



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA E BIOTECNOLOGIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOLOGIA DELLA SALUTE BIOSANITARIO FORENSE

**CONFRONTO TRA DIVERSE METODICHE ISTOCHIMICHE
ED IMMUNOISTOCHIMICHE PER LA VALUTAZIONE DEL
GRADO DI MATURAZIONE DI ALCUNI NUCLEI DEL
NETWORK RESPIRATORIO IN CASI DI MORTE
IMPROVVISA ED INATTESA DEL LATTANTE**

Relatrice:
Prof.ssa Marianna Penzo

Candidata:
Lucrezia Timotei

Correlatore:
Dott. Vincenzo Nardini
Dott.ssa Maria Elena Filice

Sessione Luglio 2024
Anno Accademico 2023/2024

INDICE

ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE	4
1.1 Cos'è la SIDS (Sudden Infant Death Syndrome)?.....	4
1.1.1 Definizione.....	4
1.1.2 Epidemiologia.....	7
1.1.3 Fattori di rischio e modello patogenetico	10
1.1.4 L'importanza dell'autopsia completa e del medico legale/anatomo- patologo esperti.....	14
1.2 Il sistema nervoso centrale.....	19
1.2.1 Un quadro d'insieme del sistema nervoso	19
1.2.2 Il SNC	20
1.2.3 Focus sul Tronco Encefalico.....	24
1.2.4 Le strutture chemorecettoriali (SCR).....	29
1.3 Correlazione SNC e SIDS.....	33
SCOPO DELLA TESI	40
MATERIALI E METODI	41
3.1 Popolazione dello studio.....	41
3.2 Materiale biologico sottoposto allo studio.....	42
3.3 Taglio.....	43
3.4 Colorazione	45
3.4.1 Ematossilina-eosina	45
3.4.2 Luxol Fast Blue.....	47
3.4.3 Blu di Toluidina	50
3.5 Immunoistochimica	52

3.5.1 Protocollo NeuN	55
RISULTATI.....	56
4.1 Colorazione istochimica con Ematossilina-Eosina.....	56
4.2 Colorazione immunohistochimica con anticorpo anti NeuN.....	63
4.3 Colorazione istochimica speciale con Blu di Toluidina	75
4.4 Colorazione istochimica speciale con Luxol Fast Blue	81
DISCUSSIONE	84
BIBLIOGRAFIA	95

ABSTRACT

L'elaborato è centrato sulla sindrome della morte improvvisa ed inattesa del lattante (SUDI/SIDS), un problema che colpisce una percentuale minore dello 0,1% dei nuovi nati/anno¹, ma ancora largamente sconosciuto. La morte improvvisa ed inattesa del lattante si verifica solitamente durante il sonno notturno entro il primo anno di vita. Il “modello a triplice rischio” spiega la SIDS come un'intersezione tra la vulnerabilità del lattante, un periodo critico dello sviluppo omeostatico e la presenza di fattori di stress esogeni che causano un'alterazione nel meccanismo dell'*arousal*. È possibile individuare alla sua base una serie di alterazioni congenite e/o acquisite a livello del sistema nervoso centrale come un'ipoplasia o agenesia di uno o più nuclei respiratori correlati ad un inefficace controllo della ventilazione e del ritmo sonno-veglia. Lo studio presentato, unicamente morfologico, è volto alla messa a punto di colorazioni istochimiche ed immunoistochimiche per confrontare il differente grado di maturazione neuronale tra i “casi” ed i “controlli” e per individuare se fosse presente una metodica da preferire alle altre per la valutazione del rischio di morte improvvisa ed inattesa. Sono stati selezionati 28 bambini deceduti di età compresa tra 1 giorno e 1 anno e mezzo differenziando una coorte di 11 “casi” SIDS e una di 17 “controlli”, classificati con numerazione crescente ed in forma completamente anonima. Il materiale oggetto della presente tesi è relativo a sezioni istologiche di tessuto encefalico incluso in paraffina, prelevato per la normale routine diagnostica autoptica. In seguito al taglio delle sezioni si procede alle colorazioni istochimiche quali Ematossilina-Eosina (routine), Luxol Fast Blue e Blu di Toluidina; e alla colorazione immunoistochimica con anticorpo anti NeuN. Si riportano le caratteristiche dei nuclei respiratori ricavate da ciascuna colorazione dimostrando alla fine un'associazione tra l'ipoplasia del nucleo arcuato e del nucleo di pre-Bötzingher con il gruppo dei “casi”, insieme ad una desquamazione endimale e all'aumento del numero di tanciti suggerendo un difetto durante lo sviluppo gestazionale nel periodo compreso tra le otto e sedici settimane. L'immunocolorazione con anticorpo anti NeuN (Antigene Neuronale Nucleare) si rivela essere la metodica più efficace nel discriminare i casi di “studio”.

¹ circa 0,2/0,4 /1000 nati, nei paesi con elevato sviluppo socio-economico

INTRODUZIONE

1.1 Cos'è la SIDS (Sudden Infant Death Syndrome)?

1.1.1 Definizione

La SIDS, sindrome della morte improvvisa del lattante, più comunemente conosciuta con il termine “morte in culla”, ha da sempre avuto una difficile definizione (1) ed è sempre stata considerata una diagnosi di esclusione (2). Il termine “SIDS” viene utilizzato quando un bambino, apparentemente in buono stato di salute, viene ritrovato inaspettatamente morto spesso durante il sonno notturno (1).

La prima definizione accettata a livello internazionale fu quella del 1969 di Bruce Beckwith che utilizzò il termine SIDS per un distintivo sottogruppo di morti inattese del lattante che si erano verificate nel periodo postnatale con caratteristiche cliniche, epidemiologiche e patologiche relativamente coerenti (2).

Nel 1989, con la definizione del National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), venne introdotto il termine “accurata esame post-mortem” che portò alla riformulazione della precedente definizione descrivendo la SIDS come “morte inattesa di un lattante sotto un anno di vita, che rimane inspiegata dopo un’attenta investigazione che include un’autopsia completa, l’ispezione della scena di morte e la revisione della storia clinica” (1).

Tra il 1998 e il 2001 uno studio tedesco (studio GeSID) allestito su 455 infanti che erano morti improvvisamente e inaspettatamente, portò alla classificazione di quattro categorie patologiche dei casi di SIDS (P-cat1, P-cat2, P-cat3, P-cat4) (3). Questo condusse Beckwith alla necessità di una revisione della sua definizione nel 2003 e nel gennaio 2004 un gruppo di esperti si radunò a San Diego proponendo una nuova definizione (3). La definizione di San Diego aggiunse all’esplicazione di NICHD un’apparente associazione con il sonno chiarendo il termine SIDS come *“improvvisa e inaspettata morte di un infante minore di un anno con insorgenza dell’episodio fatale apparentemente avvenuto durante il sonno, che rimane inspiegata dopo un’accurata investigazione che include una completa autopsia e la revisione delle circostanze di morte e della storia clinica”* (1). Alla generale definizione si aggiungono una serie di sottocategorie, per aiutare la classificazione diagnostica dei singoli casi: SIDS 1A, SIDS 1B, SIDS 2, USID (Tabella 1) (1).

- Categoria 1A (classiche caratteristiche con investigazione completa): un bambino che presenta i requisiti descritti nella definizione generale con l'aggiunta di una serie di caratteristiche cliniche come età compresa tra i 21 giorni e i 9mesi, normale storia clinica, parto ad età gestazionale maggiore o uguale a 37 settimane di gestazione e assenza di eventi simili in fratelli, o parenti vicini; circostanze della scena di morte come ambiente del sonno sicuro e assenza di evidenze di morte accidentale; assenza di scoperte patologiche letali, di traumi e abusi, di effetti sostanziali di stress a livello timico a seguito dell'autopsia, e negatività agli esami tossicologici, microbiologici, radiologici e metabolici (1).
- Categoria 1B (classiche caratteristiche con incompleta investigazione): un bambino che risponde ai criteri della definizione generale e della categoria 1A tranne per il fatto che non è stato possibile eseguire l'autopsia o/e non è stato possibile eseguire una delle analisi tossicologiche, microbiologiche, radiologiche e metaboliche (1).
- Categoria 2: un bambino che rispecchia i requisiti generali e della categoria 1A ad esclusione di una serie di parametri clinici come età minore di 21 giorni o maggiore di 270 giorni, presenza di casi simili in fratelli o parenti vicini e comparsa di condizioni patologiche neonatali e perinatali; condizioni di circostanza come asfissia meccanica o soffocazione non determinata con certezza, rilevazione di crescita anormale, infiammazione o anomalie non sufficienti per essere la causa inequivocabile di morte (1).
- USID (unclassified sudden infant deaths): include gli infanti che non rispondono ai requisiti della categoria 1 o 2, ma diagnosi alternative di naturali o innaturali condizioni sono equivocabili (1).

	Clinical history	Circumstances of death	Autopsy
SIDS general definition	Sudden and unexpected death	Unexplained after review of the circumstances	Unexplained after complete autopsy
	Under 1 year of age		
	Lethal episode during sleep		
	Death unexplained by CH		
Specific definition			
Category IA SIDS	1. Older than 21 days, under 9 months	Scene investigation performed and gave no explanation	1. No lethal pathological findings
	2. Normal CH	Safe sleep environment	2. No unexplained trauma, abuse, neglect or unintentional injury
	3. Full-term pregnancy (>37 weeks)	No evidence of an accident	3. No substantial thymic stress
	4. Normal growth and development		4. Toxicology, microbiology, radiology, vitreous chemistry and metabolic screening were negative
	5. No similar deaths in siblings/relatives		
Category IB SIDS	1-5 (criteria for category IA SIDS)	Scene investigation was not undertaken	1-4 and 5. One or more of the following analyses were not performed: toxicology, microbiology, radiology, vitreous chemistry and metabolic screening
Category II SIDS	differences to category I criteria:	Mechanical asphyxia or suffocation by overlaying not determined with certainty	1-5 and
	6. Age range (0-21 and 270-365 days)		6. Abnormal growth and development not thought to have contributed to death
	7. Neonatal/perinatal conditions that have resolved by the time of death		7. More marked inflammatory changes or abnormalities not sufficient to cause death
	8. Similar deaths in siblings, near relatives		
USID	Criteria for category I or II SIDS are not fulfilled	Alternative diagnoses of natural or unnatural death are equivocal	Autopsy has not been performed

CH Clinical history, USID Unclassified Sudden Infant Death

Tabella 1: Classificazione dei casi SIDS (3)

Recentemente oltre alla SIDS è stata definita un'altra entità di morte inaspettata che si verifica entro la prima settimana di vita, definita early-Sudden Infant Death Syndrome (e-SIDS) che risulta essere una conseguenza di un improvviso collasso neonatale, Sudden Unexpected Postnatal Collapse (SUPC) (4).

La classica definizione della SIDS non include le morti inaspettate che si verificano nella prima settimana di vita ma, per le similitudini che presentano a livello di fattori di rischio coinvolti e nelle condizioni in cui si verificano, è altamente probabile che abbiamo un meccanismo patogenetico comune (4).

1.1.2 Epidemiologia

La SIDS è la prima causa di morte naturale nel primo anno di vita dato che i meccanismi patogenetici alla base di essa rimangono largamente sconosciuti e la prevenzione è ancora una sfida lontana (5).

Dati statistici significativi sono forniti dai registri di nascita e morte dei bambini, che permettono di avere informazioni sulle tendenze della SIDS. La causa del decesso sui certificati di morte è identificata mediante il codice ICD (International Classification of Diseases) sviluppato dall' Organizzazione Mondiale della Sanità per catalogare le malattie e le cause di morte. Secondo tale sistema di codifica, nell'ultima versione ICD-10, il codice R95 corrisponde alla SIDS (1).

Ogni anno si verificano circa 4 milioni di morti neonatali, la maggior parte delle quali nei paesi a basso e medio reddito (6). Dagli anni Novanta agli anni Duemila si è verificato un calo importante dei casi, grazie soprattutto alle campagne “Back to Sleep” promuoventi l'abitudine a far dormire i bambini in posizione supina (1).

Dalla Figura 1 possiamo evincere una netta riduzione del tasso di mortalità negli anni, tendenza che però non si riflette ugualmente nella riduzione dei casi di mortalità neonatale.

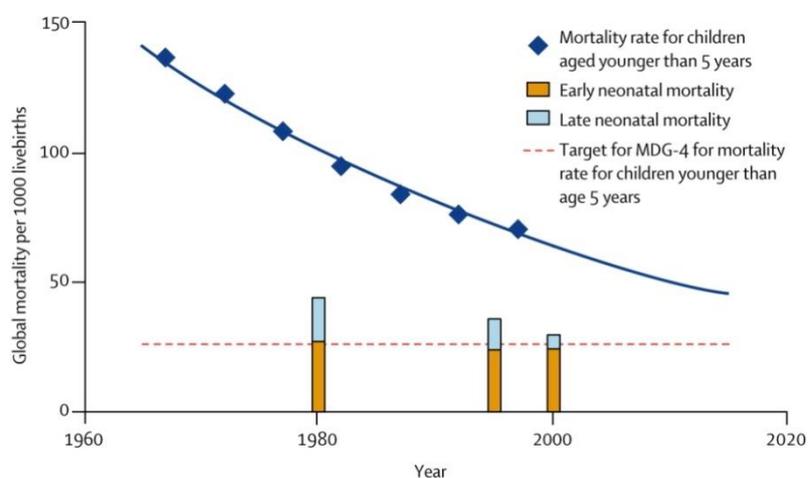


Figura 1: Trend della mortalità infantile 1965-2015 (6)

Non esistono dati nazionali sull'incidenza della SIDS per mancanza di un sistema di rilevazione omogeneo, al 2023 tale valore è stimabile essere attorno allo 0,5% dei nati vivi, ovvero 250 nuovi casi SIDS/anno (7).

La SIDS presenta una serie di caratteristiche distintive in termini di età di morte, stagionalità, sesso ed etnia (1).

Età di morte

Il 90% dei casi si verificano nei primi sei mesi di vita, con un picco massimo tra i due e i quattro mesi, periodo in cui l'encefalo del bambino subisce numerosi cambiamenti a livello di sviluppo neurologico, in particolare a carico dei processi coinvolti nel controllo omeostatico (8).

La Figura 2 mostra come il numero di morti inaspettate sia maggiormente accentuato nel periodo postnatale sotto i quattro mesi.

Figure 4: Majority of unexplained infant deaths occur in the early postneonatal period

Distribution of unexplained infant deaths by age at death, England and Wales, 2004 to 2021p



Source: Deaths in England and Wales from the Office for National Statistics

Figura 2: Trends dei casi di SIDS per età

Stagionalità

I primi studi avevano dimostrato una maggiore incidenza di casi nei mesi invernali, osservando nel semestre ottobre-marzo il 65% dei casi di SIDS (9), ma studi più recenti hanno dimostrato una distribuzione piuttosto omogenea durante l'anno (1).

Sesso

È ormai confermata una predominanza della SIDS nel sesso maschile, complessivamente si osserva che il rapporto tra la mortalità nei maschi e nelle femmine è uguale a 1:4, valore pressappoco costante negli anni (9).

Etnia

La SIDS risulta non avere la medesima incidenza nelle varie etnie, si osserva infatti una maggiore prevalenza nella popolazione nera e nei nativi americani rispetto a quella caucasica, asiatica e ispanica (Figura 3) (10).

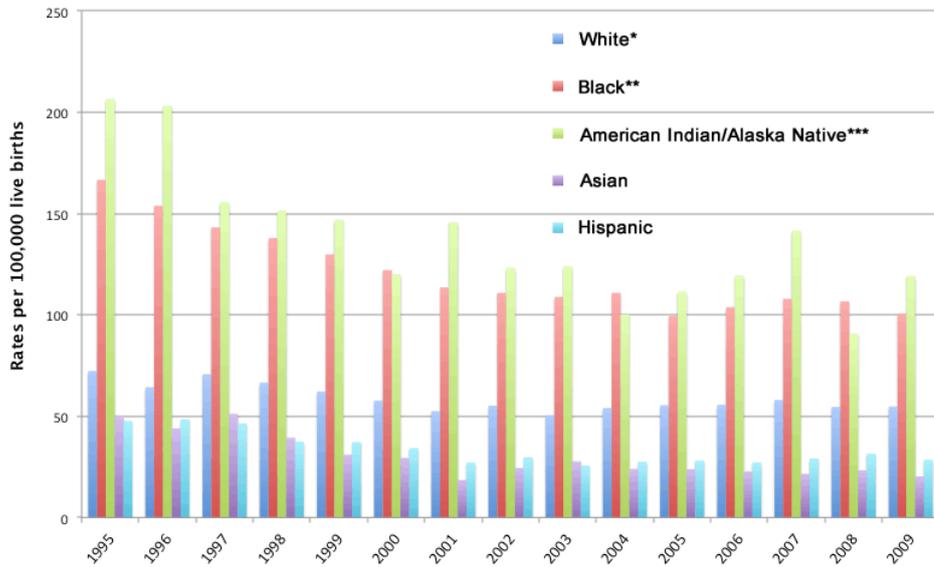


Figura 3: Distribuzione dei casi di SIDS per tipologia ed etnia 1995-2009 (10)

1.1.3 Fattori di rischio e modello patogenetico

I fattori di rischio possono essere suddivisi in due categorie:

- “Non modificabili” come sesso, etnia, prematurità (parto ad età gestazionale minore di 37 settimane), madre primipara o madre con più di due precedenti gravidanze, Apgar score minore di 7, peso alla nascita minore di 1600 g, età materna minore di 20 anni e livello di educazione materna minore di 12 anni (4,11).
- “Modificabili” tra cui il fumo di sigaretta durante la gravidanza da parte della madre, l’inquinamento atmosferico e la posizione prona del neonato durante il sonno. (4)

Il fumo di sigaretta materno, l’abuso di alcool e droghe, l’inquinamento ambientale e alimentare possono interagire con le variabilità genetiche e causare alterazioni di sviluppo a livello del sistema nervoso centrale, che possono essere considerate alla base della SIDS (4).

Tali fattori esogeni, quindi, giocano un ruolo chiave in un bambino già compromesso da variabili genetiche durante il periodo critico di sviluppo poiché possono portare a ipercapnia, deregolazione cardiaca, alterazione della termoregolazione e diminuzione dell’*arousal* (12).

L’*arousal* identifica il grado di eccitazione o di attivazione fisiologica in seguito ad uno stimolo. Diversi studi hanno dimostrato come esso sia coinvolto nei circuiti cerebrali e nella regolazione dei cicli di sonno-veglia, in particolare viene inattivato da un “interruttore” a livello dell’ipotalamo durante il sonno, passaggio regolato da diversi neuroni ipotalamici tra cui i neuroni dell’*orexina* (13). L’*arousal* dal sonno varia in durata ed intensità che risulta essere un importante mediatore della ventilazione e della dilatazione faringea, un aumento inutilmente eccessivo della ventilazione dopo l’*arousal* potrebbe portare a ipocapnia e alla destabilizzazione del sistema ventilatorio (14).

Il modello più accreditato che spiega la morte improvvisa del lattante è stato proposto da Filiano e Kinney nel 1994 ed è costituito dall’intersezione di tre fattori sovrapposti, da qui il nome “modello a triplice rischio”, ovvero la vulnerabilità del lattante, un periodo critico dello sviluppo nel controllo omeostatico ed uno o più fattori di stress esogeni (15).

Già nel 1970 Bergman sosteneva che la SIDS non dipendesse da una singola caratteristica che predisponesse il bambino a morte improvvisa, ma da un'interazione di fattori con probabilità variabili. Nel 1972 Wedgwood propose la prima idea di "triplice ipotesi di rischio" che raggruppava la vulnerabilità generale, rischi collegati all'età specifica del bambino e fattori acceleranti (16).

Seguono negli anni altre formulazioni di tale ipotesi fino ad arrivare alla forma migliore nel 1994 con Filiano e Kinney (16) che è rappresentata in Figura 4.

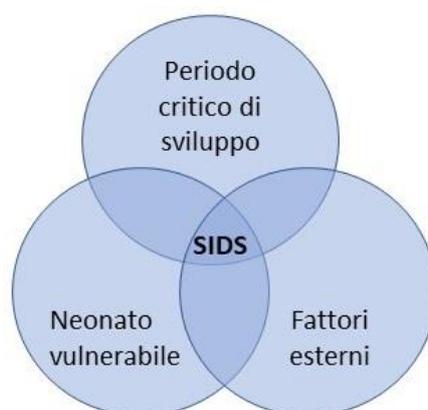


Figura 4: Modello Triplice Rischio di Filiano e Kinney (1994).
(SaperiDoc - Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna)

Il neonato ha un rischio costituzionale collegato alla presenza di fattori di rischio non modificabili (vulnerabilità del bambino) come anomalie strutturali o funzionali di centri nervosi essenziali per lo svolgimento delle attività vitali (4). La vulnerabilità biologica del bambino potrebbe anche essere nascosta e dovuta ad anomalie del tronco encefalico, problemi di conduzione cardiaca, alterazioni geniche, anomalie di canali ionici o presenza di una risposta immunologica (17).

Un bambino con tali anomalie ha un aumentato rischio nel periodo critico di sviluppo, periodo in cui si verificano una serie di cambiamenti fisiologici per lo sviluppo del controllo omeostatico. In più il neonato può essere esposto a fattori di stress esogeni come la posizione prona durante il sonno che causa una riduzione drastica dell'ossigeno fornito all'encefalo; il fumo di sigaretta materno, ma anche la presenza di cuscini o coperte nel letto del bambino, tutti fattori modificabili che possono essere eliminati (4).

Diversi studi hanno ormai confermato che il fumo materno è il principale contributore di alterazioni a carico dello sviluppo neuronale nella progenie (18).

L' esposizione prenatale al fumo riduce l'ossigenazione fetale come conseguenza dell'aumento dei livelli di carbossiemoglobina nel sangue. Il monossido di carbonio (CO), che è il principale prodotto di combustione della nicotina, attraversa la placenta e si lega all'emoglobina causando ipossia fetale dato che la carbossiemoglobina non è capace di cedere ossigeno ai tessuti (11).

Oltre a questo, la nicotina può avere anche un effetto diretto sui vasi del feto causando lesioni aterosclerotiche, può superare la barriera emato-encefalica alterando DNA, RNA e proteine a livello neuronale e può legarsi ai recettori nicotinici impedendo la regolare trasmissione dell'acetilcolina (4).

La SIDS è una condizione con cause sconosciute dovuta alla sua complessa patogenesi definita dalla combinazione di fattori genetici, ambientali e socio-culturali (17), patofisiologia che è descritta in Figura 5.

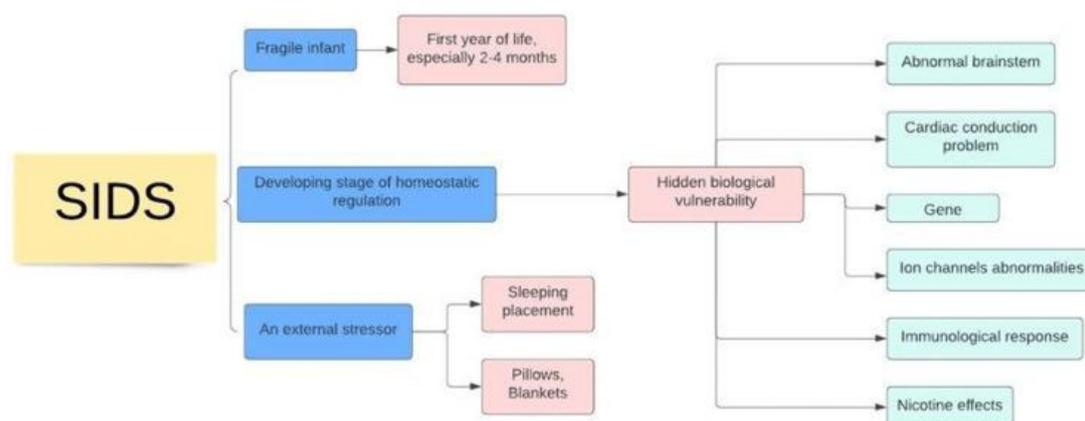


Figura 5: Patofisiologia della SIDS (17)

Vari studi suggeriscono la presenza di tre fattori causativi alla base della SIDS collegati alla respirazione (apnea o soffocamento), alla discinesia cardiaca (aritmia) e alla discinesia viscerale (spasmi o reflusso), enfatizzando il ruolo cruciale del riflesso d'immersione (19).

Il riflesso d'immersione è una risposta fisiologica presente in tutti i vertebrati, che permette di preservare le riserve di ossigeno durante l'immersione in acqua, è caratterizzato da una redistribuzione del flusso sanguigno per garantire una corretta ossigenazione del cuore e del cervello limitando il flusso ai muscoli non essenziali. Tale riflesso si attiva in seguito alla stimolazione del nervo trigemino causando apnea, bradicardia e aumento della resistenza vascolare periferica. La stimolazione

potrebbe avvenire durante il sonno del bambino in posizione prona, portando a bradicardia e apnea fino ad interruzione della respirazione e morte (20). La posizione “prona” potrebbe, nella fase di maggiore vulnerabilità della vita del lattante, predisporre ad un aumento dell’ipercapnia per una “rirespirazione” della CO₂ espirata, come è mostrato in Figura 6.



Figura 6: Infante in posizione prona che sta ri-respirando CO₂
(CanturkGurol, YavuzM.Sunay, CanturkNergis, Child Death, Forensic Medicine-From oldproblems to new challenges, 2011)

1.1.4 L'importanza dell'autopsia completa e del medico legale/anatomo-patologo esperti.

Nel 1999 Faye-Peterson, Guinn e Wenstrom definirono l'importanza dell'autopsia perinatale come strumento diagnostico per determinare la causa di morte, dimostrando che nel 94% dei casi del loro studio, dopo un'attenta autopsia era stato possibile risalire alla causa del decesso (21).

Nel 2006 in Italia è stata emanata la legge n.31 del 2 febbraio "Disciplina del riscontro diagnostico sulle vittime della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS) e di morte inaspettata del feto" il cui articolo 1 cita "I lattanti deceduti improvvisamente entro un anno di vita senza causa apparente e i feti deceduti anch'essi senza causa apparente dopo la venticinquesima settimana di gestazione devono essere prontamente sottoposti, con il consenso di entrambi i genitori, a riscontro diagnostico da effettuarsi nei centri autorizzati" definendo l'obbligo dell'esecuzione di autopsia in caso di SIDS (22).

Nel 2014 vennero definite le condizioni di esecuzione dell'autopsia in modo da avere un protocollo di studio standard ottimale, quando il Ministero della Salute emanò il Decreto 7 Ottobre 2014 "Protocolli diagnostici nei casi di morte infantile e della morte inaspettata del feto" approvando all'articolo 1 il protocollo presente nella Legge 2 febbraio 2006, n.31, articolo 1, comma 2 "Protocollo di indagini e di riscontro diagnostico nella morte improvvisa infantile". Tale protocollo descriveva il metodo di studio della Sudden and Unexpected Infant Death (SUID): esame della storia clinica e delle circostanze di morte, autopsia, esame tossicologico, esami molecolari e studio del tessuto di conduzione cardiaco e del peduncolo cerebrale. L'allegato 2 riportava "le linee guida per il sopralluogo in caso di morte improvvisa infantile inaspettata (SUID)" per un'indagine completa sulle cause e sulle modalità dell'evento, che insieme alla revisione della storia clinica sono essenziali per i fini diagnostici. L'allegato 3 conteneva "il protocollo di autopsia per la SUID" per stabilire la causa di morte e rispondere alle domande correlate alle circostanze dell'evento: se è attribuibile ad un processo naturale, o se è possibile che sia stata accidentale, la possibilità di asfissia e ostruzione delle vie aeree, la possibilità di lesioni non accidentali (maltrattamento) e la documentazione della presenza/assenza di processi patologici. In tale allegato è riportata anche la

procedura autoptica che dovrebbe essere eseguita congiuntamente dal medico legale e dall'anatomo-patologo per la possibile sovrapposizione di aspetti legali e sanitari. La procedura prevede un esame esterno: peso e lunghezza dell'infante, presenza/assenza di secrezioni o sangue intorno alla bocca e al naso, petecchie emorragiche sulle congiuntive e mucosa orale, dimorfismo. Ad esso deve seguire un accurato esame interno: esame radiologico; peso ed esame di tutti gli organi; conservazione del blocco cuore-polmoni e dell'encefalo; esame dell'encefalo dopo opportuna fissazione; esecuzione di prelievi istologici di encefalo, polmone, cuore, timo, fegato, pancreas, milza, surreni, reni, muscolo scheletrico ed eventuali fratture, da analizzare mediante colorazione ematossilina-eosina o tricromica; esecuzione di prelievi per indagini molecolari mediante PCR e prelievi per la tossicologia (23).

L'autopsia è essenziale anche per escludere la Shaken Baby Syndrome (SBS), la forma di maltrattamento fisico intrafamiliare, che si verifica quando il bambino viene scosso violentemente dai genitori o dal caregiver come reazione ad un pianto inconsolabile. Il picco di incidenza è tra le due settimane e i primi sei mesi di vita, periodo in cui il bambino non ha ancora un congruo controllo dei muscoli del capo e l'encefalo è di consistenza gelatinosa, per cui le scosse all'interno della scatola cranica possono portare ad emorragie cerebrali e retro-bulbari dell'occhio, con esito infausto nel 25% dei casi (24).

Il modello toscano

In Toscana, con il Piano Sanitario Regionale 2008-2010 al punto 6.5, è stata posta particolare importanza all'assunzione di interventi necessari per la prevenzione della SIDS legati al Progetto Obiettivo "Assistenza Materno Infantile" (25).

Sulla base del sopracitato obiettivo e a seguito dell'istituzione di una commissione regionale SIDS (Giunta regionale n. 245 del 31/03/08) è stato approvato il protocollo "Percorsi organizzativi finalizzati all'esecuzione del riscontro autoptico nel caso di Morte Improvvisa ed Inattesa del Lattante nella Regione Toscana" con la delibera 1164 del 14 dicembre 2009, per l'organizzazione del servizio di Anatomia Patologica di Area Vasta finalizzato all'esecuzione del riscontro autoptico nei casi di SIDS (26). L'allegato "A" di tale protocollo ribadisce quanto

sia fondamentale un esame autoptico completo nei casi SIDS, comprensivi di sopralluogo sul luogo del decesso, di raccolta delle informazioni relative al ritrovamento, delle indagini radiologiche e dell'esecuzione di autopsia completa, effettuata da personale esperto, dato che si tratta di una diagnosi di esclusione.

