

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**  
**“AMEDEO AVOGADRO”**



**DOTTORATO DI RICERCA**  
**IN**  
**MEDICINA MOLECOLARE**  
**XXVI CICLO**

**Caratterizzazione della risposta macrofagica  
nella steatoepatite non alcolica**

**Candidato**

**Irene LOCATELLI**

**Tutor**

**Prof. Emanuele ALBANO**

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**

## **SOMMARIO**

|   |    |
|---|----|
| INTRODUZIONE.....   | 3  |
| MATERIALI E METODI.....   | 6  |
| RISULTATI.....  | 7  |
| I topi C57BL/6 sviluppano steatoepatite più severa rispetto ai topi Balb/c dopo quattro settimane di dieta MCD. ....                          | 7  |
| La polarizzazione Th1 nei topi C57BL/6 non influenza la gravità della NASH indotta dalla dieta MCD. ....                                      | 7  |
| I linfociti Th17 non sono coinvolti nello sviluppo della NASH indotta dalla dieta MCD.....  | 7  |
| La polarizzazione M1 delle cellule di Kupffer è responsabile della maggiore gravità della NASH nei topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD..... | 7  |
| I topi C57BL/6 NF- $\kappa$ B1-/- sviluppano maggiore steatoepatite rispetto al ceppo di controllo dopo quattro settimane di dieta MCD.....   | 8  |
| DISCUSSIONE.....  | 9  |
| Conclusioni.....  | 10 |
| Sviluppi della ricerca .....  | 10 |
| BIBLIOGRAFIA .....  | 12 |

## INTRODUZIONE

L'incidenza di sovrappeso ed obesità sta rapidamente aumentando nei paesi sviluppati ed è associata con lo sviluppo di diabete di tipo 2, ipertensione e NAFLD (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*). Quest'ultima è caratterizzata da un accumulo di trigliceridi all'interno del fegato con caratteristiche istopatologiche simili a quelle dell'epatopatia alcolica ALD (*Alcoholic Liver Disease*) sebbene insorga in individui che non consumano regolarmente bevande alcoliche. La NAFLD è una delle forme più comuni di malattia epatica cronica con una prevalenza nella popolazione generale dal 3 al 15%, raggiungendo anche il 70% negli individui obesi (1). In circa il 20-30% dei pazienti con NAFLD si ha una progressione della malattia in steatoepatite non alcolica (NASH), caratterizzata da danno del parenchima, infiammazione e fibrosi, che può evolvere in cirrosi epatica e, in alcuni casi, in epatocarcinoma (1).

La rilevanza clinica e sociale di NAFLD e NASH ha stimolato numerosi studi con lo scopo di capire i meccanismi che portano allo sviluppo della malattia e, successivamente, di poter sviluppare trattamenti efficaci (2). I dati finora disponibili indicano che l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti è determinato dal fatto che i soggetti con NAFLD sono insulino-resistenti. Questo determina un incremento di lipolisi nel tessuto adiposo e un aumento di acidi grassi liberi circolanti che, una volta entrati nella circolazione portale, promuovono la sintesi di trigliceridi all'interno degli epatociti. Inoltre, altri fattori che contribuiscono alla steatosi sono l'aumento dei grassi assunti con la dieta, la diminuzione dell'ossidazione degli acidi grassi liberi, l'aumentata lipogenesi e la diminuzione del trasporto dei lipidi epatici attraverso le lipoproteine a bassa densità (VLDL) (3). Nei soggetti obesi l'aumento del tessuto adiposo è accompagnato dall'infiltrazione da parte di monociti e linfociti che vengono attivati con il rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*) che promuove la steatosi epatica inducendo insulino-resistenza e aumentando gli acidi grassi liberi circolanti, IL-6 (interleuchina-6) e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (4). Inoltre, i soggetti con NAFLD mostrano diminuiti livelli di adiponectina (adipocitochina anti-infiammatoria) e maggiori livelli di leptina (favorisce l'ossidazione degli acidi grassi) e resistina (stimola la gluconeogenesi epatica) circolanti: questo sbilanciamento favorisce l'accumulo epatico di grassi influenzando in modo inverso la gluconeogenesi e il metabolismo lipidico (4).

Un aspetto critico nello studio di questa malattia è costituito dalla ancora incompleta comprensione dei meccanismi responsabili della progressione di NAFLD in NASH. È stato osservato che l'accumulo di colesterolo e di acidi grassi liberi negli epatociti causa una disfunzione mitocondriale caratterizzata da aumento delle dimensioni dei mitocondri, presenza di inclusioni cristalline e riduzione delle attività enzimatiche associata ad un aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, a loro volta, causano ulteriori danni ai mitocondri e mutazioni a livello del DNA mitocondriale (5). Inoltre, nella NAFLD anche l'induzione di particolari isoforme del citocromo P450 (CYP2E1 e CYP4A10) implicate nel metabolismo degli acidi grassi a lunga catena contribuiscono al danno ossidativo (5). Infatti, i pazienti con NAFLD/NASH presentano un aumento di marcatori del danno ossidativo e una diminuzione di anti-ossidanti epatici. Un ulteriore meccanismo di danno nell'evoluzione da NAFLD a NASH coinvolge l'eccessivo aumento di acidi grassi liberi indotto dalla insulino-resistenza. A livello epatico l'eccesso di acidi grassi liberi promuove alterazioni a livello del reticolo endoplasmatico, noti come stress del reticolo (ER stress) (6) ed apoptosi degli epatociti in conseguenza dell'attivazione di particolari chinasi, come JNK1/2 (*c-Jun N-terminal Kinases 1/2*) (7). Al momento, quindi, lo stress ossidativo, il danno dell'ER, le disfunzioni mitocondriali e l'attivazione di JNK1/2 sono considerate importanti fattori nella patogenesi del danno epatico in corso di NASH.

Oltre al danno epatico, anche l'infiammazione contribuisce alla progressione da steatosi a steatoepatite attraverso meccanismi molecolari di attivazione strettamente collegati tra loro. Infatti, l'aumento degli acidi grassi e dello stress ossidativo all'interno delle cellule parenchimali inducono attraverso l'azione del fattore NF- $\kappa$ B la produzione da parte degli epatociti di IL-6 e TNF- $\alpha$  che a loro volta stimolano le cellule di Kupffer a secernere mediatori infiammatori che reclutano al fegato altre cellule fagocitarie e linfociti. A questo proposito si è osservato che nei pazienti con NASH l'aumento di citochine infiammatorie è proporzionale alla gravità delle lesioni epatiche (8), mentre in modelli murini di NASH l'inibizione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B protegge significativamente dallo sviluppo di steatoepatite e riduce l'espressione di TNF- $\alpha$ .

