

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”



DOTTORATO DI RICERCA
IN
MEDICINA MOLECOLARE
XXVI CICLO

Candidato

Irene LOCATELLI

Tutor

Prof. Emanuele ALBANO

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
MATERIALI E METODI.....	6
RISULTATI.....	8
DISCUSSIONE.....	12
BIBLIOGRAFIA	28

INTRODUZIONE

La NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) è una delle forme più comuni di malattia cronica epatica nei paesi sviluppati ed è considerata l'espressione epatica della sindrome metabolica, un insieme di manifestazioni cliniche strettamente legate all'obesità viscerale e contraddistinta da insulino-resistenza, dislipidemia e ipertensione. La NAFLD 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 ha una prevalenza nella popolazione generale dal 3 al 15%, raggiungendo il 70% negli individui obesi. Circa il 10-20% dei pazienti con NAFLD sviluppa steatoepatite non alcolica (NASH), caratterizzata da danno del parenchima, infiammazione e fibrosi, che può evolvere in cirrosi epatica e, nei casi più gravi, in epatocarcinoma (1).

Un aspetto critico nello studio di questa patologia è determinato dall'incompleta comprensione dei meccanismi responsabili della progressione della semplice steatosi in NASH. Questo aspetto è molto rilevante dal punto di vista clinico in quanto il danno del parenchima e l'infiammazione che caratterizzano la NASH sono i fattori che determinano l'evoluzione a fibrosi e cirrosi.

Il continuo sviluppo e la rilevanza clinica e sociale della NAFLD e della NASH hanno stimolato numerosi studi con lo scopo di capire i meccanismi che portano allo sviluppo della malattia e, quindi, di poter sviluppare trattamenti in grado di bloccare l'evolvere della patologia (2).

I dati presenti in letteratura indicano che l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti è determinato dal fatto che i soggetti con NAFLD sono insulino-resistenti sia a livello del muscolo perché esibiscono un ridotto consumo di glucosio, sia a livello del fegato perché mostrano una diminuita soppressione di produzione endogena di glucosio, sia a livello del tessuto adiposo perché hanno un'elevata lipolisi e, di conseguenza, aumentati livelli di acidi grassi liberi circolanti. Questi ultimi, 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- α (*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*) che recluta macrofagi, causando insulino-resistenza epatica (4). Inoltre, i soggetti con NAFLD mostrano diminuiti livelli di adiponectina (adipocitochina anti-infiammatoria che è collegata negativamente con l'accumulo di trigliceridi epatici) e maggiori livelli di leptina (favorisce l'ossidazione degli acidi grassi e agisce come stimolo pro-infiammatorio) 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).

E' stato osservato che l'insulino-resistenza e l'accumulo di colesterolo e di acidi grassi liberi negli epatociti causano una disfunzione mitocondriale caratterizzata da aumento delle dimensioni dei mitocondri, presenza di inclusioni cristalline e riduzione delle attività enzimatiche (in particolar modo degli enzimi della catena respiratoria) 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 (malonildialdeide, 4-idrossi-nonenale) e una concomitante 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). A tal proposito, è stato dimostrato che la delezione genica di JNK1/2 negli epatociti è accompagnata da una riduzione dell'infiammazione e di insulino-resistenza in modelli murini. 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, è stato dimostrato che 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'attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B, la produzione da parte degli epatociti di IL-6 e TNF- α . Queste citochine 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).

Nei suoi stadi più avanzati la NASH è caratterizzata dalla comparsa di fibrosi che tende frequentemente ad evolvere verso cirrosi. La fibrosi, come accade nelle altre epatopatie croniche, 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- β 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. Le HSCs sono indotte a proliferare e a differenziare anche dalle citochine derivate dai linfociti e dallo stress ossidativo (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 in questi ultimi anni si siano delucidati numerosi aspetti della patofisiologia e della biologia molecolare e cellulare della NASH, rimangono alcune domande a cui non si è ancora trovata una risposta. Particolare attenzione viene indirizzata sui fattori che causano il progressivo danno epatico e sulle relazioni tra insulino-resistenza, infiammazione e fibrosi.

Durante il primo anno di Dottorato ho dimostrato che l'attivazione M1 delle cellule di Kupffer contribuisce alla maggiore suscettibilità allo sviluppo di steatoepatite nei topi C57BL/6, suggerendo così che la progressione da NAFLD a NASH possa essere influenzata da fattori genetici ed epigenetici che controllano le risposte funzionali dei macrofagi epatici. Partendo da queste osservazioni, l'attività di ricerca del secondo anno di Dottorato in Medicina Molecolare è stata indirizzata ad approfondire questo argomento.

Recenti studi hanno dimostrato che la subunità p50 del fattore di trascrizione NF- κ B (*nuclear transcription factor kB*) codificata dal gene NF κ B1 è coinvolta nel regolare la risposta macrofagica (10, 11). In particolare, gli omodimeri p50 hanno un ruolo importante sia nel ridurre la produzione di citochine pro-infiammatorie nei macrofagi e nelle cellule stellate epatiche sia nel guidare la polarizzazione alternativa M2 nei macrofagi, producendo Arginasi 1 e la citochina CCL17 ed inibendo la produzione di iNOS (*inducible NO synthetase*) e TNF- α (12 – 14). In questo contesto si è osservato che topi difettivi per NF κ B1 (NF κ B1-/-) sviluppano infiammazione e danno del parenchima maggiori rispetto agli animali *wild type* in un modello di polmonite indotta da *Escherichia Coli* (10, 15) e presentano difetti nei processi di risoluzione dell'infiammazione in

seguito a induzione di glomerulonefrite (10, 11). Anche a carico del fegato è noto che gli animali privi di NFκB1 presentano un incremento dell'infiammazione e della fibrosi epatica rispetto ai controlli quando vengono trattati con tetracloruro di carbonio, un noto composto epatotossico (16). Nell'uomo è stato identificato un polimorfismo funzionale nella regione promotrice del gene NFκB1 (-94 insertion/deletion ATTG, rs28720239) che riduce la produzione della proteina e che è associato ad una più alta prevalenza di malattie infiammatorie e autoimmuni, ad esempio colite ulcerativa ed endometriosi (17 – 19). Lo stesso polimorfismo aumenta il rischio di cirrosi in pazienti alcolizzati, attraverso un aumento dell'infiammazione epatica (20).

Sulla base di queste osservazioni abbiamo voluto studiare se in animali NFκB1^{-/-} la modulazione della differenziazione macrofagica potesse influenzare la progressione della NASH indotta alimentando gli animali con una dieta prima di metionina e colina (MCD – methionine choline deficient) in quanto i topi NFκB1^{-/-} sono protetti dall'insulino-resistenza e dall'obesità indotta da una dieta ricca di grassi in relazione ad un aumento della risposta epatica all'insulina e ad un elevato dispendio di energia (21).

MATERIALI E METODI

Animali e protocollo sperimentale. I topi C57BL/6 NF κ B1^{-/-} sono stati forniti dal Prof. Antonio Sica mentre i topi C57BL/6 WT dalla ditta Harlan-Hossan (Corezzana, Italia). Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi di otto settimane e per ciascun punto sperimentale sono stati inclusi 8-10 animali. Il trattamento con la dieta è stato iniziato dopo una settimana di ambientamento ed è proseguito per due, quattro e otto 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. Quest'ultimo è stato centrifugato e il siero è stato conservato per ulteriori analisi. 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 circolanti di TNF- α e i livelli epatici di IFN- γ e osteopontina sono stati valutati utilizzando kits ELISA commerciali forniti rispettivamente da Peprotech (Milano, Italia) e da R&D Systems (Abingdon, UK).

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 μ 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- α , procollagene- α 1, TIMP-1, IL-12p40, iNOS, MGL1, CCL2, CXCL10, IL-10, osteopontina, INF- γ , IL-15, NK1.1, CD11b, TGF- β , annessina A1, CCR2, CX3CL1, CX3CR1 e beta-actina murini (Applied Biosystems Italia, Monza). I dati sono stati analizzati col software 7000 System Software e l'espressione genica relativa è stata calcolata come $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct$ del gene target - Ct di beta-actina presa come gene di riferimento). 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 ematosilina-eosina e la tricromica di Masson. Il grado di steatosi e di infiammazione lobulare è stata valutato dall'anatomopatologo Dott.ssa Cristina Bozzola in accordo con i criteri di Kleiner et al. (27). Il numero dei foci necro-infiammatori è stato contato al microscopio ad alto ingrandimento in dieci campi distinti. Per valutare la presenza di macrofagi e di cellule stellate attivate sono stati utilizzati su sezioni epatiche fissate in formalina rispettivamente l'anticorpo anti-F480 murino (eBiosciences, San Diego, CA, USA), l'anticorpo policlonale anti- α -SMA (Labvision, Bio-Optica, Milan, Italy) e l'anticorpo anti-annessina A1 (Invitrogen). Le cellule colorate sono state contate al microscopio in dieci campi distinti.

Isolamento dei linfociti epatici e analisi citofluorimetrica. I linfociti sono stati isolati dal fegato di topi C57BL/6 WT e NF κ B1^{-/-} e purificati su un gradiente di densità (Lympholyte®-M, Cederlane Laboratories Ltd., Burlington, Canada) come descritto da Crispe (28). Le cellule sono state lavate con una soluzione salina e incubate 30 minuti con siero murino deplementato per bloccare i legami aspecifici. Le cellule sono state incubate con anticorpi coniugati a fluorocromi per CD45, CD3, CD4, CD8, NK1.1 (eBiosciences, San Diego CA, USA) e il loro numero relativo è stato quantificato utilizzando il citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson). Per valutare le cellule produttrici di osteopontina sono stati utilizzati un anti-siero policlonale anti-osteopontina

(Millipore, Temecula, CA, USA) e IgG anti-rabbit coniugate con ficoeritrina (Sigma-Aldrich, Milan, Italy).

Western blotting. I fegati murini sono stati omogeneizzati in un buffer di lisi (10mM Tris/HCl pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM NaF, 20mM sodium pyrophosphate, 2mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glicerolo, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10mg/ml leupeptin e 60mg/ml aprotinin) e gli estratti proteici (30ug) sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10%. Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con anticorpo anti-Annessina A1 (Invitrogen) e anti-actina (Sigma-Aldrich) e rivelate con Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus [ECL (enhanced chemiluminescence); PerkinElmer] usando lo strumento VersaDoc 3000 quantitative imaging system e il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

RISULTATI

La mancanza di NFkB1 peggiora la steatoepatite e promuove la fibrosi in topi alimentati con la dieta MCD.

Prima di somministrare la dieta priva di metionina e colina (MCD) ai topi abbiamo esaminato dal punto di vista istopatologico le sezioni epatiche degli animali *wild type* (WT) e NFkB1^{-/-} alimentati con la dieta controllo; come si può osservare dalle Figure 1A e 1B i fegati dei due ceppi murini sono paragonabili, ad eccezione della presenza di sporadici aggregati di cellule mononucleate che circondano gli epatociti in apoptosi nei topi NFkB1^{-/-}. In seguito alla somministrazione della dieta MCD per quattro settimane sia i topi WT sia quelli NFkB1^{-/-} sviluppano NASH, caratterizzata da steatosi macrovescicolare accompagnata da infiltrazione lobulare di cellule infiammatorie e necrosi focale (Fig. 1C-D). La valutazione semi-quantitativa dell'estensione di steatosi ed infiammazione lobulare mostra che i topi NFkB1^{-/-} hanno punteggi maggiori a cui si associa una più alta frequenza di granulomi e un aumento di cellule apoptotiche rispetto agli animali WT mentre il numero di foci necrotici è paragonabile tra i due ceppi (Tabella 1). I risultati ottenuti con l'istologia sono in accordo con le analisi biochimiche, in quanto l'accumulo intraepatico di trigliceridi e il rilascio di alanina-transaminasi (ALT) sono significativamente più alti nei topi NFkB1^{-/-} alimentati con dieta MCD rispetto ai topi WT con lo stesso trattamento (Fig. 1E-F). Il maggior grado di infiammazione epatica nei topi NFkB1^{-/-} è stato confermato da più alti valori di espressione per mRNA epatico di TNF- α e livelli di TNF- α circolanti due volte maggiori rispetto agli animali WT (Fig. 1G-H).