L'evento della morte improvvisa si verifica nella maggior parte dei casi all'interno delle mura domestiche per cui è stato redatto e distribuito a tutto il personale dei servizi d'emergenza (Pronto Soccorso e 118) un opuscolo informativo sulle caratteristiche della SIDS e sul comportamento corretto da avere in tali casi, tra cui vi rientra anche la documentazione delle circostanze ambientali del decesso.

Questo progetto aveva l'obiettivo di creare un approccio integrato tra servizio di emergenza (118), associazione di familiari (Semi per la SIDS), un giudice, il pediatra di famiglia e il patologo di riferimento delle tre aree in cui la Toscana è divisa (nord-ovest, sud-est e centro) per migliorare la gestione dei casi SIDS, promuovere la ricerca in tale ambito ed implementare il supporto ai familiari (27).

Nel suddetto allegato sono riportate anche le indicazioni generali per il riscontro diagnostico/autopsia in casi di morte improvvisa ed inattesa del lattante (indagine autoptica, studio istologico dei tessuti, esami microbiologici e tossicologici). Il protocollo riporta che, in caso di sospetta SIDS, l'indagine diagnostica debba prevedere un esame esterno accurato al fine di rilevare lesioni traumatiche o patologiche, documentato fotograficamente, e affiancato da almeno due proiezioni radiografiche ortogonali total body per individuare eventuali fratture. A questo deve seguire un esame interno approfondito per escludere la presenza di eventuali malformazioni, nel dettaglio si eviscerano in blocco gli organi del torace fino al collo. Verranno eseguiti piccoli prelievi dei liquidi corporei come urine e sangue da conservare a -80°C e scongelare in caso di studi molecolari e/o tossicologici. Gli organi interni vengono fissati in formalina neutra tamponata per facilitare lo studio topografico. Lo studio del cuore prevede un esame accurato di tutte le cavità, gli apparati valvolari ed i grossi vasi. Si eseguono due prelievi come rappresentato in Figura 7: il campione 1 contenente il nodo seno-atriale, le sue diramazioni atriali e la *Crista Terminalis*; il campione 2 comprende invece la giunzione atrio-ventricolare con le ramificazioni atriali (28).

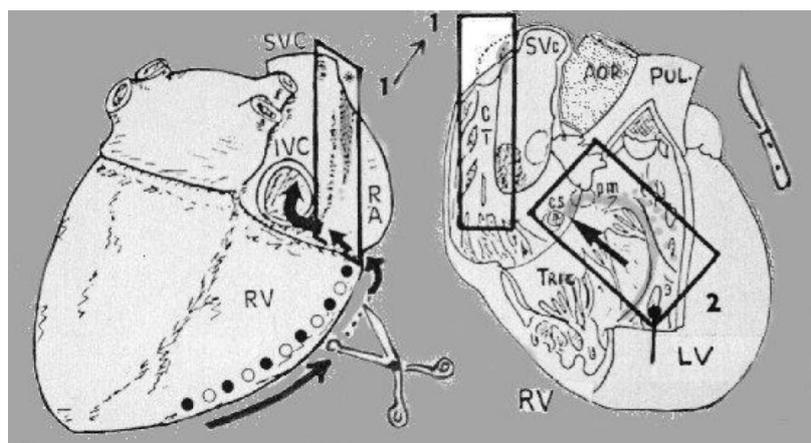
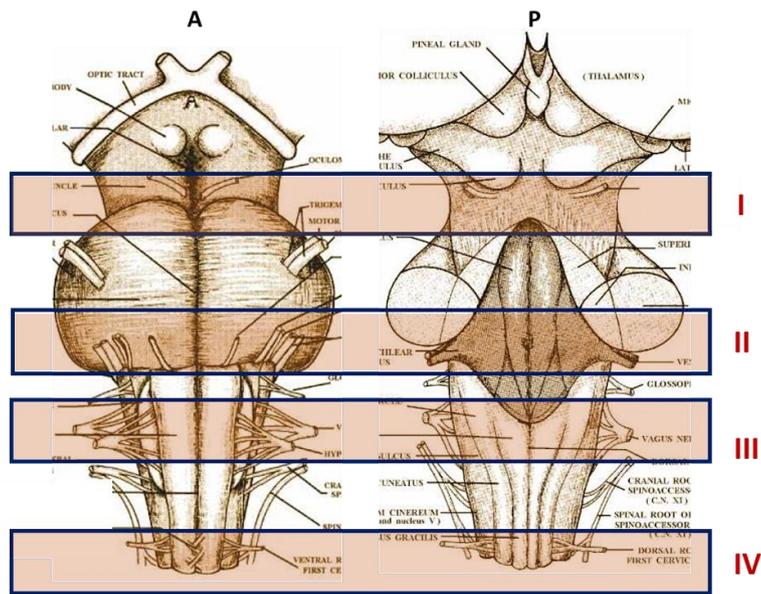


Figura 7: Campionamento del sistema di conduzione cardiaca
 {SVC: Vena Cava Superiore, IVC: Vena Cava Inferiore, AR: Atrio Destro, RV: Ventricolo Destro, CT: Crista Terminalis, AOR: Aorta, PUL: Arteria Polmonare, TRIC: Tricuspide, cs: Seno Coronarico, pm: Pars Membranacea Septi, LV: Ventricolo Sinistro} (Protocollo diagnostico, Centro Lino Rossi)

Per lo studio del Sistema Nervoso Centrale si procede alla fissazione dell'encefalo in formalina tamponata o in fissativi idonei. Si eseguono multipli prelievi del tronco encefalico come illustrato in Figura 8: il primo campione, pontino-mesencefalico, comprende il terzo superiore del ponte di Varolio e la porzione adiacente di mesencefalo; il secondo si estende dal terzo superiore del midollo allungato alla porzione adiacente di ponte; il terzo si estende 2-3 mm sopra e sotto l'obex, ed un eventuale quarto comprende la porzione rostrale del midollo allungato. A tali livelli si ritrovano le principali strutture coinvolte nelle funzioni vitali quali cardiorespiratoria, del risveglio e delle prime vie digestive. A livello encefalico si esegue almeno un prelievo per lobo. Per gli eventuali studi di genetica molecolare, l'invio al laboratorio deve avvenire entro 24 ore dal prelievo, conservando i campioni a 4°C (28).



*Figura 8: Campionamento del tronco encefalico
(Protocollo diagnostico, Centro Lino Rossi)*

Oltre alla procedura autoptica sono delucidati anche i requisiti minimi professionali e ambientali/strutturali per l'esecuzione del riscontro diagnostico (28).

1.2 Il sistema nervoso centrale

1.2.1 Un quadro d'insieme del sistema nervoso

Il sistema nervoso è una complessa organizzazione di strutture che correlano le reazioni interne dell'individuo e le integrano con gli stimoli esterni (29).

Tutti gli organismi sono capaci di rispondere a stimoli chimici e fisici grazie alla presenza di cellule specializzate, i neuroni, che permettono la comunicazione tra cellule trasferendo rapidamente un'informazione da una parte all'altra del corpo. Tutti i neuroni, insieme alle loro cellule di sostegno, costituiscono il sistema nervoso dell'organismo. Il neurone, per far fronte alle richieste, possiede due differenti attività quali la conduzione del segnale da una parte all'altra della cellula e la trasmissione sinaptica alle cellule adiacenti grazie alla presenza di lunghi prolungamenti citoplasmatici, i neuriti. Quest'ultimi possono essere suddivisi tipicamente in multipli dendriti per la ricezione degli stimoli e un assone, di dimensioni maggiori, per la trasmissione dell'impulso, che risulta spesso rivestito da una guaina mielinica per aumentare la velocità di conduzione (30).

Il sistema nervoso è suddiviso per definizione in sistema nervoso centrale (cervello e midollo spinale) e sistema nervoso periferico (nervi, gangli e organi terminali che collegano il sistema nervoso centrale con le altre parti del corpo). L'intero sistema nervoso ha origine dall'ectoderma, il foglietto embrionale più esterno (29). I foglietti embrionali si formano durante la gastrulazione, processo che avviene durante la terza settimana dello sviluppo dell'embrione umano, permettendo il passaggio da uno strato monodimensionale di cellule epiteliali (la blastula) ad una struttura multidimensionale (la gastrula). Dall'esterno all'interno si osservano l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma, ognuno dei quali corrisponde allo sviluppo di specifici organi ed apparati durante l'organogenesi. Un'altra importante funzione della gastrulazione è la determinazione della direzionalità di sviluppo definendo gli assi craniale/caudale e dorsale/ventrale (31).

Il sistema nervoso centrale deriva dal tubo neurale, mentre il sistema nervoso periferico dalle creste neurali, entrambe strutture di origine ectodermica (30).

1.2.2 Il SNC

Il sistema nervoso centrale è un insieme di continue strutture che viene convenzionalmente diviso in encefalo (cervello e cervelletto), tronco encefalico e midollo spinale (o cordone spinale). Tutte le strutture sono composte da due tipi di compartimenti: la sostanza grigia, che contiene maggiormente le cellule nervose, e la sostanza bianca composta prevalentemente da fasci o masse di fibre nervose, per la maggior parte di tipo mielinico (29).

Lo sviluppo del SNC può essere suddiviso in quattro successivi periodi che sono in parte sovrapposti. La Figura 9 rappresenta lo sviluppo del sistema nervoso centrale.

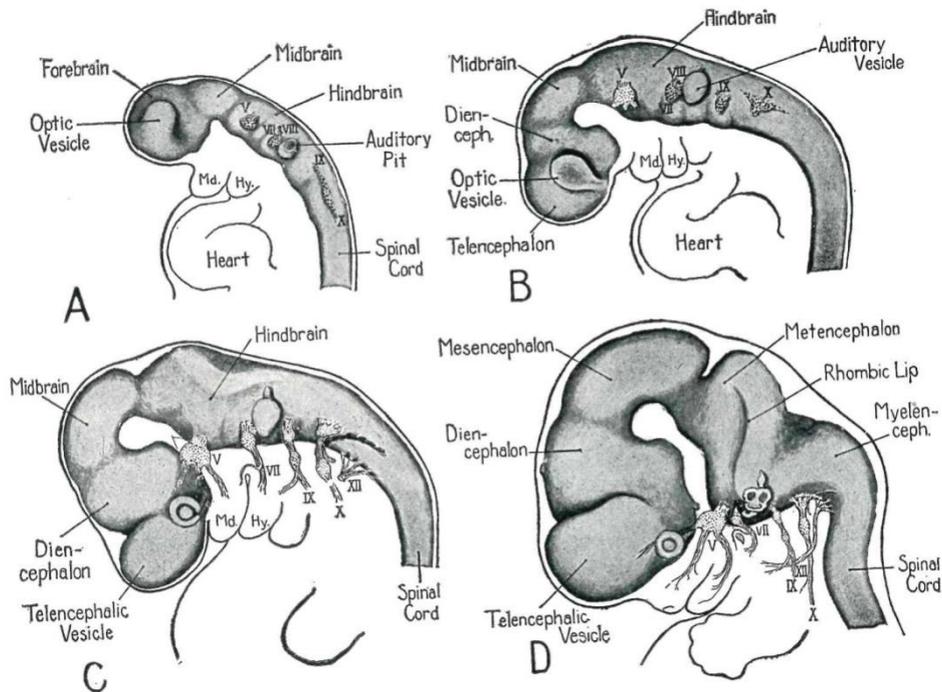


Figura 9: Sviluppo del sistema nervoso centrale. A: 3 settimane e mezzo, B: oltre 4 settimane. C: 5 settimane, D: oltre 7 settimane (29)

Nel primo periodo, corrispondente alle prime quattro settimane di gestazione, la piastra neurale, formatesi in seguito a ripetuti cicli di divisione mitotica delle cellule neuro-epiteliali, forma un solco che si chiude progressivamente per formare il tubo neurale, la chiusura inizia al 22° giorno per concludersi al 26°. Durante questo primo periodo possono sopraggiungere difetti del tubo neurale o stati di disrafia (32).

Con il termine disrafia, secondo la definizione del Dizionario Treccani, si intende ogni malformazione congenita in seguito a incompleta o difettosa saldatura delle due metà degli organi mediani, come ad esempio la spina bifida.

La Figura 9 raccoglie i vari difetti che possono manifestarsi in seguito ad alterazioni della chiusura del tubo neurale.

I difetti del tubo neurale sono tipicamente difetti “aperti”, a causa dell’arresto della chiusura prima della fusione delle pieghe neurali nella linea mediana dorsale (Figura 10A-C). Il difetto maggiore (più grave) è la craniorachioschisi in cui la chiusura non inizia al giorno 22 con conseguente quasi totale apertura della cavità cranica e della colonna vertebrale (anencefalia). La mancata chiusura del neuroporo caudale causa l’iniencefalia (Figura 10D) con retroflessione estrema della testa. Se il difetto avviene durante la seconda neurulazione, responsabile della formazione del tubo neurale nella regione sacrale e caudale, si può verificare una canalizzazione delle cellule mesenchimali, disrafia spinale che presenta diverse varianti (Figura 10E-H) (33).

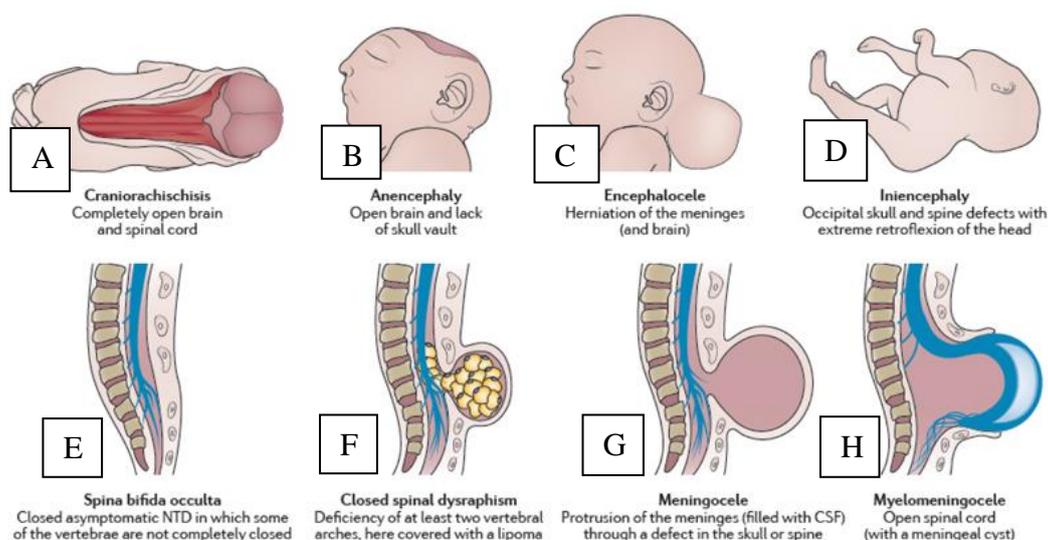


Figura 10:Panoramica generale dei difetti del tubo neurale (33 [modificata])

Nel secondo periodo di sviluppo, compreso tra le quattro e le sette settimane di gestazione, prende luogo l’evaginazione ottica, si forma il ganglio basale e l’ipotalamo, il prosencefalo evagina per formare i due emisferi e dalla sesta settimana compare il bulbo olfattorio. Durante tale periodo possono verificarsi anomalie come l’oloprosoencefalia, una complessa malformazione suddivisibile in tre forme in base alla severità, alobare, semilobare e lobare, caratterizzate dalla mancanza completa o parziale dei due emisferi per mancata o incompleta divisione del prosencefalo (32).

Il terzo periodo, compreso tra le otto e le sedici settimane, vede lo sviluppo del corpo calloso, la divisione delle cellule neuro-epiteliali nella zona ventricolare e la loro migrazione a formare la corteccia cerebrale. Inizia anche il differenziamento cellulare e le cellule ependimali, gliali e i neuroni acquisiscono le loro caratteristiche morfologiche. In questo periodo possono insorgere anomalie cito-architettoniche o agenesia del corpo calloso (32).

Il quarto, ed ultimo periodo, corrispondente alla seconda metà della vita fetale, è caratterizzato da un progressivo aumento del volume dei neuroni, sviluppo delle fibre afferenti e proliferazione delle cellule gliali con conseguente aumento della superficie corticale con formazione di solchi, infine si verifica la mielinizzazione. Fattori ambientali e processi patologici si verificano in questo periodo. Dopo la nascita i principali eventi sono la mielogenesi e la proliferazione gliale (32).

Il peso medio dell'encefalo alla nascita è di 400g, per poi aumentare, gradualmente fino ai 18 anni in seguito alla continua formazione di connessioni sinaptiche, produzione di cellule di nevroglia e ispessimento delle guaine mieliniche, raggiungendo un peso medio di 1360 g nell'uomo e 1275 g nella donna (30).

Il sistema nervoso è un complesso network che permette all'organismo di interagire con l'ambiente circostante. Nel dettaglio il sistema nervoso centrale è diviso in encefalo e in midollo spinale. Il primo è suddiviso a sua volta in quattro parti quali il tronco encefalico formato da midollo allungato, ponte e mesencefalo; il cervelletto; il diencefalo con talamo e ipotalamo e i due emisferi cerebrali (telencefalo) compresi all'interno della corteccia cerebrale (34). Il midollo spinale è l'estensione caudale del sistema nervoso centrale. Si tratta di una struttura grossomodo cilindrica vagamente segmentata di 1cm di diametro e di 42-45 cm di lunghezza estesa all'interno del canale vertebrale continuando con il midollo allungato (32, 35). Tra il cervelletto e il midollo allungato (detto anche bulbo) è localizzato il quarto ventricolo, una dilatazione del canale ependimale compresa tra il bulbo anteriormente e il cervelletto posteriormente (32). L'organizzazione anatomica sopradescritta è riprodotta in modo schematico nella Figura 11.

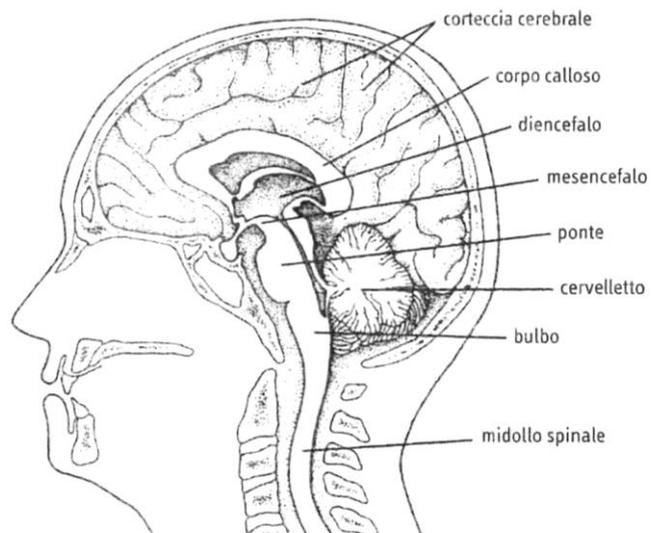


Figura 11: Rappresentazione delle principali strutture del Sistema Nervoso Centrale
(Fabbro F., "Manuale di neuropsichiatria infantile, Una prospettiva psicoeducativa", Carocci editore, 2019)

1.2.3 Focus sul Tronco Encefalico

Il tronco encefalico si estende in cavità cranica delimitato rostralmente dal diencefalo e caudalmente dal midollo spinale ed è collegato al cervelletto mediante i peduncoli cerebellari. In direzione caudo-rostrale è formato dal midollo allungato, ponte e mesencefalo che condividono fasci di fibre nervose (35).

Il midollo allungato si estende, nell'adulto, per circa 3 cm dalla decussazione delle piramidi sino al solco bulbo pontino, che lo separa dal ponte. Tale struttura anatomica possiede quattro rilievi sulla faccia antero-laterale quali due piramidi bulbari determinate dal passaggio dei fasci cortico-spinali, e due olive bulbari corrispondenti in profondità ai nuclei olivari inferiori. Le due piramidi sono separate tra di loro dalla fessura mediana anteriore che si estende dalla decussazione delle piramidi al forame ovale (o obex), mentre risultano distinte dalle olive bulbari grazie al solco anterolaterale (35).

Sulla faccia posteriore, in porzione caudale sono presenti il tubercolo gracile e cuneato, mentre nella porzione craniale il triangolo inferiore della fossa romboidea del pavimento del quarto ventricolo (35).

Il ponte, lungo circa 2.5 cm, unisce i due emisferi cerebrali ed è suddiviso in due parti quali la ventrale e la dorsale. La parte basale, attraversata medialmente dal solco basilare, è una stazione sinaptica che permette la connessione tra la corteccia di un emisfero e quella dell'altro assicurando la massima efficienza dei movimenti volontari. La parte dorsale è simile al midollo allungato e al mesencefalo dato che in tale posizione si ritrovano le vie ascendenti e discendenti ed i nuclei dei nervi encefalici (30).

Il mesencefalo, lungo circa 1.5 cm si estende dal ponte al diencefalo, è costituito da una colonna bianca da entrambi i lati che costituisce il piede del peduncolo e dalla fossa interpeduncolare che è rappresentata dalla depressione tra le due colonne. Sulla superficie laterale è osservabile soprattutto il peduncolo cerebrale e sulla superficie dorsale quattro rilievi quali la coppia di collicoli inferiori e la coppia di collicoli superiori (30).

La composizione anatomica del tronco encefalico, in particolare la superficie laterale, è osservabile in Figura 12.

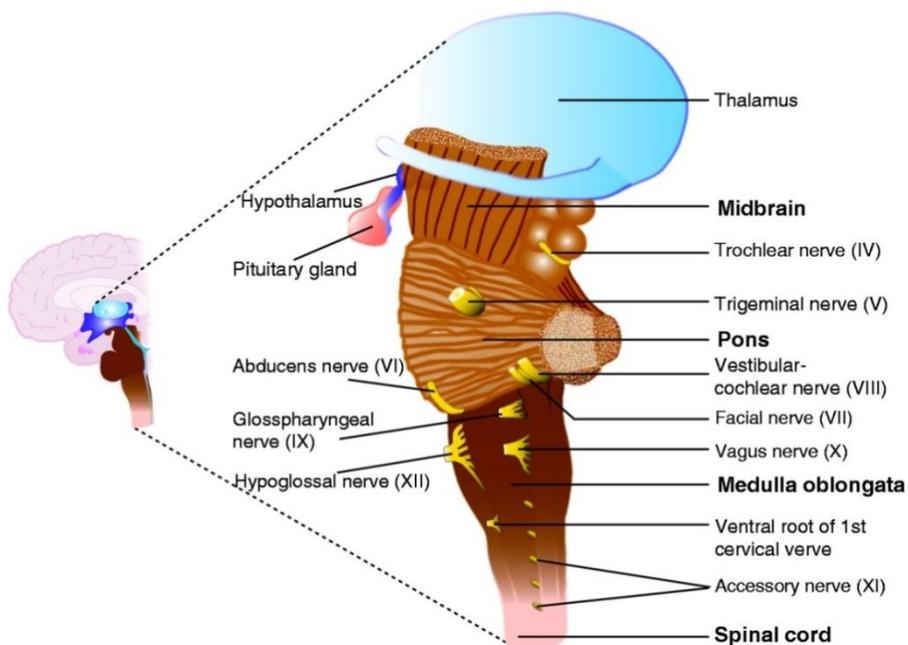


Figura 12: Organizzazione anatomica del tronco encefalico.
 (Vila-Pueyo Marta, Hoffmann Jan ed al., "Brain structure and function related to headache: Brainstem structure and function in headache", *Sage Journals*, 2018)

Dalla superficie laterale, come si osserva nella sovrastante Figura 12, e ventrale del tronco encefalico emerge la maggior parte dei nervi cranici, fanno eccezione i primi due che emergono rispettivamente dal telencefalo e dal diencefalo. La Figura 13 delucida la posizione e la rispettiva nomenclatura dei nervi cranici, mostrando come sette dei nervi cranici emergono dal midollo allungato (36).

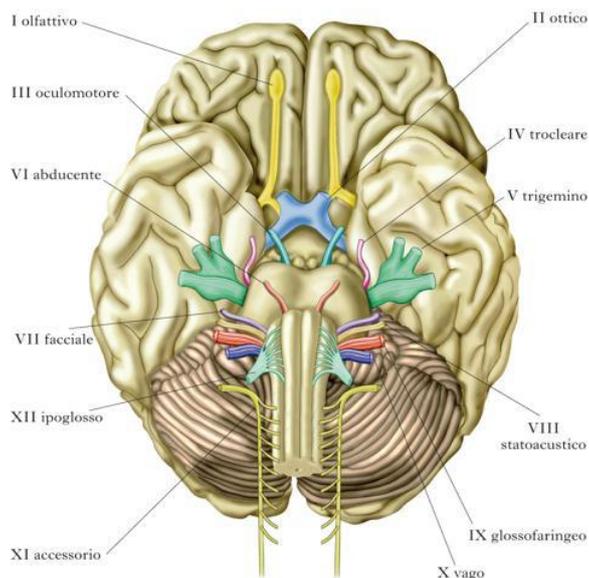


Figura 13: Rappresentazione dei 12 nervi cranici (36)

Il tronco encefalico è attraversato da tratti di proiezione ascendenti e discendenti lungo i quali si ritrovano i nuclei propri (nucleo gracile, cuneato, cuneato accessorio, il complesso olivare inferiore e i nuclei pre-olivari), ed è percorso per tutta la lunghezza dalla formazione reticolare (35).

Il network respiratorio

I centri che controllano la respirazione sono distribuiti nel ponte, midollo allungato e nella porzione di midollo spinale confinante. Tali centri sono collegati tra di loro formando una rete “network respiratorio” che permette di generare i movimenti ventilatori, grazie alle sinapsi tra i vari neuroni. A differenza delle altre strutture respiratorie queste devono già essere sviluppate al termine della gravidanza per consentire i primi atti respiratori (4).

Le principali strutture appartenenti al network sono il nucleo intermedio laterale nel tratto rostrale del midollo spinale, il nucleo di Kölliker-Fuse a livello del ponte rostrale, il complesso facciale/parafacciale (cF/PF) in corrispondenza del ponte caudale e il nucleo pre-Bötzinger nel midollo allungato in prossimità dell’obex (4). La Figura 14 mostra la posizione delle strutture sopracitate e la loro rispettiva posizione in corrispondenza delle varie sezioni di tronco encefalico ottenute in fase di campionamento.

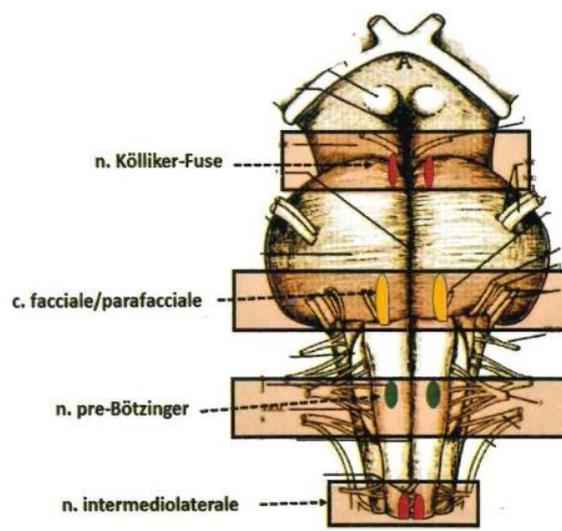


Figura 14: Localizzazione dei componenti del network respiratorio (4)

Il nucleo intermedio laterale è considerato la sorgente dell'attività respiratoria essendo responsabile dello sviluppo polmonare del feto e di promuovere i primi impulsi respiratori (4).

Il nucleo di Kölliker-Fuse, una componente funzionalmente distinta del complesso parabranchiale, ha un ruolo cruciale nella coordinazione della respirazione non solo in condizioni di normossia, ma anche in situazioni di alta concentrazione di anidride carbonica o bassa di ossigeno. Tale nucleo fu descritto nel 1923 da Lumsden come "inspiratory off-switch" importante nella transizione tra inspirazione ed espirazione, giocando un ruolo centrale nel controllo neuronale del respiro. In aggiunta potrebbe essere coinvolto nella regolazione del risveglio intervenendo nel chemoriflesso ipossico/ipercapnico (37).

A livello di tale nucleo sono espressi diversi recettori e trasportatori di neurotrasmettitori tra i principali il glutammato, eccitatorio, il cui recettore ionotropico NMDA influenza lo stato sonno-veglia e interviene in condizioni di ipossia; l'acido gamma-aminobutirrico (GABA), inibitorio, il cui recettore ha un ruolo cruciale nella regolazione della coordinazione sequenziale dei processi respiratori; l'acetilcolina, coinvolta nella ventilazione polmonare e nella regolazione della frequenza respiratoria durante la notte; la serotonina che regola le vie aeree superiori e controlla il pattern della respirazione. Oltre ai neurotrasmettitori sono espressi anche i recettori di alcuni neuro peptidi come l'orexina, eccitatorio, che regola tra le varie funzioni lo stato sonno-veglia ed è probabilmente associata a disordini del sonno (narcolessia) e all'apnea notturna; e la somatostatina che ha un ruolo nel controllo cardiorespiratorio non propriamente noto (37).

Il complesso facciale/parafacciale (cF/PF) definito dall'insieme del nucleo facciale e del nucleo parafacciale dato che i loro neuroni sono mixati, rappresenta il secondo centro respiratorio a livello cerebrale definito il più importante generatore di ritmo respiratorio neuronale, capace di attivare i neuroni del nucleo pre-Bötzinger identificando così la sua attività come pre-inspiratoria oltre che espiratoria (38).

Il nucleo pre-Bötzinger (NpB), facente parte del complesso pre-Bötzinger (pBC) è fondamentale per la ritmogenesi respiratoria, ma diversi studi hanno dimostrato che per la generazione del ritmo respiratorio sono necessarie anche delle cellule

pacemaker (39). Il complesso pBC oltre a contenere neuroni coinvolti nella genesi del ritmo respiratorio e nella modulazione della respirazione eupnoica, ha un ruolo essenziale anche nel controllo di tutte le funzioni vitali (40).

