



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**SCUOLA DI DOTTORATO IN BIOLOGIA E MEDICINA DELLA
RIGENERAZIONE**

XXVI CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Ruolo dell'immunità e degli ormoni sessuali in un modello di
danno epatico acuto**

Direttore della Scuola: CHIAR.MA PROF.SSA MARIA TERESA CONCONI

Coordinatore di indirizzo: CHIAR.MA PROF.SSA MARIA TERESA CONCONI

Relatore : DOTT.SSA ROSA DI LIDDO

Co-Relatore: CHIAR.MA PROF.SSA MARIA TERESA CONCONI

Dottorando: VINCENZO AMODIO

RIASSUNTO

È noto che gli ormoni sessuali controllano in maniera diretta ed indiretta l'infiammazione. In alcuni modelli di danno tissutale, gli androgeni hanno dimostrato di avere capacità immunosoppressive mentre gli estrogeni hanno contribuito alla immunoprotezione e alla risoluzione delle lesioni tissutali. Poiché la rigenerazione epatica è risultata più lenta e difficile negli animali maschi rispetto a quella osservata nelle femmine, in questo studio è stato allestito un modello di danno epatico acuto per induzione con CCl₄ ed è stato esplorato il meccanismo di risoluzione della lesione epatica in animali maschi e femmine. In particolare, mediante un'analisi multiparametrica di citofluorimetria, sono state caratterizzate le popolazioni esogene ed endogene di linea monocitica/macrofagica e linfocitaria coinvolte nella risposta infiammatoria. I livelli di espressione dei marcatori d'interesse delle cellule epatiche estratte da animali sani sono stati assunti come riferimento per discriminare la reattività immunitaria nei gruppi sperimentali di danno epatico. Allo scopo di definire il ruolo degli androgeni nella modulazione della risposta al danno epatico acuto, alcuni animali trattati con CCl₄ sono stati sottoposti al trattamento con un inibitore del recettore degli androgeni (AR), la flutamide. L'effetto specifico della flutamide è stato definito per confronto con i campioni trattati con CCl₄ e solo veicolo. Lo studio di citofluorimetria ha rilevato un significativo dimorfismo tra maschi e femmine a livello del tempo di reclutamento delle cellule mieloidi immunosoppressive nel fegato. Inoltre, l'*homing* è risultato dipendente dagli androgeni come dimostrato dall'espressione di AR sulle cellule GR-1^{high} e dal blocco indotto sul loro reclutamento nel fegato da parte della flutamide. La flutamide ha dimostrato di intensificare la risposta infiammatoria nel maschio mentre nella femmina ha contribuito alla sua modulazione.

ABSTRACT

Direct and indirect effect of sex hormones have been demonstrated to control the inflammation process. Using animal models of tissue damage, androgens demonstrated to be immunosuppressive while estrogens contributed to exert immunoprotective activity and wound repair. As liver regeneration showed to be slower and more difficult in males than in females, in this thesis a liver acute damage model was obtained by injection of CCl₄ in Balb/c mice (males and females). By cytometrical multiparametric method, the endogenous and exogenous populations of monocyte and lymphocyte lineages were explored. The expression level of target markers, relative to cells of healthy animals, was assumed as reference to discriminate the immunoreactivity of test groups of liver damage. In order to define the regulatory role of androgens on the liver acute damage response, some animals were also treated with an antagonist of androgen receptor (AR), flutamide. The flutamide effect on liver endogenous and exogenous cells was defined as specific when compared to that of oil vehicle. The cytometrical study showed important differences among males and females. In particular, the homing time of immunosuppressive myeloid cells was delayed in males in respect to females. Moreover, the homing resulted to be dependent on androgens as the inhibition of AR through flutamide tackled migrating Gr-1^{high} cells to liver. While flutamide showed to contribute to inflammation in males, in contrast it guaranteed its negative regulation in females.

INDICE

Riassunto	i
Abstract	iii
INDICE	v
1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 Il Fegato e la rigenerazione epatica	pag. 1
1.2 I Mediatori cellulari della risposta al danno epatico	pag. 1
1.3 Il Microambiente epatico e l'infiammazione	pag. 2
1.4 Cellule di Kupffer	pag. 2
1.4.1 Monociti circolanti	pag. 2
1.4.2 Danno epatico e dimorfismo fisiopatologico	pag. 3
2. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 5
3. MATERIALI E METODI	pag. 7
3.1. Modello animale	pag. 7
3.2. Induzione del danno epatico acuto	pag. 7
3.3. Analisi istologica	pag. 8
3.4. Studio dell'immunofenotipo	pag. 9
a) Dissociazione delle cellule epatiche	pag. 9
b) Preparazione dei campioni per l'analisi di citofluorimetria	pag. 10
c.1) Basi teoriche della citofluorimetria	pag. 10
c.2) Principio di funzionamento della CFM	pag. 11
3.5. Analisi di espressione delle citochine	pag. 13

4. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 15
4.1. Analisi istologica	pag. 15
4.2. Analisi di citofluorimetria	pag. 19
5. CONCLUSIONI	pag. 29
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 31

1. INTRODUZIONE

La rigenerazione epatica è un processo fisiologico che contribuisce all'omeostasi dell'organo. Rappresenta un processo complesso in cui tipi cellulari diversi interagiscono tra loro sotto il controllo di molecole infiammatorie, fattori di crescita ed ormoni.

1.1 Il Fegato e la rigenerazione epatica

Il fegato è un organo caratterizzato dalla peculiare capacità di mantenere costanti le sue dimensioni, anche in seguito ad un danno grave che può conseguire alla resezione chirurgica, all'ischemia, alle infezioni virali oppure al trattamento con sostanze ad azione tossica (*Tau et al., 2004*). La rigenerazione epatica è un meccanismo di difesa che si è sviluppato negli animali allo scopo di proteggerlo da danni derivanti da intossicazioni alimentari. Dimostrata per la prima volta da Higgins e Anderson (1931) in un modello sperimentale murino di epatectomia parziale, essa è caratterizzata da complessi meccanismi cellulari e molecolari che ne regolano l'insorgenza, la progressione ed il completamento fino al ripristino della sua massa originaria. Si definisce dunque come un fenomeno di tipo compensatorio in cui meccanismi quali l'apoptosi e la proliferazione cellulare, la difesa e la soppressione immunitaria, la fagocitosi ed il rimodellamento si susseguono in un perfetto equilibrio dinamico.

1.2 I Mediatori cellulari della risposta al danno epatico

Gli epatociti sono le principali cellule coinvolte nella rigenerazione epatica. Si presentano di forma poligonali che si organizzano a formare l'unità anatomico-funzionale detta lobulo epatico (*Mall et al., 1906*). In sezione, il lobulo ha la forma di un esagono delimitato ai vertici dalle triadi portalì in cui si riconoscono un ramo della vena porta, uno dell'arteria epatica ed un dotto biliare epatico tenuti strettamente insieme dalla cosiddetta lamina limitante (Figura 1). Il sangue perfonde il lobulo dalla vena porta e dall'arteria epatica attraverso i sinusoidi fino alla vena centrolobulare. In caso di danno epatico, gli epatociti, la cui vita media è di circa 200 giorni, escono dalla fase G0 ed entrano nel ciclo replicativo allo scopo di ripristinare la massa persa. Dopo epatectomia parziale, è stato dimostrato che il ripristino della massa epatica è garantito dalla proliferazione di altri tipi cellulari comprendenti i colangiociti e le cellule stellate

(Ponder *et al.*, 1996). Nei roditori, il fegato può ripristinare il suo volume originale in seguito alla rimozione di 2/3 del parenchima epatico in circa 10 giorni (Michalopoulos *et al.*, 1997; Fausto *et al.*, 2004). In condizioni di danno epatico cronico causato da farmaci, virus e tossine la proliferazione degli epatociti può risultare essere limitata per cui un ruolo essenziale nel processo di rigenerazione epatica è giocato dalla componente cellulare staminale comprendente le “cellule ovali”.

1.3 Il Microambiente epatico e l’infiammazione

Il microambiente epatico definisce come l’insieme di cellule e fattori strutturali e/o solubili che partecipano al mantenimento dell’omeostasi tessutale. Ha una grande plasticità e capacità compensatoria che conferiscono al fegato una caratteristica dinamicità di risposta a danni chimici, fisici o biologici.

1.3.1 Cellule di Kupffer

Costituiscono il 15% circa della popolazione epatica e appartengono al sistema monocitico/macrofagico. Localizzate a livello dei sinusoidi, si sviluppano nel midollo osseo, maturano in monociti del sangue periferico per poi completare la loro differenziazione all’interno del fegato (Gale *et al.*, 1978; Naito *et al.*, 1997). Sono dotate di attività fagocitaria e fungono da cellule presentanti l’antigene. Secernono citochine, ossido di azoto ed intermedi reattivi dell’ossigeno che agiscono modulando l’azione delle cellule immunitarie e delle cellule epatiche (Seki *et al.*, 2000).

Sono coinvolte nella patogenesi del danno epatico attraverso il rilascio di sostanze pro-infiammatorie, come l’LPS, le citochine pro-infiammatorie (IL6, IL-8, TNF- α , IFN- α), le chemochine (CCL2,) e le specie reattive dell’ossigeno e dell’azoto. In particolare, le cellule di Kupffer secernono chemochine per richiamare cellule infiammatorie circolanti e citochine quali TNF- α .

1.3.2 Monociti circolanti

I macrofagi e le cellule dendritiche assicurano l’omeostasi del tessuto epatico in condizioni fisiologiche mentre durante un processo infiammatorio mediano la risposta immunitaria innata ed adattativa. In stato stazionario, le cellule di Kupffer, ovvero i macrofagi epatici residenti, sono sottoposte ad un fisiologico *turnover* mediato da monociti ematici derivati dal midollo osseo (Klein *et al.*, 2007). In seguito ad un danno,

esse si attivano e rilasciano fattori di crescita quale il TGF- (Gerritsma et al., 1998), citochine proinfiammatorie (Harvey et al., 2003) che in sinergia con i fattori di stress (acidi biliari, ROS) (Zernecke et al., 2009), corpi apoptotici o necrotici (Zernecke et al., 2009) attivano le cellule epatiche stellate e quindi la rigenerazione del tessuto (Karlmark et al., 2008). La chemochina CCL2 gioca un ruolo essenziale nella risposta al danno epatico. Secreta dalle cellule di Kupffer attivate, oltre che dalle cellule stellate ed endoteliali sinusoidali (Leifeld et al., 2003; Friedman et al., 2008; Kolios et al., 2008; Cheng et al., 2011), ha la funzione primaria di richiamare monociti e macrofagi attraverso il recettore CCR2. Esprimendo il medesimo recettore, le NK e i linfociti rispondono al suo segnale (Karlmark et al., 2008). E' stato dimostrato che i livelli intraepatici e sierici di CCL2 sono alti nei pazienti affetti da epatite fulminante e nei modelli murini di danno epatico acuto (Possama et al., 2010). Poiché il livello di espressione della chemochina CCL2 a livello epatico è superiore, le popolazioni mieloidi di tipo infiammatorio residenti nel midollo osseo (Karlmark et al., 2009) ed espressioni CCR2 sono reclutate in modo preferenziale nel fegato.