È noto che la steatoepatite indotta dalla dieta MCD causa lo sviluppo di fibrosi dopo almeno otto settimane di trattamento. Sorprendentemente, analisi istologiche utilizzando la colorazione tricromica di Masson, che rileva la deposizione di collagene epatico, mostra che già a quattro settimane di dieta MCD i topi NFkB1^{-/-} hanno un'apprezzabile deposizione centri-lobulare di collagene (Fig. 2B). Invece, i topi WT trattati con dieta MCD mostrano solo un modesto aumento della matrice fibrillare soprattutto localizzata negli spazi peri-sinusoidali (Fig. 2A). Inoltre, l'immunoistochimica per α -SMA (*smooth-muscle α -actin*) evidenzia un aumentato numero di cellule epatiche stellate positive per α -SMA solo nei fegati dei topi NFkB1^{-/-} alimentati con dieta MCD (Fig. 2C). Nonostante la dieta MCD induca un aumento dell'espressione dell'mRNA di marcatori profibrogenetici quali procollagene-1 α e TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloprotease-1*) sia nei topi WT sia in quelli NFkB1^{-/-}, l'aumento è significativamente più rilevante negli animali deficitari di NFkB1 rispetto ai WT.

A conferma del fatto che i topi NFkB1^{-/-} abbiano una più rapida evoluzione della NASH, abbiamo osservato che anche dopo solo due settimane di somministrazione di dieta MCD i topi NFkB1^{-/-} presentano una maggiore infiammazione lobulare, un aumentato rilascio di ALT e un'aumentata espressione di mRNA epatico per TNF- α e procollagene-1 α rispetto agli animali WT, pur in presenza di steatosi paragonabile (Fig. 3).

La mancanza di NFkB1 non influenza la risposta macrofagica nella NASH.

Per valutare il ruolo dei macrofagi nel nostro modello, abbiamo marcato le cellule macrofagiche con l'anticorpo anti-F4/80 e abbiamo osservato che sia nei topi WT sia nei topi NFkB1^{-/-} lo sviluppo della NASH determina un aumento del numero delle cellule F4/80 positive, senza differenze tra i due ceppi di animali (Fig. 4A). Con nostra sorpresa abbiamo anche constatato che la mancanza di NFkB1 non influenza l'attivazione macrofagica in corso di NASH in quanto l'incremento nell'espressione dei marcatori M1 come IL-12p40 e iNOS risulta comparabile nei due ceppi (Fig. 4B-C). Come previsto, i marcatori macrofagici M2 MGL1 (*macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1*) e IL-10 sono più bassi nei topi NFkB1^{-/-} di controllo rispetto ai topi WT, ma la dieta MCD non ne altera l'espressione (Fig. 4D-E). Infine, sebbene sia noto dalla letteratura che la mancanza di NFkB1 aumenti la produzione da parte delle cellule stellate epatiche

di CCL2 e CXCL10 (13), nel nostro modello l'mRNA epatico per queste chemochine è risultato simile nei due ceppi (Fig. 4F-G).

Il reclutamento delle cellule NKT caratterizza la NASH nei topi NFkB1-/-.

Diversi studi hanno dimostrato che i linfociti sono presenti negli infiltrati infiammatori causati dalla NASH. Per spiegare le differenze nell'evoluzione della malattia nei topi NFkB1-/- abbiamo caratterizzato l'infiltrato linfocitario epatico in topi alimentati con dieta MCD. Ad un'analisi immunoistochimica i linfociti T, evidenziabili con un anticorpo anti-CD3, risultano più frequenti negli infiltrati lobulari dei topi NFkB1-/- rispetto agli animali WT (27.9 ± 2.4 vs 20.1 ± 4.7 ; $p=0.002$). Per caratterizzare le popolazioni linfocitarie abbiamo quindi isolato i leucociti epatici e questi sono stati analizzati al citofluorimetro. I risultati ottenuti hanno confermato che il reclutamento delle cellule T è significativamente maggiore nei topi deficitari di NFkB1 (Fig. 5A-B). Questo aumento coinvolge i linfociti T effettori CD8+, mentre la popolazione dei linfociti *T-helper* CD4+ non subisce alcuna variazione in seguito alla mancanza di NFkB1 e alla dieta MCD (Fig. 5C-D). Abbiamo inoltre osservato che mentre la NASH nei topi WT induce una diminuzione nel numero di cellule *natural killer* (NK; CD3-, NK1.1+) e dei linfociti T *natural killer* (NKT; CD3+, NK1.1+) del fegato, nei topi NFkB1-/- alimentati con dieta MCD, invece, la popolazione NK non subisce alcuna variazione, mentre le cellule NKT incrementano significativamente il loro numero (Fig. 5E-F-G). Per spiegare questo effetto abbiamo misurato l'espressione epatica di IL-15, una citochina coinvolta nella sopravvivenza e maturazione delle cellule NK e NKT (22). Come si vede dalla figura 6A nei topi WT la dieta MCD non altera i livelli di mRNA di IL-5 che invece sono significativamente incrementati nei topi NFkB1-/. Inoltre l'aumento dell'espressione di IL-15 è evidente in questi animali già dopo solo due settimane di trattamento con dieta MCD (Fig. 6A) in associazione ad un'aumentata espressione dell'mRNA epatico per il marcatore delle cellule NK e NKT, NK1.1 (Fig. 6B), suggerendo che la mancanza di NFkB1 può stimolare il reclutamento delle cellule NKT promuovendo l'attività di IL-15.

Poiché recenti studi hanno evidenziato il ruolo di osteopontina prodotta dalle cellule NKT nella progressione della NASH (23, 24), siamo andati a valutarne l'espressione nel nostro modello. Abbiamo osservato che soltanto i topi NFkB1-/- alimentati con la dieta MCD mostrano uno specifico aumento dell'espressione di mRNA epatico per IFN- γ e osteopontina, due citochine prodotte dalle cellule NKT (7A-B). Per confermare il reale incremento di queste due citochine, abbiamo valutato la presenza della proteina mediante un saggio ELISA e il contenuto epatico di IFN- γ e osteopontina è, rispettivamente, tre e due volte più alto nei topi NFkB1-/- rispetto agli animali WT con NASH (7C-D). Dall'analisi citofluorimetrica dei leucociti che esprimono osteopontina isolati dai fegati dei topi NFkB1-/- con NASH emerge che circa il 40% è positivo per NK1.1 (7E). Da questi dati abbiamo potuto concludere che il deficit delle proteine p105 e soprattutto della subunità p50 di NF-kB codificate dal gene NFkB1 incrementa la progressione della NASH verso la fibrosi stimolando il reclutamento delle cellule NKT che a loro volta sono capaci di produrre osteopontina, citochina profibrogenica, suggerendo l'importanza di queste cellule nell'evoluzione della NAFLD.

Caratterizzazione dei macrofagi nella progressione della NASH.

Parallelamente alla caratterizzazione dei meccanismi di progressione della NASH nei topi NFkB1-/-, mi sono occupata di analizzare il ruolo dei macrofagi nella progressione della steatoepatite. È noto che in seguito a danno epatico le cellule di Kupffer, macrofagi residenti all'interno dei sinusoidi epatici, vengono rapidamente attivate rilasciando numerose citochine e chemochine che promuovono la risposta infiammatoria nel fegato. Negli ultimi anni, parecchi studi in modelli murini hanno dimostrato che, nell'evoluzione dei processi infiammatori, numerosi monociti infiltrano il fegato dopo il rilascio di chemochine da parte dei macrofagi residenti, delle

cellule stellate, degli epatociti e delle cellule endoteliali contribuendo in maniera determinante all'evoluzione sia del danno epatico sia dei processi che portano alla fibrosi.

I dati ottenuti in precedenza dimostravano come una maggiore polarizzazione M1 delle cellule macrofagiche fosse responsabile delle differenze tra ceppi di topi nell'estensione dell'infiammazione epatica durante le fasi precoci della NASH (25). Abbiamo voluto quindi analizzare se durante l'evoluzione della malattia verso la fibrosi ci fosse un reclutamento di monociti con caratteristiche differenziali diverse. Esistono, infatti, due classi di monociti circolanti: a) i monociti Ly6C^{hi} rappresentano il sottotipo infiammatorio ed esprimono alti livelli di CCR2 ma bassi livelli di CX3CR1 e sono attivamente reclutati nei tessuti alterati dove danno origine a macrofagi o a cellule presentanti l'antigene; b) i monociti Ly6C^{lo} rappresentano, invece, il sottotipo non infiammatorio ed esprimono alti livelli di CX3CR1 e danno origine a macrofagi e cellule dendritiche mieloidi in tessuti sani (26, 27). Si pensa che queste due classi di monociti siano reclutate in momenti diversi durante lo sviluppo e la progressione delle malattie infiammatorie. Ad esempio, nei topi i monociti circolanti esprimono Ly6C^{hi} sono reclutati dopo il danno epatico attraverso un meccanismo dipendente da CCR2 e dal suo ligando CCL2 (28), mentre diverse osservazioni suggeriscano che i monociti Ly6C^{lo} partecipino ai processi di terminazione della risposta infiammatoria e intervengano nella riparazione tissutale (26). Tuttavia, lo specifico ruolo di queste due popolazioni monocitarie nell'influenzare le caratteristiche funzionali dei macrofagi epatici durante l'evoluzione del danno cronico è ancora poco chiaro.

Nei nostri esperimenti abbiamo confrontato topi C57BL/6 alimentati con la dieta MCD per quattro ed otto settimane in quanto questi due tempi sono caratterizzati dalla presenza, rispettivamente, di sola steatoepatite o di NASH avanzata con fibrosi. Come atteso, gli animali trattati per otto settimane presentano maggior danno epatico testimoniato da più alti livelli di rilascio di transaminasi ALT ed un maggior contenuto epatico di trigliceridi rispetto ai topi alimentati con la stessa dieta solo per quattro settimane. (Fig. 8A-E).

Per valutare l'infiltrato macrofagico, le sezioni epatiche sono state marcate con l'anticorpo anti-F4/80, un antigene espresso selettivamente dai macrofagi tissutali. Abbiamo osservato che con il progredire della malattia si verifica un aumento del numero di macrofagi che si associa ad aumentati livelli epatici di mRNA per CD11b, una molecola di adesione dei fagociti espressa anche dai macrofagi attivati (Fig. 9A-B). Peraltro, da un punto di vista morfologico risultano evidenti modificazioni nella forma e nelle dimensioni delle cellule F4/80 positive che, soprattutto dopo otto settimane di trattamento con dieta MCD, appaiono di grosse dimensioni e contenenti al loro interno corpi apoptotici e vescicole lipidiche. Mentre nelle fasi precoci della malattia si osserva un incremento nell'espressione epatica di marcatori di polarizzazione macrofagica M1 come la forma inducibile di ossido nitrico sintetasi (iNOS), con la progressione delle lesioni verso la fibrosi abbiamo evidenziato una drammatica diminuzione di livelli di mRNA per alcuni marcatori M1 tra cui iNOS ed un incremento invece dell'espressione di una tipica citochina fibrogenetica TGF- β . Per contro, i livelli di marcatori M2 quali *macrophage galactose-type C-type lectin 1* (MGL1/CD301) risultavano invariati nelle fasi precoci e presentano un più modesto declino in quelle più avanzate (9C-D). Per valutare se questi cambiamenti potessero essere dovuti ad un cambiamento del pattern di espressione di citochine che richiamano i monociti circolanti Ly6C^{hi}/CCR2+/CX3CR1^{lo} o Ly6C^{lo}/CCR2-/CX3CR1^{hi}, abbiamo analizzato se si verificassero cambiamenti nell'espressione dei recettori CCR2 e CX3CR1 così come delle relative chemochine. Abbiamo osservato che nella fase iniziale della NASH dopo quattro settimane di dieta MCD si verifica un aumento dell'espressione dell'mRNA di CCL2 e del suo recettore CCR2, ma dopo otto settimane i valori diminuiscono significativamente fino a raggiungere livelli paragonabili a quelli del controllo (Fig. 10A-B). Invece, l'espressione di CX3CL1 e del suo recettore CX3CR1 aumenta progressivamente e diventa apprezzabile nelle fasi avanzate della malattia in coincidenza con la comparsa della fibrosi (Fig. 10C-D).