La Figura 15 illustra varie sezioni trasversali del tronco encefalico in direzione rostro-caudale identificando la localizzazione dei nervi cranici, dei fasci di fibre ascendenti e discendenti e dei principali nuclei.

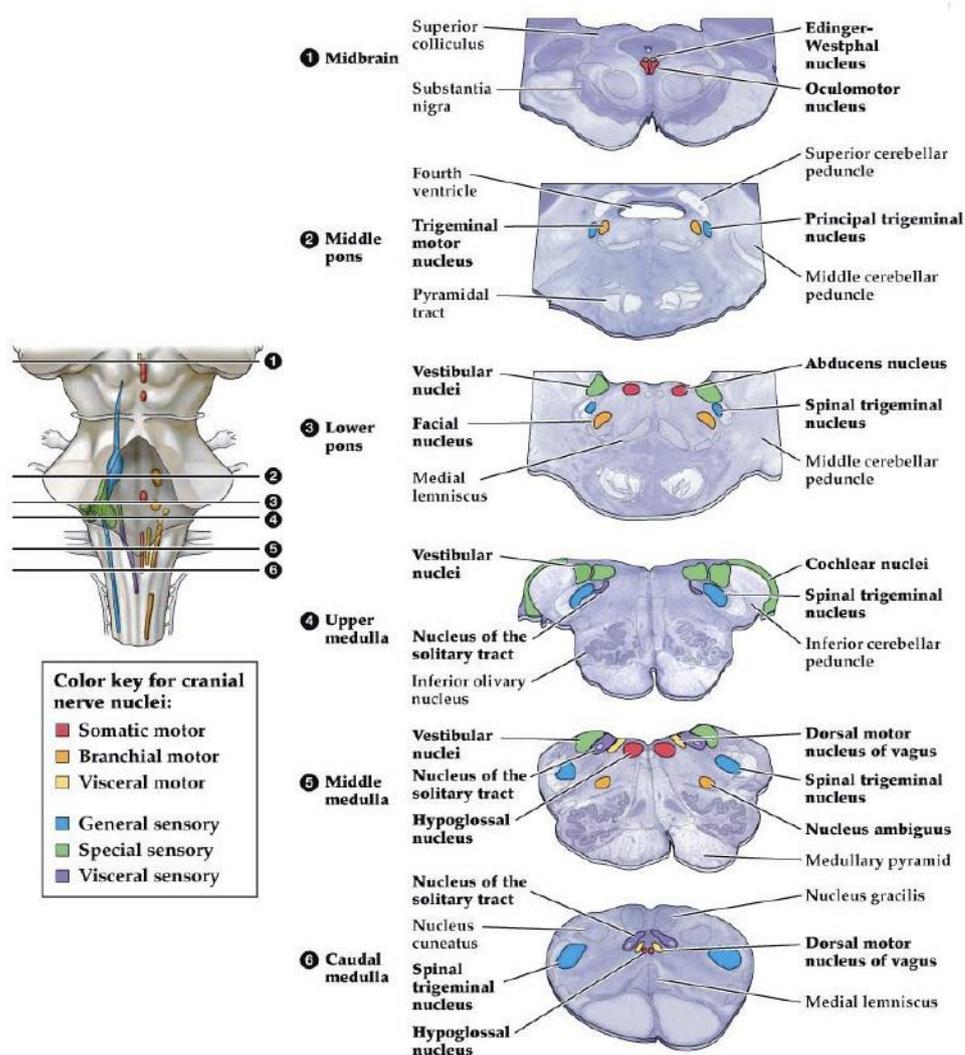


Figura 15: Sezioni trasversali a livello del tronco encefalico mostrando la localizzazione dei nervi cranici, fasci di fibre ascendenti e discendenti e dei principali nuclei

(Lab.4-Nerve and neuromodulatory nuclei of the brain stem, Location of the cranial nerve nuclei, Duke University Medical School, <https://brain.oit.duke.edu/lab04/lab04.html>)

1.2.4 Le strutture chemorecettoriali (SCR)

I chemorecettori respiratori centrali sono un insieme di cellule sensibili ai cambiamenti di PCO_2 (pressione parziale dell'anidride carbonica) e al pH cerebrale, e contribuiscono alla stimolazione respiratoria indotta da condizioni di ipercapnia e acidosi metabolica (41). La chemorecezione centrale è associata al mantenimento di una PCO_2 arteriosa normale e di un pH costante, regolando la ventilazione alveolare. Oltre a questo ruolo cruciale, essa influenza anche la resistenza delle vie aeree, la pressione sanguigna e la sensibilità allo stato di eccitazione. Tali chemorecettori erano ritenuti essere localizzati solo sulla superficie ventrale della medulla, mentre oggi è noto che sono presenti anche a livello del tronco encefalico, cervelletto, ipotalamo e mesencefalo (42).

Diverse sono le strutture chemorecettoriali espresse a livello del tronco cerebrale che sono finalizzate al controllo della respirazione dopo la nascita essendo coinvolte nella continua rilevazione di CO_2/H^+ nel liquido interstiziale, e nella trasmissione delle informazioni ai vari componenti del network respiratorio che agiscono per la regolazione dei parametri. Tra queste, le principali, sono i nuclei del rafe nel tronco cerebrale, il nucleo di Kölliker-Fuxe a livello del ponte rostrale, il nucleo retro-trapezoide in posizione caudale del ponte, il nucleo arcuato nel midollo allungato dove è localizzata anche l'area postrema, e l'ependima in corrispondenza dei ventricoli e del canale centrale (4).

I nuclei del rafe appartengono al sistema reticolare ascendente, in particolare sono distribuiti nella zona mediana e paramediana del tronco encefalico. Studi di immunofluorescenza e di immunoistochimica hanno rivelato la presenza di neuroni di serotonina (5 Idrossitriptamina; 5-HT) in questi nuclei classificati da Dahlström e Fuxe in nove gruppi di cellule (B1-B9). Il gruppo B1 è espresso a livello del nucleo di rafe pallidus nella zona ventrale della medulla allungata; il B2 si estende a livello del nucleo di rafe obscurus soprattutto in posizione dorsale; il B3 è espresso entro i confini del nucleo di rafe magnus; il B5 nel nucleo di rafe pontis; il B6 e B8 a livello del nucleo centrale superiore e il B7 nel nucleo di rafe dorsale (43).

La Figura 16 esplica la posizione dei nuclei del rafe (in rosa) e dell'intera formazione reticolare (zona mediana corrispondente ai nuclei del rafe, zona laterale e zona mediale).

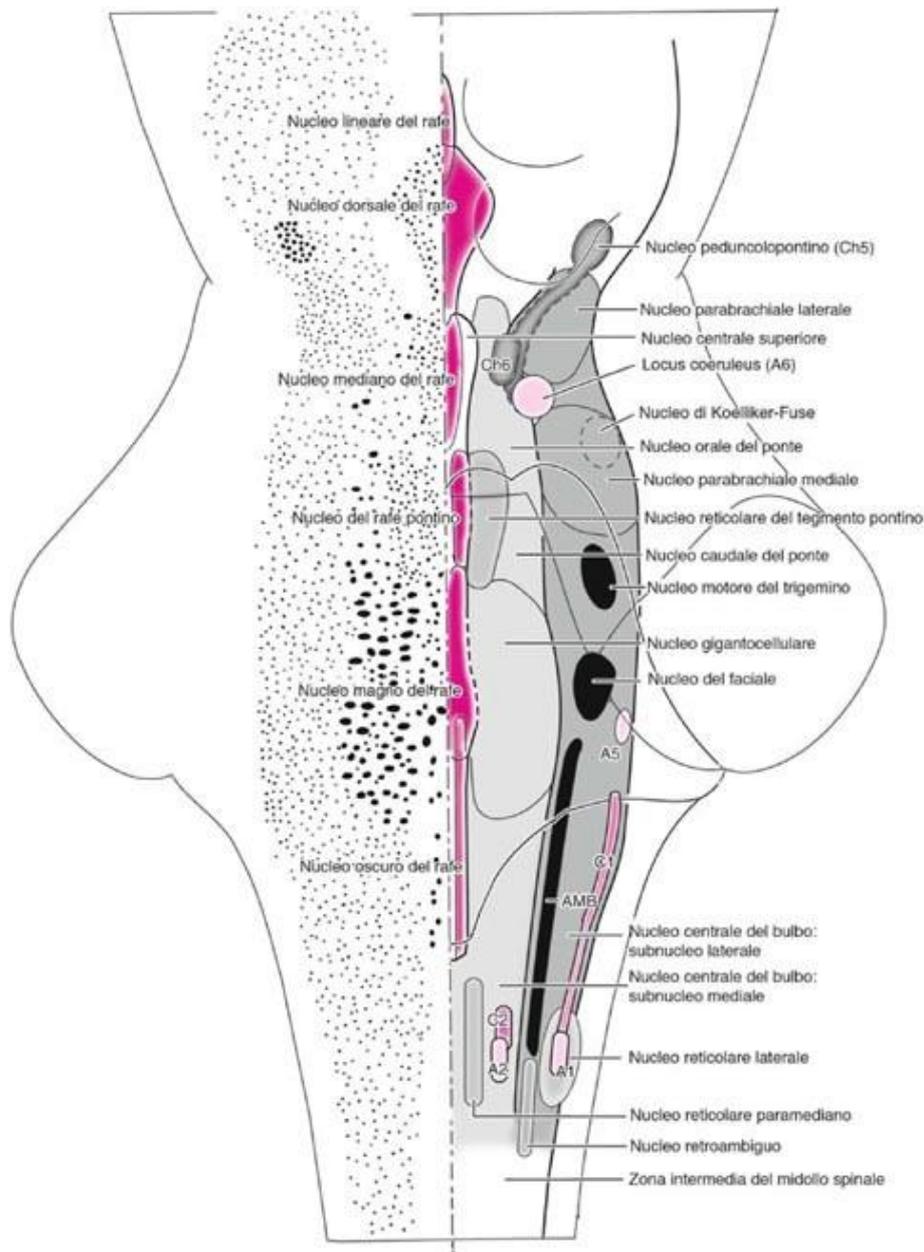


Figura 16: La formazione reticolare. Rappresentazione semischematica in proiezione dorsale del tronco encefalico. Sinistra, citoarchitettura; destra, suddivisioni della formazione reticolare (campo tegmentale mediale, grigio chiaro; campo tegmentale laterale, grigio scuro), i nuclei del rafe (rosso), i gruppi cellulari noradrenergici A1–A6 (rosso chiaro), i gruppi adrenergici C1 e C2 (rosso medio) e i gruppi cellulari colinergici Ch5 e 6 (grigio). AMB, nucleo ambiguo

(Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijzen C., “Formazione reticolare e gruppi cellulari monoaminergici e colinergici”, Springer Nature, 2010)

La serotonina è un neurotrasmettitore sintetizzato dal triptofano, che è un aminoacido essenziale, a livello dei neuroni serotoninergici nel sistema nervoso centrale e nelle cellule entero-cromaffini nell'apparato gastrointestinale. Si tratta di una triptamina coinvolta in molte funzioni biologiche come, ad esempio, la

regolazione dei ritmi circadiani o la sincronizzazione del ciclo sonno-veglia con le fluttuazioni quotidiane oltre che ad agire sul sistema cardiovascolare così come a livello del SNC (44). Esistono due tipi di recettori serotoninergici, uno accoppiato a canali ionici (5-HT₃) ed uno a proteine G tra cui si distinguono quelli che possiedono la fosfatasi alcalina come secondo messaggero (5-HT₂) e quelli che hanno l'AMP ciclico (5-HT_{1,4,5,6,7}) (45). Tra questi recettori il 5-HT_{1A} e il 5-HT_{2A} risultano essere collegati alla SIDS dato che mediante l'immunoistochimica si osserva una diminuzione della loro espressione (1).

I nuclei del rafe vengono suddivisi in due gruppi, quali caudale e rostrale, il complesso caudale insieme alla serotonina sono considerati importanti modulatori dell'*arousal*, ventilazione, chemorecezione, funzione autonoma, riflessi delle vie aeree superiori e termoregolazione, uno squilibrio di questo network potrebbe rendere un bambino maggiormente vulnerabile a morte improvvisa durante il sonno (46).

Il nucleo retrotrapezoide (NRT) è uno dei principali siti di chemorecezione centrale, la cui attività ventilatoria è stimolata dall'acidificazione. Diversi studi hanno mostrato come una lesione o inibizione di tale nucleo causi una drastica riduzione della respirazione e come tale nucleo non risponda solo ai livelli di CO₂ nel fluido extracellulare nel cervello, ma anche alla composizione di gas nel sangue rilevata da chemorecettori periferici; quindi, sembra avere un ruolo nell'integrazione delle informazioni dei chemorecettori periferici e centrali. Varie evidenze hanno mostrato come i neuroni NRT coinvolti nel chemoriflesso esprimono l'*homeobox* PHOX2B che rappresenta quindi un marcatore selettivo di tale nucleo (47).

Il nucleo arcuato (ARC) si trova sulla superficie della piramide, nel dettaglio sulla superficie ventrale della medulla compreso tra il polo caudale dell'oliva inferiore e il bordo caudale del ponte, e da esso dipartono fibre fino al cervelletto, alcune percorrendo la superficie laterale del midollo allungato come fibre arcuate esterne, altre dorsalmente lungo la linea mediana del midollo allungato lateralmente nelle strie midollari del pavimento del quarto ventricolo (12,30). L'ARC agevola la chemio sensitività alla CO₂ e agli ioni idrogeno, è considerato per questo il centro della chemiosensività, ventilazione, funzioni autonome e del risveglio oltre ad avere un ruolo nel regolare la pressione sanguigna, nonché la frequenza e il ritmo

cardiaco. L'ipoplasia di tale nucleo può causare dissenergia cardio-ventilatoria, alterazione delle risposte all'ipercapnia, controllo emodinamico aberrante, chemio sensibilità difettosa alla CO₂, alterate risposte di risveglio e di difesa e pervietà delle vie aeree (12).

La Figura 17 mostra la localizzazione del nucleo arcuato, principale centro cardio-ventilatorio, in una sezione trasversale di midollo allungato circa a all'altezza dell'oliva che illustra anche le altre strutture anatomiche presenti a tale livello.

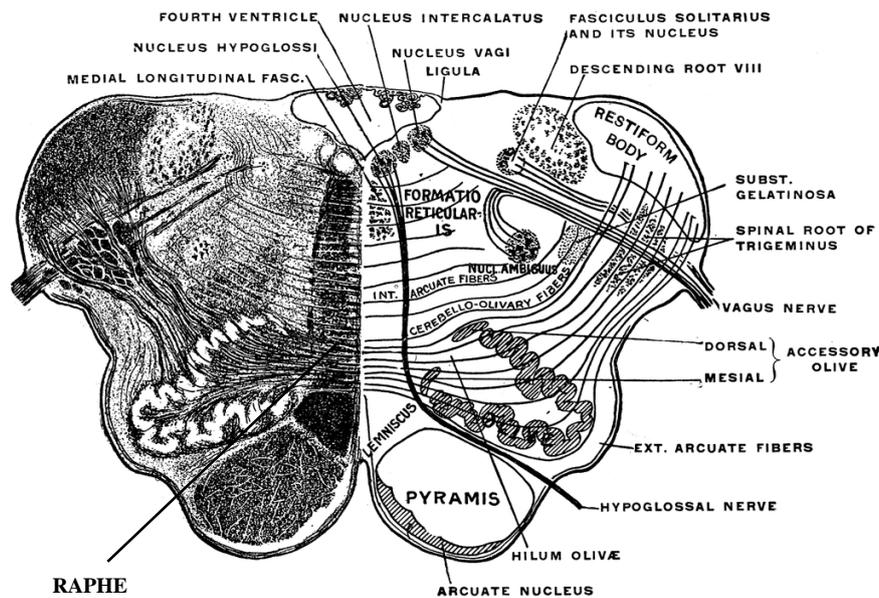


Figura 17: Sezione del midollo allungato a circa metà dell'oliva
(Gray, "Henry Gray's Anatomy: Descriptive and applied", Lea & Febiger, Philadelphia, 1913)

L'area postrema è una struttura bilaterale localizzata nella porzione caudale dell'encefalo, a livello del limite infero-posteriore del quarto ventricolo, è una delle regioni cerebrali più riccamente vascolarizzate nei mammiferi e rappresenta l'unico accesso alla circolazione dovuto alla presenza di capillari fenestrati. Da anni è nota la sua associazione con il riflesso emetico, ma studi recenti hanno rilevato anche il suo ruolo nella regolazione di molte funzioni vitali come il controllo cardiovascolare e l'attività respiratoria (48).

L'ependima rappresenta il rivestimento dei ventricoli cerebrali e del canale centrale del midollo spinale ed è costituito da uno strato ininterrotto di cellule gliali, le cellule ependimali. Fornisce una barriera protettiva e un sistema di filtraggio tra il parenchima cerebrale e il liquido cerebrospinale (49).

1.3 Correlazione SNC e SIDS

Anomalie a carico del sistema cardio-respiratorio autonomo nervoso giocano un ruolo chiave nell'innescare la morte riflessogena. Un certo numero di alterazioni congenite e/o acquisite a livello del sistema nervoso centrale e periferico possono essere considerate alla base o come concause della morte improvvisa (50).

Ipoplasia o agenesia di uno o più nuclei respiratori sono spesso riscontrati in lattanti deceduti improvvisamente in quanto una loro alterazione può causare un inefficace controllo della ventilazione e del ritmo sonno-veglia (4).

Studi epidemiologici hanno collegato infatti la SIDS con la fase del sonno dato che nella maggior parte dei casi si verifica durante il sonno notturno o nel passaggio tra sonno e (mancato) risveglio (*arousal*) (12).

Tra i nuclei maggiormente studiati figura il nucleo arcuato, che già nel 1992, con uno studio di Filiano e Kinney era stato connesso alla morte improvvisa dato che una sua ipoplasia è associata a dissinergia tra la coordinazione cerebellare della ventilazione e l'*arousal* e chemio sensitività soprattutto durante il sonno e nel periodo critico di sviluppo. Tale studio ha classificato l'ipoplasia/aplasia del nucleo arcuato come fattore di rischio per la SIDS poiché impedisce di avere l'assetto neuronale completo e di conseguenza un'appropriata transizione cardio-ventilatoria o un controllo dell'*arousal* durante questo periodo critico della vita del lattante (12). Uno studio del 2002 condotto da Maturri, Biondo ed altri, ha investigato le caratteristiche morfometriche, cioè volume, densità neuronale e numero totale di neuroni, del nucleo arcuato di 62 infanti morti per SIDS e di 25 controlli di età comparabile morti per causa nota. Da tale studio emerse che il 56% dei casi mostrava ipoplasia del nucleo arcuato con variazioni di lunghezza e nel numero delle popolazioni neuronali. In aggiunta rivelava anche una riduzione dei recettori della serotonina localizzati non solo nel nucleo dei casi SIDS, ma anche nelle altre strutture midollari. Lo studio concluse che la maturazione neuronale era anormale nei casi, mostrato dall'ipoplasia, dalla deficienza neuronale e dal legame dei neurotrasmettitori. Questo potrebbe rendere un infante vulnerabile a morte improvvisa per difetti nel riflesso respiratorio ad asfissia e ipercapnia concomitante alla posizione prona del bambino durante il sonno (50).

La posizione prona è associata ad un aumento di rischio di respirare nuovamente i gas espirati causando ipercapnia e ipossia, oltre ad aumentare il rischio di surriscaldamento con innalzamento della temperatura corporea, in misura maggiore rispetto alla posizione supina. Dormire proni altera il sistema cardiovascolare del bambino in particolare tra i 2/3 mesi d'età e diminuisce l'ossigenazione cerebrale (51).

Sulla base di tutte queste considerazioni, nel 2004, è stato ritenuto che il protocollo dell'autopsia per le vittime SIDS debba includere anche la valutazione del sistema nervoso autonomo (52).

La Figura 18 mostra le differenze di sviluppo del nucleo arcuato tra un caso SIDS (18.A) ed un infante di controllo di età comparabile (18.B).

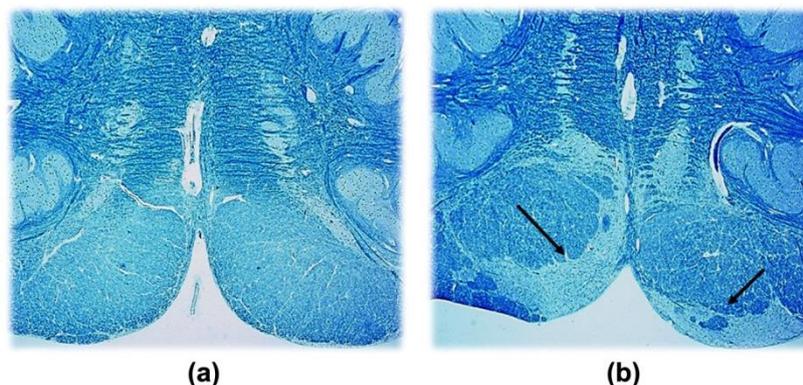


Figura 18: Sezione trasversale del midollo allungato ottenuta con colorazione Klüver-Barrera. A: Ipoplasia del nucleo arcuato in un caso SIDS (ingrandimento 10x). B: Nucleo arcuato normo strutturato in un controllo di pari età (ingrandimento 10x).

(Lavezzi ed al., "Orexin expression in the Kölliker-Fuse nucleus", *NeurologicalResearch*, 2016 [modificata])

Le strutture anatomiche coinvolte nella morte improvvisa non sono però confinate al solo nucleo arcuato, ma includono anche anomalie del nucleo intermedio laterale, del nucleo di Kölliker-Fuse, del complesso facciale/parafacciale, del nucleo pre-Bötzing, dei nuclei del rafe, del nucleo retro-trapezoide, dell'ependima e dell'area postrema (4).

Uno studio del 2010 condotto da Lavezzi ha mostrato vari gradi di iposviluppo del nucleo intermedio laterale comprendenti immaturità neuronale, ipoplasia o agenesia, riscontrati quasi esclusivamente in infanti morti improvvisamente e inaspettatamente. Il medesimo studio ha rivelato come l'esposizione prenatale alla nicotina alteri lo sviluppo dei centri nervosi autonomi dalle prime settimane

gestazionali quando, ad esempio, l'integrità del nucleo intermedio laterale è essenziale per l'attuazione dei primi atti respiratori (53).

Il nucleo di Kölliker-Fuse esercita un'attività inibitoria della respirazione durante la vita fetale per poi convertirsi dopo la nascita in un centro attivo per la facilitazione respiratoria. Uno dei primi studi, condotto nel 2004 da Lavezzi ed altri non aveva rilevato differenze morfologiche statisticamente significative di questa struttura anatomica tra i casi SIDS e i controlli (54).

È noto che la SIDS sia caratterizzata da morte improvvisa di un lattante, apparentemente sano, durante il sonno a causa di un deficit nella fase del risveglio che richiede un network respiratorio completamente sviluppato per regolare la ventilazione. Il nucleo di Kölliker-Fuse è cruciale nel controllo della respirazione avendo connessioni con neuroni serotoninergici e noradrenalinici lungo il tronco encefalico, ma risulta essere anche una componente fondamentale del sistema dell'orexina coinvolta nella fase del risveglio. Lo studio che ha dimostrato tale implicazione del nucleo KF è stato condotto nel 2016 da Lavezzi ed altri, questo aveva confermato la mancanza di differenze morfologiche tra casi e controlli come illustrato dagli studi precedenti, ma mostrava una negatività del recettore dell'orexina (OxR1) mediante l'immunoistochimica nei casi SIDS rispetto ad una positività nei controlli. Ritenendo il nucleo KF il primo bersaglio dei neuroni ipotalamici a ricevere il segnale di eccitazione e coordinare le altre strutture coinvolte nel sistema dell'orexina per regolare la transizione sonno-veglia, un'alterata espressione dell'orexina a tale livello potrebbe causare gravi implicazioni nella patogenesi della SIDS (55).

Alterazioni del complesso facciale/parafacciale sono frequentemente ritrovate in infanti incomprensibilmente nati morti, ma non in casi di SIDS; quindi, data l'esclusiva presenza di ipoplasia del cF/PF nella fase prenatale, quest'alterazione è considerata un marcatore della nati-mortalità inspiegabile (38).

Un'elevata percentuale di alterazioni strutturali e/o funzionali del complesso pre-Bötzinger è osservata in una significativa percentuale di casi di morte improvvisa, specialmente nelle morti improvvise nel periodo tardo-fetale. Uno studio del 2008 condotto da Lavezzi e Maturri su 63 infanti ha rivelato la presenza di ipoplasia o

agenesia nell' 83% dei casi SUDI che potrebbe essere correlata a difetti dell'attività respiratoria nella vita prenatale (40).

Il nucleo retro-trapezoide nei soggetti normali contiene un gruppo di neuroni PHOX2B immuno-positivi all'interno della regione caudale del ponte, ma un'anomala espressione di tale marcatore o alterazioni strutturali sono state osservate nel 71% dei casi SIUD/SIDS rispetto ad un 10% dei controlli su un totale di 58 infanti. Questi risultati permettono di suggerire che anomalie a carico del nucleo retro-trapezoide compromettono il controllo chemorecettoriale giocando un ruolo importante nella patogenesi della SIUD e della SIDS (47).

Sono osservati diversi cambiamenti patologici a carico dell'ependima nelle vittime di morte improvvisa, spesso correlate al fumo materno durante la gravidanza. Le alterazioni maggiormente osservate nei casi SIDS sono la desquamazione dell'ependima, aumento del numero di tanciti indicativi di maturazione ependimale ritardata, invaginazione e presenza di noduli nello strato subependimale ed alterazione del numero di cellule ependimali con ciglia (49).

A livello dell'area postrema di feti e infanti morti improvvisamente vi è una più alta incidenza di alterazioni rispetto ai controlli di età comparabile, tra cui ipoplasia, mancanza di vascolarizzazione, formazione di cisti e reattiva gliosi, collegate al fumo materno, e riscontrate nel 67% dei casi. L'ipoplasia e la mancanza di capillari è interpretabile come uno sviluppo ritardato e questo potrebbe impedire il rilascio di neurotrasmettitori e l'assorbimento di elementi essenziali nel sangue e nei soluti, alterando così le funzioni vitali (48).

Uno studio realizzato nel 2009 da Lavezzi ed altri su una coorte di 28 casi SIDS, 12 casi SIUD e 17 controlli ha rivelato come l'ipoplasia di uno o più nuclei caudali o rostrali del rafe sia presente nel 57% dei casi SIDS, nel 67% delle SIUD e solo nel 24% dei controlli. Il medesimo studio, oltre ad analizzare lo sviluppo dei nuclei del rafe, ha studiato l'espressione della serotonina in tale area anatomica mostrando una diminuzione dell'espressione dei recettori della triptamina in questione nella zona medullare e un aumento del numero e della densità del corpo cellulare della serotonina particolarmente nel nucleo pallidus del rafe (56). La Figura 19 mostra le varie anomalie nell'espressione dei marcatori della serotonina, tra cui si osserva una riduzione significativa del recettore 5HT1A nei casi SIDS rispetto ai controlli

(19.A), un aumento del numero di neuroni 5HT (19.B), un aumento della frazione granulare che è un indice di immaturità e una diminuzione della frazione multipolare che è indicativa di un buon grado differenziativo, suggerendo quindi la complessiva immaturità neuronale (19.C) e riduzione dei trasportatori 5HTT (19.D).

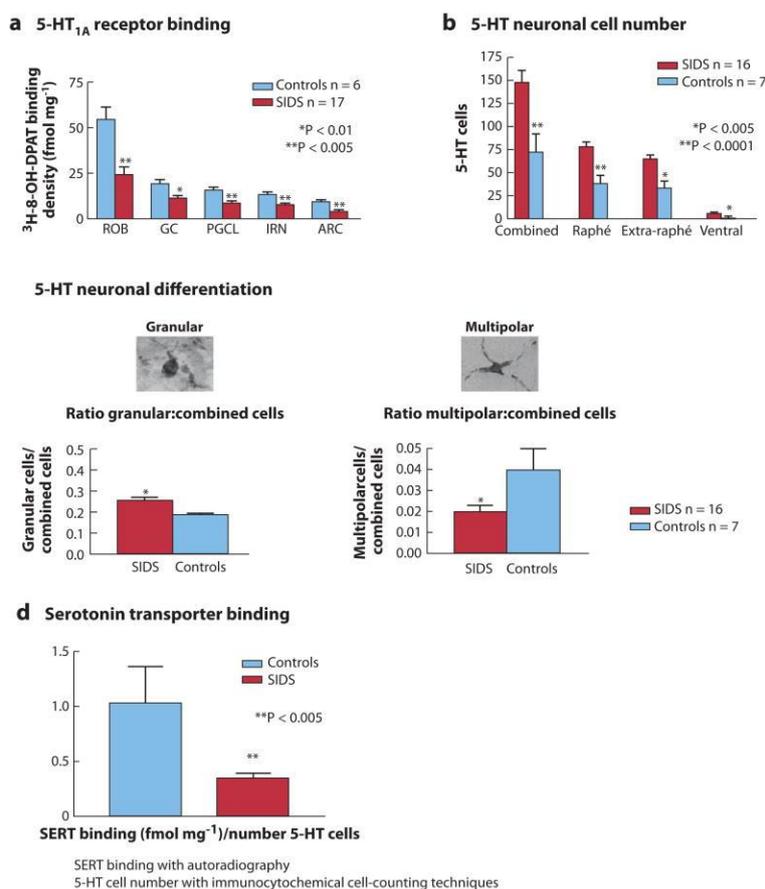


Figura 19: Multiple anomalie dei marcatori della serotonina in casi SIDS comparati con controlli. ARC: Nucleo Arcuato, ROB: Nucleo Obscurus del Rafe, GC: Cellule Gangliari, IRN: Nucleo Reticolare Intermedio; PGCL: Paragiantocellulare laterale (Kinney H.C, Richerson G.B ed al., "The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome", *Annual Review of Pathology*, 2009,4:517-50)

L'immaturità neuronale può essere valutata mediante l'utilizzo di uno specifico marker neuronale, l'antigene neuronale nucleare (NeuN), utile per la valutazione del differenziamento neuronale e del diverso stato funzionale dei neuroni. I vantaggi collegati all'utilizzo di NeuN come marcatore neuronale sono dovuti alla sua espressione esclusivamente a livello del tessuto nervoso, a differenza di altri marcatori che sono espressi anche in altre cellule; alla mancata espressione nei progenitori neuronali immaturi e al fatto di essere l'unico, tra i marcatori neuronali, ad esprimersi a livello nucleare (57).