Nei suoi stadi più avanzati la NASH è caratterizzata dalla comparsa di fibrosi che tende frequentemente ad evolvere verso cirrosi. I meccanismi che appaiono coinvolti nella fibrogenesi in corso di NASH sono in parte comuni a quelli di altre epatopatie croniche. La fibrosi si sviluppa inizialmente nelle aree pericentrali e le cellule responsabili della deposizione di matrice extracellulare sono le cellule epatiche stellate (HSCs), che in risposta a TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor beta1*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e MCP-1 rilasciati dai macrofagi si differenziano in cellule simili ai miofibroblasti producendo collagene e componenti della matrice extracellulare. A questo processo contribuiscono anche le citochine derivate dai linfociti e lo stress ossidativo che inducono le HSCs a proliferare e a differenziare in miofibroblasti (9). Nei soggetti con NASH, la sopravvivenza delle HSCs viene anche stimolata dall'aumento della leptina e dalla diminuzione dell'adiponectina in quanto in condizioni fisiologiche l'adiponectina riduce la proliferazione e induce l'apoptosi delle HSCs (4).

Nonostante queste informazioni permettano di comprendere alcuni aspetti nell'evoluzione della malattia molte questioni rimangono aperte. In particolare restano ancora in gran parte sconosciuti i meccanismi che mantengono uno stato di infiammazione cronica a livello epatico e come le risposte infiammatorie influenzino la comparsa e la progressione della fibrosi. Infatti dal punto di vista clinico si osserva che indipendentemente dal grado di insulino-resistenza solo una parte dei soggetti affetti da NAFLD progrediscono a NASH e fra questi ultimi si osserva una grande variabilità nell'evoluzione della fibrosi.

Nell'attività di ricerca svolta durante il primo anno di Dottorato in Medicina Molecolare mi sono occupata di caratterizzare i meccanismi infiammatori e immunitari coinvolti nell'influenzare la variabilità interindividuale nella progressione della NASH, utilizzando come modello sperimentale la somministrazione di dieta MCD (*methionine-choline deficient*) a due ceppi di topi caratterizzati da una diversa produzione di citochine da parte dei linfociti Th CD4+ e dei macrofagi.

Da molto tempo è nota una variabilità tra i vari ceppi murini per quanto riguarda le risposte dell'immunità innata ed adattiva che è stata utilizzata per studiare la patogenesi di alcune malattie infiammatorie nonché in patologie croniche con una componente infiammatoria come l'aterosclerosi (10). In particolare, i topi di ceppo C57BL/C hanno una risposta prevalentemente Th1 (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), mentre i topi Balb/c producono principalmente citochine Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (13). È stato dimostrato che la risposta Th1 è responsabile dell'aumentata suscettibilità all'aterosclerosi dei topi C57BL/C (13, 14), mentre la risposta Th2 è associata con un'aumentata fibrosi nei topi Balb/c (15). Inoltre, i macrofagi dei topi C57BL/6, una volta attivati, mostrano una polarizzazione M1, mentre i macrofagi dei topi Balb/c hanno una tendenza ad una attivazione M2 (16), condizione caratterizzata da una risposta anti-infiammatoria, pro-fibrogenica e immuno-soppressiva (17).

La scelta di questo approccio è stata suggerita da recenti osservazioni che dimostrano che nei soggetti obesi le chemochine secrete dai macrofagi presenti nel tessuto adiposo sono in grado di reclutare linfociti T e NKT (*natural killer*) (11). A loro volta i linfociti CD4<sup>+</sup> Th1 che infiltrano in grasso stimolano la polarizzazione M1 dei macrofagi con la conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-12, MCP-1) promuovendo insulino-resistenza e l'ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie (11, 12). Inoltre sia nei modelli murini sia nell'uomo è stato dimostrato che un aumento delle citochine M1 è associato con lo sviluppo della NASH (8). Per questi esperimenti è stato scelto un modello sperimentale di NASH basato sulla somministrazione della dieta MCD che permette di riprodurre la NASH umana senza indurre obesità evitando così interferenze dovute all'azione di linfociti Th1 e dei macrofagi M1 sull'infiammazione del tessuto adiposo e l'insulino-resistenza causate dall'obesità (18).

## **MATERIALI E METODI**

*Animali e protocollo sperimentale.* I topi C57BL/6 e Balb/c maschi di otto settimane sono stati forniti dalla ditta Harlan-Hossan (Corezzana, Italia) mentre i topi C57BL/6 p50<sup>-/-</sup> dal Prof. Sica. Il trattamento con la dieta è stato iniziato dopo una settimana di ambientamento ed è proseguito per quattro settimane. Le diete MCD e di controllo sono state fornite dal Laboratorio Dottor Piccioni (Gessate, Italia). Settimanalmente è stato controllato il peso degli animali. Al sacrificio i topi sono stati anestetizzati con sevofluorano ed è stato prelevato il sangue. I fegati sono stati rimossi, lavati in una soluzione salina e tagliati in piccole porzioni: alcune sono state subito congelate in azoto liquido e conservate a -80°C, altre sono state fissate in formalina 10% e altre ancora in OCT.

*Analisi biochimiche.* I valori delle ALT e del contenuto di trigliceridi nel fegato sono stati determinati da kit spettrofotometrici forniti rispettivamente dalla Radim S.p.A. (Pomezia, Italia) e dalla Sigma Diagnostics (Milano, Italia). I livelli di TNF- $\alpha$  e IL-12 circolanti sono stati valutati nel siero murino utilizzando kits ELISA commerciali (Peprotech, Italia).

*Estrazione dell'RNA e Real Time PCR.* L'RNA è stato estratto dal fegato murino con TRI reagent (Applied Biosystems Italia, Monza) e quantificato a 260nm con lo spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DW, USA). 1 $\mu$ g di RNA è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Italia, Monza). La Real Time PCR è stata eseguita nel termociclatore Techne TC-312 usando TaqMan Gene Expression Master Mix e le sonde TaqMan Gene Expression per TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IL-4, INF- $\gamma$ , IL-17a, IL-10, T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ T, CCL2, CXCL9, CXCL10, MGL-1 e beta-actina murini (Applied Biosystems Italia, Monza). I dati sono stati analizzati col software 7000 System Software a normalizzati rispetto all'espressione del gene beta-actina. Tutti i campioni sono stati esaminati in duplicato e i risultati sono stati espressi come unità arbitrarie.

*Istologia e immunoistochimica.* Il danno epatico è stato valutato con la colorazione ematossilina-eosina e la tricromica di Masson. La gravità della steatosi e dell'infiammazione lobulare è stata valutata dall'anatomopatologo Dott.ssa Cristina Bozzola. Il numero dei foci necro-infiammatori è stato contato al microscopio ad alto ingrandimento in dieci campi distinti. Per valutare la presenza di cellule T infiltrate nel fegato è stato utilizzato su sezioni epatiche congelate l'anticorpo monoclonale anti-CD3 murino (R&D System Europe Ltd, Abingdon, UK). Le cellule colorate sono state espresse come percentuale di cellule infiammatorie che hanno infiltrato il parenchima epatico.