1.4 Danno epatico e dimorfismo fisiopatologico

Durante il danno epatico il complesso gioco di interazioni cellulari è sotto l'influenza dei segnali prodotti dalle cellule epatiche e delle cellule infiammatorie endogene ed esogene. Numerose evidenze hanno messo in luce una sostanziale differenza tra maschio e femmina nella risposta al danno epatico acuto o cronico. Si stima che l'epatocarcinoma sia 3-5 volte più comune negli uomini che nelle donne (Bosch et al., 2004) mentre l'epatocarcinogenesi sperimentale si sviluppa più frequentemente negli animali di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile.

Alla base di tale differenza si riconoscono nella specie umana cause a) di tipo sociologico quali il maggior consumo di alcol ed il diverso stile di vita nell'uomo rispetto alla donna e di b) tipo fisiologico quali gli ormoni sessuali (Yokoyama et al., 2005).

Il fegato è un organo sensibile agli effetti degli ormoni sessuali. Variazioni nella concentrazione degli ormoni sessuali circolanti o nell'espressione epatica dei loro specifici recettori (Yokoyama et al., 2005) possono tradursi in una significativa modificazione della risposta riparativa del danno epatico. Numerose evidenze dimostrano come gli ormoni sessuali intervengano modulando positivamente o negativamente la risoluzione della lesione epatica. In particolare, è stato osservato che

nel fegato gli estrogeni, mediante il recettore degli estrogeni (ER- α), agiscono su diversi tipi cellulari contribuendo a preservarne la funzione in condizioni di stress (*Yokoyama et al, 2005*). Il recettore degli androgeni (AR) è stato identificato nelle cellule infiammatorie di origine mieloide che garantiscono a livello epatico un'azione pro-infiammatoria e immunosoppressiva nei confronti delle cellule T CD8+. La presenza di AR sulle cellule effettrici dell'infiammazione lascia intuire una possibile regolazione della risposta infiammatoria da parte del testosterone. Attualmente, il ruolo dell'AR nel danno epatico acuto non è stato ancora chiarito.

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di definire il ruolo degli androgeni nella risposta al danno epatico acuto in un modello animale di topi Balb/c indotto mediante somministrazione di CCl₄. A differenti intervalli di tempo (T3gg, T5gg, T8gg), l'analisi istologica ha consentito di valutare l'entità del danno in tempi precoci e la risoluzione delle lesioni epatiche in tempi successivi. Lo studio multiparametrico di citofluorimetria sulle popolazioni epatiche dissociate ha permesso di discriminare tra maschio e femmina lo sviluppo della risposta riparativa in termini di attivazione di popolazioni endogene ed esogene sulla base dell'identificazione dei marcatori CD11b, F4/80, CCR2 e Gr-1. In particolare, per definire in modo preciso il ruolo svolto dagli androgeni, alcuni animali trattati con CCl₄ sono stati poi sottoposti all'inibizione di AR con flutamide veicolata in olio. L'allestimento di un controllo di trattamento con solo veicolo ha consentito di discriminare con chiarezza l'effetto indotto dalla flutamide rispetto all'attività pro-infiammatoria dell'olio. Mediante l'impiego del kit CBA, è stata definita l'espressione di citochine infiammatorie e antinfiammatorie nelle popolazioni epatiche dissociate e trattate o meno con flutamide. I risultati di tale studio hanno permesso di caratterizzare la risposta linfocitaria e macrofagica secondo il criterio binario di Th1/Th2 e M1/M2.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Modello animale

Gli esperimenti sono stati condotti nel rispetto delle normative vigenti (L. 116/92) presso lo stabulario del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova. Hanno previsto l'impiego di 77 topi Balb/c maschi e femmine, di otto settimane e del peso di 23-18 g. Per tutta la durata della sperimentazione gli animali, hanno avuto libero accesso a cibo ed acqua e sono stati mantenuti a 25°C, con un ciclo di luce/buio di 12 ore.

3.2. Induzione del danno epatico acuto

Il modello di danno epatico acuto è stato allestito somministrando agli animali maschi e femmine una dose singola di tetracloruro di carbonio (CCl₄) (0,75 ml/Kg) (Sigma-Aldrich) per via intraperitoneale (i.p.). Allo scopo di verificare il coinvolgimento degli ormoni sessuali nella risposta al danno acuto, un gruppo di animali, dopo 48 ore dalla somministrazione di CCl₄, è stato sottoposto al trattamento con un inibitore di AR. In particolare, i topi maschi e femmine sono stati sottoposti a somministrazioni giornaliere (i.p.) di flutamide (Sigma-Aldrich) (50 mg/Kg) preparata in 0,1 ml di olio di girasole (Sigma-Aldrich). In parallelo, un ugual numero di campioni è stato trattato solo con olio per definire l'effetto specifico della flutamide rispetto al suo veicolo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. Ad intervalli di 3 (T3gg), 5 (T5gg) e 8 (T8gg) giorni dall'induzione del danno (Fig. 3.1), i topi sono stati soppressi per dislocazione cervicale ed il fegato è stato prelevato per l'analisi istologica, lo studio dell'immunofenotipo e delle citochine. In particolare, da ciascun fegato un lobo è stato prelevato, conservato in una soluzione di formalina al 4% e poi incluso in paraffina. La restante parte è stata sottoposta a digestione enzimatica e le cellule dissociate sono state utilizzate per l'identificazione, mediante citofluorimetria, di a) marcatori della linea monocitica/macrofagica e linfocitaria; b) citochine espresse. In parallelo, gli animali sani non trattati con CCl₄ sono stati usati come riferimento per i gruppi sperimentali allestiti, i cui acronimi per i topi maschi (M) e femmine (F) sono di seguito riportati:

MC e FC (animali di controllo, non trattati con CCl₄);

MD e FD (animali trattati con CCl₄)

MF e FF (animali trattati con CCl₄ e flutamide)

MV e FV (animali trattati con CCl_4 e veicolo).

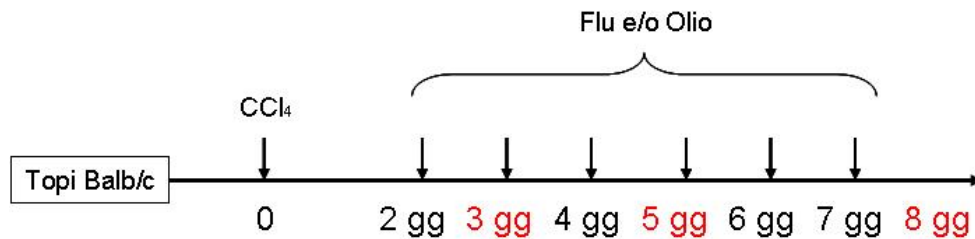


Figura. 3.1. Schema generale dell'esperimento condotto. Induzione del danno epatico con una singola somministrazione di CCl_4 . Le frecce nere indicano le somministrazioni di CCl_4 , flutamide e veicolo. In rosso sono riportati i giorni in cui è stato eseguito il sacrificio degli animali (T3gg, T5gg, T8gg)

3.3. Analisi istologica

Dopo fissaggio per una notte con una soluzione acquosa di formalina al 4%, i campioni sono stati risciacquati in acqua distillata e poi disidratati mediante passaggi successivi in soluzioni di etanolo a concentrazioni ascendenti. In particolare, è stato effettuato un passaggio della durata ciascuno di due ore in etanolo al 70%, al 80%, al 90%, un passaggio over-night in etanolo al 95% e un passaggio finale in etanolo al 100%. Dopo diafanizzazione mediante una soluzione di xilene ed etanolo assoluto (1:1, v/v) per un'ora, i campioni sono stati trattati per un'ora con xilene. Dopo incubazione per due ore in paraffina a 58°C , ogni campione è stato incluso e lasciato raffreddare a temperatura ambiente. Dopo 24h, sezioni di $5\ \mu\text{m}$ di spessore sono state preparate mediante taglio con microtomo e posizionate su vetrini portaoggetti a carica positiva SuperFrost® Ultra Plus (Thermo Scientific). L'indagine istologica è stata eseguita mediante la colorazione di ematossilina-eosina (Merck KGaA). Le sezioni sono state preventivamente deparaffinate con xilene per 15 minuti e poi idratate tramite passaggi consecutivi in una scala discendente di etanolo assoluto, un passaggio di 5 minuti in acqua distillata ed uno finale di 10 minuti in acqua distillata. Dopo incubazione di 30 secondi in ematossilina, le sezioni sono state risciacquate rapidamente in acqua distillata e poi immerse in acqua di fonte per 15 minuti. Al contrasto nucleare con eosina per 15 secondi e lavaggio con acqua distillata, è seguita una disidratazione rapida in soluzioni acquose di etanolo al 80%, 95%, 100% e xilene. I vetrini sono stati montati con il Bio Mount (Bio Optica) e le immagini sono state poi acquisite con il microscopio ottico Leitz DMIRB (Leica). Per ogni campione, è stata eseguita l'analisi di quattro sezioni e di ciascuna di queste sono state acquisite le immagini di quattro campi scelti in modo casuale. L'entità del danno è

stata definita in modo semiquantitativo mediante l'osservazione dei campioni da parte di due operatori diversi ed assumendo come riferimento il campione sano. In particolare, come riportato in Tabella 3.1, è stata definita in modo arbitrario una scala di valutazione (0-5), dove il punteggio minimo corrisponde all'assenza di danno mentre il valore massimo di 5 è indicativo di una condizione di necrosi coagulativa estesa.

