



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali  
CdL in Biologia Applicata alla Biomedicina  
Curriculum Fisiopatologico  
Tesi di Laurea Magistrale

**Caratterizzazione istomorfometrica ed  
immunoistochimica delle alterazioni  
coronariche in un modello sperimentale  
di aterogenesi accelerata: ruolo  
dell'infiammazione e della proliferazione  
cellulare**

**Relatore:**

Dott. Gualtiero Pelosi

**Correlatori:**

Prof. Aldo Paolicchi

Dott.ssa Angela Pucci

**Candidata:**

Marianna Terreni

Anno Accademico 2013-2014

## Indice

<b>I. Introduzione.</b> .....	<b>3</b>
I.1. Strutture anatomiche .....	5
I.1.1. Circolazione coronarica .....	5
I.1.2. Arteria carotide. ....	8
I.1.3. Arteria femorale .....	9
I.1.4. Aorta ascendente .....	9
I.2. Struttura dei vasi arteriosi .....	10
I.3. Sviluppo della placca aterosclerotica.....	12
I.3.1. Processi iniziali dell'aterosclerosi.....	13
I.3.2. Progressione della lesione aterosclerotica.....	15
I.3.3. Complicazioni della lesione aterosclerotica.....	18
I.4. Classificazione delle placche aterosclerotiche .....	21
I.5. Modelli sperimentali di aterosclerosi.....	26
<b>II. Scopo del progetto</b> .....	<b>34</b>
<b>III. Materiali e metodi</b> .....	<b>36</b>
III.1. Gruppi di animali e dieta. ....	36
III.2. Istopatologia.....	38
III.2.1. Campionamento.....	38
III.2.2. Processazione.....	39
III.2.3. Colorazioni istologiche. ....	40

III.3. Analisi immunoistochimiche.....	43
III.4. Analisi di immagine e morfometria.....	46
<b>IV. Risultati.....</b>	<b>50</b>
IV.1. Caratterizzazione del modello di aterogenesi nel maiale.....	50
IV.1.1. Gli animali.....	50
IV.1.2. Caratterizzazione bioumorale.....	50
IV.2. Risultati istopatologici.....	51
IV.2.1. Campionamento ed esame macroscopico.....	51
IV.2.2. Tipologia di lesioni e loro distribuzione.....	54
IV.2.3. Istomorfometria.....	63
IV.3. Immunoistochimica quantitativa.....	67
IV.3.1. IHC – Markers cellulari ed infiammatori.....	67
IV.3.2. IHC – Markers di proliferazione.....	80
IV.4. Colocalizzazioni e correlazioni.....	83
IV.4.1. Colocalizzazioni.....	83
IV.4.1. Correlazione tra severità delle lesioni e composizione cellulare.....	85
<b>V. Discussione e Conclusioni.....</b>	<b>87</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>92</b>
<b>Ringraziamenti.....</b>	<b>101</b>

# I. Introduzione.

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di mortalità nei paesi industrializzati in seguito agli eventi acuti ad esse associati cioè l'infarto miocardico e l'ictus cerebrale (4,3 milioni di decessi ogni anno in Europa). La patologia organica alla base delle malattie cardiovascolari è l'aterosclerosi, una alterazione degenerativa ad eziopatogenesi multifattoriale dell'intima delle arterie di medio e grande calibro, ad altissima incidenza e che decorre nella maggior parte dei casi in forma asintomatica, manifestandosi clinicamente quando complicata da trombosi per erosione o rottura di placca, causando una riduzione del flusso ematico (Hansson, 2005). Classici fattori di rischio, come ipertensione, diabete, dislipidemia e fattori genetici possono essere considerati utili nel predire il rischio di patologia aterosclerotica, tuttavia da soli non possono inequivocabilmente definire la sua patogenesi, né tantomeno le sue complicanze cliniche acute (Lamon, 2008; Marzilli et al., 2012).

Per molti anni si è ritenuto che l'aterosclerosi fosse prevalentemente un fenomeno passivo di accumulo di colesterolo all'interno della parete vasale mentre oggi ne è ampiamente riconosciuta la natura di processo infiammatorio cronico delle arterie in cui l'attivazione endoteliale locale e la deposizione nell'intima di lipoproteine e colesterolo rappresentano l'evento iniziale (Hansson et al., 2011; Skålen et al., 2002).

La teoria infiammatoria fu originariamente proposta a metà del XIX secolo da Rudolf Virchow (Mayerl et al., 2006) e nella visione attuale l'aterogenesi sarebbe la conseguenza di una "risposta al danno" (Ross, 1993), con inappropriata riparazione: l'alterazione dell'endotelio vasale

in seguito a traumi meccanici, flusso turbolento, basso shear stress, infezioni e/o aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) innescherebbe una risposta infiammatoria locale cronica associata a processi riparativi inappropriati che contribuiscono a perpetuare e amplificare la patologia (Ross, 1993; Epstein et al., 1999).

La formazione della placca aterosclerotica è il risultato di eventi successivi al danno endoteliale:

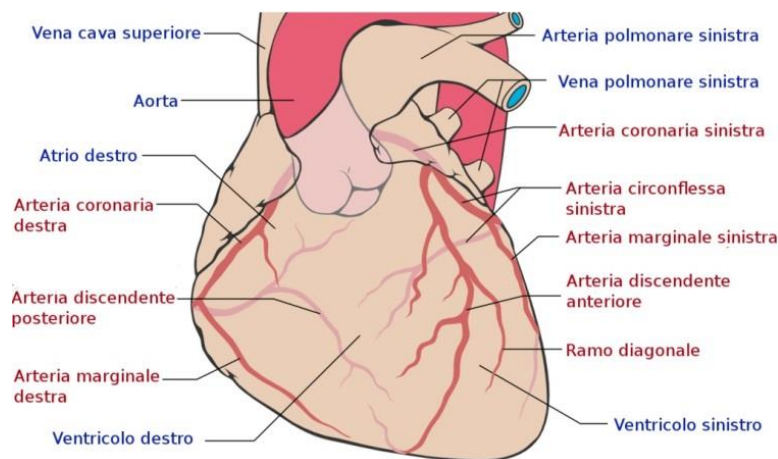
1. L'accumulo di lipidi, principalmente colesterolo libero ed esteri del colesterolo, e loro successiva modificazione (aggregazione, ossidazione e glicosilazione delle lipoproteine a bassa densità con formazione di oxLDL e minimally modified LDL);
2. Infiltrazione dell'intima di linfociti e macrofagi, questi ultimi derivanti dai monociti circolanti, i quali fagocitano le LDL ossidate o modificate trasformandosi in cellule schiumose (foam cells);
3. Migrazione dalla tonaca media di cellule muscolari lisce contrattili, loro attivazione e dedifferenziazione in muscolari lisce sintetiche;
4. Secrezione di citochine e chemochine e aumentata sintesi di matrice extracellulare e collagene da parte delle cellule muscolari lisce attivate.

La formazione di placche aterosclerotiche si verifica prevalentemente a livello di arterie di medio calibro come le coronarie o le carotidi, e quelle che vascolarizzano gli arti inferiori, in particolare l'iliaca e le femorali. Sono però interessate anche arterie di grosso calibro come l'aorta.

## I.1. Strutture anatomiche

### I.1.1. Circolazione coronarica

Il cuore pompa il sangue in tutti i tessuti dell'organismo e per svolgere la sua funzione di pompa ha bisogno di un continuo ed ininterrotto apporto di ossigeno e sostanze nutritizie che riceve attraverso la circolazione coronarica. I vasi che portano al miocardio il sangue ricco di ossigeno sono le arterie coronariche, i vasi che rimuovono il sangue deossigenato dal miocardio sono le vene cardiache. Il nome di questi vasi di medio e piccolo calibro (3-5 mm di diametro) deriva dalla loro particolare distribuzione attorno al muscolo cardiaco, che circondano componendo una sorta di corona arteriosa.



*Figura 1. Rappresentazione schematica del decorso dei vasi coronarici nel cuore di mammifero.*

Le arterie coronarie sono due (figura 1): l'arteria coronaria sinistra e l'arteria coronaria destra, prendono origine dall'aorta ascendente, appena al di sopra della valvola aortica o semilunare (sono le prime arterie che originano dall'aorta) e decorrono lungo la superficie esterna del cuore (arterie coronariche epicardiche), emettendo rami a decorso intramiocardico (arterie intramurali); più precisamente l'arteria coronaria sinistra origina dal seno aortico sinistro mentre l'arteria coronaria destra origina dal seno aortico destro.

L'arteria coronaria sinistra è solitamente di calibro maggiore rispetto alla controlaterale; origina dall'aorta ascendente tramite l'ostio coronario sinistro, comincia con un tronco comune che decorre in direzione orizzontale e raggiunto il solco coronario si divide in due grossi rami, l'arteria intraventricolare anteriore, o arteria discendente anteriore, e l'arteria circonflessa. Il ramo discendente anteriore nell'uomo decorre lungo la parete anteriore del cuore e va ad irrorare la maggior parte dell'apice cardiaco, la parete anteriore del ventricolo sinistro e i due terzi anteriori del setto interventricolare. Si distinguono tre segmenti: prossimale, mediale e distale. Dalla porzione prossimale si dipartono il primo ramo diagonale e il primo ramo settale; dalla porzione mediana si dipartono i rami settali minori; dalla porzione distale si dipartono il secondo ramo diagonale e il primo ramo apicale. L'arteria circonflessa decorre lungo la parete laterale del ventricolo sinistro e si estende sulla faccia posteriore del cuore nel solco coronario: i suoi rami irrorano gran parte della parete posteriore del cuore.

L'arteria coronaria destra origina dall'aorta ascendente e decorre nel solco coronario tra l'auricola destra e il ventricolo destro. A parte le collaterali che da essa si dipartono, rimane indivisa lungo tutto il suo decorso. La coronaria destra irrorata la maggior parte delle pareti dell'atrio e del ventricolo destro, la parete postero laterale del ventricolo sinistro e la metà posteriore del setto del cuore.

I rami arteriosi si continuano in arteriole e capillari, i quali sono presenti in densità molto maggiore di quanto non lo siano nel muscolo scheletrico. In condizioni basali solo il 60-70% dei capillari miocardici è pervio e questo garantisce una riserva di capillari che possono essere resi disponibili in caso di una maggiore richiesta funzionale da parte del muscolo cardiaco (Losano et al., 1998).

La maggior parte del miocardio riceve sangue da più di un ramo arterioso. Ci sono inoltre molte anastomosi, o collegamenti diretti, tra i rami arteriosi; le anastomosi si formano tra i rami di una determinata arteria o tra rami di arterie diverse. Nel caso in cui un'arteria sia ostruita, le aree dipendenti da quell'arteria possono ancora ricevere del sangue attraverso gli altri rami della stessa arteria e/o attraverso anastomosi con altre arterie coronariche.

In condizioni fisiologiche le arterie coronariche possiedono un meccanismo di autoregolazione che mantiene il livello di flusso del sangue appropriato al fabbisogno del tessuto cardiaco, attraverso la regolazione delle resistenze vascolari (vasodilatazione o vasocostrizione).

La circolazione coronarica è completata dalle vene coronariche. La vena più grande che drena il sangue dal lato sinistro del cuore è la grande vena cardiaca, mentre la piccola vena cardiaca drena il sangue dal margine destro del cuore. Queste vene convergono verso la parte posteriore del solco coronario e si aprono in una grande cavità venosa che è il seno coronarico, che a sua volta scarica il sangue nell'atrio destro.

Il flusso di sangue attraverso i vasi coronarici non è continuo. Quando il muscolo cardiaco si contrae, i vasi sanguigni che decorrono all'interno delle pareti del cuore sono compressi e il sangue non fluisce facilmente al loro interno. Quando il muscolo cardiaco si rilassa (diastole) i vasi sanguigni non sono compressi e il flusso di sangue attraverso i vasi coronarici riprende. Flusso oscillatorio e movimento sisto-diastolico delle arterie subepicardiche sono fattori emodinamici proaterogenetici peculiari e specifici del distretto arterioso coronarico e ne spiegano in parte l'elevata suscettibilità all'aterogenesi rispetto ad altri distretti.



## I.1.2. Arteria carotide.

Il primo ramo che si diparte dall'arco aortico è l'arteria brachiocefalica; è un'arteria molto corta che si divide a livello della clavicola per formare la carotide comune destra, arteria che trasporta il sangue al lato destro della testa e del collo, e la succlavia destra, arteria che trasporta sangue all'arto superiore destro. Il secondo e il terzo ramo dell'arco aortico sono l'arteria carotide comune sinistra che trasporta sangue al lato sinistro della testa e del collo, e l'arteria succlavia sinistra che trasporta sangue all'arto superiore sinistro.

Le arterie carotidi comuni si dirigono superiormente, senza ramificarsi, lungo i due lati del collo fino all'angolo inferiore della mandibola, dove ciascuna arteria carotide comune si ramifica in arteria carotide interna ed esterna (figura 2).

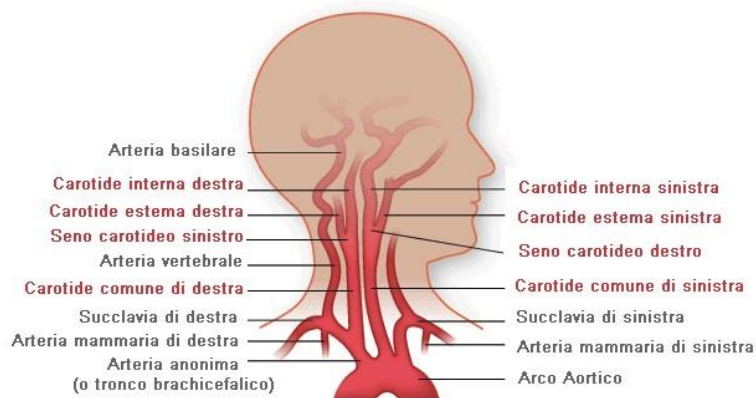


Figura 2. Rappresentazione del decorso delle arterie carotidee.

L'arteria carotide esterna poco dopo l'origine si flette verso avanti allontanandosi dalla carotide interna per portarsi in alto e tornare indietro passando tra il processo mastoideo e l'angolo della mandibola; oltre questo punto si divide in arteria mascellare e arteria temporale superficiale. Le arterie carotidi esterne emettono molti rami che irrorano le strutture del collo e della faccia.

L'arteria carotide interna ha un diametro maggiore dell'arteria carotide esterna, e in genere la carotide interna di sinistra è più grande di quella di destra. Risale verso l'alto costeggiando la parete laterale della faringe e quindi penetra nel canale carotideo. Percorso tutto il canale carotideo si viene a trovare all'interno della cavità cranica dove piega in avanti e penetra nel seno cavernoso (tratto intracavernoso). All'interno di questo caratteristico seno venoso essa non è bagnata direttamente dal sangue ivi contenuto ma è ricoperta esternamente dall'endotelio del seno stesso. All'interno del seno cavernoso forma una curva diretta all'indietro e verso l'alto (sifone carotideo). Le arterie carotidi interne, insieme con le arterie vertebrali, che sono rami delle arterie succlavie, irrorano il cervello.

### **I.1.3. Arteria femorale**

Con il termine arteria femorale si va a indicare un gruppo di arterie della coscia: esse nascono dietro il legamento inguinale (dall'iliaca esterna) e dopo aver attraversato il canale degli adduttori terminano al ginocchio, uscita dal quale prende il nome di arteria poplitea. Il suo nome deriva dallo stretto rapporto anatomico che ha con il femore, l'osso che costituisce lo scheletro della coscia.

L'arteria femorale è divisa in tre parti: la femorale comune che nasce direttamente dall'iliaca esterna e che si divide nella femorale profonda (che fornisce la coscia) e nella femorale superficiale (che continuando nella poplitea fornirà sangue alla gamba e al piede).

### **I.1.4. Aorta ascendente**

L'aorta ascendente è il primo breve tratto dell'aorta. Trae origine dall'orifizio della valvola aortica, all'altezza del margine inferiore della terza cartilagine costale, dopodiché si dirige verso l'alto e verso destra

fino a raggiungere la seconda cartilagine costale destra, dove termina continuandosi nell'arco aortico.

E' lunga circa cinque centimetri e può essere suddivisa in due tratti. Il primo tratto è la radice aortica che è costituita dalla valvola aortica o semilunare che si apre durante la sistole ventricolare sinistra permettendo la fuoriuscita del sangue spinto nell'aorta dalla contrazione del ventricolo; i seni aortici di Valsalva, poco sopra l'origine dell'aorta, in cui sono presenti tre rigonfiamenti, situati dietro le cuspidi valvolari che accolgono le escursioni dei lembi della valvola; gli osti coronarici anteriore e posteriore, da cui originano rispettivamente due rami collaterali, la coronaria di destra e di sinistra. Il secondo tratto è il tratto tubulare che si estende fino all'arco aortico. A livello della congiunzione con l'arco aortico è possibile riconoscere una più o meno ampia dilatazione sul lato destro, definita grande seno aortico, il cui diametro si accentua con l'età e può divenire sede di aneurismi.

## **I.2. Struttura dei vasi arteriosi**

I vasi sanguigni presentano una grandissima variabilità di struttura dovuta alle loro diverse funzioni e posizioni. Ad ogni modo è possibile descrivere in generale la struttura della parete di un vaso sanguigno distinguendo tre strati (detti tonache) dall'interno all'esterno: tonaca intima, tonaca media e tonaca avventizia (figura 3). Tra questi tre strati, a segnare il confine, vi sono due lamine di tessuto elastico denominate rispettivamente lamina elastica interna e lamina elastica esterna. La struttura e la consistenza delle tre tuniche è diversa in base al calibro delle arterie determinandone le caratteristiche passive (elasticità e distensibilità) e le caratteristiche attive (contrattilità).

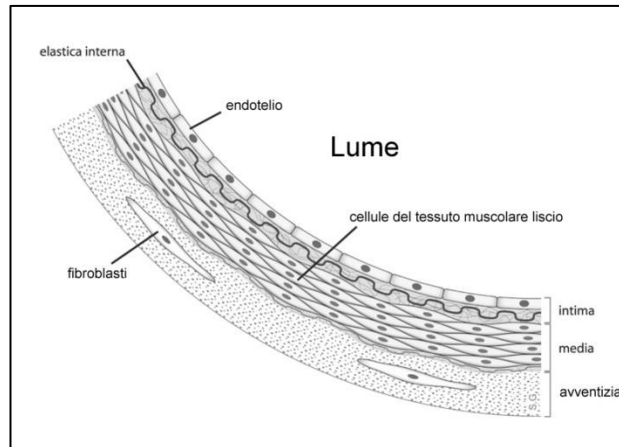


Figura 3. Rappresentazione schematica di un vaso arterioso.

**Tonaca intima:** è lo strato più interno della parete. L'intima è definita come la regione della parete arteriosa compresa tra la superficie endoteliale delimitante il lume e il margine luminale della tonaca media; la lamina elastica interna, considerata generalmente parte della media, denota il confine tra tonaca intima e tonaca media (Stary et al., 1994). È costituita da un unico strato di cellule pavimentose, l'endotelio, supportato da uno strato di connettivo lasso, la lamina basale, e da uno strato elastico sub-endoteliale. I principali componenti della tonaca intima sono le cellule endoteliali; queste sono molto sottili e strettamente legate le une alle altre, assumendo tipicamente una forma allungata verso la direzione del flusso. Le cellule endoteliali svolgono ruoli importantissimi nel regolare la diffusione di sostanze dal sangue all'interstizio che circonda i vasi, modulare il passaggio di cellule immunitarie, partecipare ai processi coagulativi in seguito ad una lesione vascolare. L'endotelio gioca un ruolo critico nel regolare l'entrata, l'uscita ed il metabolismo delle lipoproteine e di altri agenti che possono partecipare alla formazione di lesioni di tipo aterosclerotico (Giannotti et al., 2007).

**Tonaca media:** è lo strato più spesso della parete, tipicamente costituita da strati concentrici di elastina, separati da sottili strati di tessuto connettivo, fibre di collagene e cellule muscolari lisce (SMC). In

base alla sua costituzione condiziona il comportamento funzionale dell'arteria: nella tonaca media delle arterie di grosso calibro prevale il tessuto elastico, mentre in quelle di medio e piccolo calibro prevale il tessuto muscolare. Sia le fibre elastiche che le fibre collagene della tonaca media sono sintetizzate dalle cellule muscolari lisce.

**Tonaca avventizia:** è lo strato più esterno, protegge le arterie e ne permette l'ancoraggio ai tessuti circostanti. E' costituita prevalentemente da tessuto connettivo lasso, ricco in collagene, e i fibroblasti che lo secernono. Grazie alla limitata elasticità delle fibre collagene questo strato pone un limite alla dilatazione dei vasi. Nel caso dei vasi di più grosso calibro, la tonaca avventizia può essere tanto sviluppata da accogliere nel suo spessore altri piccoli vasi (*vasa vasorum*) attraverso i quali riceve le sostanze nutritive.

### **I.3. Sviluppo della placca aterosclerotica.**

Nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche possiamo distinguere diverse fasi: processi iniziali che generano lesioni clinicamente silenti; fasi di progressione che portano alla formazione di lesioni stenotiche non necessariamente sintomatiche; eventi complicanti che sono alla base delle manifestazioni cliniche croniche o acute.

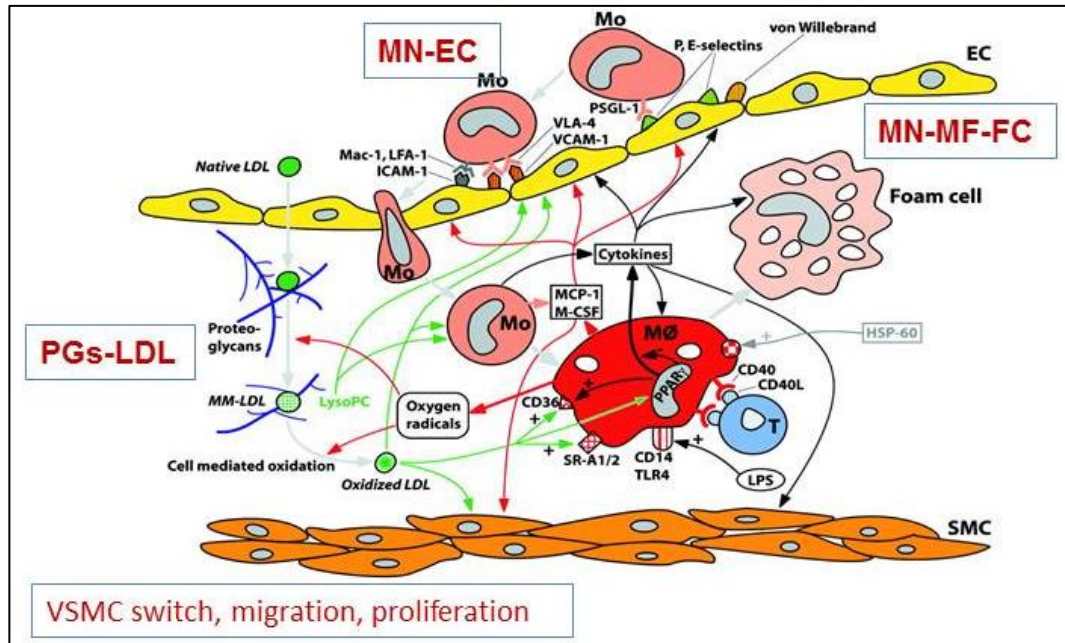


Figura 4. Sviluppo e progressione della placca aterosclerotica (Østerud et al., 2003).

### I.3.1. Processi iniziali dell'aterosclerosi.

Esperimenti su animali, studi epidemiologici e ricerche cliniche hanno stabilito che alti livelli di colesterolo possono promuovere la malattia cardiovascolare aterosclerotica. Il colesterolo è trasportato nel sangue dalle lipoproteine a bassa densità (LDL): questa particelle contengono colesterolo esterificato e trigliceridi circondati da un guscio di fosfolipidi, colesterolo libero e la apolipoproteina B100 (ApoB100). Le particelle di LDL possono accumularsi nella tonaca intima e qui ApoB100 può legarsi ai proteoglicani della matrice extracellulare attraverso interazioni ioniche (Tabas et al., 2007). Le LDL legate ai proteoglicani sembrano possedere un'aumentata suscettibilità all'ossidazione e alla glicosilazione non enzimatica, due tipi di alterazioni che favoriscono il processo infiammatorio (Broccolo, 2010; Libby, 2008). L'ossidazione delle lipoproteine si può verificare sia nella porzione lipidica che in quella proteica. La modificazione della porzione lipidica include la formazione di idroperossidi, lisofosfolipidi, ossisteroli e prodotti aldeidici derivanti dalla rottura delle catene degli acidi grassi (Witztum et al., 1998); la modificazione della porzione proteica

può includere rotture della catena peptidica. Il danno e l'attivazione endoteliale generano una disfunzione endoteliale, con l'accumulo e l'ossidazione delle LDL, che creano la caratteristica fatty streak nella parete del vaso (Davignon et al., 2004). La formazione di LDL ossidate (oxLDL) si crede giochi un ruolo centrale nell'amplificazione della risposta infiammatoria mediando l'aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie che promuovono il reclutamento leucocitario nello strato intimale (Boudjeltia et al., 2006; Martìn-Fuentes et al., 2007). Hanno infatti una funzione chemiotattica per i monociti, potenziando così il loro reclutamento nello spazio sub-endoteliale. Le cellule vascolari attivate aumentano l'espressione di molecole di adesione come ICAM (intracellular adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule), P- ed E-selectine, integrine e chemochine che guidano il pattern di adesione, attrazione e infiltrazione delle cellule infiammatorie circolanti (Lamon et al., 2008). E' un reclutamento che vede coinvolte principalmente due popolazioni cellulari del sangue, i monociti e i linfociti T. I monociti reclutati nello strato intimale dell'arteria sono stimolati dal fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF) prodotto dalle cellule endoteliali attivate a differenziare in macrofagi; questo processo è necessario per lo sviluppo della placca aterosclerotica (Smith et al., 1995). Le ox-LDL accumulatesi nella lesione precoce sono riconosciute e fagocitate dai macrofagi mediante recettori specifici, come LOX-1, CD36 o il recettore "spazzino" (scavenger receptor – SR) (Dhaliwal et al., 1999); l'espressione di questi recettori non è inibita dagli elevati livelli di colesterolo, per cui i macrofagi possono assorbire continuamente LDL fino ad assumere l'aspetto di cellule schiumose (foam cells, FC), caratteristiche delle lesioni aterosclerotiche. Nello spazio sub-endoteliale, i monociti possono secernere un gran numero di prodotti che possono partecipare all'iniziazione e all'evoluzione della placca aterosclerotica, tra cui interleuchina-1 (IL-1) e il TNF (tumor necrosis

factor) che aumentano la chemiotassi e l'adesività monocitaria formando un meccanismo di amplificazione per il reclutamento di monociti all'interno della lesione (Mitchinson et al., 1987). Inoltre, i monociti e i macrofagi possono rilasciare enzimi e radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che promuovono il danno endoteliale e la citolisi. D'altra parte alcuni macrofagi possono andare incontro a morte per apoptosi contribuendo alla formazione di un nucleo (core) necrotico ricco in lipidi, caratteristico di questo tipo di lesione (Pontieri et al., 2010; Hansson, 2005).

