

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

**Scuola di Dottorato di Ricerca in
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
Indirizzo: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE**

CICLO XXII°

**Valutazione del ruolo delle cellule progenitrici epatiche e del
microambiente cellulare e molecolare nel processo di rigenerazione e
carcinogenesi epatica**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. PierPaolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Supervisore: Dott.ssa. Patrizia Burra

Dottorando: Debora Bizzaro

INDICE

Sommario	5
Abstract	6
Abbreviazioni	7
1. Introduzione	
1.1 Rigenerazione epatica	9
1.2 Le cellule staminali adulte	11
1.2.1 Cellule progenitrici epatiche	12
1.2.2 La risposta dutturale	14
1.3 Modelli animali di attivazione delle cellule progenitrici epatiche	15
1.4 cellule progenitrici epatiche nelle patologie dell'uomo	16
1.5 Il microambiente	18
1.5.1 La nicchia staminale	18
1.5.2 Cellule stellate	19
1.5.3 Cellule di Kupffer	20
1.6 Infiammazione e rigenerazione	21
1.6.1 Interferon gamma (INF γ)	22
1.6.2 Tumor Necrosis Factor (TNF)	22
1.6.3 Transforming Growth Factor β (TGF β)	23
1.6.3 Interleuchina 6	23
1.7 Infiammazione e cancerogenesi	24
1.8 Cellule staminali tumorali	25
1.9 Dimorfismo fisiopatologico del danno nei due sessi	27
2 Scopo dello studio	29
3 Materiali e metodi	31
3.1 Modelli animali	31
3.1.1 Primo esperimento di danno epatico acuto	31
3.1.2 Secondo esperimento di danno epatico acuto	33
3.1.3 Danno epatico cronico potenzialmente cancerogeno	34
3.2 Analisi istologica	36
3.2.1 Inclusione in paraffina	36
3.2.2 Colorazione ematossilina-eosina	36
3.2.3 Colorazione speciale Tricromica di Masson	38

Indice

3.2.4 Colorazione PAS-D	38
3.2.5 Immunoistochimica	39
3.2.6 Immunofluorescenza	41
3.3 Analisi bioumorali	42
3.4 Analisi espressione genica	42
3.4.1 Estrazione RNA totale	42
3.4.2 Retrotrascrizione	43
3.4.3 Real Time PCR	45
3.5 Saggio di Griess	47
4. Risultati	51
4.1 Primo esperimento danno acuto	51
4.1.1 Sopravvivenza	51
4.1.2 Analisi della prima risposta al danno acuto	51
4.1.3 Analisi della fase tardiva	54
4.2 Secondo esperimento danno acuto	60
4.2.1 Sopravvivenza	61
4.2.2 Progressione del danno istologico	61
4.2.3 Analisi del quadro infiammatorio	63
4.2.4 Analisi della presenza di cellule stellate	65
4.3 danno cronico potenzialmente cancerogeno	67
4.3.1 Sopravvivenza ed esame macroscopico	67
4.3.2 Quadro istologico	67
4.3.3 Analisi bioumorali	68
4.4 Valutazione dell'effetto di CCl ₄ e DEN <i>in vitro</i>	70
5. Discussione	75
6. Bibliografia	81

Sommaro

La rigenerazione epatica, processo fisiologico indispensabile per la normale omeostasi del fegato, è l'evento finale di un complesso processo che implica l'interazione di diversi tipi cellulari e segnali molecolari che compongono il microambiente del fegato. Tra i segnali molecolari hanno un ruolo fondamentale gli ormoni steroidei sessuali e le molecole infiammatorie.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare in un modello murino di danno epatico acuto (indotto con CCl₄) e cronico (indotto con DEN) le alterazioni molecolari e cellulari in animali di sesso maschile e di sesso femminile. È stata inoltre testata la Monocrotalina, un alcoloide che blocca la proliferazione degli epatociti. Negli animali trattati si è osservato un tasso di mortalità significativamente superiore rispetto ai non trattati, un quadro istologico più compromesso ed una maggiore attivazione delle cellule stellate, mentre non sono state riscontrate differenze significative circa l'attivazione delle cellule progenitrici epatiche. Valutando la differenza della risposta tra sesso maschile e femminile, il presente studio ha rilevato un significativo dimorfismo che riguarda prevalentemente il tipo ed il grado della risposta infiammatoria suscitata dal danno indotto con il medesimo agente tossico. Nei topi di sesso femminile sembra esserci una predominanza di citochine di tipo Th1 (rappresentate dall'IFN γ), mentre nei fegati degli animali di sesso maschile predomina l'infiammazione di tipo Th2 (rappresentata da IL-4). È stato quindi evidenziato che gli animali dei due sessi rispondono attivando due vie di infiammazione diverse per lo stesso stimolo nocivo. Inoltre nei fegati degli animali di sesso maschile è stata riscontrata una sovra-regolazione del TNF α che secondo una recente ipotesi sembra essere indotto dalla stimolazione dei recettori degli androgeni presenti sulle cellule di Kupffer. La produzione massiva di TNF α potrebbe spiegare la risoluzione più lenta del danno epatico negli animali di sesso maschile e al contempo l'elevato numero di cellule macrofagiche presenti nell'animale maschio.

Dal presente studio è quindi emerso che in corso di rigenerazione epatica il microambiente epatico gioca un ruolo fondamentale ed in particolare è emersa l'importanza della componente ormonale e infiammatoria e della loro interazione nell'intero processo. Il ruolo che gli ormoni sessuali possono svolgere nel modulare la risposta infiammatoria e quindi la capacità rigenerativa può essere di fondamentale importanza per la valutazione clinica e terapeutica di diverse patologie infiammatorie che presentano dimorfismo sessuale.

ABSTRACT

The liver regeneration, an essential process for physiological homeostasis of the liver, is the final event of a complex process that involves the interaction of different cellular and molecular signals of the hepatic microenvironment. The most important molecular signals are sex steroid hormones and inflammatory molecules.

The aim of this research was to evaluate in a mouse model the molecular and cellular changes in response to acute (induced by CCl₄) and chronic (induced by DEN) hepatic injury. We also compared animals treated and not treated with Monocrotaline, an alkaloid that blocks the hepatocyte proliferation. Treated animals showed a significantly higher mortality rate, histology features were more impaired with a greater activation of stellate cells compared to non-treated animals, while there were no significant differences concerning the activation of liver progenitor cells. Regarding the gender difference, a significant dimorphism on the type and degree of the inflammatory response to a damage caused by the same toxic agent was seen in male and female. In female mice it appears to be a predominance of Th1-type cytokines (mainly IFN γ), while in male mice the dominant inflammation was Th2-type (IL-4). Animals of different gender responded by activating two different pathways of inflammation for the same *noxa*. Moreover, we found the up-regulation of TNF α , according to a recent hypothesis, suggesting to be induced by the stimulation of androgen receptors on Kupffer cells in male livers. The massive production of TNF α could explain in male livers both the slower resolution of liver injury and the high number of Kupffer cells.

This study showed that during liver regeneration, the hepatic microenvironment plays a crucial role and, in particular, highlighted the importance of hormonal and inflammatory components and their interaction throughout the process. The role that sex hormones may play in modulating the inflammatory response and thus the regenerative capacity may be of fundamental importance for the clinical evaluation and therapy of inflammatory diseases with sexual dimorphism.

ABBREVIAZIONI

α -SMA	α -smooth muscle actin
AAF	Acetaminofluorene
CK	Citocheratina
CS	Cellula Staminala
CSC	Cancer Stem Cell
DEN	Dietilnitrosamina
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
dNTP	Deossiribonucleoside trifosfato
FBS	Siero fetale bovino
IFN	Interferone
IL	Interleuchina
LPS	Lipopolisaccaride
mRNA	RNA messaggero
NO	Ossido Nitrico
O/N	Over Night
PBS	Phosphate buffered saline
Real Time PCR	Real Time polymerase chain reaction
SEM	Standard Error of the Mean
TA	Temperatura ambiente
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper
Tm	Temperatura di melting
TNF	Tumor Necrosis Factor

1. INTRODUZIONE

1.1 Rigenerazione epatica

La capacità del fegato di rigenerarsi è nota da epoca immemorabile come dimostra il mito di Edipo degli antichi greci, che racconta del titano Prometeo che coraggiosamente rubò il fuoco agli dei per donarlo agli uomini. Zeus, scoperto il furto, lo condannò a essere incatenato per l'eternità a una roccia sulle montagne del Caucaso e dispose che ogni giorno un'aquila gigante gli divorasse il fegato. Ogni notte però il suo fegato ricresceva, così che l'aquila potesse tornare a divorarlo il giorno seguente.

Il fegato si caratterizza nei mammiferi, infatti, per la sua peculiare capacità di mantenere costanti le sue dimensioni, anche in seguito a danno epatico di grave entità che può conseguire alla resezione chirurgica od in seguito a danno tossico, ischemico o virale (*Taub, 2004*). La rigenerazione del fegato presumibilmente si è evoluta per proteggere gli animali allo stato selvatico dagli eventuali danni all'organo determinati da intossicazioni con tossine alimentari dato che il fegato è il primo "filtro" per tutte le sostanze assorbite nel tratto gastrointestinale.

La capacità rigenerativa del fegato è stata per la prima volta dimostrata da Higgins e Anderson nel 1931 in un modello sperimentale di epatectomia parziale (*Higgins, 1931*). In tale modello murino, alla rimozione chirurgica di 2/3 della massa epatica conseguiva una rapida crescita del fegato residuo con rigenerazione dell'organo in circa una settimana dall'intervento.

La rigenerazione epatica è regolata da meccanismi molecolari ancora non del tutto conosciuti, ma è noto che il fegato è in grado di recuperare le sue dimensioni sia dopo perdita di massa che iperplasia. Il processo di rigenerazione può essere definito un fenomeno di tipo compensatorio dato che la massa finale del fegato che ha rigenerato è in funzione delle necessità dell'organismo ed una volta che la massa originaria è stata ripristinata, la proliferazione delle cellule coinvolte cessa (*Koniaris, 2003*).

Introduzione

Le principali cellule coinvolte nel processo di rigenerazione sono gli epatociti che si dispongono a formare la principale unità funzionale del fegato, il lobulo epatico (Mall, 1906). Il lobulo epatico ha forma esagonale delimitato ai vertici dalle triadi portali che sono costituite da una diramazione della vena porta, una diramazione dell'arteria epatica ed in un dotto epatico tenuti strettamente uniti da degli epatociti che formano la cosiddetta lamina limitante (Fig. 1.1). Il sangue perfonde il lobulo dalla vena porta e dall'arteria epatica attraverso i sinusoidi fino alla vena che si trova al centro del lobulo (vena centro lobulare).

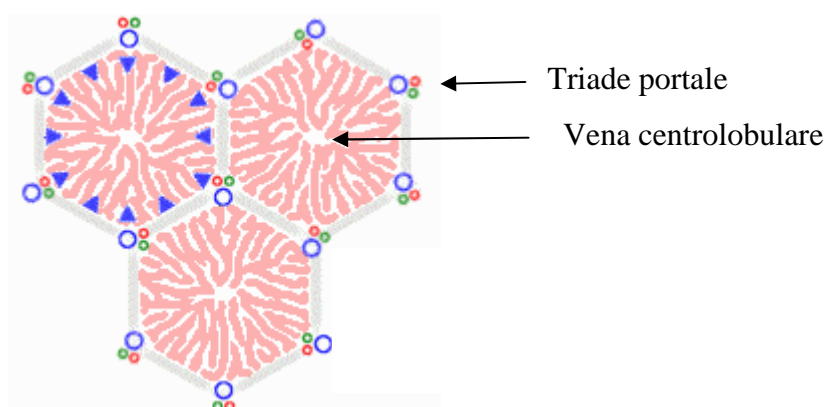


Fig. 1.1 Il lobulo epatico

Il turn-over cellulare degli epatociti è relativamente lento, la vita media di un epatocita si aggira, infatti, intorno ai 200-300 giorni (Bucher., 1971) e per tale motivo il fegato viene definito un organo stabile. In caso di danno epatico però, gli epatociti escono dalla fase G0 del ciclo cellulare ed iniziano a replicare al fine di recuperare la massa persa. Dopo epatectomia parziale, infatti, la proliferazione dei compartimenti principali epiteliali (epatociti e colangiociti), seguita dalla proliferazione delle cellule mesenchimali (cellule stellate), ripristina velocemente la massa epatica (Ponder, 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, 1997; Fausto, 2004).

Condizioni di danno epatico cronico causato da farmaci, virus e tossine possono però ostacolare la proliferazione degli epatociti. In tali condizioni, è stato comprovato che un ruolo essenziale nella rigenerazione epatica è giocato da una

popolazione di cellule staminali residenti nel fegato che prendono il nome di “cellule progenitrici epatiche” o “cellule ovali” nel modello murino, termini usati indistintamente a seguire nel testo. Tali cellule possono essere considerate vere e proprie cellule staminali adulte o somatiche.

1.2 Le cellule staminali adulte

In base alle conoscenze attuali, in molti e forse in tutti gli organi dei mammiferi sono presenti delle cellule staminali adulte che intervengono nei normali processi di turn-over cellulare e nei processi di riparazione di un eventuale danno.

In passato si riteneva che soltanto i tessuti soggetti a continuo ricambio (sangue ed epiteli) possedessero cellule staminali, necessarie per sostituire con nuove cellule differenziate le cellule perdute quotidianamente durante tutta la vita dell'individuo. Oggi è stato dimostrato, in modo incontrovertibile, che cellule staminali sono presenti in molti organi e tessuti, tra cui il cervello (*Reynolds, 1992*), muscolo scheletrico (*Quinn, 1984*) e cuore (*Beltrami, 2001*). In genere, vi è un numero molto esiguo di cellule staminali in ogni tessuto, che si mantiene però stabile nel numero e nella qualità grazie alla particolare divisione cellulare delle cellule staminali la cosiddetta divisione asimmetrica.

Quando una cellula si divide dà luogo, normalmente, a due cellule figlie identiche (divisione simmetrica). Nella divisione asimmetrica, invece, le cellule staminali generano una cellula identica alla cellula madre ed una più differenziata (progenitore di transito) capace di un numero limitato di cicli prima di dare origine a cellule mature del tessuto. In tal modo, indipendentemente dal numero di cicli asimmetrici compiuti, il numero di cellule staminali così generate rimane costante (*Dominici, 2006*) (FIG 1.2).

