51-57, 2002.
- Wangemann P. Topical Review Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol*; 576(1): 11–21, 2006.
- Yamamoto H e Makimoto K. Response of EP and cochlear blood flow to angiotensin II during hypoxic conditions. *Auris Nasus Larynx*; 25: 377-385, 1998.
- Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T e Kondo K. Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res*; doi: 10.1016/j.heares.2013.01.021. [Epub ahead of print], 2013.
- Yoshioka M, Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nomura H e Nakashima T. The impact of arterial sclerosis on hearing with and without occupational noise exposure: a population-based aging study in males. *Auris Nasus Larynx*; 37(5): 558-564, 2010.
- Zoratti M e Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241: 139-76, 1995.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A e Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*; 90: 405-413, 1997.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Cochlear Ltd per aver in parte sostenuto economicamente il progetto svolto.

Vorrei inoltre esprimere gratitudine, per la loro preziosa collaborazione, a tutte le persone che hanno preso parte alla realizzazione di questo progetto di ricerca.

Il Prof. Roberto Ferrari e il Dott. Giacomo Carrà del dipartimento di Scienze Mediche dell'Università degli Studi di Ferrara, per la messa a punto del modello di infarto.

Il Dott Carlo Veronesi del dipartimento di Scienze Biomediche e chirurgico-specialistiche dell'Università degli Studi di Ferrara, per l'aiuto nella messa a punto del modello di ischemia.

Laura, Edi, Valeria, Pietro e Vincenza per la collaborazione durante la fase sperimentale, per il supporto morale, e l'amicizia dimostratami durante questi tre anni.