Il reclutamento dei linfociti T avviene in parallelo a quello dei macrofagi, con un meccanismo simile che coinvolge molecole di adesione e chemochine (Hansson et al., 2006). Non sono molto abbondanti, con un rapporto macrofagi/linfociti T approssimativamente compreso tra 4:1 e 10:1 nelle lesioni umane. I linfociti T vengono attivati nella lesione, producono mediatori pro-aterogenici che contribuiscono alla crescita della lesione e alla progressione della malattia (Hansson et al., 2006; Tedgui et al., 2006). Per esempio, il rilascio di linfocine ed interleuchine da parte dei linfociti T attivati può regolare l'uptake delle lipoproteine dei macrofagi e questo può influenzare la formazione di foam cells (John et al., 1990).

Lo stadio della lesione appena descritto è quello della stria lipidica (fatty streak) chiamata così proprio per l'accumulo di lipidi, liberi o sotto forma di foam cells.

### **I.3.2. Progressione della lesione aterosclerotica**

Mentre l'accumulo di macrofagi – foam cells è la caratteristica della stria lipidica, l'accumulo di tessuto fibromuscolare contraddistingue la lesione aterosclerotica avanzata (Stary et al., 1994) In risposta ai fattori di crescita, le cellule muscolari lisce contrattili (SMCs) derivate dalla parte vasale migrano e proliferano in tutta l'intima



dedifferenziandosi prevalentemente in cellule muscolari lisce sintetiche, ma con potenzialità di acquisire anche altre caratteristiche fenotipiche (trans-differenziazione), da quella infiammatoria a quella angiogenetica fino a quella osteogenetica (Bentzon et al., 2006).

Nelle arterie giovani in via di sviluppo, le cellule muscolari lisce possiedono la capacità di proliferare e produrre grandi quantità di collagene, elastina e proteoglicani; contengono più reticolo endoplasmatico rugoso e meno fibrille contrattili; nelle arterie adulte, la loro principale funzione è quella di regolare la tensione parietale, ma possono recuperare il loro fenotipo sintetico e partecipare al riparo tissutale o all'aterogenesi. Nelle lesioni aterosclerotiche in via di sviluppo, le cellule muscolari lisce sembrano recuperare le caratteristiche fenotipiche di cellule muscolari lisce in arterie giovani in via di sviluppo (Chamley-Campbell et al., 1979; Campbell et al., 1985).

Evidenze sperimentali hanno mostrato che l'endotelio intatto gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento di un basso stato proliferativo delle cellule muscolari lisce in condizioni vascolari normali. In caso di danno vascolare, le cellule endoteliali attivate e le stesse cellule muscolari lisce possono rilasciare sostanze mitogene che promuovono la proliferazione delle SMC (John et al., 1990). Le citochine prodotte dai macrofagi attivati (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) sono in grado di stimolare la migrazione delle cellule muscolari della tonaca media verso l'intima e di indurre la produzione locale di fattori di crescita, tra i quali il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF, platelet-derived growth factor) e il fattore di crescita per i fibroblasti (FGF, fibroblast growth factor). E' da tener presente che la formazione della lesione aterosclerotica non è un processo continuo e lineare ma attraversa fasi di replicazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, che dipendono da un complesso equilibrio tra mediatori in grado di promuovere la

formazione della lesione e altri meccanismi che possono inibirla (Stary et al., 1995; Broccolo, 2010). Vi sono infatti alcune citochine, in particolare l'interferone  $\gamma$  sintetizzato dai linfociti T attivati che sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce.

La formazione di tessuto fibroso nell'arteria contribuisce in modo significativo alla progressione della placca aterosclerotica. La secrezione e la sintesi della matrice extracellulare è regolata dai fibroblasti e dalle cellule muscolari lisce stimulate dai fattori di crescita. Gli elementi che compongono questo tessuto fibroso sono collagene, proteoglicani e glicoproteine (John, 1990). Il collagene è una proteina strutturale e rappresenta il principale costituente dei tessuti connettivi; la formazione di collagene fornisce il maggior contributo alla crescita della placca aterosclerotica: tra i vari tipi di collagene viene principalmente sintetizzato il collagene di tipo I da parte delle cellule muscolari lisce quando sono stimulate dai fattori di crescita. I proteoglicani sono delle macromolecole composte da un core proteico a cui sono legati glicosamminoglicani (GAG, o mucopolisaccaridi) di cui il dermatan solfato e il biglicano sono i più rappresentati nelle lesioni aterosclerotiche (Wight et al., 1989; Yea-Herttuala et al., 1986). Le glicoproteine sono una famiglia di proteine a cui è legata una catena oligosaccaridica; le placche aterosclerotiche contengono elevate concentrazioni di glicoproteine (Ross, 1986).

Anche la produzione della matrice extracellulare è controbilanciata dalla distruzione catalizzata dalle metalloproteasi della matrice (MMP). Da una parte la degradazione della matrice extracellulare è una condizione necessaria che facilita la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media verso la tonaca intima; dall'altra può però facilitare la rottura del collagene del cappuccio fibroso, tendendo quindi ad aumentare la fragilità delle placche favorendone la rottura.

Il core lipidico viene così avvolto da formazioni fibrose fino ad esserne quasi totalmente sostituito. La fibrosi è anche un fattore stabilizzante la lesione poiché crea una specie di capsula attorno al core lipidico rendendo la placca più resistente alla rottura. Se la proliferazione delle cellule muscolari lisce però continua, unitamente alla formazione di altro tessuto fibroso, può verificarsi un restringimento significativo del lume vasale (stenosi).

La calcificazione è un altro fenomeno che spesso caratterizza le placche di tipo avanzato che si verifica sia sui residui delle cellule morte che sui lipidi extracellulari. Alcune sottopopolazioni di cellule muscolari lisce sono in grado infatti di promuovere la calcificazione attraverso un'aumentata secrezione di citochine, aumentando la produzione di proteine specializzate nel sequestro di calcio come le proteine morfogenetiche del tessuto osseo.

### **I.3.3. Complicazioni della lesione aterosclerotica.**

Lo sviluppo di una placca aterosclerotica e la sua evoluzione verso l'occlusione del vaso in un processo più o meno discontinuo e più o meno rapido si verifica attraverso tappe che condizionano e caratterizzano le manifestazioni cliniche. Le singole placche hanno quindi destini diversi e soltanto alcune evolvono in direzione tale da produrre eventi clinici (figura 5). Da ciò il concetto di "vulnerabilità" della placca, intesa come qualità distintiva che contraddistingue la placca destinata alla complicanza rispetto alle altre definite "stabili" (L'Abbate et al, 2007).

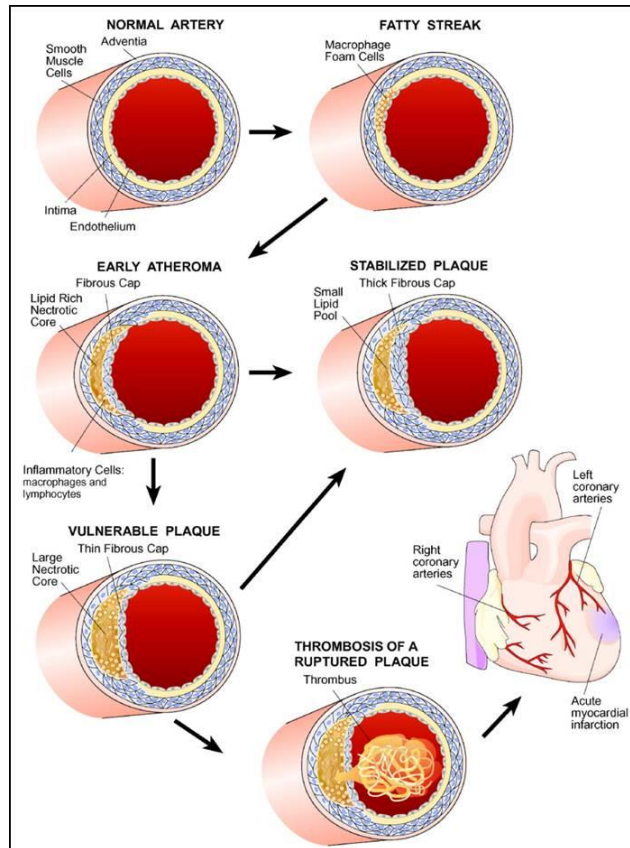


Figura 5. Stadi della patologia coronarica (Lusis, 2012).

Le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi sono dovute quasi esclusivamente alla complicazione della lesione per trombosi in seguito a tre eventi: l'ulcerazione della superficie endoteliale, la rottura della capsula fibrosa o l'emorragia dei microvasi interni alla lesione (Shah, 2003). Si possono verificare rotture sia dello strato endoteliale che della capsula fibrosa con l'esposizione al sangue della matrice fortemente trombogena: questo causa la formazione di un aggregato piastrinico e la deposizione di fibrina. La maggior parte di questi microtrombi probabilmente si dissolve senza dar luogo a manifestazioni cliniche attraverso un processo di fibrinolisi locale e riparazione dell'endotelio; mentre se il trombo è di dimensioni maggiori può in ultima istanza occludere il lume del vaso riducendo il flusso del sangue e causando ipossia (Pontieri et al., 2010).

Eventi trombotici possono verificarsi anche intrapacca, infatti man mano che la lesione avanza, si sviluppano in abbondanza plessi di microvasi per fornire nutrimento alle cellule della lesione (Stary et al., 1994). La rottura di tali vasi scatena la cascata della coagulazione e provoca trombosi in situ.

I trombi, sia interni alla lesione che quelli di superficie, possono ingrandirsi in situ fino ad occludere completamente il vaso bloccando il flusso sanguigno dal punto in cui si sviluppa la placca; oppure possono staccarsi dal sito della lesione e seguire il flusso sanguigno fino a bloccarsi in una ramificazione vasale di piccolo calibro impedendo l'afflusso di sangue da quel punto in poi. Entrambi questi eventi impediscono la corretta ossigenazione dei tessuti inducendone la necrosi (Libby, 2001).

## I.4. Classificazione delle placche aterosclerotiche

Tra il 1994 e il 1995 l'American Heart Association ha ultimato la definizione di un sistema di stadiazione numerica della placca aterosclerotica, attualmente utilizzato in maniera universale (Stary et al., 1994; Stary, 2000), basato su un'analisi istologica della placca nel punto di massima estensione. Le lesioni I-III sono precursori silenti delle lesioni avanzate IV-VI (figura 6).

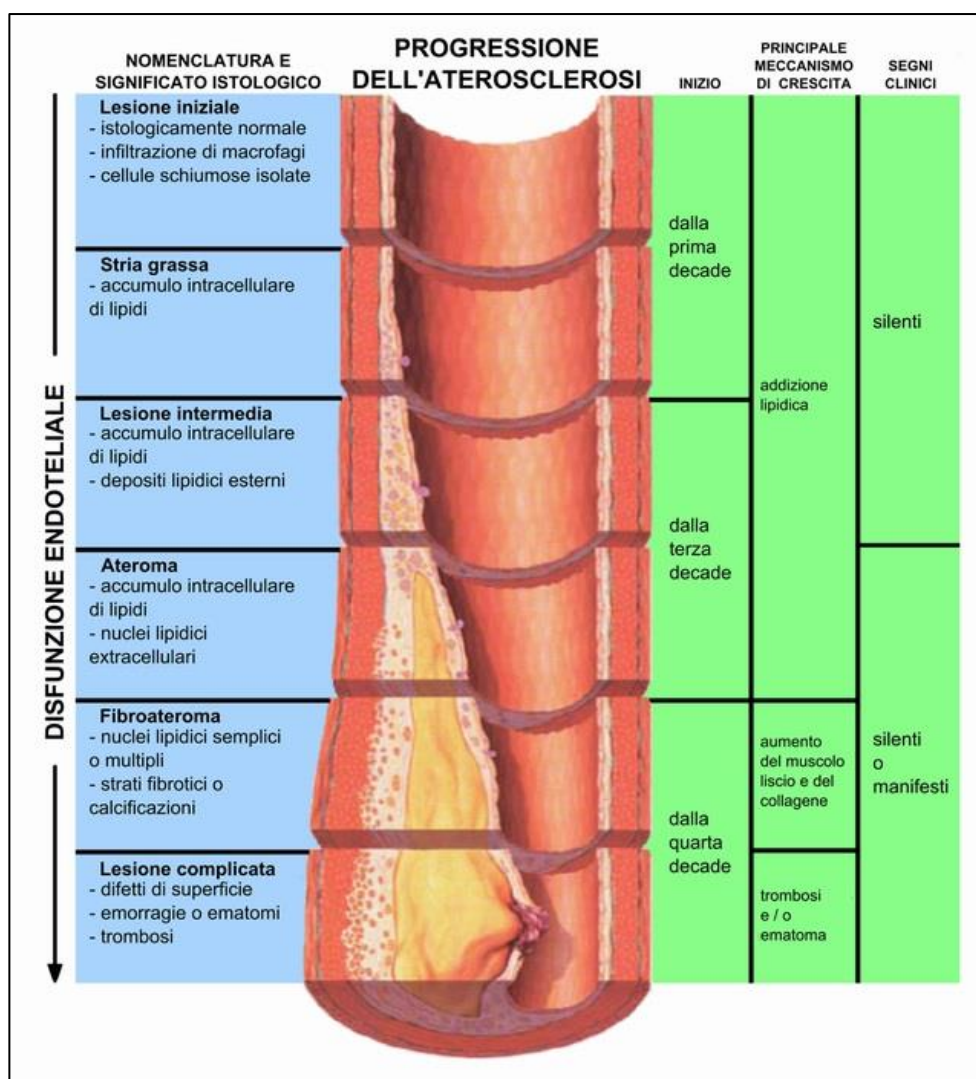


Figura 6. Classificazione delle lesioni aterosclerotiche su base morfologica, proposta dall'American Heart Association (AHA).

**Stadio I (lesione iniziale):** nello stadio molto iniziale la placca contiene una quantità di lipoproteine aterogene sufficiente a stimolare il progressivo accumulo di macrofagi e la sporadica comparsa di macrofagi schiumosi. Tali cambiamenti sono più marcati in arterie che mostrano allo stesso tempo fenomeni adattativi a livello dell'intima che si ispessisce. Questi fenomeni sono praticamente presenti in tutti gli esseri umani, non riducono il lume vascolare e possono essere interpretati come fenomeni adattativi alle forze meccaniche locali.

**Stadio II (stria lipidica):** questo tipo di placca consiste in strati di macrofagi schiumosi e cellule muscolari lisce cariche di lipidi. Questo tipo di lesione viene grossolanamente definito come stria lipidica (fatty streak). Questa lesione è correlata alle concentrazioni plasmatiche di colesterolo ed è facilmente regredibile sia negli esseri umani che nei modelli sperimentali animali di aterosclerosi.

**Stadio III (preateroma):** la definizione "lesione di tipo III" si applica esclusivamente a quelle lesioni che fanno da ponte tra le lesioni di tipo II e gli ateromi. E' nota anche come lesione intermedia, transizionale o pre-ateroma, è tipica degli adulti in giovane età. Le sue peculiari caratteristiche istologiche oltre alle foam cells sono anche delle goccioline lipidiche extracellulari che si accumulano tra gli strati delle cellule muscolari lisce nell'ispessimento intimale adattativo; sono identiche alle goccioline extracellulari che si trovano disperse in piccole quantità in alcune lesioni di tipo II.

**Stadio IV (ateroma):** nelle lesioni di tipo IV si ha un fitto accumulo di lipidi extracellulare che occupa un'ampia ma ben definita regione dell'intima; questo tipo di accumulo è noto come core lipidico. La lesione di tipo IV è conosciuta anche come ateroma ed è la prima lesione di tipo avanzato a causa della grave disorganizzazione dell'intima causata dal core lipidico. Questo caratteristico core lipidico

sembra svilupparsi da un incremento e la conseguente confluenza di piccoli gruppi isolati di lipidi extracellulari che caratterizzano la lesione di tipo III (Sary et al., 1995).

**Stadio V (fibroateroma):** è caratterizzato dalla formazione di nuovo tessuto connettivo fibroso. Quando questo tessuto fa parte di una lesione con un nucleo lipidico (tipo IV) questo tipo di morfologia può essere indicato come fibroateroma o lesione di tipo Va; una lesione di tipo V in cui il core lipidico e altre parti della lesione sono calcificate può essere indicata come lesione di tipo Vb; se il nucleo lipidico è assente e anche la quantità lipidica in generale è minima può essere indicata come lesione di tipo Vc (Sary et al., 1995).

**Stadio VI (lesioni complicate):** la morbilità e mortalità per aterosclerosi è in gran parte dovuto a lesioni di tipo IV e di tipo V in cui si sono sviluppate ematomi o emorragie e depositi trombotici; una lesione di tipo IV o di tipo V con una o più di queste caratteristiche possono essere classificate come lesioni di tipo VI o lesioni complesse. Si distinguono nei seguenti sottotipi: la lesione di tipo VIa è caratterizzata da ulcerazioni della superficie endoteliale; il tipo VIb è caratterizzato dalla presenza ematoma o emorragia nel vasi interni alla lesione; nella lesione di tipo VIc si ha presenza di trombi; la lesione di tipo VIabc presenta tutte le caratteristiche (Sary et al, 1995).

Va sottolineato l'importante concetto che ciascun tipo di placca può raggiungere i vari stadi evolutivi in tempi diversi e che la progressione allo stadio più avanzato non è obbligatoria ma richiede uno stimolo addizionale. I tipi I, II e III hanno in comune l'assenza di alterazioni della matrice e/o della struttura microscopica dell'intima e della tonaca media; le lesioni più avanzate invece contengono accumuli lipidici extracellulari che finiscono con il distruggere la struttura dell'intima e nei casi più avanzati quella della media e dell'avventizia.



Una classificazione alternativa e più semplice, che sottolinea il rapporto tra la morfologia della lesione e la patologia clinica è stata introdotta successivamente da Virmani et al. (Virmani et al., 2000). Ritenevano infatti che lo schema di classificazione proposto all'AHA fosse difficile da utilizzare per due motivi: in primo luogo perché usa una lunga lista di numeri romani modificati da lettere che sono difficili da ricordare; in secondo luogo, implica un modello ordinato e lineare di progressione della lesione e questo può essere ambiguo poiché non risulta chiaro se esista soltanto una singola sequenza di eventi nella progressione di tutte le lesioni. Lo schema modificato da Virmani prevede 7 categorie; le caratteristiche chiave che le definiscono sono l'accumulo di lipidi in relazione alla formazione del cappuccio fibroso, i cambiamenti nel nucleo lipidico a formare il core necrotico, l'ispessimento o l'assottigliamento del cappuccio fibroso e la trombosi (figura 7).

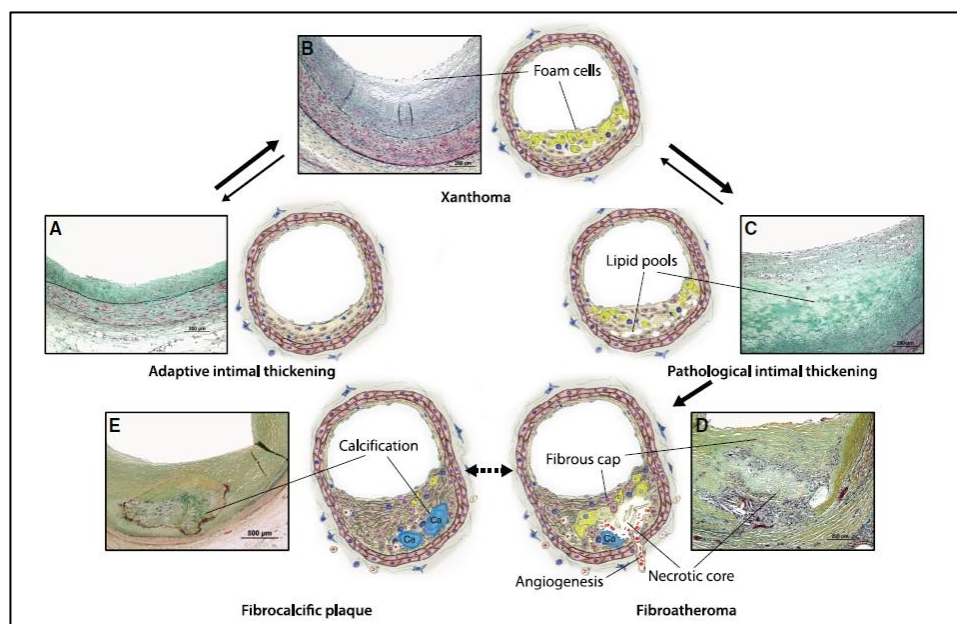


Figura 7. Tipi di lesioni aterosclerotiche: modificazioni di Virmani et al. alla classificazione dell'AHA. A, ispessimento intimale adattativo; B, xantoma intimale; C, ispessimento intimale patologico; D, fibroateroma; E, placca fibrocalcifica.

**Ispessimento intimale adattativo.** Si tratta di una risposta adattativa fisiologica allo stress emodinamico, spesso rilevabile a livello delle biforcazioni delle arterie. E' caratterizzato da un aumento di cellule muscolari lisce nell'intima in assenza di lipidi o macrofagi – foam cells.

**Xantoma intimale.** Viene proposto questo termine invece della lesione di tipo II, o fatty streak. Si ha un accumulo sul versante luminale di foam cells senza la formazione del core necrotico o del cappuccio fibroso.

**Ispessimento intimale patologico.** E' la lesione di tipo III dell'AHA: si ha un'aumentata proliferazione di cellule muscolari lisce in una matrice ricca in lipidi e proteoglicani.

**Ateroma a cappuccio fibroso.** Il cappuccio fibroso è definito come uno strato distinto di tessuto connettivo e cellule muscolari lisce che ricopre completamente il core lipidico e necrotico, in una matrice ricca in collagene e proteoglicani con vari gradi di infiltrazione da parte di macrofagi e linfociti.

**Fibroateroma a cappuccio sottile.** E' uno specifico tipo di placca non riconosciuto dalla classificazione AHA (Fuster et al., 2009); l'assottigliamento del cappuccio fibroso (con uno spessore minore di 65µm) è una condizione predisponente alla rottura della placca. Il cappuccio sottile è caratterizzato da una diminuzione delle cellule muscolari lisce e da un aumentato infiltrato infiammatorio; il sottostante core necrotico è solitamente ampio; frequentemente sono presenti calcificazioni e/o emorragie (Schwartz et al., 1995; Velican et al., 1980).

La rottura di placca è una soluzione di continuo del cappuccio fibroso: rappresenta la causa più frequente di formazione del trombo che si continua con il sottostante core necrotico. Queste lesioni sono

tipicamente caratterizzante da un ampio core necrotico e da un cappuccio fibroso infiltrato da macrofagi e linfociti.

Questo concetto è distinto da quello di erosione di placca; nella zona di erosione generalmente l'endotelio è assente e lo strato intinale esposto è principalmente composto da cellule muscolari lisce e proteoglicani.

**Nodulo calcifico.** Questo termine si riferisce ad una lesione caratterizzata da rottura del cappuccio fibroso e trombosi associata ad una densa calcificazione nodulare.

**Placca fibrocalcifica.** Alcune placche possiedono uno spesso cappuccio fibroso a ricoprire estesi accumuli di sali di calcio vicino alla media (Hansson et al., 2009). Poiché il core necrotico è generalmente piccolo e la placca è prevalentemente fibrosa, non si parla più di ateroma ma di placca fibrocalcifica.

## **I.5. Modelli sperimentali di aterosclerosi.**

I meccanismi di base di molti processi fisiopatologici non sono specie-specifici, ma in comune a organismi più o meno vicini evolutivamente. La possibilità di facile reperimento e manipolazione dei modelli di studio consente così indagini più approfondite e proficue di quanto non possano essere le indagini effettuate sull'uomo stesso.

Questo è particolarmente importante per l'aterogenesi, cioè lo studio delle fasi iniziali di formazione e crescita della placca aterosclerotica, uno stadio della patologia in cui le evidenze anatomopatologiche nell'uomo sono ristrette a reperti autoptici occasionali senza la possibilità di monitorare l'evoluzione delle lesioni iniziali verso l'ateroma, la placca stabile, la placca "vulnerabile" né tantomeno le placca complicata da rottura e trombosi.

I modelli animali di aterosclerosi sviluppano lesioni o in maniera spontanea o a seguito di interventi che riguardano il regime dietetico o, ancora, previa induzione di tipo meccanico, chimico o immunologico. I modelli animali rappresentano uno strumento utile per studiare gli effetti di diversi fattori, dietetici e non, sullo sviluppo o la regressione della patologia in condizioni controllate. Infatti, gli effetti dei fattori di rischio nello sviluppo della patologia aterosclerotica nei grossi vasi sono stati valutati in modelli animali, nei quali sono state escluse altre influenze secondarie. Inoltre, dai dati sulle pareti arteriose di modelli animali sono state ricavate informazioni importanti circa le strategie diagnostiche e terapeutiche, potenzialmente applicabili anche all'uomo.

I modelli animali più utilizzati nei protocolli di studio in questo campo sono riassunti in figura 8: comprendono animali di piccola taglia come roditori, in particolare topi con mutazioni genetiche, e conigli, ed animali di grossa taglia, principalmente suini, con varianti genetiche e varianti miniaturizzate.