PUNTEGGIO	DESCRIZIONE
0	Nessun danno
1	Infiltrato infiammatorio lieve
2	Alcune cellule parenchimali alterate in zone limitate e/o citolisi residua
3	Infiltrato infiammatorio importante associato ad attivazione cellule infiammatorie endogene e/o citolisi estesa
4	Necrosi localizzata
5	Necrosi coagulativa estesa

Tabella 3.1. Scala di valutazione istologica del danno epatico acuto

3.4. Studio dell'immunofenotipo

La caratterizzazione delle popolazioni di linea monocitica/macrofagica o linfocitaria, che “orchestrano” la risposta al danno epatico acuto, ha previsto a) una fase iniziale di digestione enzimatica del fegato in cellule singole; b) una fase intermedia di marcatura con anticorpi specifici coniugati direttamente o indirettamente con fluorofori; c) l'analisi mediante citometria a flusso.

a) Dissociazione delle cellule epatiche

Il tessuto epatico è stato lavato abbondantemente in soluzione fisiologica, sminuzzato e poi risospeso in una soluzione enzimatica di pronase (68,2 PUK) (Calbiochem), collagenase IV (0,062 CDU) (Invitrogen, Italy), DNAse I (3,07 U) (Worthington). La digestione è stata eseguita per 30 minuti, in bagnetto Dubnoff, sotto agitazione, a 37°C. Dopo disattivazione degli enzimi con terreno DMEM e siero bovino fetale (10%), la sospensione cellulare è stata filtrata con *cell strainer* (BD Biosciences) e poi risciacquata in PBS. La lisi di globuli rossi è stata eseguita mediante trattamento di 10 minuti con una soluzione acquosa 1X di *Lysis Buffer* (BD Biosciences). Dopo centrifugazione a

252g per 5 minuti, il pellet di ciascun campione è stato lavato con PBS e poi utilizzato per l'analisi dell'immunofenotipo e delle citochine.

b) Preparazione dei campioni per l'analisi di citofluorimetria

Le cellule sono state risospese in PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0,2% (Sigma-Aldrich). La marcatura è stata eseguita a temperatura ambiente per 15 minuti, al buio utilizzando i seguenti anticorpi primari: PE monoclonal anti-mouse F4/80 (BioLegend), APC monoclonal anti-mouse CD36 (BioLegend), FITC Rat anti-mouse CD11b (BD Biosciences), PECy7 Rat anti-mouse Ly6G e Ly6C (BD Biosciences), PerCPCy5.5 Rat anti-mouse CD4 (BD Biosciences), PECy7 Rat anti-mouse CD8a (BD Biosciences), APC Rat anti Mouse CCR2 (R&D Systems), controllo Isotipici anti Mouse IgG2b (R&D Systems). L'indagine di espressione dell'AR ha previsto la permeabilizzazione dei campioni con la soluzione Fixation and Permeabilization Buffer (BD Biosciences) per 20 minuti a 4°C e una marcatura indiretta con l'anticorpo primario rabbit anti mouse AR (Santa Cruz Biotechnology) e l'anticorpo secondario PE goat anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology). Per meglio definire l'immunofenotipo delle popolazioni di interesse, sono state allestite delle marcature multiparametriche utilizzando le combinazioni come di seguito riportato: CD11b/F4/80/Ly6GC/CCR2, CD11b/Ly6GC/AR e CD4/CD8a.

Tutti i campioni sono stati risciacquati con PBS, centrifugati a 252g per 5 minuti, risospesi in 200 µl di PBS e poi caricati su citofluorimetro FACSCanto II (BD Biosciences). L'acquisizione di tutti i campioni e l'analisi dei dati relativi allo studio multiparametrico sono state eseguite mediante il programma FACSDiva 3.2 (BD Biosciences). I risultati relativi alle analisi monoparametriche sono stati espressi come percentuali di cellule positive rispetto al campione di controllo di marcatura e sono stati ottenuti applicando la funzione statistica *Substraction* del programma di analisi Summit 4.3 (Beckman Coulter Inc). I valori ottenuti dall'analisi citofluorimetrica relativi a ciascun gruppo sperimentale, sono espressi come valore medio \pm la deviazione standard (SD) di tre animali. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test t di Student e i valori di *p* inferiore a 0,05 sono stati considerati significativi (*).

c.1) Basi teoriche della citofluorimetria

La nascita della citofluorimetria a flusso (CFM) avviene intorno agli anni '70 e determina un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche.

Inizialmente limitata alla misura di 1-2 parametri (uno per le misure fisiche e l'altro per la fluorescenza), la CFM porta subito un grande impulso allo studio del sistema immunitario, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Lo sviluppo ulteriore della citofluorimetria è stato poi dettato dalla produzione di a) anticorpi monoclonali e policlonali; b) fluorocromi; c) citometri a flusso multiparametrici.

Un punto di svolta nella CFM è stato lo sviluppo di coloranti come le ficobiliproteine, i fluorocromi naturali solubili in acqua e fluorescenti a pH neutro, coniugabili con anticorpi monoclonali con elevate rese quantiche (Figura 3.2). Le ficobiliproteine sono caratterizzate da un tetrapirrolo lineare coniugato a proteine, che, in seguito ad una transizione elettronica, origina una banda spettrale.

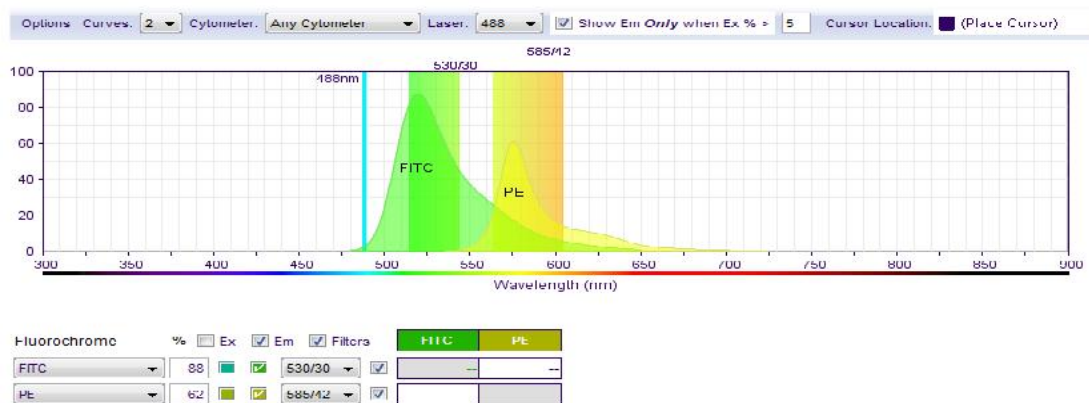


Figura 3.2. Spettro di emissione dei fluorocromi FITC e PE.

L'analisi citofluorimetrica permette di misurare caratteristiche fisiche e chimiche delle cellule o di altre particelle biologiche quali la dimensione, la granularità superficiale, il contenuto di acidi nucleici (DNA, RNA), l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche o lo stato di fosforilazione delle proteine. La misurazione viene eseguita su proprietà singole o multiple e procede ad una velocità (eventi/sec) molto rapida (300-500 eventi/sec).

c.2) Principio di funzionamento della CFM

La tecnica prevede a) la preparazione del campione nella forma di una sospensione cellulare monodispersa, b) la marcatura con anticorpo/anticorpi fluorescenti specifici, c) il caricamento in un sistema fluidico di trasporto o *sheath fluid*, d) l'eccitazione del campione nella camera di flusso mediante un fascio di luce laser focalizzata di alcune

decine di micron (Figura 3.3) ed infine e) l'analisi dei dati.

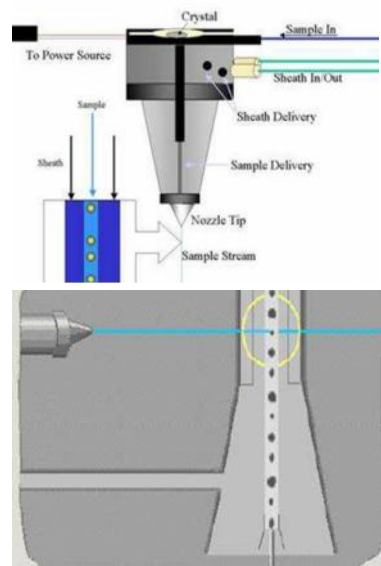


Figura 3.3. Camera di flusso e punto in cui il laser intercetta le cellule.

Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (*stream*), ogni singola cellula o particella, dopo marcatura con uno o più anticorpi fluorescenti, eccitata genera segnali relativi alle sue proprietà fisiche (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di membrana) e chimiche (presenza di specifici marcatori di membrana o intracellulari). I segnali vengono poi raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici ed inviati a specifici sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, vengono inviati ad un computer per essere digitalizzati (Figura 3.4).

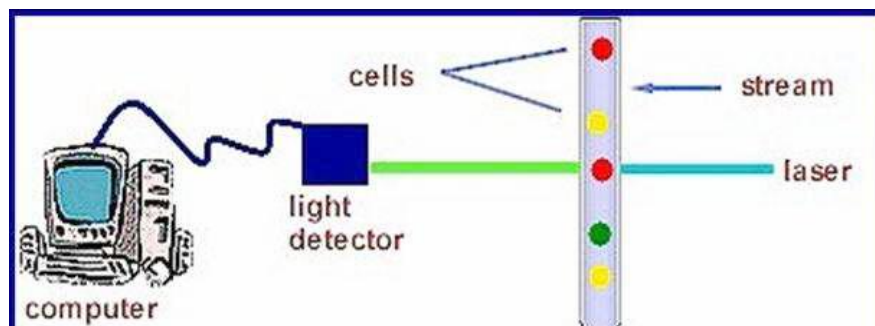


Figura 3.4 . Elementi costitutivi di un citofluorimetro.

3.5. Analisi di espressione delle citochine

I livelli di espressione delle citochine IL-2, IL-6, TNF, IFN- γ , IL-4 e IL-10 negli estratti proteici delle popolazioni epatiche dissociate sono stati misurati mediante citofluorimetria utilizzando il kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences). Le proteine sono state estratte trattando i campioni cellulari per 5 minuti in ghiaccio con 0,5 ml di Ripa buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) supplementato con *protease inhibitor cocktail* (Sigma-Aldrich). Dopo sonicazione mediante bagnetto US2000 (Vetrotecnica) per 5 minuti, i lisati cellulari sono stati centrifugati a 16000 g, per 10 minuti, a 4°C. I surnatanti contenenti la frazione proteica sono stati prelevati ed utilizzati per l'analisi delle citochine. La metodica del CBA si basa sul principio di marcatura a *sandwich* dei test ELISA e sull'impiego di biglie marcate con fluoroforo PE, che emettono per ciascuna citochina target un livello discreto di fluorescenza, e biglie condizionate con anticorpo specifico per la citochina d'interesse (Figura 3.5). In parallelo, controlli interni (standard) sono allestiti per definire i valori di fluorescenza di riferimento. In particolare, il kit impiegato ha consentito l'indagine quantitativa di IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ . I dati quantitativi espressi in pg/ μ l, sono corrispondenti alla fluorescenza media emessa nel canale 585 \pm 42 nm. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il programma FCAP Array v3 (BD Biosciences).