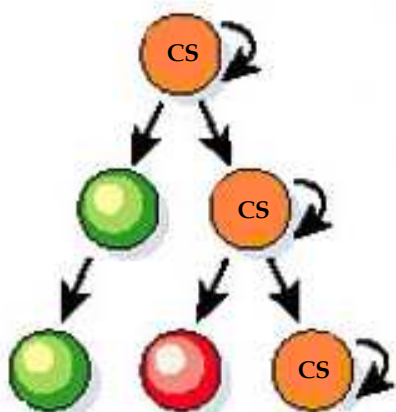


Fig.1.2 Divisione asimmetrica

1.2.1 Cellule progenitrici epatiche

Nel fegato, l'esistenza di cellule staminali era già stata postulata alla fine degli anni '50 quando Wilson e Leduc ebbero l'impressione che le cellule dei colangioli distali dei dotti biliari fossero responsabili del ripristino della massa epatica di roditori dopo danno indotto mediante alterazioni nutrizionali (*Leduc, 1954*). Il primo studio che dimostra l'esistenza di piccole cellule epiteliali indifferenziate nel fegato adulto è stato effettuato da Farber (*Farber, 1956*), che trattò ratti con diverse sostanze cancerogene, come etionina e 2- e 3-metil-4-dimetilaminobenzene. In questi studi, Farber notò la proliferazione di cellule epiteliali poste nella regione periportale caratterizzate da scarso citoplasma basofilo e dal nucleo di forma ovale, alle quali diede la definizione di "cellule ovali". Ulteriori evidenze bibliografiche di queste cellule si trovarono poi nel 1978 in uno studio effettuato da Shinozuka circa la risposta istologica ad una dieta deficiente in colina somministrata a ratti (*Shinozuka ., 1978*). Le cellule progenitrici epatiche sono cellule staminali bi-potenti presenti sia nell'uomo che negli animali capaci di differenziare in epatociti o colangiociti (cellule dei dotti biliari) in seguito a stimolo differenziativo adeguato (*Libbrecht ., 2002; Roskams , 2003*). In particolare queste cellule intervengono quando la normale proliferazione degli epatociti è bloccata,

condizione che si verifica in alcune patologie od in seguito alla somministrazione di sostanze tossiche.

Tali cellule risiedono nei Canali di Hering che rappresentano la più piccola e periferica diramazione dell'albero biliare, che mette in comunicazione i canalicoli biliari localizzati tra le superfici cellulari di due epatociti adiacenti con i dotti biliari interlobulari (*Alison, 1996; Roskams, 2004*). I canali di Hering possono quindi essere considerati a tutti gli effetti il collegamento anatomico e fisiologico tra gli epatociti ed il sistema biliare (Fig. 1.3).

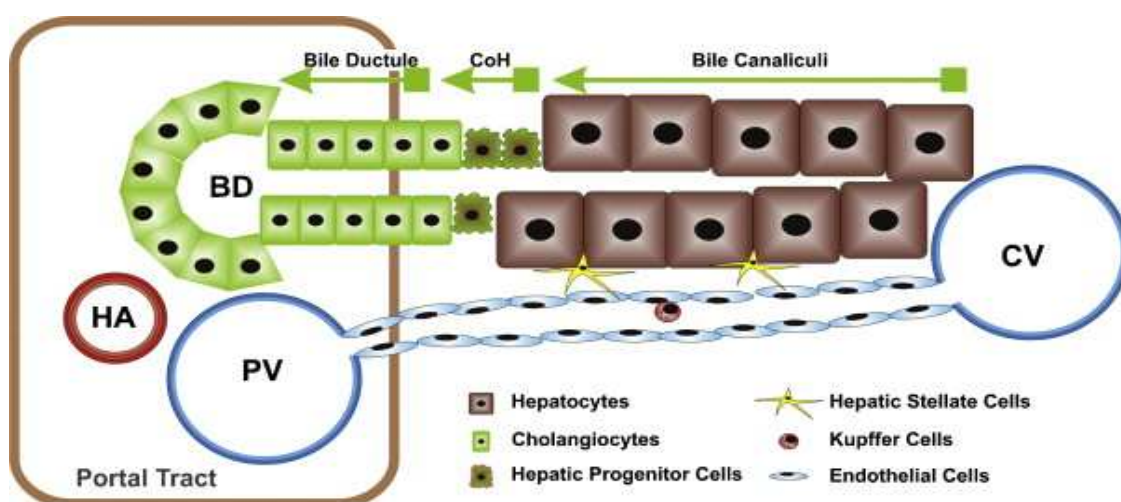


Fig. 1.3 Localizzazione delle principali cellule epatiche (da *Gaudio, 2009*)

All'analisi istologica le cellule progenitrici epatiche sono difficili da identificare esclusivamente dalla loro morfologia, mentre sono individuabili utilizzando specifici marcatori immunostochimici tipici di epatociti e colangiociti maturi. Le cellule progenitrici epatiche risultano, infatti, positive alla marcatura con citocheratine (CK), in particolare CK7 e CK19, filamenti intermedi del citoscheletro presenti anche nei colangiociti; albumina e CK8 tipici invece degli epatociti maturi; alfa-fetoproteina tipica degli epatoblasti e CD133 e c-kit tipici marcatori delle cellule staminali ematopoietiche (*Mancino, 2007; Shafritz, 2006*).

La presenza nelle cellule progenitrici epatiche di caratteristiche proprie delle cellule ematopoietiche midollari ha fatto emergere l'ipotesi, non ancora confermata, che queste cellule possano derivare da cellule circolanti di origine midollare, ma al

momento la loro origine non è ancora stata identificata con chiarezza (*Petersen, 1999; Oh, 2007*).

Non del tutto chiaro e definito risulta essere anche il pattern di marcatori delle cellule progenitrici epatiche, che rimane ancora molto controverso. Tale considerazione potrebbe far pensare all'esistenza di un pool eterogeneo di cellule diverse tra loro (*Lowes, 2003*).

1.2.2 La risposta duttulare

Come abbiamo visto, quando il danno epatico è tale da compromettere le capacità rigenerative degli stessi epatociti, viene attivato il compartimento di cellule staminali allocato a livello dei Canali di Hering, fisiologicamente presenti in stato quiescente (*Alison, 1996*). Questa risposta, chiamata “risposta delle cellule ovali” o nell'uomo “reazione duttulare”, si esprime sia in un aumento della popolazione biliare che nella differenziazione epatocitaria (*Gordon, 2000a; Gordon, 2000b*).

La risposta delle cellule ovali si può dividere in 4 fasi: attivazione, proliferazione, migrazione e differenziamento (*Erker, 2008*). Molteplici tipi cellulari sono presenti durante l'attivazione delle cellule progenitrici epatiche tra cui cellule epiteliali, ematopoietiche e mesenchimali. Ancora non è ben noto il pattern di informazioni molecolari coinvolte, né i tipi cellulari responsabili della secrezione e della ricezione di tali segnali. I segnali molecolari che fanno partire la cascata di attivazione delle cellule ovali possono agire sia direttamente, agendo sulla loro proliferazione, sia indirettamente tramite la stimolazione di cellule non endoteliali che a loro volta inviano segnali molecolari alle cellule progenitrici epatiche bersaglio. Sarà quindi indispensabile che gli studi futuri, oltre a descrivere la tipologia cellulare coinvolta nell'attivazione delle cellule progenitrici epatiche, siano mirati ad esaminare i segnali molecolari coinvolti e la sequenza temporale con cui vengono inviati.

In seguito all'attivazione, le cellule ovali proliferano nella regione periportale e con la progressione del danno epatico migrano infiltrandosi nel parenchima lungo i canalicoli biliari.

La differenziazione delle cellule progenitrici epatiche verso epatociti maturi o colangiociti è caratterizzata dalla comparsa di cellule con fenotipo intermedio, che rappresentano una trans-amplificazione della popolazione. In particolare, durante la differenziazione verso epatociti maturi, i progenitori danno luogo a epatociti intermedi, cellule poligonali con una dimensione intermedia tra quella delle cellule progenitrici epatiche e degli epatociti maturi e allo stesso modo, la differenziazione verso colangiociti determina la comparsa di colangiociti immaturi dalle caratteristiche istologiche intermedie. La maturazione delle cellule progenitrici epatiche verso la linea colangiocitaria potrebbe avvenire attraverso la differenziazione in piccoli e poi grandi colangiociti, che passano dal canale di Hering fino ai dotti biliari più grandi. Tali evidenze sono state riscontrate solo nei roditori (*Roskams, 2003; Mancino, 2007; Roskams, 2006; Paku, 2004*).

1.3 Modelli animali di attivazione delle cellule progenitrici epatiche

Wilson e Leduc (*Leduc, 1958*) furono i primi a descrivere l'attivazione di un compartimento di cellule staminali nel topo, dopo gravi lesioni indotte tramite la dieta. Successivamente, sono stati descritti vari modelli della cosiddetta "reazione delle cellule ovali" nei roditori. Questi modelli utilizzano principalmente potenziali agenti cancerogeni per inibire la proliferazione degli epatociti maturi seguiti dall'induzione di un danno che stimola la rigenerazione.

I principali metodi utilizzati per indurre la proliferazione delle cellule ovali negli animali sono:

- Dieta modificata deficiente in colina e con l'aggiunta di etionina nell'acqua di abbeveraggio (choline-deficient, ethionine-supplemented-CDE diet) (*Akhurst, 2001*). Le cellule ovali appaiono circa al terzo giorno per poi espandersi

rapidamente fino al 14° giorno di trattamento arrivando ad un plateau. Questo protocollo è tra i più utilizzati nel ratto e nel topo negli ultimi anni.

- somministrazione di 2-acetilaminofluorene (AAF), retrorsina oppure Monocrotalina seguita da stimoli mitogeni quali epatectomia parziale (PHx) o danno con epatotossine (come il tetracloruro di carbonio (CCl₄) e alcool allilico). L'AAF (*Alison, 1998*), retrorsina (*Laconi, 1999*) e Monocrotalina (*Song, 2004*) vengono convertiti in metaboliti attivi con attività citotossica e antiproliferativa dal citocromo p450, tipico degli epatociti maturi. La bassa espressione del citocromo da parte delle cellule ovali le rende resistenti a questo effetto tossico e sono quindi in grado di proliferare. Il forte stimolo proliferativo indotto dall'epatectomia o dalle epatotossine induce la proliferazione delle cellule ovali entro le 48 ore successive all'intervento (*Arai, 2004*).

- somministrazione di 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-diidro-collidina (DCC) da 3 a 6 settimane. Gli eventi principali sono apoptosi e necrosi degli epatociti e in 3-4 settimane dopo l'inizio del trattamento si evidenzia il picco della proliferazione delle cellule ovali (*Preisegger, 1999*).

- Modelli animali di malattia del fegato grasso, come Ob/Ob-mice o PARP1 mice (-/-) sono caratterizzati da inibizione della replicazione degli epatociti maturi, causata dallo stress ossidativo, e mostrano un'elevatissima risposta delle cellule ovali. (*Roskams, 2003 Yang, 2004*).

1.4 Cellule progenitrici epatiche nelle patologie del fegato umano

La reazione dutturale ha una importante rilevanza clinica per la sua frequente comparsa in diverse malattie del fegato nell'uomo. Quasi tutte le patologie epatiche sono infatti caratterizzate da un certo grado di danno, perdita o compromissione della rigenerazione degli epatociti e/o delle vie biliari a cui consegue l'attivazione delle cellule progenitrici epatiche. Tale attivazione viene descritta in varie condizioni tra cui insufficienza epatica fulminante, epatiti croniche virali, epatopatie alcoliche, steatosi epatica non alcolica, colangiopatie e patologie epatiche di natura

ereditaria (*Roskams, 1991, Roskams, 2003, Roskams, 2003a,; Falkowski, 2003; Roskams, 2003*). La significativa attivazione delle cellule progenitrici epatiche che si osserva nelle fasi avanzate della maggior parte delle malattie epatiche croniche nell'uomo può essere probabilmente ricondotto ad una progressiva perdita della capacità proliferativa degli epatociti per l'accorciamento dei telomeri determinata dai molti anni o decenni di malattia (*Wiemann, 2002; Marshall, 2005*). Nelle patologie acute, invece, l'importante proliferazione del comparto progenitore può essere ricondotta alla massiva necrosi degli epatociti e alla conseguente riparazione del danno mediante attivazione delle cellule progenitrici (*Katoonizadeh, 2006*).

Tipicamente, l'attivazione delle cellule progenitrici epatiche correla positivamente con i parametri clinici di gravità della malattia, come il MELD ed il grado di fibrosi e può influenzare la prognosi di questa condizione patologica (*Katoonizadeh ; 2006 Libbrecht , 2000*).

Esistono inoltre alcune malattie del fegato nelle quali l'attivazione delle cellule progenitrici epatiche non ha luogo. È il caso, ad esempio, dell'ostruzione biliare extraepatica più comunemente causata da calcoli biliari. La proliferazione dei dotti che si verifica in questa condizione è fondamentalmente diversa dalla reazione dei dotti in altre malattie del fegato, in quanto è il risultato della proliferazione dei colangiociti maturi, senza il coinvolgimento delle cellule progenitrici. Al contrario, una partecipazione di primo piano delle cellule progenitrici epatiche è stata descritta in malattie croniche delle vie biliari come la cirrosi biliare primaria, anche se sono disponibili poche evidenze per quanto riguarda il loro ruolo durante l'evoluzione clinica e patologica di questa malattia (*Roskams 2003*).

1.5 Il microambiente

Il microambiente cellulare può essere definito come l'insieme dei componenti cellulari e molecolari che interagiscono con la cellula al fine di mantenerne l'omeostasi. Il ruolo fondamentale svolto dal microambiente viene dimostrato, ad esempio nel fegato, dall'osservazione che gli epatociti, che hanno un enorme potenziale di crescita *in vivo*, sono molto difficili da mantenere vitali e differenziati quando isolati e messi in coltura, a sottolineare l'importanza delle cellule e dell'ambiente extracellulare che li circonda fisiologicamente.

1.5.1 La nicchia staminale

Il microambiente assume un'ulteriore importanza quando si parla di cellule staminali o progenitrici. Per tale motivo si parla di nicchia staminale, che viene definita come il microambiente cellulare ed extracellulare che sostiene le cellule staminali e contribuisce a mantenere la loro capacità di auto-rinnovamento (*Moore, 2006*). La nicchia staminale gioca un ruolo fondamentale per mantenere lo stato di quiescenza, ma è in grado di fornire segnali di attivazione e proliferazione in caso di necessità (*Zhang, 2008; Naveiras, 2006; Crosnier, 2006*).

Nel fegato, la nicchia delle cellule progenitrici epatiche si trova a livello dei canali di Hering e si compone di numerose cellule diverse, quali miofibroblasti e cellule stellate epatiche, cellule endoteliali, epatociti, colangiociti, cellule di Kupffer e cellule infiammatorie. Tutte queste cellule interagiscono tra loro e con le cellule progenitrici epatiche influenzandone i processi proliferativi e differenziativi attraverso numerosi segnali all'interno della nicchia (*Alison, 2009*).

Di seguito vengono riportate le caratteristiche di due popolazioni cellulari indispensabili nella nicchia staminale delle cellule progenitrici epatiche: le cellule stellate e le cellule di Kupffer.