Table 1 Advantages and disadvantages of certain animal species in human atherosclerosis research		
Animals	Advantages	Disadvantages
Rabbits	Naturally LDL-receptor-deficient strain, naturally hypertriglyceridemic strain, good size, easy to keep and handle, known to many investigators, good response to dietary cholesterol, and availability of transgenic lines	Lesion locations less similar to those in man, the majority of circulating cholesterol is HDL, very high plasma cholesterol needed to induce atherosclerosis, no advanced lesions, hepatic lipase deficient, no spontaneous atherosclerosis, and cholesterol storage syndrome on cholesterol feeding
Mice	Well-defined genetics, easy breeding, short generation time, inbred availability, easy handling and housing, and availability of several transgenic lines	Highly resistant to atherogenesis, high HDL, no CETP, and difficulties in frequent blood sampling and dissection of medium/small-size vessels
Rats	Easy handling and housing, several strains of rats with heritable hyperlipidemia (some of which are associated with atherogenesis), and transgenic rats overexpressing human CETP produce atherosclerosis	Highly resistant to atherogenesis, high HDL, and no CETP
Hamsters	Have plasma CETP, could develop hypercholesterolemia and early atherosclerosis of fatty streaks and complex plaques after various duration of diet induction, and easy to handle	The inconsistent and unrepeatable results of aortic lesions
Guinea pigs	The majority of circulating cholesterol is LDL, possess CETP, lipoprotein lipase, and LCAT, resigificant atherogenic inflammation with increased aortic cytokines	No advanced atherosclerotic lesions, antibodies involved in atherogenic inflammation are rarely available, and not a good surgical model
Avian	Atherosclerosis-susceptible strains, location and progress of lesions similar to those in humans, low cost and easy handling, sufficient size, good response to dietary cholesterol, short generation time, and relatively long life span	Non-mammalian, lack of apoE, B <sub>48</sub> , and chylomicron formation, viral infection seen associated with atherosclerosis, and considerable changes in lipoprotein metabolism during egg-laying
Dogs	Some physiological/anatomical similarities to humans, well-characterized lipoprotein profile, hematologic and metabolic similarities to humans, extensive literature on blood pressure-altering drugs and drug interactions, and prosthetic devices	Atherosclerosis-resistant species, high HDL, expensive, no advanced atherosclerotic lesions, poor response to dietary cholesterol, ethical concerns, large amount of experimental agents needed, and spontaneous bacteremias and viral infections
Swine	Some physiological/anatomical similarities to humans, spontaneous atherosclerosis particularly in abdominal aorta, availability of miniature pigs, natural lipoprotein mutant strains, advanced vulnerable carotid atherosclerotic plaques, and surgical study of carotid artery stent techniques	High cholesterol diet (4%-5% w/w), longer time diet induction, very low baseline cholesterol level, difficulties in care, and high maintenance cost
Non-human primates	The closest species to humans, some strains respond well to dietary cholesterol, spontaneous early stage atherosclerosis in some strains, familial LDL receptor deficiency, and surgical angioplasty study	Serious chronic kidney disease is the outcome of atherosclerosis research (resulting in high risk of premature death), variations in site of lesions, limited availability, expensive and difficult to house and handle, and ethical concerns

LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; CETP, cholesteryl ester transfer protein; apo, apolipoprotein; LCAT, lecithin-cholesterol acyl transferase.

Figura 8. Tabella riassuntiva dei principali modelli sperimentali di aterosclerosi (Xiangdong et al., 2011).

Il coniglio è uno degli animali più utilizzati come modello sperimentale di aterosclerosi. E' con questo animale che vennero avviati esperimenti con dieta ricca di grassi, suggerendo come l'estensione del danno causato dall'aterosclerosi sia proporzionale all'ammontare del colesterolo assunto. Il coniglio è un animale altamente sensibile allo sviluppo di placche ateromasiche in seguito all'assunzione di una dieta ad alto contenuto di colesterolo. Esso mostra infatti una spiccata tendenza a sviluppare ipercolesterolemia già dopo poche settimane (4-16) dall'inizio di una dieta ad alto contenuto di colesterolo (0,5-2%). Il principale svantaggio nell'utilizzo del coniglio nutrito con dieta iperlipidica come modello di aterosclerosi è l'elevato tasso iperlipidico, e il conseguente sovraccarico lipidico raggiunto per

evidenziare lesioni aterosclerotiche. Questo fatto determina un accumulo di colesterolo tissutale con compromissione di organi quali cuore, reni e polmone, condizione che, di norma, non si verifica nel caso di aterosclerosi umana. Inoltre i conigli sono erbivori e presentano importanti differenze nel metabolismo lipidico rispetto all'uomo.

Il topo, così come il ratto, è una specie resistente all'aterogenesi. A differenza dell'uomo, infatti, non possiede l'enzima colesteril-estere transferasi (CETP) e la frazione HDL delle lipoproteine è il principale trasportatore di colesterolo. L'impiego di diete aterogeniche causa in questi animali un aumento del colesterolo plasmatico, ma non si riscontra una correlazione significativa tra colesterolo circolante e presenza di aterosclerosi, sebbene siano evidenti le caratteristiche degli stadi precoci di aterogenesi (strie lipidiche) in alcuni ceppi (C57BL/6J). L'impiego dei topi in questo tipo di studi è principalmente associato alle varianti genetiche disponibili sia come mutazioni spontanee sia come risultato di ingegneria genetica (knockout e delezioni geniche parziali).

Tra i più importanti modelli di topi knockout si possono ricordare animali mancanti del gene che codifica per la Apolipoproteina E (Apo E). Questa è una glicoproteina associata con tutte le lipoproteine eccetto le LDL e la sua principale funzione in vivo è quella di mediare una rapida clearance di IDL e chilomicroni, i cui residui, in caso di accumulo, inducono aterogenesi. I topi carenti di Apo E hanno livelli plasmatici di colesterolo cinque volte superiori alla norma e uno sviluppo di depositi ricchi di cellule schiumose a livello dell'aorta prossimale a tre mesi di età, sia quando sono nutriti con una dieta a basso contenuto di colesterolo, sia ad elevato contenuto. Un ulteriore modello degno di nota è il topo knockout per il recettore delle LDL. In questi modelli i livelli di colesterolo plasmatici sono due volte più alti

che nei topi normali, dovuto ad un incremento da sette a nove volte delle IDL e LDL.

Dal punto di vista genetico il maiale è una specie relativamente vicina all'uomo. Questa caratteristica è anche estesa agli aspetti anatomici e fisiologici del sistema cardiovascolare e della risposta fisiopatologica delle arterie all'ipercolesterolemia.

Le specie domestiche di maiale da fattoria (*Sus scrofa*) sono quelle attualmente più utilizzate ai fini sperimentali nella ricerca cardiovascolare. Tuttavia nelle situazioni in cui l'eccessiva crescita ponderale risulti problematica ai fini sperimentali, vengono impiegate varianti mini o miniaturizzate per studi cronici (Yucatan, Hanford, Sinclair e Göttingen) e, più recentemente, suini geneticamente modificati (LDL receptor), per ridurre i costi delle diete aterogeniche arricchite di colesterolo. Nonostante le razze in miniatura siano di dimensioni inferiori ai maiali domestici, esse sono comunque abbastanza grandi da permettere manovre diagnostiche e terapeutiche, come per esempio una indagine coronarografica o una cateterizzazione cardiaca condotta con strumenti e cateteri utilizzati in clinica.

Il maiale raggiunge tipicamente la maturità sessuale tra i 6 e gli 8 mesi ed un peso variabile tra i 30 e i 100 kg. La specie suina è un modello utile per lo studio della fisiologia e fisiopatologia in quanto presenta molteplici analogie con quella umana. Tra le più importanti ci sono:

1. Dimensione degli organi
2. Struttura del letto vascolare polmonare
3. Distribuzione delle arterie coronarie
4. Fisiologia ed anatomia cardiovascolare

Il cuore di un maiale mini che pesa 40-50 kg ha dimensioni simili a quello umano ed anche il circolo coronarico ha una somiglianza anatomica e fisiologica del 90% con quello umano. Il cuore del maiale, tuttavia è più predisposto ad andare incontro a vasospasmo durante la manipolazione e non presenta circolo coronarico collaterale pre-esistente. I gas ematici, il pH e il volume circolante sono simili, sebbene l'ematocrito e l'emoglobina siano leggermente ridotti nel maiale. Tradizionalmente il maiale è sempre stato stigmatizzato per l'eccessiva composizione grassa del suo corpo, ben noto è il modo di dire "grasso come un maiale"; tuttavia recenti dati indicano come il grasso corporeo, espresso in g/kg, indica come questo parametro sia ben bilanciato tra le due specie. Sebbene ci siano alcune importanti eccezioni, le misure della funzione ventricolare e dei parametri emodinamici umani possono essere paragonati a quelli suini.

La dimensione dei vasi e del cuore del maiale sono comparabili con quelli umani. L'anatomia delle arterie coronarie è così simile che spesso risulta difficile distinguere un esame angiografico di maiale da uno umano. Il cuore suino è morfologicamente simile al cuore umano eccetto per la presenza della vena azygos di sinistra (hemiazygos), la quale contiene sangue sistemico dai vasi intercostali e che entra nel seno coronarico (Swindle et al., 1986). Conseguentemente, il sangue contenuto nel seno coronarico è misto, miocardico e sistemico. I suini hanno marcate fibre di Purkinje, un sistema di conduzione che è maggiormente neurogenico piuttosto che miogenico e cellule nervose all'interno del nodo atrioventricolare diverse da quelle umane.

Lo sviluppo di aterosclerosi nel maiale può essere sia spontaneo, sia indotto.

Maiali normali o nutriti con dieta standard mostrano bassi livelli plasmatici di LDL e valori di HDL piuttosto elevati e, di conseguenza,



non sviluppano spontaneamente lesioni aterosclerotiche mature. In studi gerontologici si possono ritrovare informazioni di aterosclerosi spontanea nel maiale; il fatto che i maiali sani sviluppassero aterosclerosi come parte del normale invecchiamento è noto fin dal 1775. Tuttavia, il processo può essere notevolmente accelerato se i maiali sono nutriti con dieta ad alto contenuto di colesterolo. Essi sviluppano ipercolesterolemia (>300 mg/dl) e lesioni aterosclerotiche simili a quelle osservate nell'uomo. L'evoluzione e i tipi istologici delle lesioni dipendono dalla razza di suino impiegata, dai livelli plasmatici di colesterolo, dal tempo di esposizione e dalla co-presenza di altri fattori proaterogenici. Lo sviluppo di lesioni ateromatose complesse è possibile nel modello suino ma i tempi richiesti per tale sviluppo sono lunghi (7-12 mesi) in condizioni di ipercolesterolemia severa. Il lungo tempo che occorre per lo sviluppo di lesioni spontanee nel maiale, come nell'uomo, è il più grosso svantaggio nello studio di modelli spontanei di aterosclerosi in questo animale. L'evoluzione della patologia è simile, la composizione chimica e cellulare dell'ateroma sono simili, le lesioni aumentano di estensione e severità con l'aumentare dell'età, le complicanze della malattia aterosclerotica osservate nell'uomo come trombi murali, infarto acuto del miocardio, ictus, aneurisma dell'aorta addominale sviluppano in entrambe le specie.

Per accorciare i tempi per lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche e per minimizzare i costi di mantenimento degli animali per tali studi, sono state adottate diverse strategie sperimentali che prevedono l'utilizzo di maiali con mutazioni spontanee in geni codificanti per apolipoproteine o per recettori delle LDL. Questi animali sviluppano spontaneamente lesioni aterosclerotiche anche in regime di dieta a basso contenuto di grassi. Alternativamente, la combinazione della condizione diabetica e della dieta ipercolesterolemica accelera la

progressione delle lesioni aterosclerotiche con la frequente presenza di fibroateromi e lesioni calcifiche nelle coronarie entro 6-9 mesi.

Tuttavia i costi per l'acquisto ed il mantenimento di maiali mutanti o di maiali diabetici sono un fattore limitante nell'impiego di questi modelli nella ricerca scientifica e l'uso di animali geneticamente modificati sta prendendo sempre più piede.

I modelli animali hanno contribuito ad accelerare l'identificazione e la validazione di target per migliorare le terapie alle malattie aterotrombotiche. Tuttavia, mentre i modelli animali di piccole dimensioni forniscono praticità sperimentale e facilità di manipolazione, sono necessari modelli clinicamente più rilevanti per studiare i meccanismi coinvolti nella malattia aterosclerotica umana. I modelli animali di grossa taglia sono associati a costi più elevati, maggiori preoccupazioni etiche, caratterizzazione genetica meno precisa, maggiore difficoltà nel mantenimento delle colonie e nella loro manipolazione; tuttavia la loro somiglianza con l'uomo fornisce uno strumento interessante per lo sviluppo di nuove intuizioni nel campo della patologia cardiovascolare umana. Ad oggi, considerando tutti i modelli, quello suino è uno dei più utili per lo studio dei meccanismi biologici alla base dell'aterogenesi e con una più diretta traslazione in ambito clinico.

## II. Scopo del progetto

Questo progetto di tesi è inserito all'interno del Progetto Europeo del Settimo Programma Quadro ARTreat "Multi-level patient-specific artery and atherogenesis model for outcome prediction, decision support treatment, and virtual hand-on training". ARTreat è progetto complesso, multidisciplinare, integrato, nell'ambito dell'Information Communication Technology, che può essere sinteticamente descritto come attuazione di una piattaforma informatica per la predizione di crescita della placca aterosclerotica e per il supporto decisionale al trattamento.

Il primo obiettivo di questo progetto di tesi è stato quello di ottenere un modello sperimentale di aterosclerosi nei suini mediante dieta iperlipidica ed ipercolesterolemica, della durata di 2 e 4 mesi, e valutare le alterazioni istologiche della parete arteriosa delle coronarie, femorali, carotidi e dell'aorta negli animali trattati rispetto ai non trattati.

Il secondo scopo è stato valutare, attraverso l'analisi morfometrica ed immunoistochimica delle alterazioni coronariche, il grado di espressione di alcuni markers di infiammazione e proliferazione cellulare associata ai diversi stadi evolutivi e alla severità delle lesioni.

Attraverso la sequenza dei quadri istopatologici associati alle fasi di formazione iniziale della lesione aterosclerotica fino allo sviluppo dell'ateroma, ci aspettiamo di ottenere informazioni utili per stabilire il contributo relativo della migrazione/attivazione monocitaria rispetto

alla dedifferenziazione/proliferazione delle cellule muscolari lisce nel processo di aterogenesi coronarica.

## III. Materiali e metodi

### III.1. Gruppi di animali e dieta.

Il protocollo sperimentale è stato eseguito su 20 animali anestetizzati.

Sono stati studiati tre gruppi di animali:

1. i controlli, ovvero maiali trattati con dieta standard per circa 2 mesi (10 settimane) e 4 mesi (17 settimane) (gruppo **CTR**; n=7)
2. maiali che ricevono una dieta iperlipidica per 10 settimane (gruppo **HF**; n=7)
3. maiali che ricevono una dieta iperlipidica per 17 settimane (gruppo **HHF**; n=6)

La composizione delle diete standard e iperlipidica è mostrata in tabella 1.

Nutrienti	Composizione	Dieta Standard	Dieta Iperlipidica
Proteine (%)		15,8	17,5
Grasso (%)	totale	4,2	27
	animale	0	20
	di cui colesterolo	0	4
	vegetale	4,3	7
Carboidrati (%)		54	33
Fibre (%)		4,8	7,2

*Tabella 1. Composizione della dieta standard e della dieta iperlipidica.*

L'energia totale fornita dalla dieta iperlipidica è 4450 Kcal/kg dieta, mentre per la dieta standard è 3170 Kcal/kg dieta. La quantità di energia ricavata dai grassi per il primo tipo di dieta è 2430 Kcal, corrispondente al 54,6% del totale, mentre per il secondo tipo solo 378 Kcal sono ricavate dai grassi, corrispondenti al 12% del totale.

Al fine di caratterizzare il modello e valutare l'effetto della dieta sulla composizione delle lipoproteine plasmatiche è stato effettuato un prelievo di sangue in condizioni basali (pre-dieta aterogena) e alla fine della dieta, prima del campionamento dei tessuti. I parametri di infiammazione sistemica e di profilo lipidico plasmatico rilevati sono: colesterolo totale, HDL, LDL, apolipoproteina A1 (componente proteico principale delle HDL, costituendo circa il 65% del contenuto proteico totale delle HDL).

Dopo il completamento degli studi emodinamici in vivo, gli animali vengono sacrificati mediante iniezione intravenosa di KCL sotto

anestesia: l'intero cuore e le principali arterie periferiche vengono raccolti per le successive analisi istologiche ed immunoistochimiche.

Dopo il sacrificio, in tutti i gruppi di animali le arterie coronarie e periferiche escisse vengono esaminate con indagini istopatologiche ed immunoistochimiche.

## **III.2. Istopatologia.**

Lo scopo principale delle indagini istopatologiche ed immunoistochimiche è quello di fornire dati quantitativi sperimentali sul modello sperimentale di sviluppo della lesione aterosclerotica. Per fare questo si è mirato a valutare morfometricamente la posizione delle lesioni, il tipo, il volume, la composizione e lo stato infiammatorio.

### **III.2.1. Campionamento.**

Alla fine degli studi in vivo degli animali dei tre gruppi sperimentali, il cuore e le principali arterie periferiche vengono escissi, lavati in soluzione fisiologica isotonica, esaminati macroscopicamente e immersi in formalina al 5% per la fissazione del tessuto.

I campioni vengono raccolti dal cuore fissato: sono stati ottenuti segmenti trasversi dall'arteria coronaria sinistra principale LMCA (1 segmento di 1 mm), dall'arteria discendente anteriore sinistra LAD (10-12 segmenti di 5 mm ciascuno), dall'arteria coronaria circonflessa sinistra LCX (4 segmenti di 10 mm ciascuno) e dall'arteria coronaria destra RCA (4-5 segmenti di 10 mm ciascuno). Nelle figure 9 e 10 è mostrato il protocollo di raccolta e segmentazione dei campioni per LMCA, LAD e LCX.



Figura 9. Metodo di campionamento e sezionamento delle coronarie per l'analisi istopatologica.

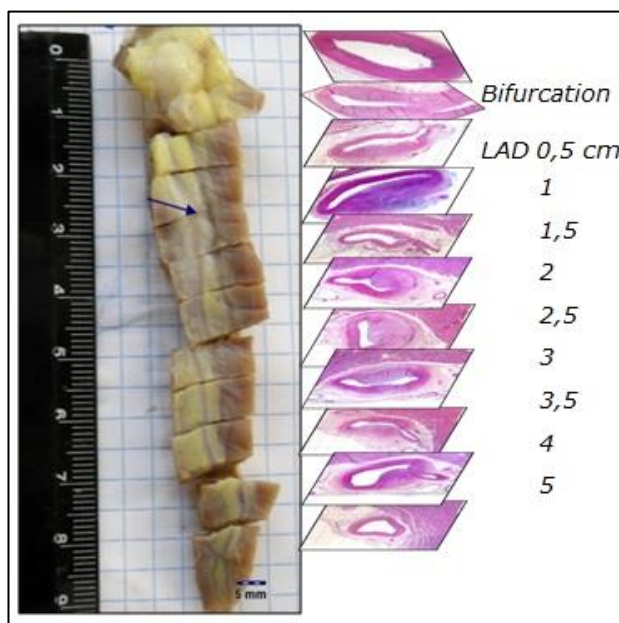


Figura 10. Segmentazione e ricostruzione longitudinale di una arteria discendente anteriore sinistra per l'analisi morfometrica.

Campioni supplementari vengono raccolti dalle arterie destre carotidi e femorali e dall'aorta di ogni animale.

### III.2.2. Processazione.

#### III.2.2.1. Fissazione ed inclusione.

La fissazione, mediante immersione in formalina tamponata al 5% per 7-10 giorni, è una procedura essenziale in campo istopatologico per impedire l'avanzamento della decomposizione del tessuto, per preservarne le caratteristiche chimiche ed antigeniche e per conferire la resistenza adeguata ai successivi trattamenti. I campioni vengono



poi processati attraverso una disidratazione per passaggi in una serie ascendente di alcool per consentire una disidratazione completa e graduale dei tessuti. Successivamente vengono chiarificati in un solvente organico, lo xilene, ed infiltrati in una particolare miscela di cere, la paraffina, con punto di fusione a 56°C. Dai blocchetti di paraffina ottenuti dopo raffreddamento vengono tagliate le sezioni istologiche; a questo scopo i tessuti vengono orientati in modo tale da ottenere sezioni trasversali dei vari vasi arteriosi.

#### **III.2.2.2. Taglio e sparaffinatura.**

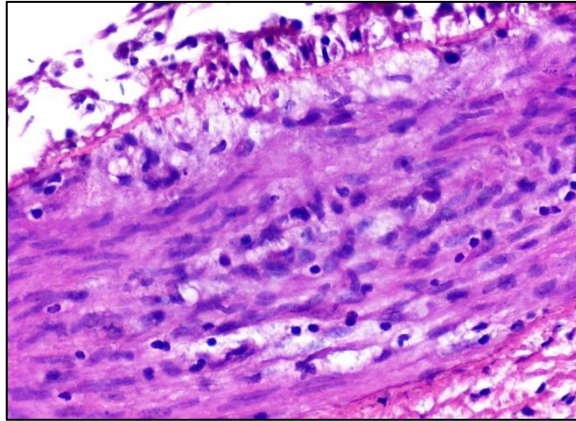
Dai blocchetti di paraffina vengono tagliate sezioni seriate di uno spessore di 5 µm con l'utilizzo del microtomo rotativo (Microm HM330, Bio-optica). Le sezioni così ottenute vengono distese su vetrini portaoggetto carichi elettrostaticamente e fatte essiccare in stufa a 40°C per garantire la completa aderenza delle fettine sui vetrini.

La paraffina non è miscibile con acqua e alcool quindi, per poter procedere alle successive colorazioni istologiche, deve essere eliminata dal vetrino mediante immersione in xilene. Successivamente occorre reidratare le sezioni attraverso la scala discendente di alcool (assoluto e 95°) e portate in acqua distillata, per consentire di essere trattate con i principali coloranti dissolti in soluzioni idrofile.

#### **III.2.3. Colorazioni istologiche.**

##### **III.2.3.1. Ematossilina – Eosina**

E' la colorazione di base nello studio morfologico e generale dei tessuti animali (figura 11).



*Figura 11. Ingrandimento 40x di un'arteria coronarica colorata con Ematossilina-Eosina: l'ematossilina colora in blu-viola i nuclei, l'eosina colora in rosa il citoplasma.*

L'ematossilina è una sostanza vegetale che viene estratta dal legno di campeggio (*Haematoxylin campechianum*); non è di per sé un colorante ma diventa tale per ossidazione ad emateina; l'emateina assume attività tintoriale in presenza di un mordenzatore che di solito è un allume (Emallume di Mayer, Bio-optica). È un colorante basico, cationico, ed in quanto tale vi si legano componenti basofili, che hanno affinità per le basi, ossia le sostanze acide, i cui gruppi ionizzabili sono principalmente i carbossilici, gli ossidrilici, i solforici e i fosforici. Colora in blu violaceo i nuclei, la mucina e le sostanze fondamentali dei connettivi al alto tenore di mucopolisaccaridi come la matrice cartilaginea.

L'eosina è una tetrobromofluoresceina derivante dall'anilina. È un colorante acido, anionico: vi si legano i componenti acidofili, ossia le basi, i cui gruppi ionizzabili sono principalmente gli amminici. Colora in rosso rosato la maggioranza delle strutture citoplasmatiche, il tessuto connettivo e la sostanza intercellulare.

Procedimento:

Le sezioni deparaffinate e portate all'acqua vengono immerse in ematossilina di Mayer per 5 minuti e successivamente vengono lavate in acqua corrente per 15 minuti. Dopo un breve passaggio in alcol 95°

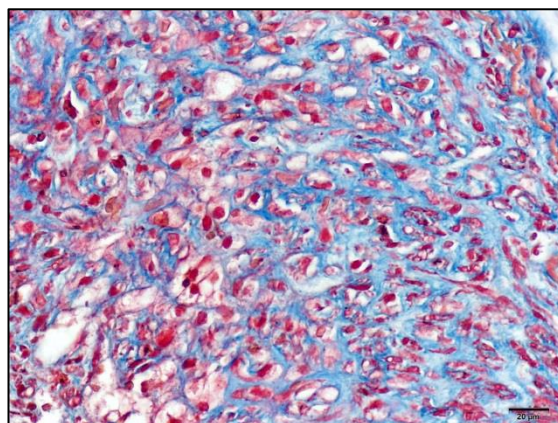
vengono immerse in eosina alcolica per 2 minuti. Si procede infine con la disidratazione attraverso la scala ascendente di alcol (95° e assoluto), passaggio in xilene e montaggio del vetrino copri-oggetto con resina.

### III.2.3.2. Tricromica di Masson

E' la colorazione istologica specifica per il tessuto connettivo, in particolare per il collagene. Il metodo associa una colorazione nucleare ottenuta con ematossilina ferrica di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico ed una colorazione del connettivo con due differenti coloranti acidi, il blu di anilina, per collagene e strutture ricche in mucopolisaccaridi, e fucsina di Ponceau, per le fibre muscolari.

Le diverse strutture, come mostrato in figura 12, assumono così le seguenti colorazioni:

- Nuclei e gameti: nero
- Citoplasma, cheratina, fibre muscolari e granuli acidofili: rosso
- Collagene e muco: blu
- Eritrociti: giallo



*Figura 12. Ingrandimento 40x di una colorazione Tricromica di Masson: citoplasma e fibre muscolari si colorano in rosso, i nuclei in nero, il collagene in blu e gli eritrociti in giallo.*

Procedimento:

Le sezioni sparaffinate e reidratate vengono trattate con Ematossilina ferrica sec. Weigert per 10 minuti; i vetrini vengono sgocciolati e sulle sezioni viene posto acido picrico in soluzione alcolica lasciandolo agire per 4 minuti. In seguito ad un breve lavaggio in acqua distillata le sezioni vengono trattate con fucsina di Ponceau per 4 minuti. I vetrini vengono lavati in acqua distillata e sulle sezioni viene posto acido fosfomolibdico al 1% per 10 minuti. Senza lavaggio e dopo sgocciolamento, le sezioni vengono trattate con blu di anilina per 5 minuti. Dopo il lavaggio in acqua distillata, si procede con la disidratazione attraverso la scala ascendente di alcol (95° e assoluto), passaggio in xilene e montaggio in resina.