Inoltre, siamo andati a valutare l'espressione di annessina A1, un proteina anti-infiammatoria prodotta da granulociti neutrofili e da monociti (43). Abbiamo osservato che con lo sviluppo della NASH e con il progredire della malattia verso la fibrosi si verifica un aumento progressivo della produzione di annessina A1 (Fig. 11A-B), la quale all'esame in immunistochemica risulta essere espressa da macrofagi di grosse dimensioni contenenti vacuoli lipidici e corpi apoptotici (Fig. 11C-F).

Valutando insieme tutti gli animali trattati con la dieta MCD abbiamo osservato che esiste una significativa correlazione tra l'espressione dell'mRNA epatico di annessina A1 e quella di CX3CL1 ($r=0.74$ $p=0.014$) e CX3CR1 ($r=0.76$ $p=0.025$) ed anche di TGF- β ($r=0.77$ $p=0.0007$) (Fig. 12A-C). Sebbene ancora molto preliminari, questi risultati suggeriscono la possibilità che nel corso dell'evoluzione del danno epatico i macrofagi che hanno fagocitato epatociti morti o danneggiati possano, attraverso l'espressione di annessina A1, favorire il reclutamento di cellule monocitarie di diversa tipologia o il cambiamento nelle caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule macrofagiche pre-esistenti.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti studiando lo sviluppo di NASH nei topi NFkB1^{-/-} hanno evidenziato che questi sviluppano una steatoepatite significativamente più grave rispetto ai topi WT, caratterizzata da un'estesa infiltrazione lobulare di cellule mononucleate, frequenti lipogranulomi, più alti livelli di TNF- α circolante e un'aumentata apoptosi degli epatociti. Inoltre, la NASH nei topi NFkB1^{-/-} associa con una più rapida progressione della fibrosi centrolobulare che è già ben evidente dopo solo quattro settimane di trattamento con dieta MCD. Sebbene precedenti studi abbiano dimostrato che nei topi NFkB1^{-/-} trattati con tetracloruro di carbonio il danno epatico cronico e la fibrosi dipendano dal reclutamento delle cellule epatiche stellate (HSC) attivate che, oltre a produrre procollagene-1 α e TIMP-1, iper-esprimono mediatori pro-infiammatori come TNF- α , CCL2, CXCL10 e GM-CSF (13), questi meccanismi non sono apparsi avere un ruolo significativo nelle nostre condizioni sperimentali. Abbiamo invece osservato che la rapida progressione della NASH nei topi NFkB1^{-/-} si associa ad un reclutamento di linfociti T che coinvolge le cellule CD8⁺ e NKT, mentre i linfociti T CD4⁺ non vengono alterati. Il coinvolgimento di linfociti T è in accordo con studi effettuati utilizzando modelli murini di glomerulonefriti che hanno dimostrato come una diffusa infiltrazione di cellule T sia coinvolta nel causare una ritardata risoluzione dell'infiammazione nei topi NFkB1^{-/-} (15).

Il ruolo delle cellule NKT nella NASH è complesso, in quanto nella steatosi e nelle prime fasi di steatoepatite si verifica una diminuzione della popolazione epatica delle cellule NKT come conseguenza della produzione di IL-12 da parte delle cellule di Kupffer: infatti, nei topi alimentati con una dieta priva di colina le cellule NKT nel fegato diminuiscono man mano che la steatosi epatica progredisce, ma rimangono inalterate in topi privi di IL-12; inoltre, la somministrazione di lipopolissaccaride induce un aumento dell'espressione epatica di IL-12 e la deplezione delle cellule di Kupffer riduce l'espressione epatica di IL-12 e impedisce la diminuzione delle cellule NKT (29, 30). Nei topi con NASH più avanzata, invece, si evidenzia un'espansione nel numero delle cellule NKT in seguito ad attivazione del *pathway di hedgehog*: queste cellule producono fattori solubili che promuovono la fibrogenesi e che stimolano la progressione della malattia (23). Inoltre, è stato dimostrato che la deplezione delle cellule NKT previene l'infiammazione epatica e la fibrosi indotta dalla dieta MCD (24), ma aumenta l'espressione di marcatori infiammatori e il numero di linfociti T nel fegato di topi alimentati con una dieta ricca di grassi (31). Nel nostro studio, abbiamo osservato che, a differenza dei topi WT alimentati con dieta MCD in cui è presente solo steatoepatite e si verifica una deplezione delle cellule NKT, nei topi NFkB1^{-/-} trattati nello stesso modo che presentano NASH avanzata (steatoepatite e fibrosi) si ha un aumento delle cellule NKT. Questi risultati sono in accordo con la correlazione diretta tra la prevalenza delle cellule NKT nel fegato e la gravità della steatoepatite osservata nei pazienti con NASH (32), supportando l'importanza delle cellule NKT nel dirigere la progressione della NASH verso la fibrosi.

Ad oggi si sa poco su come la deficienza di NFkB1 possa influenzare la risposta delle cellule NKT. Recentemente, è stato riportato che la mancanza di NFkB1 riduce moderatamente la popolazione epatica delle cellule NKT nei topi C57BL/6 poiché viene alterata la loro maturazione (33). Comunque, abbiamo osservato che anche nelle prime fasi della NASH nei topi NFkB1^{-/-} si verifica un aumento dell'espressione epatica di IL-15. IL-15 è una citochina pleiotropica responsabile della sopravvivenza e maturazione dei macrofagi, delle cellule T, NK e NKT (22). Nel fegato, IL-15 prodotta dagli epatociti ha un ruolo chiave nel creare il microambiente favorevole alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule T, in particolar modo i linfociti T CD8⁺, e induce l'espressione dei marcatori NK sulle cellule T (34). Sebbene l'IL-15 viene prodotta costitutivamente nel fegato, la sua espressione da parte degli epatociti e delle cellule progenitrici epatiche aumenta in risposta a un danno; inoltre, la somministrazione di IL-15 a un topo adulto sano stimola la mitosi negli epatociti e l'accumulo di cellule progenitrici (35). Nei topi WT l'aumento di IL-15 è concomitante all'espansione delle cellule NKT e quindi è evidente solo nella NASH avanzata indotta da un

trattamento con dieta MCD di otto settimane (23). Quindi, proponiamo che la mancanza di NFkB1 possa favorire l'aumento di IL-15 non appena si sviluppa la NASH, prevenendo così la deplezione delle cellule NKT causata dall'IL-12 e permettendo un più rapido aumento del numero delle cellule e una progressione più rapida della patologia.

Per quanto riguarda il meccanismo attraverso il quale le cellule NKT potrebbero stimolare la progressione del danno epatico nella NASH abbiamo osservato che i topi NFkB1 -/- mostrano uno specifico aumento della produzione epatica di IFN- γ e osteopontina. IFN- γ può originare sia dai linfociti T CD8+ sia dalle cellule NKT e stimola la produzione di TNF- α e delle specie reattive dell'ossigeno da parte dei macrofagi. Osteopontina è una citochina glicosilata prodotta sia dalle cellule immunitarie sia dalle cellule parenchimali e ha un ruolo importante nell'infiammazione e nella riparazione tissutale (36). Le cellule NKT sono un'importante risorsa di osteopontina nel danno epatico mediato dai linfociti: infatti, in topi in cui è stata indotta epatite mediante Concavalina A si verifica un aumento delle cellule NKT che secernono osteopontina, la quale aumenta l'attivazione delle cellule NKT e promuove l'infiltrazione e l'attivazione dei neutrofili (37). Nel nostro modello le cellule NKT esprimenti osteopontina sono bene evidenti solo nei fegati dei topi NFkB1 -/- con NASH. Tutto ciò non esclude che altre cellule come linfociti T, macrofagi o colangiociti (38) possano contribuire alla produzione di osteopontina. Il ruolo dell'osteopontina nello stimolare l'evoluzione della NASH è in linea con gli studi pubblicati in letteratura in cui i topi deficitari di osteopontina sono protetti dalla steatoepatite e dalla fibrosi indotta dalla dieta MCD (24, 39). Inoltre, è stato dimostrato che l'osteopontina è un importante modulatore dell'infiammazione del grasso durante l'obesità, in quanto attiva i macrofagi presenti nel tessuto adiposo e interferisce con la funzione degli adipociti (40). Comunque, diversamente da quanto pubblicato da Sahai e colleghi (39) che avevano utilizzato il ceppo murino A/J, non abbiamo osservato cambiamenti nell'espressione epatica di osteopontina nei topi C57BL/6 WT che hanno ricevuto la dieta MCD per quattro settimane. Questa variazione potrebbe riflettere la differenza di ceppo nella risposta infiammatoria epatica coinvolta nello sviluppo della NASH (41). È da sottolineare che i topi NFkB1 -/- sviluppano un'apprezzabile fibrosi epatica nonostante l'aumento di IFN- γ dovrebbe antagonizzare la fibrogenesi. In questo contesto, l'aumento epatico di osteopontina osservato in questi animali potrebbe avere un ruolo significativo, in quanto l'osteopontina è stata dimostrata stimolare le cellule stellate epatiche a produrre collagene (42).

Nel complesso questi risultati confermano l'importanza del reclutamento delle cellule NKT nell'influenzare l'evoluzione della NASH verso la fibrosi e suggeriscono la possibile importanza di polimorfismi a carico del gene NFkB1 quale fattore di rischio per la progressione della malattia nell'uomo.

Sviluppi della ricerca

Durante il secondo anno di dottorato ho partecipato allo sviluppo di due progetti di ricerca distinti, ma con l'obiettivo comune di definire quali sono i meccanismi molecolari e cellulari che guidano l'evoluzione della NASH.

Il primo riguarda la caratterizzazione dei meccanismi di sviluppo della NASH nei topi NFkB1 -/- dove abbiamo potuto determinare che la progressione della NASH verso la fibrosi si associa ad un maggior reclutamento delle cellule NKT mediato da un incremento di produzione di IL-15 e da una maggior produzione di osteopontina, una citochina profibrogenica.

Per completare questo lavoro e, quindi per dimostrare che è proprio IL-15 a impedire la deplezione delle cellule NKT nei topi NFkB1 -/- affetti da NASH, si dovrà indagare meglio il ruolo di IL-15 somministrando ad animali NFkB1 -/- un anticorpo neutralizzante IL-15. In maniera analoga l'uso di anticorpi neutralizzanti osteopontina potrà permettere di confermare che l'aumentata produzione di

questa citochina da parte delle cellule NKT è effettivamente coinvolta nel favorire la rapida evoluzione della NASH verso la fibrosi.

Il secondo progetto, invece, è stato rivolto alla caratterizzazione del ruolo dei macrofagi nello sviluppo della NASH. In seguito a trattamento dei topi C57BL/6 con dieta MCD per quattro e otto settimane abbiamo osservato che si verifica un aumento progressivo del numero dei macrofagi epatici con l'evolversi della patologia e che tali cellule sono ingrossate e ripiene di vacuoli di grasso e corpi apoptotici. Inoltre, nei topi alimentati con dieta MCD per otto settimane si ha un progressivo aumento dell'espressione di annessina A1, proteina anti-infiammatoria prodotta dai macrofagi durante i processi di terminazione dell'infiammazione che nel nostro modello risulta essere esclusivamente presente nei macrofagi contenenti corpi apoptotici e vacuoli lipidici. La sintesi di annessina A1 correla sia con l'incremento dell'espressione di CX3CL1 e del suo recettore CX3CR1 che sono stati dimostrati favorire il reclutamento di monociti Ly6C^{lo}, coinvolti nel promuovere i processi riparativi sia con quello di TGF- β , la principale citochina pro-fibrogenetica. Queste osservazioni suggeriscono la possibilità che attraverso l'espressione di annessina A1 i macrofagi che hanno fagocitato epatociti morti o danneggiati possano favorire l'evoluzione verso la fibrosi.