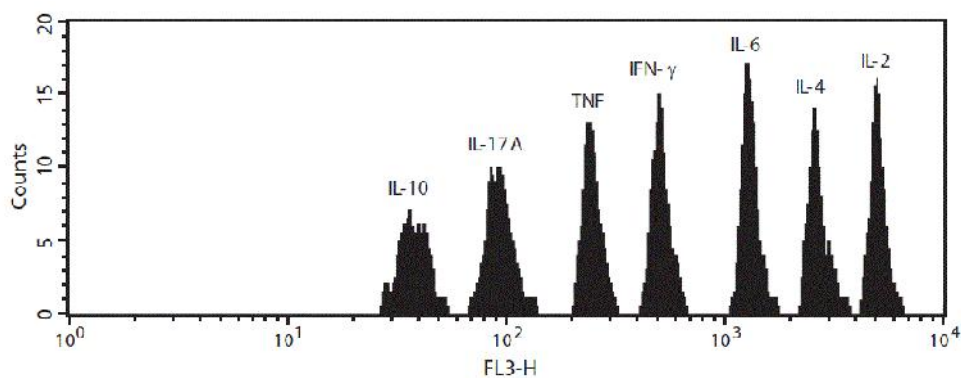


Figura 3.5. Intensità di fluorescenza delle biglie di citochine.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Analisi istologica

Negli ultimi decenni, numerosi studi hanno evidenziato il coinvolgimento degli ormoni steroidei sessuali e dei relativi recettori nel processo d'infiammazione, imputando un ruolo anti-infiammatorio agli estrogeni e un'attività pro-infiammatoria agli androgeni e dimostrando, in tal modo, un dimorfismo immunitario tra i due sessi (*Yokoyama et al., 2005*). E' altresì noto che nell'essere umano il danno epatico, conseguente sia a stati patologici che ad esposizione a sostanze epatotossiche, può avere delle conseguenze molto diverse nel maschio e nella femmina (*Shimizu, 2003*). In questo studio, è stato utilizzato un modello murino, nel quale è stato indotto, mediante somministrazione intraperitoneale di CCl₄, un danno epatico acuto che viene risolto nell'arco di circa 10 giorni grazie alla capacità rigenerativa dell'organo. Alcuni tipi di danno tissutale, come per esempio nel modello animale con induzione con CCl₄, determinano il rilascio in circolo di chemochine, citochine ed altri fattori solubili in grado di attivare e richiamare cellule infiammatorie a livello del sito del danno. Secondo studi già condotti, la necrosi epatica instaurata somministrando 0,75 ml/Kg di CCl₄, dovrebbe evidenziarsi a livello delle aree centro lobulari entro le ventiquattro ore (*Basu, 2003*).

I dati relativi alla sopravvivenza hanno evidenziato una maggiore sensibilità al trattamento negli animali maschi rispetto alle femmine: infatti, prima della fine della sperimentazione, la percentuale di decessi era pari all'11.4 % nelle femmine, contro il 23.8 % nei maschi.

Tale osservazione è stata confermata dall'analisi istologica effettuata dopo 3, 5 e 8 giorni (T3gg, T5gg, T8gg) dall'induzione del danno. Rispetto agli animali di controllo non trattati (figura 4.1), le sezioni relative agli animali maschi presentavano, dopo T3gg dalla somministrazione di CCl₄, vaste aree necrotiche a livello sia della zona centro-lobulare che degli spazi portali, dilatazione dei sinusoidi e piccole ma diffuse aree emorragiche (figura 4.2). Il grado di necrosi, valutato da 2 operatori distinti secondo una scala da 1 a 5, è stato giudicato pari a 5 ed è disceso a valori pari a 3 dopo T5gg dall'induzione del danno. Infatti, si osservava una diminuzione dell'ampiezza delle aree necrotiche, al cui interno era evidente una maggiore presenza di infiltrato infiammatorio, costituito prevalentemente da macrofagi. A T8gg, quest'ultimo permaneva a livello del parenchima e delle zone centro-lobulari, ma il danno appariva

quasi completamente recuperato (punteggio 1-2). Anche nel gruppo di animali femmina (figura 4.3) sono state osservate modifiche strutturali analoghe a quanto evidenziato negli animali maschi in seguito a danno indotto con CCl₄. Tuttavia, le aree necrotiche apparivano di dimensioni minori a T3gg (punteggio 4). Inoltre, allo stesso time point, si osservava una maggiore presenza di macrofagi esclusivamente in prossimità delle zone centro lobulari. Analogamente a quanto evidenziato nel gruppo dei maschi, a T8gg si raggiungeva una completa rigenerazione. Al fine di verificare un possibile coinvolgimento degli androgeni nei processi epatici di rigenerazione, dopo 48 ore dall'induzione del danno con CCl₄ altri gruppi di animali hanno ricevuto, sempre per via intraperitoneale, la flutamide, un inibitore degli androgeni. Parallelamente, altri animali sono stati trattati con solo olio, usato come veicolo per la flutamide. Nei gruppo di animali maschi (figura 4.2), trattati con l'inibitore degli androgeni, è stata osservata, a T3gg dall'induzione del danno, una minore estensione delle aree necrotiche (punteggio 4). Tuttavia, a T8gg la necrosi, seppur limitata, era ancora presente (punteggio 2), non solo nel gruppo trattato con flutamide ma anche in quello che aveva ricevuto il solo veicolo. E' ipotizzabile che la somministrazione quotidiana di olio possa innescare una reazione infiammatoria, in grado di ostacolare i processi rigenerativi endogeni. In questo gruppo di animali, come parzialmente atteso, è stato riscontrato un quadro istologico compatibile con la steatosi. Analogamente a quanto osservato negli animali trattati con CCl₄ l'infiltrato infiammatorio era presente sia nel parenchima che in prossimità delle vene centro-lobulari. La somministrazione di flutamide agli animali femmine (figura 4.3) non modificava il quadro istologico rispetto a quanto osservato nel gruppo nel quale era stato indotto il solo danno.

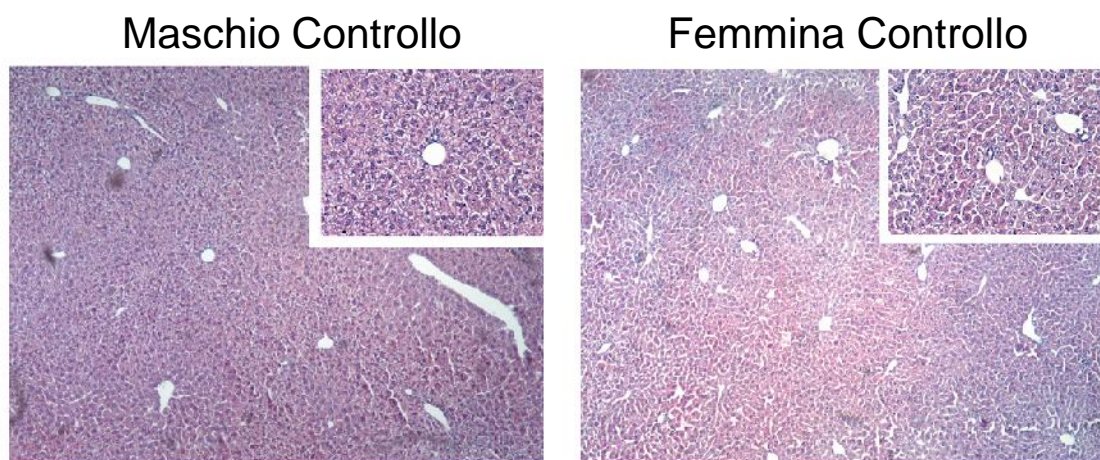


Figura 4.1. Sezioni di fegato colorate con ematossilina/eosina (E/Eo). Ingrandimento x50, nel riquadro ingrandimento x 200.

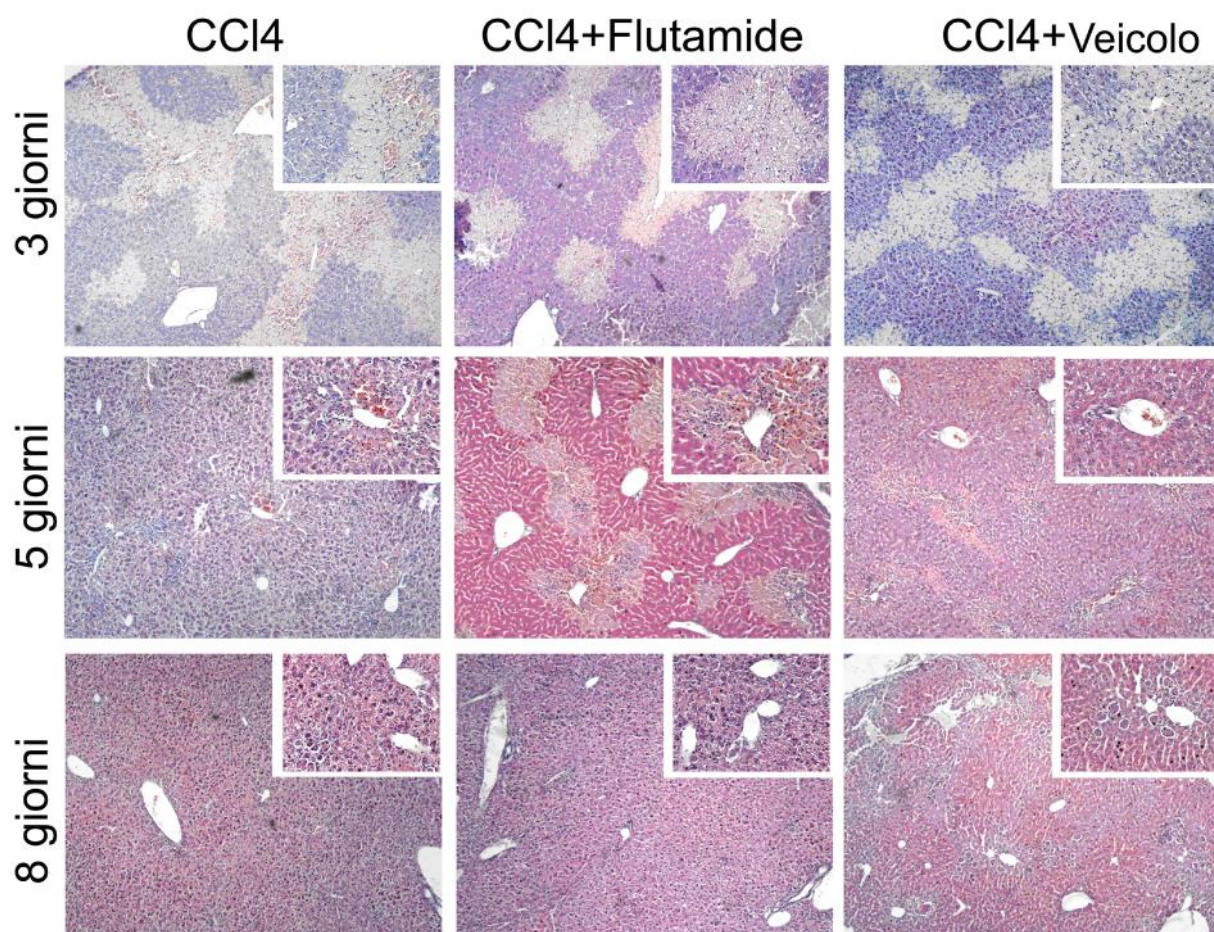


Figura 4.2. Sezioni di fegato colorate con ematossilina/eosina (E/Eo). Animali maschi sacrificati a T3-5-8gg dall'induzione del danno e con somministrazioni di flutamide e/o olio. Ingrandimento x50, nel riquadro ingrandimento x200.