### **III.3. Analisi immunoistochimiche**

L'immunoistochimica è una tecnica in grado di individuare specifiche molecole o strutture del compartimento intra- ed extracellulare. Si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo, in addizione a sistemi di rilevazione (enzimatici o fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio. Esistono metodiche dirette ed indirette; nelle metodiche dirette si utilizza un unico anticorpo diretto contro la molecola da ricercare e questo stesso anticorpo lega un cromogeno che ne permette la visualizzazione; nelle metodiche indirette vengono utilizzati due anticorpi, un anticorpo primario diretto contro la molecola da ricercare, ed un anticorpo secondario, coniugato con un cromogeno, che andrà a legarsi all'anticorpo primario.

Il protocollo utilizzato in questo studio ha utilizzato la metodica immunoistochimica indiretta, secondo cui la reazione antigene-anticorpo primario viene rilevata con un anticorpo secondario biotinilato che viene poi legato all'avidina coniugata ad un enzima

catalizzatore (la perossidasi di rafano); per localizzare le perossidasi è stato utilizzato il substrato cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) che in presenza dell'enzima produce un precipitato di colore marrone visibile al microscopio ottico.

Complicazioni: per evitare falsi positivi dovuti alla reazione del cromogeno con le perossidasi endogene, queste vengono disattivate per sovrasaturazione con perossido di idrogeno. Altri falsi positivi possono essere dovuti alla fissazione dei campioni istologici: la fissazione in formalina determina la formazione di legami crociati tra il liquido fissativo e i gruppi attivi delle proteine causando il mascheramento di molti siti antigenici; per evitare che questo accada i preparati vengono sottoposti a smascheramento termico in tampone citrato.

Procedimento:

Sezioni seriate consecutive di 5  $\mu\text{m}$  di spessore vengono poste su vetrini a carica positiva per le indagini immunoistochimiche. I vetrini vengono deparaffinati e portati all'acqua distillata. Le sezioni vengono incubate in perossido di idrogeno 3% per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in acqua distillata, si procede allo smascheramento dei siti antigenici ottenuto con l'immersione dei vetrini in tampone citrato (pH 6) in forno a microonde per due cicli da 5 minuti (700W e 350W); i vetrini vengono poi lasciati raffreddare a temperatura ambiente per circa 20 minuti. Le sezioni vengono bloccate con il siero di bloccaggio (Vectastain elite ABC kit) per 30 minuti e successivamente vengono incubate con l'anticorpo primario (secondo la sua diluizione specifica) a 4°C in camera umida over-night. Dopo il lavaggio in acqua distillata, le sezioni vengono incubate per 30 minuti con l'anticorpo secondario biotinilato (Vectastain elite ABC kit). Dopo lavaggio si procede con l'incubazione con l'enzima perossidasi (Vectastain elite ABC kit). In seguito a lavaggio la reazione viene sviluppata con il cromogeno DAB.

A questo punto, per potenziare la definizione della struttura del preparato, le sezioni vengono controcolorate con ematossilina di Mayer per 10 secondi circa. Si procede infine con la disidratazione delle sezioni attraverso la scala ascendente di alcol (95° e assoluto), passaggio in xilene e montaggio in resina. Le cellule così trattate risultano colorate in varie gradazioni di marrone se legate all'anticorpo (positive) o colorate in blu se non legate (negative).

Gli anticorpi primari utilizzati in questo studio vengono riportati di seguito, con le relative diluizioni.

1. Composizione cellulare della placca:

- **alfaSMA** (actina muscolo liscio specifica, clone 1A4 Santa Cruz, diluito 1:100), come marker fenotipico delle cellule muscolari lisce
- **MAC-387** (S100A8 o calprotectina clone MAC-387 Thermoscientific, diluito 1:1000), come marker cellulare di monociti e macrofagi

2. Stato infiammatorio della lesione:

- **CD107a** o **LAMP-1**, proteina lisosomiale di membrana (clone 4E9/11 AdB Serotec, diluito 1:100) è stato utilizzato come marker di attività fagocitica e lisosomiale delle cellule infiammatorie all'interno della lesione
- **MIF**, fattore di inibizione della migrazione dei macrofagi (clone FL115 Santa Cruz, diluito 1:250)
- **CXCR4**, recettore di SDF-1 (clone H-118 Santa Cruz, diluito 1:250)
- **SDF-1alfa**, (fattore 1 derivato dalle cellule stromali, Santa Cruz, diluito 1:200)

3. Proliferazione cellulare:

- **Ki-67** (clone SP6, ThermoScientific, diluito 1:200): è una proteina nucleare espressa in tutte le fasi del ciclo cellulare tranne che nella fase di quiescenza; la sua espressione è considerata indice della frazione di cellule di una popolazione cellulare potenzialmente in grado di replicare.

### **III.4. Analisi di immagine e morfometria.**

Segmenti consecutivi di ciascun segmento arterioso sono stati trattati colorazioni di istologia classica (Ematossilina-Eosina e Tricromica di Masson) e colorazioni immunoistochimiche; sono stati esaminati mediante microscopia ottica (Olympus BX43) ai vari ingrandimenti (2x – 40x) e digitalizzati attraverso un sistema video (videocamera Olympus D70) interfacciato ad un computer con software dedicato (Olympus Cell Sens Dimension) per l'acquisizione delle immagini e le analisi morfometriche.

I parametri morfometrici di ogni lesione sono stati ottenuti da segmenti consecutivi utilizzando il software Olympus Cell Sens Dimension su sezioni istologiche colorate con Ematossilina-Eosina e Tricromica di Masson. La dimensione della lesione può essere espressa in termini di spessore e di area, come mostrato in figura 13. I parametri morfometrici standard utilizzati per definire lo spessore sono lo spessore intinale (IT, Intimal Thickness) ossia il massimo spessore misurabile della tonaca intima, e l'IMT ratio, ossia il rapporto tra lo spessore dell'intima e quello della media. L'area della lesione viene definita mediante il valore assoluto dell'area di lesione (LA, Lesion Area) e il rapporto tra l'area di lesione e l'area totale della parete arteriosa all'interno della lamina elastica esterna, ossia la somma dell'area della tonaca intima e della tonaca media (% Lesion

Area), per eliminare il problema della costrizione del lume vascolare in seguito a fissazione e processazione.

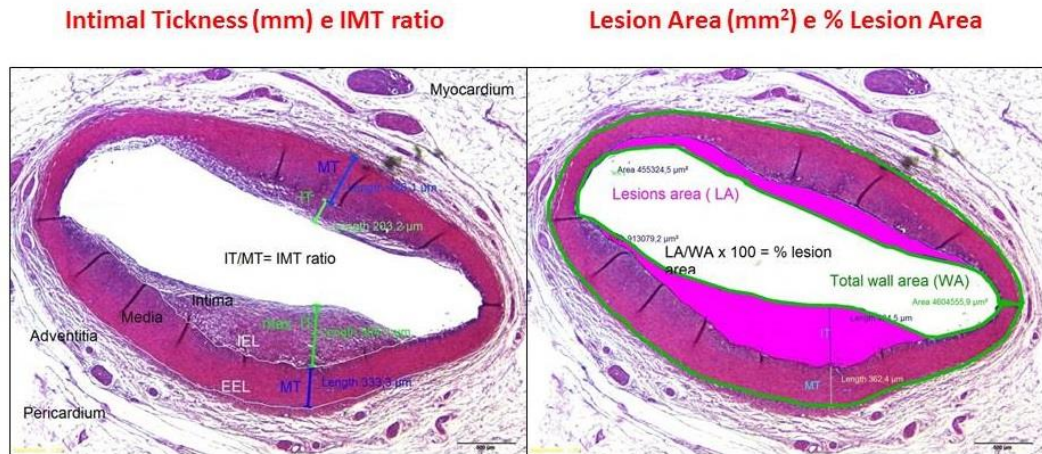


Figura 13. Analisi morfometrica di una lesione coronarica. A sinistra vengono misurati lo spessore intimale (IT) e il rapporto dello spessore intima/media (IMT ratio); a destra sono misurati l'area di lesione (LA) e la percentuale di area di lesione (% LA).

La quantificazione della fibrosi è stata ottenuta su sezioni colorate con Tricromica di Masson ed analizzate mediante Cell Sens Dimension Color Imaging software. 4-5 campi microscopici caratteristici di ogni sezione sono stati digitalizzati ad alto ingrandimento (20x – 40x) mediante threshold manuale di colore per stimare la percentuale di positività d'area per il tessuto fibroso (colore blu) all'interno della regione di interesse (ROI). Un esempio semplificato della procedura è mostrato in figura 14: la sogliatura del colore viene effettuata identificando tutti i pixel del colore di interesse (blu per il tessuto fibroso nella Tricromica di Masson).



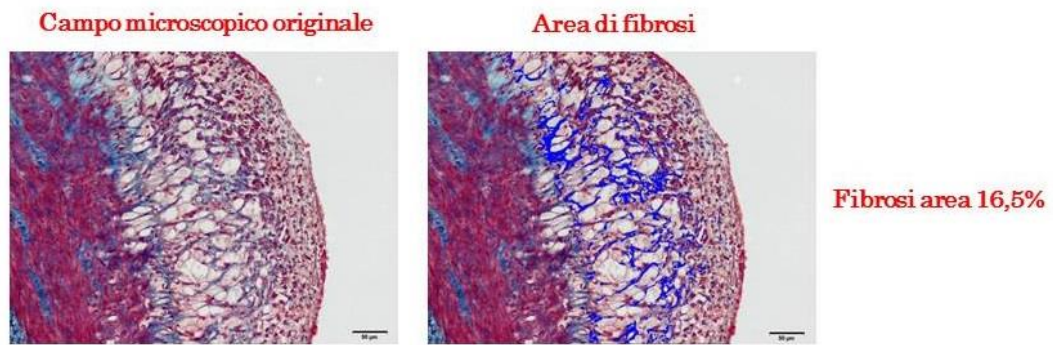


Figura 14. Quantificazione della componente fibrotica nella Tricromica di Masson mediante sogliatura di colore.

In modo simile sono stati quantificati i risultati immunostochimici. Il numero di ogni tipo cellulare positivo per lo specifico marker è espresso come percentuale dell'area positiva coperta dal segnale (sogliatura per il colore marrone) all'interno della regione di interesse delle singole lesioni. Analogamente sono stati quantificati la componente lipidica intracellulare, che risulta incolore in ogni tipo di colorazione (sogliatura per il colore bianco), e la componente nucleare negativa per lo specifico marker (sogliatura per il colore blu). Un esempio è mostrato nella figura 15.

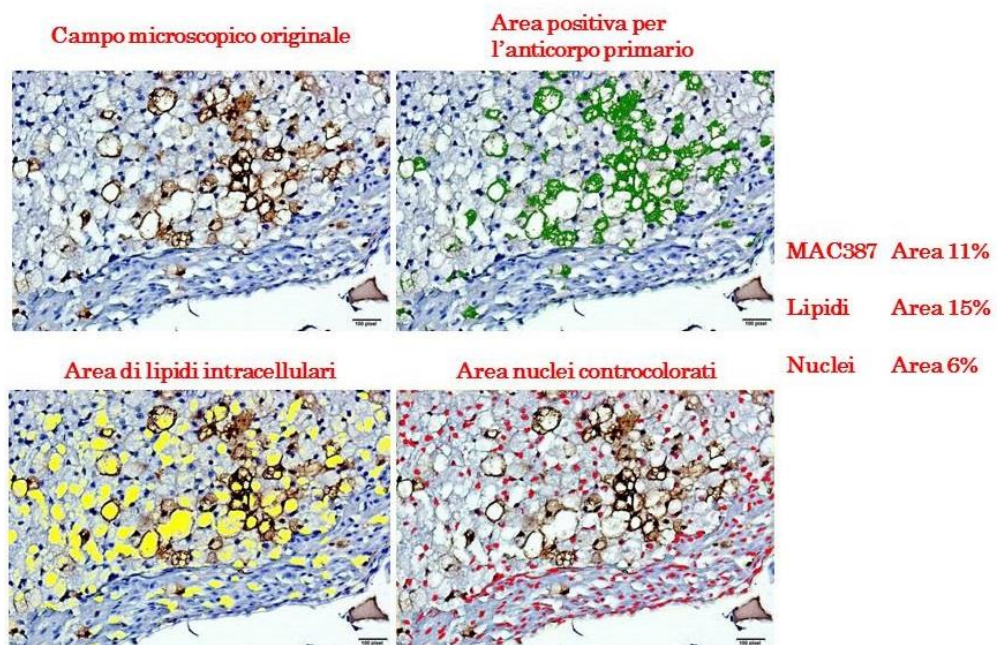


Figura 15. Quantificazione dell'area positiva al marker immunostochimico, della

*componente nucleare negativa all'anticorpo e della componente lipidica mediante sogliatura di colore.*

## IV. Risultati

### IV.1. Caratterizzazione del modello di aterogenesi nel maiale

#### IV.1.1. Gli animali

Nella tabella 2 è mostrato il peso degli animali dei tre gruppi sperimentali dopo il periodo di dieta con le corrispondenti quantità di dieta assunta. Il peso degli animali prima del trattamento non era significativamente diverso fra i tre gruppi (25-30 Kg).

Gruppi (giorni di dieta)	Peso post-dieta (Kg)	Kg dieta assunta
C (70±2gg)	33,8±9,5	49
HF (74±4gg)	36,8±2,9	46,3±11,9
HHF (119±17)	56,12±12,5	82,1±11,6

Tabella 2. Peso degli animali dei gruppi CTR, HF e HHF dopo la dieta, e la relativa quantità di dieta assunta.

#### IV.1.2. Caratterizzazione biumorale

In tabella 3 sono mostrati i risultati degli esami del sangue effettuati sui tre gruppi di animali post-dieta.

	C (7)	HF (7)	HHF (6)	$p$ C vs HF	$p$ C vs HHF	$p$ HF vs HHF
Colesterolo totale (mg/dL)	63,3±4,2	633,2±83,6	558±134	<0,0001	<0,0001	ns
Colesterolo HDL (mg/dL)	25,8±3,8	46,4±18,7	34±14	0,016	ns	<0,0001
Colesterolo LDL (mg/dL)	27,5±3,0	576,1±83,2	511,2±133, 6	<0,0001	0,0002	ns
Colesterolo Totale/HDL.ratio	2,5±0,3	15,2±5,0	19±7	<0,0001	0,0129	0,0003

<i>Apolipoproteina A1 (mg/dL)</i>	25,1±5,0	61,7±13,0	54,7±6,4	<0,0001	0,0039	ns
<i>oxLDL (U/L)</i>	5,3±5,2	31,9±4,2	45,5±20	0,0002	0,0001	ns
<i>Trigliceridi (mg/dL)</i>	50,3±10,5	54,0±16,8	65±45	ns	ns	0,023
<i>Leucociti (*1000 n/mL)</i>	12,9±0,4	14,7±2,4	10,26±2,5	ns	ns	ns
<i>Ematocrito (%)</i>	26,3±2,5	31,6±4,2	25,1±1,2	0,013	ns	0,038

Tabella 3. Dati biomorali dei tre gruppi di animali: CTR, HF e HHF. I dati sono espressi come media ± SD. Analisi statistica: ANOVA. ns=non significativo

Sia negli animali trattati per 8 settimane che negli animali trattati per 16 settimane, la dieta ipercolesterolemica aumenta significativamente la quantità di colesterolo totale (quasi di 10 volte), la concentrazione plasmatica di LDL e di oxLDL e della apolipoproteina A1.

## IV.2. Risultati istopatologici

### IV.2.1. Campionamento ed esame macroscopico

Il numero dei segmenti coronarici e periferici raccolti ed esaminati è mostrato in tabella 4 per i 3 gruppi sperimentali. Per ogni segmento arterioso sono state ottenute 30-100 sezioni, colorate con tecniche di istologia classica ed immunohistochimica, digitalizzate mediante microscopia ottica e preparate per l'analisi morfometrica e di immagine.

ARTERIE	CAMPIONI TOTALI	CTR	HF	HHF
LMCA	40	14	12	12
LAD	134	30	34	60
LCX	54	15	18	24

<b>RCA</b>	<i>59</i>	21	28	39
<b>TOTALE</b>	<i>287</i>	80	92	135
<b>CAROTIDI</b>	<i>19</i>	7	5	5
<b>FEMORALI</b>	<i>9</i>	3	2	4
<b>AORTA</b>	<i>7</i>	2	2	3
<b>TOTALE</b>	<i>33</i>	12	9	12

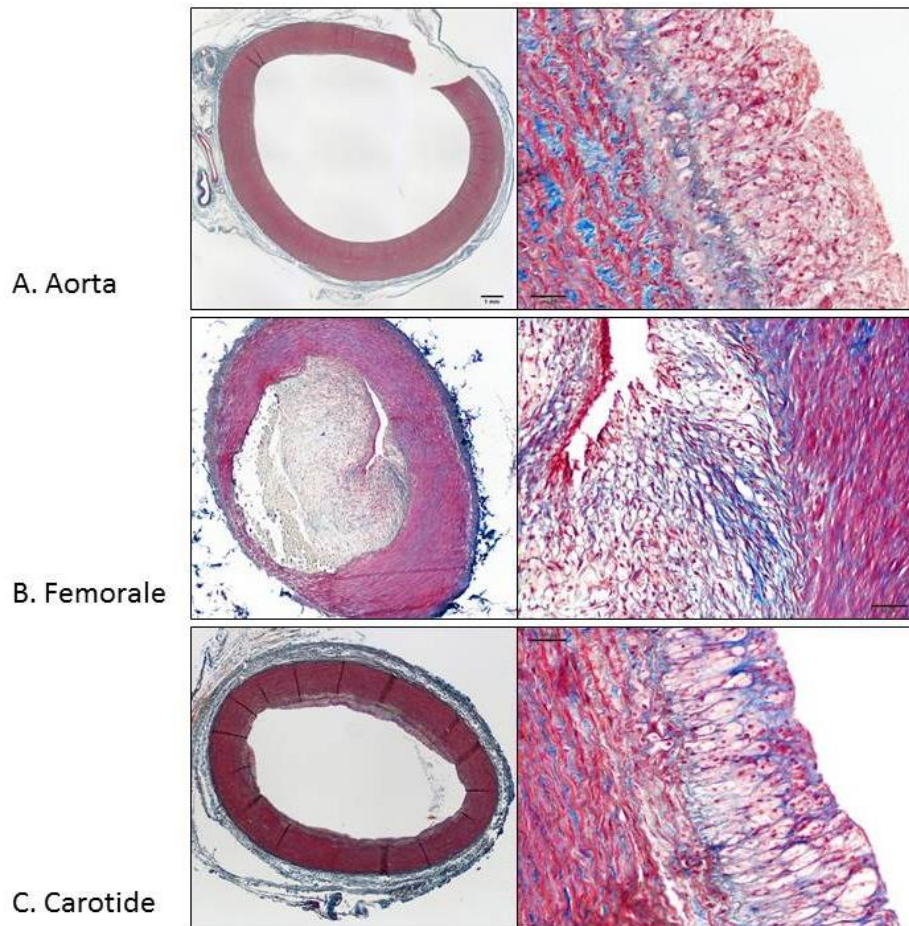
*Tabella 4. Numero totale di prelievi di segmenti coronarici e arteriosi periferici effettuati nei tre gruppi sperimentali.*

#### **IV.2.1.1. Campioni periferici**

All'esame macroscopico non sono state osservate lesioni intimali nelle arterie periferiche negli animali del gruppo CTR e del gruppo HF.

Fra i campioni del gruppo HHF sono state evidenziate lesioni intimali in 4/6 casi nei tratti ascendenti e addominali dell'aorta (principalmente fatty streaks), in 5/6 casi nelle arterie carotidiche (carotide comune e biforcazione) e in 3/6 casi nelle arterie femorali. Solo un caso di arteria femorale presenta sviluppo di ateroma.

In figura 16 sono riportate le lesioni più importanti riscontrate nei vasi periferici degli animali del gruppo HHF.



*Figura 16. Massime lesioni arteriose rilevate nei vasi periferici del gruppo HHF. A, aorta; B, femorale; C, carotide.*

#### **IV.2.1.2. Campioni coronarici**

All'esame macroscopico non è stata rilevata nessuna evidente lesione coronarica nei segmenti trasversali delle arterie coronariche del gruppo di animali di controllo.

Nel gruppo di animali con dieta ipercolesterolemica di 2 mesi è stata evidenziato un ispessimento nel tratto prossimale della discendente anteriore sinistra solo in un caso.

Invece l'analisi macroscopica dei segmenti trasversali delle arterie coronariche del gruppo di animali con dieta ipercolesterolemica a 4



mesi ha mostrato evidenti placche coronariche in 4 casi su 6 (figura 17).



*Figura 17. Aspetto macroscopico dell'arteria interventricolare anteriore di un caso del gruppo HHF, in situ (a sinistra) e dopo isolamento e sezionamento trasversale (a destra).*

#### **IV.2.2. Tipologia di lesioni e loro distribuzione**

Le principali caratteristiche istopatologiche coronariche osservate nei tre gruppi sperimentali sono riportate nella tabella 5: per ogni tipo di lesione è specificato il range di intimal thickness (IT) ed il range di ITM ratio, nonché la prevalente composizione cellulare. I quadri patologici sono stati classificati secondo i criteri di Stary, tenendo conto anche delle modificazioni di Virmani.

<b>TIPO</b>	<b>DESCRIZIONE</b>	<b>INTIMAL THICKNESS (μm)</b>	<b>IMT RATIO</b>
<b>Normale</b>	<b>Tessuto normale</b>	20-30	EC, SMCs IMT ratio ≤ 0,1
<b>Tipo I</b>	<b>Lesione iniziale</b>	40-100	FC, MN, MF IMT ratio <0,5
<b>Tipo II</b>	<b>Fatty streak</b>	100-200	FC, MN, MF IMT ratio ≥ 0,3
<b>Tipo III</b>	<b>Preateroma</b>	≥200	Accumuli lipidici FC, MN, MF, L, SMCs IMT ratio ≥ 0,5
<b>Tipo IV</b>	<b>Ateroma</b>	>500	Cappuccio fibroso, core necrotico, IMT ratio ≥ 1
<b>Tipo Va</b>	<b>Fibroateroma</b>	>500	Proliferazione fibromuscolare, neovasi, IMT ratio >1
<b>Tipo Vb</b>	<b>Placca fibrocalcifica</b>	>1000	Calcificazioni, neovasi, IMT ratio ≥ 2

*Tabella 5. Classificazione e principali caratteristiche istopatologiche delle lesioni riscontrate negli animali dei gruppi HF e HHF.*

La figura 18 mostra i criteri istopatologici adottati per la classificazione delle alterazioni coronariche nei gruppi CTR, HF e HHF.



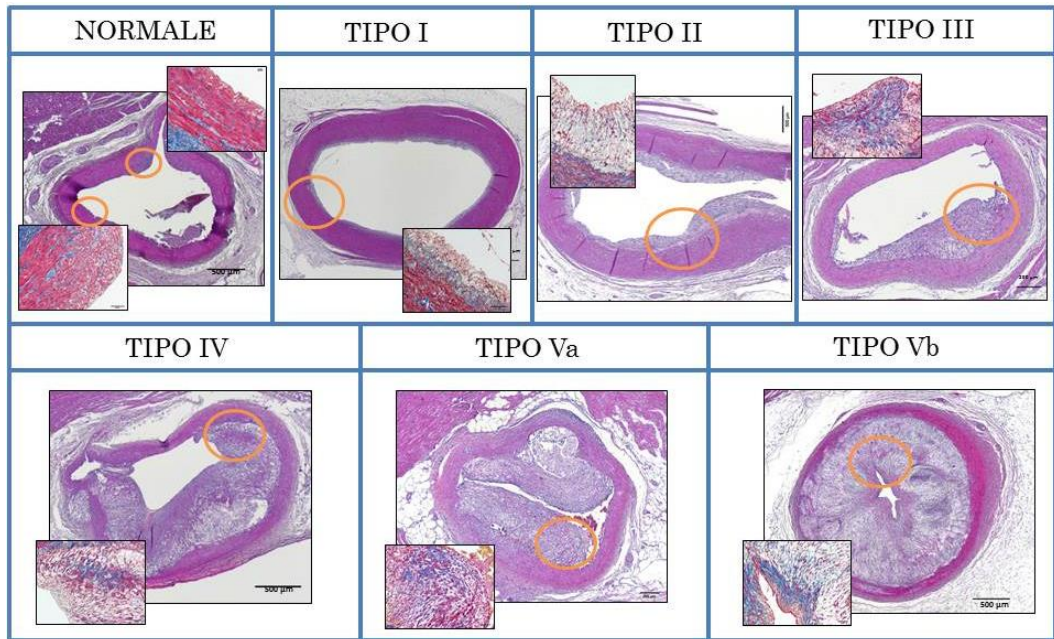


Figura 18. Pannello istopatologico completo delle alterazioni coronariche osservate nei gruppi di animali C, HF, HHF. Sono mostrate le sezioni colorate con Ematossilina-Eosina ad ingrandimento 2x o 4x e nei riquadri i corrispettivi ingrandimenti 20x della Tricromica di Masson.

A) L'intima delle arterie coronarie intatte, come quella mostrata in figura 19, è composta da un monostrato di cellule endoteliali (indicate dalla freccia blu), isolate cellule muscolari lisce che risultano positive per l'alfaSMA (indicate dalla freccia nera), immerse in una matrice extracellulare ricca in collagene e fibre elastiche, e raramente monociti-macrofagi, separati dalla tonaca media da una lamina elastica interna spessa circa 3-4  $\mu\text{m}$  (indicata dalla linea tratteggiata). In un'intima normale l'IT misura  $22\pm 5\mu\text{m}$ .