## **RISULTATI**

### **I topi C57BL/6 sviluppano steatoepatite più severa rispetto ai topi Balb/c dopo quattro settimane di dieta MCD.**

I topi C57BL/6 e Balb/c sono stati alimentati per quattro settimane con dieta controllo o dieta MCD; in entrambi i ceppi murini quest'ultima causa steatoepatite caratterizzata da accumulo di trigliceridi negli epatociti, rilascio di alanina aminotransferasi (ALT) e infiammazione lobulare. Paragonando i due ceppi di animali, si è osservato un maggiore contenuto ( $p < 0,05$ ) di trigliceridi epatici nei topi C57BL/6 rispetto ai topi Balb/c, mentre non si ha alcuna differenza nel rilascio delle ALT (Fig. 1). Alla valutazione istopatologica i topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD hanno presentato maggiore estensione della steatosi ( $p < 0,05$ ) e dell'infiammazione lobulare ( $p < 0,002$ ) ed un'augmentata prevalenza di necrosi focale ( $p < 0,001$ ) rispetto ai topi Balb/c (Fig. 2A-F). A conferma del maggior grado di infiammazione l'espressione epatica di mRNA per TNF- $\alpha$  ed i suoi livelli circolanti sono risultati significativamente più alti nei topi C57BL/6 rispetto ai Balb/c trattati con la dieta MCD (Fig. 2G-H). Come atteso, negli animali alimentati con dieta MCD la deposizione di collagene è stata modesta con localizzazione prevalente negli spazi peri-sinusoidali e non si sono osservate differenze tra i due ceppi di topi.

### **La polarizzazione Th1 nei topi C57BL/6 non influenza la gravità della NASH indotta dalla dieta MCD.**

L'analisi immunocistochemica per le cellule CD3 positive ha mostrato che gli infiltrati infiammatori nei fegati dei topi C57BL/6 erano caratterizzati da un'augmentata frequenza di linfociti T ( $p < 0,02$ ), localizzati prevalentemente attorno ai foci necrotici. Su questa base abbiamo voluto indagare se la differente risposta Th nei due ceppi di topi potesse influenzare la risposta infiammatoria. A questo scopo abbiamo misurato l'espressione epatica di mRNA per INF- $\gamma$  e IL-4, come citochine rappresentative rispettivamente della risposta Th1 e Th2. In entrambi i ceppi la dieta MCD non modifica in modo significativo l'espressione delle due citochine, sebbene nei topi C57BL/6 il contenuto di INF- $\gamma$  sia risultato più alto rispetto ai topi Balb/c trattati nello stesso modo (Fig. 3A-B). Inoltre non si sono osservate variazioni apprezzabili anche nel contenuto di mRNA epatico di T-bet (*Th1 regulator T-cell T-box transcription factor*) e di GATA3, fattori di trascrizione rispettivamente Th1 e Th2 (Fig. 3C-D).

### **I linfociti Th17 non sono coinvolti nello sviluppo della NASH indotta dalla dieta MCD.**

I linfociti Th17 (*IL-17-producing T helper*) sono un nuovo gruppo di linfociti Th che hanno un ruolo nell'induzione dell'infiammazione in diverse malattie infiammatorie croniche fra cui alcune patologie epatiche (19). In particolare è stato dimostrato che i linfociti Th17 sono implicati nello sviluppo dell'epatopatia alcolica (20). Per questa ragione abbiamo voluto verificare un possibile coinvolgimento di cellule Th17 nello sviluppo della NASH sperimentale. I valori del contenuto di mRNA epatico di IL-17a sono risultati molto bassi, al limite del rilevamento strumentale, per cui i dati ottenuti non sono stati ritenuti attendibili. Inoltre, il trattamento con la dieta MCD non ha modificato l'espressione dell'mRNA di ROR $\gamma$ T, un fattore di trascrizione che controlla la differenziazione dei linfociti Th17 (Fig. 3E). Possiamo, quindi, escludere un ruolo dei linfociti Th17 nella NASH indotta dalla dieta MCD.

### **La polarizzazione M1 delle cellule di Kupffer è responsabile della maggiore gravità della NASH nei topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD.**

E' noto che, indipendentemente dalla polarizzazione Th1 dei linfociti, i macrofagi derivati dai topi C57BL/6, una volta attivati, hanno una maggior tendenza ad una risposta M1, mentre i macrofagi dei topi Balb/c hanno una maggiore propensione ad un'attivazione 'alternativa', M2 (21), condizione caratterizzata da risposte anti-infiammatorie, pro-fibrogeniche e immuno-soppressive (22). Noi abbiamo osservato che lo sviluppo della NASH in entrambi i ceppi di topi è associata ad

un'aumentata espressione dell'mRNA delle citochine e chemochine M1 quali IL-12p40, CCL2 (MCP-1), CXCL9 e CXCL10. Tuttavia, nel fegato dei topi C57BL/6 trattati con la dieta MCD l'espressione dell'mRNA per IL-12p40, CXCL9 e CXCL10 è risultata significativamente più alta rispetto ai topi Balb/c con lo stesso trattamento, mentre la differenza nell'mRNA di CCL2 non ha raggiunto la significatività statistica. Queste osservazioni sono state confermate dalla misura dei livelli di IL-12 circolante che hanno dimostrato un'aumentata produzione di questa citochina nei topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD rispetto a i topi Balb/c (Fig. 4A-C). Per contro, i marcatori di polarizzazione M2 MGL1 (*macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1*) e IL-10 non sono risultati influenzati dalla dieta MCD, sebbene i topi C57BL/6 trattati con la dieta di controllo presentano livelli maggiori rispetto ai topi Balb/c (4D-E). Inoltre, valutando insieme tutti gli animali trattati con la dieta MCD, abbiamo osservato che esiste una significativa correlazione positiva tra il numero dei focolai di necro-infiammazione evidenziabili istologicamente nel fegato e l'espressione epatica di mRNA per IL-12p40 ( $r=0.60$ ;  $p=0.009$ ), CXCL9 ( $r=0.64$ ;  $p=0.005$ ) e CXCL10 ( $r=0.51$ ;  $p=0.018$ ). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la polarizzazione M1 delle cellule di Kupffer possa contribuire alla maggiore gravità della NASH nei topi C57BL/6 alimentati con la dieta priva di metionina e colina favorendo lo sviluppo di risposte infiammatorie nel fegato.

Per confermare queste osservazioni stiamo mettendo a punto la tecnica di isolamento dei macrofagi epatici mediante adesione su plastica e di controllo della purezza della popolazione mediante citofluorimetria a flusso utilizzando come marcatori macrofagici CD11b e F4/80. Dopo questa verifica è possibile estrarre l'RNA dai macrofagi così isolati e analizzare l'espressione dei marcatori di attivazione M1 soltanto nelle cellule di Kupffer.

### **I topi C57BL/6 NF-kB1<sup>-/-</sup> sviluppano maggiore steatoepatite rispetto al ceppo di controllo dopo quattro settimane di dieta MCD.**

Parecchi studi hanno dimostrato che la subunità p50 del fattore di trascrizione NF-kB (NF-kB1) è essenziale per la risposta proliferativa dei linfociti, per la produzione di specifici anticorpi e per risposte contro numerosi patogeni, ma non è essenziale per lo sviluppo del sistema immunitario (23). Poiché topi in cui è stata silenziata l'espressione di p50 di NF-kB presentano difetti nella risposta immunitaria, un'aumentata suscettibilità alle infezioni e una risposta macrofagica prevalentemente M1 (24), abbiamo voluto verificare se la somministrazione della dieta MCD a questi topi provocasse un danno epatico maggiore. Infatti, risultati preliminari utilizzando topi C57BL/6 non esprimenti la subunità p50 di NF-kB (NF-kB1<sup>-/-</sup>) alimentati con dieta MCD per quattro settimane dimostrano che questi topi sviluppano una steatoepatite più severa rispetto ai topi C57BL/6 WT (*wild type*) utilizzati come controllo: infatti, i topi C57BL/6 NF-kB1<sup>-/-</sup> presentano un maggior rilascio di ALT e un aumentato numero di cellule apoptotiche (Fig. 5).