1.5.2 Cellule stellate

Le cellule stellate epatiche nel fegato normale costituiscono circa 1/3 della popolazione cellulare non parenchimale del fegato e rappresentano il 5-8% dell'intera popolazione cellulare epatica (*Geerts, 2001*). Esse si localizzano a livello dello spazio perisinusoidale noto come spazio di Disse, a stretto contatto con gli epatociti e le cellule endoteliali che delimitano il sinusoidale epatico. Ogni cellula presenta lunghe estroflessioni che si estendono dal corpo cellulare e avvolgono i sinusoidi, da qui il loro nome di cellule stellate. La principale caratteristica morfologica delle cellule stellate nel fegato normale è la presenza di goccioline lipidiche citoplasmatiche contenenti vitamina A, sotto forma di retinolo palmitato. Nel fegato normale, le cellule stellate sono descritte come in uno stato di quiescenza. In caso di danno epatico invece le cellule passano ad uno stato attivato caratterizzato da proliferazione cellulare, trasformazione in miofibroblasti con conseguente acquisizione di facoltà contrattili e la successiva chemiotassi. La quantità di vitamina A diminuisce progressivamente e inizia la sintesi e deposito di matrice extracellulare, responsabile della fibrosi e della cirrosi nel lungo termine. Le cellule stellate sono, infatti, la principale fonte cellulare epatica per la produzione di proteine della matrice extracellulare, come il collagene di tipo I, III e IV. Recenti studi hanno però sottolineato il ruolo importante che possono avere cellule estranee al fegato, quali le cellule staminali del midollo osseo (*Russo, 2006*). È ormai chiaro che vi è uno stretto scambio molecolare tra le cellule progenitrici e le cellule stellate epatiche (*Santoni-Rugiu, 2005; Kuwahara, 2008; Sanchez-Munoz, 2007*). Le cellule stellate sono una fonte importante di fattori di crescita, come il TGF α (Transforming Growth Factor alpha) e l'HGF (Hepatocyte Growth Factor). Le cellule progenitrici possono essere direttamente responsabili dell'attivazione delle cellule stellate o, viceversa, le cellule stellate attivate potrebbero favorire l'espansione delle progenitrici e guidare la loro differenziazione. Un recente studio su modelli animali di Van Hul (*Van Hul, 2009*) sembra indicare che le cellule progenitrici epatiche necessitano di una matrice di sostegno, presumibilmente rappresentata da miofibroblasti/cellule stellate, per la migrazione e l'ancoraggio, al

fine di differenziare e ripopolare il fegato danneggiato. Questa osservazione rafforza l'ipotesi di un ruolo fondamentale della nicchia staminale nella proliferazione e differenziazione delle cellule progenitrici.

1.5.3 Cellule di Kupffer

Le cellule di Kupffer costituiscono il 15% circa di tutte le cellule del fegato e si trovano ancorate ai sinusoidi. Sono cellule appartenenti al sistema monocitico/macrofagico ed il loro sviluppo inizia nel midollo osseo, con la genesi di promonociti e monoblasti e con la successiva maturazione in monociti del sangue periferico, completando la loro differenziazione in cellule di Kupffer una volta localizzati all'interno del fegato (*Gale, 1978; Naito, 1997*).

Le cellule di Kupffer risiedendo all'interno del lume dei sinusoidi del fegato, sono le prime cellule ad essere esposte al materiale assorbito dal tratto gastrointestinale (*Mrass, 2006*). Sono dotate di potere fagocitario verso elementi estranei come batteri e virus e fungono da cellule presentanti l'antigene. Sono inoltre in grado di sintetizzare varie sostanze, tra cui citochine, ossido di azoto e intermedi reattivi dell'ossigeno. Questi fattori oltre ad autoregolare le stesse cellule di Kupffer, modulano l'azione di altre cellule immunitarie e delle cellule epatiche (*Seki, 2000*). Le cellule di Kupffer sono, infatti, coinvolte nella patogenesi del danno epatico attraverso il rilascio di sostanze biologicamente attive che svolgono un ruolo chiave nella modulazione delle altre cellule. Le cellule di Kupffer attivate in seguito a contatto con sostanze pro-infiammatorie, come l'LPS o prodotti batterici, secernono citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IFN- α), chemochine (MCP-I, IL-8) e specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto che contribuiscono al danno epatico. In particolare, le cellule di Kupffer secernono chemochine per richiamare cellule infiammatorie circolanti e citochine quali l'interleuchina-6 (IL6) e TNF- α , che attivano le cellule stellate che a loro volta secernono fattori di attivazione per gli epatociti ed in alcuni casi per le cellule progenitrici epatiche. In seguito a danno epatico le cellule di Kupffer sono inoltre responsabili dell'attivazione di una

risposta profibrogenica attraverso la produzione di TGF- β , metalloproteinasi della matrice, PDGF (piastrine-derived growth factor) e ROS (Tacke, 2009).

L'attivazione sembra essere necessaria per il normale funzionamento fisiologico del fegato, come la rimozione o la tolleranza agli agenti patogeni, come pure in corso di danno epatico acuto (Wick, 2002)

Comprendere il ruolo delle cellule di Kupffer in queste risposte diverse è una chiave per comprendere i meccanismi della fisiologia e patologia del fegato.

1.6. Infiammazione e rigenerazione

La rigenerazione epatica è un processo molto complesso, che è accompagnato da una rete altamente controllata di segnali che comprende comunicazione intercellulare e intracellulare (FIG 1.4).

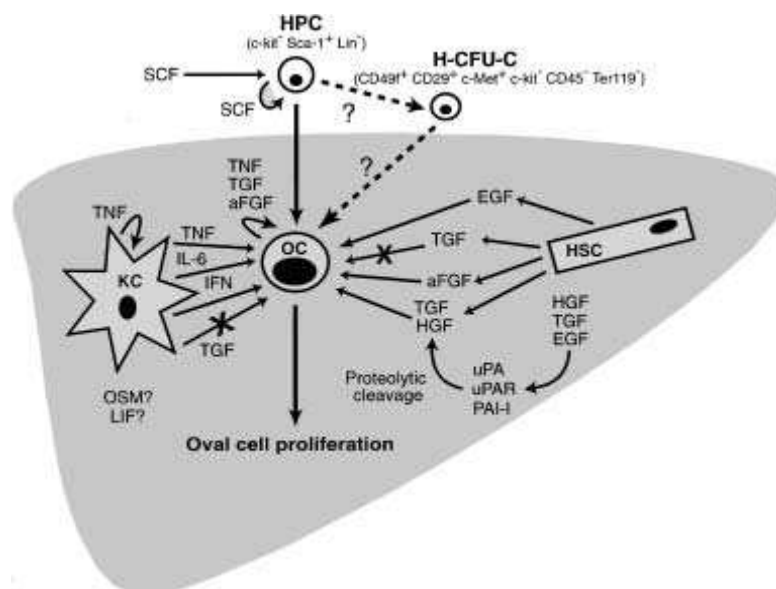


Fig. 1.4 Complessa rete di segnali molecolari tra epatociti (HPC), cellule di Kupffer (KC), cellule ovali (OC) e cellule stellate (HSC) durante un danno epatico e conseguente rigenerazione (da Lowes, 2003)

Le lesioni al fegato provocano cambiamenti significativi dell'espressione e dell'attività di una serie di mediatori del segnale prodotti dalle cellule epatiche e

delle cellule infiammatorie endogene (cellule di Kupffer) ed esogene (linfociti e cellule dell'immunità innata). Tali segnali possono avere effetti opposti sulle cellule implicate nella rigenerazione quali gli epatociti e le cellule progenitrici epatiche. Uno dei temi emergenti, infatti, circa l'attivazione delle cellule progenitrici epatiche è che le citochine infiammatorie hanno effetti opposti sugli epatociti e sulle cellule progenitrici.

1.6.1 Interferon gamma (IFN γ)

L'IFN- γ viene liberato dalle cellule Natural Killer e dai linfociti T e ha come bersaglio gli stessi linfociti T, i linfociti B e i macrofagi; l'IFN- α viene liberato dai linfociti T e B ed agisce sulle cellule normali con azione antivirale.

Diverse linee di ricerca hanno dimostrato l'importanza dell'interferone gamma nel processo di attivazione delle cellule ovali. Topi transgenici con deficit di IFN γ hanno dimostrato avere una risposta delle cellule ovali attenuata (*Sun, 2004*). Al contrario, l'aggiunta di IFN γ e TNF (Tumor Necrosis Factor), fattori di crescita presenti anche durante lo sviluppo del fegato, determina l'arresto della proliferazione degli epatociti in coltura, ma promuove l'attivazione delle cellule ovali (*Brooking, 2005*).

1.6.2 Tumor necrosis factor (TNF α)

Il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) è il principale iniziatore della risposta infiammatoria, agisce sui vasi della zona colpita aumentando la permeabilità vascolare, facilitando la fuoriuscita verso la zona dell'immunoglobuline, dei fattori del complemento, dei fattori chemiotattici, ecc. A livello epatico è stato dimostrato che l'inibizione del TNF indotta mediante somministrazione di desametasone inibisce totalmente la proliferazione delle cellule ovali in seguito a danno da AAF seguito da epatectomia parziale (*Nagy 1998*).

Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che il TNF stimola la proliferazione di una linea cellulare immortalizzata di cellule ovali di origine murina (LE/6). Questi studi hanno sottolineato l'importanza della famiglia del TNF nella attivazione delle cellule ovali. Anche se una parte della produzione del TNF può essere attribuito alla infiltrazione di cellule infiammatorie, la maggior parte del TNF epatico prodotto durante la rigenerazione del fegato è derivante dalle cellule di Kupffer.

1.6.3 Transforming growth factor β (TGF β)

Il TGF β è una molecola multifunzionale che svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale, nella genesi dei tumori, nella guarigione delle soluzioni di continuo, nei processi fibrotici e di recente è stata dimostrata anche un'attività immunoregolatrice di tale citochina. Il TGF β svolge nei processi infiammatori un'attività chemotattica per i monociti in un primo stadio, mentre in una fase successiva attiverrebbe le stesse cellule per il rilascio di altri mediatori.

A livello epatico è riportato che il TGF β ha un effetto regolatore differenziale sugli epatociti maturi e sulle cellule ovali. Il TGF β è, infatti, in grado di indurre l'apoptosi negli epatociti maturi, ma non sulle cellule ovali o sull'epitelio biliare (*Jung , 2008*)

1.6.4 Interleuchina 6 (IL-6)

L'IL-6 viene liberata da linfociti e macrofagi ed agisce sugli stessi linfociti T e linfociti B determinandone l'attivazione. A livello epatico essa sembra regolare l'attivazione e la proliferazione delle cellule ovali, funzione evidenziata in topi knock-out per l'IL-6 i quali mostrano una ridotta attivazione delle cellule progenitrici in risposta ad una dieta carente di colina (*Matthews, 2004*). Gli stessi dati sono stati confermati dopo aver somministrato desametasone in topi sottoposti ad epatectomia parziale (*Nagy, 1998*).

1.7 Infiammazione e cancerogenesi

L'infiammazione gioca un ruolo indispensabile nella rigenerazione epatica e più in generale nella risposta a danno epatico, ma è oramai noto che vi sono altri risvolti. L'infiammazione cronica è alla base di processi patologici per la maggior parte delle neoplasie umane. (*Balkwill, 2001*). Circa il 25% delle neoplasie sembra essere associato ad uno stato di infiammazione cronica in quasi tutti i distretti corporei (*Perwez Hussain, 2007*). Il ruolo dell'infiammazione nella cancerogenesi è stato per la prima volta proposto da Rudolf Virchow nel 1863, quando notò la presenza di leucociti nei tessuti neoplastici. Da quelle prime osservazioni molti altri studi hanno accumulato dati a sostegno della teoria che i tumori possono avere origine presso i siti di infezione o infiammazione cronica (*Mueller, 2004*). Infatti, nonostante la risposta infiammatoria sia una forma di difesa contro le infezioni o le lesioni e sia soprattutto un processo autolimitante, la risoluzione inadeguata di una risposta infiammatoria spesso conduce a varie malattie croniche tra cui potenzialmente anche il cancro (*Jackson, 2006; Schottenfeld, 2006*). Ad esempio, lo sviluppo di carcinomi dello stomaco, del fegato, della colecisti, della prostata e del pancreas è stata attribuita a infiammazione gastrica indotta da *Helicobacter pylori*, epatite cronica, colecistite, atrofia infiammatoria della prostata e pancreatite cronica, rispettivamente (*Schottenfeld, 2006; Matsuzaki, 2007; Philpott, 2004*).

L'infiammazione cronica è coinvolta in tutte le fasi della carcinogenesi. L'infiammazione agisce, infatti, come un fattore regolatore nell'iniziazione determinando instabilità genomica causata dall'eccessiva produzione di ROS (*Perwez Hussain, 2007, Lu, 2006*). L'infiammazione agisce poi come regolatore fondamentale della promozione e progressione del tumore tramite diversi meccanismi tra cui l'accelerazione del ciclo cellulare e quindi della proliferazione cellulare, l'evasione dalla morte cellulare programmata o apoptosi e la stimolazione della neovascolarizzazione tumorale (*Philip, 2004; Surh, 2001*).

Tra i principali attori molecolari coinvolti nell'asse infiammazione-cancro, si annoverano citochine, chemochine, prostaglandine e NO.

1.8 Cellule staminali tumorali

È noto che il cancro si sviluppa a partire da tessuti normali attraverso l'accumulo di alterazioni genetiche che agiscono di concerto per conferire fenotipi maligni. Ad oggi si conoscono molti geni che quando mutati sono responsabili della formazione e della progressione di tumori ma ancora non c'è certezza per la maggior parte dei tumori umani circa l'identità della popolazione cellulare che subisce tali eventi genetici. Le cellule differenziate, a lungo imputate come origine della massa tumorale presenterebbero delle caratteristiche incompatibili con tale ruolo. Ad esempio, le cellule differenziate, specialmente in alcuni distretti corporei come gli epitelii, raramente proliferano e vengono rapidamente sostituite, di conseguenza la probabilità che in una singola cellula si accumulino una serie di mutazioni necessarie per la formazione di un tumore è molto bassa. Inoltre, la maggior parte dei tumori sono eterogenei, composti da cellule che mostrano diversi gradi di differenziazione e di trasformazione, che rende difficile capire come una cellula ben differenziata sia in grado di dare luogo a molteplici tipi di cellule meno differenziate, anche considerando la possibilità che il processo di trasformazione induce un certo grado di dedifferenziamento. Al fine di spiegare queste incoerenze, negli ultimi anni si sta sempre più affermando la teoria delle "Cancer Stem Cell" (CSC), secondo la quale le cellule staminali sono ritenute all'origine del processo neoplastico, date le proprie caratteristiche di "self renewing" illimitato e la loro emivita, superiore rispetto a tutte le altre cellule differenziate (Fig. 1.5).

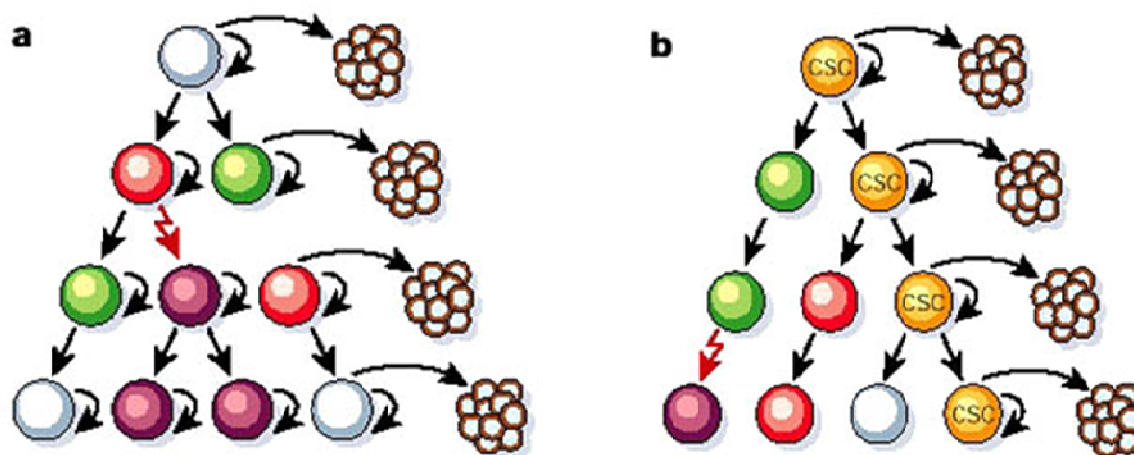


Fig. 1.5 Teorie sulla cancerogenesi. a) Teoria classica secondo la quale la massa tumorale nasce da cellule differenziate; b) Teoria delle cellule staminali tumorali (CSC)

L'implicazione più importante di questa teoria è la possibilità di sviluppare una terapia antitumorale che vada a colpire direttamente le cellule staminali alla base dello sviluppo neoplastico. Infatti, l'inefficace targeting verso questa popolazione di cellule all'interno del tumore spiega fallimenti terapeutici e la ricorrenza di malattia (Al-Hajj, 2004). La maggior parte degli agenti chemioterapici citotossici presenta infatti come bersaglio le cellule in rapida proliferazione, suggerendo che le cellule staminali del cancro possono sopravvivere a tali trattamenti grazie al loro tasso di proliferazione molto più lento.