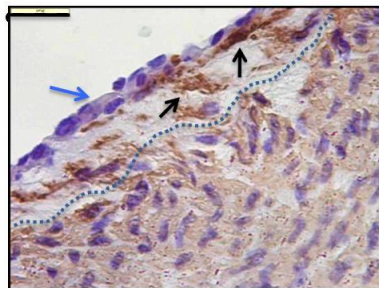
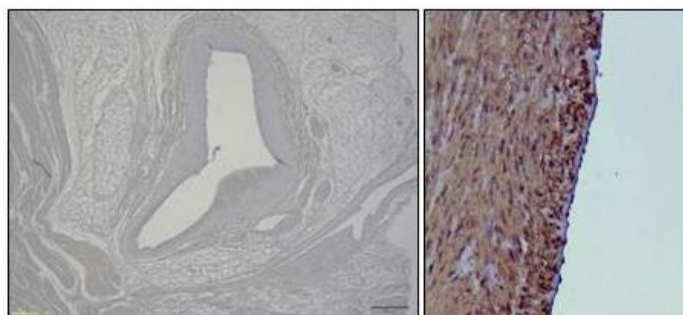


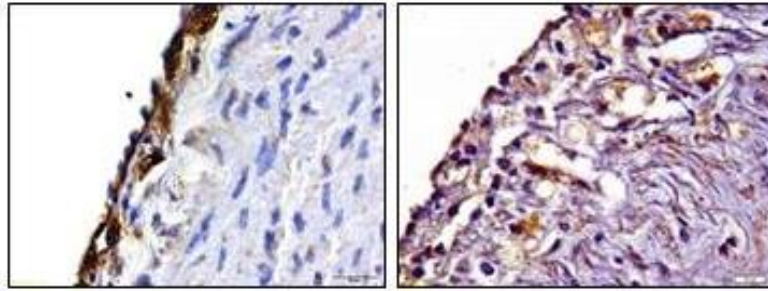
Figura 19. Intima di una arteria coronarica normale di un caso del gruppo CTR. le cellule positive per l'alfaSMA sono evidenziate in marrone (ingrandimento 40x).

L'ispessimento intimale adattativo è una variante anatomica della normale tonaca intima, che appare più spessa del normale (40-50 $\mu$ m); è generalmente presente a livello delle biforcazioni sia negli animali di controllo sia nei segmenti normali degli animali trattati. Questo ispessimento, spesso descritto nelle normali coronarie umane, è dovuto ad un'aumentata proliferazione delle cellule muscolari lisce subendoteliali, mostrata in figura 20 da una positività immunohistochimica per l'alfaSMA e per il marker di proliferazione nucleare Ki-67, e spesso è associata ad una doppia lamina elastica interna: non sono presenti né foam cells né cellule infiammatorie.



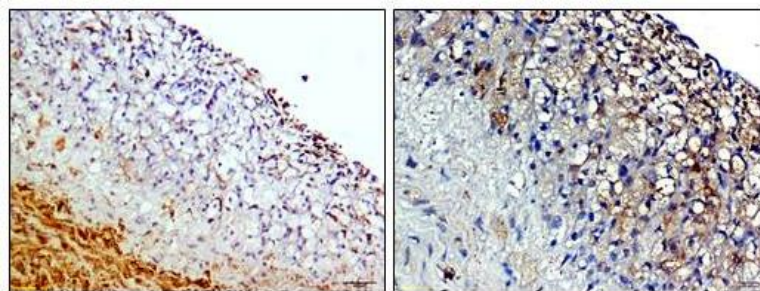
*Figura 20. Ispessimento intimale adattativo della biforcazione della discendente anteriore sinistra di un caso del gruppo CTR.*

B) Le lesioni di tipo I nella classificazione di Stary sono caratterizzate da un aumentato IT ( $\leq 100\mu$ m) con un precoce accumulo subendoteliale di foam cells, poche cellule macrofagiche e muscolari lisce all'interno della matrice extracellulare. La positività per l'alfaSMA delle cellule muscolari lisce non è significativamente diversa dall'intima normale, ma c'è un'intensa positività per il marker di attività fagocitaria CD107a nelle foam cells subendoteliali e nei macrofagi, suggerendo che è iniziata una precoce fase del processo aterogenetico (figura 21).



*Figura 21. Iniziale deposizione subendoteliale di FCs. Positività cellulare per CD107a, 40x.*

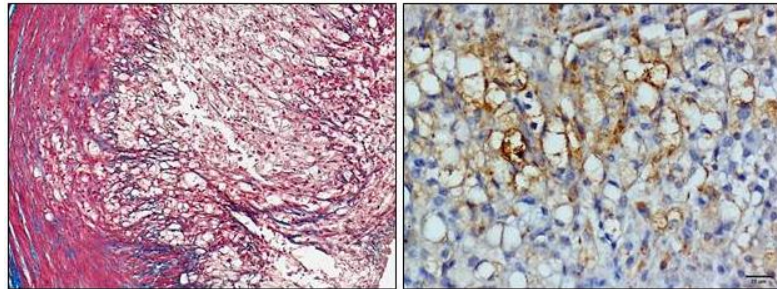
C) La classificazione in lesioni di tipo II, chiamate anche fatty streaks o xantoma intimale (nella classificazione di Virmani), è basata sia sull'intimal thickness ( $IT \geq 100 \mu m$ ) che sull'ITM ratio ( $\geq 0,2$ ) e da una iniziale deposizione di foam cells nella tonaca media; vi possono essere alcune foam cells necrotiche ed un iniziale accumulo di lipidi extracellulari. Queste lesioni sono confinate nello spazio intimale subendoteliale, con una intatta lamina elastica interna singola o doppia, e sono principalmente composte da foam cells di origine macrofagica con una superficie relativa di cellule muscolari lisce positive all'alfaSMA di tipo romboidale sintetica inferiore a quello presente nell'intima intatta e nella lesione di tipo I. Sia le foam cells che i macrofagi sono intensamente positivi per il CD107a, indicando la presenza di un processo di fagocitosi attiva (figura 22).



*Figura 22. Lesione di tipo II in una porzione prossimale della coronaria destra di un caso del gruppo HF. A sinistra è mostrato la positività delle SMCs per l'alfaSMA (10x), a destra la positività delle FCs e dei macrofagi per la LAMP-1 (20x).*

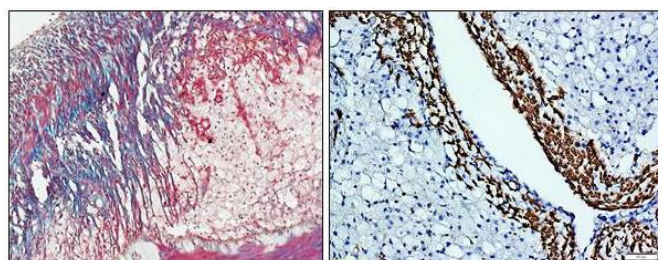
D) Le lesioni di tipo III (o preateromi nella classificazione di Virmani), sono caratterizzate da rotture della lamina elastica interna, da

un'aumentata concentrazione di foam cells derivate dalle SMCs sintetiche e di accumuli lipidici extracellulari in associazione alle FCs sia nello strato intimale che nella media. Risultano intensamente positive per il CD107a in tutti i tipi cellulari della lesione e per CXCR4-MIF nelle FCs di origine macrofagica e nelle cellule endoteliali (figura 23).



*Figura 23. Lesione di tipo III. a sinistra è mostrata la rottura della lamina elastica interna con la colorazione tricromica di Masson (10x); a sinistra l'intensa positività per il CD107a (40x).*

E) Le lesioni tipo IV, o ateromi, sono caratterizzate dalla formazione di un core lipidico e necrotico spesso ricoperto da un cappuccio fibroso composto da cellule muscolari lisce, particolarmente evidente con una colorazione immunohistochimica per l'alfaSMA (figura 24). Lo spessore intimale è superiore a 500  $\mu\text{m}$  e l'IMT ratio è maggiore di 1.

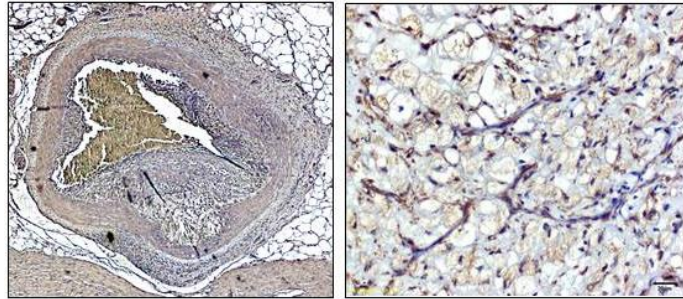


*Figura 24. Lesione di tipo IV (ateroma): A sinistra è mostrato il core lipidico (Tricromica di Masson, 10x) circondato dal cappuccio fibroso di cellule muscolari lisce, meglio evidenziato dalla positività per l'alfaSMA a destra (20x).*

F) Nel fibroateroma, o lesione di tipo Va, l'IT è maggiore di 500  $\mu\text{m}$  e l'IMT ratio è superiore a 1; si ha un incremento del tessuto connettivo che va mano a mano a sostituire il core lipidico e necrotico. C'è quindi

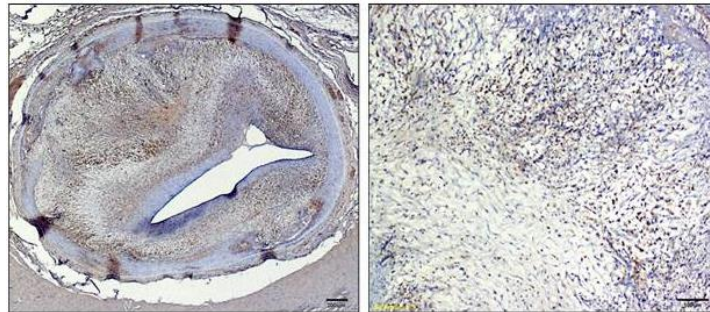


una intensa proliferazione delle cellule muscolari lisce, evidenziata da una intensa positività per il Ki-67 e per l'alfaSMA, con formazione di nuova vascolarizzazione (figura 25).



*Figura 25. Positività per l'alfaSMA in una placca di tipo Va (fibroateroma).*

G) La placca fibrocalcifica, o lesione di tipo Vb, è una placca prevalentemente fibrosa, in cui sono frequenti fenomeni di calcificazione sotto forma di depositi di sali di calcio e fenomeni di neovascolarizzazione (figura 26). Lo spessore intimale è superiore a 1000  $\mu\text{m}$  e l'IMT ratio è superiore a 2.



*Figura 26. Positività del marker infiammatorio MIF in placca fibrocalcifica.*

#### **IV. 2.2.1. Incidenza e localizzazione delle lesioni nei gruppi trattati .**

In figura 27 e in tabella 6 è mostrato un confronto tra l'incidenza delle lesioni nei segmenti coronarici del gruppo HF e del gruppo HHF. La grande maggioranza dei campioni coronarici del gruppo HHF (84%) mostra evidenze istologiche di aterosclerosi: dei 113 segmenti coronarici (su 135 esaminati) che presentano lesioni coronariche, circa un terzo (36 segmenti) presentano lesioni di tipo IV o di tipo V, mentre

gli altri due terzi (77 segmenti) presentano stadi più bassi di lesioni pre-aterosclerotiche come i segmenti del gruppo HF, in cui sono prevalenti le lesioni di tipo II.

	<b>HF</b> 7 casi		<b>HHF</b> 6 casi	
<b>N. segmenti</b>	92		135	
<b>N. segmenti con lesione</b>	34 (37%)		113 (84%) 36 (27%) ≥ Ateroma	
	<b>N.</b>	<b>%</b>	<b>N.</b>	<b>%</b>
<b>Tipo I</b>	8	23	18	16
<b>Tipo II</b>	20	59	45	40
<b>Tipo III</b>	6	18	14	12
<b>Tipo IV</b>	0	0	11	10
<b>Tipo Va</b>	0	0	14	12
<b>Tipo Vb</b>	0	0	11	10

*Tabella 6. Distribuzione di frequenza delle lesioni aterosclerotiche coronariche nei gruppi HF e HHF.*

La frequenza di distribuzione delle lesioni coronariche nei gruppi HF e HHF è illustrata graficamente in figura 27.

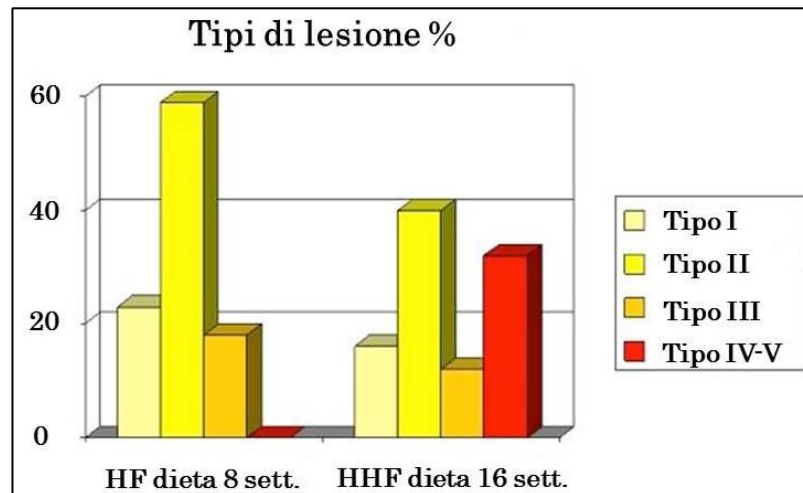


Figura 27. Distribuzione di frequenza delle lesioni coronariche aterosclerotiche indotte da dieta iperlipidica di 8 e 16 settimane.

Nel gruppo HF la porzione prossimale della coronaria destra (1 cm dall'origine) è il segmento più frequentemente affetto da lesioni aterosclerotiche precoci, mentre il segmento prossimale della discendente anteriore sinistra è quello maggiormente correlato alle lesioni di tipo proliferativo.

Nel gruppo HHF tutte le lesioni sono localizzate nella porzione prossimale delle tre principali arterie coronariche, con una prevalenza del primo segmento della RCA e della LMCA e i due terzi prossimali della LAD. Le lesioni più avanzate sono localizzate più distalmente nella LAD e nella LCX rispetto a quanto osservato nel gruppo HF (figura 28).

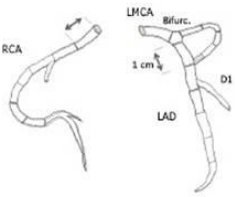
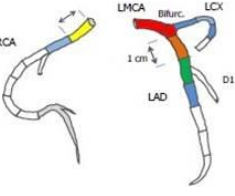
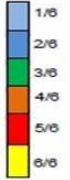
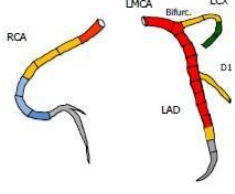

GRUPPO	LESIONE	TIPO DI LESIONE	INCIDENZA
CTR	nessuna		
HF	Tipo I-II-III		n. casi / n. tot 
HHF	Tutti i tipi di lesione I-Vb		n. casi / n. tot 

Figura 28. Incidenza e localizzazione delle lesioni nei segmenti coronarici nei tre gruppi di animali.

### IV.2.3. Istomorfometria

#### IV.2.3.1. Risultati generali coronarie

Per le analisi morfometriche sono stati misurati i seguenti parametri: lo spessore intimale (IT,  $\mu\text{m}$ ), il rapporto tra lo spessore dell'intima e quello della media (IMT ratio), il valore assoluto dell'area di lesione (LA,  $\text{mm}^2$ ) e il rapporto percentuale tra area di lesione e area totale di parete arteriosa all'interno della lamina elastica esterna (%LA).

Il trattamento con dieta ipercolesterolemica di due mesi (gruppo HF) induce alcune lesioni iniziali (prevalentemente fatty streaks), mentre la dieta di quattro mesi induce lo sviluppo di lesioni tre volte maggiori di cui il 30% almeno di tipo IV (figura 29).



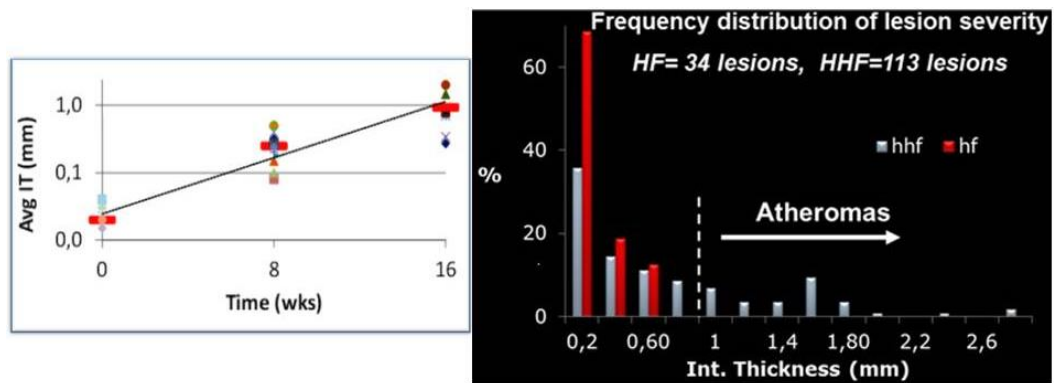


Figura 29. A sinistra è mostrata la correlazione fra valori medi di IT delle lesioni (in scala logaritmica) in ciascun caso dei 3 gruppi CTR (0 settimane di dieta aterogenica), HF (8 settimane di dieta aterogenica) e HHF (16 settimane di dieta aterogenica) e durata della dieta; il range fra i valori intragruppo è simile a quello fra le medie dei gruppi HF e HHF. A destra è mostrato un istogramma della distribuzione di frequenza dei valori medi di IT delle lesioni dei gruppi HF e HHF.

#### IV.2.2.2. Profiling intracoronarico degli indici istomorfometrici e dei componenti della lesione.

I parametri morfometrici sono stati utilizzati per la ricostruzione longitudinale dell'arteria discendente anteriore sinistra dall'origine (dalla biforcazione con la circonflessa) fino all'apice del ventricolo sinistro.

Nelle figure è mostrata la distribuzione longitudinale dell'area di lesione in un caso rappresentativo del gruppo HF (figura 30) e in un caso del gruppo HHF (figura 31): si conferma la maggior severità di lesioni nei tratti prossimali dell'arteria nel gruppo HF e nel gruppo HHF anche nelle porzioni più distali.

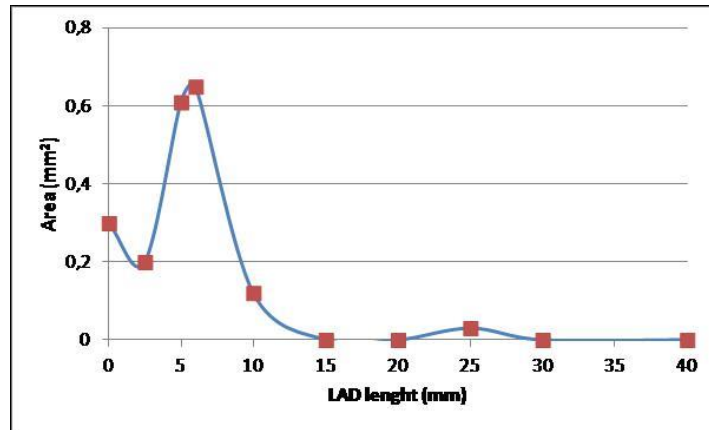


Figura 30. Profilo intracoronarico dell'area di lesione lungo la LAD di un caso del gruppo HF.

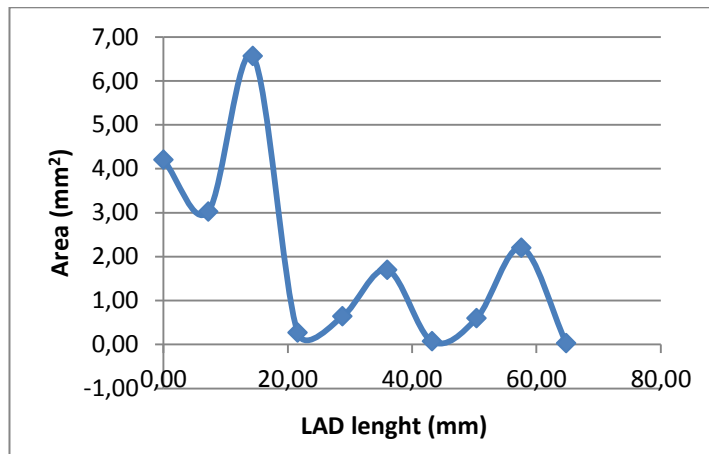


Figura 31. Profilo intracoronarico dell'area di lesione lungo la LAD di un caso del gruppo HHF.

Oltre ai dati istomorfometrici, sono stati raccolti anche i dati quantitativi dei componenti della lesione: collagene e lipidi. In figura 32 è mostrato il profiling intracoronarico dei componenti della lesione di un caso del gruppo HHF.

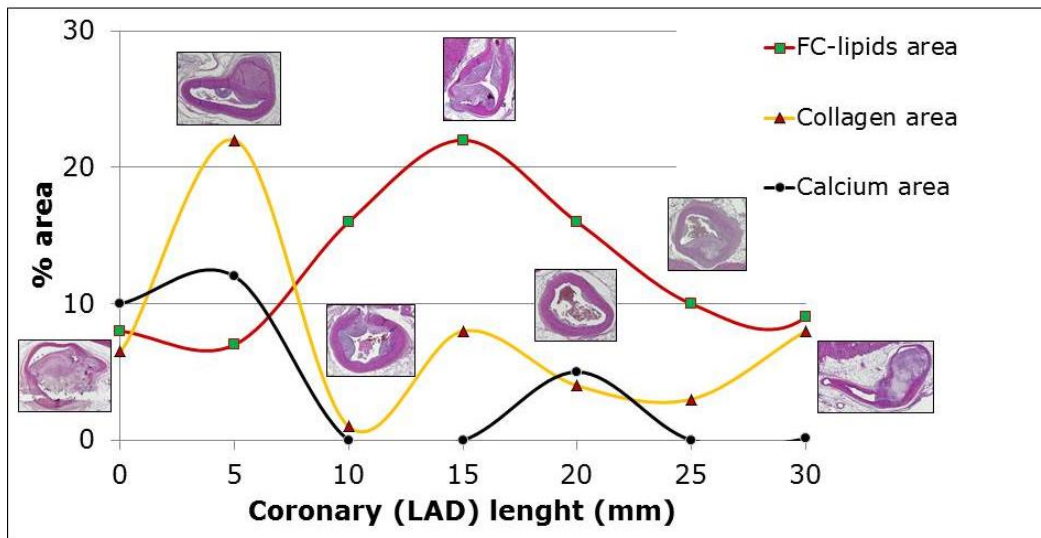


Figura 32. Profilo intracoronarico dell'area dei componenti della lesione lungo la LAD di un caso del gruppo HHF.

#### IV.2.3.3. Risultati generali arterie periferiche

Infine sono stati misurati i parametri istomorfometrici delle arterie periferiche nel gruppo HHF: in tabella 7 sono riportati lo spessore intimale e l'IMT ratio come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

	IT	IMT ratio
AORTA	0,39 $\pm$ 0,46	0,16 $\pm$ 0,14
CAROTIDE	0,14 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,15
FEMORALE	0,55 $\pm$ 0,53	0,57 $\pm$ 0,34

Tabella 7. Parametri istomorfometrici delle arterie periferiche del gruppo HHF; i valori sono espressi come media $\pm$ DS.

## IV.3. Immunoistochimica quantitativa

### IV.3.1. IHC – Markers cellulari ed infiammatori

#### IV.3.1.1. Risultati generali

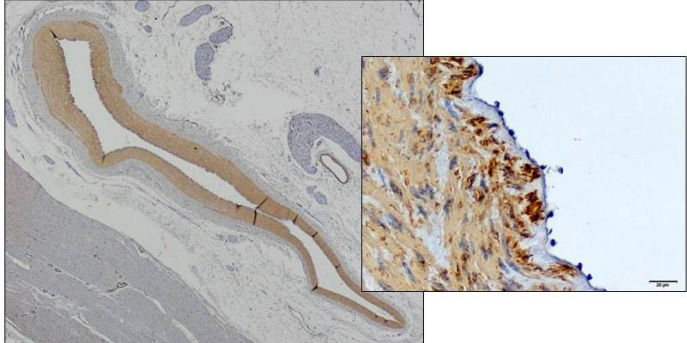
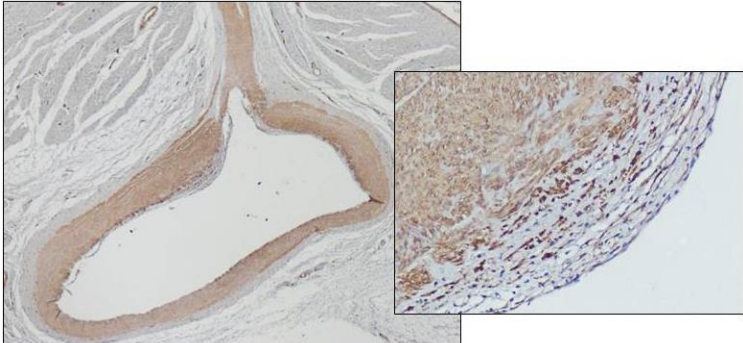
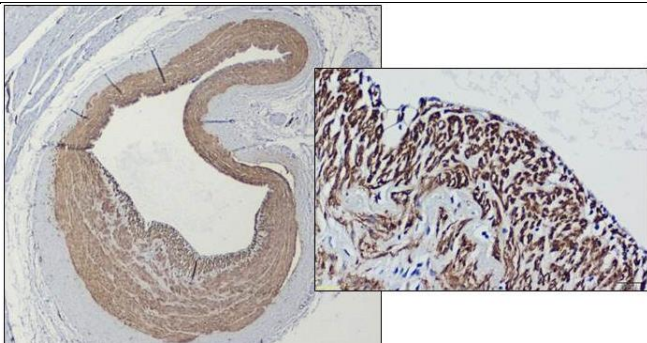
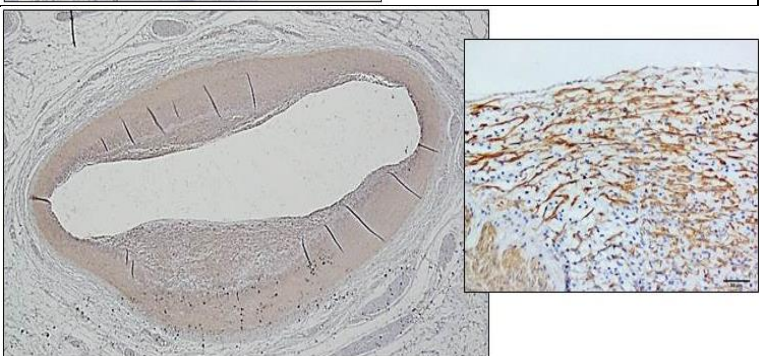
L'analisi immunoistochimica è stata condotta nei tre gruppi sperimentali utilizzando una serie di markers cellulari che sono riassunti in tabella 8. Per ciascun anticorpo è stata misurata l'area di positività all'interno delle lesioni in ogni caso.