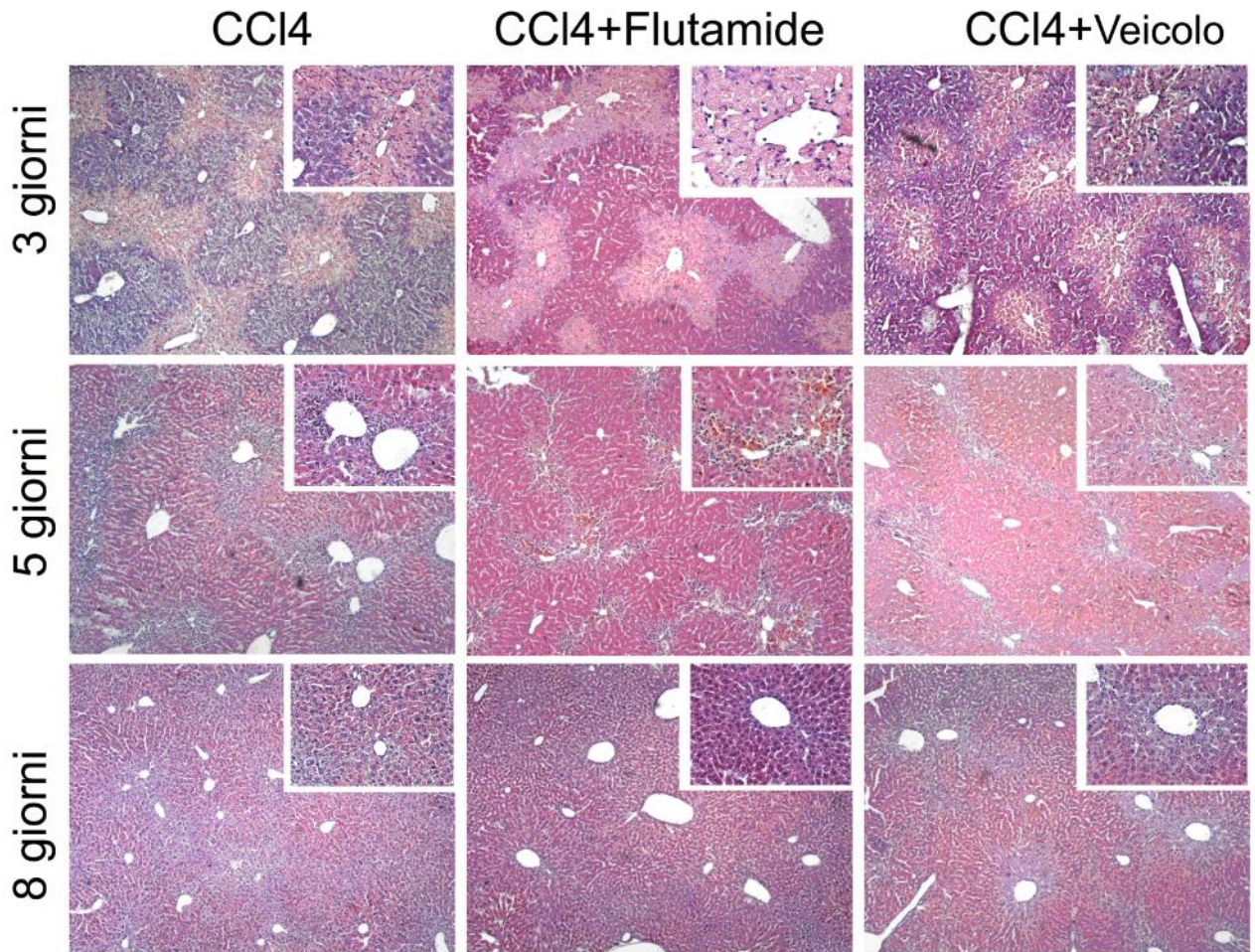


Figura 4.3. Sezioni di fegato colorate con ematossilina/eosina (E/Eo). Animali femmina sacrificati a T3-5-8gg dall'induzione del danno e con somministrazioni di flutamide e/o olio. Ingrandimento x50, nel riquadro ingrandimento x200.

4.2. Analisi di citofluorimetria

E' noto che la risoluzione del danno epatico acuto è un processo complesso in cui i macrofagi intervengono durante le fasi di inizio, sviluppo e progressione del danno controllando, rispettivamente, l'infiammazione, la proliferazione cellulare ed il rimodellamento tessutale.

In particolare, reclutati in fase precoce nei siti infiammatori, i monociti/macrofagi promuovono la fagocitosi delle cellule necrotiche e la secrezione di citochine proinfiammatorie e di fattori di crescita (*Duffield et al., 2003*). In fase tardiva, invece, essi contribuiscono al rimodellamento epatico e al ripristino della funzionalità epatica (*Duffield et al., 2003*). E' stato dimostrato che la fase precoce e quella tardiva del danno epatico acuto sono sotto il controllo di due sottopopolazioni di origine mieloide che si caratterizzano per specifiche proprietà funzionali e fenotipiche (*Ramachandran et al., 2009*). I monociti circolanti sono comunemente definiti "classici" e "non classici" sulla base delle loro proprietà migratorie, differenziative ed immunofenotipiche. Nell'uomo, il citotipo classico è del tipo $CD14^+$, $CCR2^+$ e $CD16^-$ mentre quello non classico risulta includere cellule $CD14^{low}$ $CCR2^-$ $CD16^+$. Nel modello murino, tali immunofenotipi corrispondono, rispettivamente, alle sottopopolazioni $CCR2^+$ $Gr-1^{high}$ e $CCR2^-$ $Gr-1^{low}$. Da un punto di vista funzionale, essi corrispondono, rispettivamente, ai monociti di tipo *infiammatorio* e di tipo *antinfiammatorio* o *riparativo* (*Ramachandran et al., 2009*) poiché le cellule $Gr-1^{high}$ sono reclutate precocemente nei siti di infiammazione dove svolgono un'attività pro-infiammatoria mentre i monociti $Gr-1^{low}$ agiscono come cellule "sentinella" a livello periferico, garantendo la sorveglianza tessutale ed il continuo rifornimento di macrofagi residenti e di cellule dendritiche. Il controllo della proliferazione e del differenziamento delle popolazioni $Gr-1^{high}$ è riconosciuto essenziale per la risoluzione del processo infiammatorio (*Lin et al., 2009; Nahrendorf et al., 2007; Arnold et al., 2007; Movahed et al., 2010*) o per lo sviluppo della fibrosi epatica (*Karlmarm et al., 2009*). Ramachandran e collaboratori (2012) hanno dimostrato che tale sottopopolazione, sotto l'influenza del microambiente epatico, subisce un cambiamento fenotipico e, convertendosi nel citotipo $Gr-1^{low}$, partecipa alla soppressione della fibrinogenesi mediante la specifica produzione delle metalloproteinasi MMP9, MMP12 e del fattore di crescita IGF-1.

Dati clinici e sperimentali suggeriscono che la guarigione di ferite o danni tessutali (*Lai et al., 2009; Kan et al., 2008*) sono più lenti e difficili nei maschi a causa di una regolazione da parte degli ormoni sessuali sull'espressione di mediatori

dell'infiammazione o di specifici recettori nella popolazione immunoreattiva. In particolare, studi in modelli animali o casi clinici hanno dimostrato che gli estrogeni attraverso il recettore specifico di tipo α (ER- α) esercitano un'azione protettiva nei confronti di patologie croniche quali la cirrosi epatica ed il carcinoma epatocellulare (Becker *et al.*, 1996). Poiché il ruolo del recettore degli androgeni nella risposta al danno epatico acuto è stato solo parzialmente caratterizzato (Huang *et al.*, 2012), in questa tesi, mediante un articolato studio di citofluorimetria, è stato definito il coinvolgimento di AR nella risposta di topi maschi e femmine Balb/c al danno indotto con CCl₄.

Tabella 4.1. Livelli di espressione basale di marcatori di linea mieloide, linfoide e del recettore AR in animali femmine (FC) e maschi (MC). I dati sono stati normalizzati rispetto al controllo di marcatura e sono espressi come valore medio di fluorescenza (MIF)± deviazione standard (SD). Significatività statistica calcolata mediante il test t di Student e i valori di p inferiore a 0,05 sono stati considerati significativi (*).								
Campione	CD11b (MIF±SD)	F4/80 (MIF±SD)	Gr-1* (MIF±SD)	CCR2 (MIF±SD)	CD36* (MIF±SD)	CD4* (MIF±SD)	CD8a (MIF±SD)	AR* (MIF±SD)
FC	2.55±0.20	54.49±5.89	35.60±3.53	60.90±7.56	87.83±1.73	71.21±1.71	2.76±0.34	42.43±3.44
MC	4.65±1.04	58.77±15.71	13.84±1.88	63.32±8.95	40.84±6.94	85.70±0.99	1.87±0.19	73.57±2.02

Come riportato in Tabella 4.1, nel fegato di topi femmine Balb/c in condizioni basali è stata osservata una maggiore espressione degli antigeni Gr-1 e CD36 mentre, nel maschio, è stata rilevata una maggiore presenza del recettore AR e del CD4. Il maggior numero di cellule residenti Gr-1 nel fegato dei topi femmine suggerisce una linea di difesa superiore per contrastare il danno del parenchima.

L'alta espressione dei marcatori CD36 e CD4 è da correlare alla specifica attivazione da parte dell'IL-6, attraverso il recettore IL-6R, dei linfociti CD4+ (Zola *et al.*, 1992) e delle cellule di Kupffer (Bilzer *et al.*, 2006) coesprimenti il CD36, una proteina di membrana coinvolta nel trasporto di acidi grassi di lunga catena (Malerod *et al.*, 2002).

Liva e collaboratori (2001) hanno dimostrato che il testosterone esplica un effetto immunomodulatorio agendo sui linfociti CD4+ attraverso l'AR. La maggiore espressione di CD4+ nel maschio è da interpretare come un effetto specifico induttivo degli androgeni sui linfociti.

Sebbene gli stati di attivazione dei monociti siano comunemente caratterizzati come M1 e M2 (Mantovani *et al.*, 2004), la loro reattività nel danno epatico è altamente eterogenea e non è definibile mediante un criterio di semplice classificazione binaria

(*Mosser et al., 2008*). Il reclutamento di popolazioni cellulari immunitarie e la polarizzazione dei monociti/macrofagi sono processi fortemente controllati dalle citochine e dai fattori di crescita del microambiente epatico, quali il TNF- α , secreto soprattutto dai macrofagi, dagli epatociti e da altre cellule immunitarie (*Hassan et al., 2007*) e l'INF- γ , una citochina pro-infiammatoria rilasciata da macrofagi, cellule T-CCR2 dipendenti e cellule NKT (*Hogaboam et al., 2000; Dambach et al., 2002*). Il coinvolgimento dei monociti infiammatori Gr1^{high} si è dimostrato critico durante gli stadi infiammatori (*Duffiel, et al., 2003*) ed il loro alterato reclutamento o la loro mancata soppressione si correla a condizioni patologiche. L'assenza del segnale dell'INF- γ nei topi *Knock-out* o neutralizzati con specifici inibitori ha dimostrato di esercitare un effetto protettivo nei confronti del danno epatico acuto (*Dong et al., 2005*), probabilmente, perché interferisce con l'asse chemochinico CXCL9-11/CXCR3 e quindi con l'infiltrazione delle cellule T.