Alcune importanti evidenze sperimentali sembrano confermare il coinvolgimento delle cellule ovali nel processo di trasformazione neoplastica anche nell'epatocarcinoma, una delle neoplasie più diffuse nel mondo. Nonostante la presenza di cellule ovali durante il processo di carcinogenesi epatico sia ormai stabilita, non si conoscono ancora i meccanismi cellulari e molecolari con cui queste cellule partecipano al processo di trasformazione neoplastica, né la loro interazione con altre cellule tipiche del tessuto epatico (es. cellule stellate, fibroblasti, epatociti, ecc).

1.9. Dimorfismo fisiopatologico del danno epatico nei due sessi

Nell'uomo è nota una sostanziale differenza nell'incidenza delle malattie epatiche croniche, in particolare dell'HCC, nei maschi rispetto alle femmine. Si stima infatti che HCC è 3-5 volte più comune negli uomini che nelle donne (*Bosch, 2004*) e nell'epatocarcinogenesi sperimentale, si sviluppa più frequentemente negli animali di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile.

Alla base di tale differenza si possono ricondurre nella specie umana cause prettamente di tipo sociologico (ad esempio maggior consumo di alcol e diverso stile di vita nell'uomo rispetto alla donna) e di tipo fisiologico. La causa fisiologica principale è da ricercare nell'azione svolta dagli ormoni sessuali, in particolare gli estrogeni. Il fegato è, infatti, un organo sensibile agli effetti degli estrogeni e le differenze nel livello di ormoni sessuali circolanti e nell'espressione epatica dei recettori degli ormoni sessuali (*Yokoyama, 2005*), si ritiene che sia responsabile del dimorfismo nella fisiopatologia epatica nei due sessi. A questo proposito, numerosi studi sperimentali sono stati condotti per chiarire l'effetto degli ormoni sessuali in corso di danno epatico sia nel miglioramento, sia nel peggioramento della lesione epatica.

È noto che gli ormoni estrogeni presentano una potente azione mitogena che favorisce la proliferazione cellulare. Accanto a questo concetto bisogna però considerare anche che il meccanismo responsabile della diversa risposta a stress epatici nei due sessi può essere ricondotto ad una diversa modulazione della risposta infiammatoria. Infatti, sebbene il meccanismo responsabile di un danno epatico è diverso per ogni tipo di stress che lo causa, ci sono meccanismi comuni, quali l'attivazione di processi infiammatori (*Kershenobich, 2003*), la sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (*Takeyama, 1992*) e le alterazioni del microcircolo (*Vollmar, 1996*). Inoltre, l'attivazione delle cellule di Kupffer (*Tsukamoto, 2002*) e l'aumento delle molecole di adesione per i leucociti (*Ohki, 1998*) sono stati proposti come possibili meccanismi.

Gli estrogeni sono in grado di agire sui diversi tipi cellulari del fegato contribuendo a preservare la funzione epatica in condizioni di stress. Queste azioni

Introduzione

comprendono la promozione del processo di rigenerazione degli epatociti, la riduzione delle citochine pro-infiammatorie e del rilascio di radicali dell'ossigeno da parte delle cellule di Kupffer, l'attenuazione della risposta contrattile e la produzione di collagene da parte delle cellule stellate epatiche, e l'up-regolazione della ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) nelle cellule endoteliali (*Yokoyama et al, 2005*). Tuttavia, il preciso meccanismo responsabile di tali differenze tra maschi e femmine rimane ancora da stabilire con certezza.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Obiettivo principale dello studio è stato la valutazione della diversa risposta cellulare, bioumorale e molecolare in topi di entrambi i sessi a danno epatico acuto e cronico, potenzialmente carcinogenico. È stato in particolare analizzato il ruolo delle cellule ovali e del microambiente cellulare e infiammatorio in corso di patologia epatica acuta e cronica e durante lo sviluppo dell'epatocarcinoma in modelli *in vivo*. L'analisi è stata condotta valutando la proliferazione delle cellule ovali e delle cellule stellate, valutando l'entità della risposta infiammatoria e i valori degli indicatori bioumorali di funzionalità e necrosi epatica.

La ricerca si è articolata pertanto nei seguenti punti:

- Analisi della risposta cellulare e molecolare conseguente all'induzione di danno epatico, in animali maschi e femmine;
- Valutazione della presenza di cellule ovali in modelli murini di patologie epatiche acute, croniche e di natura neoplastica;
- Valutazione del coinvolgimento di altre cellule quali cellule stellate e cellule di Kupffer nel processo di danno epatico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modelli animali

Tutti gli esperimenti con animali sono stati condotti nel rispetto delle normative vigenti (L. 116/92). Per tutta la durata degli esperimenti gli animali hanno avuto libero accesso a cibo ed acqua e sono stati mantenuti a temperatura costante di 20°C e con cicli luce/buio di 12 ore. La stabulazione è stata mantenuta presso lo stabulario semi-barrierato con barriere SPF (Specific Pathogen Free) di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova. Per gli esperimenti sono stati utilizzati topi del ceppo Balb/c.

3.1.1 Primo esperimento di danno epatico acuto

Il primo modello di danno epatico acuto chimicamente indotto è stato allestito al fine di indurre la proliferazione delle cellule ovali in topi Balb/c di 8 settimane all'inizio del trattamento e di entrambi i sessi. A tal fine è stato modificato un protocollo classico di induzione che prevede lo stimolo che blocca la proliferazione degli epatociti endogeni, seguito da danno che induce la rigenerazione e quindi la proliferazione delle cellule progenitrici.

Il blocco degli epatociti endogeni è stato indotto mediante somministrazione di due dosi da 50 mg/kg in soluzione fisiologica di Monocrotalina (Sigma-Aldrich) mediante iniezione intraperitoneale con intervallo di due settimane tra una dose e l'altra. La Monocrotalina è un alcaloide pirrolizidinico derivato da numerose piante del genere *Crotalaria* che induce il blocco della proliferazione degli epatociti (FIG. 3.1). La Monocrotalina viene biotrasformata a livello epatico mediante ossidasi in

una forma bioattivata (Monocrotaline pirrolo) che agisce come agente alchilante di proteine e DNA interferendo quindi con il ciclo cellulare (Lamé, 2005, Butler, 1970).

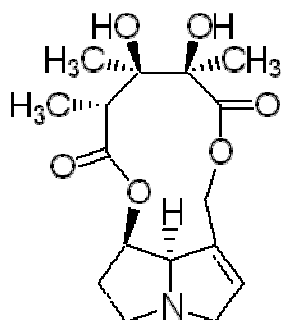


Fig. 3.1 Struttura chimica della Monocrotalina

A 15 giorni dall'ultima dose di Monocrotalina è stato indotto danno epatico acuto mediante somministrazione di singola dose di 0,75 ml/Kg in olio d'oliva di tetracloruro di carbonio (CCl₄, Sigma-Aldrich) mediante iniezione intraperitoneale. Il CCl₄ è un composto sintetico epatotossico che si accumula nel parenchima epatico dove subisce la trasformazione Citocromo P450 dipendente, che determina la formazione di un metabolita altamente reattivo, il radicale libero CCl₃^o. Questo provoca la perossidazione dei fosfolipidi delle membrane cellulari epatiche con conseguente necrosi a livello della zona III del lobulo epatico. Ne consegue una risposta infiammatoria inizialmente dovuta all'attivazione delle cellule di Kupffer che secernono citochine, chemochine ed altri fattori pro-infiammatori, i quali, oltre ad avere effetti citotossici diretti, attraggono ed attivano altri monociti, neutrofili e linfociti dal torrente circolatorio che contribuiscono all'instaurarsi del danno epatico.

In tutti i gruppi di trattamento gli animali sono stati sacrificati a 24 ore e ad 8 giorni dall'induzione del danno. Ad ogni end-point sono stati sacrificati 6 maschi (di cui 4 trattati e 2 controlli sani) e 6 femmine (4 trattate e 2 controlli sani).

Tale modello animale di trattamento con Monocrotalina e CCl₄ (gruppo A) è stato confrontato con animali trattati esclusivamente con CCl₄ (Gruppo B) al fine di valutare l'effettiva azione di blocco della proliferazione indotta dalla Monocrotalina. Anche in questo caso gli animali sono stati sacrificati a gruppi di 6

animali maschi e 6 femmine (4 trattati e 2 controlli per ogni gruppo) a 24 ore e 8 gironi dal danno.

La valutazione di eventuali effetti indotti dalla sola Monocrotalina è stata effettuata su animali maschi e femmine trattati esclusivamente con Monocrotalina e sacrificati a 2 settimane dalla seconda e ultima somministrazione (Gruppo C). Nella **Tabella 3.1** sono riassunti i gruppi di trattamento.

Al momento del sacrificio tutti gli animali sono stati anestetizzati mediante anestesia gassosa (miscela di ossigeno e fluorene) ed è stato eseguito un prelievo ematico mediante puntura intracardiaca. Gli animali sono stati quindi sacrificati mediante dislocazione cervicale ed è stato prelevato il fegato processato poi per l'inclusione in paraffina e le successive analisi istologiche.

Tabella 3.1 Sintesi dei gruppi di trattamento del primo esperimento di danno acuto

Gruppo	Trattamento	Sacrificio	n° trattati	n° controlli
A	Monocrotalina + CCl₄	24 ore	4 ♂ + 4 ♀	2 ♂ + 2 ♀
		8 giorni	4 ♂ + 4 ♀	2 ♂ + 2 ♀
B	CCl₄	24 ore	4 ♂ + 4 ♀	2 ♂ + 2 ♀
		8 giorni	4 ♂ + 4 ♀	2 ♂ + 2 ♀
C	Monocrotalina 2 dosi	15gg da ultima dose	4 ♂ + 4 ♀	2 ♂ + 2 ♀

3.1.2 Secondo esperimento di danno epatico acuto

Al fine di completare il quadro di progressione del danno e della conseguente riparazione e rigenerazione l'esperimento è stato ripetuto in animali maschi e femmine trattati con unica dose di CCl₄ (0.75 ml/Kg in olio d'oliva) e sacrificati a 48 ore, 5 giorni, 8 giorni e 12 giorni dalla somministrazione. Ad ogni end-point sono stati sacrificati 6 maschi (di cui 4 trattati e 2 controlli sani) e 6 femmine (4 trattate e 2 controlli sani) per un totale di 48 animali.

Allo stesso modo, al momento del sacrificio gli animali sono stati anestetizzati mediante anestesia gassosa e sottoposti a prelievo ematico mediante puntura intracardiaca.

Dopo il sacrificio per dislocazione cervicale, il fegato è stato rimosso totalmente e processato in parte per l'inclusione in paraffina per l'analisi istologica e immunoistochimica e in parte congelato in azoto liquido e conservato a -80°C per l'analisi molecolare.

3.1.3. Danno epatico cronico potenzialmente cancerogeno

Un terzo modello animale è stato allestito per valutare il ruolo delle cellule ovali e delle differenze nei due sessi durante danno cronico con una sostanza cancerogena, la Dietilnitrosamina (DEN). La DEN è un nitrosoderivato con note proprietà cancerogene in modelli animali, somministrata attraverso diverse vie si è, infatti, rivelata cancerogena in tutte le specie animali trattate producendo tumori benigni e maligni del fegato, del rene, della cavità nasale, del polmone, della trachea, dell'esofago. I metaboliti derivanti dalla sua biotrasformazione indotta dal citocromo p450 (O⁶-ethyldeoxyguanosine e O⁴ e O⁶-ethyldeoxythymine) sono sostanze promutagene in grado di iniziare il processo di carcinogenesi nei distretti coinvolti (Fig. 1.6).

La DEN è stata somministrata ad un totale di 48 topi Balb/c di 8 settimane di entrambi i sessi. La DEN è stata dissolta nell'acqua di abbeveraggio, alla concentrazione di 50 parti per milione (50 ppm). La DEN è una sostanza fotosensibile di conseguenza sono stati utilizzati abbeveratoi per roditori oscurati e l'acqua è stata cambiata due volte a settimana. Gli animali controllo hanno ricevuto acqua non trattata posta in abbeveratoi oscurati e cambiata due volte a settimana.

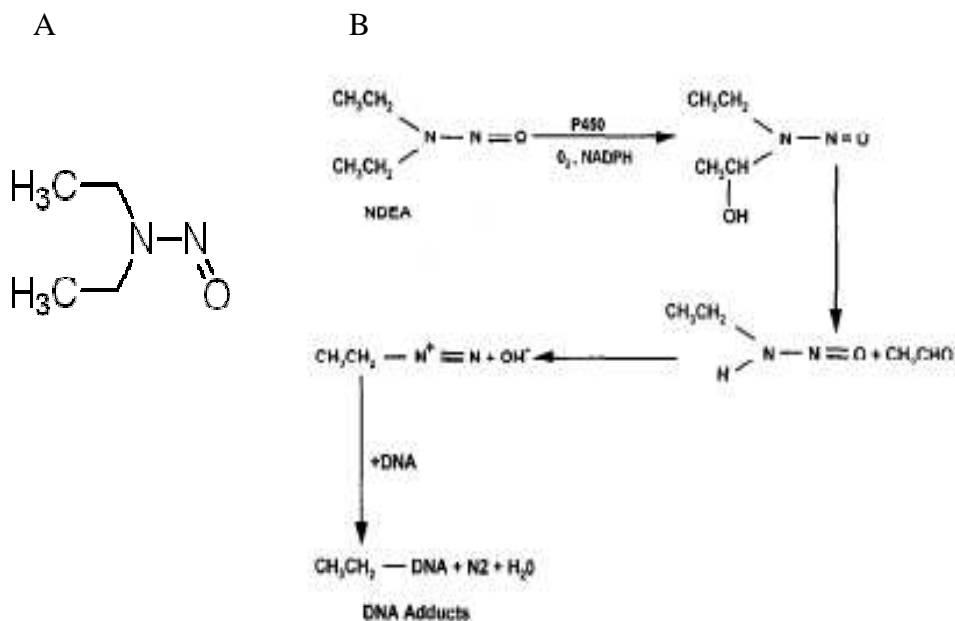


Figura 1.6 Struttura molecolare della DEN (A) e meccanismo di biotrasformazione (B)

Il trattamento con DEN è stato prolungato per 1, 2, 3 e 5 mesi. Ad ogni endpoint sono stati sacrificati 6 maschi (di cui 4 trattati e 2 controlli sani) e 6 femmine (4 trattate e 2 controlli sani). Al momento del sacrificio tutti gli animali sono stati anestetizzati mediante anestesia gassosa (miscela di ossigeno e fluorene) ed è stato eseguito prelievo ematico mediante puntura intracardiaca. Dopo il sacrificio per dislocazione cervicale, il fegato è stato rimosso totalmente e processato in parte per l'inclusione in paraffina per l'analisi istologica e immunohistochimica e in parte congelato in azoto liquido e conservato a -80°C per l'analisi molecolare. Sono stati prelevati inoltre rene, milza e un tratto di piccolo intestino per l'analisi istologica.