	Normale	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo Va	Tipo Vb
alfaSMA	+	+	+	++	++	++	++
MAC 387	-	-	±	+	+	+	+
CD107a	-	±	+	++	++	+	+
MIF	-	±	+	++	++	+	+
CXCR4	-	±	+	++	++	+	+
SDF-1alfa	-	-	±	+	+	+	+
Ki67	-	-	+	++	++	++	++

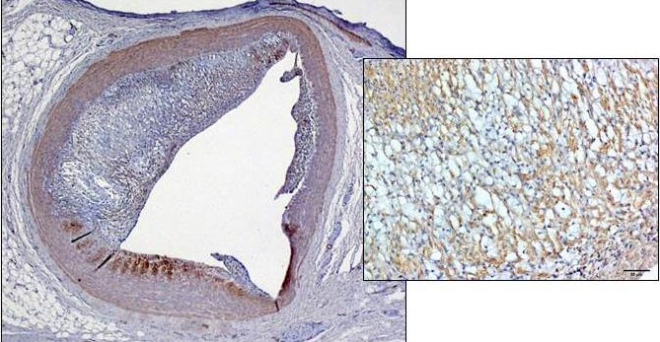
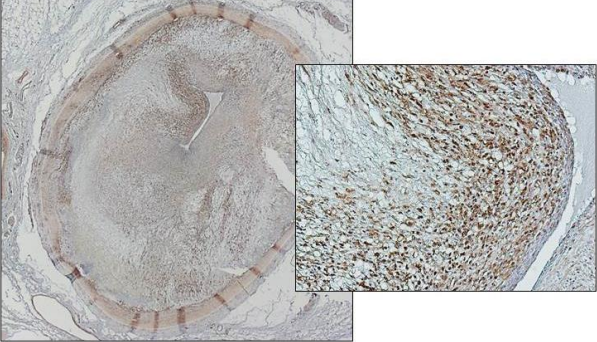
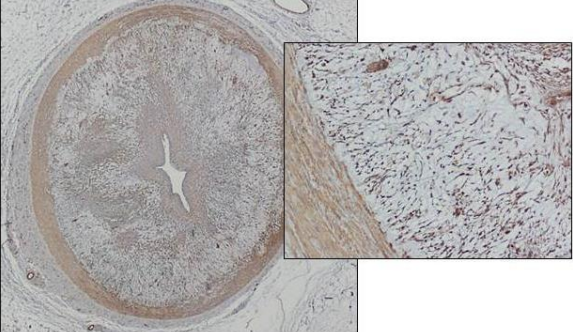
Tabella 8. Anticorpi utilizzati e la loro relativa espressione secondo uno score semiquantitativo nei gruppi CTR, HF e HHF.

L'actina muscolo liscio specifica (alfaSMA) è stata usata come marker cellulare delle cellule muscolari lisce, sia per il fenotipo contrattile che per quello sintetico. Cellule interne alla lesione positive per l'alfaSMA sono presenti in tutti i tipi di lesione nel gruppo HF e nel gruppo HHF nonché, sebbene in misura minore, nell'intima intatta degli animali del gruppo CTR. L'alfaSMA risulta positiva anche nelle foam cells derivate dalle cellule muscolari lisce.

La tabella 9 mostra i risultati qualitativi dell'analisi immunoistochimica per l'alfaSMA nei diversi tipi di lesione.

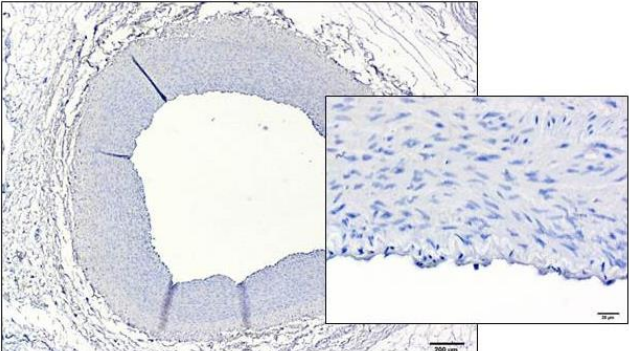
<p>Normale</p>	
<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	

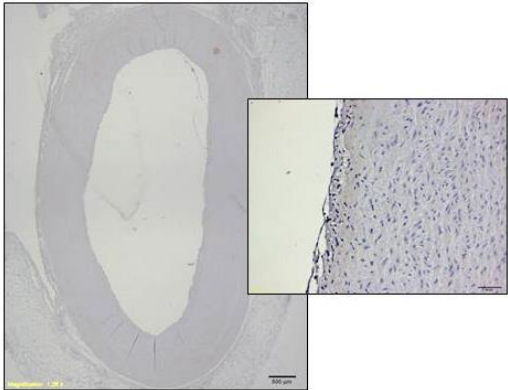
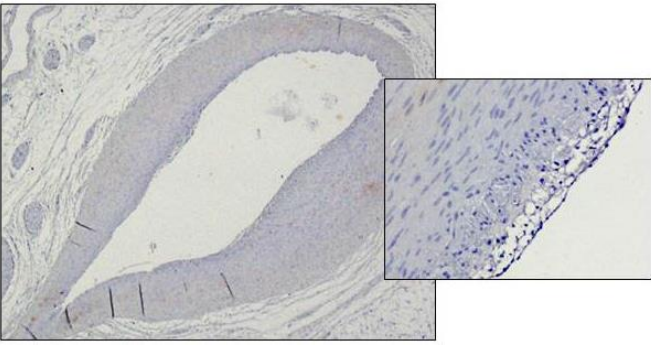
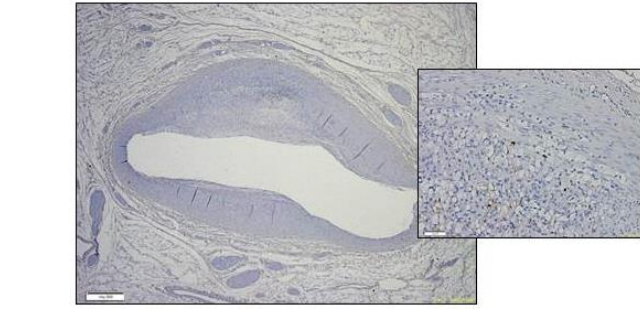
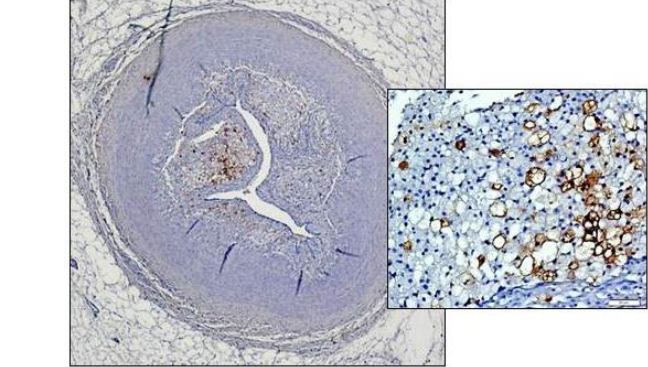


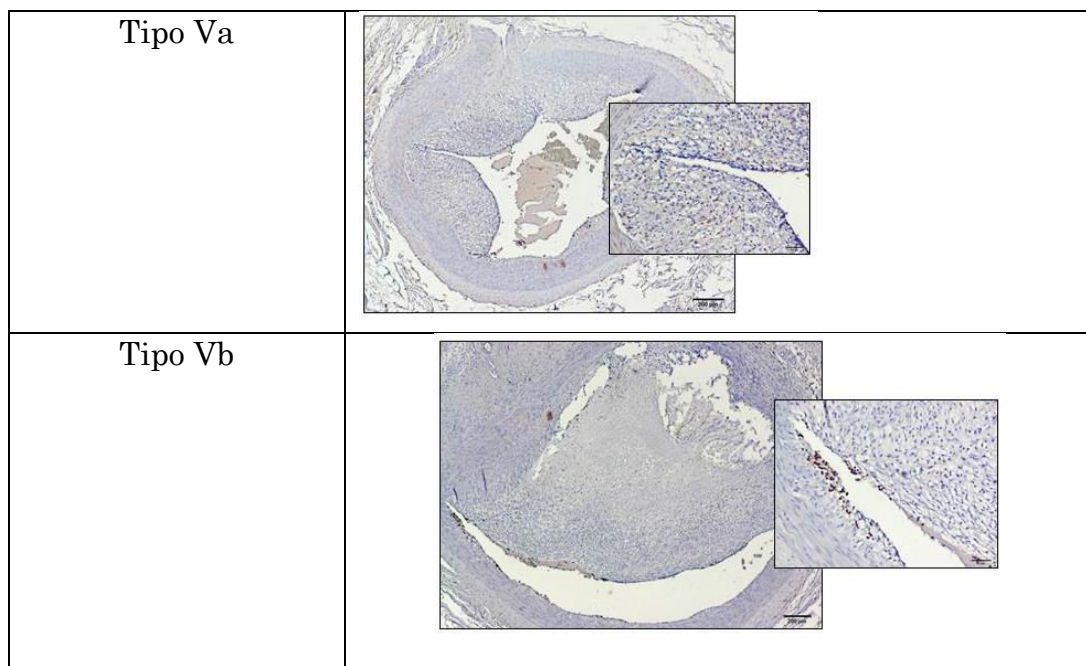
Tipo IV	
Tipo Va	
Tipo Vb	

*Tabella 9. Risultati immunoistochimici per l'alfaSMA, marker delle cellule muscolari lisce.*

Il MAC-387 è stato usato come marker della membrana cellulare dei monociti-macrofagi. Risulta positivo nei macrofagi non modificati in foam cells e in alcune foam cells di origine macrofagica nel gruppo HF e HHF con la massima positività nella lesione di tipo IV (tabella 10).

Normale	
---------	--------------------------------------------------------------------------------------

<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	
<p>Tipo IV</p>	

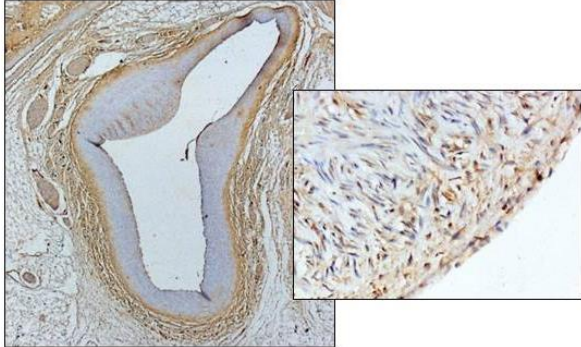
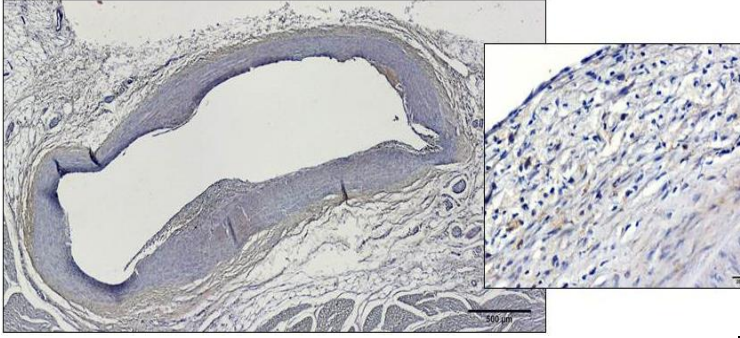
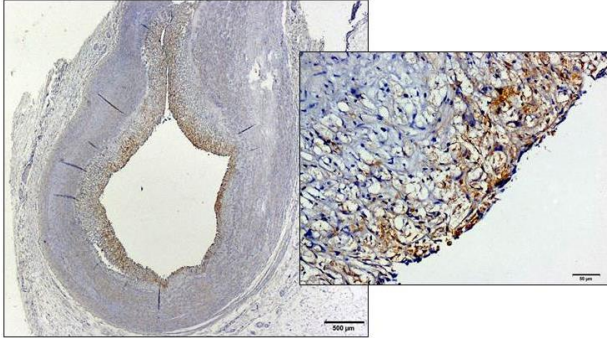
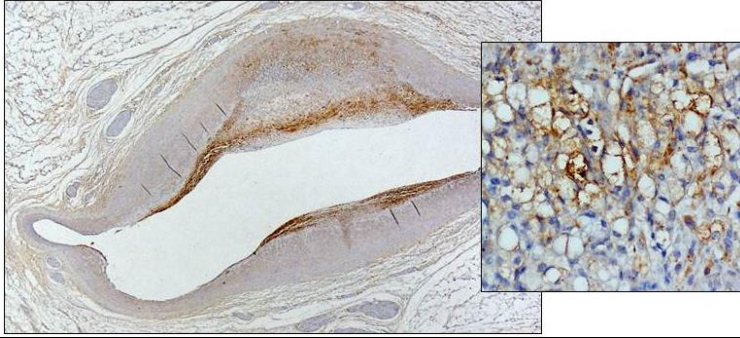
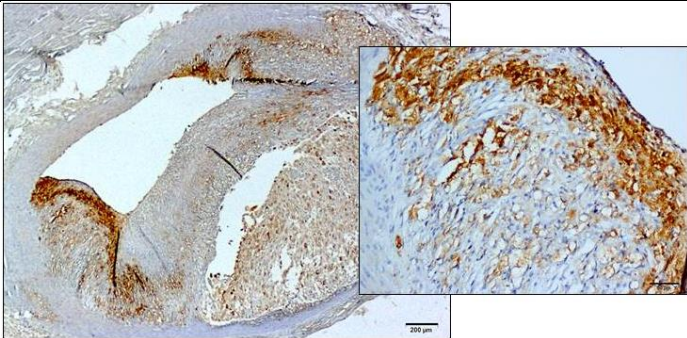


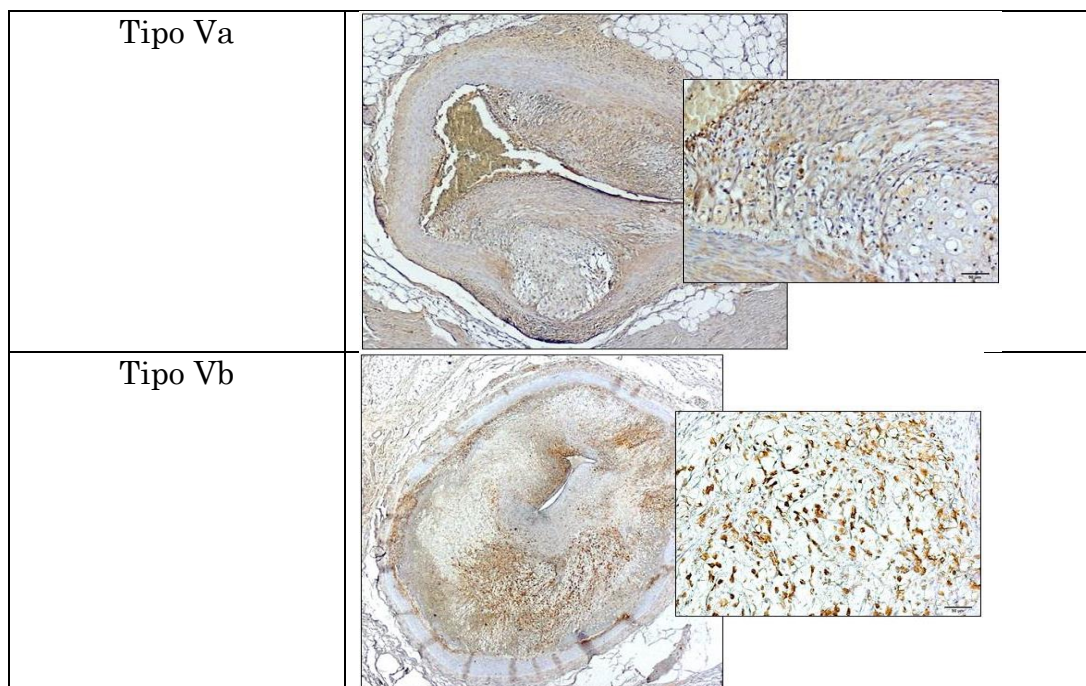
*Tabella 10. Analisi immunoistochimica per il MAC-387 nei vari tipi di lesione.*

Il CD107a è stato usato come marker della LAMP-1 (proteina lisosomiale di membrana), come indice dell'attività di degranolazione delle vescicole lisosomiali delle cellule infiammatorie all'interno della lesione. L'overespressione della LAMP-1 si è dimostrata parallela al rilascio di diversi enzimi lisosomiali e può essere considerato un marker dello stato infiammatorio fagocitico della parete vascolare (Bao et al., 2010; Thomas et al., 2010).

Una forte positività per la LAMP-1 è presente sia nelle cellule infiammatorie e nelle foam cells, sia nei macrofagi e nelle cellule muscolari lisce in tutti i tipi di lesione (tabella 11). Una debole positività è presente anche nelle cellule endoteliali in alcuni tratti coronarici intatti.



<p>Normale</p>	
<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	
<p>Tipo IV</p>	



*Tabella 11. Risultati immunoistochimici per il CD107a nei diversi tipi di lesione.*

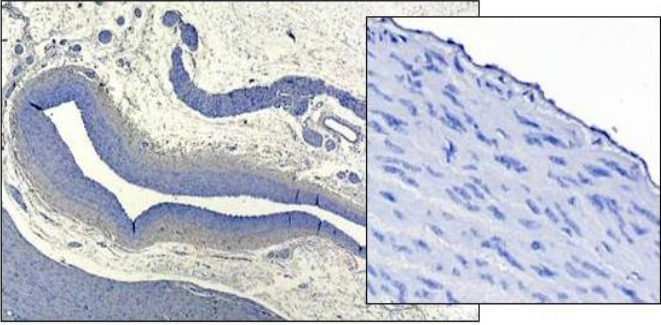
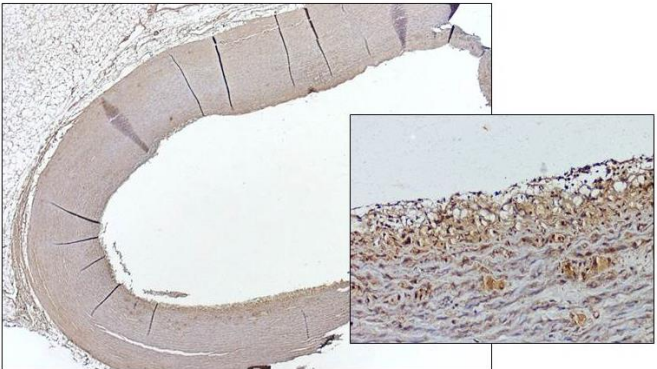
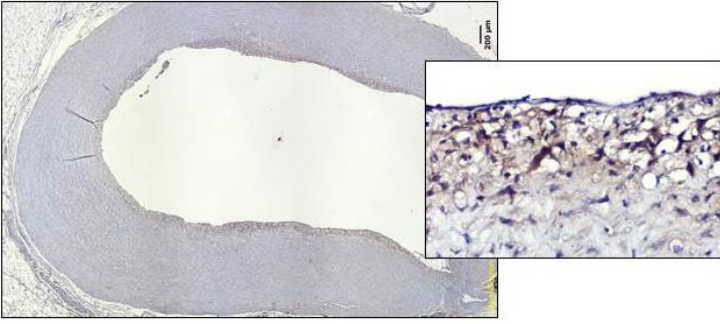
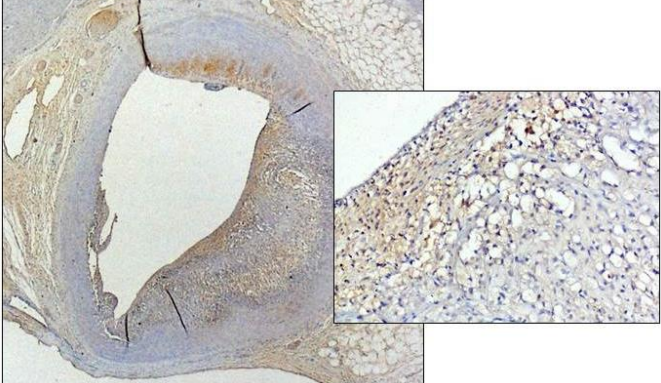
Per studiare lo stato infiammatorio della lesione abbiamo usato anche altri tre anticorpi correlati tra di loro: il MIF (fattore di inibizione della migrazione dei macrofagi), il suo recettore CXCR4 ed il ligando specifico di CXCR4, l'SDF-1alfa (fattore 1 di derivazione stromale).

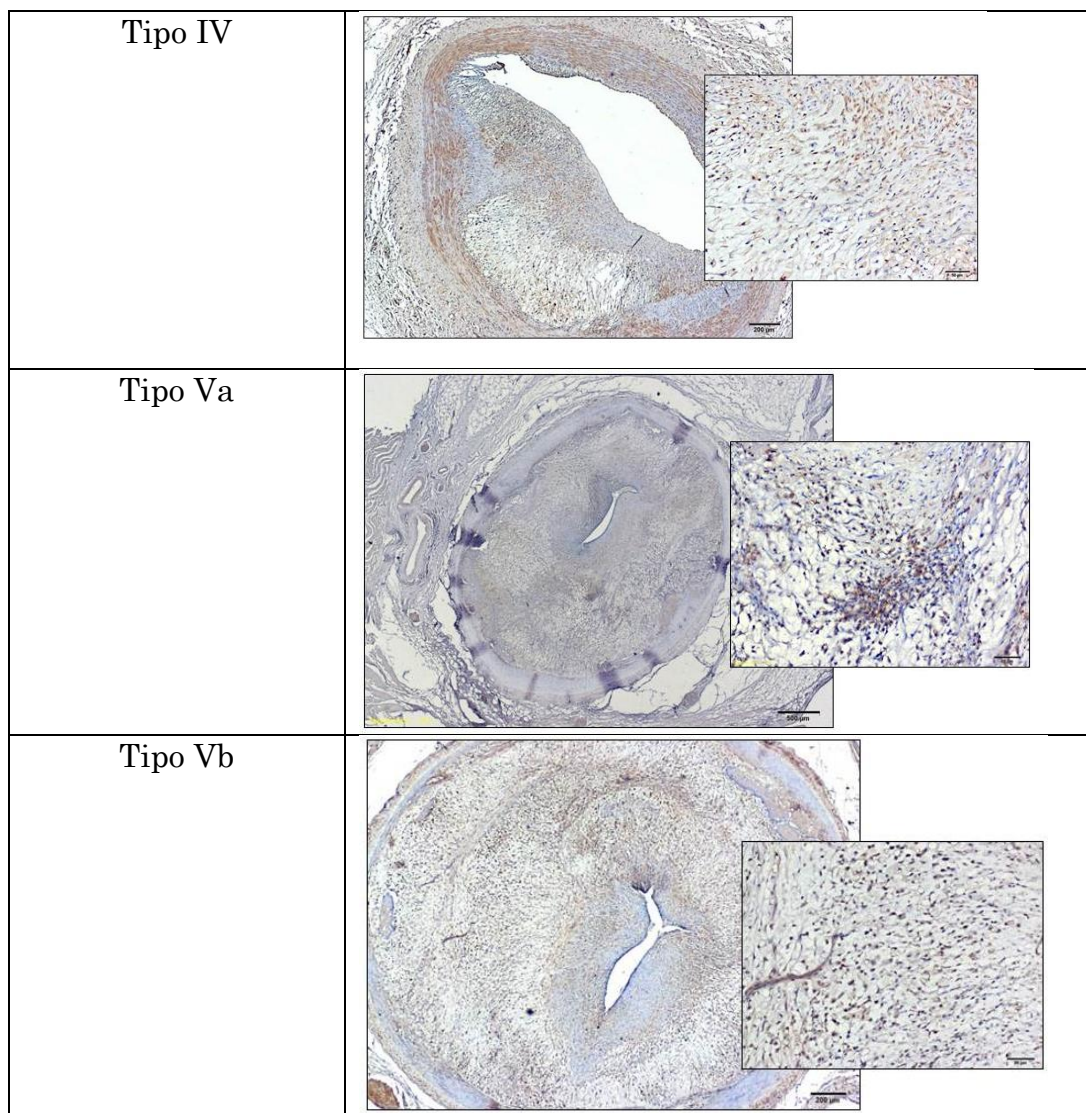
MIF è risultato un fattore chiave nei processi vascolari che danno luogo all'aterosclerosi; diversi fattori proaterogenici, come le oxLDL, possono indurre l'espressione di MIF in diversi tipi cellulari.

La positività per il MIF è forte nelle cellule endoteliali e nelle foam cells in tutti i tipi di lesione (tabella 12).

La funzione proinfiammatoria di MIF è ben definita nelle placche di tipo avanzato: può essere considerato come uno specifico marcatore di instabilità della placca.