Coi prossimi esperimenti ci proponiamo di caratterizzare dal punto di vista funzionale i macrofagi esprimenti annessina A1 isolandoli dal fegato di topi con NASH avanzata; andremo così a valutare il pattern di espressione di citochine e chemochine e di fattori pro-infiammatori e pro-fibrogenetici. Inoltre, vorremo andare a valutare il ruolo di annessina A1 nell'evoluzione della NASH utilizzando animali *knockout* per annessina A1 o per il suo recettore FPR2 o, in alternativa, utilizzando alcuni peptidi antagonisti del recettore FPR2: determineremo così in che modo l'espressione di annessina A1 moduli i meccanismi infiammatori e l'evoluzione verso la fibrosi. Importante sarà poi valutare se si è in grado di ripristinare nei topi privi di annessina A1 il fenotipo osservato negli animali WT utilizzando annessina A1 ricombinante o il frammento di proteina compreso tra gli amminoacidi 2-26, che esibisce una leggera differenza nel profilo di affinità col recettore FPR2 ma possiede proprietà anti-infiammatorie molto simili alla molecola intera.

Tabella 1: la mancanza di NFkB1 peggiora la steatoepatite nei topi alimentati con dieta MCD.

	WT con dieta MCD	NFkB1 -/- con dieta MCD	Significatività statistica
Steatosi	1.9 ± 0.6	2.6 ± 0.5	p=0.02
Infiammazione lobulare	1.5 ± 0.5	2.2 ± 0.7	p=0.02
Epatociti apoptotici	2.5 ± 1.5	4.7 ± 2.2	p=0.03
Foci necrotici	5.0 ± 2.3	5.3 ± 3.0	p=0.79
Granulomi	2.8 ± 0.75	5.2 ± 1.2	p=0.003

La steatosi e l'infiammazione lobulare sono state valutate semi-quantitativamente in accordo con Klemer e colleghi (23), mentre il numero dei foci necro-infiammatori, gli epatociti apoptotici e i granulomi sono stati contati in dieci campi differenti utilizzando un microscopio ad alta risoluzione. I valori si riferiscono a 8-10 animali per gruppo.

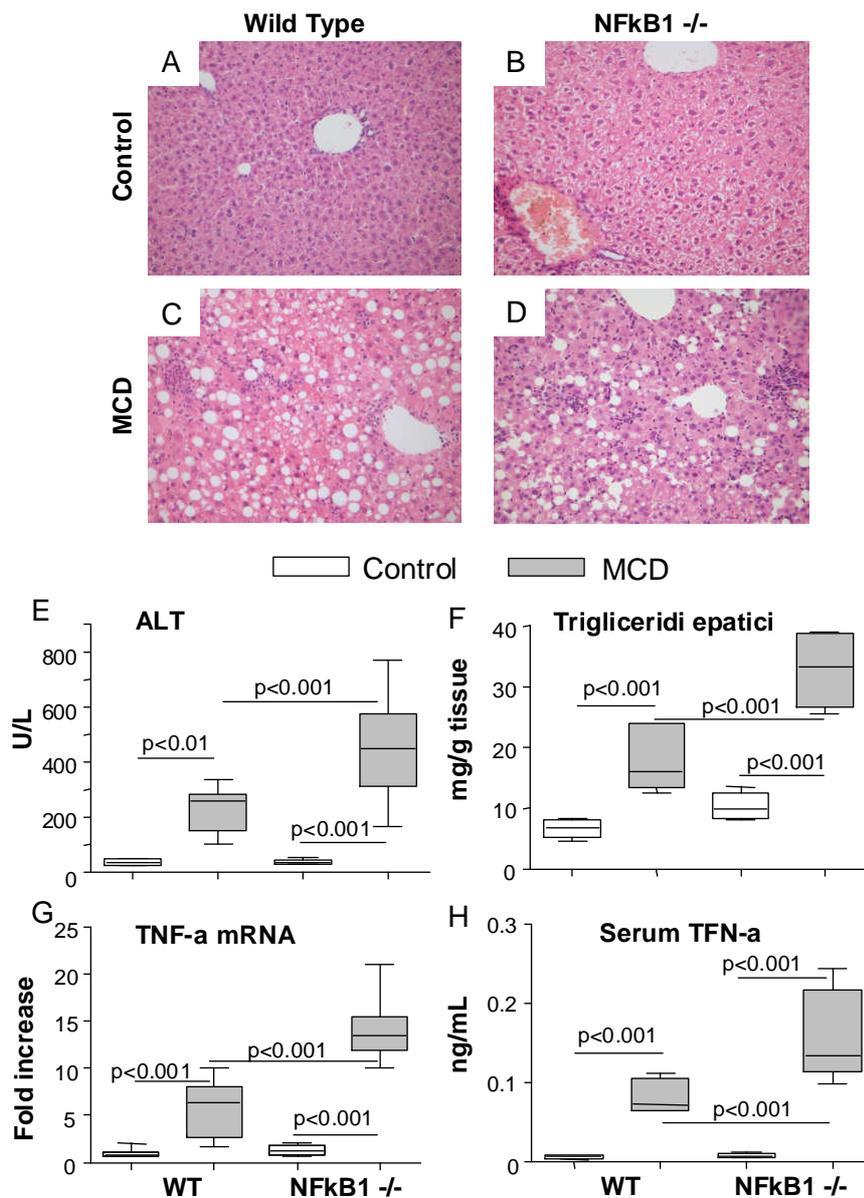


Figura 1

Figura 1: la mancanza di NFkB1 aumenta il danno epatico in topi con NASH.

I topi WT e NFkB1^{-/-} sono stati alimentati per quattro settimane con dieta sia di controllo sia deficiente in metionina e colina (MCD). Le sezioni epatiche sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina (A-D: ingrandimento 200X). Il rilascio delle alanina-transaminasi (E) e il contenuto epatico di trigliceridi (F) sono stati valutati con metodi enzimatici. L'espressione dell'mRNA epatico di TNF- α è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina (G). I livelli di TNF- α circolanti sono stati determinati nel siero degli stessi animali (H). I valori si riferiscono a 8-10 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).

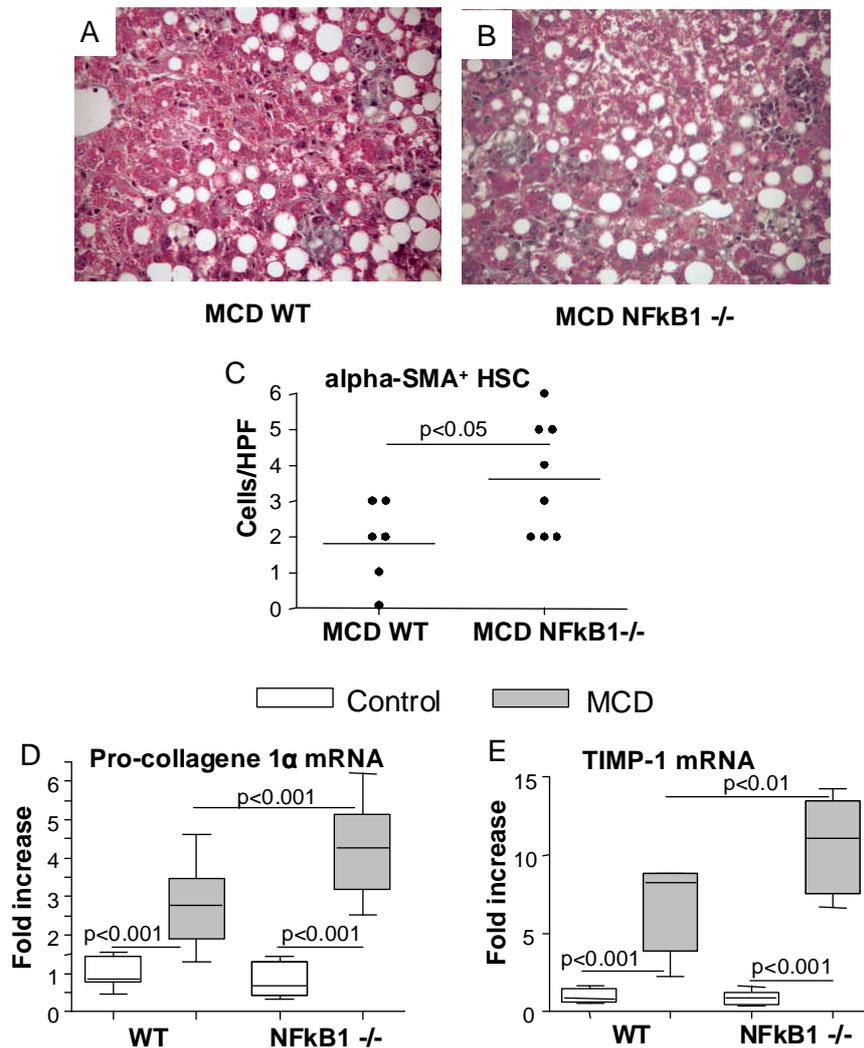


Figura 2

Figura 2: la mancanza di NFκB1 induce fibrosi in topi con NASH.

I topi WT e NFκB1 -/- sono stati alimentati per quattro settimane con dieta sia di controllo sia deficiente in metionina e colina (MCD). Le sezioni epatiche sono state sottoposte a colorazione con il metodo della tricromica di Masson (A-B: ingrandimento 400X). Le cellule epatiche stellate attivate esprimenti α-SMA sono state evidenziate mediante immunistoichimica e contate in dieci campi differenti utilizzando un microscopio ad alto ingrandimento (C). L'espressione dell'mRNA epatico di pro-collagene 1α e di TIMP-1 è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina (D-E). I valori si riferiscono a 8-10 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).