NeuN è un fattore di trascrizione espresso a livello nucleare e citoplasmatico dei neuroni in stato post-mitotico quando iniziano a differenziarsi in cellule mature funzionalmente e morfologicamente, per cui una negatività delle cellule a NeuN è indice di immaturità a differenza di una forte positività che rappresenta neuroni in buono stato di salute (58).

La Figura 20 illustra i casi di ipoplasia osservati nelle vittime SIDS, SIUD e nei controlli, mostrando la prevalenza di tale alterazione a carico del nucleo obscurus del rafe (ObR) e del caudale lineare (CliR).

Number of cases with hypoplasia (%)	Rostral raphe group			Caudal raphe group		
	CliR	DoR	MeR	MaR	ObR	PaR
SIDS						
8 (29%)	+	-	+	-	+	-
3 (11%)	+	-	-	-	+	-
1 (4%)	+	-	-	-	-	-
2 (7%)	-	+	-	+	-	-
1 (4%)	-	-	+	-	-	+
1 (4%)	-	-	-	-	+	-
Infant controls (n = 11)						
3 (27%)	-	-	-	-	+	-
SIUD						
5 (42%)	+	-	+	-	+	-
2 (17%)	+	-	-	-	+	-
1 (8%)	-	-	-	-	+	-
Fetal controls (n = 6)						
1 (17%)	-	-	-	-	+	-

Figura 20: Distribuzione dei casi di ipoplasia osservati totalmente in 16/28 SIDS (57%), 8/12 SIUD (67%) e 4/17 controlli (24%). CliR: Nucleo caudale lineare del rafe, DoR: Nucleo dorsale del rafe, MeR: Nucleo mediano del rafe, MaR: Nucleo magnus del rafe, ObR: Nucleo obscurus del rafe, PaR: Nucleopallidus del rafe (56)

Lo studio sopracitato di Lavezzi è stato anche il primo a stabilire una correlazione tra difetti dei nuclei del rafe e polimorfismi nella regione promotrice dei trasportatori della serotonina nei casi SIDS e SIUD (56).

Già nel 2001 era stato illustrato come variazioni a carico della regione promotrice del gene che codifica per il 5-HTT fossero associate ad un'alterazione della regolazione dell'attività della serotonina a livello cerebrale. Erano state osservate differenze statisticamente significative nella distribuzione e frequenza allelica a livello della regione promotrice della serotonina tra le vittime SIDS ed i controlli. Le varianti alleliche individuate erano la L, XL e S, le prime due maggiormente espresse nei casi SIDS rispetto ai controlli. Sapendo che l'efficienza di trasporto della serotonina era maggiore con l'espressione dell'allele L rispetto all'allele S, nei casi SIDS la funzione eccitatoria della 5HT era inferiore a livello respiratorio rispetto ai controlli con l'allele S (59).

In riferimento allo studio del 2009, rivela come un'alta percentuale di casi SIDS o SIUD con genotipo L/L o L/S del 5HTT mostri l'ipoplasia di uno o più dei nuclei del rafe suggerendo come l'allele L sia correlato ad un iposviluppo di tali nuclei. Dal momento in cui i neuroni serotonergici sono coinvolti nel meccanismo respiratorio, lo studio ha concluso che l'ipoplasia di almeno uno dei nuclei del rafe, osservato in una grande percentuale di casi SIDS, potrebbe causare dei difetti a livello del complesso serotonergico impedendo la respirazione eupnoica con conseguente successiva morte. Perciò il genotipo 5HTT L rappresenta un fattore predisponente per la morte improvvisa data la sua associazione con difetti di sviluppo dei nuclei del rafe (56).

La Figura 21 mostra un insieme generale delle alterazioni osservate nei casi SIDS/SIUD con le relative frequenze osservate nello specifico nello studio descritto precedentemente del 2009 di Lavezzi.

Study group	Number of cases (%)			
	Arcuate nucleus hypoplasia	Pre-Bötzinger nucleus hypoplasia	Parafacial nucleus hypoplasia	Raphé nuclei hypoplasia
SIDS (<i>n</i> = 28)	9 (32%)	2 (7%)	—	16 (57%)
Infant controls (<i>n</i> = 11)	2 (18%)	—	—	3 (27%)
SIUD (<i>n</i> = 12)	5 (42%)	—	6 (50%)	8 (67%)
Fetal controls (<i>n</i> = 6)	2 (33%)	—	—	1 (17%)

Figura 21: Sommario delle scoperte istologiche neuropatologiche dei nuclei del tronco encefalico in 28 SIDS, 12 SIUD e 17 controlli (56)

SCOPO DELLA TESI

Come precedentemente accennato, lo studio è volto a valutare il differente grado di maturazione neuronale dal punto di vista morfologico tra i “casi” e i “controlli”, in particolare per evidenziare una ridotta maturazione a carico dei nuclei del tronco encefalico del network respiratorio dato che, per la corretta regolazione della ventilazione, è necessaria una loro completa maturazione. La colorazione di routine istologica (Ematossilina-Eosina) può presentare limiti per una più dettagliata visualizzazione delle fibre nervose e dei nuclei respiratori, per cui, nello studio, vengono proposte due colorazioni specifiche per il sistema nervoso centrale con cui si valuta un’eventuale alterazione di sviluppo a carico dei nuclei coinvolti nella regolazione respiratoria che potrebbe essere correlata a SIDS.

La colorazione istochimica in questione è la Luxol Fast Blue che, oltre a fornire informazioni maggiori sulla presenza di alterazioni morfologiche, permette di valutare l’integrità delle connessioni neuronali e la colorazione di Nissle, basata sull’utilizzo del Blu di Toluidina, che fornisce un’immagine in “negativo” rispetto alla colorazione di Luxol Fast Blue, evidenziando i corpi cellulari e dunque i nuclei. Il marker di immaturità neuronale è l’antigene neuronale nucleare (NeuN), che viene utilizzato per valutarne l’espressione mediante colorazione immunoistochimica, basata sull’utilizzo di un anticorpo anti-NeuN.

Oltre a valutare se l’ipotesi di immaturità neuronale possa essere considerata (o associata ad) una causa della morte improvvisa, si confrontano le differenti colorazioni istochimiche e immunoistochimiche per definire la loro efficacia nella diagnosi, se è possibile individuarne una mutuamente esclusiva o se è necessaria l’integrazione di differenti metodiche per giungere ad una corretta diagnosi.

Le valutazioni verranno eseguite mediante l’utilizzo di test statistici per definire se vi siano delle differenze statisticamente significative tra i due gruppi (controlli e casi) e se le diverse metodiche conducono a conclusioni diverse.

MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione dello studio

Per lo studio sono stati selezionati 28 bambini deceduti di età compresa tra 1 giorno e 1 anno e mezzo differenziando una coorte di 11 “casi” SIDS e una di 17 “controlli”. Gli infanti sono casi dell’archivio autoptico della U.O. Anatomia Patologica 2 dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana), dal 2013 al 2023 compresi. La casistica iniziale prevedeva 87 infanti che sono stati selezionati in base ai seguenti criteri di esclusione:

- Infanti altamente pre-termine e/o con prematurità di alto grado (parto ad epoca gestazionale minore di 37 settimane).
- Infanti con un quadro clinico non compatibile con lo studio per un elevato grado di malformazioni o per la presenza di malattie congenite gravi o alterazioni a carico del sistema nervoso centrale.
- Casi medico legali il cui materiale anatomico è a carico della Procura.

Applicando tali criteri si giunge ad una coorte di 31 bambini da cui, per problemi arte-fattuali (esempio: macerazione avanzata del tessuto cerebrale), ne sono stati esclusi altri due, per arrivare infine ad una coorte di 28.

Come precedentemente accennato, lo studio è stato eseguito sugli encefali di 28 casi di infanti sottoposti a riscontro diagnostico/autopsia, secondo i protocolli per l’accertamento delle SIDS. Dopo aver suddiviso la casistica nei due gruppi, usando quindi come unico dato clinico l’appartenenza al gruppo di “studio” o di “controllo”, è stata classificata con numerazione crescente, in forma completamente anonima (C1-17 per i controlli e T1-11 per i casi) in modo tale da non poter in alcun modo risalire all’infante corrispondente. Si specifica che nessun dato genetico e/o clinico è stato preso in considerazione. Per le suddette motivazioni sopra citate, non è stato necessario richiedere l’autorizzazione al comitato etico.

3.2 Materiale biologico sottoposto allo studio

Il materiale oggetto della presente tesi è relativo a sezioni istologiche di tessuto encefalico fissato in formalina ed incluso in paraffina, presente in archivio secondo i protocolli dell'autopsia per i casi di sospetta SIDS.

In particolare, lo studio è centrato sulla porzione del tronco encefalico compresa tra il solco bulbo-pontino e la porzione superiore del bulbo comprendente quindi il complesso di Pre-Bötzinger, il nucleo arcuato, il nucleo retro-trapezoide, l'area postrema e l'ependima, nonché i nuclei del Rafe localizzati in posizione mediana per tutto il tronco encefalico. Per mancanza di materiale anatomico corrispondente alle aree di loro localizzazione non è stato possibile valutare lo sviluppo del nucleo di Kölliker-Fuse e del nucleo intermedio laterale.

Nello specifico dello studio, partendo da materiale presente in archivio, si procede con il taglio delle sezioni istologiche.

Le sezioni istologiche colorate sono confrontate tra i "casi" e i "controlli" per evidenziare particolari differenze mediante opportuna osservazione al microscopio ottico, Leica DM300.

Le differenze osservate tra i casi ed i controlli sono valutate mediante test statistico opportuno, Test T per valutare le differenze tra le medie dei campioni o Test X^2 per valutare l'indipendenza tra le variabili, ponendo come limite di significatività 0,05.

3.3 Taglio

Lo strumento utilizzato per tagliare è il microtomo rotativo Leica RM2255 illustrato in Figura 22.



Figura 22: Microtomo rotativo Leica RM2255

Il materiale oggetto dello studio è alloggiato in cassette sakura, per cui è necessario prima rimuovere la retina impostando il microtomo a 20 μ m e poi procedere alla “sgrossatura” che consiste nel tagliare sezioni multiple finché non otteniamo la totale scoperta dalla paraffina del campione. Il passaggio successivo consiste nel posizionare il blocchetto su una piastra fredda alla temperatura di -15°C, questo è importante per facilitare il taglio altrimenti la paraffina risulterà morbida impedendo di ottenere una buona sezione. Quando il blocchetto sarà raffreddato si procede con il taglio impostando il microtomo a 2 μ m per la colorazione standard ovvero l’ematossilina-eosina, a 4 μ m per l’immunoistochimica e a 7 μ m per la colorazione Luxol Fast Blue e Blu di Toluidina. La sezione ottenuta, che deve contenere l’intero campione, viene prelevata con una pinzetta e posta nel bagno stendi fette, una vasca con acqua a 45°C per favorire la distensione del foglietto ottenuto poiché tale temperatura permette alla paraffina di dilatarsi.

Una volta ottenuta una sezione ben distesa, senza piegature, viene raccolta con un vetrino in modo tale che vi aderisca e per facilitare quest’ultimo passaggio viene posto sulla piastra riscaldata (43°C) che costituisce il piano di appoggio superiore del bagno. La piastra, oltre a facilitare l’adesione, consente anche l’asciugatura dei vetrini prima di essere sottoposti a colorazione.

La Figura 23 mostra i passaggi eseguiti in fase di taglio a partire dal posizionamento dei blocchetti dei campioni su piastra fredda (28A). Dopo aver ottenuto l’adeguato

raffreddamento segue l'inserimento dei blocchetti nel microtomo per ottenere le sezioni dello spessore desiderato, nell'immagine è impostato a 4 μm (28B). Segue la distensione delle sezioni passandole nel bagno caldo (28C), e infine sono prelevate con un vetrino sul quale aderiscono grazie al collocamento di questo sulla piastra riscaldata (28D), ottenendo così le sezioni pronte per la colorazione o l'immunohistochimica.

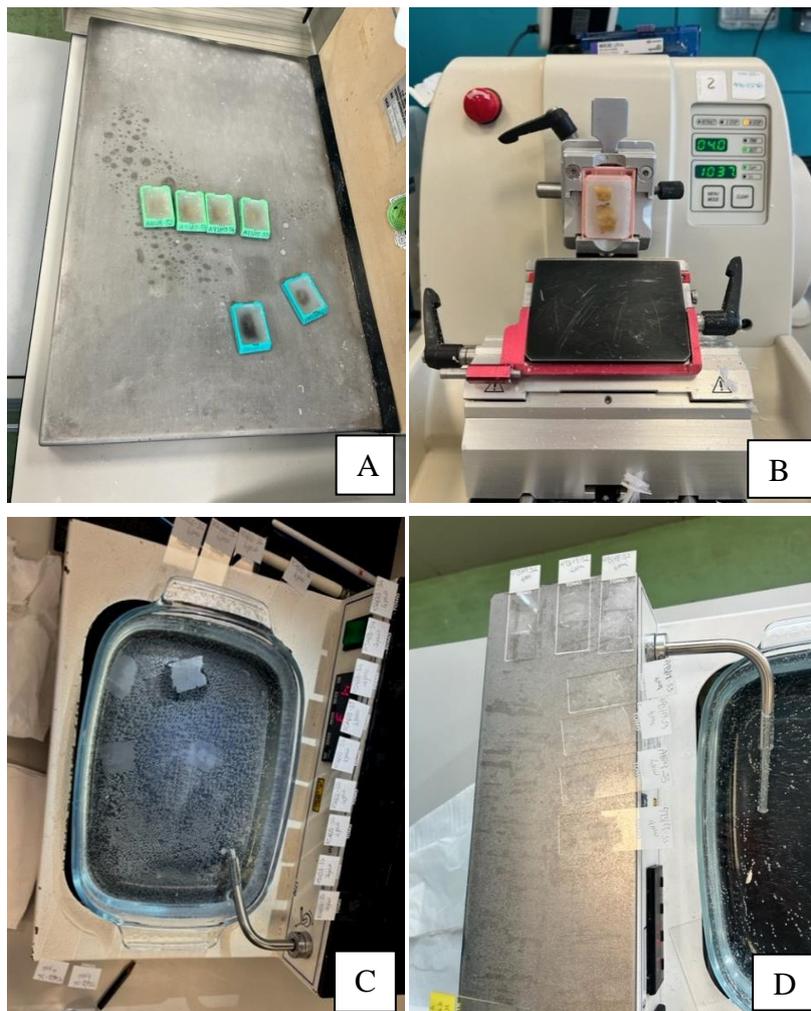


Figura 23: Fasi della procedura di taglio. A: Blocchetto su piastra fredda, B: Blocchetto inserito nel microtomo, C: Sezioni nel bagno, D: Vetrini su piastra calda.

3.4 Colorazione

La colorazione è un procedimento volto a rendere colorate determinate porzioni di preparati istologici. Il colorante è quindi una molecola solubile capace di legarsi a specifici substrati cellulari o tissutali.

3.4.1 Ematossilina-eosina

Questa colorazione non è specifica per il sistema nervoso, ma è utile per avere una panoramica generale dell'organizzazione anatomica.

PROCEDIMENTO

La colorazione viene eseguita dal coloratore automatico CoverstainerDako, in cui vengono inseriti i rack contenenti ciascuno 10 vetrini su cui sono presenti le sezioni istologiche, e poi viene impostato il protocollo desiderato. È necessaria una prima fase di riscaldamento per 15 minuti per facilitare la sparaffinatura e successivamente procedere alla colorazione consistente di diversi passaggi come segue.

REAGENTE	TEMPO
Histoclear	10 minuti
Histoclear	10 minuti
Alcool 99%	5 minuti
Alcool 99%	5 minuti
Alcool 95%	5 minuti
Alcool 95%	5 minuti
Acqua distillata	2 minuti
Ematossilina	3.5 minuti
Acqua distillata	1 minuto
Bluing	1 minuto
Acqua di fonte corrente	1 minuto
Alcool 95%	1 minuto
Eosina	4 minuti

Alcool 95%	30 secondi
Alcool 99%	1 minuto
Alcool 99%	3 minuti
Histoclear	2 minuti
Histoclear	1 minuto

Alla fine di questi passaggi vi è la dispensazione di una goccia di Balsamo di Canada, un montante, che favorisce l'adesione del vetrino copri oggetto su quello porta oggetto.

È un processo ciclico che complessivamente dura un'ora in cui vengono colorate fino a 240 sezioni, al termine della quale seguono 10 minuti di asciugatura dei vetrini, quest'ultimo passaggio è facoltativo, ma solitamente viene eseguito.

Il coloratore automatico è mostrato in Figura 24 con focus sul cassetto di apertura contenente i rack in cui alloggiano i vetrini con le sezioni.

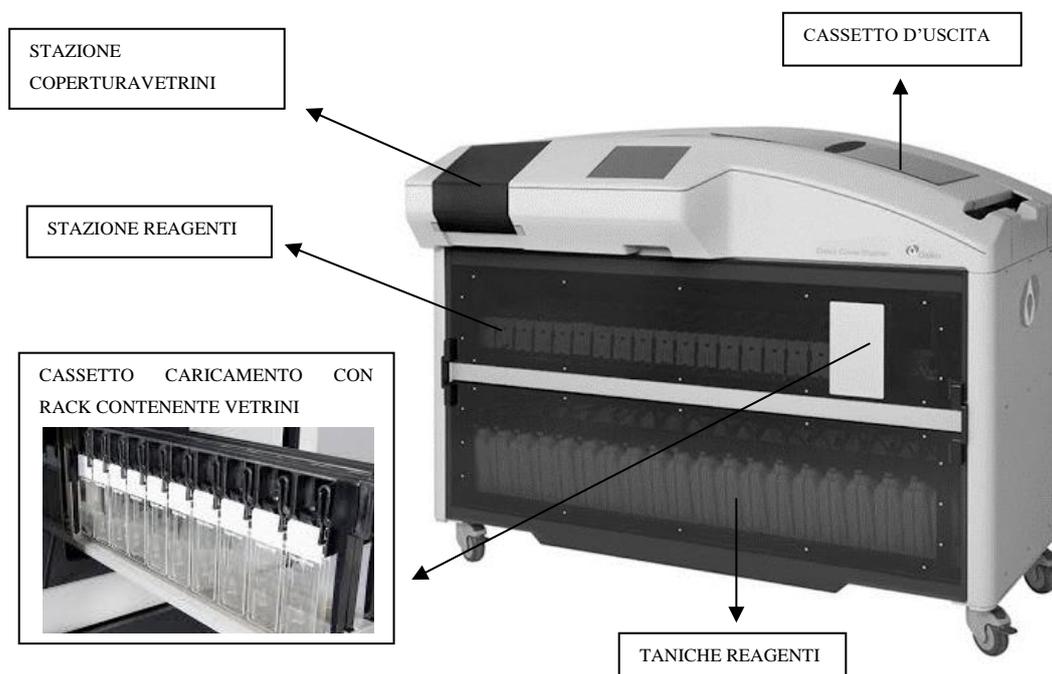


Figura 24: Coloratore automatico CoverstainerDako

3.4.2 Luxol Fast Blue

Il colorante Luxol Fast Blue è elettivo per il sistema nervoso centrale formando legami con le strutture fosfolipidiche quali lecitina e sfingomieline, facilitando così l'evidenziazione delle fibre nervose ed i nuclei del tronco encefalico.

Si basa su una reazione acido-base, il blu Luxol è solubile in alcol e si lega alle basi dei fosfolipidi a livello della mielina.

PROCEDIMENTO

Questa colorazione è stata eseguita manualmente.

Prima di tutto è necessario preparare tutte le soluzioni, tra cui il carbonato di litio allo 0,05% (per avere un volume di 50 mL si aggiungono a 0,025g di polvere di carbonato di litio 50 mL di acqua distillata), e la soluzione necessaria per rompere i legami tra la paraformaldeide e le proteine dato che sono i medesimi siti a cui deve legarsi il colorante, scopo ottenuto mediante una soluzione di Tris HCl a pH 9,5 ed EDTA (per avere 100 mL di volume finale si aggiunge 1 mL di Tris HCl, 0,2 mL di EDTA e 98,8 mL di acqua milliQ).

Per quanto riguarda il colorante Luxol è utilizzata una soluzione già pronta all'uso, la Luxol Fast Blue solution 1%, della ditta Sigma Aldrich (Solution Luxol L029 Sigma).

Prima di procedere con la colorazione è fondamentale ottenere la sparaffinatura delle sezioni (si tratta di sezioni di 7 μ m adese su vetrini polarizzati), resa possibile mediante un passaggio in stufa a 60 °C per 40 minuti, a cui devono seguire due passaggi in xilolo, ciascuno di 10 minuti, da eseguire sotto cappa chimica.

La colorazione, che richiede due giorni, è eseguita come segue.

REAGENTE	TEMPO
Etanolo 99%	5 minuti
Etanolo 99%	5 minuti
Etanolo 95%	5 minuti
Etanolo 95%	5 minuti
Acqua distillata	2 minuti
Soluzione di Tris HCl/EDTA	10 minuti in microonde interrompendo ogni volta che si osserva una vigorosa ebollizione in modo da mantenere la temperatura attorno ai 90 °C
Luxol 1%	Overnight in stufa a 65 °C
Carbonato di litio 0,05%	5 secondi
Etanolo 70%	10 secondi
Etanolo 70%	10 secondi
Acqua MilliQ	Qualche secondo
Carbonato di litio 0,05%	5 secondi
Etanolo 70%	10 secondi
Etanolo 70%	10 secondi
Acqua MilliQ	Qualche secondo
Etanolo 70%	3 minuti
Etanolo 95%	3 minuti
Etanolo 99%	3 minuti
Xilolo	3 minuti

Dopo l'ultimo passaggio in xilolo è opportuno versare una o due gocce di Balsamo di Canada essenziale per garantire l'adesione del vetrino copri oggetto sulle sezioni istologiche.

La Figura 25 mostra, in sintesi, i passaggi eseguiti per l'allestimento della colorazione. Sono illustrati i passaggi sotto cappa chimica (25A), l'alloggiamento

dei campioni immersi in Luxol, indicati dalla freccia, e posti in stufa (25B), e la fase di montaggio dei vetrini (25C).



Figura 25: Passaggi della colorazione Luxol Fast Blue. A: Passaggi sotto cappa chimica; B: Passaggio in stufa, la freccia indica l'alloggiamento dei campioni; C: Fase di montaggio dei vetrini.

3.4.3 Blu di Toluidina

La colorazione di Nissle basata sull'utilizzo del Blu di Toluidina è elettiva per il tessuto nervoso evidenziando la sostanza tigroide del Nissle tipica del citoplasma dei neuroni. Si basa sull'utilizzo di un colorante basico, infatti le zolle di Nissle sono aree fortemente basofile per la presenza di ribosomi associati al reticolo endoplasmatico. Questo colorante andrà a legarsi agli acidi nucleici contenuti nel nucleo. Quando i neuroni sono molto attivi nella sintesi proteica possiedono un'alta concentrazione di reticolo endoplasmatico rugoso nel citoplasma ricco di RNA per cui potrà essere evidenziato dal blu di toluidina. Grazie a questa particolare caratteristica dei neuroni, la colorazione di Nissle può colorare specificatamente il citoplasma dei neuroni. Le aree ricche di sostanza tigroide sono presenti a livello del corpo cellulare e nella porzione più prossimale dei dendriti, ma risultano assenti a livello dell'assone che quindi non risulterà colorato.

PROCEDIMENTO

Questa colorazione è stata eseguita manualmente.

Le sezioni di tronco encefalico, con uno spessore di 7 μ m, sono adese su vetrini polarizzati.

Innanzitutto, è opportuno preparare il Blu di Toluidina allo 0.04%: partendo da uno stock di Blu di Toluidina allo 0,5% deve essere diluito con acetato di sodio 0,1 M con pH uguale a 4,8, quindi, per avere 50 mL di volume finale si aggiungono 4 mL di Blu di Toluidina 0,5% e 46 mL di acetato di sodio.

Prima di procedere alla colorazione è necessario ottenere la sparaffinatura, resa possibile grazie ad un passaggio dei vetrini in stufa a 65°C per 40 minuti e successivo trasferimento in xilolo per 10 minuti. Segue la colorazione come descritto sotto.

REAGENTE	TEMPO
Etanolo 100%	5 minuti
Etanolo 95%	5 minuti
Etanolo 70%	5 minuti
Acqua Helix	10 minuti
Blu di Toluidina 0,04%	10 minuti
Acqua Helix	1 secondo
Etanolo 70%	1 secondo
Etanolo 95%	10 secondi
Etanolo 100%	2 secondi
Ripetere dal Blu di Toluidina per un totale di 4 volte	
Etanolo 100%	3 minuti
Xilolo	3 minuti

Infine, è opportuno aggiungere una goccia di montante sul vetrino per far aderire il vetrino copri oggetto e poter conservare così la sezione.

3.5 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica biochimica che permette la rilevazione di specifici antigeni presenti nel campione in esame mediante l'utilizzo di anticorpi che, legandosi all'antigene, formano l'immunocomplesso visualizzabile mediante un opportuno sistema di rilevazione. Un antigene è una qualsiasi sostanza che è in grado di essere riconosciuta dalle cellule del sistema immunitario, mentre un anticorpo è una proteina specifica del sistema immunitario capace di riconoscere porzioni specifiche dell'antigene, dette epitopi.

Il metodo di rilevazione può essere diretto, se l'anticorpo che riconosce l'antigene è già coniugato con l'enzima, oppure indiretto, se l'anticorpo legante l'antigene, detto anticorpo primario, non è marcato, per cui è necessario un anticorpo secondario che riconosce il primario e coniugato con l'enzima.

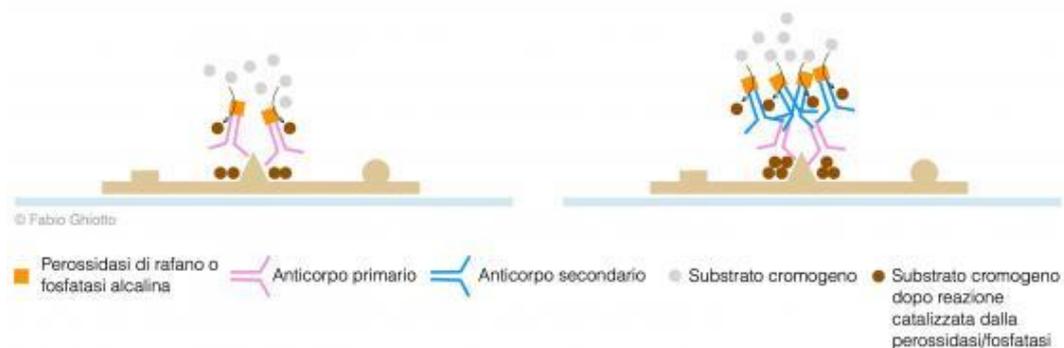


Figura 26: Reazione immunoistochimica diretta (a sinistra) e indiretta (a destra). (Atlas of Histology)

Nello studio viene ricercato l'antigene neuronale NeuN per valutarne la diversa espressione nei casi e nei controlli.

È importante specificare che l'immunoistochimica viene allestita su sezioni bianche sulle quali non è stata eseguita alcuna colorazione, e che devono essere adese a specifici vetrini carichi elettronegativamente ("vetrini polarizzati") in modo tale da consentire una maggiore adesione del pezzo anatomico dato che i tessuti umani risultano essere complessivamente carichi positivamente.

L'immunoistochimica viene eseguita da specifici strumenti che necessitano di un anticorpo primario, che dovrà legarsi all'antigene di nostro interesse, di una contro colorazione e di un sistema di rilevazione.

PROCEDIMENTO

Il sistema di colorazione avanzata BenchMark ULTRA è lo strumento usato per colorare automaticamente vetrini con campioni istologici mediante immunostochimica specifica, permettendo la processazione indipendente di 30 vetrini. Tale sistema è costituito da un computer con relativo software su cui definire e memorizzare i protocolli della colorazione, e dallo strumento di colorazione vero e proprio. Ogni vetrino possiede uno specifico codice a barre che viene letto dallo strumento consentendo di associare il corrispondente protocollo. Prima di procedere all'inserimento dei vetrini è opportuno un passaggio in stufa a 60°C per 30 minuti per ottenere la completa asciugatura dei vetrini e facilitare la successiva sparaffinatura. Dopo si esegue il caricamento dei vetrini nei cassettei che inizieranno la corsa di colorazione.

Lo strumento, oltre ai reagenti specifici per la reazione, utilizza sempre i così detti "reagenti consumabili" quali l'Ez Prep, ULTRA LCS, SSC, Reaction Buffer, ULTRA CC1 e ULTRA CC2.

L'EzPrep (in diluizione 1:10) è una soluzione sparaffinatrice a base acquosa; l'ULTRA LCS è un liquido oleoso di copertura usato come barriera tra i reagenti acquosi e l'aria per prevenire l'evaporazione e l'essiccamento del campione alla fine della corsa e mantenerlo oleato; la SSC è un tampone di ibridazione che favorisce il recupero antigenico; la Reaction Buffer è utilizzata per eseguire i lavaggi dei vetrini durante la corsa; l'ULTRA CC1 e CC2 sono due soluzioni usate in fase di pretrattamento che permettono di idrolizzare i legami covalenti formati dalla formalina nel tessuto consentendo lo smascheramento antigenico ed il riconoscimento dell'epitopo.

Il sistema di rilevazione, indiretto, si basa sull'utilizzo di un enzima quale la perossidasi di rafano e del cromogeno 3,3-diaminobenzidina tertraidrocloreuro (DAB) che in presenza del substrato produce un precipitato marrone nella zona di formazione dell'immunocomplesso (UltraView Universal DAB Detection Kit).