<p>Normale</p>	
<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	

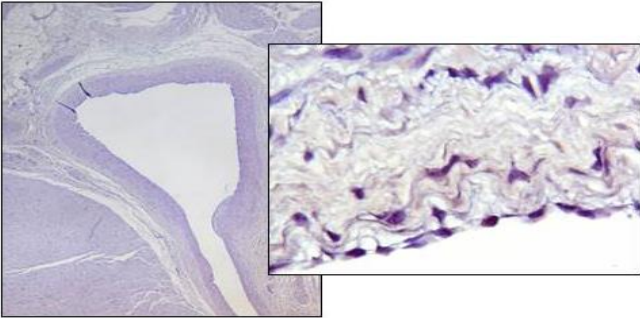
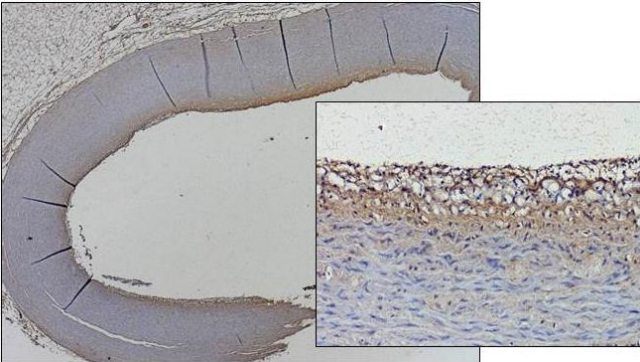
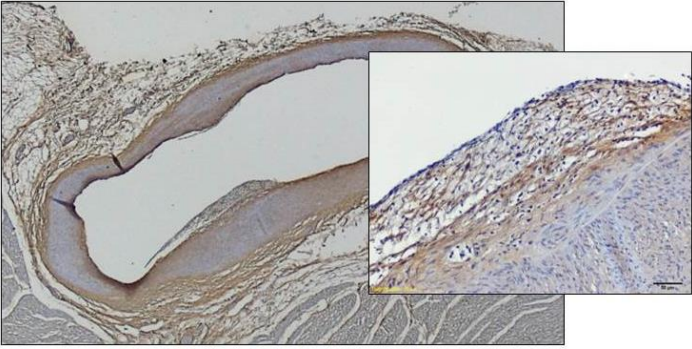
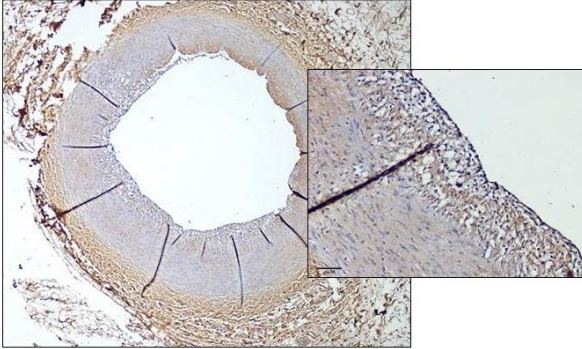


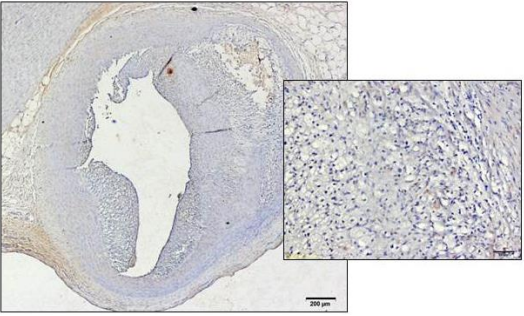
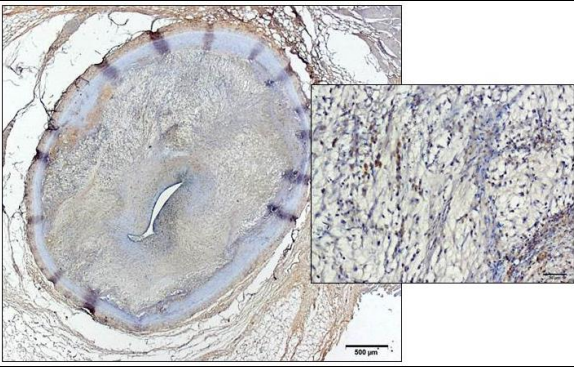
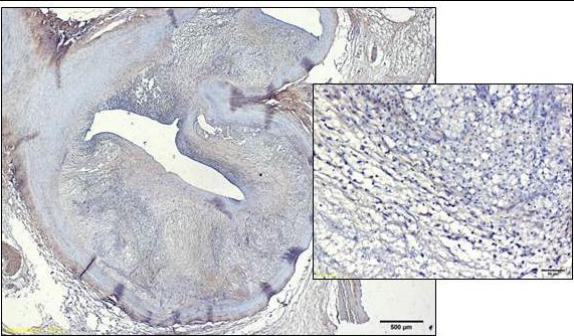
*Tabella 12. Analisi immunoistochimica per il MIF nei vari tipi di lesione.*

La positività del recettore CXCR4, sebbene meno intensa, è risultata parallela a quella del MIF nei vari tipi di lesione (tabella 13).

Quando la lesione si è formata, ma anche in stadi precoci, vi è evidenza immunoistochimica di una positività diffusa per il recettore CXCR4 su cellule infiammatorie come foam cells e cellule muscolari lisce. Questo può essere interpretato come una risposta al maggior rilascio di mediatori infiammatori come MIF e SDF-1alfa che favoriscono l'adesione, la migrazione e il trasporto cellulare.



<p>Normale</p>	
<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	

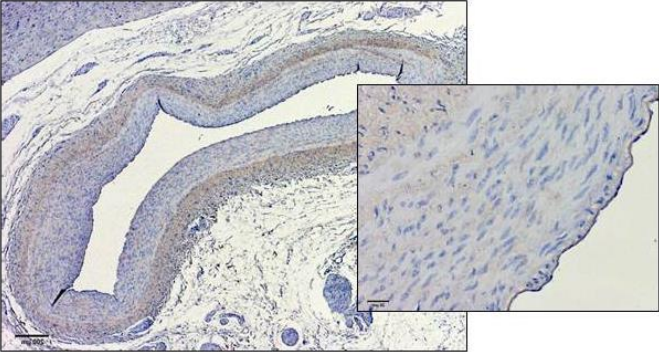
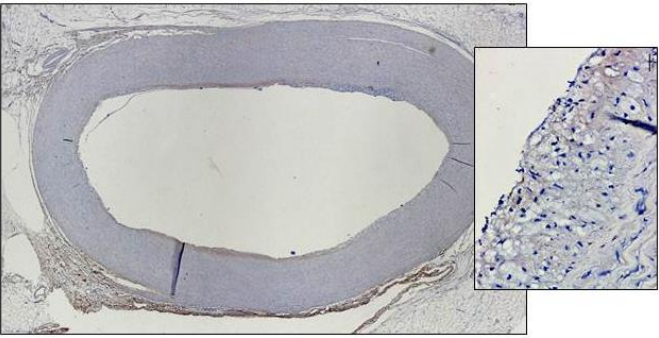
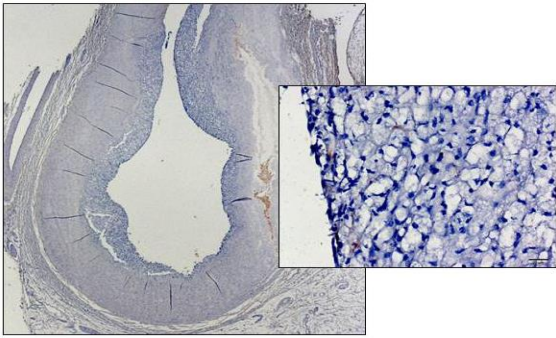
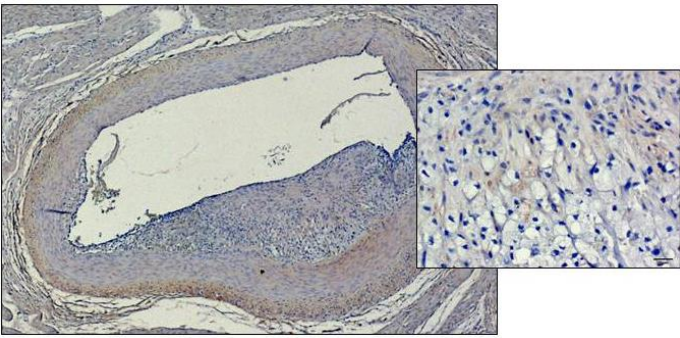
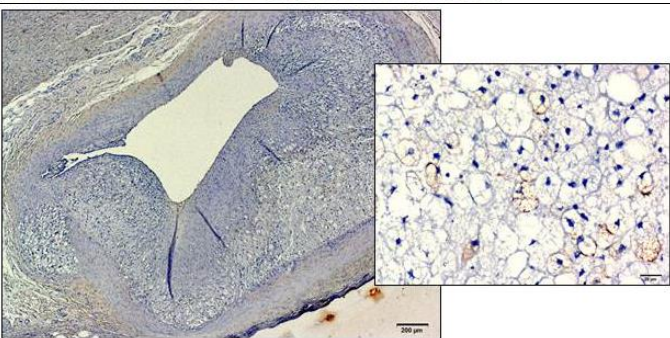
<p>Tipo IV</p>	
<p>Tipo Va</p>	
<p>Tipo Vb</p>	

*Tabella 13. Positività immunoistochimica per il CXCR4 nei vari tipi di lesione.*

SDF-1alfa (fattore 1 derivato dalle cellule stromali) ha un ruolo essenziale nell'emopoiesi, nella mobilitazione delle cellule staminali, nello sviluppo degli organi e nell'angiogenesi.

Sebbene la sua maggiore espressione sia presente nelle lesioni di tipo avanzato, è rilevabile anche nelle lesioni pre-aterosclerotiche precoci (tabella 14).



<p>Normale</p>	
<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	
<p>Tipo IV</p>	

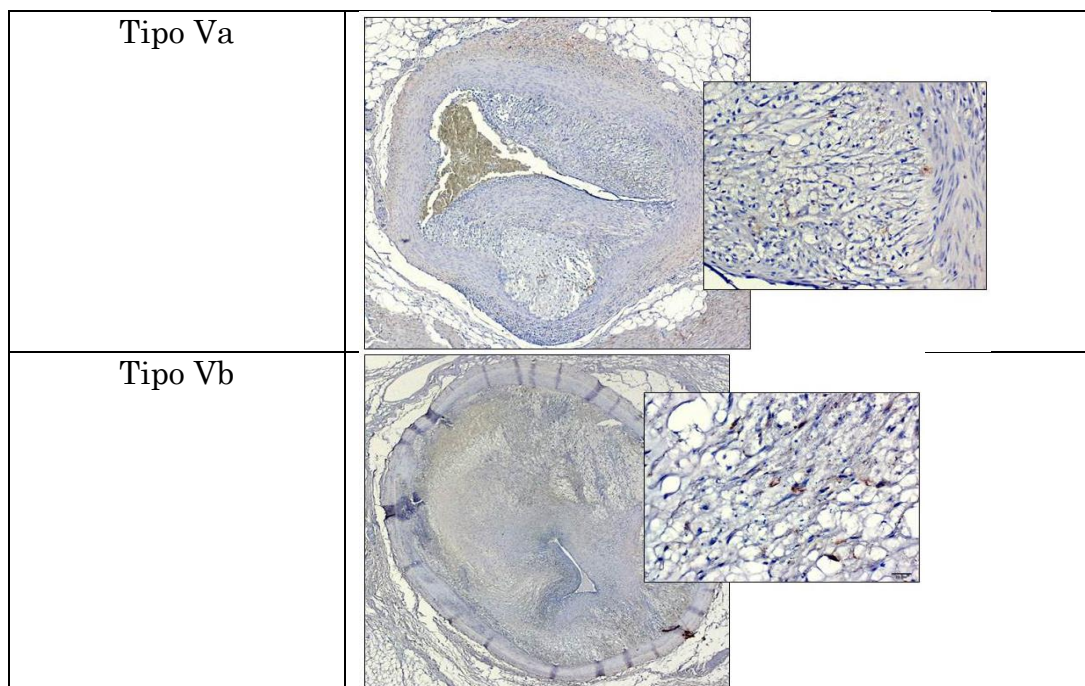


Tabella 14. Immunoistochimica dell'SDF-1alfa nei vari tipi di lesione.

I risultati quantitativi delle analisi immunoistochimiche sono riassunti in tabella 15 dove la positività per i diversi markers cellulari e infiammatori è espressa come percentuale di area positiva sull'area totale di lesione. In tabella sono riportate anche le concentrazioni dei lipidi nelle varie tipologie di lesioni.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo Va	Tipo Vb
Anticorpo	% Area di lesione					
<b>alfaSMA</b>	19±2	16±5	20±7	24±3	24±3	25±5
<b>MAC 387</b>	-	-	0,4±0,01	0,6±0,2	0,3±0,1	0,2±0,01
<b>CD107a</b>	18±5	14±5	18±5,2	11,3±7,9	11,8±1,3	10,2±5,1
<b>MIF</b>	6±2	11±5	5±1,5	2,4±1,5	3±1,5	3,5±1,5
<b>CXCR4</b>	3±2	7±4	3±1	1±0,5	0,8±0,4	0,7±0,3
<b>SDF-1alfa</b>	1±0,4	1,3±1	1±0,4	1,2±0,1	1,1±0,1	2,1±0,4
<b>FC-Lipidi</b>	14±7	20±7	16±5	14±3	15±2	8±3

Tabella 15. Composizione cellulare e markers infiammatori nei diversi tipi di lesione nel gruppo HF e HHF, espressi come positività percentuale dell'area totale di lesione. I dati sono espressi come media ± DS. MAC-387 nelle lesioni di tipo IV aumenta la sua espressione in modo significativo rispetto alle altre lesioni. L'espressione di MIF e quella di CXCR4 aumentano in modo significativo nella lesione di tipo II rispetto agli altri tipi di lesione. Diminuisce invece in modo significativo la quantità di FC-lipidi nelle lesioni di tipo Vb (fibrocalcifiche) rispetto alle altre lesioni.



#### IV.3.1.2. Profiling intracoronarico dei markers cellulari e infiammatori

In figura 33 è mostrato un esempio di profiling intracoronarico della discendente anteriore in un caso del gruppo HHF che mette in evidenza la correlazione tra i marker cellulari (MAC-387) e infiammatori (MIF e CXCR4).

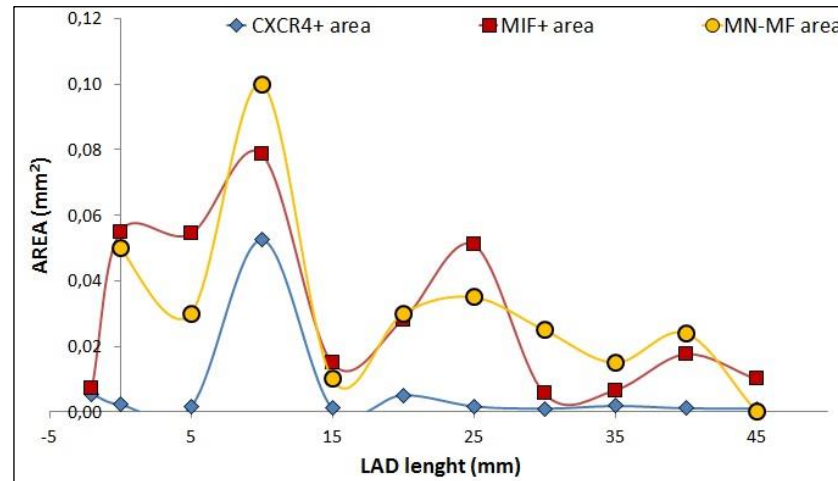
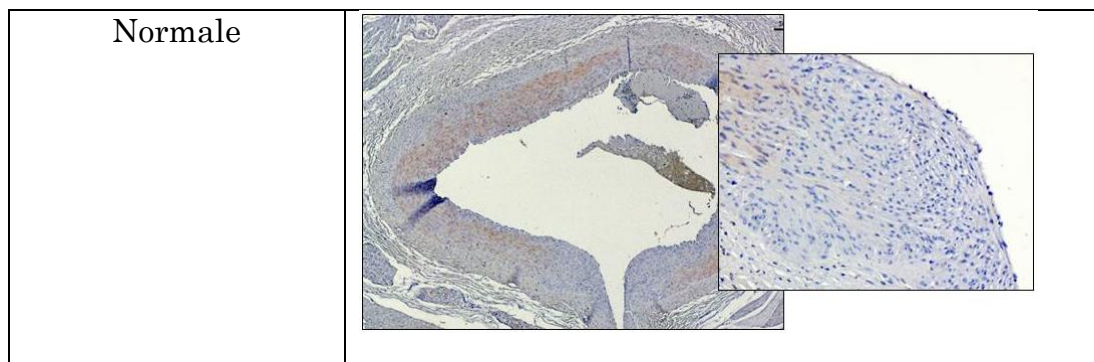
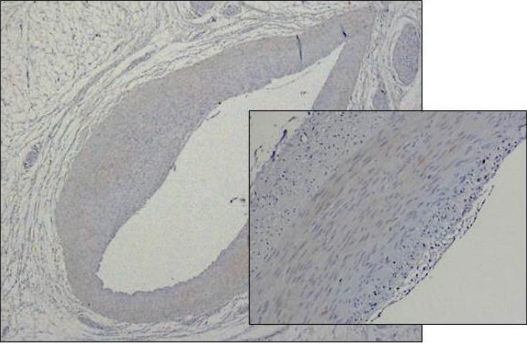
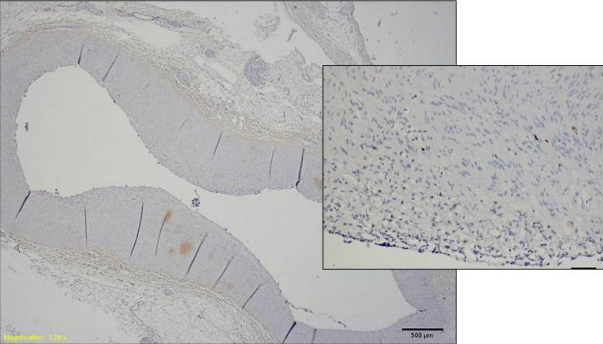
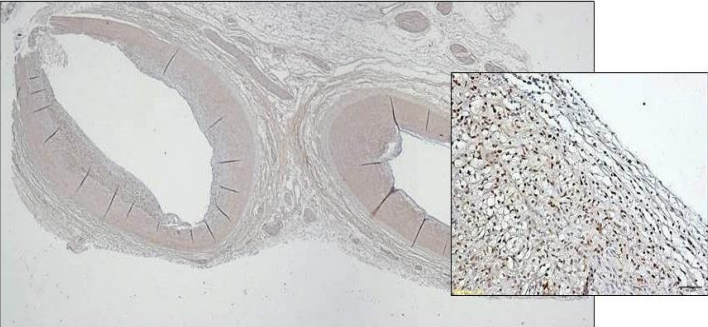
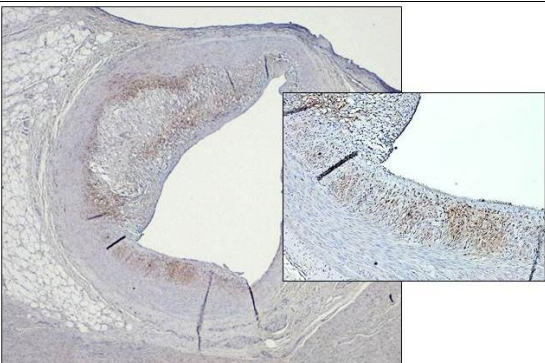
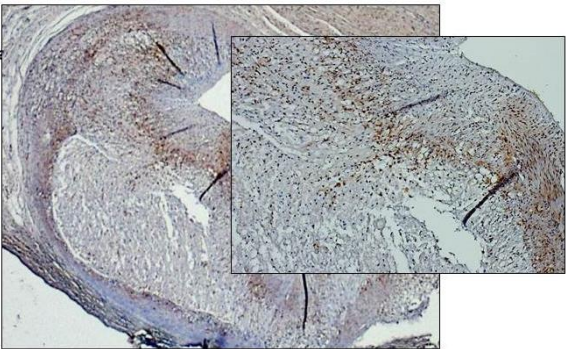


Figura 33. Profiling intracoronarico della positività percentuale dei vari markers infiammatori nella LAD di un caso del gruppo HHF per MAC-387, MIF e CXCR4.

#### IV.3.2. IHC – Markers di proliferazione

Il Ki-67 è stato utilizzato come marker di proliferazione cellulare (tabella 16): è una proteina nucleare espressa dalle cellule in stato replicativo, marcatamente presente nelle lesioni di tipo più avanzato (proliferazione delle cellule muscolari lisce).



<p>Tipo I</p>	
<p>Tipo II</p>	
<p>Tipo III</p>	
<p>Tipo IV</p>	
<p>Tipo Va</p>	

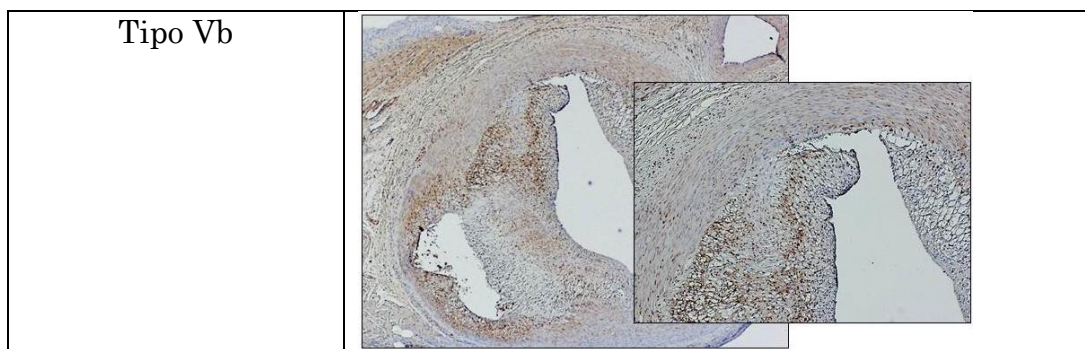


Tabella 16. Analisi immunoistochimica per il marker di proliferazione Ki-67 nei vari tipi di lesione.

In tabella 16 sono riportati i risultati quantitativi dell'analisi immunoistochimica per il Ki-67, espressi come percentuale di area positiva dell'area totale di lesione.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo Va	Tipo Vb
Anticorpo	% Area di lesione					
<b>Ki-67</b>	-	2,7±1,2	6,6±2,4	13±2,9	12,8±3,8	10,9±2,5

Tabella 17. Risultati immunoistochimici per il marker di proliferazione Ki-67. I dati sono espressi come media±DS. L'espressione di Ki-67 nelle lesioni avanzate (IV-Vb) aumenta in modo significativo rispetto alle lesioni di tipo II; le lesioni di tipo III mostrano valori intermedi.



## IV.4. Colocalizzazioni e correlazioni

### IV.4.1. Colocalizzazioni

L'approccio immunohistochimico su sezioni consecutive seriate ha permesso di determinare la colocalizzazione di diversi anticorpi sullo stesso tipo cellulare.

Nelle figure è mostrata la colocalizzazione degli anticorpi MIF, SDF-1 e CXCR4 in un caso tipico del gruppo HHF (figura 34).

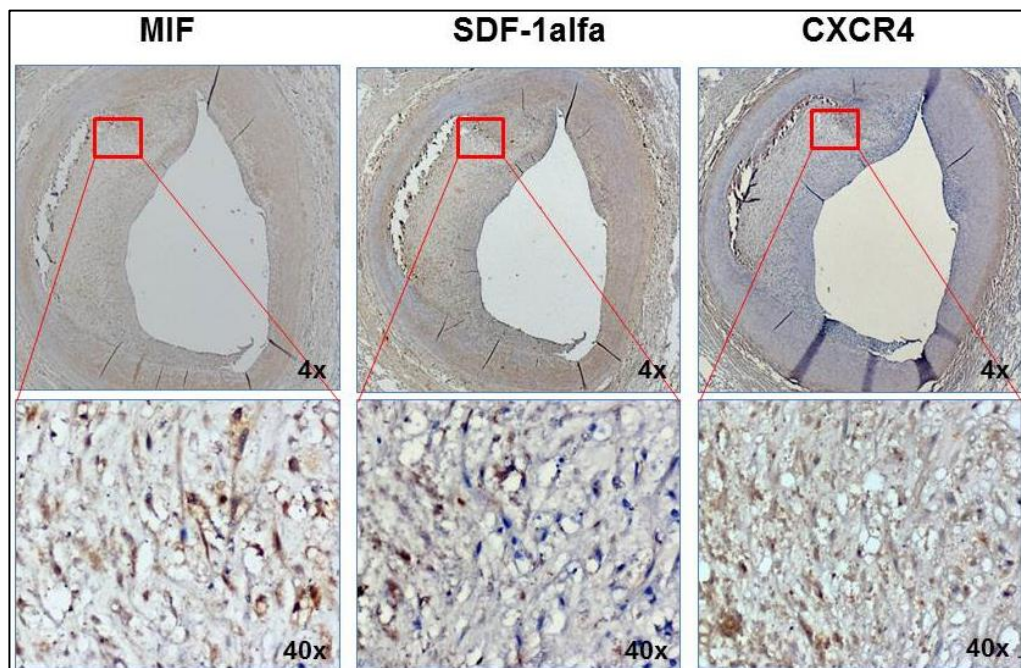


Figura 34. Colocalizzazione dei markers infiammatori MIF, SDF-1alfa e CXCR4 su sezioni seriate consecutive di un caso del gruppo HHF.

Questo tipo di approccio è utile per caratterizzare lo stato evolutivo di una lesione e per accertare che i marcatori di chemiotassi come MIF e CXCR4 presenti nelle cellule all'interno della lesioni siano attivi nel promuovere la crescita della placca, in quanto associati sia a marcatori di infiammazione che di proliferazione cellulare all'interno degli stessi tipi cellulari in cui sono espressi. In figura 35 è mostrato un esempio di cellule di fenotipo macrofagico (MAC-387 positive) alfaSMA negative a

carattere proliferativo (Ki67 +) all'interno della lesione che esprimono sia adesione cellulare (MIF +) che infiammazione (LAMP-1 +).