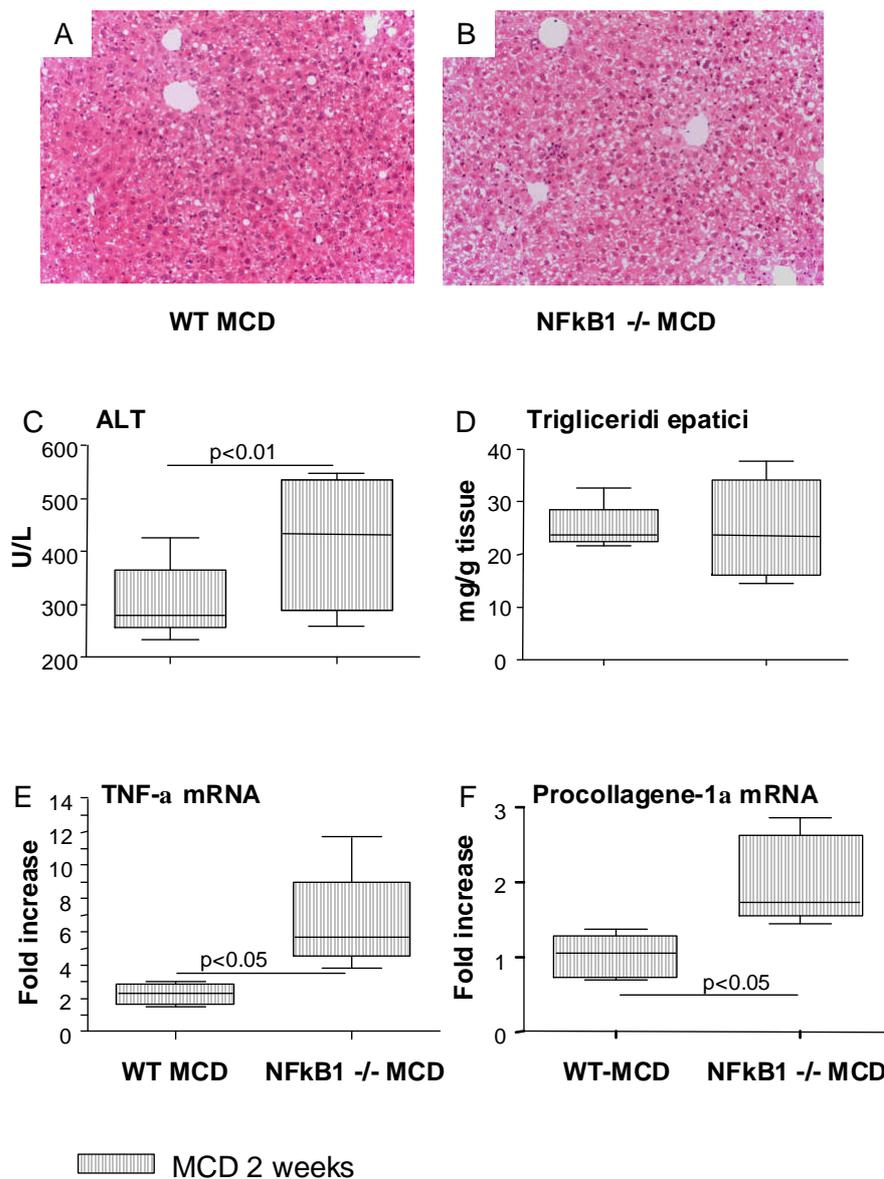


Figura 3

Figura 3: la mancanza di NFκB1 induce lo sviluppo della NASH dopo solo due settimane di dieta MCD.

I topi WT e NFκB1 -/- sono stati alimentati per due settimane con dieta MCD. Le sezioni epatiche sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina (A-B; ingrandimento 400X). Il rilascio delle alanina-transaminasi (C) e il contenuto epatico di trigliceridi (D) sono stati valutati con metodi enzimatici. L'espressione dell'mRNA epatico di TNF-α e di procollagene-1α è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina (E-F). I valori si riferiscono a 8-10 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).

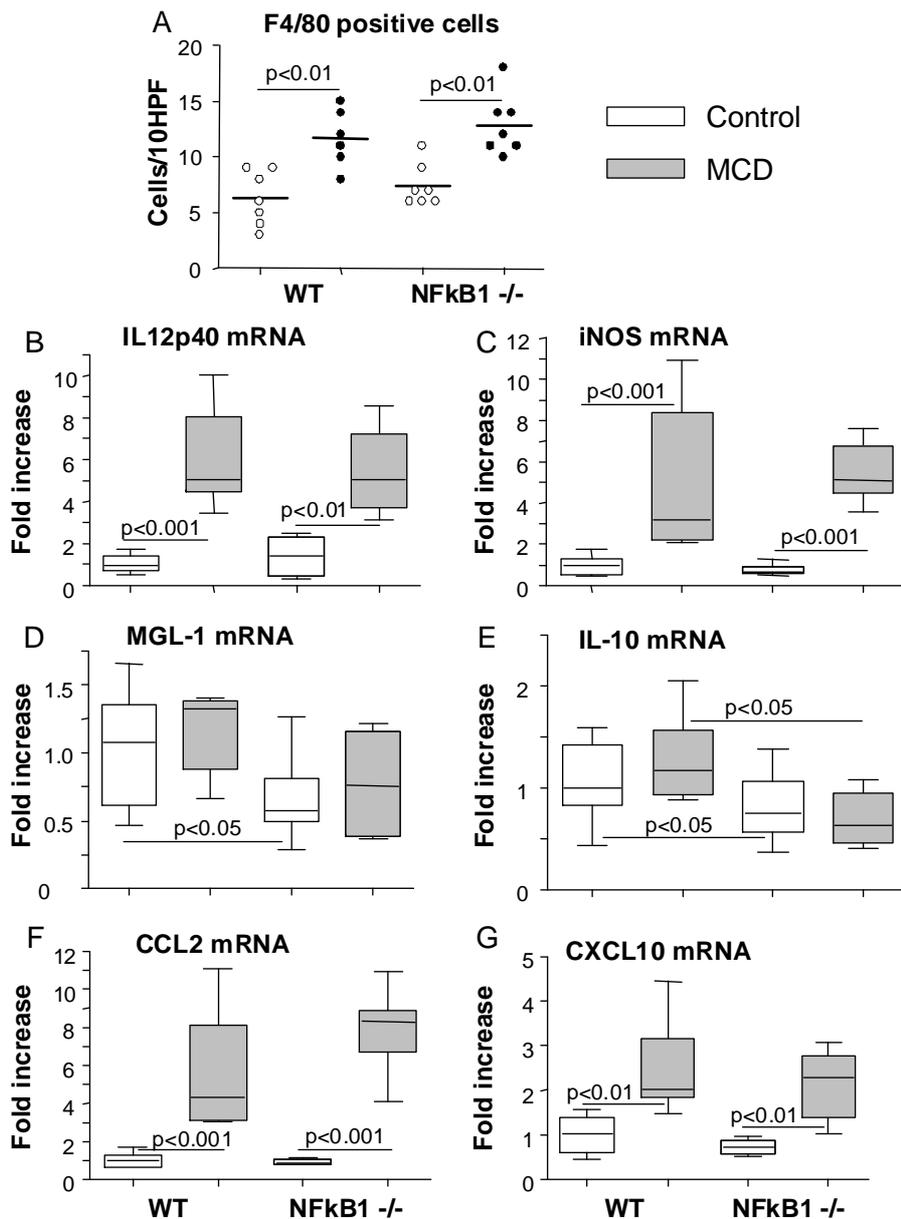


Figura 4

Figura 4: lo sviluppo della NASH in topi NFkB1 -/- non influenza la risposta macrofagica.

I topi WT e NFkB1 -/- sono stati alimentati per quattro settimane con dieta sia di controllo sia deficiente in metionina e colina (MCD). Le cellule macrofagiche sono state marcate con l'anticorpo anti-F4/80 e contate in dieci campi differenti utilizzando un microscopio ad alto ingrandimento (A). L'espressione dell'mRNA epatico di IL12p40, iNOS, MGL-1, IL-10, CCL2 e CXCL10 è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina (B-G). I valori si riferiscono a 8-10 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).

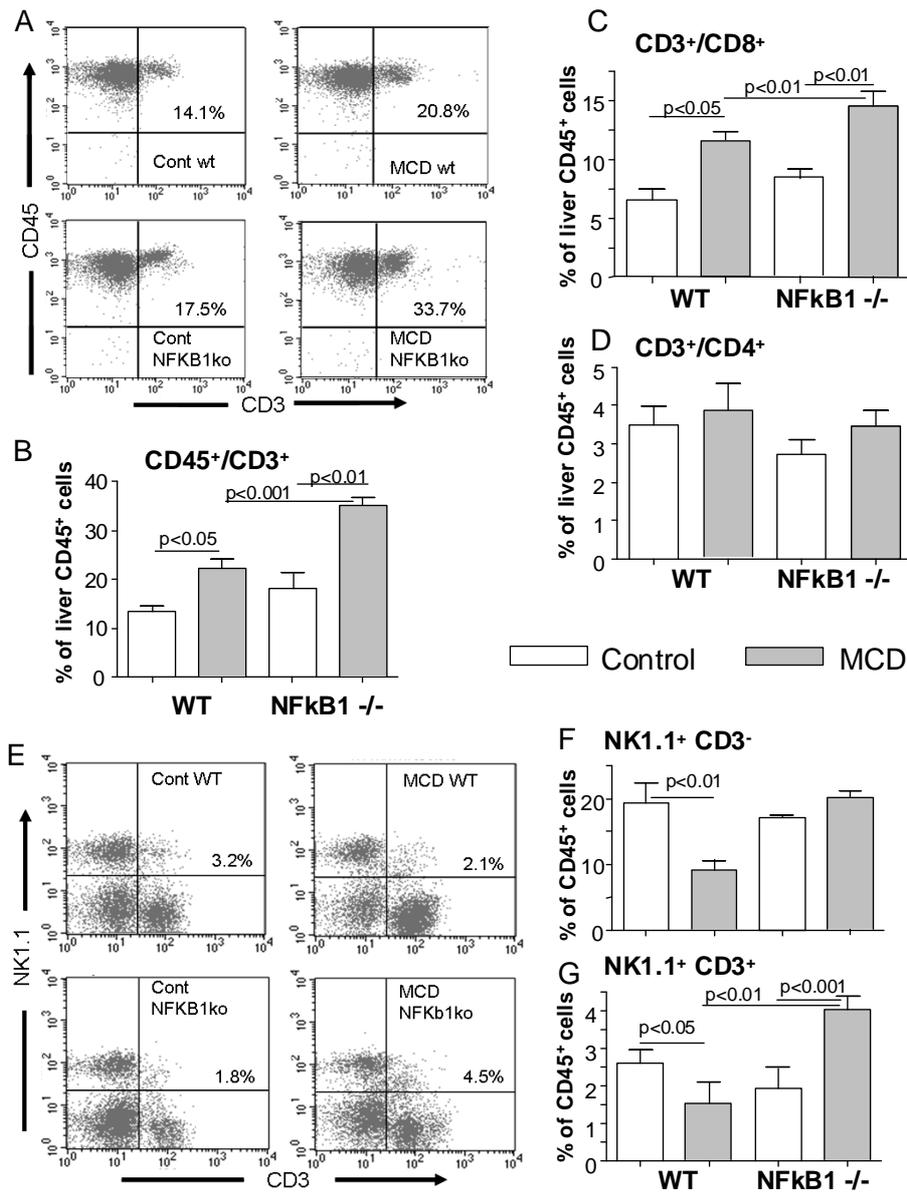


Figura 5

Figura 5: lo sviluppo della NASH in topi NFkB1 -/- associa con un aumentato reclutamento dei linfociti T epatici.

I leucociti epatici sono stati isolati dai fegati dei topi WT e NFkB1 -/- alimentati per quattro settimane con dieta sia di controllo sia MCD e analizzati utilizzando il FACS. Nel pannello A è mostrato un grafico rappresentativo dei linfociti T CD3⁺. I grafici B, C e D mostrano le analisi statistiche delle popolazioni di linfociti T CD3⁺ e CD4⁺ o CD8⁺. Nel pannello E è rappresentato il grafico dei linfociti CD3⁺ NK1.1⁺. I grafici F e G mostrano le analisi statistiche delle cellule CD3⁻ NK1.1⁺ (NK) e CD3⁺ e NK1.1⁺ (NKT). I valori si riferiscono a 5-6 animali per gruppo e le barre rappresentano la mediana ± deviazione standard.

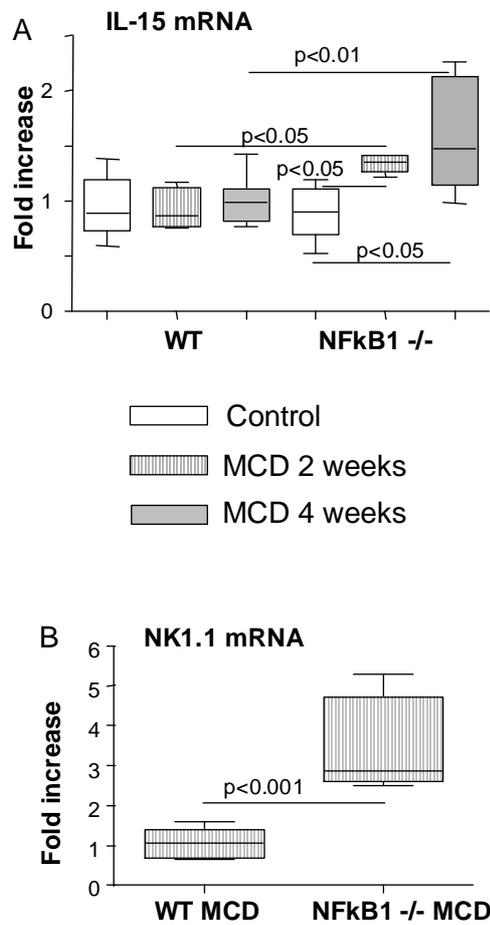


Figura 6

Figura 6: la mancanza di NfκB1 promuove l'attività di IL-15.