3.2 Analisi istologica

3.2.1 Inclusione in paraffina

Gli organi subito dopo il prelievo sono stati processati per l'inclusione in paraffina. Al prelievo è seguita la riduzione in pezzi di piccole dimensioni e la fissazione per almeno 24 ore in soluzione di formalina (Sigma-Aldrich) al 4% in acqua milliQ. Al termine della fissazione i pezzetti sono stati sciacquati in acqua distillata per eliminare i residui di formalina che potevano interferire con la successiva colorazione e quindi disidratati mediante passaggi successivi in soluzioni di etanolo ed acqua distillata a concentrazioni ascendenti. In particolare sono stati eseguiti passaggi di due ore in etanolo al 70%, due ore in etanolo al 80%, due ore in etanolo al 90%, una notte in etanolo al 95%, 2 ore in etanolo al 100%. Ha fatto seguito la diafanizzazione mediante passaggio di un'ora in soluzione di xilene ed etanolo assoluto (1:1, v/v) e quindi in xilene per un'ulteriore ora. Al termine della disidratazione i pezzetti sono stati posti in paraffina preriscaldata a 60°C per almeno 2 ore al fine di impregnare tutto il tessuto di paraffina e quindi inclusi e lasciati raffreddare a temperatura ambiente.

Al microtomo (Histoslide 2000, Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni dello spessore di 4 µm, che sono state fatte aderire su vetrini portaoggetti SuperFrost Plus (Menzel-Glaser).

3.2.2 Colorazione ematossilina eosina

Sulle sezioni di 4 µm ottenute al microtomo è stata eseguita la colorazione ematossilina-eosina secondo i comuni protocolli. Le sezioni sono state preventivamente deparaffinate tramite due passaggi in xilene, ciascuno di 5 minuti e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in una scala discendente di

concentrazioni di etanolo in acqua distillata: etanolo assoluto, etanolo 95%, etanolo 80% ed etanolo 70%. L'idratazione si è conclusa quindi con un passaggio di almeno 10 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con il colorante ematossilina (Merk) che colora di blu-violetto i nuclei per 3 minuti, lavata 2 volte velocemente in acqua distillata e contrastata per 3 minuti in acqua di fonte. Quindi è seguito il trattamento con eosina (Merck) per 1,30 minuti e lavata ancora velocemente in acqua distillata.

Il montaggio è stato eseguito con Histochoice[®] Mounting Media (Amresco) previa disidratazione con passaggi rapidi in etanolo 80%, 95%, 100% e xilene.

Per ogni animale sono state valutate 4 sezioni diverse e di ogni sezione sono stati valutati 4 campi rappresentativi. È stata quindi effettuata l'analisi semiquantitativa per definire l'entità del danno da parte di due operatori distinti. La scala di valutazione è stata stabilita arbitrariamente da un punteggio minimo pari a 0 (nessun danno) ad un massimo di 5 (necrosi coagulativa estesa) (Tabella 3.2).

Tabella 3.2 Scala per la valutazione del danno a livello isologico

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

3.2.3 Colorazione speciale Tricromica di Masson

È stata quindi eseguita la colorazione speciale Tricromica di Masson che mette in evidenza le fibre di collagene (colorazione verde) e quindi l'eventuale presenza di fibrosi. Il metodo associa una colorazione nucleare ottenuta con ematossilina ferrica di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico e una colorazione del connettivo con due differenti coloranti acidi. Per la colorazione è stato utilizzato un kit commerciale (Bio-Optica, Milano). Rapidamente, il procedimento utilizzato è il seguente. Dopo aver deparaffinato ed idratato le sezioni, sono state trattate per 10 minuti con Ematossilina ferrica sec. Weigert, sol. B ed Ematossilina ferrica sec. Weigert, sol. A. I vetrini sono stati sgocciolati e sulle sezioni è stato posto acido picrico in soluzione alcolica e lasciato agire per 4 minuti. In seguito ad un rapido lavaggio in acqua distillata è stata posta sulle sezioni fucsina di Ponceau B per 4 minuti. I vetrini sono stati lavati in acqua distillata e subito sono stati trattati con Acido fosfomolibdico al 1% per 10 minuti. Senza sciacquare, i vetrini sono stati sgocciolati e trattati con verde luce allo 0,3% per 5 minuti. Le sezioni sono state lavate in acqua distillata e quindi disidratate rapidamente attraverso la serie ascendente di alcol sostando 1 minuto nell'ultimo assoluto. L'ultimo passaggio è stato effettuato in xilene ed i vetrini sono poi stati montati con Histochoice[®] Mounting Media (Amresco).

3.2.4 Colorazione PAS-D

La reazione PAS (Periodic-Acid-Schiff) è una reazione istochimica che evidenzia componenti tessutali contraddistinti da gruppi glicolici o aminoidrossilici adiacenti, colorandoli in rosso magenta.

Nella colorazione PAS, il materiale viene trattato con acido periodico; durante questo processo i glicoli 1,2 vengono ossidati a gruppi aldeidi. Con il

reagente di Schiff, le aldeidi reagiscono a formare dialdeidi rilevate mediante la precipitazione di un complesso insolubile color magenta (aldeide fucsina).

La colorazione PAS può essere associata al pretrattamento con un enzima, la α -amilasi, nota anche come diastasi, comunemente presente nella saliva. Tale enzima degrada il legame 1-4 glucosidico del glicogeno dando origine a zuccheri idrosolubili (maltosio e destrina), eliminati durante la colorazione. Nella colorazione PAS-D quindi il glicogeno non risulta evidenziato.

Il protocollo prevede che dopo la reidratazione, le sezioni vengano trattate con diastasi per 20 minuti a temperatura ambiente. In seguito ad accurato lavaggio le sezioni sono state trattate con soluzione di acido periodico 0,5% (Sigma-Aldrich) per 5 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati lavati più volte in acqua distillata. Le sezioni sono state quindi trattate con reagente di Schiff (Sigma-Aldrich) per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver lavato i vetrini in acqua corrente per 5 minuti, è stata effettuata la colorazione di contrasto in soluzione ematossilina di Gill 3 per 90 secondi. Previo lavaggio in acqua corrente i vetrini sono stati fatti asciugare all'aria e montati con Histochoice[®] Mounting Media (Amresco).

3.2.5 **Immunoistochimica**

Sulle sezioni paraffinate di 4 μm è stata quindi effettuata analisi immunoistochimica per mettere in evidenza cellule ovali, cellule stellate attivate/miofibroblasti e cellule di Kupffer. Gli anticorpi primari utilizzati e le diluizioni di lavoro sono riportate in Tabella 3.2. La reazione immunoistochimica è stata eseguita secondo la metodica standard per l'amplificazione del segnale con biotina-streptavidina adattata alle caratteristiche del tessuto epatico.

Le sezioni epatiche, a seguito della deparaffinatura sono state poste in tampone citrato (2.94 gr in 1000 ml H₂O, pH 6) per effettuare lo smascheramento antigenico mediante riscaldamento con microonde per 10 minuti totali a media

potenza e successivo raffreddamento delle sezioni. Il blocco delle perossidasi endogene è stata effettuata mediante incubazione con H₂O₂ (Sigma-Aldrich) al 3% per 20 minuti a temperatura ambiente in camera umida. Il tessuto epatico è particolarmente ricco di biotina ed avidina endogene, di conseguenza, con la metodica standard il segnale di fondo risulta particolarmente elevato. È stato quindi eseguito il blocco dell'avidina e della biotina endogene mediante un kit commerciale (Dako), al fine di rendere il segnale più chiaro ed evitare falsa positività. Dopo accurato lavaggio con PBS è stata eseguita la saturazione dei siti di legame mediante incubazione con siero (normal serum) dell'animale in cui è stato prodotto il secondario. Il siero è stato utilizzato al 10% in PBS ed incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Senza lavaggi intermedi è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo primario, alle diluizioni indicate in **Tabella 3.3**.

Tabella 3.3 Anticorpi primari utilizzati e condizioni di incubazione (O/N overnight, TA temperatura ambiente).

Anticorpo	Tipo	Ditta	Incubazione
Citocheratine (WSS)	Rabbit poly	Dako	1:2000 O/N 4°C
αSMA (clone 1A4)	Mouse mono	Sigma-Aldrich	1:4000 2 ore TA
CD68	Rat poly	Abcam	1:200 2 ore TA

Dopo 2 accurati lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS le sezioni sono state incubate con i rispettivi anticorpi secondari biotinilati anti-rabbit (Dako), anti-rat (Dako) e anti-mouse (Vectors Labs) diluiti 1:250 in PBS. L'incubazione è stata eseguita per 40 minuti a temperatura ambiente in camera umida. Le sezioni sono state poi lavate in PBS 2 volte per 5 minuti ciascuna. In seguito è stata effettuata l'incubazione con streptavidina-HRP diluita 1:500 in PBS per 40 minuti a temperatura ambiente. La rilevazione della reazione è stata effettuata mediante incubazione con 3-3' diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, UK) per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo il blocco della reazione in acqua distillata, i

nuclei sono stati contrastati mediante colorazione con ematossilina per 1 minuto a temperatura ambiente. È seguita la disidratazione e il montaggio dei vetrini come precedentemente descritto.

Per ogni vetrino è stato eseguito un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità).

La valutazione semi-quantitativa della immuno-reattività per pancitocheratine e α SMA è stata effettuata analizzando due sezioni per ogni animale (trattati e controlli), in maniera indipendente e casuale da parte di due operatori, mediante l'utilizzo del microscopio ottico (Leica DM2000), collegato alla telecamera (Nikon). I risultati sono stati espressi in termini di numero di cellule positive per le pancitocheratine e numero di segmenti periportalì e/o portoportalì positivi per α SMA calcolati in 10 campi ottici \pm SEM.

3.2.6 Immunofluorescenza

L'anticorpo anti α SMA è stato testato sulle sezioni epatiche anche mediante immunofluorescenza. Il procedimento utilizzato è simile a quello riportato per l'immunoistochimica con alcune modifiche. Alla deparaffinatura ed idratazione in acqua distillata delle sezioni è seguito lo smascheramento antigenico con sodio citrato come riportato precedentemente. In seguito è stato effettuato il blocco dei siti di legame mediante incubazione con siero al 10% in PBS e quindi l'incubazione con l'anticorpo primario (diluizione 1:2000 in PBS) per 2 ore a temperatura ambiente. In seguito ad accurati lavaggi è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato direttamente con FITC. I vetrini sono stati montati con montante idrofilo contenente DAPI (Vector Labs).

Per ogni vetrino è stato eseguito un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità).

L'utilizzo di un anticorpo secondario direttamente coniugato al fluorocromo aggira molti dei problemi derivanti dalle caratteristiche del tessuto epatico, tra cui la presenza di perossidasi, biotina ed avidina endogene.

Le sezioni sono state analizzate mediante microscopio a fluorescenza (Leica DM2000).

I risultati sono stati espressi in termini di numero di segmenti periportal e/o portoportal positivi per α SMA in 10 campi ottici \pm SEM.

3.3 Analisi biumorali

I campioni ematici sono stati raccolti in provettine BD Microtainer® con Litium Heparin e gel per separazioni plasmatiche al momento del sacrificio degli animali del primo esperimento di danno acuto e dell'esperimento con DEN. Tali campioni sono stati testati per la quantificazione di: bilirubina totale, bilirubina coniugata e bilirubina non coniugata, ALT e AST da parte del laboratorio analisi centrale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Sono stati utilizzati per le analisi le normali procedure utilizzate per i campioni ematici umani. I valori degli animali trattati sono stati rapportati ai valori riscontrati negli animali controllo non trattati ed indicati come media \pm SEM.

3.4 Analisi espressione genica

3.4.1 Estrazione RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dai frammenti di fegato conservati a -80°C. I frammenti sono stati polverizzati in un mortaio mantenendoli in azoto liquido. La polvere ottenuta è stata posta in una provetta Eppendorf a cui è stato aggiunto un volume adeguato di Trizol® (Invitrogen). Sono stati quindi aggiunti 0,2 volumi di

cloroformio. I campioni sono stati mescolati energicamente per qualche secondo e quindi posti in ghiaccio per 15 minuti. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000 rpm in centrifuga refrigerata. Al termine della centrifugazione si possono individuare 3 fasi, la prima acquosa, la seconda biancastra costituita dalle membrane cellulari e la terza rossa contenente il Trizol residuo. È stata recuperata esclusivamente la fase acquosa nella quale è presente l'RNA, ponendo particolare attenzione a non toccare la parte bianca membranosa. A ciascun campione è stato quindi aggiunto 1 volume di isopropanolo freddo (a -20°C) e le Eppendorf sono state mescolate per inversione e poste a -80°C per un'ora. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000 rpm in centrifuga refrigerata. Il pellet ottenuto è stato quindi lavato per 3 volte con etanolo 75% in acqua DEPC (priva di RNasi, trattata con dietilpirocarbonato) mantenuto a -20°C. Dopo ciascun lavaggio i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 12000 rpm in centrifuga refrigerata. Al termine del terzo lavaggio l'etanolo è stato eliminato completamente ed il pellet fatto asciugare in speed-vac al fine di eliminare qualunque traccia di etanolo che potrebbe interferire con la successiva retro trascrizione. Il pellet di RNA asciutto è stato risospeso in 20 µl di acqua DEPC ed i campioni sono stati quindi conservati a -80°C. La concentrazione dell'RNA totale estratto è stata quantificata mediante lettura allo spettrofotometro a 260 nm mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti d'assorbanza A260/A280 e A260/A230.

3.4.2 Retrotrascrizione

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA impiegando la retrotrascrittasi SuperScript e utilizzando primers universali (random). Tutte le procedure sono state eseguite in ambiente ad uso esclusivo per RNA al fine di evitare contaminazioni. Il protocollo di retro trascrizione prevede che venga preparata una mix di denaturazione per ciascun campione da retrotrascrivere così composta:

Materiali e metodi

DTT	0,1 M
Buffer	5X
dNTPs	5 mM
Random primers	50 μ M

Tutti i reagenti utilizzati per questa fase e la successiva sono della ditta Invitrogen.

È stato quindi aggiunto 1 μ g di RNA quindi posto la mix a 72°C per 5 minuti al termine dei quali i campioni sono stati posti subito in ghiaccio per evitare la rinaturazione dell'acido nucleico.

La mix di retrotrascrizione è stata preparata nel seguente modo:

Retrotrascrittasi Superscript II	140 U
RNasi out	98 U
Acqua DEPC	q.b. per arrivare a 25 μ l

La retrotrascrizione, che avviene in un volume totale di 25 μ l, prevede i seguenti passaggi: 42°C per 50 minuti, 95 °C per 5 minuti. I campioni vengono mantenuti a 4°C fino alla successiva precipitazione del cDNA che viene effettuata mediante incubazione over-night a -80°C con 0,1 volumi di sodio acetato 3 M e 2.5 volumi di etanolo assoluto, allo scopo di eliminare i sali che potrebbero interferire nelle fasi successive. Il pellet di cDNA è stato quindi recuperato mediante centrifugazione e lavato con etanolo al 75%, lasciato asciugare e risospeso in acqua. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20 °C.