La contro colorazione è rappresentata dall'ematossilina che colora i nuclei cellulari di blu. È opportuno utilizzare anche il BluingReagent, una soluzione acquosa di carbonato di litio tamponato, per rendere la tonalità della contro colorazione di colore blu più intenso.

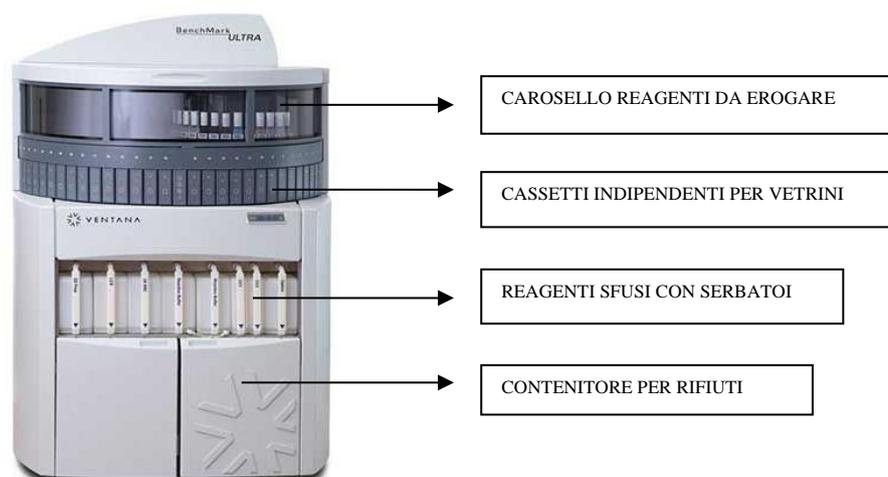


Figura 27: sistema di colorazione avanzata BenchMark ULTRA

Dopo il ciclo in macchina i vetrini devono essere accuratamente lavati con acqua di fonte e sapone neutro per eliminare l'olio utilizzato durante la reazione poiché esso ha un diverso indice di rifrazione e impedirebbe la lettura successiva al microscopio ottico del campione. Dopo multipli passaggi di lavaggio è necessario eseguire dei passaggi in alcool al 95% prima e al 99% dopo, tre lavaggi per ciascun alcool, ognuno di circa 2-3 minuti per ottenere la disidratazione del campione. Vengono poi posti in stufa a 60°C per 2 minuti per garantirne l'asciugatura, al termine della quale è necessario dispensare su ogni vetrino una goccia di balsamo, il quale, agendo come collante, permetterà per capillarità l'adesione del vetrino copri oggetto.

È necessario imporre un controllo positivo rappresentato dal tessuto umano in cui si osserva la massima espressione della proteina di nostro interesse. Il tessuto corrispondente è stato individuato consultando il "The Human Protein Atlas", e in particolare il tessuto di maggior espressione per l'antigene NeuN è la corteccia cerebrale ed il cervelletto.

3.5.1 Protocollo NeuN

Anticorpo: MAB377 Ms X Neuronal Nuclei (NeuN) 1.0 mg/mL (LOT: 4101852) che deve essere conservato ad temperatura compresa tra i 2 e gli 8°C.

La titolazione viene eseguita mediante l'aggiunta di 100 µL di anticorpo diluito 1:100 con l'AntibodyDiluentVentana (LOT: K04623). La titolazione deve essere eseguita dopo circa 1 ora e 30 dall'inizio della corsa, ma viene comunque segnalata da un suono da parte dello strumento. Dopo averla eseguita la corsa riprende per circa 2 ore, al termine delle quali vengono prelevati i vetrini che subiranno i vari lavaggi prima di essere montati.

Tempo complessivo della corsa: 3h 30 min circa

Controllo positivo: cervelletto

Processo eseguito in automatico dallo strumento BenchMark dopo aver impostato sul software il protocollo:

- 1- Riscaldare vetrino a 75°C (sparaffinatura)
- 2- Cell Conditioning
- 3- ULTRA Conditioner
- 4- Riscaldare vetrini a 95°C e incubare per 8 minuti (CellConditioner2)
- 5- ULTRA CC2 24 minuti
- 6- ULTRA CC2 44 minuti
- 7- Riscaldare vetrini a 37°C e incubare per 4 minuti (Anticorpo)
- 8- Titolazione con NeuN e incubare per 48 minuti
- 9- Ultra Wash
- 10- Dispensare un'aliquota di Hematoxylin (controcolorazione), aggiungere Coverslip e incubare per 24 minuti
- 11- Dispensare un'aliquota di BluingReagent, aggiungere Coverslip e incubare per 16 minuti

RISULTATI

Premessa

Di ogni campione erano state ottenute almeno due sezioni corrispondenti a livelli differenti del tronco encefalico mediante un taglio sagittale, perpendicolare all'asse del tronco, ma per le sottostanti valutazioni è stata scelta solamente la più rappresentativa di ciascun campione dopo averle opportunamente analizzate tutte. Inoltre, non si conosce lo spessore in senso cranio-caudale della sezione di partenza, per cui si considerano le varie strutture come bidimensionali. In riferimento ai test statistici eseguiti si considera come ipotesi nulla l'indipendenza tra le variabili e come livello di significatività un valore di α maggiore di 0,05.

4.1 Colorazione istochimica con Ematossilina-Eosina

La colorazione mediante Ematossilina-Eosina non consente di individuare completamente ed efficacemente tutti i nuclei respiratori, non essendo specifica del tessuto nervoso. Tale colorazione consente di effettuare una prima valutazione di sviluppo neuronale esclusivamente di alcune aree facilmente individuabili per la loro localizzazione, come l'area postrema, localizzata a livello infero posteriore del quarto ventricolo, il nucleo arcuato, posizionato in zona caudale sulla superficie ventrale della medulla e l'ependima. Le immagini sottostanti rappresentano l'area postrema in un controllo (Figura 28A) e in un caso (Figura 28B) da cui si può evincere una ridotta quantità cellulare e una diminuita vascolarizzazione del caso rispetto al controllo.

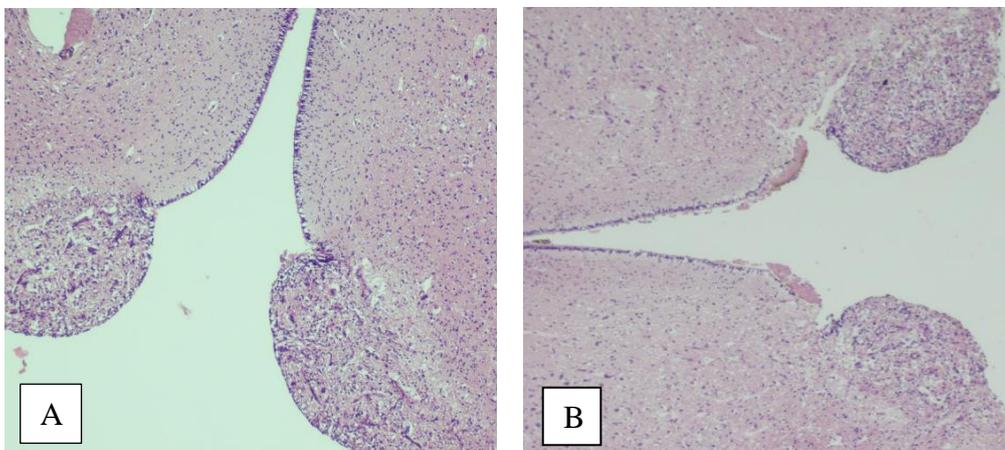
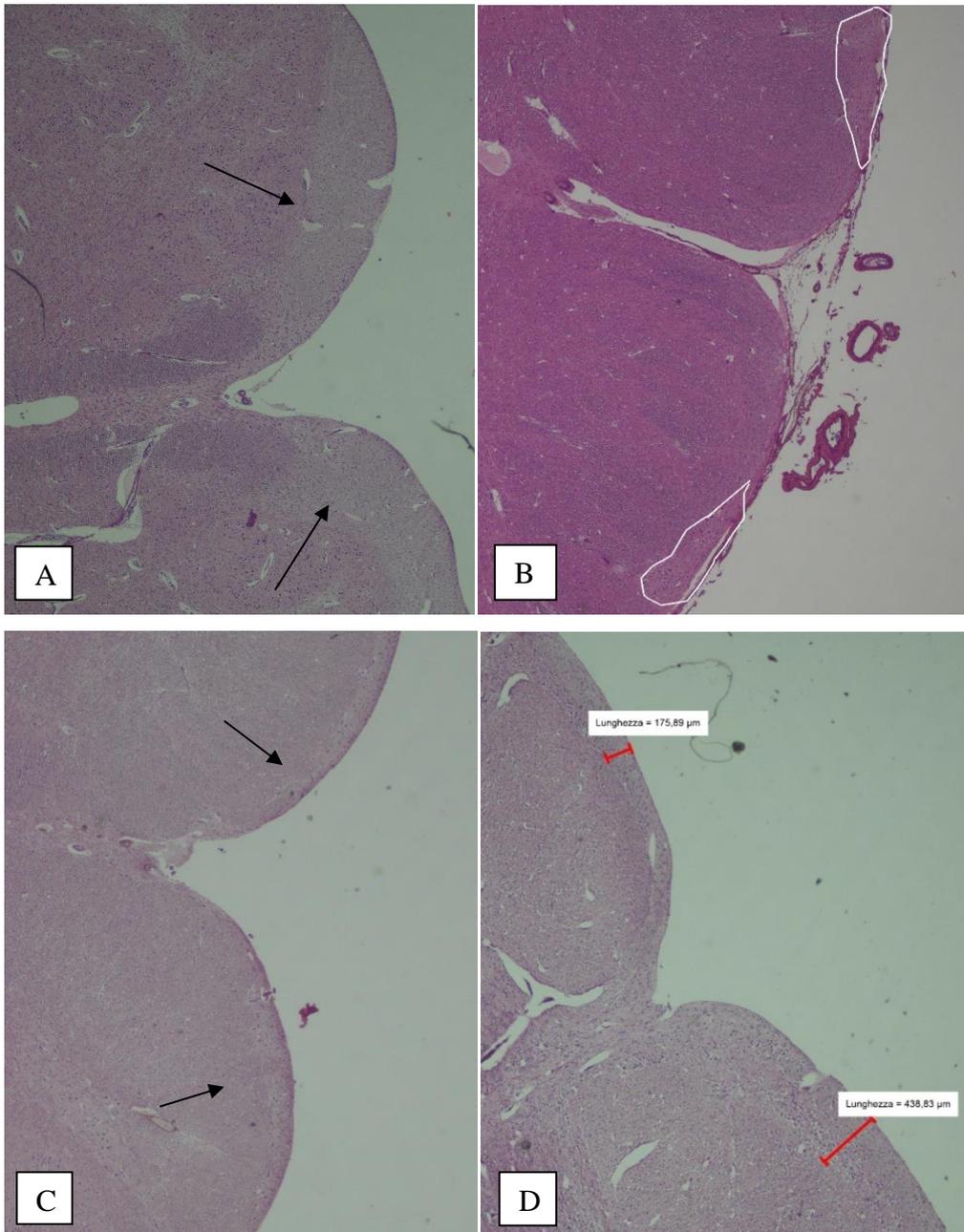


Figura 28: Area postrema con ematossilina-eosina ad ingrandimento 20X in un controllo (A) e in un caso (B).

Le immagini presenti in Figura 29 rappresentano ciascuna una condizione riscontrata del nucleo arcuato (indicato dalla freccia): Figura 29A condizione normale di sviluppo; Figura 29B condizione normale di sviluppo, ma limitata alla porzione basale indicata dai confini bianchi; Figura 29C ipoplasia bilaterale segnalata dalle frecce; Figura 29D ipoplasia monolaterale lieve, mostrata dalla lunghezza dello spessore basale nei due emi-nuclei; Figura 29E ipoplasia monolaterale grave dato che una metà è quasi del tutto assente; Figura 29F agenesia.



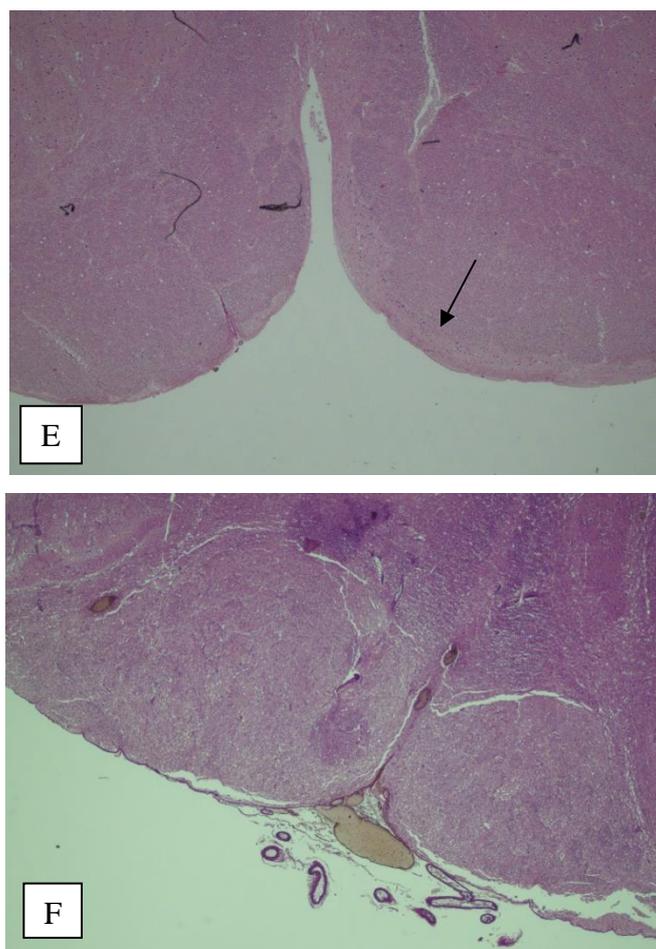


Figura 29: Rappresentazione del nucleo arcuato dopo colorazione ematossilina-eosina ad ingrandimento 20X. A: Condizione normale C11; B: Condizione normale (i confini bianchi evidenziano il nucleo arcuato) C2; C: Ipoplasi bilaterale T10; D: Lieve ipoplasi monolaterale (le lunghezze sono riferite allo spessore del nucleo arcuato in ogni emi-lato) C12; E: Marcata ipoplasi monolaterale T9; F: Agenesia T1. Le frecce indicano il nucleo arcuato, dove presente. C indica i “controlli” e T indica i “casi” affiancati da rispettivo numero indicativo del campione.

La struttura del nucleo arcuato e dell’ependima sono descritte, per ciascun campione, nella sottostante tabella (Tabella 2), dove “C” indica i campioni appartenenti al gruppo “controlli” e “T” al gruppo “casi”.

Campione	Struttura Nucleo Arcuato	Struttura Ependima
C1	Normopresente	Monostrato con poche ciglia
C2	Simmetrico alla base	Monostrato
C3		
C4		
C5	Normopresente	Monostrato ciliato
C6	Normopresente	Monostrato ciliato con alcuni spazi bianchi
C7	Molto sottile	Non facilmente distinguibile
C8	Un'emimetà maggiormente sviluppata	Monostrato ciliato
C9	Normopresente	Monostrato ciliato

C10	Un'emimetà maggiormente sviluppata	Monostrato ciliato
C11	Molto esteso	Monostrato ciliato
C12	Un'emimetà spessa il doppio	Monostrato
C13	Normopresente	Monostrato con poche ciglia
C14	Normopresente	Monostrato con poche ciglia e alcuni taniciti
C15	Normopresente	Monostrato
C16	Estremamente sottile	Strato non uniforme con spazi bianchi e alcuni taniciti
C17	Non valutabile per presenza di vasi nella regione dove dovrebbe essere ospitato	Monostrato ciliato con alcuni spazi bianchi
T1	Assente	Monostrato sottile, presente da un lato soltanto
T2	Un'emimetà maggiormente sviluppata	Monostrato con poche ciglia
T3	Un'emimetà maggiormente sviluppata	Monostrato con taniciti
T4	Normopresente	Strato non uniforme, con ciglia e taniciti
T5	Assente	Strato non uniforme
T6	Limitato alla porzione interna	Strato non uniforme con spazi bianchi, presenti sia ciglia sia taniciti
T7	Molto esteso	Strato non uniforme con spazi bianchi, presenti sia ciglia sia taniciti
T8	Un'emimetà leggermente più sviluppata	Strato non uniforme con spazi bianchi, presenti sia ciglia sia taniciti
T9	Presente solo un'emimetà	Monostrato sottilissimo
T10	Molto esiguo, ma simmetrico alla base	Strato non uniforme con spazi bianchi, presenti sia ciglia sia taniciti
T11	Molto ridotto	Strato non uniforme con spazi bianchi, presenti sia ciglia sia taniciti

Tabella 2: Struttura del nucleo arcuato e dell'ependima osservata al microscopio ottico dopo colorazione ematossilina-eosina. L'evidenza grigia si riferisce ai campioni che non sono risultati idonei per lo studio. La "T" denota i campioni appartenenti ai "casi" e la "C" ai "controlli".

Il campione C3 e C4 sono evidenziati di grigio nella tabella dato che, in seguito alla colorazione, il loro materiale anatomico non è risultato adeguato poiché non contenente la regione soggetta a valutazione.

In riferimento al nucleo arcuato è possibile osservare casi di ipoplasia monolaterale o bilaterale, di agenesia o di normale sviluppo basandosi esclusivamente sull'osservazione dell'espansione del nucleo arcuato, che però non sempre è nettamente riconoscibile. La Tabella 3 riporta la frequenza delle quattro condizioni.

	Normale	Ipoplasia Monolaterale	Ipoplasia bilaterale	Agenesia
CASI	2 (18,2%)	4 (36,3%)	3 (27,3%)	2 (18,2%)
CONTROLLI	9 (64,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)	0 (0%)

Tabella 3: Frequenza delle condizioni di sviluppo del nucleo arcuato riscontrate nei casi e nei controlli.

Dai risultati ottenuti, senza distinguere tra ipoplasia bilaterale e monolaterale, si osservano 7 esempi di ipoplasia e 2 di normale sviluppo nei “casi”, mentre nei controlli 5 di ipoplasia e 9 di normale sviluppo.

Dati questi valori si effettua un test statistico per valutare se vi è un’associazione tra la presenza di ipoplasia del nucleo arcuato e la SIDS, in particolare si esegue il Test del X^2 ponendo come ipotesi nulla l’indipendenza tra le variabili.

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Ipoplasia	7	5	12
No ipoplasia	4	10	14
TOTALE	11	15	26

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
Ipoplasia	5,08	6,92	12
No ipoplasia	5,92	8,08	14
TOTALE	11	15	26

Si ottiene come valore di p-value 0,126, dunque l’ipotesi di indipendenza tra l’ipoplasia del nucleo arcuato e la SIDS risulta essere confermata.

Si esegue un test statistico anche per valutare se l’agenesia possa essere, invece, associata alla morte improvvisa.

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Agnesia	2	0	2
No agnesia	9	15	24
TOTALE	11	15	26

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
Agnesia	0.85	1.15	2
No agnesia	10.15	13.85	24
TOTALE	11	15	26

Il p-value corrispondente è 0,086. Questi risultati portano a rifiutare l'ipotesi di indipendenza tra variabili per cui l'agenesia del nucleo arcuato risulta essere associata alla SIDS.

La colorazione istochimica Ematossilina-Eosina, come detto, evidenzia bene anche l'ependima: costituito da un monostrato di cellule epiteliali cilindriche nei controlli, e da uno strato non omogeneo nella maggior parte dei "casi". La Figura 30 mostra l'ependima di un controllo (30 A) e di un "caso" (30 B).

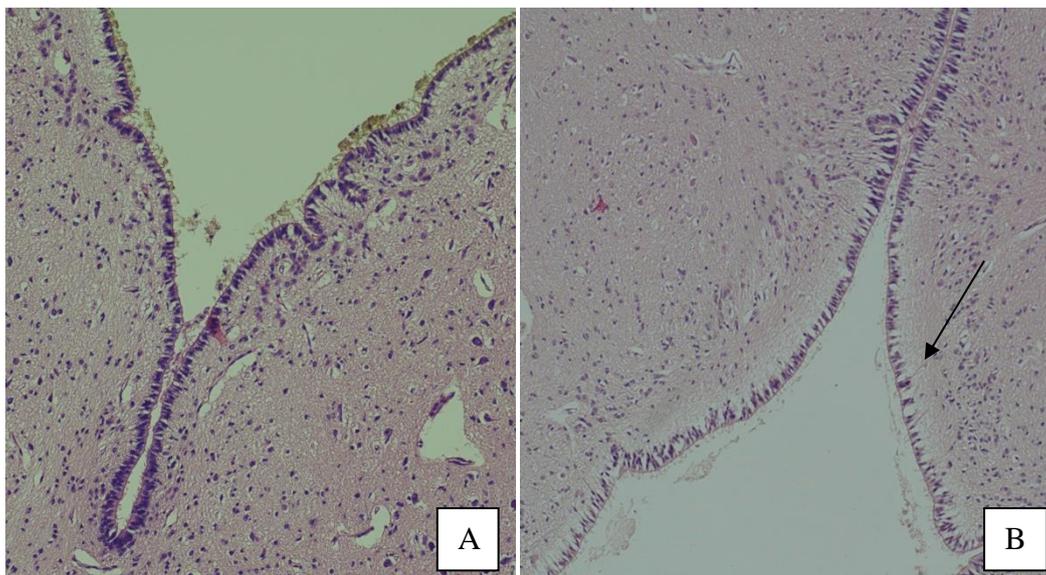


Figura 30: Ependima con ematossilina-eosina ad ingrandimento 10X. A: C10; B: T6, la freccia indica i prolungamenti dei taniciti. La "C" indica l'appartenenza ai "controlli" e la "T" ai "casi".

Si valuta mediante Test X^2 se la mancanza di monostrato possa essere considerato un fattore di rischio per la morte improvvisa

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
No monostrato	7	2	9
Monostrato	4	13	17
TOTALE	11	15	26

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
No monostrato	4.65	6.35	11
Monostrato	6.35	8.65	15
TOTALE	11	15	26

Si ottiene come valore di p-value 0.007 e come Odds Ratio 11,4. Questi risultati portano a rifiutare l'ipotesi di indipendenza tra le variabili per cui la mancanza di un monostrato ependimale è considerata essere associata alla SIDS, in particolare la presenza di tale condizione è associata ad un aumentato rischio di 11,4 volte di morte improvvisa ed inattesa.

La colorazione con Ematossilina-Eosina permette di distinguere anche i nuclei del Rafe, ma essendo distribuiti in ogni campione lungo tutta la lunghezza della sezione, non è possibile fare valutazioni.

4.2 Colorazione immunostochimica con anticorpo anti NeuN

La colorazione immunostochimica con anticorpo anti NeuN ha evidenziato i neuroni positivi in marrone. NeuN è un marcatore neuronale utile per la valutazione del grado di maturità dei neuroni per cui la sua positività è indice di un'adeguata maturazione e di un corretto differenziamento.

La prima struttura presa in considerazione è stata il nucleo arcuato di cui si valutano le dimensioni, la densità neuronale, il numero assoluto di neuroni positivi, e l'intensità della colorazione. Le misure sono state effettuate manualmente ricorrendo all'utilizzo di un vetrino e di un oculare micrometrici. Si specifica inoltre che le misure sono state approssimate a linee rette e le aree alla figura geometrica più simile, quindi al rettangolo per il nucleo e alla circonferenza per l'intera sezione. Sono dunque misure soggette a variabilità umana, così come la conta dei neuroni. La Figura 31 mostra un esempio in cui il nucleo arcuato simmetrico, e presente solo alla base, è stato approssimato con due rettangoli.

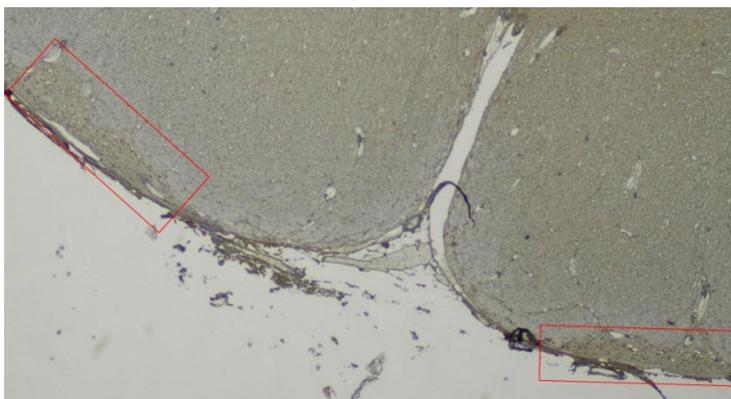


Figura 31: Nucleo arcuato C2 ("controllo"). Immunostochimica con NeuN. Ingrandimento 20X. I rettangoli rossi evidenziano il nucleo arcuato indicando l'approssimazione che è stata eseguita per il calcolo dell'area.

La densità è stata calcolata come rapporto tra la quantità di neuroni positivi presenti nella regione soggetta ad esame e l'area corrispondente. La conta dei neuroni è stata eseguita ad ingrandimento 100X e l'intensità della colorazione positiva è stata valutata assegnando un punteggio da 1 a 3, dove 1 indica una colorazione molto debole, 2 intermedia e 3 molto intensa.

Di seguito sono riportati i parametri riferiti al nucleo arcuato (Tabella 4), dove "A" e "B" indicano i due emi-lati dato che, non conoscendo l'orientamento della sezione, non è possibile distinguere tra destra e sinistra.

	Nucleo Arcuato									
	Presente?	Spessore base(mm)	Spessore interno(mm)	Dimensioni (mm)	Numero neuroni	Intensità colore	Area (mm ²)	Densità	Area sezione (mm ²)	Area nucleo/Area sezione
C1	si	0,45	0,1	5,4x4,6	221	3	3,08	72	201	1,5%
C2	si	0,25	/	1,1x0,25 ⁻	140	3	0,55	255	113	0,5%
C3	/									
C4	/									
C5	si	0,1	0,1	4,8x0,9	120	2	0,66	182	79	0,8%
					20 A			33A		
C6	si	0,15	0,15	4,9x1,5	0 B	2	1,2	0 B	113	1,1%
C7	si	0,2	0,2	3x0,8	43	2	0,72	60	31	2%
C8	si	0,1	0,05	4,1x2	102	2	0,66	155	154	0,4%
C9	si	0,1	0,1	3,2x1,2	42	2	0,56	75	79	0,7%
C10	si	0,05	0,05	5,4x1,2	117	2	0,52	225	50	1,0%
C11	si	0,05	0,1	3,7x1,7	128	3	0,52	246	38	1,4%
C12	si	0,15	0,1	7,1x2	121	2	1,46	83	113	1,3%
C13	si	/	0,05	1x0,1*	27	3	0,2	135	95	0,2%
C14	si	0,1	0,1	3,2x1,1	69	3	0,43	160	79	0,5%
C15	si	/	/	0,3x0,9"	64	2	0,54	119	50	1,1%
					2,2x1,7 A			0,16 A	388 A	
C16	si	0,04	0,04	1,2x1,7 B	53 B	2	0,12 B	442 B	79	0,4%
C17	si	0,1	0,1	4,6x1,7	292	3	0,8	365	50	1,6%
T1	no								79	
					190 A			1,08 A	176 A	
T2	si	0,26 [^]	0,06 [^]	5,1x1,5	63 B	3	0,69 B	91B	64	2,8%
					134 A			191 A		
T3	si	0,2 [°]	0,2 [°]	5,6x0,7	72 B	2	1,4	103 B	79	1,8%
T4	si	0,15	0,15	5,1x0,7	38	2	0,98	39	79	1,2%
		0,03 B		1,5x2,2 A	179 A			0,11 A	1627 A	
T5	si	0,07 A	0,03	3,7x2,2 B	41 B	3	0,33 B	124 B	79	0,6%
					18 A			43 A		
T6	si	0,1	0,1	4,9x1,7	43 B	2	0,84	102 B	50	1,7%
T7	si	0,06	0,06	2,4x2,7	15	3	0,46	33	132	0,3%
		0,05 A			74 A			0,66 A	117 A	
T8	si	0,3 B	0,25	4,5x2,2	328 B	3	1,21 B	231 B	78	2,4%
T9	si (solo 1)	0,2	0,2	3,2x2,9	78	2	1,22	64	154	0,8%
					85 A			472 A		
T10	si	0,05	0,05	4,9x1,2	45 B	2	0,36	250 B	79	0,5%
T11	si	0,1	0,1	9,8x2,2	26	1	1,42	18	113	1,3%

Tabella 4: Parametri misurati del nucleo arcuato osservato al microscopio ottico dopo immunostochimica con NeuN. La "T" denota i campioni appartenenti ai "casi" e la "C" ai "controlli". A e B indicano le due metà. L'evidenza grigia indica i campioni non idonei per lo studio.

⁻ simmetrico alla base

* simmetrico a circa 1,9 mm dalla rientranza verso l'interno in cui si osserva una sottilissima striscia con pochi neuroni

[°] simmetrico in basso con poi una striscia di 0,1 verso l'interno

[^] si osserva una striscia esterna blu di lungo tutto l'estensione di spessore 0,06 mm ed una zona marrone di 0,2 mm alla base, estesa per 3,8 mm da un lato e per 2,3 mm dall'altro. Dal lato più esteso si contano 190 neuroni, dall'altro 63

[°] simmetrico, ma un lato quasi totalmente blu e l'altro quasi totalmente marrone

Come detto precedentemente, i campioni C3 e C4 sono evidenziati di grigio nella tabella dato che, in seguito alla colorazione, il loro materiale anatomico non è risultato adeguato poiché non contenente la regione soggetta a valutazione.

Nel campione C17 si osservano vasi e strutture otticamente vuote in corrispondenza della regione anatomica in cui normalmente dovrebbe essere ospitato il nucleo arcuato (Figura 32).