La NASH è stata indotta dal trattamento con dieta MCD per due e quattro settimane. L'espressione dell'mRNA epatico di IL-15 e NK1.1 (A-B) è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina. I valori si riferiscono a 8-10 animali per ciascun 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).

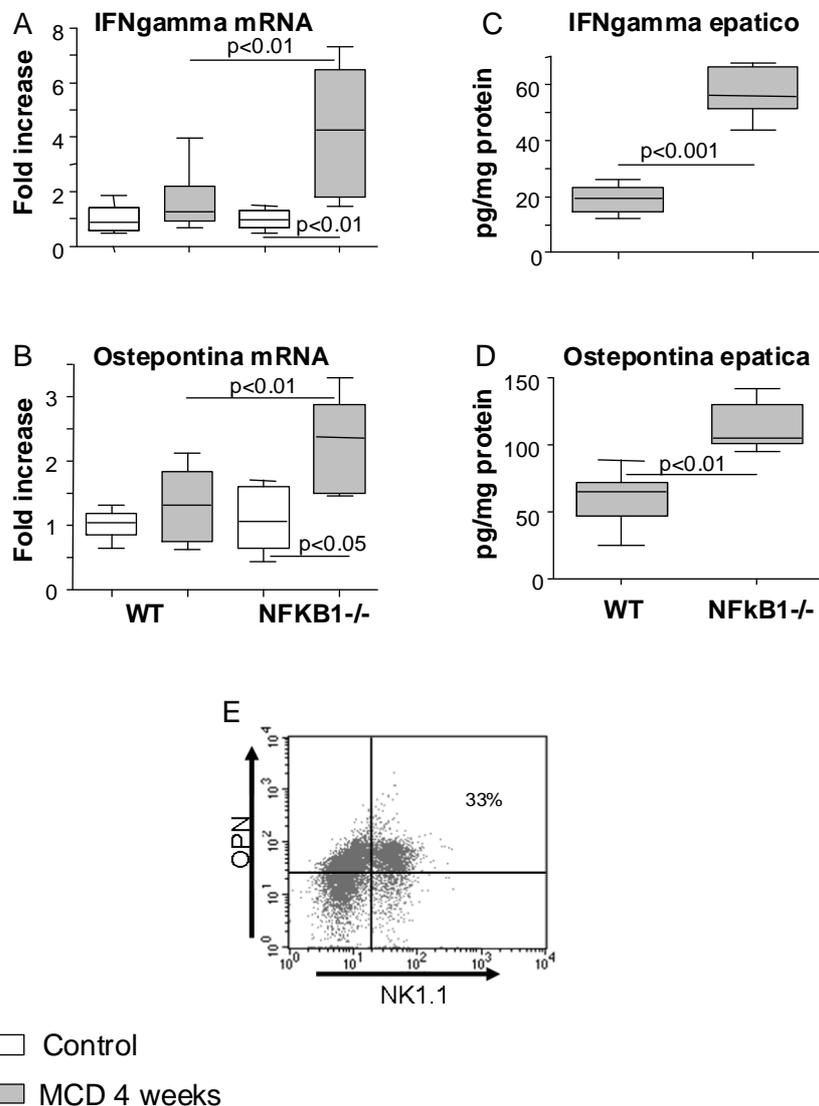


Figura 7

Figura 7: la produzione di citochine derivate dalle cellule NKT caratterizza la NASH nei topi NFKB1 -/-.

La NASH è stata indotta dal trattamento con dieta MCD per quattro settimane. L'espressione dell'mRNA epatico di interferon- γ (IFN- γ) e di osteopontina (A-B) è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina. I livelli intraepatici di IFN- γ (C) e osteopontina (D) sono stati valutati mediante ELISA. I valori si riferiscono a 8-10 animali per ciascun 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). Il pannello E mostra l'analisi al citofluorimetro dei leucociti esprimenti NK1.1 e osteopontina isolati dai fegati di topi NFKB1 -/- alimentati con dieta MCD.

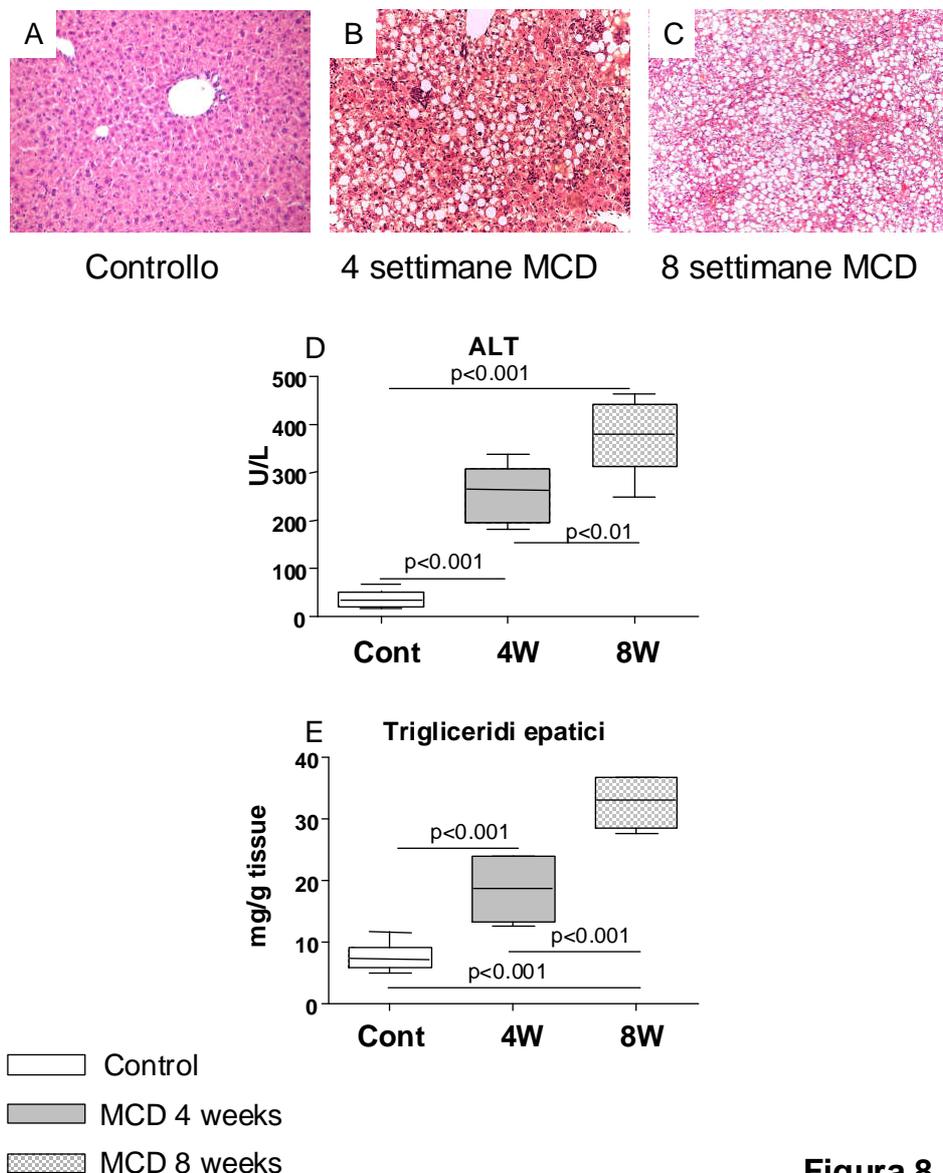


Figura 8

Figura 8: i topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD per otto settimane sviluppano NASH associata a fibrosi.

I topi C57BL/6 sono stati alimentati per quattro e otto settimane con dieta controllo e MCD. le sezioni epatiche sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina (A-C; ingrandimento 200X). Il rilascio delle alanina-transaminasi (D) e il contenuto epatico di trigliceridi (E) sono stati valutati con metodi enzimatici. I valori si riferiscono a 8-10 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)

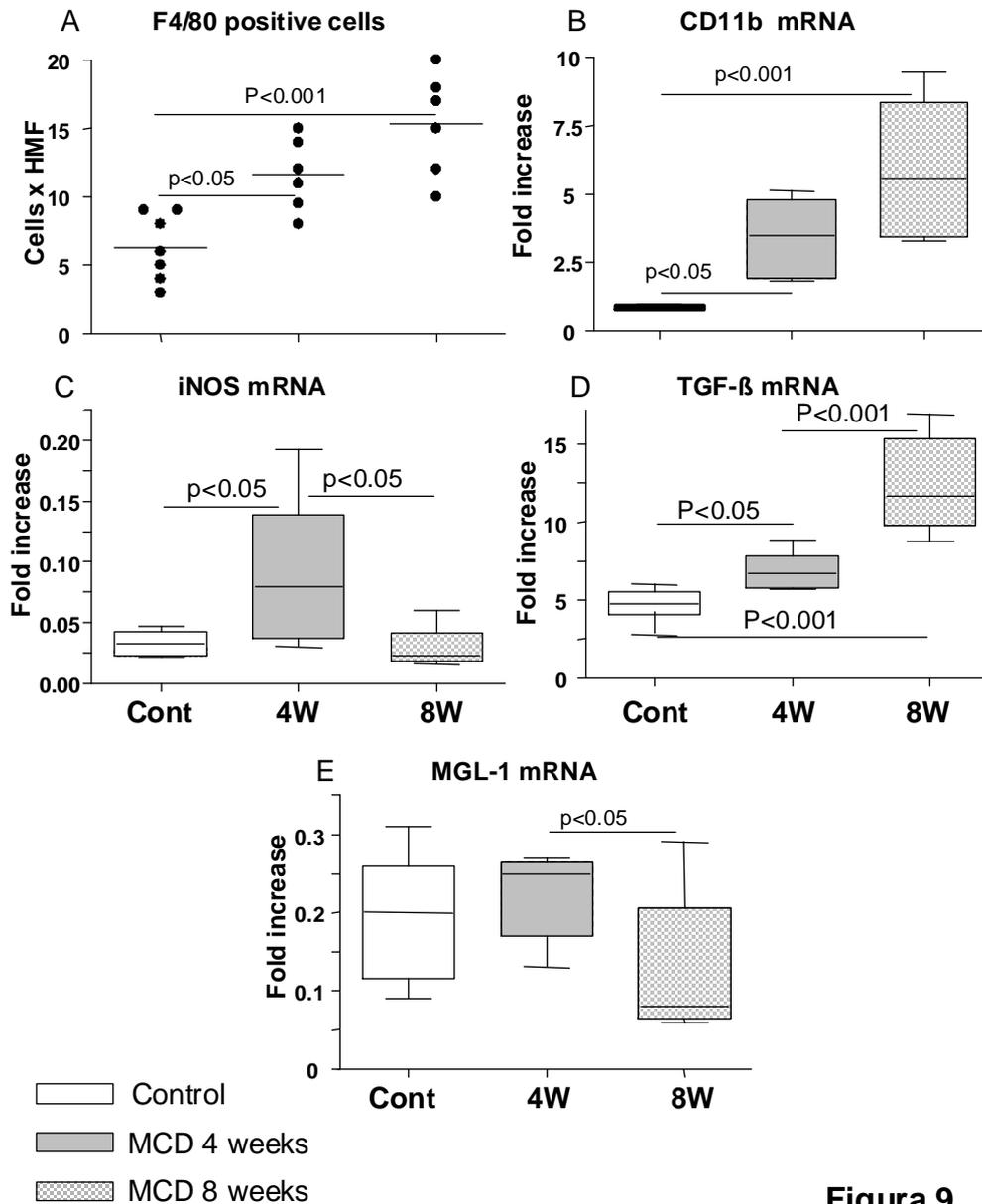


Figura 9

Figura 9: lo sviluppo di fibrosi in topi C57BL/6 alimentati con dieta MCD per 8 settimane è associata ad un aumento di macrofagi e ad un cambiamento dell'espressione di citochine epatiche.