3.4.3 Real Time PCR

I campioni di RNA totale così ottenuti sono stati analizzati mediante Real Time PCR utilizzando il SYBR Green (Quiagen) come indicatore di fluorescenza e verifica della specificità dei prodotti amplificati mediante curva di melting. La Real-Time PCR è una tecnica che consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA stampo attraverso il monitoraggio in tempo reale dell'intensità di fluorescenza che si libera dal prodotto di amplificazione durante la reazione a catena della DNA polimerasi: questo risulta possibile mediante l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo, a livello del prodotto di reazione, segue la stessa cinetica della PCR. Il Syber green emette una fluorescenza maggiore quando intercalato al DNA a doppia elica, quindi, con il procedere dei cicli di amplificazione, si assisterà ad un continuo aumento della fluorescenza (*Morrison, 1998*). Il ciclo raggiunto il quale la fluorescenza supera il valore base (threshold) viene indicato come Ct (Cycle threshold).

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta sui campioni conservati a -80°C per i seguenti geni: β -actina, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , HIF-1 α , EPAS1. Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse sono state individuate tramite consultazione del database Nucleotide disponibile online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>). I primer sono stati disegnati mediante impiego del software Probe Finder (Roche) a cavallo tra 2 esoni adiacenti, in modo tale da escludere l'amplificazione di eventuale DNA contaminante ed analizzati mediante il software disponibile online al sito www.bmr-genomics.it.

I primer e la rispettiva temperatura di annealing, sono indicati in **Tabella**

3.3.

Tabella 3.3 Primer murini utilizzati e relativa temperatura di annealing

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Temp
β -actina	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA	59°C
IL-4	TGGTGTTCTTCGTTGCTGTG	TGGTGTTCTTCGTTGCTGTG	60°C
IL-6	ACCAAACCTGGATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCA	58°C
IL-10	CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTGAT	TTTTCACAGGGGAGAAATCG	56°C
IFN- γ	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG	59°C
TNF- α	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	GGTCTGGGCCATAGAAGTGA	60°C
HIF-1 α	GCACTAGACAAAGTTCACCTGAGA	CGCTATCCACATCAAAGCAA	59°C
EPAS1	GTGTGTCAAACCTATGTGCTGA	GTGTGGCTTGAACAGGGATT	59°C

La mix di reazione per ciascun campione è costituita da:

2 μ l di cDNA campione

0,75 μ M primer Forward e 0,75 μ M Reverse

acqua RNAsi free

SYBR Green PCR Master mix secondo le indicazioni della ditta fornitrice

Nel controllo negativo sono stati utilizzati 2 μ l di acqua RNAsi free al posto del cDNA. L'amplificazione è stata condotta utilizzando lo strumento Lightcycler II (Roche) con il seguente programma: 15 minuti a 95°C per attivare la Taq DNA polimerasi; 20 secondi alla temperatura di appaiamento che dipende dalla coppia di primers utilizzati; 15 secondi a 95°C per la denaturazione; 10 secondi a 72°C per l'estensione. Tali cicli sono stati ripetuti in media 40 volte.

I dati sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa dell'algoritmo della derivata seconda. Tale metodo consente di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un campione ed il relativo controllo. Per poter effettuare tale confronto è necessario disporre di uno "standard interno", di un riferimento, comune sia al campione trattato, sia al controllo ed espresso costitutivamente in entrambi. Tali geni costitutivi, denominati

housekeeping, sono caratterizzati dal fatto che la loro espressione segue l'attività trascrizionale della cellula: ne consegue che la quantità di RNA e quindi di cDNA utilizzato quale template è ad essa proporzionale. Tale valore, che risulta attendibile a parità di efficienza di amplificazione del gene target e dell' housekeeping, esprime dunque l'entità dell'espressione differenziale del gene d'interesse tra il campione ed il suo controllo.

Per ogni campione (analizzato in triplicato) è stato individuato il valore di Ct del gene di interesse e di quello housekeeping. È stata quindi calcolata la loro differenza che rappresenta il ΔCt in modo tale che la quantità di ogni messaggero codificante il gene di interesse sia normalizzata rispetto al gene housekeeping. Per ogni gruppo di trattamento è stato calcolato il ΔCt medio e la deviazione standard. La differenza tra il ΔCt di un qualsiasi gruppo di trattamento ed il ΔCt del gruppo controllo rappresenta il $\Delta\Delta Ct$, derivandone che il $\Delta\Delta Ct$ del gruppo controllo è pari a zero. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che per il gruppo dei campioni controllo sarà quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni non trattati). Con tale metodo per ogni campione la quantità del gene di interesse analizzato è quindi espressa come n-volte rispetto alla quantità presente nel fegato degli animali controllo (non trattati). Tutti i dati vengono espressi come media \pm errore standard. L'analisi statistica è stata condotta mediante *t* test di Student. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

3.5 Saggio di Griess

Il saggio di Griess è un metodo comunemente utilizzato per la determinazione indiretta dell'NO che coinvolge la misura spettrofotometrica di nitriti e nitrati. Questo metodo richiede che i nitrati siano prima ridotti a nitriti e poi determinati

mediante la cosiddetta reazione di Griess (*Griess, 1879*). Al termine della reazione si forma un composto rosso rilevabile spettrofotometricamente a 540 nm (Abs).

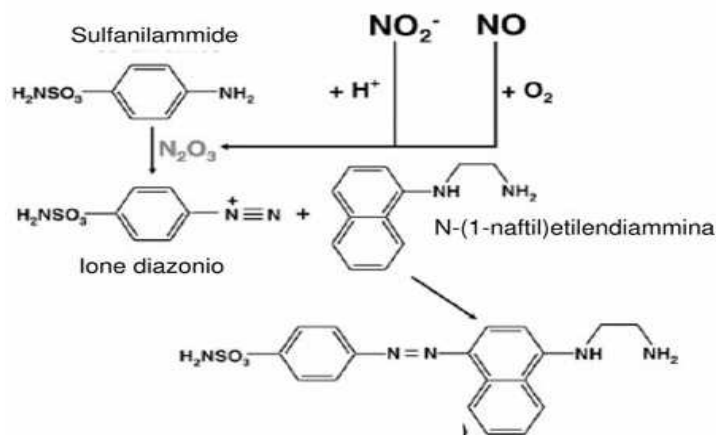


Figura 3.1 Reazione di Griess

La produzione di NO è stata testata su colture cellulari di RAW 264.7, una linea di monociti-macrofagi derivanti da topo Balb/c maschio a cui era stata indotta una leucemia di Albeson (*Raschke, 1978*). Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM (Gibco) addizionato di 10% v/v di FBS (Gibco), DMEM (Gibco), 2 mM Lglutammina, 100 U penicillina/0,1 mg streptomina/ml (Gibco). Le cellule sono state divise tre volte a settimana mediante raschiamento e distacco delle cellule con cell-scraper (Invitrogen). Il giorno antecedente il trattamento con le sostanze stimolo, le cellule sono state piastrate su una 6-well ad una densità di 3×10^6 cellule per pozzetto. L'induzione dello stimolo è stata effettuata in terreno uguale a quello di coltura, ma utilizzando DMEM senza rosso fenolo (Gibco). È stato testato l'effetto di CCl_4 alla concentrazione di $1 \mu\text{M}$ e della DEN alla concentrazione di 40 mM. Come controllo positivo è stata effettuata la stimolazione delle RAW 264.7 con l'LPS (Lipopolisaccaride derivato da *Escherichia Coli*, Sigma), sostanza nota per attivare la produzione di NO nei monociti. L'LPS è stato utilizzato alla concentrazione di $1 \mu\text{g/ml}$. L'incubazione è stata effettuata in incubatore a 37°C per 24 ore al termine delle quali è stato effettuato il test di Griess per valutare la produzione di NO. Il reattivo di Griess è stato preparato con 0,1% N-(1-

naftil)etilendiammina e 1% sulfanilammide in HCl 0,4 M. I surnatanti delle colture cellulari sono stati raccolti e trattati con il reattivo di Griess in rapporto 1:1. La reazione è stata protratta per 15 minuti a temperatura ambiente al buio. Al termine è stata effettuata una lettura spettrofotometrica in duplicato con lettore ELISA (Packard Fusion Microplate Reader) alla lunghezza d'onda di 540nm. La concentrazione di NO presente nei surnatanti è stata estrapolata da una retta di taratura effettuata con concentrazioni note di nitrito di sodio (NaNO_2 da 0 a 100 μM , Sigma Aldrich) fatte reagire con il reattivo di Griess.

4. RISULTATI

4.1 Primo esperimento danno acuto

4.1.1 Sopravvivenza

Nel primo esperimento di danno acuto gli animali sono stati suddivisi in due gruppi. Nel Gruppo A, trattato con due dosi di Monocrotalina e successivamente con CCl₄ per indurre il danno abbiamo riscontrato il decesso spontaneo di un animale maschio e di un animale femmina, pari al 12.5% degli animali trattati (16 animali). La femmina è deceduta dopo 20 minuti dalla somministrazione di CCl₄ e gli organi prelevati (fegato, cuore, polmoni, milza, reni) non hanno mostrato evidenze di danno. Ipotizziamo che il decesso sia stato causato da depressione profonda dei centri respiratori bulbari indotto dal CCl₄. Il decesso dell'animale maschio avvenuto a circa 18 ore dal danno è probabilmente imputabile al grave danno epatico subito, anche se non è stato possibile analizzare gli organi per sopraggiunto *rigor mortis*.

Gli animali del Gruppo B, trattati esclusivamente con CCl₄, sono sopravvissuti fino alla fine dell'esperimento (decessi 0%).

4.1.2 Analisi della prima risposta al danno acuto

Al momento dell'espanto il fegato degli animali sia del Gruppo A sia del Gruppo B sacrificati a 24 ore dall'induzione del danno si presentava all'esame macroscopico di colore biancastro, al contrario degli animali controllo nei quali il fegato presentava il classico colore rosso-brunastro. Non si sono rilevate differenze macroscopiche tra gli animali di sesso maschile e quelli di sesso femminile.

L'analisi istologica effettuata previa colorazione ematossilina-eosina ha evidenziato a 24 ore dall'induzione del danno nelle sezioni epatiche degli animali del Gruppo A, trattati con Monocrotalina+CCl₄ ampie aree di necrosi localizzata

Risultati

nella zona 2 e 3 del lobulo epatico mentre la zona 1 rimane vitale. Il danno è quindi limitato prevalentemente alla zona centro lobulare, localizzazione tipica di danno indotto mediante agente tossico. La localizzazione e l'entità del danno è pressoché uguale nei due sessi. L'analisi semiquantitativa effettuata da due operatori distinti ha rivelato un'entità del danno pari al grado massimo della scala adottata, sia nei maschi che nelle femmine (**Fig. 4.1**).

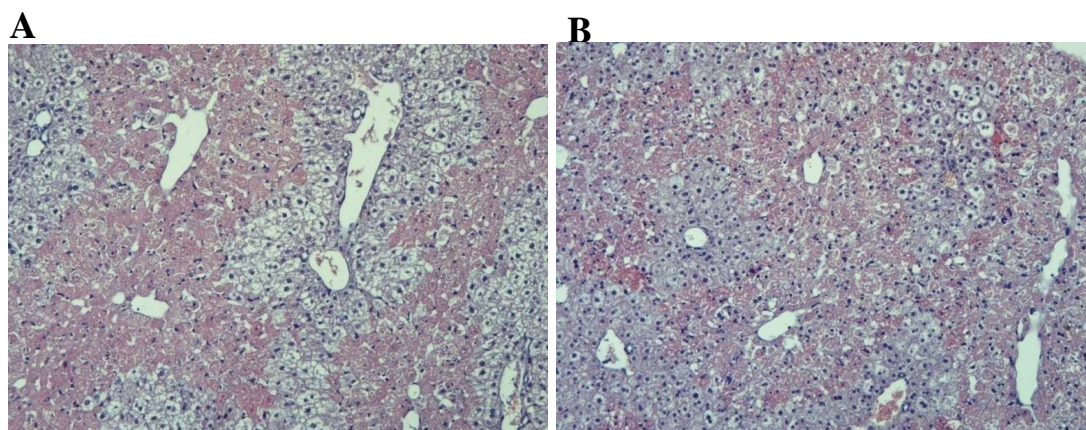


Figura 4.1 Colorazione ematossilina-eosina delle sezioni di fegato ottenute da animali del Gruppo A sacrificati a 24 ore dalla somministrazione della tossina epatica. A) Animali maschi B) Animali femmina. Ingrandimento 100x

Allo stesso modo, le sezioni epatiche degli animali del Gruppo B, trattati con solo CCl_4 , a 24 ore dal danno hanno evidenziato necrosi centro lobulare paragonabile al gruppo A e senza differenze significative nei due sessi per quanto riguarda localizzazione ed entità (stadio 5 della scala di danno) (Fig 4.2)

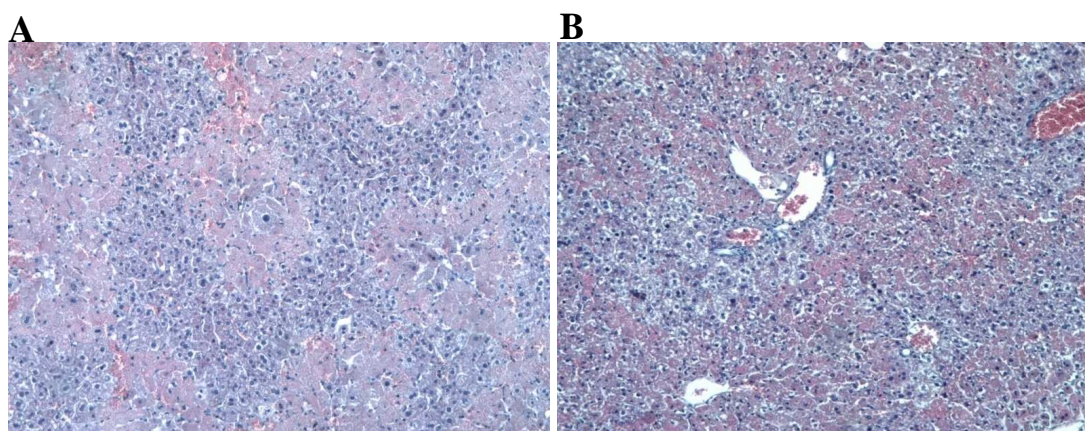


Figura 4.2 Colorazione ematossilina-eosina delle sezioni di fegato ottenute da animali del Gruppo A sacrificati a 24 ore dalla somministrazione della tossina epatica. A) Animali maschi B) Animali femmina. Ingrandimento 100x

I campioni ematici prelevati al momento del sacrificio sono stati sottoposti ad analisi bioumorali per marcatori di funzionalità epatica (bilirubina totale, coniugata e non coniugata) e marcatori di necrosi epatica (AST, ALT). L'analisi ha rivelato una differenza a 24 ore dal danno tra gli animali trattati e gli animali controllo sani per quanto riguarda tutti i parametri bioumorali considerati (Fig. 4.3). L'analisi statistica ha rilevato significatività ($p < 0,05$) esclusivamente per gli indicatori di necrosi ALT e AST tra trattati e controlli, mentre la differenza tra gli altri indicatori considerati, pur evidente, non è risultata significativa a causa dell'elevata variabilità riscontrata e del numero degli animali. Ipotizziamo che tale variabilità sia da ricercare nel metodo utilizzato, sviluppato per la quantificazione dei marcatori su campioni ematici umani.