## DISCUSSIONE

Al momento solo pochissimi studi hanno preso in considerazione la differenza di suscettibilità dei diversi ceppi murini allo sviluppo della NASH sperimentale. Nonostante vi siano cospicue differenze fra i diversi modelli sperimentali impiegati, emerge che i topi C57BL/6 e 129/SVJ sviluppano NASH e fibrosi in seguito a dieta ad alto contenuto di grassi, mentre i topi A/J sono resistenti (25, 26); inoltre, la steatoepatite indotta dalla dieta MCD (*methionine-choline deficient*) è maggiore nei topi A/J e C57BL/6 rispetto ai topi C3H/HeN e Balb/c (27, 28). Al momento i fattori responsabili per queste differenze sono stati poco caratterizzati. È stato proposto che numerosi loci sui cromosomi 1, 2 e 7 influenzano l'entità del danno epatico misurato attraverso il rilascio di transaminasi in sette diversi ceppi di topi alimentati con dieta MCD (27). Inoltre, sembra che le differenze di progressione della NASH tra i ceppi DBA/2J and C57BL/6 siano dovute a differenze nei meccanismi epigenetici che controllano la metilazione del DNA e degli istoni (29).

I risultati ottenuti sono in linea con gli esperimenti di cui sopra e dimostrano che dopo quattro settimane di dieta MCD i topi C57BL/6 sviluppano una steatoepatite molto più grave rispetto ai topi Balb/c caratterizzata da maggior accumulo di trigliceridi negli epatociti, una maggiore estensione dell'infiammazione lobulare e della necrosi focale e da più alti livelli di TNF- $\alpha$  circolante.

Studi in modelli sperimentali di aterosclerosi hanno dimostrato che la più rapida evoluzione della placca aterosclerotica nei topi C57BL/6 rispetto ai topi Balb/c è dovuta all'espressione di specifiche molecole di istocompatibilità di classe II che regolano l'attivazione delle cellule CD4<sup>+</sup> Th1 nei riguardo di antigeni presenti nelle LDL ossidate (21). A loro volta, questi linfociti producono INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  che stimolano i macrofagi presenti nella placca a rilasciare ROS, NO e citochine pro-infiammatorie (22).

Per quanto riguarda il nostro modello sperimentale, la polarizzazione Th1 dei topi C57BL/6 non sembra influenzare la gravità della NASH indotta dalla dieta MCD, in quanto i marcatori di polarizzazione Th1 INF- $\gamma$  e T-bet non vengono modificati in modo significativo. Questo risultato, può apparire in contrasto con alcuni lavori presenti in letteratura in cui topi alimentati sia con una dieta ipercalorica associata ad attivazione delle cellule CD4<sup>+</sup> con concavalina A sia con una dieta priva di colina somministrata per 10-20 settimane mostrano una produzione elevata di INF- $\gamma$  (30, 31). Tuttavia va notato che nei due lavori citati l'estrinsecazione di una risposta Th1 richiede l'attivazione linfocitaria con concavalina A o un lungo periodo di trattamento con la dieta priva di colina. Questo suggerisce che il reclutamento delle cellule CD4<sup>+</sup> possa richiedere tempi maggiori delle quattro settimane utilizzate nei nostri esperimenti.

È stato dimostrato che durante il processo infiammatorio i macrofagi si differenziano in base a diversi stimoli ambientali: ad esempio, i lipopolisaccaridi batterici e l'INF- $\gamma$  promuovono l'attivazione classica M1 caratterizzata dalla produzione di ROS, NO e citochine e chemochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, CXCL9, CXCL10), mentre IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  inducono l'attivazione alternativa M2 associata ad una attività anti-infiammatoria, pro-fibrogenica e immunosoppressiva (17). È stato osservato che l'attivazione M1 si verifica durante le infezioni batteriche, nei macrofagi presenti nella placca aterosclerotica e nel tessuto adiposo dei soggetti obesi (32, 33). I nostri dati dimostrano che anche nello sviluppo della NASH è importante la risposta M1: infatti, il maggiore grado di steatoepatite presente nei topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD correla con la polarizzazione M1 delle cellule di Kupffer di questo ceppo murino. I nostri dati sono in accordo con osservazioni cliniche che mostrano che in pazienti obesi con NASH, ma non con NAFLD, si ha una maggiore espressione di citochine e chemochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , CCL2, CXCL9, CXCL10). Da considerare è il fatto che, nonostante CCL2 sia una tipica citochina M1, la sua espressione a livello epatico non è significativamente differente tra i topi C57BL/6 e Balb/c: ciò può essere dovuto al fatto che durante il danno epatico CCL2 può essere prodotto, oltre che dai macrofagi, anche dagli epatociti e dalle cellule stellate (34).

Al momento i meccanismi coinvolti nel determinare l'attivazione M1 delle cellule di Kupffer nelle prime fasi di sviluppo della NASH sono ancora poco chiari. Diversi dati indicano che TLR2, TLR4 e TLR9 contribuiscono alle risposte infiammatorie in corso di NASH dove possono essere stati attivati da lipidi provenienti dalla dieta, da prodotti batterici, da molecole rilasciate dagli epatociti danneggiati (35, 36). Inoltre, è noto che anche la cascata del complemento può stimolare l'attivazione macrofagica attraverso i fattori C3b e C5b e il rilascio di anafilotossine. A questo proposito uno studio condotto su biopsie epatiche di pazienti con NASH ha evidenziato una massiccia deposizione di frazioni del complemento che si associa ad un aumento di apoptosi, ad una maggiore infiltrazione di granulociti e a più alti livelli di espressione di mRNA epatico di IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (37).

## Conclusioni

- Le differenze tra ceppi di topi nella suscettibilità a NASH indotta da una dieta carente di metionina e colina (MCD) non dipende dalla maggiore polarizzazione Th1 caratteristica dei topi C57BL/6.
- I linfociti Th17 non appaiono giocare un ruolo nello sviluppo dell'infiammazione in corso di NASH.
- La polarizzazione M1 delle cellule di Kupffer è responsabile della maggiore gravità della NASH nei topi C57BL/6 alimentati con la dieta MCD favorendo così lo sviluppo di risposte infiammatorie nel fegato.
- Lo studio delle differenze di suscettibilità alla NASH fra ceppi murini può rappresentare un utile modello per spiegare la variabilità inter-individuale che si osserva nell'uomo nella progressione della NAFLD/NASH.