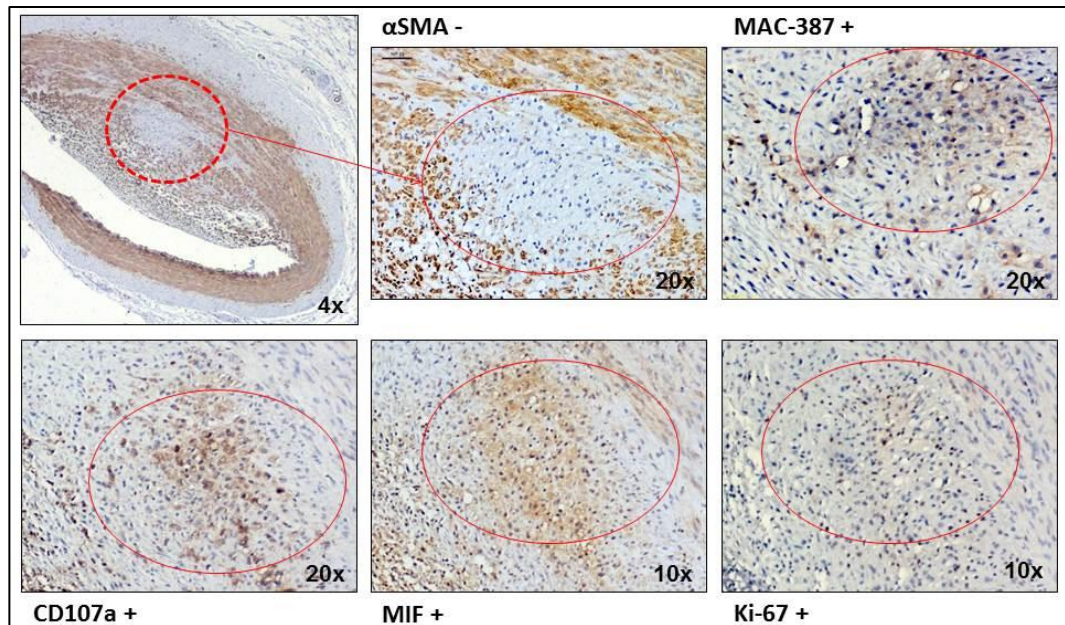
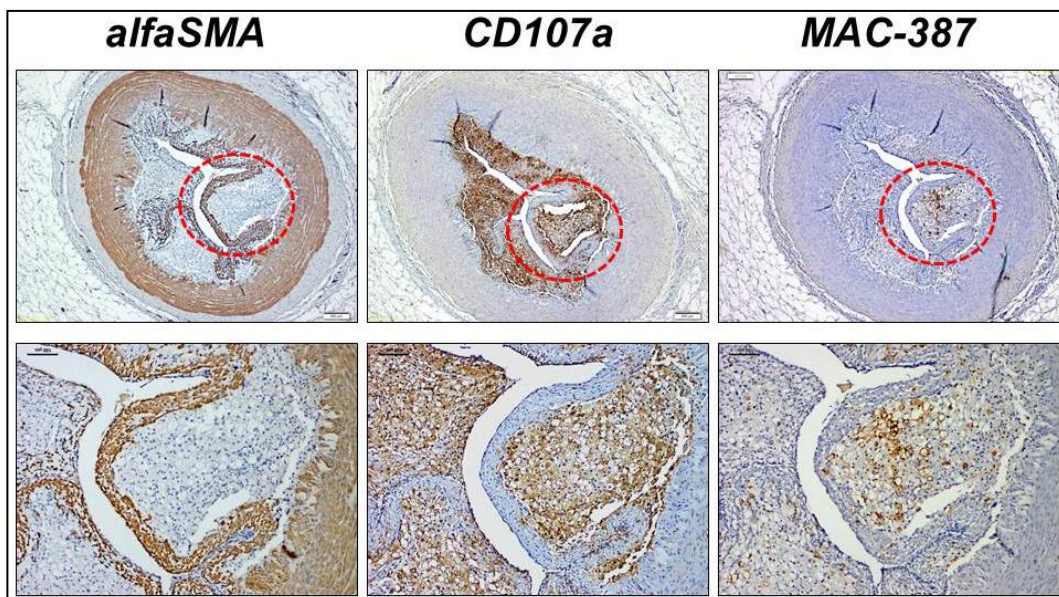


Figura 35. Proliferazione, chemiotassi e infiammazione: colocalizzazione di Ki67, MIF, CD107a e MAC-387 in cellule alfaSMA negative in un preateroma del gruppo HF.

Un altro esempio di colocalizzazione è mostrato in figura 36: è un ateroma di un caso del gruppo HHF in cui è ben visibile il cappuccio fibroso ricco in cellule muscolari lisce positivo solo all'alfaSMA, con le cellule interne alla lesione ad intensa attività infiammatoria, con una forte positività per il CD107a, molto meno intensa per il MAC-387 e negativa per l'alfaSMA.

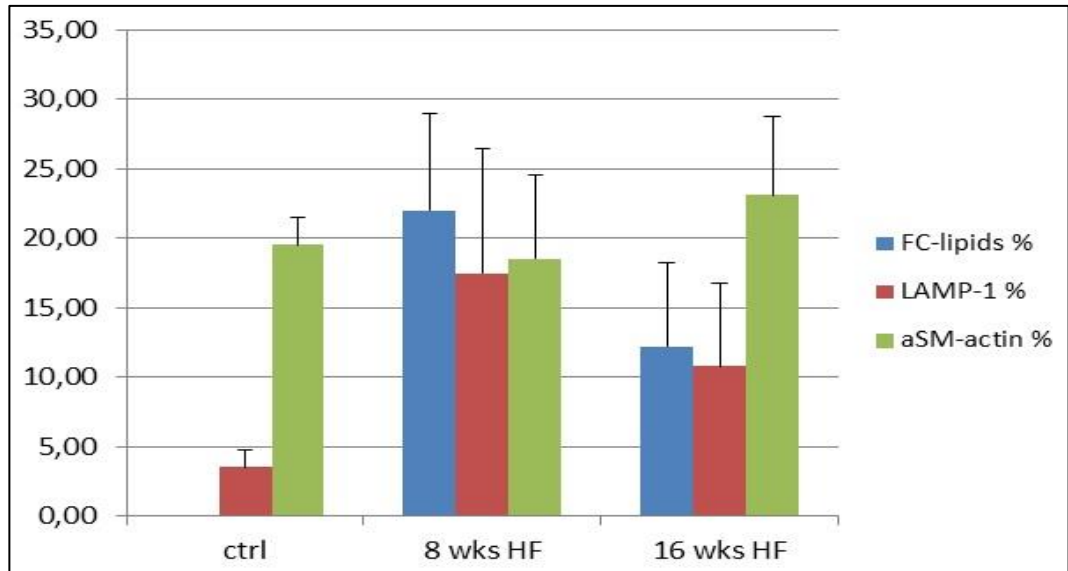


*Figura 36. Colocalizzazione di alfaSMA, CD107a e MAC-387 su sezioni seriate consecutive in un ateroma del gruppo HHF.*

#### **IV.4.1. Correlazione tra severità delle lesioni e composizione cellulare**

Nelle fasi iniziali di aterogenesi (nel gruppo HF) si evidenzia una correlazione diretta tra il contenuto relativo di foam cells e la dimensione della lesione. Nelle fasi più avanzate (gruppo HHF) invece il contenuto di cellule muscolari lisce gioca un ruolo maggiore rispetto alla componente lipidica nel contributo alla crescita complessiva del volume della placca, come evidenziato dalla forte relazione tra positività per l'alfaSMA e l'area totale di lesione (figura 37).





*Figura 37. Composizione cellulare prevalente nei tre gruppi sperimentali. Le espressioni della LAMP-1 e della componente lipidica mostrano un aumento significativo tra il gruppo di animali trattati con dieta standard e gli animali trattati con dieta iperlipidica. Tra i gruppi trattati con dieta aterogenica, il contenuto di FC-lipidi diminuisce in modo significativo nel gruppo HHF rispetto al gruppo HF.*

Il contributo prevalente delle foam cells alla crescita della lesione durante il processo di iniziazione di aterosclerosi è evidenziato in figura 38 dalla relazione diretta tra dimensione della lesione e contenuto percentuale di foam cells, rispetto alla relazione inversa tra la dimensione della lesione e la concentrazione relativa di cellule muscolari lisce.

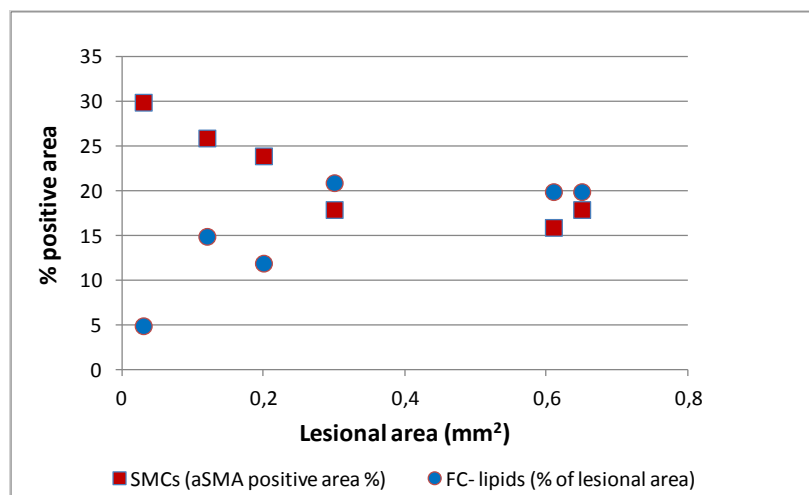


Figura 38. Concentrazioni relative di foam cells e cellule muscolari lisce di diverse lesioni all'interno di uno stesso caso del gruppo HF.

## V. Discussione e Conclusioni

### 1. Modello sperimentale di aterogenesi accelerata da dieta nel maiale.

Il primo obiettivo di questo progetto di tesi era ottenere un modello sperimentale di aterosclerosi nei suini mediante dieta iperlipidica ed ipercolesterolemica. La dieta iperlipidica arricchita di colesterolo (e sodio-colato per favorirne l'assorbimento), ha permesso di ottenere dopo poco più di 2 mesi (10 settimane) lesioni pre-aterosclerotiche dell'intima in circa un terzo dei segmenti delle arterie coronariche esaminate ma in nessuno di quelli delle arterie carotidi, femorali e dell'aorta; dopo 4 mesi (17 settimane) invece lesioni preaterosclerotiche ma anche francamente aterosclerotiche (comparabili a quelle descritte come tipo IV e V di Stary in patologia umana, nel 30% dei segmenti) si sono sviluppate in più dei 2/3 dei segmenti coronarici esaminati, mentre nel 50% delle femorali, nella maggior parte delle carotidi e in 2/3 delle aorte campionate sono presenti lesioni meno avanzate.

E' quindi possibile concludere che:



a) L'induzione del diabete mediante somministrazione di streptozotomicina utilizzata dalla maggior parte degli studi che induce una marcata risposta infiammatoria sistemica vascolare non è necessaria per stimolare l'aterogenesi nei suini e per produrre lesioni ateromatose e placche fibrocalcifiche rilevabili istopatologicamente nelle arterie coronariche simili a quelle descritte in patologia umana.

b) La bassa incidenza di lesioni avanzate in tutte le arterie periferiche e nell'aorta, così come l'incidenza e la localizzazione delle lesioni coronariche nel gruppo HHF è in accordo con le osservazioni di Mohler et al. (Mohler et al., 2008).

c) La localizzazione delle lesioni coronariche nel nostro modello suino è simile a quella delle lesioni avanzate e complicate (fibroateroma a cappuccio sottile e rottura di placca) osservate in studi autoptici di cuori umani, in cui le lesioni sono raggruppate nella porzione prossimale delle arterie principali (nella discendente anteriore sinistra e nella circonflessa sinistra, il 50% entro i primi 22 mm e il 90% entro i primi 33 mm; nell'arteria coronaria destra, il 50% all'interno dei primi 31 mm) (Giannoglou et al., 2008).

## **2. Risultati istomorfometrici e immunoistochimici**

Il secondo obiettivo di questa tesi era valutare, attraverso l'analisi morfometrica ed immunoistochimica delle alterazioni coronariche, il grado di espressione di alcuni markers di infiammazione e proliferazione cellulare associata ai diversi stadi evolutivi e alla severità delle lesioni.

L'analisi istomorfometrica dettagliata delle arterie coronariche, con la ricostruzione del profilo intimale dei vari indici morfometrici di ogni singola arteria come valutazione più accurata della diffusione della patologia aterosclerotica, ha permesso di evidenziare una elevata variabilità fra i vari casi dei gruppi trattati del grado e della severità

delle lesioni, fino a 5 volte all'interno dello stesso gruppo ad esempio per l'indice spessore intimale (IT): questa variabilità è verosimilmente dovuta al bilancio fra fattori pro- e anti-aterogenici sistemici e locali che possono essere molto diversi prima e durante il periodo di dieta nel singolo caso; una maggiore risposta infiammatoria sistemica è probabilmente alla base della maggiore suscettibilità all'aterogenesi da dieta ipercolesterolemica nei casi con patologia più severa.

L'analisi immunohistochimica ha portato alle seguenti osservazioni:

1. Il principale determinante cellulare di crescita della placca e il maggior componente cellulare del volume totale delle lesioni del gruppo HHF è il contenuto intralesionale di cellule muscolari lisce, in contrasto con gli stadi precoci delle patologie arteriose coronariche in cui il contenuto di foam cells contribuisce in modo determinante alla formazione e alla grandezza delle lesioni.
2. L'infiltrato cellulare infiammatorio non è direttamente correlato alla grandezza della lesione ma piuttosto al suo stadio evolutivo, essendo molto più marcato nel preateroma e nell'ateroma (lesioni di tipo III e di tipo IV); comunque, anche in queste lesioni di tipo più avanzato, il contributo delle cellule infiammatorie di derivazione ematica è inferiore all'1% del volume totale della lesione.
3. Esiste una relazione diretta tra l'espressione monocitaria di CXCR4 e la severità della placca coronarica, confermando l'ipotesi che, sebbene pochi monociti siano stati identificati all'interno delle placche di tipo più avanzato, la risposta sistemica dei monociti ematici è in grado di influenzare il rimodellamento della placca.
4. La neoangiogenesi intraplacca è una caratteristica costante delle placche più avanzate, mostrando una intensa positività per MIF

e CXCR4 delle cellule endoteliali e dei periciti dei microvasi di nuova formazione.

Rispetto alle alterazioni coronariche osservate da Chatzizisis et al. (Chatzizisis et al., 2008) in seguito a dieta ipercolestolemica (1,5%) più prolungata (30 settimane) in maiali diabetici, le lesioni aterosclerotiche rilevate nei maiali non diabetici in seguito a dieta iperlipidica ed ipercolesterolemica (4%) di 16 settimane possono essere opportunamente incluse nella classificazione di lesioni intermedie (lesioni di tipo II e III) e lesioni fibroateromatose, descritte come grandi placche aterosclerotiche con un sottile cappuccio fibroso che ricopre un grande core lipidico e necrotico: in contrasto con queste caratteristiche istopatologiche, abbiamo osservato diversi fibroateromi di tipo V con un cappuccio ricco in cellule muscolari lisce, un piccolo nucleo necrotico, la maggior parte calcifica (da microcalcificazioni a significativi depositi di calcio), presentando sempre neoangiogenesi intralesionale ma con limitato infiltrato infiammatorio. Per esempio, all'interno della lesione i macrofagi positivi al MAC-387 sono più frequentemente osservati nelle lesioni di tipo II e nei preateromi piuttosto che nei fibroateromi di tipo V, dato che può essere attribuito alla mancanza di una forte risposta infiammatoria sistemica e mielopoietica come nei suini diabetici e/o ad una diversa cinetica infiammatoria della lesione; infatti nei casi di patologia coronarica più avanzata il tessuto epicardico avventiziale e anche quello perivascolare circostante la coronaria sinistra sono marcatamente infiltrati da macrofagi MAC-387 positivi e da linfociti, suggerendo la presenza di una risposta infiammatoria locale intorno all'arteria malata, sebbene non all'interno della placca stessa.

A dispetto di un approccio totalmente diverso alla valutazione del tipo di cellule, le nostre percentuali di volume cellulare non sono molto

diverse dai risultati della densità cellulare o densità d'area di altri studi sperimentali umani (Orekhova et al, 2010; Geeraert et al, 2007).

Le cellule muscolari lisce di tipo romboidale-sintetico positive all'alfaSMA sono il tipo cellulare prevalente che abbiamo riscontrato nelle placche di tipo IV e V (superiore al 60% della componente cellulare). Il ruolo delle cellule muscolari lisce nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico e nella crescita della placca è stato recentemente evidenziato da una approfondita review (Alexander et al. 2012).

E' interessante notare che:

- La proliferazione delle cellule muscolari lisce è generata anche da condizioni di basso shear stress (Shafi et al., 2010)
- Le cellule muscolari lisce potrebbero essere coinvolte in una cascata di citochine all'interno della placca e svolgere un ruolo fondamentale sia nelle fasi iniziali di crescita che nello sviluppo e nel rimodellamento dell'ateroma poiché esse non solo rispondono alle citochine pro-infiammatorie , ma anche le producono esse stesse (Kitagawa et al., 2009; Alexander et al., 2012)
- Le cellule muscolari lisce (attraverso la migrazione e il trans-differenziamento) sono state segnalate come la quasi unica fonte della componente cellulare (miofibroblasti, fibroblasti, foam cells di derivazione da cellule muscolari lisce, cellule muscolari lisce infiammatorie) ed extracellulare (collagene, fibronectina, calcio, tutte le proteine della matrice extracellulare, con la sola eccezione dei lipidi extracellulari) di ateromi e

fibroateromi, nonché come promotori di neoangiogenesi intraplaacca (Alexander et al., 2012).

Pertanto, dopo gli stadi iniziali di formazione della placca aterosclerotica (in cui prevale l'accumulo di lipidi sotto forma di foam cells), prende luogo un diverso scenario biologico in cui la crescita della placca è regolata dalla proliferazione e dall'attività sintetica delle cellule muscolari lisce, e da forze meccaniche locali influenzando l'aspetto risultante dell'ateroma.

## Bibliografia

Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13-40.

Bao JX, Xia M, Poklis JL, et al. Triggering role of acid sphingomyelinase in endothelial lysosome membrane fusion and dysfunction in coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H992–H1002, 2010.

Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, Hindkjaer J, Kassem M, Falk E. Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:2696–2702.

Boudjeltia KZ, Legssyer I, Van Antwerpen P, Kisoka RL, Babar S, Moguilevsky N, Delree P, Ducobu J, Remacle C, Vanhaeverbeek M,

Brohee D. Triggering of inflammatory response by myeloperoxidase-oxidized LDL. *Biochem Cell Biol* 2006, 84:805–812.

Broccolo F. Aterosclerosi, eziopatogenesi, prevenzione e trattamento. 2010.

Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implication for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 1985; 42: 139-62.

Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979; 59: 1-61.

Chatzizisis YS, Jonas M, Coskun AU, et al. Prediction of the localization of high-risk coronary atherosclerotic plaques on the basis of low endothelial shear stress: an intravascular ultrasound and histopathology natural history study. *Circulation* 2008;117(8):993-1002.

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004, 109(Suppl 1): III27–III32

Dhaliwal BS, Steinbrecher UP (1999). Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta.*; 286:191-205.

Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation* 1999, 100: e20-e28.

Fuster V, Mearns BM. The CVD paradox: mortality vs prevalence. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:669.

Geeraert B, De Keyzer D, Davey PC, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced expression of ABCA1 in blood monocytes precedes coronary atherosclerosis and is associated with plaque complexity in hypercholesterolemic pigs. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2529–36.

Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Zamboulis C, et al. Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Int J Cardiol* 2008; 126, 302–312.

Giannotti G, Landmesser U. Endothelial Dysfunction as an Early Sign of Atherosclerosis. *Herz.* 2007; 32: 568-572.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685-1695 (2005).

Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology* 2011,vol. 12, no. 3, pp. 204–212.

Hansson GK, Nilsson J. Vaccination against atherosclerosis? Induction of atheroprotective immunity. *Semin Immunopathol.* 2009;31:95–101.

Hansson GK, Robertson AKL & Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 297–329 (2006).

John H. Ip, MD, Valentin Fuster, MD, Facc, Lina Badimon, PhD, Juan Badimon, PhD, Mark B. Taubman, MD, James H. Chesebro, MD, FACC – Syndromes of accelerated Atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation – JACC Vol. 15, No.7, June 1990: 1667-87.

Kitagawa T, Yamamoto H, Horiguchi J, et al. Characterization of non-calcified coronary plaques and identification of culprit lesions in patients with acute coronary syndrome by 64-slice computed tomography. J Am Coll Cardiol Img 2009;2:153– 60.

Kragel HA, Reddy SG, Wittes JT, et al. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death Circulation 1989;80:1747-1756.

L'Abbate A, Lombardi M, Pelosi G. Placche coronariche. In: Cademartiri F, Casolo G, Midiri M. La TC del cuore nella pratica clinica. Milano: Springer-Verlag, 2007: 101-112.

Lamon BD, Hajjar DP. Inflammation at the molecular interface of atherogenesis. An anthropological journey. Am J Pathol, 2008; 173: 1253-1264.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation. 2001; 104: 365-372.



Libby P. Patogenesi, prevenzione e trattamento dell'aterosclerosi. In: Harrison, Principi di Medicina Interna. McGraw Hill, Milano; 2008; pp 1460-1467.

Losano G, Marzilli M, Ferrari, M. La circolazione coronaria. Fisiopatologia clinica e farmacoterapia. Piccin, Padova. 1998.

Lusis AJ. Genetics of atherosclerosis. Trends Genet. 2012 June, 28(6): 267-275.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:29-38.

Martín-Fuentes P, Civeira F, Recalde D, Garcia-Otin AL, Jarauta E, Marzo I, Cenarro A: Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. J Immunol 2007, 179:3242–3248.

Marzilli M, Bairey Merz CN, Boden WE, et al. Obstructive coronary atherosclerosis and ischemic heart disease: an elusive link! J Am Coll Cardiol 2012; 60:951–6.

Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G: Atherosclerosis research from past to present - on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. Virchows Arch 2006, 449: 96-103.

Mitchinson MI, Ball RY. Macrophages and atherogenesis. *Lancet* 1987; 2: 146-9.

Mohler ER, Sarov-Blat L, Shi Y, et al. Site-specific atherogenic gene expression correlates with subsequent variable lesion development in coronary and peripheral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 May;28(5):850-5.

Orehova AN, Andreevac ER, Andrianovac IV et al, Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different type of atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries. *Atherosclerosis* 212 (2010) 436–443.

Østerud B, Bjørklid E. Role of Monocytes in atherogenesis. *Physiological Reviews* 2003, 83: 1069-1112.

Pontieri, Russo, Frati. *Patologia Generale*. Piccin, 2010.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362: 801-809.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med* 1986;314(8):488-500.

Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 1995;77:445–465.

Shafi S, Lamb D, Modjtahedi H, et al. Periadventitial delivery of anti-EGF receptor antibody inhibits neointimal macrophage accumulation after angioplasty in a hypercholesterolaemic rabbit. *Int J Exp Pathol.* 2010, 91(3):224-34.

Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 15-22.

Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, et al. (2002) Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417: 750-754.

Smith JD et al. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8264–8268 (1995).

Strydom HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ and Wagner WD, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12; 120-134. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.

Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;15:1512-31.

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer A, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special report. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 840-856.

Swindle MM, Horneffer PJ, Gardner TJ. Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Laboratory Animal Science*, vol. 36, no. 4, pp. 357–361, 1986.

Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 2007; 116, 1832–1844.

Tedgui, A. & Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 86, 515–581 (2006).

Thomas DD, Martin CL, Weng N, et al. Tumor protein D52 expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation modulates lysosomal membrane protein trafficking to the plasma membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C725–C739, 2010.

Velican D, Velican C. Atherosclerotic involvement of the coronary arteries of adolescents and young adults. *Atherosclerosis.* 1980;36:449–460.

Vilahur G, Padro T, Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. 907575.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1262–1275.

Wight LN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1989; 9:1-20.

Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998;9: 441-448.

Xiangdong L, Yuanwu L, Zhang H, Liming R, Qiuyan L, Ning L. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein and Cell (Impact Factor: 3.22).* 03/2011; 2(3):189-201. DOI:10.1007/s13238-011-1016-3.

Yea-Herttuala S, Sumuvuori H, Karkola K, Mottonen M, Ninkari P. Glycosaminoglycans in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Lab Invest* 1986;54:482-8.

Young JJ, Phillips HR, Marso SP, et al. Vulnerable plaque intervention: State of the art. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 2008;71:367–374.

## Ringraziamenti

Ed eccomi finalmente qua, a scrivere il capitolo a cui tanto ho pensato, quello più difficile, perché ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutata non solo nella realizzazione della mia tesi ma in tutto questo lungo percorso, e soprattutto farlo in poche righe, non sarà affatto semplice!

Desidero prima di tutto ringraziare il relatore di questa tesi, il Dott. Gualtiero Pelosi, per avermi dato la possibilità di svolgere l'internato di tesi e per la grande disponibilità e fiducia che mi ha sempre dimostrato in questi mesi.

Desidero ringraziare i correlatori, il Prof. Aldo Paolicchi e la Dott.ssa Angela Pucci, per la disponibilità e i preziosi consigli che hanno saputo darmi.

Un ringraziamento particolare ai colleghi dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa che hanno avuto a che fare con me in questo lungo periodo, in particolare la Dott.ssa Federica Viglione, e il mio "co-tutor" Dott. Marco Matteucci, fonti inesauribili di consigli pratici ma anche (e soprattutto) di notizie gossip!

Desidero ringraziare tutti gli amici che mi hanno supportata in questo periodo: le mie amiche di una vita Serena ed Elisa che hanno più che altro sopportato la mia assenza senza farmela mai pesare, come sanno fare solo delle vere amiche; la mia compagna di università Federica con cui ho affrontato questo percorso, nonostante in tutti questi anni non siamo mai riuscite a fare un esame insieme; la mia squadra di pallavolo ASD La Fornace che ha costituito una importantissima valvola di sfogo e mi ha fatto conoscere delle persone davvero speciali.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia: prima di tutto ai miei genitori che hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo, per il loro sostegno non solo economico ma anche e soprattutto morale, nonostante io abbia sempre cercato (inutilmente!) di nascondere le date degli esami; ai miei fratelli che in questo momento mi stanno facendo entrambi provare la grandissima emozione di diventare zia! Ed un ringraziamento, anche se lui non leggerà queste righe, al mio terzo “fratellino nero” che mi aspetta tutti i giorni a casa scodinzolando, o almeno provandoci!

Infine, ma non ultimo, un ringraziamento molto speciale va ad Emanuele, che mi è stato accanto per l'intero percorso universitario, che mi è stato vicino nei momenti più belli e in quelli di crisi (come non parlare delle mie crisi pre-esame!), che ha accompagnato tutti i giorni di questo tirocinio con la solita domanda “Ma domani cosa fai? Vai al CNR?” e con cui vorrò già da domani affrontare i prossimi capitoli della vita!

Semplicemente... Grazie,

*Marianna*