Data la dipendenza del reclutamento dei macrofagi dall'asse CCL2/CCR2, molti gruppi di ricerca hanno verificato la sua rilevanza in studi specifici di deplezione. Sebbene il ruolo dei macrofagi CCR2+ sembri svolgere un effetto protettivo nei confronti del danno epatico acuto, risulta ancora da chiarire il ruolo effettivo della chemochina CCL2 (*Laskin et al., 1995; Michael et al., 1999; Hogaboam et al., 2000; Dambach et al., 2002; Ju et al., 2002; Holt et al., 2008; Karlmark et al., 2009*) indipendentemente dal metodo di deplezione macrofagica, dalla modalità di induzione del danno ed infine dall'estensione del danno epatico. Il CCL2 è essenziale per l'infiltrazione monocitica e la produzione di citochine pro-infiammatorie a livello epatico. Nei modelli murini di danno acuto e di fibrosi epatica sono stati dimostrati due flussi di infiltrazione di cellule mieloidi che intervengono nella progressione (CCL2-dipendente) (*Antoniades et al., 2012*) e nella regressione (CCL2-indipendente) (*Duffield et al., 2003*) del danno.

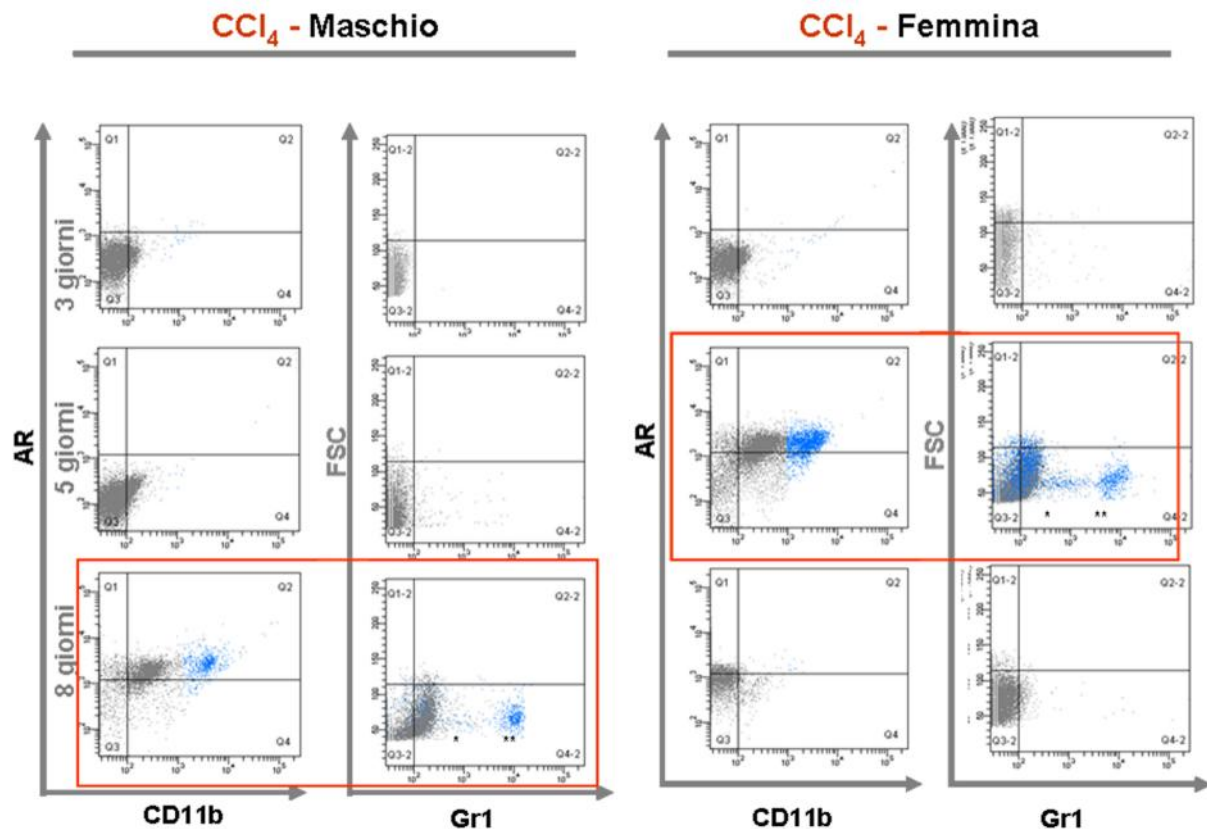


Figura 4.4. Analisi multiparametrica tramite citofluorimetria dell'espressione di Gr1^{low} (*) e Gr1^{high} (***) nelle popolazioni epatiche isolate dal fegato di topi Balb/c (maschi e femmine). Mediante l'impostazione di un gate sulla popolazione CD11b^{high} è stata rilevata la coespressione (evidenziata in blu) di AR e Gr-1. In grigio è riportata la popolazione contenente le cellule CD11b⁻ e CD11b^{low}. All'espressione di Gr1^{high} è risultata associata la presenza di CCR2 (dati non mostrati). Il livello di espressione negli animali trattati con CCl4, flutamide o solo veicolo è stato definito assumendo come riferimento quello degli animali non trattati con CCl4. I dati sono stati confermati eseguendo tre repliche per ciascun gruppo di animali (maschi e femmine) ai tempi di T3gg, T5gg, T8gg

In questo lavoro di tesi, nei topi Balb/c maschi e femmine è stato dimostrato che i monociti circolanti Gr-1^{high} mediano la risposta infiammatoria del danno indotto con CCl₄ e sono sotto il controllo di CCR2 e dell'AR (Figura 4.4). Mediante uno studio multiparametrico di citofluorimetria, le cellule mieloidi ad attività infiammatoria sono state caratterizzate in funzione del basso valore di FSC e dell'immunofenotipo CD11b^{high} CCR2⁺ (dati non riportati) AR⁺. L'identificazione di tale sottopopolazione nel fegato di maschi al tempo T8gg e delle femmine a T5gg ha suggerito una diversa regolazione del loro *homing* da parte degli ormoni sessuali. In particolare, il più precoce reclutamento di tale popolazione nelle femmine (FD) rispetto ai maschi (MD) sembra essere determinato da un maggiore livello di espressione dell'IL-6 che, stimolando un superiore rilascio di CCL2 a livello epatico, garantisce un più forte stimolo chemotattico per le popolazioni mieloidi CCR2⁺. Isse e collaboratori (2010) hanno dimostrato che i livelli superiori di IL-6 nel fegato di animali femmine sono dovuti

all'effetto mediato dagli estrogeni, attraverso il recettore ER- α , sulle cellule epiteliali biliari. Nel maschio, inoltre, la fase infiammatoria sembra rispondere ad una regolazione da parte degli ormoni sessuali attraverso il recettore AR. Tale evidenza è stata confermata eseguendo l'esperimento di inibizione dell'AR mediante trattamento con flutamide (Figura 4.5).

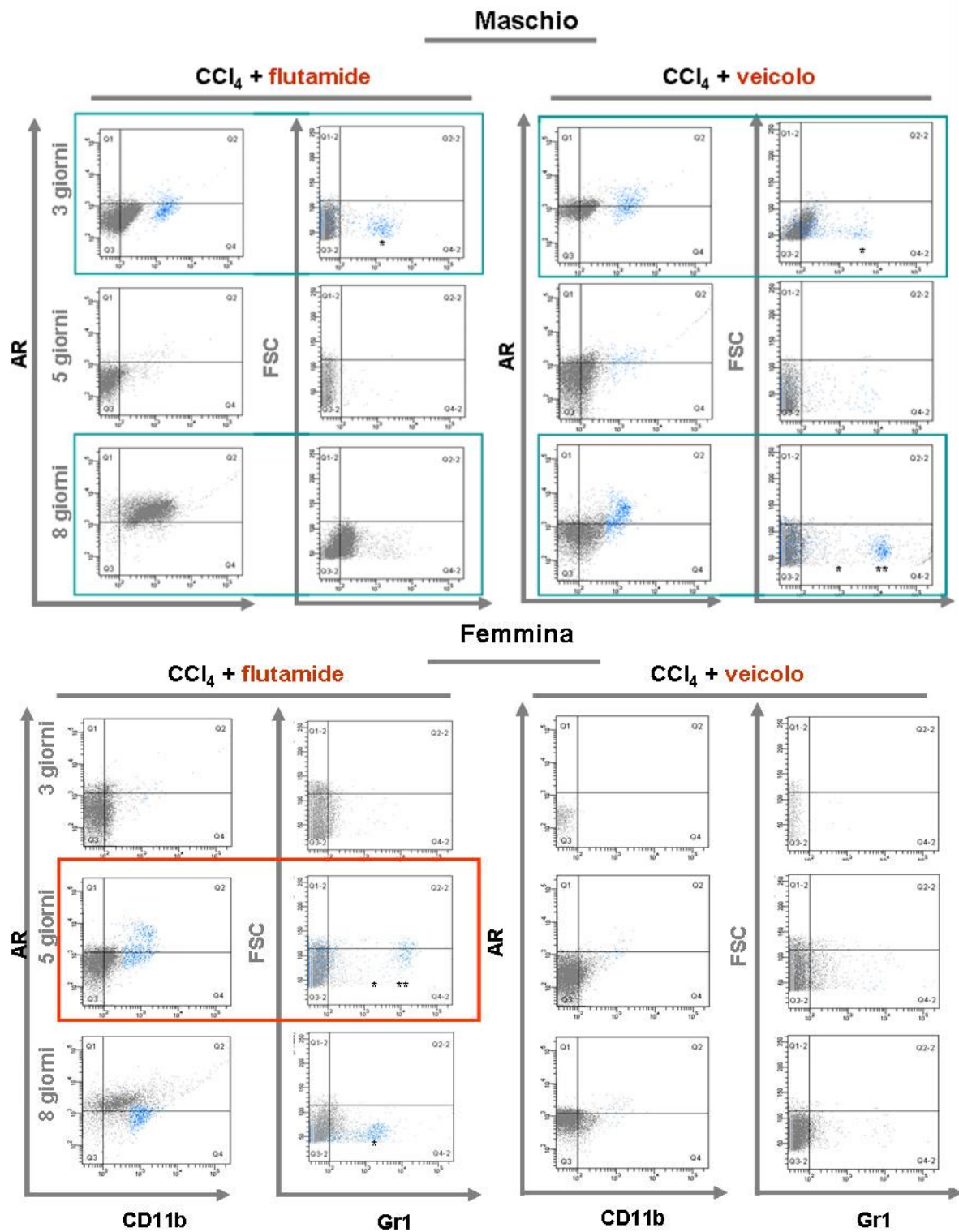


Figura 4.5. Analisi multiparametrica tramite citofluorimetria della coespressione (evidenziata in blu) di AR e Gr1^{low} (*) e Gr1^{high} (***) nelle popolazioni estratte dal fegato di animali Balb/c (maschi e femmine) indotti con CCl₄ e poi trattati con flutamide o solo veicolo. Mediante l'impostazione di un gate sulla popolazione CD11b^{high} è stata rilevata la coespressione (evidenziata in blu) di AR e Gr-1. In grigio è riportata la popolazione contenente le cellule CD11b- e CD11b^{low}. All'espressione di Gr1^{high} è risultata associata la presenza di CCR2 (dati non mostrati). Il livello di espressione negli animali trattati con CCl₄, flutamide o solo veicolo è stato definito assumendo come riferimento quello degli animali non trattati con CCl₄. I dati sono stati confermati eseguendo tre repliche per ciascun gruppo di animali (maschi e femmine) ai tempi di T3gg, T5gg, T8gg

Nelle femmine (FF) la flutamide ha dimostrato di non alterare il tempo di reclutamento delle cellule Gr1^{high} osservato nei campioni FD a T5gg. Al contrario, nei maschi (MF), la mancata identificazione al tempo T8gg delle cellule CD11b^{high} CCR2⁺ AR⁺ ha suggerito un annullamento del loro reclutamento a livello epatico (Figura 4.5). Inoltre, tale effetto è risultato di tipo specifico e non dipendente dalla somministrazione del veicolo, poichè nei campioni trattati con CCl₄ e olio (MV, FV) la presenza dei monociti infiammatori circolanti è stata regolarmente identificata al T8gg (MV) e T5gg (FV).