## Sviluppi della ricerca

I dati ottenuti durante il primo anno di dottorato hanno permesso di evidenziare che l'attivazione M1 delle cellule di Kupffer contribuisce alla maggiore suscettibilità allo sviluppo di steatoepatite nei topi C57BL/6, suggerendo che la progressione da NAFLD a NASH possa essere influenzata da fattori genetici ed epigenetici che modulano la risposta dei macrofagi. Partendo da queste osservazioni pensiamo di sviluppare la nostra ricerca attraverso l'uso di topi C57BL/6 deficitari per la subunità p50 del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B1). È noto, infatti che omodimeri di NF- $\kappa$ B1 tendono ad inibire la risposta M1 dei macrofagi (38). Risultati preliminari ottenuti dopo la somministrazione di dieta MCD a topi C57BL/6 NF- $\kappa$ B $^{-/-}$  dimostrano che questi topi manifestano una steatoepatite più grave rispetto ai topi WT. Coi prossimi esperimenti andremo a caratterizzare maggiormente le cause del danno epatico attraverso l'analisi dell'attivazione della risposta macrofagica e della produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie. Dati ottenuti nei topi NF- $\kappa$ B1 $^{-/-}$  mostrano come la ridotta sintesi di NF- $\kappa$ B1 si associa ad un'aumentata incidenza di alcune malattie autoimmuni e ad un incremento nel rischio di grave danno epatico in soggetti con abuso alcolico.

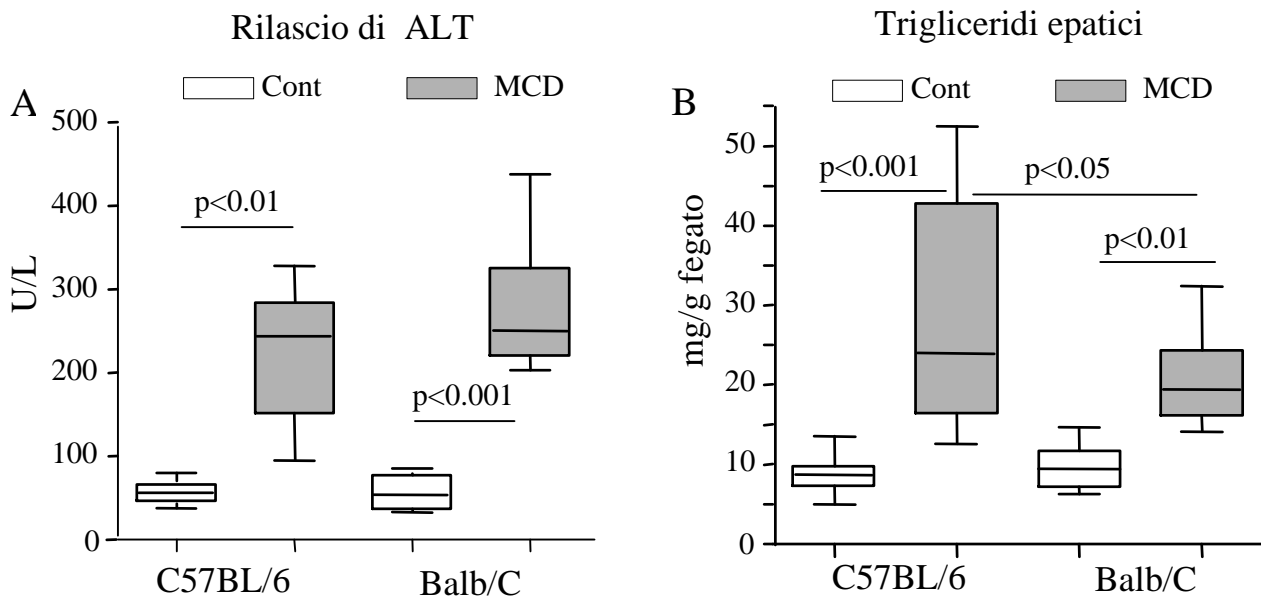
Un ulteriore sviluppo dei miei studi è nato confrontando la risposta anticorpale nei topi C57BL/6 e Balb/c trattati con la dieta MCD. Infatti abbiamo osservato che soltanto nei primi lo sviluppo di NASH si associa alla comparsa di anticorpi diretti verso addotti fra proteine e prodotti della perossidazione lipidica. Questo dato risulta particolarmente interessante in quanto dati ottenuti in pazienti con NAFLD/NASH indicano come la presenza di reazioni immunitarie verso gli stessi

addotti si associa ad una maggiore gravità della steatoepatite (39). A questo proposito è mia intenzione verificare se ed in quale misura reazioni immunitarie contribuiscano al danno epatico ed alla attivazione macrofagica analizzando attraverso immunoistochimica la presenza di immunocomplessi e la deposizione di complemento nei fegati degli animali dei due ceppi. Inoltre, è mia intenzione verificare se siano evidenziabili differenze nelle risposte dell'immunità cellulare in corso di NASH.