Pur non risultando significativa abbiamo osservato negli animali del gruppo A una tendenza dei valori di necrosi epatica ad essere leggermente superiori rispetto ai valori degli animali del gruppo B (Fig. 4.3 C e D)

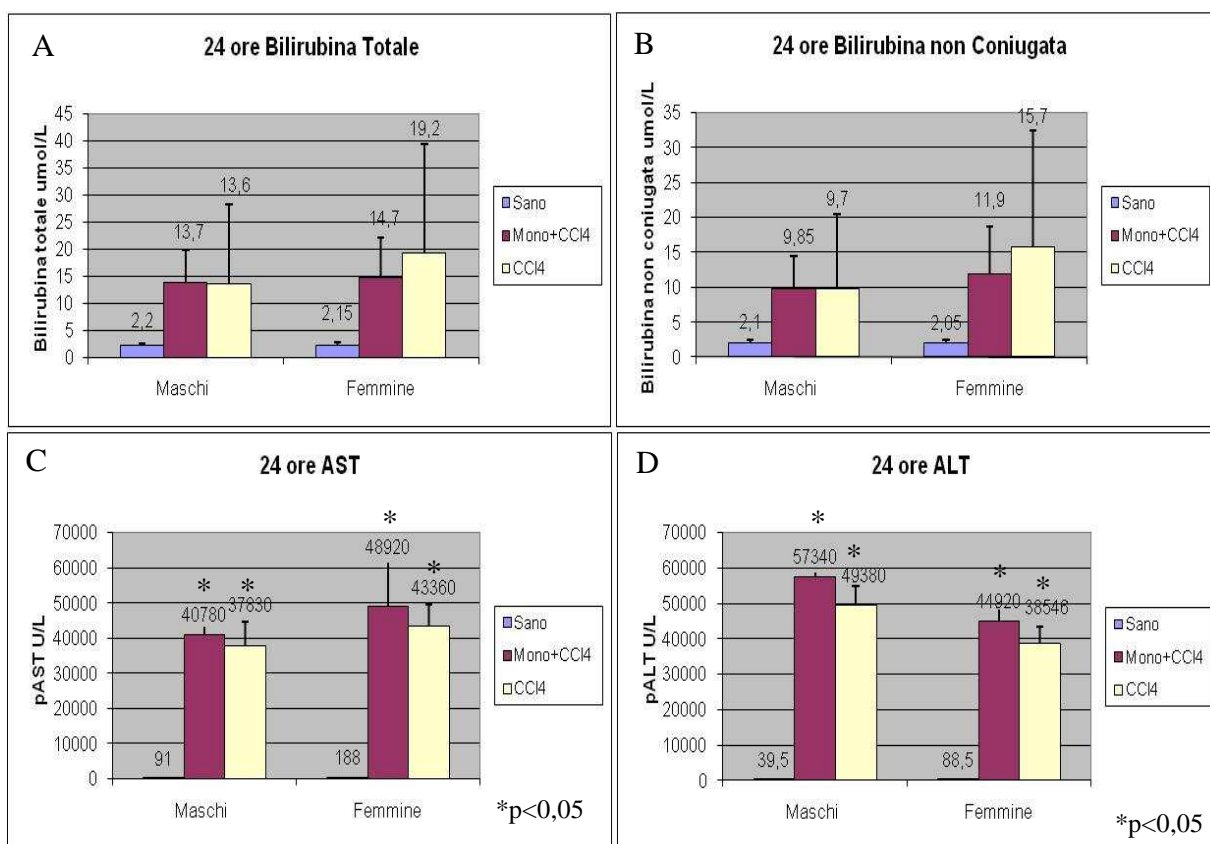


Fig. 4.3 Analisi bioumorali dei campioni ematici prelevati al momento del sacrificio degli animali del Gruppo A (mono+CCl₄) e del Gruppo B (CCl₄). * $p < 0,05$

L'analisi immunohistochimica effettuata per la ricerca di Citocheratine e α SMA non ha evidenziato la presenza di cellule ovali e cellule stellate. Il tempo intercorso tra il danno e il sacrificio è stato, infatti, troppo breve per permettere l'attivazione e la proliferazione di entrambi i tipi cellulari. La necrosi inoltre è ancora troppo diffusa per permettere l'identificazione di specifiche popolazioni cellulari.

4.1.3 Analisi della fase tardiva

Ad 8 giorni dal danno il fegato prelevato dagli animali di entrambi i sessi, sia del Gruppo A (monocrotalina+CCl₄) sia del Gruppo B (solo CCl₄), presentava un colore pressoché nella norma ma con residue aree biancastre, presenti soprattutto nelle aree periferiche dell'organo.

All'esame macroscopico non si sono rilevate differenze tra gli animali di sesso maschile e quelli di sesso femminile in entrambi i gruppi di trattamento.

Una più importante differenza tra i due sessi si è invece riscontrata all'analisi istologica. Analizzando, infatti, le sezioni epatiche di topi di sesso maschile ad otto giorni dal danno, sia del Gruppo A sia del Gruppo B sono state riscontrati degli agglomerati pigmentati con localizzazione centroacinare in zone di citolisi in quasi il 90% degli spazi portalì (Fig. 4.4). Sono inoltre evidenziabili residue aree di necrosi limitata alla vena centroacinare.

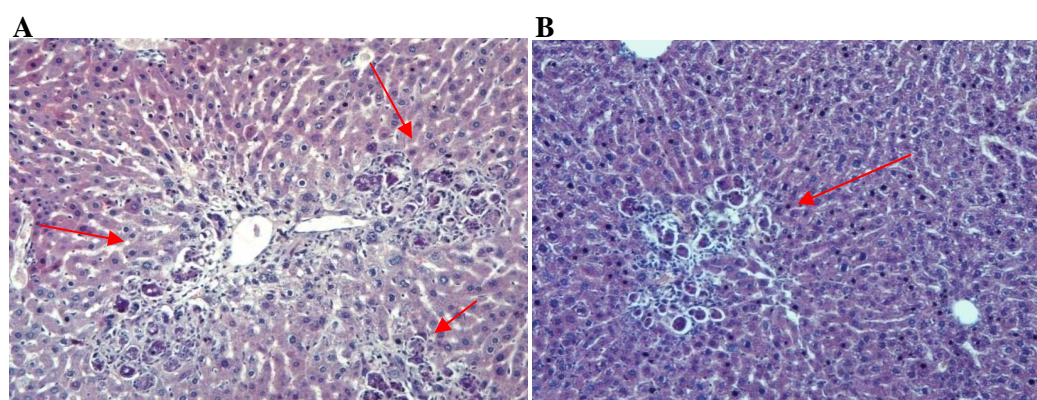


Fig. 4.4 Colorazione ematossilina-eosina delle sezioni epatiche ottenute da animali maschi sacrificati a 8 giorni dall'induzione del danno. A) Gruppo A B) Gruppo B. Ingrandimento 100x.

L'analisi semiquantitativa effettuata ha evidenziato danno di entità intermedia tra il grado 3 e il grado 4.

Gli agglomerati iperpigmentati riscontrati nei fegati dei topi maschi sono stati caratterizzati a livello istologico e funzionale. È stata quindi effettuata una colorazione immunostochimica per il marcatore CD68, una proteina della membrana lisosomiale altamente glicosilata appartenente alla famiglia delle proteine lisosomiali/plasmatiche trasportatrici di membrana, le quali svolgono un importante ruolo nella endocitosi e nella funzione lisosomiale. Tale proteina è espressa in maniera intensa nei granuli citoplasmatici di macrofagi e monociti. Tutti gli agglomerati individuati sulle sezioni degli animali maschi del Gruppo A e del Gruppo B sono risultati positivi per tale marcatore di linea (Fig. 4.6 A).

È stata inoltre effettuata la colorazione PAS-D che permette di evidenziare la presenza di materiale necrotico nel citoplasma delle cellule macrofagiche, dimostrandone la funzionalità. All'analisi delle sezioni le aree pigmentate sono risultate elementi macrofagici con citoplasma ampio contenente materiale PAS positivo, diastasi resistente sia sotto forma di zolle grossolane, sia di aspetto cilindroide, bacilliforme (Fig. 4.5 B).

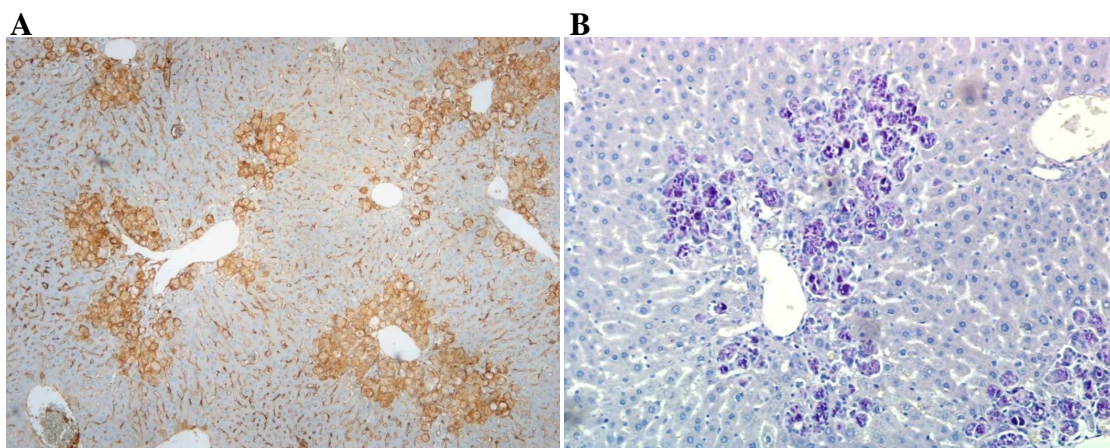


Figura 4.5 Caratterizzazione immunostochimica e funzionale delle aree macrofagiche effettuata su sezioni epatiche dei topi maschi. Le immagini riportate sono rappresentative sia per il Gruppo A sia per il Gruppo B. A) IHC anti-CD68 B) PAS-D. Ingrandimento 100x.

Risultati

Tali agglomerati macrofagici non sono stati riscontrati in nessuno dei fegati degli animali di sesso femminile di entrambi i gruppi. Al contrario, nelle sezioni delle femmine del Gruppo B la rigenerazione epatica risulta pressoché completa, senza evidenze di flogosi in corso e una valutazione semiquantitativa pari al grado 0 (Fig. 4.5 B). Le sezioni epatiche dei topi femmina del Gruppo A, invece, mostrano alcuni focolai residui di necrosi localizzata a livello centro lobulare pari ad una valutazione morfogenica di grado 1-2 della scala adottata come evidente nella Figura 4.6A.

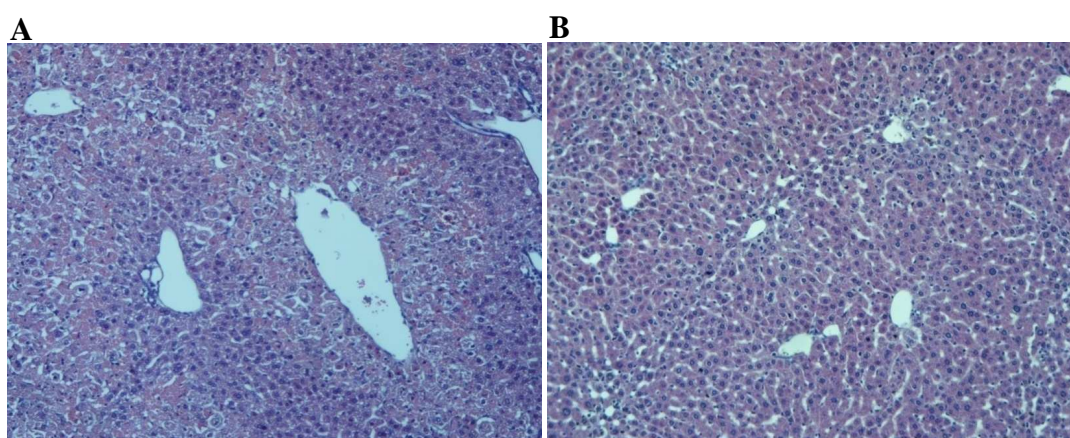


Fig. 4.6 Colorazione ematossilina-eosina delle sezioni epatiche degli animali di sesso femminile sacrificate a 8 giorni dall'induzione del danno. A) Gruppo A; B) Gruppo B. Ingrandimento 100x.

La differenza tra i due sessi rilevata nel quadro istologico non si riflette però in una differenza statisticamente significativa nei valori ematici di funzionalità epatica (bilirubina totale, coniugata e non coniugata) e nei valori di necrosi epatica (ALT, AST). Ad otto giorni dal danno i valori sono tornati tutti pressoché nella norma e paragonabili nei due sessi (Fig. 4.7).

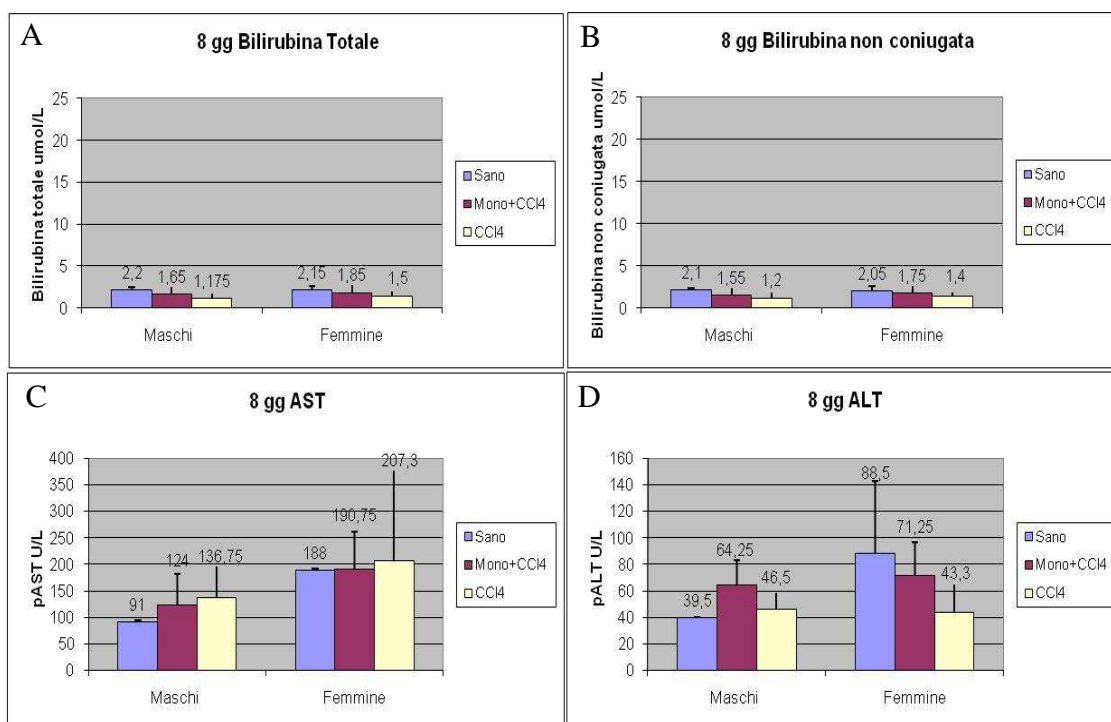


Fig. 4.7 Analisi del sangue ad 8 giorni dal danno. Vengono riportati i valori di A) bilirubina totale, B) bilirubina non coniugata, C) AST, D) ALT degli animali controllo, animale del gruppo A e del gruppo B di entrambi i sessi.