Lo studio eseguito ha, inoltre, consentito di verificare che il ritardato reclutamento delle cellule Gr-1 si traduce nel maschio in uno stato infiammatorio di grado maggiore. Tali risultati sono in accordo con le evidenze sperimentali che suggeriscono che il blocco del CCR2 mediante siero neutralizzante determina un'epatite di tipo grave caratterizzata da a) livelli ridotti di TNF- α e INF- ; b) un'alta espressione di IL-4, condizione che si correla con una risposta linfocitaria di tipo Th2.

L'olio utilizzato come veicolo ha dimostrato di alterare il microambiente infiammatorio epatico senza però interferire con il reclutamento delle popolazioni mieloidi circolanti. Tale risultato è in linea con le evidenze riportate in letteratura che dimostrano un effetto pro-infiammatorio indotto dalla somministrazione dell'olio (*Hennig et al., 2005*).

L'azione delle cellule Gr1+CD11b+ a livello epatico è di tipo immunomodulatorio in ragione di uno specifico effetto soppressivo nei confronti della proliferazione di cellule T CD8⁺ e della produzione di INF- nei siti infiammatori. E' stato dimostrato che le cellule mieloidi acquisiscono la funzione soppressiva solo dopo esposizione ai fattori presenti nel microambiente infiammatorio o tumorale quali l'INF- , i ligandi dei recettori Toll like (TLR), l'IL-13, l'IL-4 e il TGF (*Greifenberg et al., 2009*). Nella Figura 4.5 è riportata la caratterizzazione della risposta mediata dai linfociti CD4⁺ e CD8a⁺ nel modello di danno epatico acuto indotto con CCl₄. Nel fegato degli animali femmina FD, al tempo T3gg, la risposta linfocitaria è mediata solo dalle cellule CD4⁺ mentre la presenza dei linfociti CD8a⁺ è bassa o trascurabile. Ai tempi successivi, la reattività delle cellule CD4⁺ si riduce, come dimostrato dalla diminuzione dell'intensità di fluorescenza, mentre aumenta progressivamente la componente CD8a da T5gg a T8gg. Tali risultati suggeriscono che a T8gg nella femmina è attiva la fase di rimodellamento mediata da cellule linfocitarie ad attività fagocitaria. Poiché il trattamento con flutamide (FF) ha dimostrato a T5gg un'inibizione delle cellule CD8a rispetto al campione trattato solo con CCl₄ (FD) ma non rispetto a quello trattato con il veicolo (FV), l'effetto soppressivo è da ritenersi secondario alla somministrazione

dell'olio (veicolo). Al contrario, nel maschio (MD) è stata osservata una risposta linfocitaria di tipo CD4+ a tutti i tempi di analisi. Il trattamento con flutamide (MF) o con solo veicolo (MV) ha determinato una stimolazione delle cellule CD4+, come dimostrato dall'incremento della fluorescenza media osservata ai tempi T5gg e T8gg, mentre una debole reattività a carico della popolazione CD8a+ è stata osservata a T8gg. L'effetto indotto sulle popolazioni linfocitarie è in parte dipendente dalla regolazione dell'AR poiché tale recettore risulta espresso su tutte le cellule della risposta immunitaria ed in parte dalle citochine che caratterizzano il microambiente epatico del maschio e della femmina.

CAMPIONE	IL-10 (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	TNF- γ (pg/mL)	INF- γ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
MD 3GG	10,12 \pm 1,2	0,94 \pm 0,09	43,14 \pm 2,12	1,67 \pm 0,12	7,97 \pm 0,52	0,00	0,70 \pm 0,11
FD 3GG	7,46 \pm 0,89	0,42 \pm 0,09	7,44 \pm 0,75	0,64 \pm 0,14	0,59 \pm 0,13	0,30 \pm 0,07	0,35 \pm 0,09
MV 3GG	6,94 \pm 1,01	0,07 \pm 0,01	6,80 \pm 0,56	0,70 \pm 0,12	7,33 \pm 0,89	0,00	0,00
FV 3GG	3,38 \pm 0,58	0,00	120,51 \pm 5,62	0,09 \pm 0,04	4,61 \pm 0,98	0,00	0,00
MF 3GG	7,46 \pm 1,13	0,53 \pm 0,11	46,53 \pm 2,32	1,60 \pm 0,26	6,61 \pm 0,52	0,00	1,22 \pm 0,23
FF 3GG	5,39 \pm 0,56	0,00	82,73 \pm 1,56	0,00	2,59 \pm 0,89	0,00	0,20 \pm 0,08
MD 5GG	5,99 \pm 0,45	0,97 \pm 0,12	46,57 \pm 1,54	0,89 \pm 0,19	5,57 \pm 0,45	0,69 \pm 0,13	1,85 \pm 0,23
FD 5GG	0,00	2,22 \pm 0,27	31,40 \pm 2,31	0,97 \pm 0,11	5,36 \pm 0,52	0,00	3,28 \pm 0,31
MV 5GG	6,86 \pm 0,98	1,04 \pm 0,14	16,21 \pm 1,35	1,55 \pm 0,24	7,16 \pm 0,58	1,21 \pm 0,11	2,25 \pm 0,32
FV 5GG	0,00	0,10 \pm 0,02	15,76 \pm 1,05	0,00	4,40 \pm 0,57	0,00	1,96 \pm 0,23
MF 5GG	0,00	1,51 \pm 0,21	87,04 \pm 2,35	0,38 \pm 0,11	44,05 \pm 2,32	0,55 \pm 0,14	0,41 \pm 0,09
FF 5GG	0,00	1,28 \pm 0,11	19,20 \pm 1,25	0,29 \pm 0,12	5,36 \pm 0,63	0,00	0,41 \pm 0,11
MD 8GG	8,51 \pm 0,89	0,00	5,11 \pm 0,36	0,77 \pm 0,14	2,69 \pm 0,23	0,00	0,00
FD 8GG	6,42 \pm 0,56	0,42 \pm 0,11	0,00	0,09 \pm 0,02	1,52 \pm 0,23	0,00	0,45 \pm 0,09
MV 8GG	2,38 \pm 0,36	0,18 \pm 0,08	24,64 \pm 1,23	0,30 \pm 0,09	6,33 \pm 0,23	0,00	0,91 \pm 0,14
FV 8GG	15,66 \pm 1,25	0,00	12,19 \pm 2,13	0,01 \pm 0,01	9,79 \pm 0,89	0,00	0,00
MF 8GG	7,46 \pm 0,54	0,77 \pm 0,21	5,53 \pm 0,62	1,54 \pm 0,47	3,88 \pm 0,68	0,00	0,20 \pm 0,09
FF 8GG	1,38 \pm 0,11	0,00	1,06 \pm 0,14	0,50 \pm 0,13	2,21 \pm 0,41	0,00	0,60 \pm 0,11
MC 5GG	11,66 \pm 1,85	0,00	0,00	0,00	2,43 \pm 0,63	0,00	1,64 \pm 0,32
FC 5GG	11,66 \pm 2,11	0,65 \pm 0,14	2,86 \pm 0,21	0,00	4,30 \pm 0,22	1,08 \pm 0,19	1,75 \pm 0,34

Tabella 4.2. Analisi quantitativa dell'espressione delle citochine IL-10, IL-17A, TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 mediante citofluorimetria ed utilizzo del test CBA Cytometric Bead Assay. I risultati sono espressi come il valore medio di concentrazione (pg/mL) di due campioni replica \pm deviazione standard. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il programma FCAP Array v3.

Sebbene nei modelli di infiammazione cronica sia implicata nella risposta infiammatoria ed antinfiammatoria (Gabay, 2006), l'IL6 mostra un caratteristico profilo antinfiammatorio nell'infiammazione acuta (Xing *et al.*, 1998), stimola la crescita degli

epatociti (*Gauldie et al., 1987*), inibisce l'apoptosi epatocitaria, controlla l'attività delle NKT attraverso le cellule CD4+, previene il danno epatico indotto dalle cellule CD8+ stimolando l'espansione delle cellule mieloidi Gr1+CD11b+ (*Bunt et al., 2007*). L'abrogazione dell'effetto protettivo mediato dall'IL-6 si ha con la deplezione delle cellule Gr1+ e, conseguentemente, con la mancata infiltrazione leucocitaria (*Cheng et al., 2011*).

La risposta immunitaria mediata dalle cellule T gioca un ruolo essenziale nella patogenesi dei disordini epatici (*Kita et al., 2001; Heneghan and McFarlane, 2002*). L'azione delle cellule T nel fegato si realizza attraverso il rilascio di citochine che agiscono sulle cellule epatiche e sulle cellule immunitarie (*Leonard and O'Shea, 1998*). Le cellule T sono distinte in Th1, Th2 e Th17 sulla base della specifica produzione di citochine e dell'espressione di fattori di trascrizione. In particolare, i Th1 richiedono il T-box (T-bet) mentre i Th2 sono caratterizzati dal dominio GATA-3 e producono IL-4, IL-5 e IL-13. Il recettore γ (ROR- γ) è indispensabile per il differenziamento dei Th17, che sono linfociti secernenti l'IL-17 e l'IL-22.

La somministrazione di flutamide determina una risposta immunitaria in cui si osserva una aumentata espressione di IL-4, IL-5, GATA-3 suggerendo che una risposta di tipo Th2 potrebbe essere coinvolta nel danno da essa indotto (*Higuchi et al., 2011*). L'IL-4 gioca un ruolo importante nella risposta Th2 ed attiva STAT6 e GATA-3, che inducono IL-5 e eotassina (*Agnello et al., 2003*) che a loro volta stimolano lo sviluppo e l'accumulo di eosinofili e basofili.