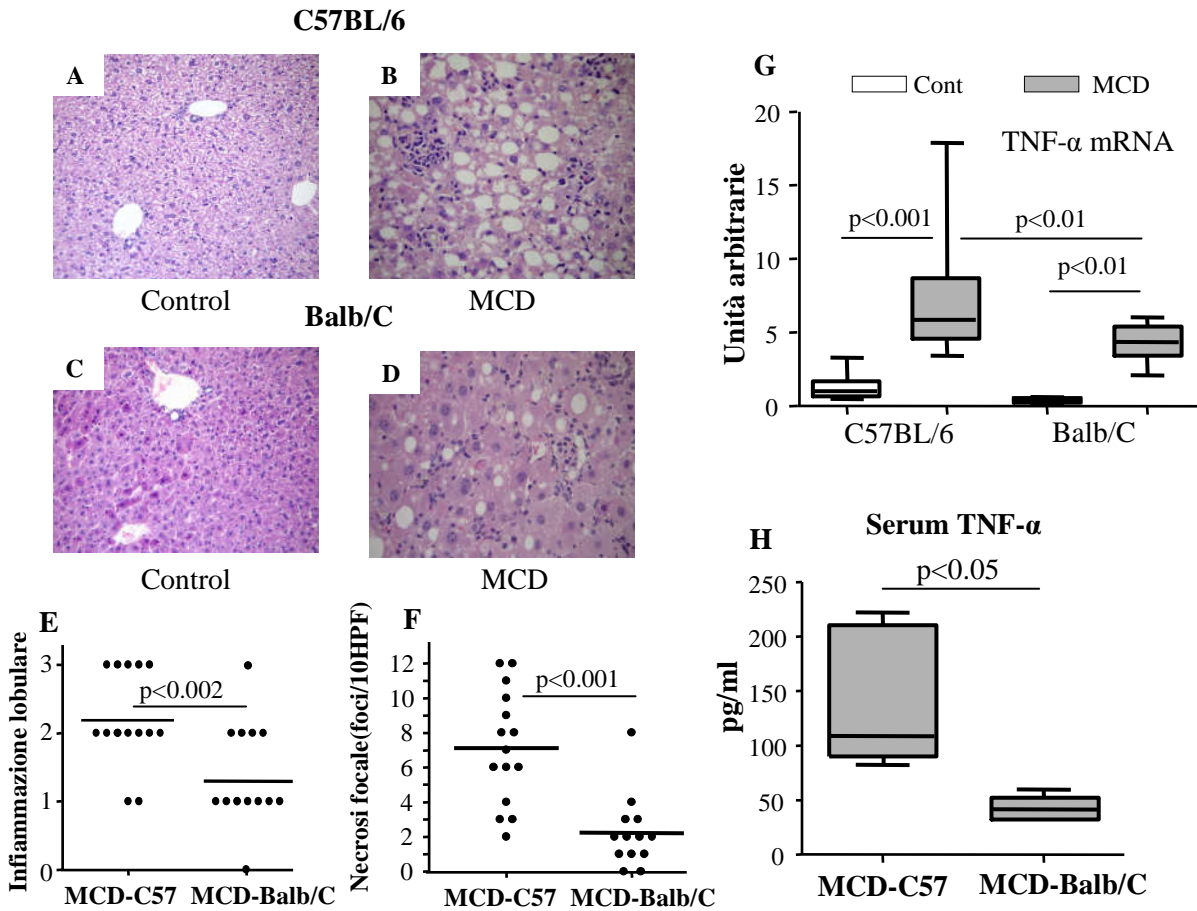
## **BIBLIOGRAFIA**

1. Reid AE. (2001) Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol.* **121**,711-723.
2. Sanyal AJ. (2005) Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 46-53.
3. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Jarvinen H, Svegliati-Baroni G (2010) From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig. Liver Dis.* **42**, 320-330
4. Shaffler A, Scholmerich J, Buchler C (2005) Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue – emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 273-280.
5. Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. (2009) Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J. Mol. Med.* **87**, 679-695
6. Cortez-Pinto H, Caneiro de Moura M, Day CP. (2006) Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J. Hepatol.* **44**, 197-208.
7. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. (2006) Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 12093-101
8. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guera M, Mayorga M, Dominiguez-Diez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. (2001) Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors p55 and p75 in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatol.* **34**, 1158-1163
9. Friedman SL. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterol.* **134**, 1655-1689.
10. Allayee H, Andalibi A, Mehrabian M. (2006) Using inbred mouse strains to identify genes for complex diseases. *Front. Biosci.* **11**, 1216-1226.
11. Kaminski D, Randall TD. (2010) Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol.* **31**, 384-390.
12. Olefsky JM, Glass CK. (2010) Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Ann. Rev. Physiol.* **72**, 219-246.
13. Stein O, Thiery J, Stein Y. (2002) Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atheroscler.* **160**, 1-10.
14. Schulte S, Sukhova GK, Libby P. (2008) Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am. J. Pathol.* **172**, 1500-1508.
15. Wynn TA. (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583-594.
16. Mill CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. (2000) M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166-6173.
17. Mosser DM, Edwards JP. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958-969.
18. Larter CZ, Yeh MM. (2008) Animal model of NASH: getting both pathology and metabolic contest right. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1635-1648
19. Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. (2010) Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 250-254.
20. Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, de Nadai P, Geerts A, Quertinmont E, Vercruysse V, Le Moine O, Devière J. (2009) The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatol.* **49**, 646-657.
21. Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. (2001) T-helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulat* **103**, 2610-2616.
22. Hansson GK, Libby P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 508-519