I topi C57BL/6 sono stati alimentati per quattro e otto settimane con dieta di controllo e MCD. Le cellule macrofagiche sono state marcate con l'anticorpo anti-F4/80 e contate in dieci campi differenti utilizzando un microscopio ad alto ingrandimento (A). L'espressione dell'mRNA epatico di CD11b, iNOS e MGL-1 (B-D) è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina. I valori si riferiscono a 8-10 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).

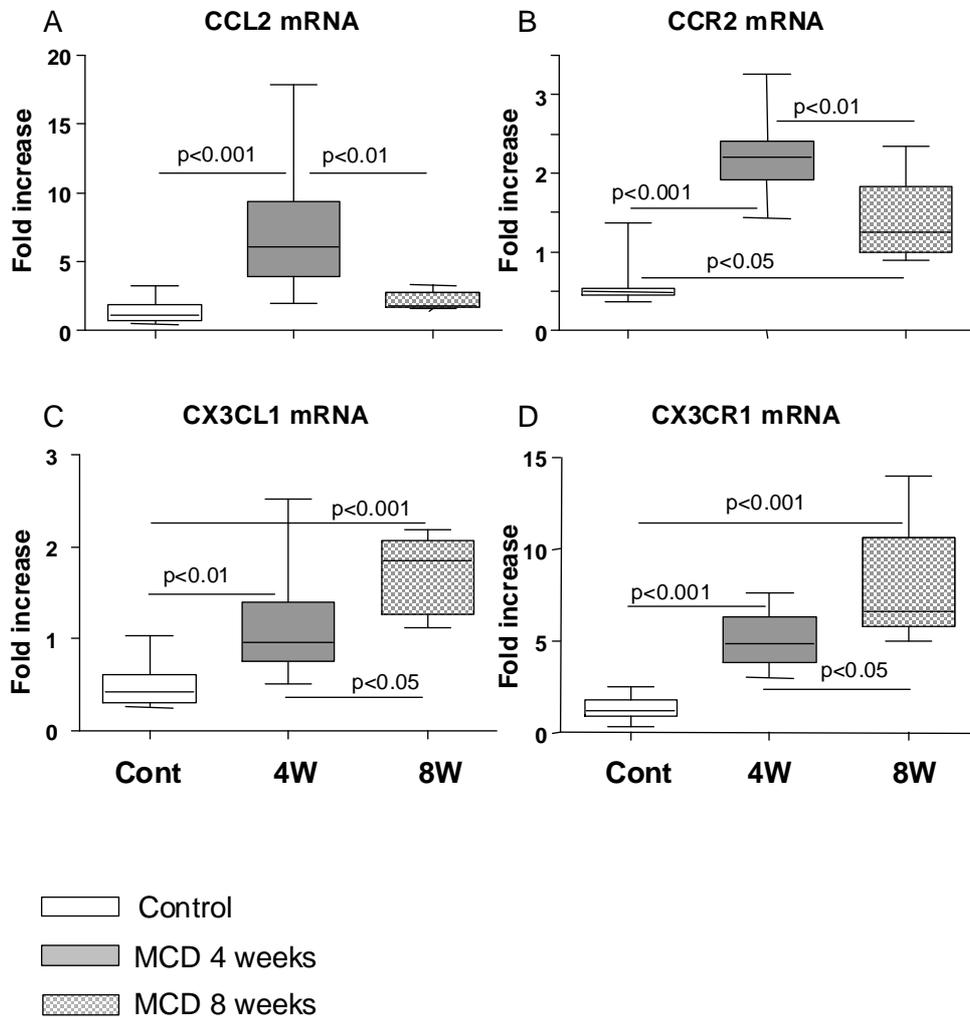


Figura 10

Figura 10: lo sviluppo della NASH è caratterizzato dal coinvolgimento di due classi diverse di monociti.

I topi C57BL/6 sono stati alimentati per quattro e otto settimane con dieta di controllo e MCD. L'espressione dell'mRNA epatico di CCL2, CCR2, CX3CL1, CX3CR1 (A-D) è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina. I valori si riferiscono a 8-10 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).

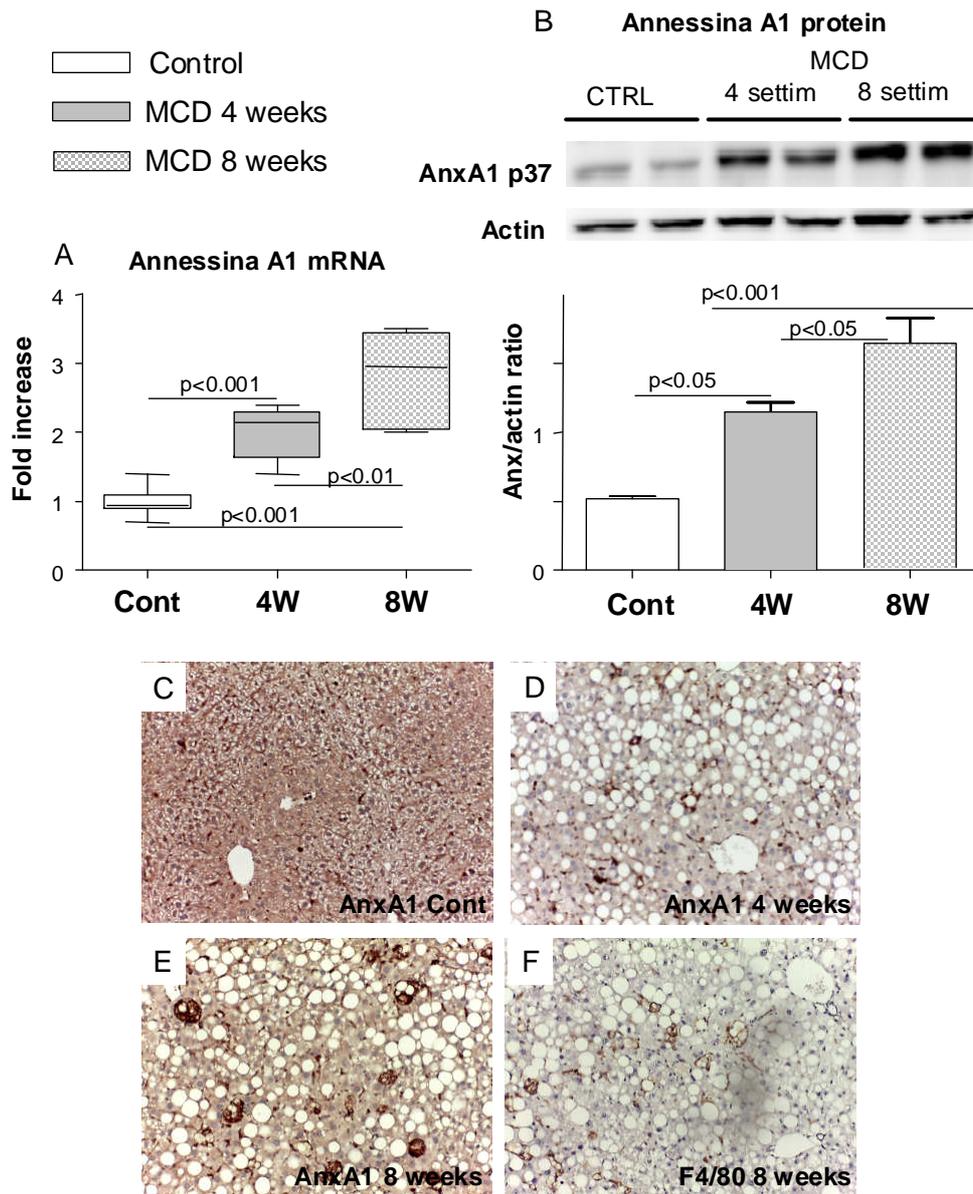


Figura 11

Figura 11: lo sviluppo di NASH in topi C57BL/6 è associato ad un aumento nell'espressione di annessina A1.

I topi C57BL/6 sono stati alimentati per quattro e otto settimane con dieta di controllo e MCD. L'espressione dell'mRNA epatico di Annessina A1 (A) è stata misurata utilizzando la Real Time PCR e i valori sono stati normalizzati rispetto al gene della beta-actina. L'espressione proteica di Annessina A1 è stata valutata mediante western blot e i valori sono stati normalizzati rispetto all'actina (B). Le sezioni epatiche sono state marcate con l'anticorpo anti-Annessina A1 e F4/80 (C-E) e valutate con un microscopio ad alto ingrandimento. I valori si riferiscono a 8-10 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).

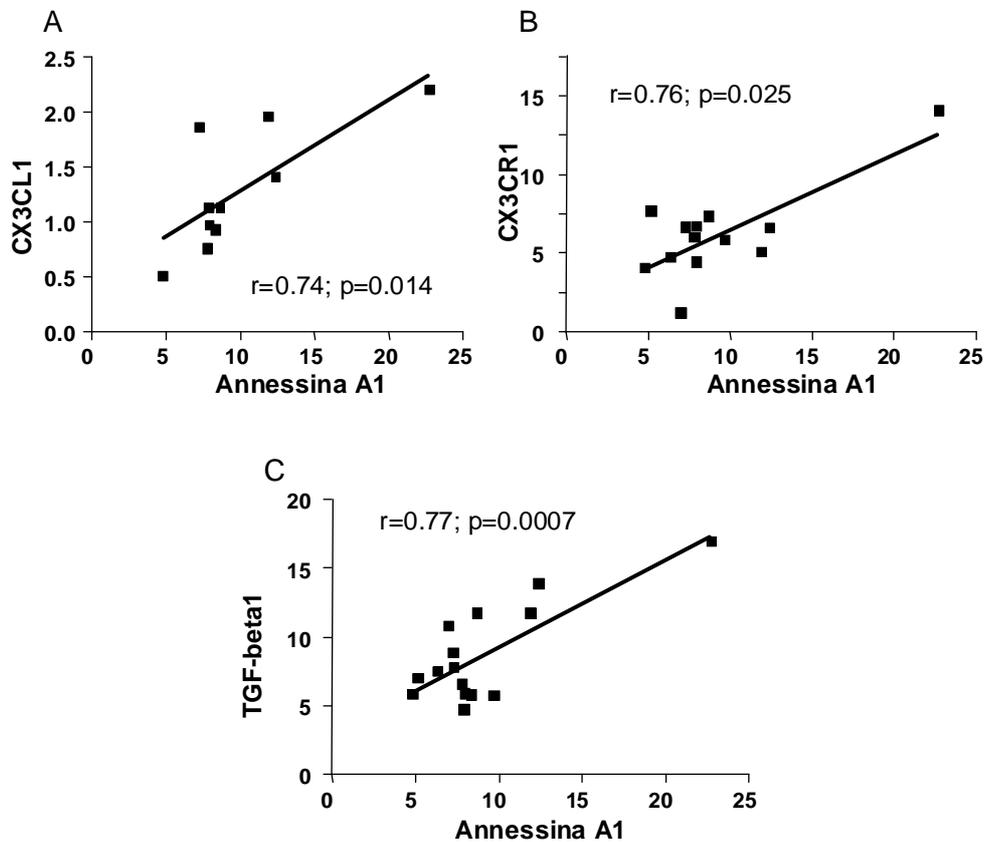


Figura 12

Figura 12: nei topi C57BL/6 si ha una correlazione positiva tra l'espressione di annessina A1 e quella di CX3CL1, CX3CR1 e TGF- β .