Il cambiamento della sottopopolazione Gr-1^{high} in Gr-1^{low} determina la risoluzione del danno acuto in senso riparativo, se regolato, oppure in senso fibrotico, se non regolato. Mentre le cellule Gr-1^{high} sono classificabili come monociti classici di tipo M1 in funzione dell'espressione del recettore CCR2 e dell'attività pro-infiammatoria, i macrofagi Gr-1^{low} rappresentano nuovi ed intermedi fenotipi macrofagici, che non corrispondono alla classificazione classica M1/M2 poiché mostrano alti livelli di espressione di geni M2 (es. arginase 1, recettore Mrc1), M1 (es. CD16, CD32, Serpina 1) mentre controllano negativamente i geni M2 quali l'IL10 e il TGF- β .

5. Conclusioni

Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che il danno epatico acuto è dipendente da fattori fisiologici legati al sesso e all'età. Studi in modelli animali o casi clinici hanno dimostrato che gli estrogeni, attraverso il recettore specifico di tipo (ER-), esercitano un'azione protettiva nei confronti di patologie a carattere infiammatorio quali la cirrosi epatica ed il carcinoma epatocellulare. Al contrario, il ruolo degli androgeni e del recettore AR nella risposta rigenerativa epatica rimane ancora poco chiaro e risulta fortemente dipendente dal tipo di danno. In questa tesi, mediante un articolato studio di citofluorimetria, è stato definito il coinvolgimento di AR nella risposta di topi maschi e femmine Balb/c al danno indotto con CCl₄. In particolare, è stato dimostrato che le lesioni epatiche vanno incontro a risoluzione più lentamente nel maschio rispetto alla femmina ed il quadro infiammatorio che si sviluppa a livello epatico risulta di grado superiore rispetto a quello osservato nella femmina. Lo studio di inibizione di AR mediante flutamide ha consentito di definire una correlazione tra il ritardato reclutamento delle cellule mieloidi immunosoppressive e l'AR. Poiché nella femmina i livelli ematici di testosterone sono bassi e a livello epatico è garantito un livello superiore di espressione di IL-6, la rigenerazione epatica risulta essere favorita. I risultati ottenuti sono in accordo con le evidenze sperimentali che suggeriscono che una alterazione dell'asse CCR2/CCL2 determina un'epatite di tipo grave caratterizzata da livelli ridotti di TNF- e INF- ed alta espressione di IL-4, ovvero con una risposta linfocitaria di tipo Th2.

La maggiore suscettibilità al danno infiammatorio nonché il difficile recupero rigenerativo nel maschio dipendono quindi dal ritardato controllo immunosoppressivo che a livello epatico le cellule Gr1+CD11b+ riescono a garantire nei confronti delle cellule T CD8+ e della popolazione di macrofagi residenti.

6. BIBLIOGRAFIA

Agnello D., Lankford C.S., Bream J., Morinobu A., Gadina M., O'Shea J.J., Frucht D.M. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* 2003; 23: 147–161.

Antoniades C.G., Quaglia A., Taams L. S., Mitry R.R., Hussain M., Abeles R., Possamai L.A., Bruce M., Mcphail M., Starling C., Wagner B., Barnardo A., Pomplun S., Auzinger G., Bernal W., Heaton N., Vergani D., Thursz M.R., Wen don, J. Source and characterisation of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. *Hepatology.* 2012; 56(2):735-46.

Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., van Rooijen N., Plonquet A., Gherardi R.K., Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007; 204(5):1057–1069.

Becker U, Deis A, Sorensen TI, Gronbaek M, Borch-Johnsen K, Muller CF, Schnohr P, Jensen G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology* 1996; 23: 1025-1029

Bilzer M., Roggel F., Gerbes A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006 Dec;26(10):1175-86

Cheng L., Wang J., Li X., Xing Q., Du P., Su L., Wang S. Interleukin-6 Induces Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells to Suppress CD8+ T Cell-Mediated Liver Injury in Mice. *PlosOne* 2011; 4;6(3):e17631.

Cho J., Kim L., Li Z., Rose N.R. Talor M.V. Njoku D.B. Sex bias in experimental immune-mediated, drug induced liver injury in BALB/c mice: suggested roles for tregs, estrogen and IL-6. *Plos One.* 2013; 8 (4): e61186

Dambach D.M., Watson L.M., Gray K. R., Durham S.K., Laskin D.L. Role of CCR2 in macrophage migration in to the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 2002; 35, 1093–1103.

Dong Z., Zhang C., Wei H., Sun R., Tian Z. Impaired NK cell cytotoxicity by high level of interferon-gamma in concanavalin A induced hepatitis. *Can. J.Physiol. Pharmacol.* 2005; 83, 1045–1053.

Duffield J.S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin. Sci.* 2003; 104, 27–38.

Friedman S.L. Hepatic fibrosis-overview. *Toxicology* 2008a; 254, 120–129.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 Suppl 2:S3

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Oct;84(20):7251-5.

Gerritsma J.S., VanKooten C., Gerritsen A.F., VanEs L.A., and Daha M.R. Transforming growth factor-beta1 regulates chemokine and complement production by human proximal tubular epithelial cells. *KidneyInt.* 1998; 53, 609–616.

Greifenberg V, Ribechini E, Rossner S, Lutz MB. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *Eur J Immunol.* 2009; 39:2865–2876

Harvey C. E., Post J. J., Palladinetti P., Freeman A. J., Ffrench R. A., Kumar R. K., Marinos, G., Lloyd A. R. Expression of the chemokine IP-10(CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 74, 360–369.

Hassan M., Selimovic D., Ghozlan, H., Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor (TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell.Signal.* 2007; 19, 301–311.

Heneghan M.A., McFarlane I.G. Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 7-13.

Hennig B., Reiterer G., Toborek M., Matveev S.V., Daugherty A., Smart E., Robertson L.W. Dietary fat interacts with PCBs to induce changes in lipid metabolism in mice deficient in low-density lipoprotein receptor. *Environ Health Perspect.* 2005;113(1):83-7.

Higuchi S, Kobayashi M, Yoshikawa Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T.. IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.* 2011; 200: 139–145.

Hogaboam,C.M., Bone-Larson,C.L., Steinhauser M.L., Matsukawa A., Gosling J., Boring L., Charo I. F., Simpson K.J., Lukacs N.W., Kunkel,S.L. Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor2. *Am.J. Pathol.* 2000; 156, 1245–1252.

Holt, M. P.,Cheng, L., Ju, C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen induced liver injury. *J Leukoc Biol.* 2008;84(6):1410-21.

Huang H.L., Wang Y.J., Zhang Q.Y., Liu B., Wang FY, Li J.J., Zhu R.Z. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl₄-induced acute liver injury in mice.*World J Gastroenterol* 2012;18(45):6605-13.

Isse K., Specht S.M., Lunz J.G. 3rd, Kang L.I., Mizuguchi Y., Demetris A.J. Estrogen stimulates female biliary epithelial cell interleukin-6 expression in mice and humans. *Hepatology.* 2010 Mar;51(3):869-80

Ju C., Reilly T.P., Bourdi M., Radonovich M.F., Brady J.N., George J.W., Pohl L.R. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem.Res. Toxicol.* 2002; 15, 1504–1513.

Kan W.H., Hsieh C.H., Schwacha M.G., Choudhry M.A., Raju R., Bland K.I., Chaudry I.H. Flutamide protects against trauma-hemorrhage-induced liver injury via attenuation of the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis. 2008;105(2):595-602.

Karlmark K.R., Wasmuth H.E., Trautwein C., and Tacke F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. *ExpertRev. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 2, 233–242.

Karlmark K.R., Weiskirchen R., Zimmermann H.W., Gassler N., Ginhoux F., Weber C., Merad M., Luedde T., Trautwein C., Tacke F. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009; 50: 261–274.

Kita H., Macky I.R., Van D.W.J., Gershwin M.E. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001; 120: 1485–1501.

Klein I., Cornejo J.C., Polakos N.K., John B., Wuensch S.A., Topham D.J., Pierce R.H., Crispe I.N. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 2007;110:4077-4085

Kolios G., Valatas V., Manousou P., Xidakis C., Notas G., Kouroumalis E. Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells. *Mol Cell Biochem.* 2008; 319(1-2):91-8.

Lai J.J, Lai K.P, Chuang K.H, Chang P., Yu IC, Lin W.J., Chang C. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF-alpha expression. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3739-51

Leifeld L., Dumoulin F.L., Purr I., Janberg K., Trautwein C., Wolff M., Manns M.P., Sauerbruch T., Spengler U. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J. Pathol* 2003; 199:335-344.

Leonard W.J, O'Shea J.J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 293–322.

Lin S.L., Castaño A.P., Nowlin B.T., Lupper M.L., Jr., Duffield J.S. Bone marrow Ly6C^{high} monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J Immunol* 2009; 183(10):6733–6743

Liva S.M, Voskuhl R.R. Testosterone acts directly on CD4⁺ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):2060-7

Malerod L., Juvet K., Gjoen T., Berg T. The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 173-180

Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25, 677-86.

Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12):958–969.

Movahedi K., Laoui D., Gysemans C., Baeten M., Stangé G., Van den Bossche J., Mack M., Pipeleers D., In't Veld P., De Baetselier P., Van Ginderachter J.A. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C^(high) monocytes. *Cancer Res* 2010; 70(14):5728–5739.

Possamai L.A., Antoniadou C.G., Anstee Q.M., Quaglia A., Vergani D., Thursz M., Wendon, J. Role of monocytes and macrophages in experimental and human acute liver failure. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16, 1811–1819.

Ramachandran P., Pellicoro A., Vernon M.A., Boulter L., Aucott R.L., Ali A., Hartland S.N., Snowdon V.K., Cappon A., Gordon-Walker T.T., Williams M.J., Dunbar D.R., Manning J.R., van Rooijen N., Fallowfield J.A., Forbes SJ, Iredale JP. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 13;109(46):E3186-95

Ramachandran P., Pellicoroa A., Vernona M.A., Boultera L., Aucotta R.L., Alia A., Hartlanda S.N., Snowdona V.K., Cappon A., Gordon-Walkera T.T., Williamsa M.J., Dunbarc D.R., Manningg J.R., van Rooijend N., Fallowfielda J.A., Forbes J.S., Iredale J. P. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Pro Natl Acad Sci Sci USA* 109 (46).

Shimizu I. Impact of estrogens in the progression of liver disease. *Liver Int* 2003; 23:63-9.

Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X.F., Achong M.K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101: 311–320.

Zernecke A., Bidzhekov K., Noels H., Shagdarsuren E., Gan L., Denecke B., Hristov M., Koppel T., Jahantigh, M. N., Lutgens E., Wang S., Olson E. N., Schober A., Weber C.. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal* 2009; 2 (100): ra81.

Zola H., Flego L. Expression of interleukin-6 receptor on blood lymphocytes without in vitro activation. *Immunology*. 1992; 76(2):338-40.