23. Sha W, Liou HC, Tuomanen E, Baltimore D (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of the NF-kB leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80**, 321-330

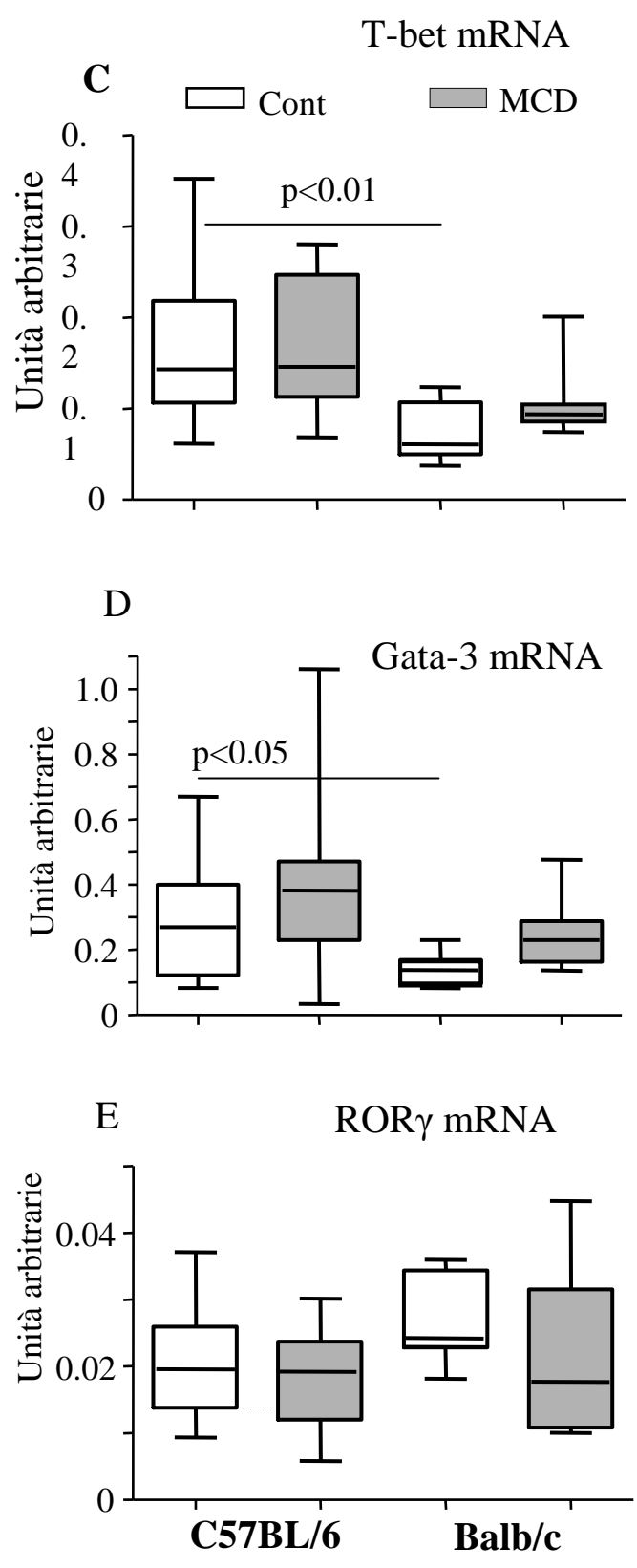
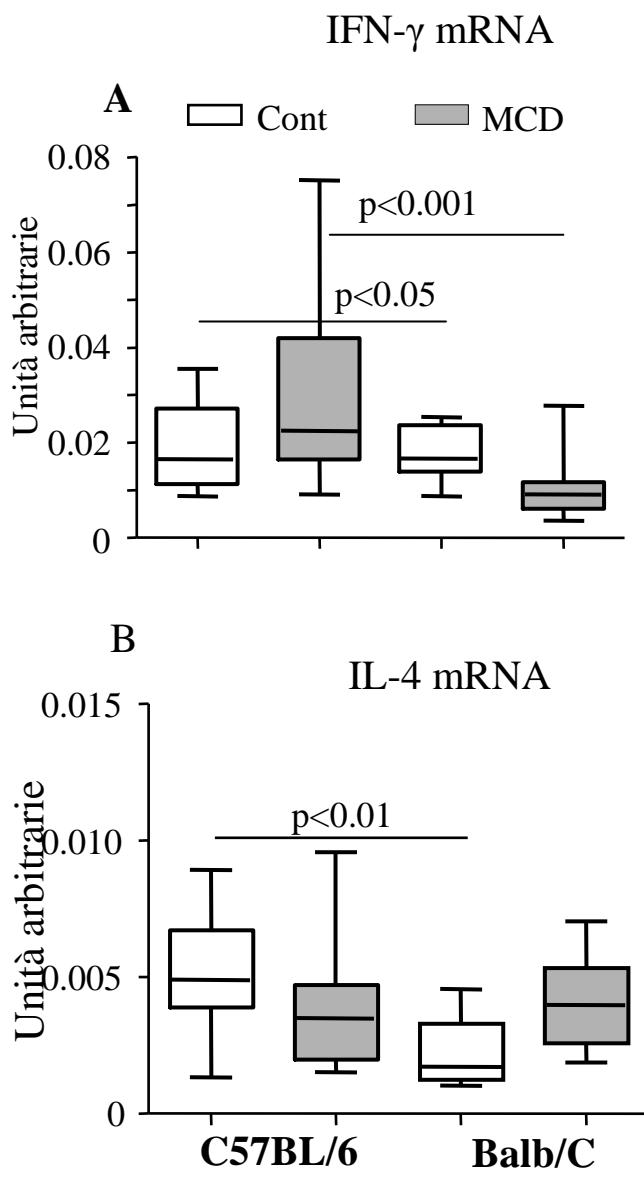
24. Tripathi P, Aggarwal A (2006) NF- $\kappa$ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science* **90**: 519-531.
25. Syn WK, Yang L, Chiang DJ, Qian Y, Jung Y, Karaca G, Choi SS, Witek RP, Omenetti A, Pereira TA, Diehl AM. (2009) Genetic differences in oxidative stress and inflammatory responses to diet-induced obesity do not alter liver fibrosis in mice. *Liver Intern.* **29**:1262-1272.
26. Hill-Baskin AE, Markiewski MM, Buchner DA, Shao H, DeSantis D, Hsiao G, Subramaniam S, Berger NA, Croniger C, Lambris JD, Nadeau JH. (2009) Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum. Mol. Gen.* **18**, 2975-2988.
27. Rangnekar AS, Lammert F, Igonnikov A, Green RM. (2006) Quantitative trait loci analysis of mice administered the methionine-choline deficient dietary model of experimental steatohepatitis. *Liver Intern.* **26**, 1000-1005.
28. Yamazaki Y, Kakizaki S, Takizawa D, Ichikawa T, Sato K, Takagi H, Mori M. (2008) Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 276-282.
29. Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA, Latendresse JR, Rusyn I, Beland FA. (2009) Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J. Hepatol.* **51**, 176-186.
30. Li, Z. Soloski MJ, Diehl AM. (2005) Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol.* **42**, 880-885.
31. Kremer M, Hines IN, Milton RJ, Wheeler MD. (2006) Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatol.* **44**, 216-227.
32. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. (2009) Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1419-1423.
33. Olefsky JM, Glass CK. (2010) Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Ann. Rev. Physiol.* **72**, 219-246.
34. Berres ML, Nellen A, Wasmuth HE. (2010) Chemokines as immune mediators of liver diseases related to the metabolic syndrome. *Did. Dis.* **28**, 192-196.
35. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. (2009) Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut.* **58**, 704-720.
36. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. (2010) Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 $\beta$  in mice. *Gastroenterol.* **139**, 323-334.
37. Rensen SS, Slaats Y, Driessen A, Peutz-Kootstra CJ, Nijhuis J, Steffensen R, Greve JW, Buurman WA. (2009) Activation of complement system in human non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol.* **50**, 1809-1817.
38. Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas Sk, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A. (2006) p50 nuclear factor- $\kappa$ B overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* **66**, 11432-11440.
39. Nobili V, Parola M, Alisi A, Marra F, Piemonte F, Mombello C, Sutti S, Povero D, Maina V, Novo E, Albano E. (2010) Oxidative stress parameters in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* **26**, 471-476.