I topi C57BL/6 sono stati alimentati per quattro e otto settimane con dieta di controllo e MCD. Tutti i valori dell'espressione dell'mRNA epatico di CX3CL1, di CX3CR1 e di TGF- β sono stati correlati con quelli di Annessina A1 (A-C). I valori si riferiscono a 8-10 animali per gruppo.

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. Beinke S, Ley SC (2004) Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* **382**, 393-409
11. Panzer U, Steinmetz OM, Turner JE, Meyer-Schwesinger C, von Ruffer C, Meyer TN, Zahner G, Gómez-Guerrero C, Schmid RM, Helmchen U, Moeckel GW, Wolf G, Stahl RA, Thaiss F (2009) Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* **297**, F429-F439
12. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM (2006) NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* **281**, 26041-26050
13. Elsharkawy AM, Oakley F, Lin F, Packham G, Mann DA, Mann J (2010) The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *J Hepatol.* **53**, 519-527
14. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A (2009) Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**, 14978-14983
15. Pereira SG, Oakley F (2008) Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**, 1425-1430
16. Oakley F, Mann J, Nailard S, Smart DE, Mungalsingh N, Constandinou C, Ali S, Wilson SJ, Millward-Sadler H, Iredale JP, Mann DA (2005) Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury. *Am J Pathol.* **166**, 695-708
17. Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR (2004) Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* **13**, 35-45
18. Zhou B, Rao L, Peng Y, Wank Y, Qie M, Zhang Z, Song Y, Zhang L (2010) A functional promoter polymorphism in NFKB1 increases susceptibility to endometriosis. *DNA Cell Biol.* **29**, 235-239

19. Zou YF, Wang F, Feng XL, Tao JH, Zhu JM, Pan FM, Su H (2011) Association of NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Tissue Antigens*. **77**, 9-17
20. Marcos M, Pastor I, González-Sarmiento R, Laso FJ (2009) A functional polymorphism of the NFKB1 gene increases the risk for alcoholic liver cirrhosis in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. **33**, 1957-1862
21. Tang T, Zhang J, Yin J, Gawronska-Kozak B, Jung DY, Ko HJ, Ong H, Kim JK, Mynatt R, Martin RJ, Keenan M, Gao Z, Ye J (2010) Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF-kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure. *J Biol Chem*. **285**, 4637-4644
22. Steel JC, Waldmann TA, Morris JC (2012) Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. **33**, 35-41
23. Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fering CM, Teaberry V, Pereira FE, Adams DH, Diehl AM (2010) Accumulation of natural killer T cells in progressive non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. **51**, 1998-2007
24. Syn WK, Agboola KM, Swiderska M, Michelotti GA, Liaskou E, Pang H, Xie G, Philips G, Chan IS, Karaca GF, Pereira TD, Chen Y, Mi Z, Kuo PC, Choi SS, Guy CD, Abdelmalek MF, Diehl AM (2012) NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. **61**, 1323-1329
25. Maina V, Sutti S, Locatelli I, Vidali M, Mombello C, Bozzola C, Albano E (2012) Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice *Clin Sci (Lond)* **22**, 545-53
26. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82
27. Stunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* **172**, 4410-4417
28. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H, Seki E (2012) Hepatic recruitment of macrophages promotes non-alcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, 1310-21
29. Li Z, Soloski MK, Diehl AM (2005) Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. **42**, 880-885
30. Kremer M, Thomas E, Milton RJ, Perry AW, van Rooijen N, Wheeler MD, Zacks S, Fried M, Rippe RA, Hines IN (2010) Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology*. **51**, 130-141
31. Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N (2010) Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. *J Gastroenterol*. **45**, 1247-1254
32. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T (2009) Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **21**, 673-680
33. Stankovic S, Gugasyan R, Kyparissoudis K, Grumont R, Banerjee A, Tschlis P, Gerondakis S, Godfrey DI (2011) Distinct roles in NKT cell maturation and function for the different transcription factors in the classical NF-kB pathway. *Immunol Cell Biol*. **89**, 294-303
34. Correia MP, Cardoso EM, Pereira CF, Neves R, Uhrberg M, Arosa FA (2009) Hepatocytes and IL-15: a favorable microenvironment for T cell survival and CD8+ T cell differentiation. *J Immunol*. **182**, 6149-6159
35. Suzuki A, McCall S, Choi SS, Sicklick JK, Huang J, Qi Y, Zdanowicz M, Camp T, Li YX, Diehl AM (2006) Interleukin-15 increases hepatic regenerative activity. *J Hepatology*. **45**, 410-418

36. Morimoto J, Kon S, Matsui Y, Uede T (2010) Osteopontin as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Drug Targets*. **11**, 494-505
37. Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onóe K, Denhardt D, Rittling S, Uede T (2004) Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity*. **21**, 539-550
38. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, Mi Z, Pereira TA, Zdanowicz M, Malladi P, Chen Y, Moylan C, Jung Y, Bhattacharya SD, Teaberry V, Omenetti A, Abdelmalek MF, Guy CD, Adams DH, Kuo PC, Michelotti GA, Whittington PF, Diehl AM (2011) Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. **53**, 106-115
39. Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF (2004) Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **287**, G264-273
40. Zeyda M, Gollinger K, Todoric J, Kiefer FW, Keck M, Aszmann O, Prager G, Zlabinger GJ, Petzelbauer P, Stulnig TM (2011) Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function. *Endocrinol*. **152**, 2219-2227
41. Rangnekar AS, Lammert F, Igoznikov 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
42. Urtasun R, Lopategi A, George J, Leung TM, Lu Y, Wang X, Ge X, Fiel MI, Nieto N (2012) Osteopontin, an oxidant stress-sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin $\alpha(V)\beta(3)$ engagement and PI3K-pAkt-NF κ B signaling. *Hepatology*. **55**, 594-608
43. D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ (2008) Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*. **155**: 152-69

LEZIONI

- PhD Summer School on Molecular Biomedicine – Udine, 9-13 Luglio 2012
- Course on "Genetics and Molecular Medicine" – Prof. Steve Ellis – dal 21 Maggio 2012 al 1 Giugno 2012
- Operator Training on BD FACSCalibur™ and BD Cell Quest Software – Buccinasco (MI), 4-5 Aprile 2012

SEMINARI

1. "The resolution of inflammation: players and targets" – Prof. Mauro Perretti – 7 Novembre 2011 – William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK
2. "Galectins-carbohydrate binding protein: sweet or sour?" – Prof. Mauro Perretti – 20 Dicembre 2011 - William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK
3. "Next-generation DNA sequencing and target arrays in the clinics" – Dr. Paolo Fortina – 25 Gennaio 2012 – Department of Cancer Biology, Jefferson Genomics Laboratory, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University Jefferson Medical College, Philadelphia, PA, USA
4. "Signalling pathways controlling integrin trafficking during invasion" – Dr.ssa Elena Rainero – 8 Marzo 2012 – Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK
5. "Role of Diacylglycerol kinases in the control of T cell activation and differentiation programs" – Prof.ssa Isabel Merida – 23 Marzo 2012 - Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid
6. "Developing strategies for tissue specific targeting" – Prof. Costantino Pitzalis – 28 Marzo 2012 – Barts and the London School of Medicine, London
7. "The role of cutaneous HPV in skin cancer" – Prof. Ingo Nindl – 29 Marzo 2012 - DKFZ - Charité Cooperation, Viral Skin Carcinogenesis, Berlin
8. "Microparticles as novel effectors in inflammation" – Prof. Mauro Perretti – 15 Maggio 2012 – William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK
9. "Resolvins and Omega-3 in inflammation" – Prof. Mauro Perretti – 16 Maggio 2012 – William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK
10. " High-throughput Biochemical Target Investigation Unveils a Novel Function of miR-21 as a Negative Modulator of Signal Transduction in T-lymphocytes" – Prof. Pino Macino – 15 Giugno 2012 - University "La Sapienza", Rome
11. "Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: from microRNA Regulation to Targeted Gene Transfer" – Prof. Luigi Naldini – 21 Giugno 2012 – San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET), Milan, ITALY

CONGRESSI

Partecipazione a congressi

- **The International Liver Congress 2012 – Barcelona, 18-22 Aprile 2012**

“NF-kB1 DEFICIENCY WORSENS NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) IN MICE BY PROMOTING LYMPHOCYTE-MEDIATED RESPONSES”

Irene Locatelli, Salvatore Sutti, Marco Vacchiano, Cristina Bozzola, Emanuele Albano

- **EASL Monothematic Conference “Immune mediated liver injury”, Stratford Upon Avon, 19-21 Gennaio 2012**

“BIAS IN MACROPHAGE POLARIZATION INFLUENCES THE PROGRESSION OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) IN MICE”

Salvatore Sutti, Virginia Maina, **Irene Locatelli**, Matteo Vidali, Cristina Mombello, Cristina Bozzola, Emanuele Albano

Comunicazione orale

- **EASL Monothematic Conference “Immune mediated liver injury”, Stratford Upon Avon, 19-21 Gennaio 2012**

“NF-kB1 DEFICIENCY WORSENS NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) IN MICE BY PROMOTING LYMPHOCYTE-MEDIATED RESPONSES”

Irene Locatelli, Salvatore Sutti, Marco Vacchiano, Cristina Bozzola, Emanuele Albano

Abstract

- **XXXI meeting of the Italian Society of Pathology and Translational Medicine – Udine, 12-15 Settembre 2012**

“IMMUNE RESPONSES AGAINST OXIDATIVE STRESS-DERIVED ANTIGENS CONTRIBUTE TO HEPATIC INFLAMMATION IN NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH)”

Salvatore Sutti, **Irene Locatelli**, Aastha Jindal, , Marco Vacchiano, Cristina Bozzola, Emanuele Albano

- **Oxygen Club of California World Congress 2012 – Alba, 20-23 Giugno 2012**

“OXIDATIVE STRESS DRIVEN IMMUNE RESPONSES CONTRIBUTES TO HEPATIC INFLAMMATION IN NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH)”

Aastha Jindal, **Irene Locatelli**, Salvatore Sutti, Marco Vacchiano, Cristina Bozzola, Emanuele Albano

- **The International Liver Congress 2012 – Barcelona, 18-22 Aprile 2012**

“THE GENETIC BACKGROUND DIFFERENTIALLY AFFECTS HEPATIC NECRO-INFLAMMATION IN RESPONSE TO CCL2 IN A MURINE MODEL OF STEATOHEPATITIS”

S. Galastri, E. Zamara, S. Milani, E. Novo, A. Provenzano, S. Sutti, **I. Locatelli**, E. Vivoli, E. Albano, M. Parola, F. Marra

- **Annual Meeting 2012 - "45th Annual Meeting of the Italian Association for the Study of the Liver - AISF" – Roma, 23-24 Febbraio 2012**

“THE GENETIC BACKGROUND DIFFERENTIALLY AFFECTS HEPATIC NECRO-INFLAMMATION IN RESPONSE TO CCL2 IN A MURINE MODEL OF STEATOHEPATITIS”
S. Galastri, E. Zamara, S. Milani, E. Novo, A. Provenzano, S. Sutti, **I. Locatelli**, E. Vivoli, E. Albano, M. Parola, F. Marra

Publicazioni

- NF-kappaB1 deficiency stimulates the progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice by promoting NKT-mediated responses
Locatelli I, Sutti S, Vacchiano M, Bozzola C, Albano E.
Clin Sci (Lond). 2012 Sep 12. [Epub ahead of print]
- Lack of CC chemokine ligand 2 differentially affects inflammation and fibrosis according to the genetic background in a murine model of steatohepatitis
Galastri S, Zamara E, Milani S, Novo E, Provenzano A, Delogu W, Vizzutti F, Sutti S, **Locatelli I**, Navari N, Vivoli E, Caligiuri A, Pinzani M, Albano E, Parola M, Marra F.
Cli Sci (Lond). 2012 Oct; 123(7):459-71
- Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice
Maina V, Sutti S, **Locatelli I**, Vidali M, Mombello C, Bozzola C, Albano E.
Clin Sci (Lond). 2012 Jun 1;1 22(11):545-53.