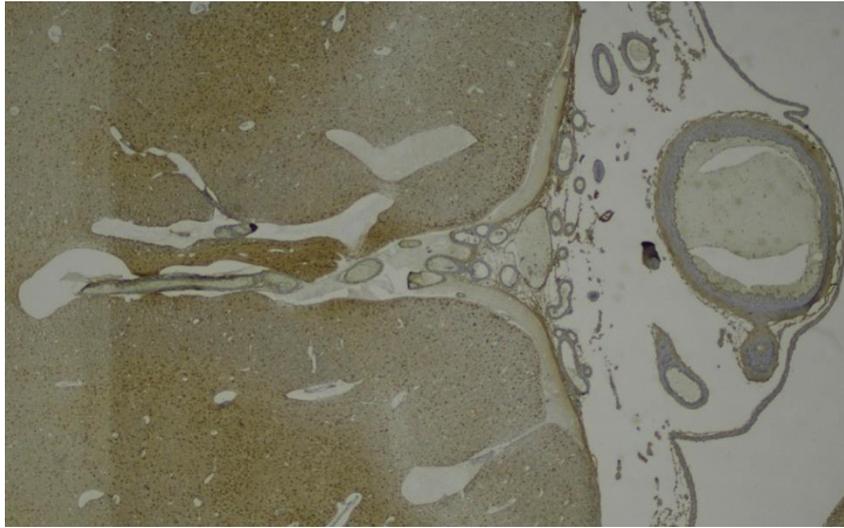


Figura 32: Nucleo arcuato C17 ("controllo"). Immunoistochimica con NeuN. Ingrandimento 20X.

La Figura 33 mostra il nucleo arcuato, delimitato dalla linea bianca, di un controllo in cui è esplicitata la corrispondenza delle misure presenti in Tabella 4: i segmenti rossi rappresentano le misure dell'estensione, il segmento blu lo spessore interno e il giallo lo spessore alla base.

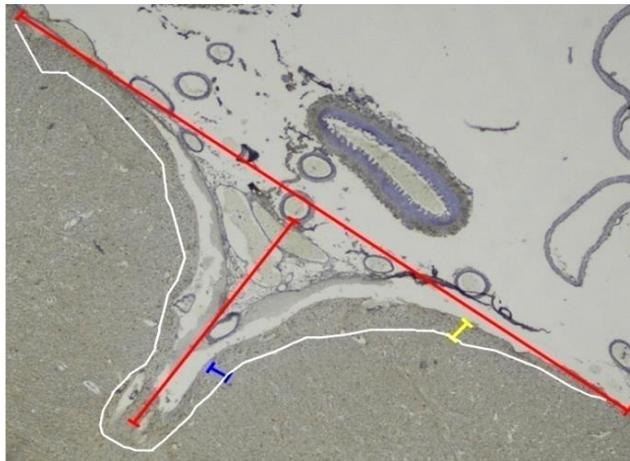


Figura 33: Nucleo arcuato C5 ("controllo"). Immunoistochimica con NeuN. Ingrandimento 20x. Il confine bianco delinea il nucleo arcuato, i segmenti rossi indicano le misure dell'estensione, il segmento blu indica lo spessore interno ed il segmento giallo lo spessore alla base.

Si esegue il Test X^2 per verificare che l'intensità della colorazione sia una variabile casuale. Si pone come ipotesi nulla l'indipendenza tra variabili (intensità colorazione e SIDS).

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Intensità 2	5	9	14
intensità 3	4	6	10
TOTALE	9	15	24

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
Intensità 2	5,25	8,75	14
Intensità 3	3,75	6,25	10
TOTALE	9	15	24

Si ottiene come valore di p-value 0,830, per cui si accetta l'ipotesi nulla e si conclude che l'intensità della colorazione immunohistochimica non è associata alla SIDS.

Il caso T11 risulta essere l'unico ad avere intensità della colorazione uno score di 1 oltre ad avere una quantità estremamente ridotta di neuroni, per cui si inserisce la Figura 34 che mostra il nucleo arcuato delimitato dalla linea nera (34 A) e specificamente l'intensità della colorazione (34 B).

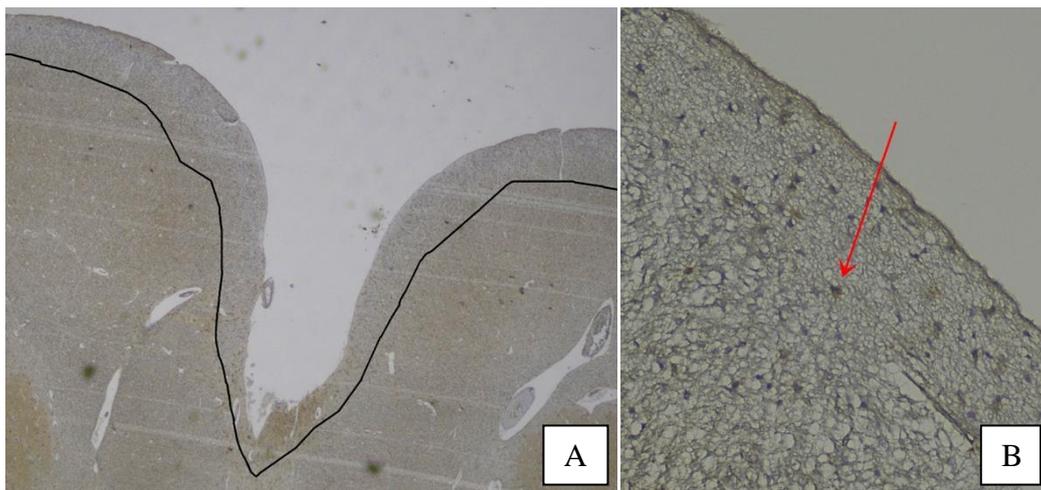


Figura 34: Immunohistochimica con NeuN di T11 ("caso"). A: Nucleo arcuato 20X. B: Neurone con intensità della colorazione 1, indicato dalla freccia.

Si riporta, in Figura 35, l'istogramma rappresentante la densità suddivisa nei due emi-nuclei sia nei controlli (35 A) che nei casi (35 B), assumendo che, laddove non è specificata una differenza tra le due metà, queste vengono considerate simmetriche, per cui la densità riportata in Tabella 4 viene divisa in due.

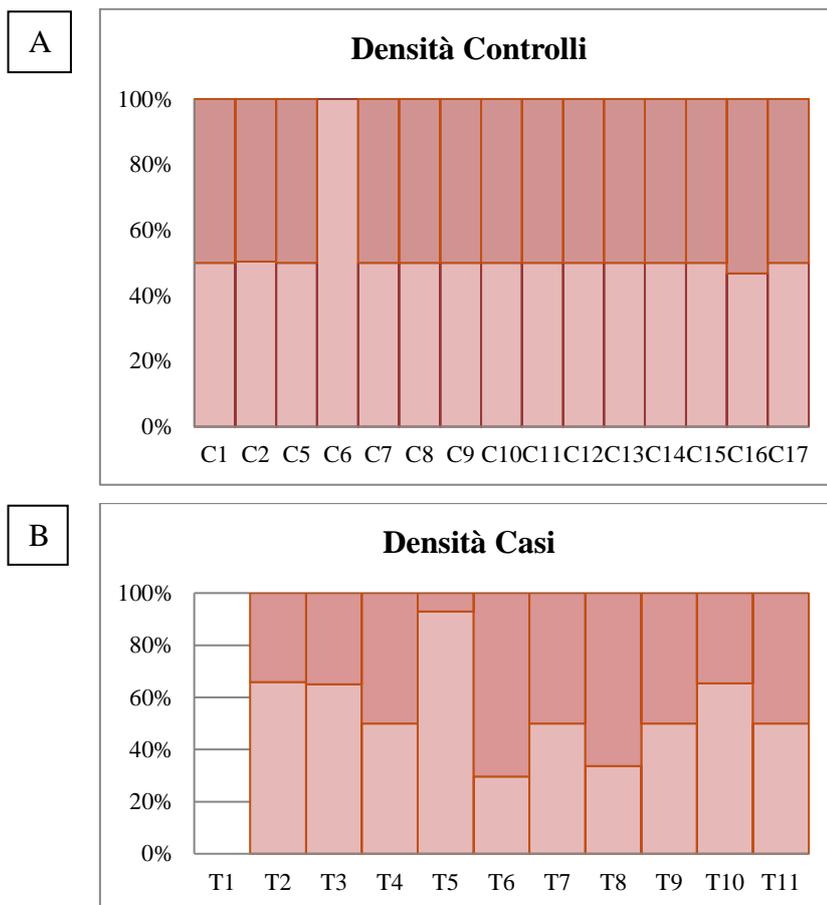


Figura 35: Istogramma riferito alla densità del nucleo arcuato nei controlli (A) e nei casi (B). Il caso T1 non presenta la colonna dato che non presenta il nucleo arcuato.

In Figura 36, si riporta il nucleo arcuato di un controllo con normale sviluppo.



Figura 36: Nucleo arcuato C15 ("controllo"). Immunoistochimica con NeuN. Ingrandimento 20X.

Sulla base dei risultati ottenuti in seguito a colorazione immunoistochimica con NeuN si esegue il Test X^2 per valutare se esiste un'associazione tra l'ipoplasia del nucleo arcuato e la SIDS, ponendo come ipotesi nulla l'indipendenza tra le due variabili.

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Ipoplasia	10	5	15
No ipoplasia	1	10	11
TOTALE	11	15	25

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
Ipoplasia	6,6	8,7	15
No ipoplasia	4,4	6,3	11
TOTALE	11	15	26

Si ottiene come p-value 0,0046. Si calcola anche l'Odds Ratio che risulta essere 20. I risultati portano a rifiutare l'ipotesi nulla, dunque l'ipoplasia del nucleo arcuato risulta essere associata alla SIDS, ed in particolare la presenza di tale condizione è correlata ad un rischio aumentato di 20 volte per un lattante.

La Figura 37 illustra invece un caso, in cui i due emi-lati hanno un'evidente differenza in estensione, la freccia verde indica la metà maggiormente sviluppata, mentre la freccia rossa quella iposviluppata.



Figura 37: Nucleo arcuato T9 ("caso"). Immunoistochimica con NeuN. Ingrandimento 40X. La freccia verde indica la metà maggiormente sviluppata, la freccia rossa indica la metà ipersviluppata.

Si riporta in Figura 38 l'istogramma raffigurante la distribuzione dell'area occupata dal nucleo arcuato rispetto all'area dell'intera sezione e si effettua un test statistico per valutare se vi è una differenza statisticamente significativa tra i casi ed i controlli.

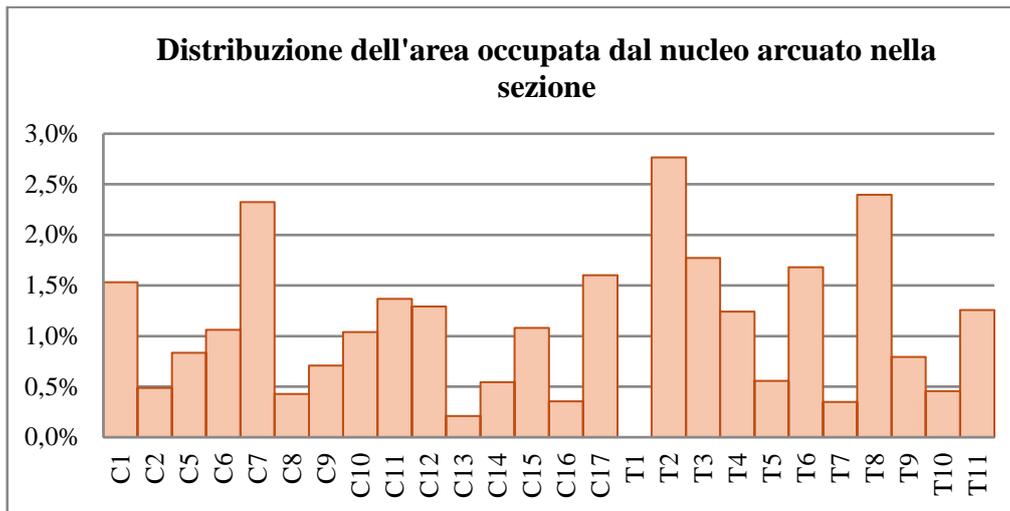


Figura 38: Istogramma della distribuzione dell'area occupata dal nucleo arcuato nella sezione.

Il test statistico eseguito è il Test T, per confrontare le medie di due campioni indipendenti. La media della distribuzione dei casi è 1,2% mentre dei controlli 1%. Prima di eseguire il Test T è necessario verificare la condizione di omoschedasticità mediante Test F da cui si ottiene come valore di p-value 0,136 che risultando maggiore di 0,05, limite di confidenza scelto, permette di non rifiutare l'ipotesi nulla. Si esegue il test T che fornisce come valore di p-value 0,457 per cui non risulta esserci una differenza statisticamente significativa tra le due medie.

L'immunoistochimica basata su NeuN permette, sorprendentemente, di studiare anche l'ependima nonostante non sia materiale propriamente neuronale, ma semplice epitelio. La colorazione in questione consente di valutare la presenza/assenza delle ciglia e dei taniciti, oltre alla struttura dello stato cellulare. Nella Tabella 5 sono descritte le rispettive caratteristiche.

	Ependima		
	Ciglia	Taniciti	Struttura
C1	poche	no	monostrato
C2	poche	pochi	monostrato
C3			
C4			
C5	si	si, ma blu	monostrato
C6	si	no	monostrato, debole intensità della colorazione
C7	poche	si	monostrato con meno cellule e prevalentemente marrone
C8	si	2 o 3	monostrato
C9	si	si, ma blu	monostrato
C10	si	no	monostrato
C11	si	pochi	monostrato
C12	poche	no	monostrato
C13	si	no	cellule non ben delineate, debole intensità della colorazione
C14	si	si	monostrato
C15	si	si	monostrato
C16	poche	no	strato non uniforme con tanti spazi bianchi, debole intensità della colorazione
C17	poche	no	strato non uniforme, debole intensità della colorazione
T1	si	no	strato molto sottile, presente da un solo lato
T2	poche	si, ma blu	strato non uniforme con spazi bianchi
T3	no	si	strato non uniforme con spazi bianchi
T4	si	si	strato non uniforme
T5	/	/	strato sostanzialmente assente
T6	poche	si	strato non uniforme con spazi bianchi
T7	si	si	strato non uniforme, forte intensità della colorazione
T8	si	si	strato non uniforme
T9	si	/	strato assente, si osservano solo le ciglia
T10	no	si	strato non uniforme con prevalenza di spazi bianchi rispetto alle cellule che risultano quasi completamente assenti
T11	poche	si	strato non uniforme con prevalenza di spazi bianchi rispetto alle cellule che risultano quasi completamente assenti

Tabella 5: Caratteristiche dell'ependima dopo immunohistochimica con NeuN. La "T" denota i campioni appartenenti ai "casi" e la "C" ai "controlli". A e B indicano le due metà. L'evidenza grigia indica i campioni non idonei per lo studio.

Si esegue il Test X^2 per valutare se la presenza di taniciti possa essere associata alla SIDS, per convenienza, i campioni che in Tabella 5 riportano la voce "pochi", vengono assimilati all'assenza di taniciti.

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Taniciti	9	5	14
No taniciti	2	10	12
TOTALE	11	15	26

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Taniciti	9	5	14
No taniciti	2	10	12
TOTALE	11	15	26

Si ottiene come valore di p-value 0,0008. Si calcola anche l'Odds Ratio che è 9. Dai dati ottenuti si rifiuta l'ipotesi nulla d'indipendenza tra le variabili e si conclude che la presenza di taniciti possa essere associata alla SIDS, correlata in particolare ad un rischio aumentato di 9 volte.

Per la valutazione di un'eventuale associazione tra la mancanza di monostrato (include sia la presenza di un monostrato fenestrato sia la totale assenza dello strato) e la SIDS si effettua un ulteriore Test X^2 .

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
No monostrato	11	3	14
Si monostrato	0	12	12
TOTALE	11	15	26

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
No monostrato	5,9	8,08	14
Si monostrato	5,08	6,9	12
TOTALE	11	15	26

Si ottiene come valore di p-value $5,13 \times 10^{-5}$, dunque si rifiuta l'ipotesi nulla d'indipendenza tra le variabili e si conclude che vi è un'associazione tra la mancanza di un monostrato ependimale e la SIDS.

La Figura 39 riporta tre esempi emblematici dell'ependima dei casi: 39 A evidenzia la fenestrazione dello strato, la presenza di ciglia e di taniciti, quest'ultimi indicati dalla freccia; 39 B mostra la quasi totale assenza dell'ependima; 39 C illustra la presenza unicamente delle ciglia con la mancanza dello strato di cellule ependimali.

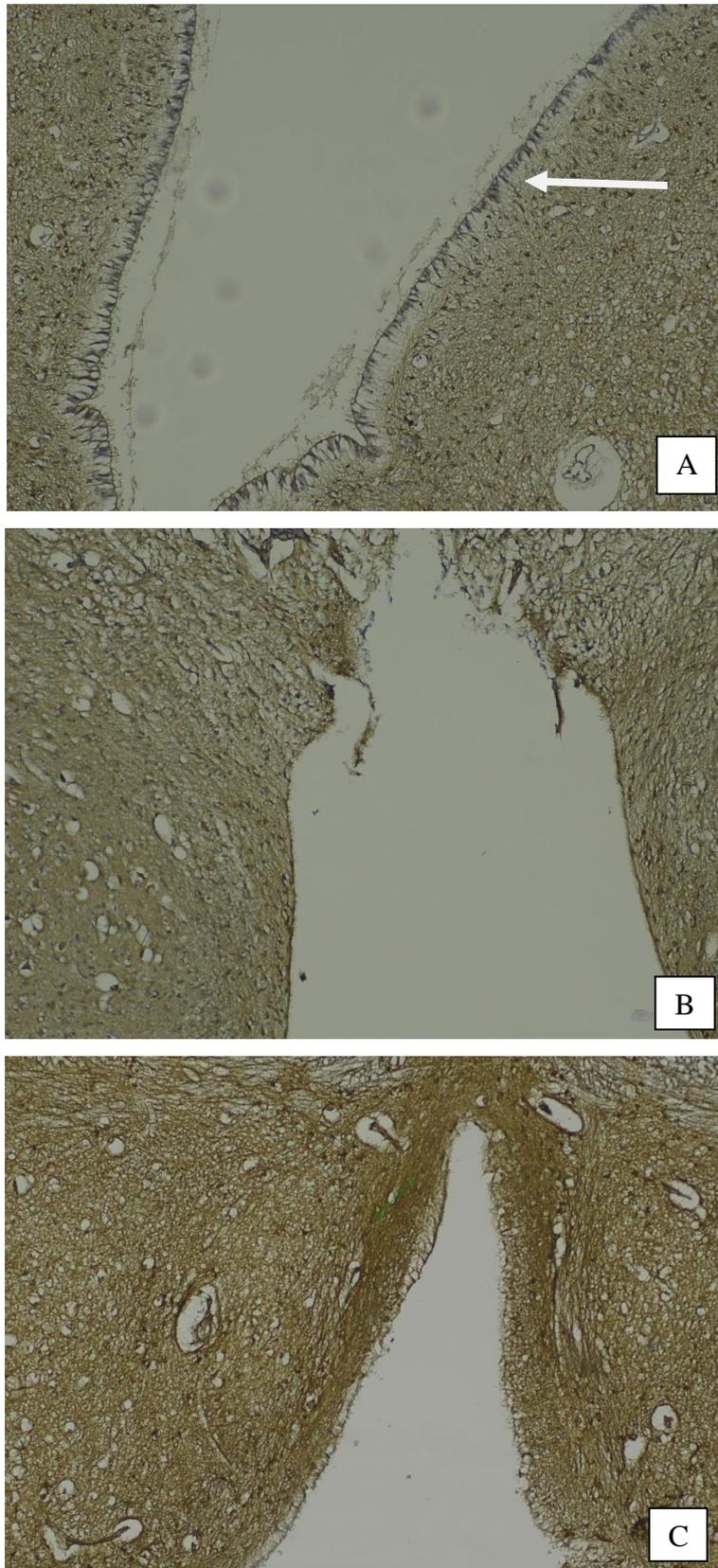


Figura 39: Ependima dopo immunohistochemical con NeuN ad ingrandimento 100X. A: Ependima fenestrato con ciglia e taniciti, T6; B: Ependima quasi del tutto assente, T5; C: Mancanza del monostrato ependimale, ma presenza delle ciglia, T9. La freccia indica i prolungamenti dei taniciti. La "T" indica l'appartenenza al gruppo "casi".

La Figura 40 mostra invece l'ependima di un controllo, in cui si notano bene le ciglia e le cellule.

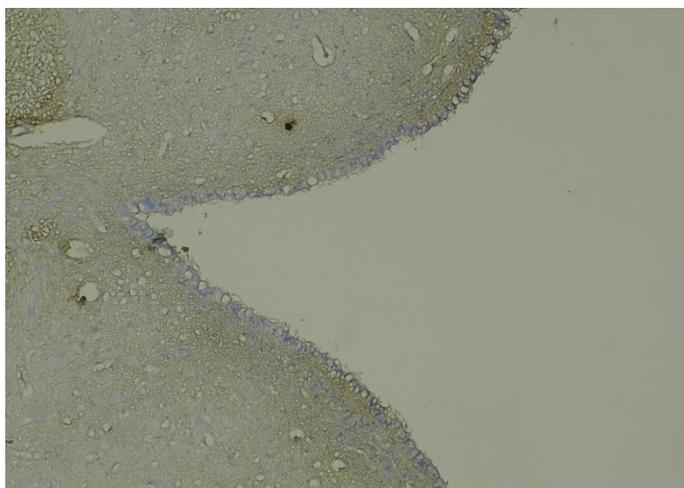


Figura 40: Ependima C6 ("controllo"). Immunohistochemicala con NeuN. Ingrandimento 100X.

In riferimento ai nuclei del Rafe non è possibile trarre una grande quantità di informazioni dato che sono sempre distribuiti lungo tutta la lunghezza della sezione in esame con un'esigua quantità di neuroni positivi, ma come tendenza generale si osserva una colorazione meno intensa e un numero più ridotto di neuroni positivi nei casi rispetto ai controlli.

Si cerca di valutare anche il nucleo di pre-Böttinger definendo la presenza/assenza, le dimensioni, il numero di neuroni in assoluto positivi, la loro intensità e la densità come rapporto tra i neuroni positivi e l'area, riferita al singolo nucleo e dove figurano due valori riguardanti il numero di neuroni è stata calcolata facendo una media dei due laddove erano vicini. Dove non sono specificati due valori differenti i due nuclei sono considerati simmetrici, in caso differente si riporta la lettera "A" e "B" indicativi dei due nuclei (Tabella 6). In questo caso le misure sono state definite in maniera digitale ad ingrandimento 20X.

Nucleo pre-Bötzingher						
	Presente?	Dimensioni (mm)	Numero neuroni	Intensità colore	Area (mm ²)	Densità
C1	si	0,7x0,3	10 A 7 B	1	0,18	47
C2	si	0,8x0,3	0		0,21	/
C3						
C4						
C5	si	0,8x0,2	6 A 6 B	1	0,16	38
C6	si	0,4x0,2	0		0,13	/
C7	si	0,3x0,07	3 A 4 B	2	0,03	117
C8	NON INDIVIDUABILE					
C9	si	0,5x0,2	5 A 5 B	1	0,1	50
C10	no					
C11	si*	0,5x0,15	2	1	0,09	22
C12	NON INDIVIDUABILE					
C13	si	0,4x0,2	17 A 11 B	2	0,06	283 A 167 B
C14	si*	0,8x0,2	18	2	0,13	138
C15	si	0,5x0,2	7 A 14 B	2	0,1	70 A 140 B
C16	si	0,5x0,2	14 A 10 B	3	0,08	175 A 125 B
C17	<i>non definibile per la sezione anatomica non adeguata</i>					
T1	no					
T2	si	0,7x0,3	51 A 35 B	3	0,17	300 A 206 B
T3	si	0,5x0,2	0		0,09	/
T4	no					
T5	NON INDIVIDUABILE					
T6	NON INDIVIDUABILE					
T7	si	0,7x0,2	0		0,16	/
T8	si	0,5x0,2	3 A 9 B	1	0,1	30 A 90 B
T9	si*	0,5x0,2	23	1	0,1	230
T10	si	0,2x0,07	18 A 15 B	2	0,01	1800 A 1500 B
T11	si	0,2x0,08	0		0,02	/

Tabella 6: Caratteristiche Nucleo pre- Bötzingher dopo immunoistochimica con NeuN.
 La "T" denota i campioni appartenenti ai "casi" e la "C" ai "controlli". A e B indicano i due nuclei.
 L'evidenza grigia indica i campioni non idonei per lo studio.
 * si osserva un solo nucleo a causa di un taglio nella zona anatomica in cui dovrebbe essere ospitato.

Dal totale dei campioni analizzati, in 7 (25%), non è stato possibile valutare il nucleo di pre-Bötzingher, in 3 (11%) non è risultato presente, e lo studio dei restanti campioni non ha consentito di trarre ragionevoli valutazioni.

4.3 Colorazione istochimica speciale con Blu di Toluidina

La colorazione con Blu di Toluidina, essendo specifica per il tessuto nervoso, permette di individuare bene il corpo cellulare e i dendriti dei neuroni per la presenza dei corpi di Nissle (Figura 41).

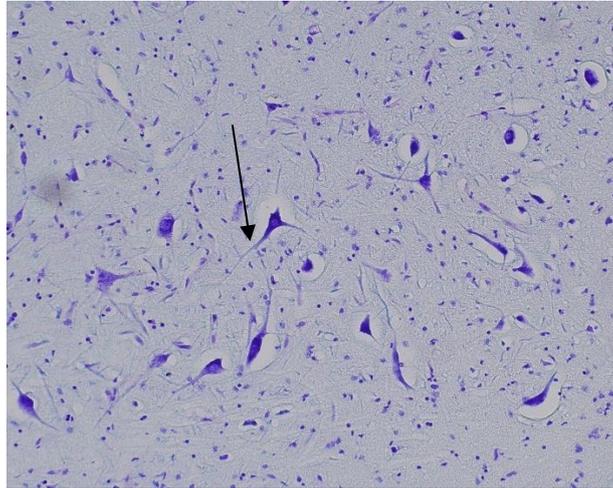


Figura 41: Neuroni 100X. La freccia indica i dendriti.

Si valuta, anche in questo caso, lo sviluppo del nucleo arcuato, dell'ependima e del nucleo di pre-Bötzing.

In riferimento al nucleo arcuato questa colorazione consente di definire in modo più netto i confini di estensione della struttura, ma non consente di valutare il grado di maturazione dei neuroni colorandoli indistintamente tutti di blu. La Figura 42 mostra il nucleo arcuato di un controllo (A) e di un caso (B).

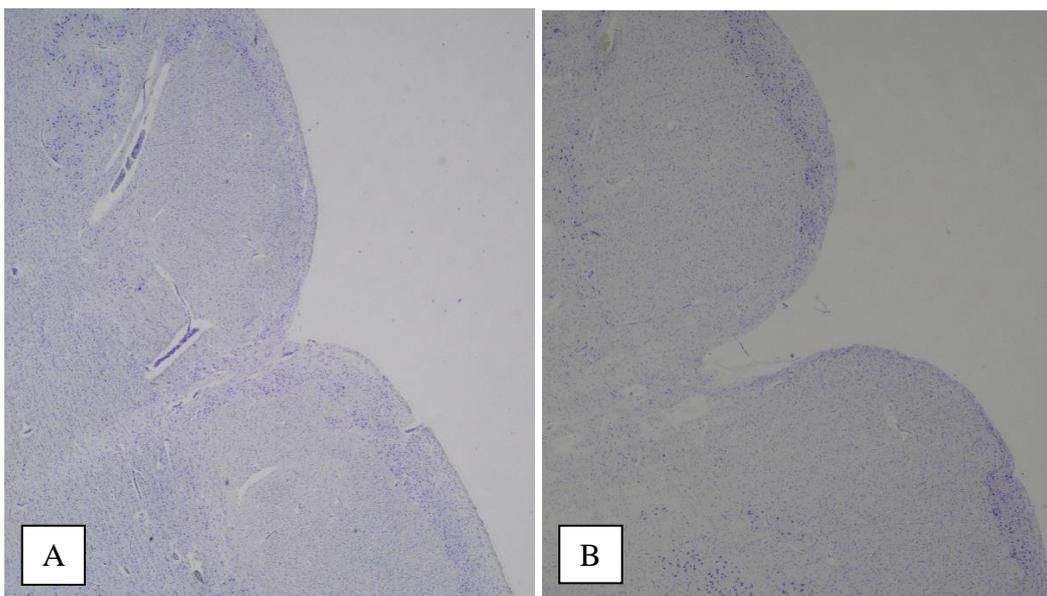


Figura 42: Nucleo arcuato dopo colorazione con Blu di Toluidina, ingrandimento 20X. A: C12; B:T2. La "C" indica l'appartenenza al gruppo "controlli" e la "T" ai "casi".

Si riporta la Tabella 7 che mostra le informazioni relative al nucleo arcuato dopo colorazione con Blu di Toluidina. Le celle evidenziate di grigio indicano i campioni in cui la colorazione non è risultata ottimale (mostrata in Figura 43). L'area è stata calcolata digitalmente ad ingrandimento 20X.