**Figura 1: Danno epatico indotto nei topi C57BL/6 and Balb/C con dieta priva di metionina e colina (MCD).** Il rilascio di alanina aminotransferasi (ALT) (A) e il contenuto epatico di trigliceridi (B) sono stati valutati nei topi in C57BL/6 and Balb/C alimentati per quattro settimane con dieta MCD. I valori si riferiscono a 12 animali per gruppo, i riquadri includono i valori tra il venticinquesimo e il settantacinquesimo percentile e le barre orizzontali rappresentano le mediane. L'80% dei valori è compreso tra gli estremi delle due barre verticali (decimo e novantesimo percentile).

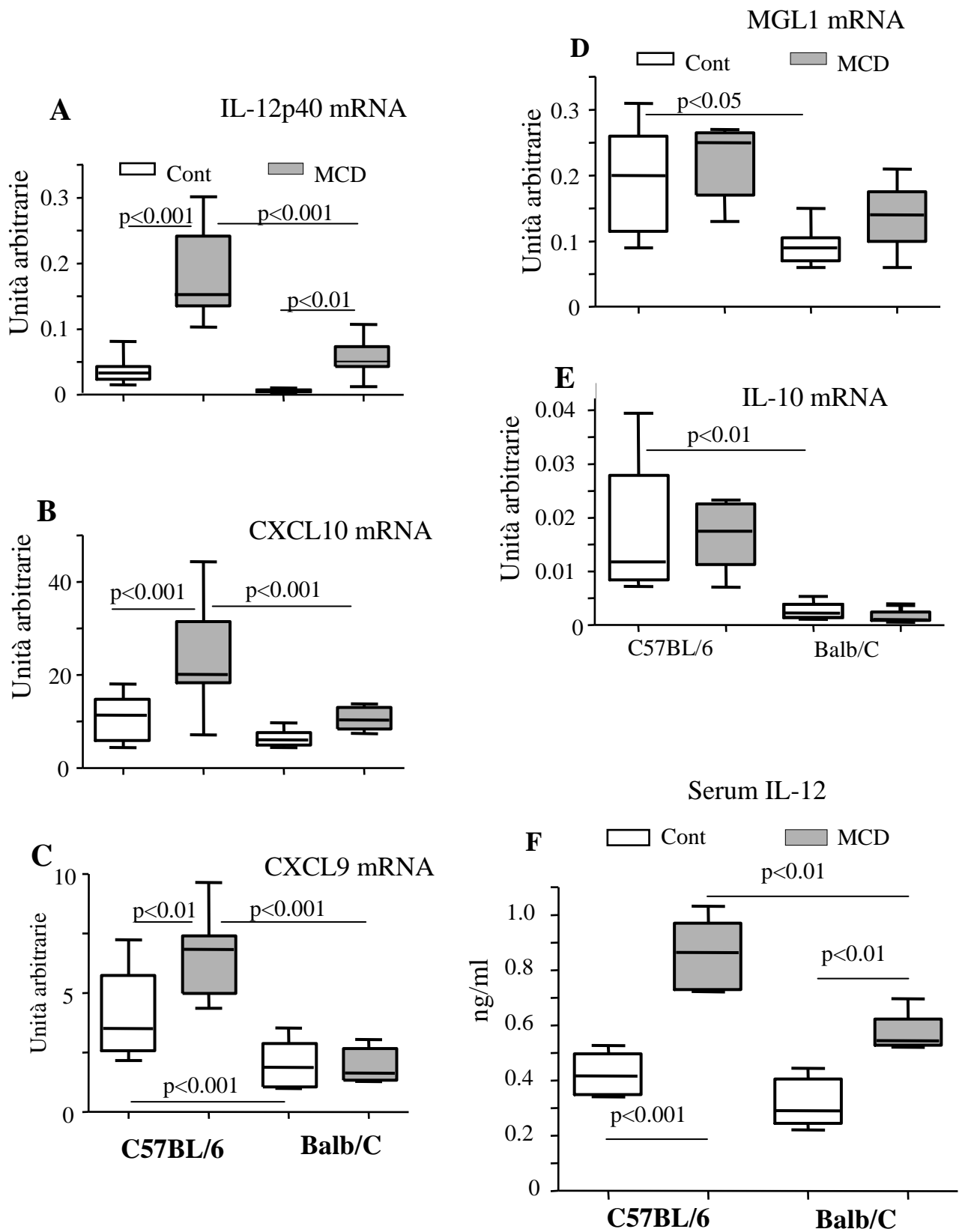


**Figura 2: Risposta infiammatoria nei topi C57BL/6 e Balb/C con NASH indotta da dieta MCD.** L'istologia epatica con ematossilina/eosina (A-D), i punteggi semi-quantitativi dell'infiammazione lobulare (E) e della necrosi focale (F) sono stati valutati nei topi C57BL/6 e Balb/C alimentati per quattro settimane con dieta controllo e MCD. L'infiammazione lobulare è stata valutata secondo i criteri di Kleiner et al., mentre i foci necrotici sono stati contati in dieci differenti campi con un microscopio ad alto ingrandimento. L'espressione dell'mRNA epatico di TNF- $\alpha$  (G) è stato misurato con la Real Time PCR ed espresso come unità arbitrarie in seguito a normalizzazione con l'espressione del gene beta-actina. I livelli di TNF- $\alpha$  circolanti (H) sono stati determinati nel siero degli stessi animali. I valori si riferiscono a 12 animali per gruppo, i riquadri includono i valori tra il venticinquesimo e il settantacinquesimo percentile e le barre orizzontali rappresentano le mediane. L'80% dei valori è compreso tra gli estremi delle due barre verticali (decimo e novantesimo percentile).



**Figura 3**





**Figure 4**

**Figura 3: Espressione dei marcatori di polarizzazione nei topi C57BL/6 e Balb/C con NASH indotta dalla dieta MCD.** L'espressione dell'mRNA di IFN- $\gamma$ , IL-4 e dei fattori di trascrizione T-bet, GATA-3 and ROR $\gamma$ T sono stati analizzati in Real Time PCR nei fegati dei topi C57BL/6 e Balb/C dopo quattro settimane di dieta MCD (A-E). I valori si riferiscono a 12 animali per gruppo e sono espressi in unità arbitrarie dopo la normalizzazione con il gene della beta-actina. I riquadri includono i valori tra il venticinquesimo e il settantacinquesimo percentile e le barre orizzontali rappresentano le mediane. L'80% dei valori è compreso tra gli estremi delle due barre verticali (decimo e novantesimo percentile).

**Figura 4: Espressione dei marcatori di polarizzazione M1/M2 nei topi C57BL/6 e Balb/C con NASH indotta dalla dieta MCD.** L'espressione dell'mRNA delle citochine e chemochine M1 (IL-12p40, CXCL9, CXCL10) e M2 (MGL-1 e IL-10) sono stati analizzati in Real Time PCR nei fegati dei topi C57BL/6 e Balb/C dopo quattro settimane di dieta MCD (A-E). I valori si riferiscono a 12 animali per gruppo e sono espressi in unità arbitrarie dopo la normalizzazione con il gene della beta-actina. I livelli di IL-12 circolanti sono stati determinati nel siero degli stessi animali (F). I riquadri includono i valori tra il venticinquesimo e il settantacinquesimo percentile e le barre orizzontali rappresentano le mediane. L'80% dei valori è compreso tra gli estremi delle due barre verticali (decimo e novantesimo percentile).



## ***LEZIONI***

**Modulo 1:** introduzione alle malattie degenerative sistemiche

Prof. Emanuele Albano

**Modulo 2:** Introduzione alle malattie neurodegenerative

Prof.ssa Lucia Corrado – Sclerosi Laterale Amiotrofica

Prof. Cristoforo Comi – Parkinson e Alzheimer

Partecipazione a Journal Club interni al Dipartimento.

## ***SEMINARI***

1. “Bone and DDS: development of bioactive artificial bone with drug delivery ability” - Prof. Makoto Otsuka –Musashino University, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Tokyo – 27 Gennaio 2011.
2. “DNA-complex releasing system by apatitic cement for gene therapy” – Dr. Tomoko Ito – Musashino University, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Tokyo – 28 Gennaio 2011.
3. “Human papillomavirus infection and other risk factors for skin cancer in organ transplant recipients” - Prof. J. N. Bouwes BAVINCK – Department of Dermatology, Leiden University, Olanda – 17 Febbraio 2011.
4. “Fluorescent mesoporous nanoparticles as tracer of the endocytic and exocytic pathway” e “Caveolae mediates endocytosis of mesoporous nanoparticle in ovarian cancer cells” - Dott.ssa Maneerat Ekkapongpisit – PostDOC Linea C, Laboratorio Patologia Molecolare – 1 Marzo 2011.
5. “Linfomi cutanei primitivi” – Prof. Emilio Berti – Istituto di Dermatologia, Università degli studi Milano- Bicocca – 2 Marzo 2011.
6. “Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features” – Prof. Sonia Levi – Università Vita Salute San Raffaele – 12 Aprile 2011.
7. “Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view” - Dott.ssa Elisabetta Bugianesi – Università di Torino – 13 Aprile 2011.
8. “Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that” - Valerio Nobili – 29 Aprile 2011.
9. “Reverse vaccination in autoimmune diseases” – Gilberto Filaci – Università di Genova – 3 Maggio 2011.
10. “Innate Immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles ” - Henrik Wolff – Finnish Institute of Occupational Health – 9 Maggio 2011.
11. "Mechanisms and Models of TDP-43 Proteinopathies" – Dr. Leonard Petrucci – Department of Neuroscience MAYO CLINIC Jacksonville (Florida), USA – 19 Maggio 2011.
12. “ Iron Management in the Hepcidin Era ” – Dr. Steven R. Ellis – University of Louisville Kentucky, USA – 25 Maggio 2011.
13. “ Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson’s disease” – Prof. Mauro Fasano – Laboratory of Biochemistry and Proteomics, Dept. of Structural & Functional Biology, Section of Human Biology, University of Insubria, Varese, Italy – 17 Giugno 2011.
14. “Frontotemporal Dementia: trying to solve a complex disorder” – Dott. Jonathan D. Rohrer – MRC Dementia Research Centre, Institute of Neurology, University College London, Queen Square, London – 24 Giugno 2011.