Nucleo Arcuato			
	Presente?	Area (mm ²)	Caratteristiche
C1	si	1,5 A	Il lato B si considera simmetrico mancando a causa del taglio della sezione
C2	si	0,01 A	Considerato simmetrico
C5	si	0,3 A	Confine non netto, si considera simmetrico
C6	si	0,2 A	Nonostante un lato appaia maggiormente sviluppata l'area è uguale nelle due metà
C7	<i>NON VALUTABILE A CAUSA DELLA COLORAZIONE</i>		
C8	si	0,7 A	Considerato simmetrico
C9	si	0,4 A	Considerato simmetrico
C10	si	0,5 A	Presente solo alla base, ma simmetrico
C11	si	0,5 A	Considerato simmetrico
C12	si	1,7 A 1 B	
C13	si	/	Estremamente sottile
C14	si	0,1 A	Considerato simmetrico
C15	si	0,7 A 0,5 B	Un lato appare maggiormente sviluppato
C16	<i>NON VALUTABILE A CAUSA DELLA COLORAZIONE</i>		
C17	<i>NON VALUTABILE A CAUSA DELLA COLORAZIONE</i>		
T1	no		
T2	si	0,6 A 0,3 B	
T3	si	0,6 A 0,9 B	
T4	si	0,8 A	Si considera simmetrico, ma è poco definito, i neuroni sono in numero ridotto e si osserva una struttura otticamente vuota
T5	si	0,5 A	Estremamente ridotto, si considera simmetrico alla base, ma un emilato presenta meno neuroni e più piccoli
T6	<i>NON VALUTABILE A CAUSA DELLA COLORAZIONE</i>		
T7	si	0,1 A	Estremamente sottile, si considera simmetrico, neuroni con dimensioni ridotte
T8	si	/	Estremamente ridotto e i neuroni molto piccoli
T9	si	1,1 A	Il lato B è assente
T10	si	0,3 A	Dimensioni ridotte, si considera simmetrico anche se un lato risulta leggermente meno
T11	si	0,3 A	Lato B sostanzialmente assente

Tabella 7: Struttura del nucleo arcuato dopo colorazione con Blu di Toluidina. A e B indicano i due emi-lati. La "T" indica l'appartenenza al gruppo "casi" e la "C" al gruppo "controlli". Le celle evidenziate di grigio indicano i campioni in cui la colorazione non è risultata ottimale.

Dalla Tabella 7 si osserva nel gruppo dei "controlli": 9 campioni con normale sviluppo del nucleo arcuato, 2 con ipoplasia monolaterale, 1 con ipoplasia bilaterale e 3 non sono valutabili a causa della colorazione non idonea. Nel gruppo dei "casi" si evince: 1 campione con agenesia del nucleo arcuato, 1 con nucleo normo

sviluppato, 4 con ipoplasia monolaterale, 4 con ipoplasia bilaterale e 1 non è valutabile a causa della colorazione non adeguata.

Mediante il Test X^2 si valuta la presenza di associazione tra l'ipoplasia e la SIDS.

Osservati	Casi	Controlli	TOTALE
Ipoplasia	8	3	11
No ipoplasia	2	9	11
TOTALE	10	12	22

Attesi	Casi	Controlli	TOTALE
Ipoplasia	5	6	11
No ipoplasia	5	6	11
TOTALE	10	12	22

Si ottiene come valore di p-value 0,01, dunque si rifiuta l'ipotesi nulla e si conclude che vi è un'associazione tra l'ipoplasia del nucleo arcuato e la SIDS.

La Figura 43 mostra due esempi in cui la colorazione non è risultata essere idonea a causa di una non sufficiente differenziazione tra sostanza grigia e sostanza bianca.

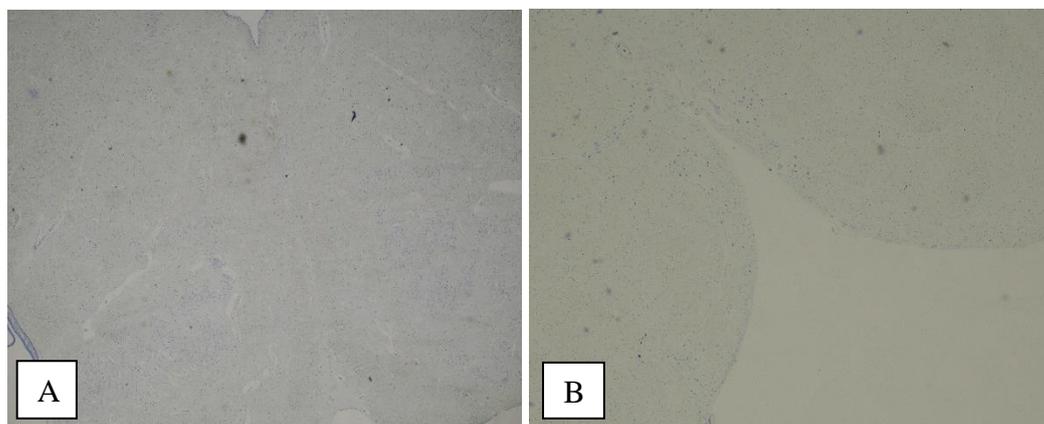


Figura 43: Colorazione con Blu di Toluidina risultata non idonea 20X. A: C7; B: T8. La "C" indica i "controlli" e la "T" i "casi".

Dall'analisi dell'ependima non si ricava alcuna informazione aggiuntiva rispetto alle precedenti, permette di distinguere la presenza o assenza del monostrato di cellule endodimali ed evidenzia in maniera migliore i prolungamenti dei taniciti.

La Figura 44 mostra l'ependima in caso (A) e in un controllo (B).

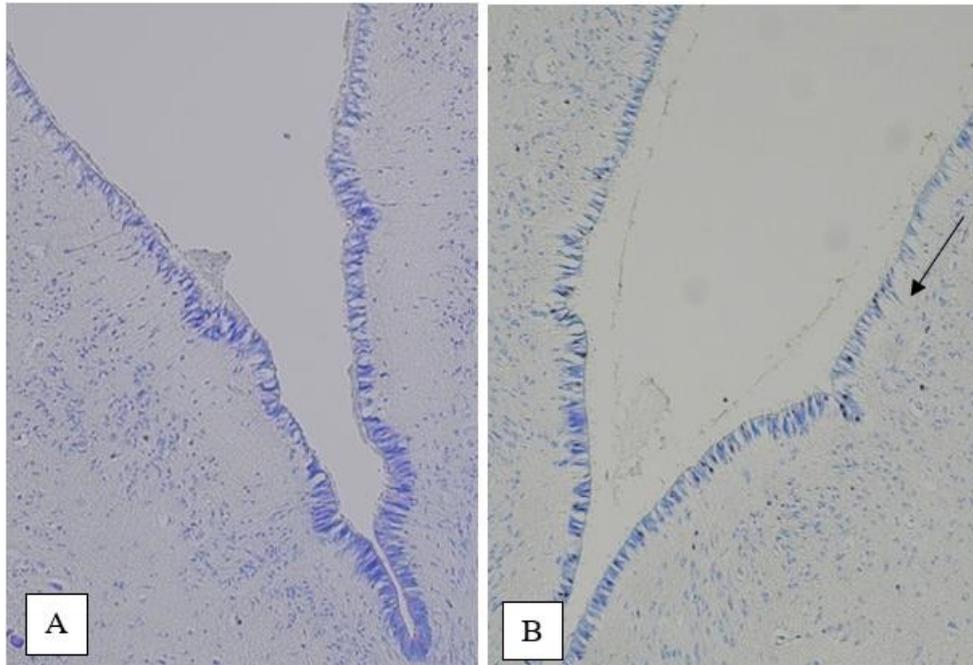


Figura 44: Ependima con Blu di Toluidina, 100X. A: C13; B: T6. La "C" indica i "controlli" e la "T" i "casi". La freccia indica i prolungamenti dei taniciti.

La colorazione istochimica con Blu di Toluidina ha permesso di valutare in modo più opportuno rispetto alle precedenti colorazioni proposte il nucleo di pre-Bötzingher, la Tabella 8 mostra i valori dell'area, riferiti ad un solo nucleo, calcolati digitalmente ad ingrandimento 10X.

Nucleo pre-Bötzingher			
Campione	Area (mm ²)	Campione	Area (mm ²)
C1	0,2	C15	/
C2	0,3	C16	0,2
C3		C17	/
C4		T1	0,1
C5	/	T2	0,07
C6	0,1	T3	0,06
C7	/	T4	0,09
C8	/	T5	0,1
C9	0,2	T6	0,2
C10	0,1	T7	0,1
C11	0,2	T8	0,1
C12	0,1	T9	/
C13	0,1	T10	0,1
C14	0,2	T11	0,1

Tabella 8: Valori area del nucleo di pre-Bötzingher dopo colorazione con Blu di Toluidina. La "T" indica l'appartenenza al gruppo "casi" e la "C" al gruppo "controlli". Le celle evidenziate di grigio indicano i campioni in cui la colorazione non è risultata ottimale. L'evidenza arancione indica i campioni che non sono risultati idonei per lo studio.

La sezione istologica corrispondente ai campioni C3 e C4 non è risultata idonea per la valutazione; i campioni evidenziati in grigio non hanno una colorazione adeguata per poter individuare l'area anatomica di interesse. In generale si osserva una maggior quantità di neuroni a livello di tale area nei controlli rispetto ai casi. Facendo una media dell'area nei controlli si ottiene come valore 0,17; nei casi 0,1. Gli istogrammi presenti in Figura 45 mostrano la distribuzione dell'area del nucleo di pre-Bötzing nei controlli (45 A) e nei casi (45 B).

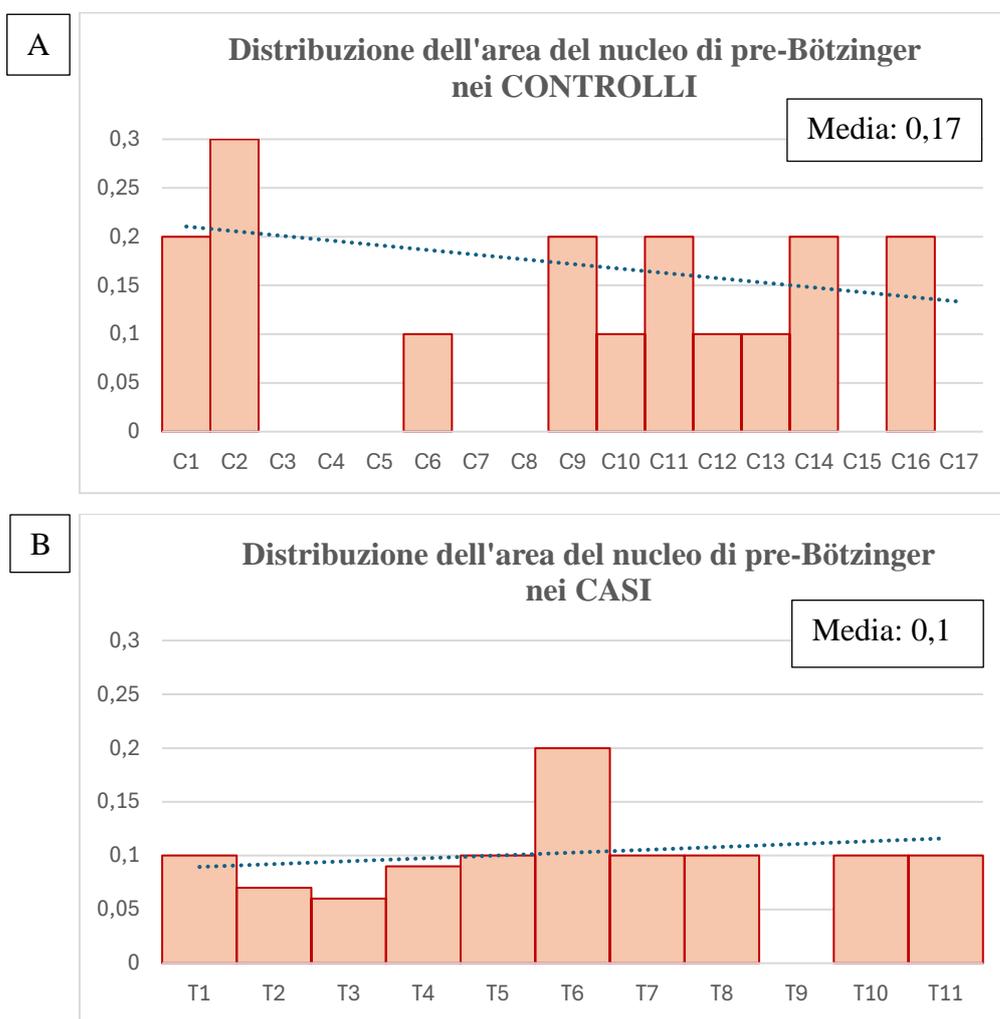


Figura 45: Istogrammi relativi alla distribuzione dell'area del nucleo di pre-Bötzing calcolata dopo colorazione istochimica con Blu di Toluidina nei controlli (A) e nei casi (B). In ogni grafico è riportata anche la linea di tendenza e la media dei valori.

Si effettua un test statistico per valutare se vi è una differenza statisticamente significativa tra le medie dei due gruppi mediante il Test T. È necessario eseguire prima il Test F per verificare l'omoschedasticità, ed ottenendo un valore di p-value

di 0,09 risulta confermata l'ipotesi. Si esegue ora il Test T ponendo come ipotesi nulla che tra le medie campionarie non vi sia una differenza statisticamente significativa, si ottiene come p-value 0,012 e dunque si rifiuta l'ipotesi nulla concludendo che vi è una differenza statisticamente significativa tra le medie dei due gruppi.

La Figura 46 mostra il nucleo pre-Bötzingher in un caso (A) e in un controllo (B).

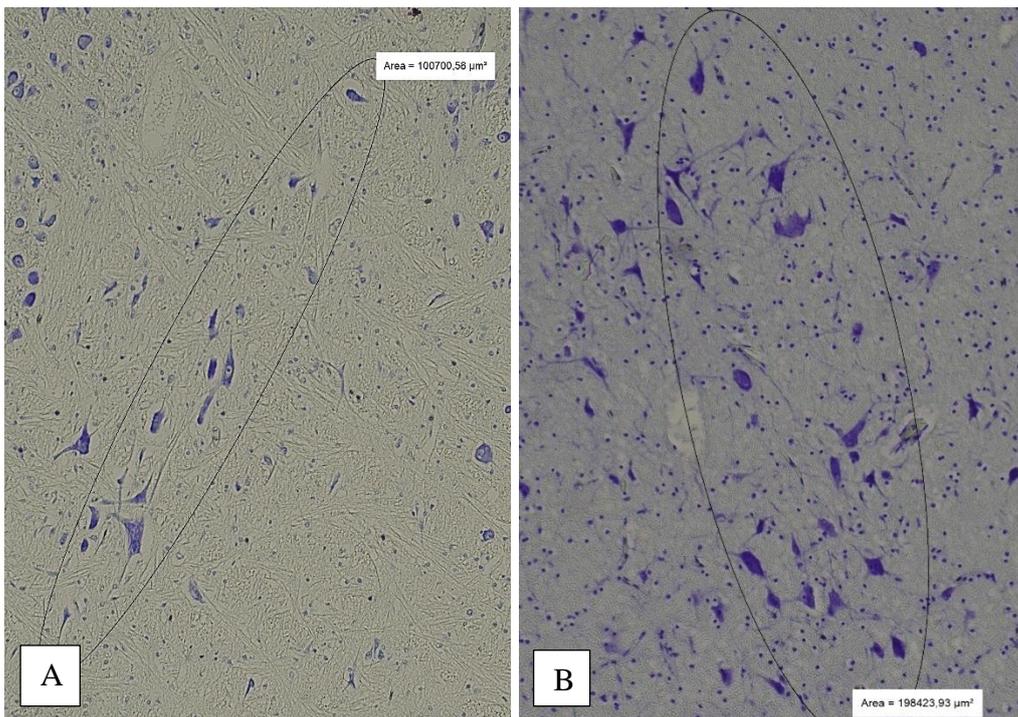


Figura 46: Nucleo pre-Bötzingher evidenziato dall'ellisse, Blu di Toluidina, 100X. A: T8; B: C1. La "T" indica l'appartenenza al gruppo "casi", la "C" al gruppo "controlli". Il riquadro con la scritta "area" ed il relativo valore indica l'area del nucleo.

4.4 Colorazione istochimica speciale con Luxol Fast Blue

La colorazione istochimica Luxol Fast Blue non ha portato ai risultati attesi, non consentendo una valutazione dello sviluppo dei nuclei respiratori. Infatti, data l'estrema variabilità di permissività delle sezioni alla colorazione, risultano campioni estremamente diafani, e altri eccessivamente scuri impedendo di effettuare valutazioni. Dei 26 campioni analizzati, è stato possibile rilevare il nucleo arcuato esclusivamente in 6 (23%), anch'essi caratterizzati da colorazione estremamente debole, ma tale da consentire di individuare i confini di tale area anatomica; in 2 campioni solamente (8%) è stato invece possibile caratterizzare il nucleo di pre-Bötzing.

La Figura 47 riporta due esempi in cui la colorazione non risultava idonea, nel caso A perché eccessivamente scura, nel B poiché estremamente chiara.

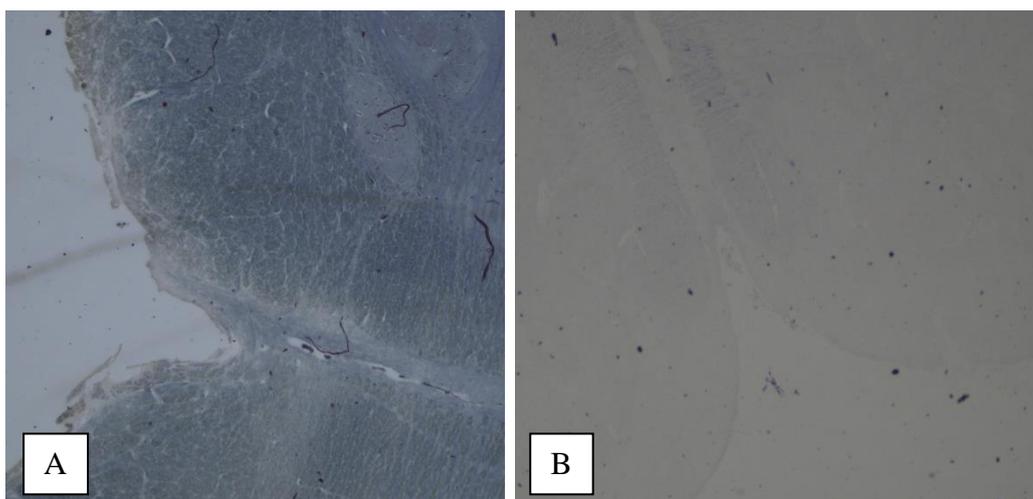


Figura 47: Esempi di colorazione Luxol Fast Blue non idonea. A: C1; B: C11. La "C" indica l'appartenenza al gruppo dei "controlli".

Si riporta anche l'esempio di un campione in cui è individuabile il nucleo di pre-Bötzing (Figura 48A) ed uno in cui è distinguibile il nucleo arcuato, indicato dalle frecce (Figura 48B).

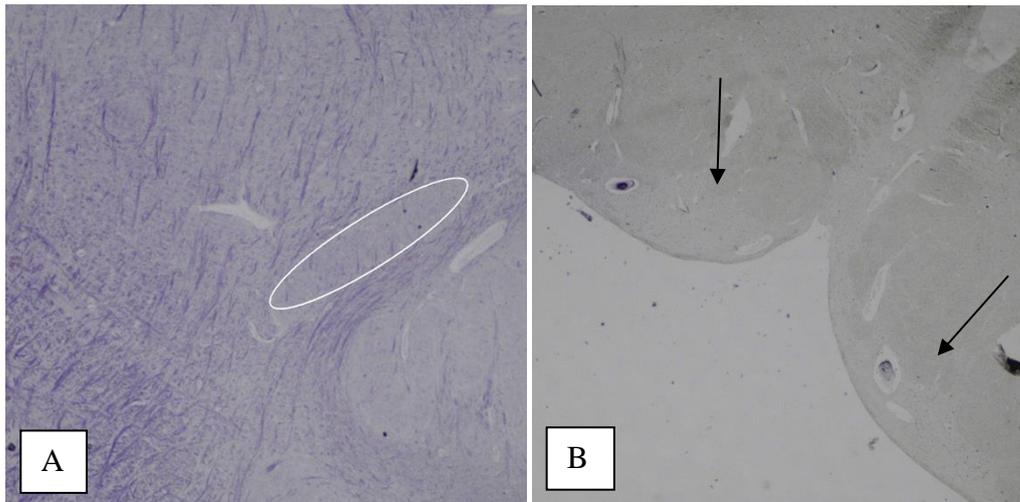


Figura 48: Colorazione Luxol Fast Blue; A: Nucleo pre-Bötzinger evidenziato dall'ellisse, T8, 20X; B: Nucleo arcuato indicato dalle frecce, T4, 20X. La "T" indica l'appartenenza dal gruppo dei "casi".

Per è opportuno valutare l'efficacia della misurazione manuale, e se, nei casi in cui non si disponga della digitale sia una buona approssimazione. Si misurano quindi digitalmente, le misure del nucleo arcuato ottenute a seguito della colorazione immunostochimica con anticorpo anti NeuN e si determina il rapporto tra i due parametri (Area Manuale/Area Digitale). Si ricorda che l'area manuale è stata calcolata approssimando il nucleo ad un rettangolo; mentre digitalmente è stata definita delineando il confine preciso del nucleo.

La Tabella 9 riporta i valori delle misure dell'area per ciascun campione, quelli evidenziati in arancione sono caratterizzati da una differenza tra le due misure maggiore del 50% indicato da un rapporto AM/AD minore o uguale a 0,5 e maggiore a 2. Si osserva tale differenza solo in 5 campioni (19%).

	Area manuale	Area digitale	Rapporto AM/AD		Area manuale	Area digitale	Rapporto AM/AD
C1	3,08	2,6	1,18	C17	0,8	0,76	1,05
C2	0,55	0,54	1,02	T1			
C3				T2	1,08 A	0,64 A	1,69 A
C4					0,69 B	0,27 B	2,56 B
C5	0,66	0,6	1,10	T3	1,4	1,6	0,88
C6	1,2	0,56	2,14	T4	0,98	1,33	0,74
C7	0,72	0,34	2,12	T5	0,11 A	0,2 A	0,55 A
C8	0,66	0,4	1,65		0,33 B	0,5 B	0,66 B
C9	0,56	0,44	1,27	T6	0,84	0,3	2,80
C10	0,52	0,44	1,18	T7	0,46	0,6	0,77
C11	0,52	0,5	1,04	T8	0,66 A	0,5 A	1,32 A
C12	1,46	1,36	1,07		1,21 B	1,4 B	0,86 B
C13	0,2	0,4	0,50	T9	1,22	1,2	1,02
C14	0,43	0,56	0,77	T10	0,36	0,6	0,60
C15	0,54	0,6	0,90	T11	1,42	1	1,42
C16	0,16 A	0,26 A	0,62 A				
	0,12 B	0,12 B	1 B				

Tabella 9: Valori dell'area calcolata manualmente (AM) e digitalmente (AD) del nucleo arcuato.

Si esegue un test statistico per valutare se vi sia una differenza statisticamente significativa tra le misurazioni. Si tratta di un Test T tra dati appaiati usando come unità campionaria la coppia di misure (misura digitale e manuale). Si pone come ipotesi nulla che la differenza media tra le misurazioni sia nulla e quindi non vi sia differenza tra le due modalità di misura. Il test conferisce un valore di p-value di 0,11 per cui non si rifiuta l'ipotesi nulla concludendo che non vi è una differenza statisticamente significativa tra le due misure. È possibile però dire che la misura manuale, come tendenza generale, tende a sovrastimare quella digitale, nonostante la differenza tra le due non sia significativa.

DISCUSSIONE

La SIDS, principale causa di morte naturale nel primo anno di vita, è una diagnosi di esclusione, nella quale giocano un ruolo chiave la vulnerabilità del lattante ed i fattori di stress esterno come, ad esempio, la posizione prona o sul fianco durante il sonno, l'ambiente microclimatico, il fumo materno durante e dopo la gravidanza. Tale sindrome è caratterizzata da un deficit nel meccanismo dell'*arousal* causato da un'alterazione congenita e/o acquisita a carico di uno o più nuclei cerebrali coinvolti nella regolazione della respirazione. Lo scopo di questo elaborato è valutare se una ridotta maturazione di alcuni dei nuclei del network respiratorio possono essere associati alla morte improvvisa rendendo l'infante maggiormente vulnerabile. In particolare, si valuta quale tra le metodiche istochimiche ed immunoistochimiche presentate, risulta essere più idonea per la valutazione dello sviluppo cerebrale.

Prima di tutto occorre fare una riflessione sulla numerosità del campione che risulta essere consistente in riferimento alle dimensioni del fenomeno, ma estremamente esigua dal punto di vista statistico; potrebbe essere utile eseguire il medesimo studio a livello multicentrico in modo da implementare la casistica, e sarebbe interessante eseguirlo a livello regionale toscano dal momento che, con l'introduzione del "Modello Toscana" del 2009, tutte le sospette SIDS dovrebbero essere trattate in modo omogeneo.

La colorazione istochimica Ematossilina-Eosina non consente di fare una valutazione approfondita sul grado di maturazione dei neuroni, né di individuare correttamente la presenza e l'estensione dei diversi nuclei respiratori, mentre permette di eseguire una valutazione generale sulla presenza/assenza del nucleo arcuato e di valutarne un eventuale sviluppo incompleto indicato da un ridotto volume/numero di neuroni (ipoplasia). Dai risultati ottenuti e dal valore del p-value ottenuto dal Test del X^2 corrispondente a 0,126 si conclude che l'ipoplasia del nucleo arcuato non è necessariamente associata alla SIDS, ma le due variabili risultano indipendenti.

L'agenesia invece si riscontra in 2 "casi" (18%) suggerendo una possibile associazione con la SIDS, ma dal test statistico eseguito risulta un valore di p-value di 0,086 per cui maggiore del valore di significatività. La mancata associazione

conclusa tra ipoplasia/agenesia del nucleo arcuato e la SIDS, che contrasta quanto dimostrato da studi precedenti (12) potrebbe essere dovuta alla relativa esigua quantità dei campioni considerati nello studio.

Dai risultati ottenuti dell'ependima si osserva una struttura caratterizzata da un monostrato ben definito in 13/15 controlli (87%) suggerendo quindi che questa sia la normale conformazione di tale struttura anatomica. Nei "casi" 7/11 (64%) mostrano uno strato non uniforme, ad indicare una possibile desquamazione delle cellule epiteliali ependimali.

Dal test statistico effettuato per valutare l'associazione tra la mancata uniformità dell'ependima e la morte improvvisa si ottiene un valore di p-value minore a 0,05 per cui si deduce la presenza di associazione, in particolare un rischio aumentato di 11,4 volte indicato dal parametro dell'Odds Ratio.

Oltre allo strato ependimale fenestrato si nota anche una maggior presenza di taniciti nei "casi" rispetto ai controlli, ma tale parametro non è valutabile dato che i taniciti non sono facilmente distinguibili a causa della medesima colorazione delle altre cellule. Quindi si mostra come una desquamazione cellulare a livello dell'ependima sia associata ad un aumento di rischio di 11,4 volte per un lattante di incombere in morte improvvisa.

Come mostrato nei risultati l'Ematossilina-Eosina potrebbe essere utile anche per la valutazione del grado di sviluppo dell'area postrema, ma non è stato possibile ricavare dati utili per l'analisi dato che tale area anatomica è risultata presente solo in una minoranza dei campioni non essendo compresa nella maggior parte delle sezioni di taglio effettuate in fase di campionamento con metodiche standard; per il futuro potrebbe essere utile modificare la tecnica di campionamento in modo da includere anche tale area in tutti i campioni.

Dai risultati ottenuti mediante la colorazione immunohistochimica con anticorpo anti NeuN è possibile trarre una serie di considerazioni riferite al nucleo arcuato. Si osserva la presenza di agenesia solo in un caso T1 (9%). Il caso T5, che risultava essere affetto da agenesia con l'Ematossilina-Eosina, con l'immunohistochimica con NeuN dimostra avere un'ipoplasia monolaterale, anche se le dimensioni del nucleo sono estremamente ridotte. Non è stato eseguito un test statistico per valutare l'associazione tra agenesia e SIDS dato che, il test effettuato per la medesima

valutazione con i dati forniti dall'ematossilina che mostrava 2 casi di agenesia invece di 1, forniva già un valore di p-value maggiore di 0,05, per cui si concorda con la precedente conclusione che l'agenesia del nucleo arcuato non sia necessariamente associata alla morte improvvisa, questo potrebbe essere il linea con quanto concluso da Maturri, Ottaviani ed altri nel 2004, che giustificavano l'assenza del nucleo arcuato dovuta ad una possibile lacerazione delle leptomeningi in fase di campionamento (52), quindi potrebbe essere collegata ad un'azione artefattuale.

Le dimensioni riguardanti la lunghezza e l'area del nucleo arcuato non sono indicativi dello sviluppo dato che sono dipendenti dall'età del lattante, per cui, molto probabilmente, un nucleo di dimensioni maggiori è associato a bambini di età maggiore rispetto ad un nucleo molto esiguo che presumibilmente appartiene ad un lattante di pochi giorni; la scelta di anonimizzare completamente i dati non rende possibile correlare il dato osservato con l'età esatta del soggetto. Inoltre, dal test statistico eseguito, si deduce che non vi è una differenza statisticamente significativa tra il rapporto dell'area del nucleo arcuato e l'area totale della sezione. Questo indica che la valutazione della semplice estensione del nucleo arcuato non è un parametro di per sé sufficiente per effettuare una diagnosi di SIDS. In linea con il fatto che anche l'Ematossilina-Eosina, che permette una diagnosi solo su base volumetrica, non è adeguata.

Il numero di neuroni positivi all'immunoistochimica con NeuN indica il numero di neuroni maturi ed in buono stato di salute. Una ridotta intensità è indice di alterazione differenziativa dei neuroni correlata a distress, asfissia perinatale o ipossia, ritenuti essere fattori patogenetici della SIDS, ma non solo (58). L'intensità della colorazione non è quindi significativamente diversa tra casi e controlli, come mostrato dal test statistico che ha come risultato di p-value 0,83 suggerendo dunque l'indipendenza tra variabili. Questo a sostegno del fatto che anche i "controlli" potrebbero aver subito episodi di sofferenza e quindi avere una ridotta intensità neuronale. Infatti, come mostrano i risultati (Tabella 4), l'intensità della colorazione è variabile tra uno score di 3 e di 2 indifferentemente nei casi e nei controlli, con un solo caso, il T11, con score di 1.

La negatività a NeuN può essere indicativa dell'assenza di NeuN e quindi di immaturità neuronale dato che tale proteina è espressa solo in cellule mature; può rappresentare un'alterata fosforilazione della proteina dal momento che subisce multiple fosforilazioni post tradizionali e l'anticorpo riconosce esclusivamente la forma fosforilata; oppure potrebbe essere il risultato di un artefatto in fase di processazione, dato che una procedura scorretta causa una riduzione dell'antigenicità. In generale, la negatività neuronale suggerisce la presenza di un danno neuronale (57). Il numero di neuroni positivi è estremamente variabile in tutti i campioni, ma in media risulta essere maggiore di 100 nei controlli e minore di 100 nei "casi", in particolare si ottiene una media di 116 nei controlli e di 39 nei casi considerando esclusivamente i campioni in cui i neuroni sono distribuiti in modo uniforme considerando i due emi-nuclei bilateralmente. Dividendo, invece, il midollo nei due emi-lati, nei controlli si osserva un'omogenea distribuzione mentre in 6 "casi" (55%) si nota una differenza tra le due metà (indicate da A e B in Tabella 4), che si riflette anche in una differente densità. Infatti, dagli istogrammi mostrati in Figura 35 si evince come la densità neuronale sia distribuita in modo omogeneo tra i due emi-nuclei nei controlli, tranne due esempi, il C5 che mostra totale assenza di neuroni in una metà e il C16 che evidenzia solo una leggera differenza. Dalla stessa Figura 35 si vede, al contrario, come nei casi la densità sia, nella maggioranza, distribuita in modo disuguale nei due emi-lati, suggerendo un'importante frequenza di ipoplasia nei lattanti morti improvvisamente e inaspettatamente.

Il parametro da prendere maggiormente in considerazione è dunque la densità, calcolata come il rapporto tra il numero di neuroni positivi e l'area del nucleo, permettendo di valutare la quantità di neuroni positivi per mm^2 e poter effettuare dei confronti. La densità è estremamente variabile nei controlli, questo spiegabile dal fatto che si tratta comunque di lattanti deceduti, anche se per causa nota, per cui un grado di immaturità neuronale potrebbe essere presente. Nel dettaglio è possibile associare a C1, C9 e C12 una lieve ipoplasia bilaterale, a C6 e C12 un'ipoplasia monolaterale, mentre i restanti controlli potrebbero essere considerati nella normalità. L'istogramma B, in Figura 35, evidenzia come nei casi T2, T3, T5, T6, T8 e T10 il nucleo arcuato presenta un lato con una densità almeno doppia rispetto

all'altra indicando un'ipoplasia monolaterale. I restanti casi, quindi T4, T7, T9 e T11 mostrano un'esigua quantità di neuroni positivi, molto inferiore rispetto ai controlli per cui potrebbero rappresentare quattro esempi di ipoplasia bilaterale. Sulla base di questi risultati e dal valore del p-value ottenuto dal test statistico (0,0046) si conclude che vi è un'associazione tra l'ipoplasia del nucleo arcuato e la SIDS, in particolare è associata ad un rischio aumentato di 20 volte. Questo sostiene i risultati di studi precedenti (12), portando quindi a concludere che la presenza di ipoplasia del nucleo arcuato in un lattante, lo potrebbe indurre a morte improvvisa a seguito di una giustapposizione di fattori di stress esterni.

Il campione C17 che mostra vasi e strutture otticamente vuote nella zona in cui dovrebbe essere ospitato il nucleo arcuato è probabilmente correlato alla presenza di una malformazione neuronale; ma non possiamo averne la certezza non potendo risalire al lattante in questione e non disponendo della cartella clinica.

Riassumendo, quindi, mediante l'immunoistochimica con NeuN si riscontrano nei controlli 3 lattanti con lieve ipoplasia bilaterale del nucleo arcuato, 2 con ipoplasia monolaterale e 10 con un normale sviluppo; nei "casi" si rilevano 6 lattanti con ipoplasia monolaterale, 4 con ipoplasia bilaterale ed 1 con agenesia.

Tutto questo porta a concludere che una diminuita positività di NeuN a livello del nucleo arcuato può essere correlata alla SIDS dato che la presenza di una maggiore quantità di neuroni immaturi a livello del nucleo arcuato potrebbe indicare una riduzione dell'efficacia delle attività svolte da tale struttura anatomica, tra cui la chemiosensibilità alla CO₂, la ventilazione e il passaggio sonno-risveglio (12).

La medesima colorazione immunoistochimica consente di trarre ragionevoli informazioni anche in riferimento all'ependima, neuroepitelio che delimita il quarto ventricolo. È composto da cellule colonnari, solitamente ciliate, alternate da taniciti, cellule specializzate nella funzione chemorecettoriale.

Dall'analisi dell'ependima dei 15 controlli si nota la presenza di ciglia in tutti i campioni, anche se 5 di essi ne mostrano un esiguo numero; in solo 8 lattanti si osserva la presenza di taniciti, di cui 2 risultano colorati di blu, indice di negatività a NeuN e dunque di immaturità neuronale, e 4 sono in numero estremamente ridotto; in tutti i campioni tranne in 3 è ben delineato il monostrato di cellule

evidenziate di blu, nei casi esclusi si osserva uno strato non uniforme, con cellule non ben delineate e con la presenza di spazi bianchi.

Studiando i “casi” si evince la presenza di ciglia in 8 campioni su 11 (73%), ma ridotta in 3 di questi; in 8 si nota la presenza di taniciti, anche se in 2 risultano colorati di blu a seguito dell’immunoistochimica; lo strato di cellule ependimali risulta essere in tutti i lattanti non uniforme con una grande quantità di spazi bianchi, ed in 2 in particolare risulta essere quasi completamente assente. La presenza di taniciti colorati in blu o marrone non è interpretabile, dato che si tratta di cellule ependimali specializzate per cui non dovrebbero risultare positive; potrebbe essere dovuto ad una cross reattività dell’anticorpo o alla migrazione di alcuni neuroni nello strato ependimale, sarebbero interessanti ulteriori studi per indagare sulla questione.

La presenza di taniciti risulta poter essere associato alla SIDS, come mostrato dal test statistico eseguito con valore di p-value di 0,0008; nel dettaglio la presenza di taniciti è correlata ad un aumentato rischio di 9 volte per il lattante di essere vulnerabile a morte improvvisa. Allo stesso modo si dimostra anche l’associazione tra la mancanza di un monostrato di cellule ependimali, quindi l’assenza o la fenestrazione di esso, con la SIDS; infatti, il valore ottenuto dal test statistico è estremamente inferiore al limite di significatività. L’aumento del numero di taniciti nei “casi” è indice di un ritardo della maturazione ependimale dato che tali cellule sono molto presenti nel periodo prenatale, ma solitamente alla nascita dovrebbero perdere i loro prolungamenti e trasformarsi in cellule ependimali normali (49). La mancata organizzazione dello strato cellulare può segnalare una desquamazione ependimale, maggiormente avanzata nei due casi in cui l’ependima risulta essere sostanzialmente assente. Dunque, se l’ependima è considerato essere una barriera protettiva e un filtro tra il parenchima e il liquido cerebrale, una sua alterazione potrebbe essere correlata ad una riduzione della sua funzionalità rendendo i lattanti maggiormente suscettibili a morte improvvisa (49).

Quindi, si suggerisce come una desquamazione cellulare e un aumento del numero di taniciti potrebbe essere associata a morte improvvisa.

Il caso T11, è un esempio particolare, dato che risulta avere la massima estensione del nucleo arcuato, ma la minima densità neuronale a causa del numero

estremamente ridotto di neuroni positivi, che tra l'altro risultano avere un'intensità molto debole indicata dallo score 1 (alla colorazione immunoistochimica per NeuN), suggerendo quindi un deficit importante nel processo di maturazione neuronale. Quest'ipotesi è supportata anche dai risultati forniti dall'analisi dell'ependima in cui le cellule sono andate quasi tutte incontro a desquamazione, le ciglia sono scarsamente rappresentate ed i taniciti molto presenti indicando quindi un'alterata maturazione anche nelle cellule ependimali.

Confrontando i risultati ottenuti con Ematossilina-Eosina con quelli ottenuti con la colorazione immunoistochimica con anticorpo anti NeuN si osserva una differenza sulla rilevanza dell'ipoplasia e la SIDS, dato che con la prima colorazione non risulta esserci un'associazione statisticamente significativa, mentre con la seconda sì. Questo perché l'Ematossilina-Eosina individua l'ipoplasia solo su base volumetrica, ma come dimostrato non vi è una differenza statisticamente significativa tra i "casi" e i controlli sulla distribuzione dell'area occupata dal nucleo arcuato nell'intera sezione. Inoltre, questa differenza potrebbe essere spiegabile anche dal fatto che l'ipoplasia è una condizione riscontrabile anche negli adulti e non necessariamente conduce alla morte, per cui come unico parametro di valutazione non è sufficiente nella discriminazione della SIDS. Si ricorda inoltre che, per una completa e corretta indagine anatomo-patologica è necessario considerare anche la presenza dei fattori di rischio come la posizione assunta durante il sonno, il bed sharing e le condizioni microclimatiche ambientali.

I risultati ottenuti mediante entrambe le colorazioni sono concordanti sul fatto che una desquamazione dell'ependima sia considerata un fattore di rischio per la SIDS, mentre esclusivamente l'immunoistochimica permette di valutare i taniciti. Dunque, complessivamente possiamo concludere che, tra le due colorazioni, l'immunoistochimica con anticorpo anti NeuN è la tecnica più efficace per la valutazione della maturazione neuronale dei nuclei cerebrali e quindi per sostanziare anatomo-funzionalmente i soggetti maggiormente predisposti alla SIDS. Si sottolinea che l'utilità del marcatore NeuN è collegata allo studio della maturazione dei singoli nuclei, e non tanto ad una valutazione generale di maturazione neuronale dato che l'intensità della colorazione è stato dimostrato non

essere statisticamente significativa tra i “casi” ed i “controlli” dato che, lattanti di entrambi i gruppi, potrebbero aver subito episodi di sofferenza.

In riferimento al nucleo di pre-Böttinger non sono stati riscontrati particolari dati rilevanti, probabilmente per il fatto che spesso è difficile identificarlo, almeno con queste due tecniche, per cui in alcuni infanti non è stato possibile valutarlo.

La colorazione istochimica speciale con Blu di Toluidina consente di valutare in modo migliore il nucleo di pre-Böttinger riuscendo a identificarlo in modo più efficace ed effettuare opportune valutazioni. Infatti, mediante il test statistico eseguito si dimostra una differenza statisticamente significativa tra la media dell’area dei casi e dei controlli, nel dettaglio risulta ridotta nei “casi”. In tale gruppo, oltre ad una riduzione dell’area, si osserva una minore quantità di neuroni a livello del nucleo ad indicare una possibile ipoplasia della struttura, associata a difetti respiratori, dato che il nucleo di pre-Böttinger è fondamentale per la ritmogenesi respiratoria (39).

Tale colorazione consente di delineare in modo più preciso i confini del nucleo arcuato, ma non permette di discriminare tra i neuroni maturi e in buono stato di salute e quelli che hanno subito un danno neuronale. Essendo una colorazione manuale e non standardizzata può essere influenzata da innumerevoli parametri per cui non si ottiene un’omogeneità nella colorazione risultante, motivo per cui in 4 campioni non è stato possibile eseguire delle valutazioni a causa della colorazione eccessivamente diafana. Dai risultati ottenuti dal test statistico, con p-value di 0,01, si deduce un’associazione tra ipoplasia e i “casi”, confermando i risultati ottenuti con la colorazione immunoistochimica con anticorpo anti NeuN.

Anche le valutazioni eseguite sull’ependima sono in linea con le precedenti, è possibile però distinguere in modo migliore i prolungamenti dei tuniciti.

L’allestimento del protocollo della colorazione Luxol Fast Blue ha incontrato molti problemi, data la difficoltosa permeabilità delle sezioni al colorante a causa della fissazione in para-formaldeide (usata per la fase di fissazione dell’encefalo) che si lega ai medesimi siti delle proteine a cui dovrebbe congiungersi il colorante. Dopo molteplici prove, con la soluzione Tris HCl/EDTA si riusciva ad ottenere lo smascheramento dei legami, ma nonostante questo il risultato finale è stato una colorazione non omogenea tra i vari campioni e anche a livello della stessa sezione

impedendo di valutare le aree anatomiche d'interesse. La grande variabilità riscontrata potrebbe essere dovuta al grande volume delle soluzioni in cui sono state immerse le sezioni durante la colorazione che, soprattutto durante la fase in microonde, non consentiva un'omogenea ebollizione del liquido non riuscendo dunque ad avere la stessa temperatura in ogni punto; sarebbe opportuno lavorare su volumi minori per consentire un'omogenea distribuzione della temperatura, infatti, durante la fase di messa a punto del protocollo, lavorando su un 1/8 del volume usato in fase di colorazione, il risultato era stato nettamente migliore, ma questo implicherebbe di colorare contemporaneamente una quantità estremamente esigua di campioni. Un altro fattore di variabilità potrebbe essere collegato al tempo di fissazione del materiale anatomico di partenza, dato che, spesso viene tenuto in fissativo per una quantità di tempo maggiore rispetto al necessario (iperfissazione), e quindi non identico per tutti i campioni. Un altro problema potrebbe essere collegato all'utilizzo di una soluzione di Luxol già pronta all'uso, mentre nei precedenti protocolli si utilizzava la polvere. Infine, dal 2013 ad oggi, la paraffina potrebbe avere subito delle variazioni nella composizione e questo potrebbe rendere un campione più suscettibile rispetto ad un altro dato che la prima operazione necessaria precedente alla colorazione è la sparaffinatura e, nel caso in cui la paraffina fosse differente, potrebbe necessitare di una tempistica diversa per ottenere la completa scopertura, correlata anche al tempo da cui pezzo anatomico risulta incluso in paraffina, anche se questo problema procedurale potrebbe essere correlato a tutte le colorazioni. Dunque, non essendo una procedura standardizzata, possono essere molteplici le variabili che influenzano la riuscita della colorazione e che purtroppo non è possibile controllare.

Valutiamo, infine, se l'approssimazione eseguita in fase di misurazione possa essere considerata accurata; in particolare se è possibile approssimare il nucleo arcuato ad un rettangolo durante la misurazione manuale per semplificare il processo di calcolo. Confrontando le misure dell'area del nucleo arcuato calcolate manualmente mediante approssimazione e digitalmente definendo dettagliatamente i confini della struttura, mediante il Test T tra dati appaiati si ottiene 0,11 come p-value dimostrando che non vi sia differenza statisticamente significativa tra le due

modalità di misura. È dunque possibile ricorrere alla misura manuale quando non si dispone della digitale dato che la differenza media tra le misurazioni risulta nulla. Riassumendo, quindi, tra le metodiche presentate la più efficace risulta essere l'immunoistochimica con anticorpo anti NeuN, anche se, a differenza della colorazione con Blu di Toluidina, non consente un'adeguata valutazione del nucleo di pre-Bötzinger, ma per la facilità di esecuzione e di riproducibilità, e per le tempistiche richieste è comunque da preferire dato che consente altre importanti valutazioni per identificare i casi di SIDS. Questi risultati confermano che NeuN è un utile marcatore di immaturità neuronale, sostenendo l'ipotesi di Lavezzi, Corna e Maturri che lo ritenevano efficace per lo studio del nucleo arcuato e dell'ependima (58) ma, in contrasto con il loro studio non risulta essere utile per la valutazione del nucleo di pre-Bötzinger.

I risultati ottenuti, contrastanti con studi precedenti, potrebbero essere associati al fatto che ai "casi" di suddetti studi erano riferite anche informazioni circostanziali, di cui non si dispone in questo studio, a seguito della scelta di anonimizzare completamente i campioni. I limiti quindi dello studio presentato, oltre alla numerosità del campione, sono collegati alla mancanza di dati circostanziali, dato che nessun fattore, preso singolarmente, è sufficiente ad innescare la morte improvvisa ed inattesa del lattante, ma è sempre generata da un insieme di variabili ("triple hit model"). Possibili ricerche future potrebbero essere volte a valutare meglio il ruolo delle alterazioni ependimali con la SIDS dato che, in letteratura, ricercando su *PubMed* "SIDS and Ependyma" figurano 5 articoli, ma solo 2 parlano di cambiamenti a carico dell'ependima, uno datato al 1996 che non utilizzava NeuN come marcatore e correlava la SIDS esclusivamente ad una desquamazione ependimale (60); ed uno del 2010 che correlava alcuni casi di SIDS con una desquamazione ed un aumento del numero di taniciti a livello dell'ependima, considerazioni però non rilevate con la colorazione immunoistochimica con anticorpo anti NeuN (49). L'associazione, invece, tra l'ipoplasia del nucleo arcuato e la SIDS è ormai largamente confermata, fin dal primo articolo del 1992 (12). A sostegno di questa tesi si sono susseguiti almeno 40 articoli scientifici condotti da studiosi accreditati individuati dalla ricerca su *PubMed* "Arcuate nucleus hypoplasia and SIDS".

Dallo studio eseguito si suggerisce quindi di introdurre la colorazione immunoistochimica con anticorpo anti NeuN come metodo di routine utile per individuare segnali di immaturità neuronale che possano rendere il lattante maggiormente suscettibile a morte improvvisa ed inattesa, dato che dai confronti eseguiti risulta essere la colorazione più utile, pur non essendo possibile rapportare tali dati con risultati di altri studi visto che non si dispone in letteratura di confronti simili. Potrebbe però, al contempo, essere utile investigare maggiormente sulla colorazione di Luxol Fast Blue essendo considerata una tra le principali metodiche per la valutazione del processo di maturazione neuronale, in particolare della mielina (61).

È possibile concludere che, avendo dimostrato un'associazione tra l'immaturità neuronale, la desquamazione ependimale e la presenza di taniciti con la SIDS, le morti improvvise e inattese potrebbero avere alla base un'alterazione di sviluppo del sistema nervoso centrale nel periodo compreso tra le otto e le sedici settimane quando inizia il differenziamento cellulare e le cellule ependimali ed i neuroni acquisiscono le loro caratteristiche morfologiche (32), rappresentando un possibile cofattore anatomico-funzionale nel determinismo della morte improvvisa ed inattesa.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Jhodie R.Ducan, Roger W. Byard, SIDS-Sudden infant and early childhood death: The past, the present and the future, University of Adelaide Press, South Australia 5005, 2018
- 2- Beckwith J.B., “Defining the sudden infant death syndrome”, *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2003, 157 (3):286-90
- 3- Bajanowski T., Brinkmann B., Vennemann M., “The San Diego definition of SIDS: practical application and comparison with the GeSID classification”, *Int J Legal Med*, 2006, 120:331-336
- 4- Anna Maria Lavezzi, Stefano Ferrero Bogetto, Luigi Maturri, La morte improvvisa e inaspettata fetale e neonatale, Aracne editrice, Roma, 2020
- 5- Glinge C., Rossetti S., ed al., “Risk of Sudden Infant Death Syndrome Among Siblings of Children Who Died of Sudden Infant Death Syndrome in Denmark”, *Jama Netw Open*, e2252724, 2023
- 6- Law E Joy, Counsens Simon, ed al., “4 million neonatal deaths: When? Where? Why?”, *Lancet*, South Africa, 2005, 365(9462): 891-900
- 7- Ministero della salute, Salute del bambino e dell'adolescente, SIDS, 2023 (<https://www.salute.gov.it/portale/saluteBambinoAdolescente/dettaglioContenutiSaluteBambinoAdolescente.jsp?lingua=italiano&id=1923&area=saluteBambino&menu=nascita>)
- 8- Carrie K. Shapiro-Mendoza, Kay M. Tomashek, ed al. “Recent National Trends in Sudden, Unexpected Infant Deaths: More Evidence Supporting a Change in Classification or Reporting”, *American Journal of epidemiology*, 2006, 163:762-769

- 9- Comitato operativo Studio Hera, “Mortalità nei primi due anni di vita in Italia: Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) ed altre morti inattese”, Istituto Superiore di Sanità, 2005
- 10- National Center for Education in Maternal and Child Health, Georgetown University, SUDI-SIDS Statistics (<https://www.ncemch.org/suid-sids/statistics/>)
- 11- Lavezzi Anna Maria, Ottaviani Giulia, Maturri Luigi, “Hypoplasia of the arcuate nucleus and maternal smoking during pregnancy in sudden unexplained perinatal and infant death”, *Neuropathology*, Milano, 2004, 24: 284-289
- 12- Filiano James J., Kinney M.D, Kinney Hannah C., “Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome”, *Journal of Neuropathology and experimental neurology*, 1992, 52:394-403
- 13- Saper B. Clifford, Scammell E. Thomas, Lu Jun, “Hypothalamic regulation of the sleep and circadian rhythms”, *Nature*, 2005, 437:1257-1263
- 14- Amatory Jason, Azarbarzin Ali, Younes Magdy ed al, “Arousal intensity is a distinct pathophysiological trait in obstructive sleep apnea”, *Sleep*, 2016, 39 (12):2091-2100
- 15- Filiano J.J., Kinney H.C., “A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple risk model”, *Biol Neonate*, 1994, 65: 94-197
- 16- Guntheroth Warren G, Spiers Philip S., “The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome”, *Pediatrics*, 110 (5), 2002

- 17- Vincent Anita, Chun Ngan Thy ed al., “Sudden Infant Death Syndrome: Risk Factors and Newer Risk Reduction Strategies”, *Cureus*, 15 (6), 2023, e40572
- 18- Lavezzi Anna Maria, Ottaviani Giulia, Maturri Luigi, “Ontogenesis of human cerebellar cortex and biopathological characterization in sudden unexplained fetal and infant death”, *Springer*, Milano, 2006
- 19- Maturri Luigi, Ottaviani Giulia, Lavezzi Anna Maria, “Techniques and criteria in pathologic and forensic-medical diagnostics in sudden unexpected infant and perinatal death”, *American Journal of Clinical Pathology*, 2005, 124: 259-268
- 20- Godek Devon, Freeman Andrew M., “Physiology, Diving Reflex”, *National library of medicine*, 2022
- 21- Faye-Peterson O.M., Guinn D.A., Wenstrom K.D.,”Value of perinatal autopsy”, *Obstetrics & Gynecology*, 1999, 94:915-920
- 22- Disciplina del riscontro diagnostico sulle vittime della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS) e di morte inaspettata del feto, *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Serie Generale Anno 147°- Numero 34 del 10/02/2006
- 23- Protocolli diagnostici nei casi della morte improvvisa infantile e della morte inaspettata del feto, *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, Serie Generale n.272, Supplemento Ordinario n.89 del 22 novembre 2014
- 24- Che cos'è La Shaken Baby Syndrome, *Terre des Hommes Italia* (<https://nonscuoterlo.terredeshommes.it/per-saperne-di-piu/che-cose-la-shaken-baby-syndrome/>)

- 25- Piano Sanitario Regionale 2008-2010, Bollettino ufficiale della regione Toscana n.25 del 30/07/2008
- 26- Delibera n.1164 del 14 dicembre 2009, Banca dati degli atti amministrativi della Giunta Regionale Toscana
(<file:///C:/Users/Utente/Downloads/Delibera%20Regione%20Toscana%20n.1164%20del%2014.12.2009.pdf>)
- 27- Piumelli R., Buccoliero A.M., Nardini V., “An integrated approach to Sudden Unexpected Infant Deaths (SUDI) in the Tuscany Region: first year of experience”, *Semi per la SIDS ONLUS*, 2010
- 28- Delibera n.1164 14/12/09, Allegato A: “Percorsi organizzativi finalizzati all’ esecuzione del riscontro autoptico nel caso di Morte Improvvisa ed Inattesa del Lattante nella Regione Toscana”
(<file:///C:/Users/Utente/Downloads/all.%20a%20Delibera%20Regione%20Toscana%20n.1164%20del%2014.12.2009.pdf>)
- 29- Henry Gray, Gray’s Anatomy, 29° edizione americana, Lea & Febiger, Stati Uniti D’America, 1975
- 30- Murray L. Barr, John A. Kiernan, Anatomia del sistema nervoso umano, traduzione italiana 6°edizione, McGraw-Hill Libri Italia, Milano, 1995
- 31- Muhr Jeremy, Arbor C. Tafline, Ackerman M. Kristin, “Embriology, Gastrulation”, *StatPearls [Internet]*, 2023
- 32- Jonathan S. Wigglesworth, Don B. Singer, Textbook of fetal and perinatal pathology, vol.2, Blackwell Scientific Publications, Boston, 1991
- 33- Copp J. Andrew, Adzick Scott N., Chitty S. Lyn ed al., “Spina Bifida”, *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 1:1500

- 34- Ludwig E. Parker, Reddy Vamsi, Varacallo Matthew, “Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS)”, *StatPearls [Internet]*, 2022
- 35- Giorgio Barbatelli, Laura Bertoni, Francesca Boccafoschi ed al., *Anatomia Umana. Fondamenti. Con istituzioni di istologia*, Edi-ermes, 2018
- 36- Enciclopedia Treccani, Dizionario di Medicina, Cranici-Nervi (https://www.treccani.it/enciclopedia/nervi-cranici_%28Dizionario-di-Medicina%29/)
- 37- Varga G. Adrienn, Maletz N. Sebastian ed al., “Neurochemistry of Kölliker-Fuse nucleus from a respiratory perspective”, *Journal of Neurochemistry*, 2021, 156 (1):16-37
- 38- Lavezzi Anna Maria, Matturri Luigi, “Hypoplasia of Parafacial/Facial Complex: a very frequent finding in sudden unexplained fetal death”, *The Open Neuroscience Journal*, 2008, 2:1-5
- 39- Reikling C. Jens, Feldman L. Jack, “PreBötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation”, *Annual Review of Physiology*, 1998, 60:385
- 40- Lavezzi Anna Maria, Matturri Luigi, “Functional neuroanatomy of the human pre-Bötzinger complex with particular reference to sudden unexplained perinatal and infant death”, *Neuropathology*, 2008, 28:10-16
- 41- Guyenet G. Patrice, Stornetta L. Ruth, Bayliss A. Douglas, “Central respiratory chemoreception”, *Journal of Comparative neurology*, 2010, 1; 518(19): 3883–3906.
- 42- Nattie Eugene, Li Aihua, “Central Chemoreceptors: locations and functions”, *Comprehensive Physiology*, 2012, 2(1): 221–254
- 43- Nieuwenhuys R., Voogd J. Van Huijzen Chr., *The Human central Nervous System*, 3° edizione, Springer-Verlag, Berlino, 1988
- 44- Marliani Andrea, “La Serotonina”, *s.i.tri. Società Italiana di Tricologia*, Firenze, 2013

- 45- Pallanti S., “Serotonina: il presente e il futuro”, *Journal of Psychopathology*, 2004
- 46- Panigrahy Ashok, Filiano James ed al., “Decreased serotonergic receptor binding in rhombic lip-derived regions of the medulla oblongata in the sudden infant death syndrome”, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2000, 59:377-384
- 47- Lavezzi Anna Maria, Weese-Mayer E. Debra., ed al., “Developmental alterations of the respiratory human retrotrapezoid nucleus in sudden unexplained fetal and infant death”, *Anatomic Neuroscience*, 2012; 170:12-19
- 48- Lavezzi Anna Maria, Mecchia Donatella, Maturri Luigi, “Neuropathology of the area postrema in sudden intrauterine and infant death syndrome related to tobacco smoke exposure”, *Autonomic Neuroscience*, 2012, 166:29-34
- 49- Lavezzi Anna Maria, Corna F. Melissa, Maturri Luigi, “Ependymal alterations in sudden intrauterine unexplained death and sudden infant death syndrome: possible primary consequence of prenatal exposure to cigarette smoking”, *Neural Development*, 2010, 5:17-25
- 50- Maturri Luigi, Biondo B., Suárez-Mier M.P., Rossi L., “Brain stem lesions in the sudden infant death syndrome: variability in the hypoplasia of the arcuate nucleus”, *Acta Neuropathol*, 2002, 104:12-20
- 51- Moon Y. Rachel, Darnall A. Robert ed al., “SIDS and other sleep-related infant deaths: evidence base for 2016 updated recommendations for a safe infant sleeping environment”, *American Academy of Pediatrics*, 2016, 138(5)
- 52- Maturri Luigi, Ottaviani Giulia ed al., “Study of the brainstem, particularly the arcuate nucleus, in sudden infant death syndrome (SIDS) and sudden intrauterine unexplained death (SIUD)”, *Am J Forensic Med Pathol*, 2004, 25:44-48
- 53- Lavezzi Anna Maria, Corna F. Melissa, Mehboob Riffat, Maturri Luigi, “Neuropathology of the intermediolateral nucleus of the spinal cord in

sudden unexplained perinatal and infant death”, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2010, 28(2):133-8

54- Lavezzi Anna Maria, Ottaviani Giulia, Ballabio Gianmario ed al., “Preliminary Study on the Cytoarchitecture of the Human Parabrachial/Kölliker-Fuse Complex, with Reference to Sudden Infant Death Syndrome and Sudden Intrauterine Unexplained Death”, *Pediatric and Developmental Pathology*, 2004, 7:171-179

55- Lavezzi Anna Maria, Ferrero Stefano, Roncati Luca ed al. “Impaired orexin receptor expression in the Kölliker–Fuse nucleus in sudden infant death syndrome: possible involvement of this nucleus in arousal pathophysiology”, *Neurological Research*, 2016, 38 (8):706-716

56- Lavezzi Anna Maria, Casale Valentina, Oneda Roberta ed al., “Sudden infant death syndrome and sudden intrauterine unexplained death: correlation between hypoplasia of Raphè Nuclei and Serotonin transporter gene promoter polymorphism”, *Pediatric Research*, 2009, 66:22-27

57- Gusel’nikova V.V., Korzhevskiy D.E., “NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker”, *Acta Nature*, 2015, 7(2):42-7

58- Lavezzi Anna Maria, Corna Melissa F., Maturri Luigi, “Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death”, *Journal of the Neurological Sciences*, 2013, 329:45-50

59- Narita Naoko, Narita Masaaki, Takashima Sachio, Nakayama Masahiro, “Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population”, *Pediatrics*, 2001, 107(4):690-2

60- Lucena J., Cruz-Sánchez F F, “Ependymal changes in sudden infant death syndrome”, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 1996, 55(3):348-56

61- Sarnat B. Harvey, “Immunocytochemical markers of neuronal maturation in human diagnostic neuropathology”, *Cell and Tissue Research*, 2015, 359(1):279-94