Una volta stabilito il quadro istologico siamo passati a valutare la presenza di cellule ovali attivate mediante immunostochimica per le citocheratine. Anche in questo caso abbiamo riscontrato un diverso quadro di attivazione tra maschi e femmine. Mentre i maschi sia del Gruppo A sia del Gruppo B presentavano reattività in prossimità degli agglomerati pigmentati in quelli che sembrano essere piccoli dotti di neoformazione (Fig. 4.8 A e B), nelle femmine si osserva la presenza di alcune cellule isolate localizzate attorno ai dotti biliari (Fig. 4.8 C e D). Negli animali femmine si è osservata inoltre una differenza circa il numero di cellule attivate tra Gruppo A e Gruppo B anche se non è risultata significativa. Nel gruppo A, dove la replicazione degli epatociti è stata bloccata tramite la Monocrotalina, si sono osservate un totale di $29,3 \pm 3,1$ cellule positive nei 10 campi considerati (ingrandimento 200x), mentre nel gruppo B, trattate solo con CCl₄, sono state individuate un totale di $24,4 \pm 2,2$ cellule (ingrandimento 200x). Negli animali controllo sono state evidenziate un totale di $9,7 \pm 2,5$ cellule positive.

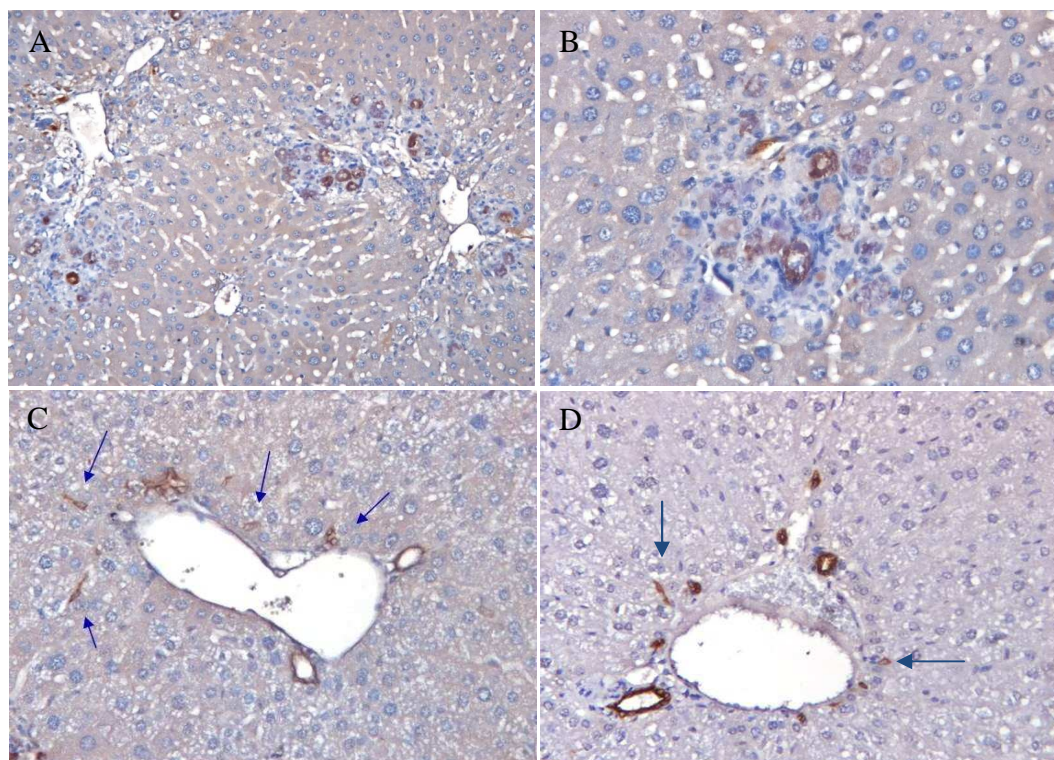


Fig 4.8 IHC per CK (marcatore delle cellule ovali). Le sezioni corrispondono a: A) maschi del Gruppo A Ingrandimento 100x, B) maschi del Gruppo B. Ingrandimento 200x, C) femmine del gruppo A Ingrandimento 100x,; D) femmine del gruppo B Ingrandimento 100x.I

L'immunohistochimica effettuata per il marcatore tipico delle cellule stellate attivate, l' α SMA, rileva una significativa presenza di cellule positive con disposizione periportale ad otto giorni dal danno sia nelle sezioni epatiche di topi maschi sia di topi femmina di entrambi i gruppi di trattamento (Fig. 4.9). I segmenti periportali positivi per α SMA sono risultati presenti nel $90,5 \pm 2,5\%$ dei lobuli individuati in 10 campi ottici (ingrandimento 100x) nelle sezioni dei maschi del Gruppo A mentre solamente nel $65,4 \pm 3,8\%$ nei maschi del Gruppo B. La differenza tra i due trattamenti è risultata statisticamente significativa ($p < 0,01$). Per quanto riguarda gli animali di sesso femminile, nelle sezioni epatiche derivate da animali del gruppo A sono stati individuati segmenti periportali positivi per α SMA nell' $89,5 \pm 5,1\%$, mentre, analogamente ai maschi sono stati individuati in minor numero nelle sezioni degli animali del gruppo B ($70,8 \pm 4,2\%$). Anche in questo caso la differenza tra i due trattamenti è risultata statisticamente significativa ($p < 0,005$). I dati sono riportati in grafico nella figura 4.10.

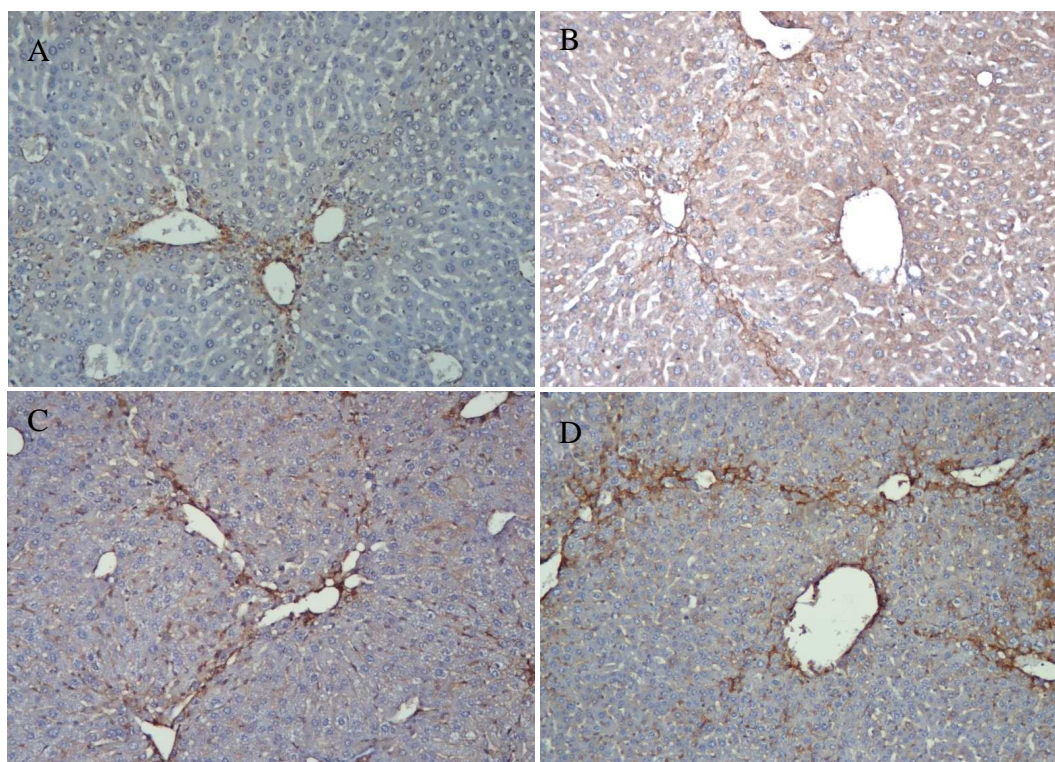


Fig 4.9 IHC α SMA (marcatore delle cellule stellate), immagini rappresentative della reattività. Le sezioni epatiche corrispondono a: A) maschi del gruppo A B) maschi del gruppo B, C) femmine del gruppo A; D) femmine del gruppo B. Ingrandimento 200X.

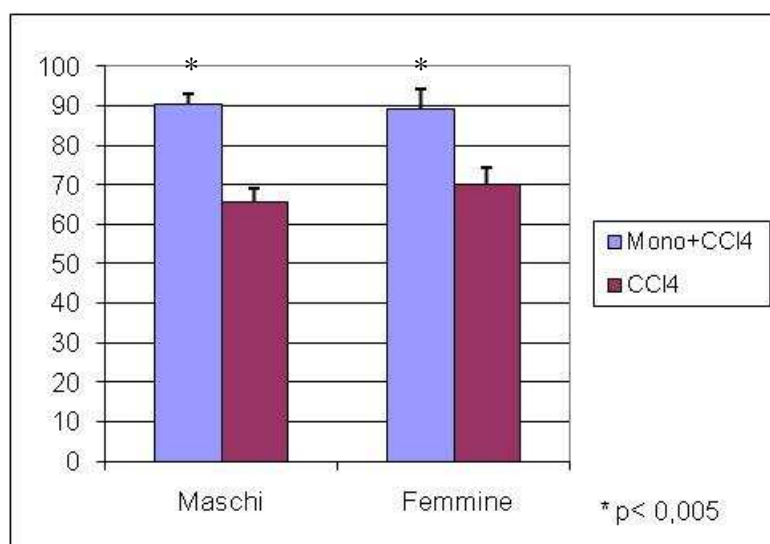


Fig. 4.10 Numero di lobuli interessati da segmenti positivi per α SMA nel modello Monocrotalina+CCl4 e nel modello solo CCl4 in 10 campi ottici. I valori sono indicati con media \pm SEM.

Risultati

All'iniziale attivazione delle cellule stellate non è stata individuata un conseguente deposito di fibre collagene, come evidenzia la colorazione speciale di Masson che colora in verde le fibre collagene. Le fibre di collagene evidenziate in verde sono risultate quantitativamente poco rilevanti come dimostra la Figura 4.10.

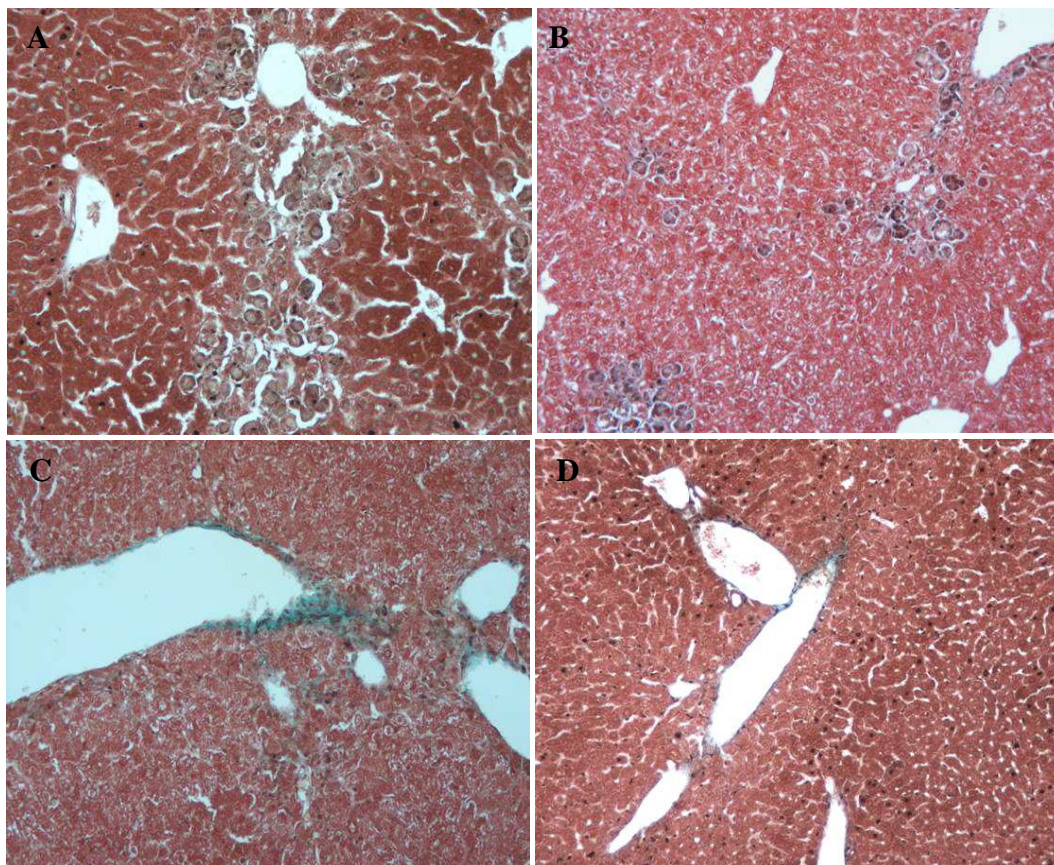


Fig. 4.10 Colorazione tricromica di Masson. Le sezioni epatiche corrispondono a: A) maschi del Gruppo A B) maschi del Gruppo B, C) femmine del Gruppo A; D) femmine del Gruppo B. Ingrandimento 100x,

4.2 Secondo esperimento danno acuto

Nel primo esperimento di danno epatico acuto avevamo analizzato esclusivamente due tempi dall'induzione del danno e solamente dal punto di vista istologico. Abbiamo quindi ripetuto il modello del Gruppo B (solo danno con CCl_4) sacrificando gli animali a 48 ore, 5, 8 e 12 giorni, al fine di valutare la rigenerazione a tempi intermedi e successivi a quelli già valutati. Inoltre, all'analisi istologica e

immunoistochimica è stata affiancata l'analisi del quadro citochinico valutato mediante Real Time PCR.

4.2.1 Sopravvivenza

Dei 40 animali trattati con CCl_4 (20 maschi e 20 femmine) 3 femmine (15%) e un maschio (5%) sono deceduti spontaneamente a 24 ore circa dal danno. A causa del sopraggiunto rigor mortis non è stato possibile prelevare ed analizzare gli organi. È plausibile, anche in questo caso, che il decesso sia stato causato dal grave danno epatico indotto dal CCl_4 . Gli altri animali trattati e i controlli sono sopravvissuti fino al momento del sacrificio.

4.2.2 Progressione del danno istologico

Le sezioni epatiche derivanti dagli animali sacrificati a 48 ore dal danno presentavano un quadro istologico paragonabile a quello delle 24 ore del primo esperimento. È stata infatti evidenziata necrosi confluyente coagulativa centroacinare che in alcuni casi connetteva due spazi portalari consecutivi (necrosi a ponte). L'analisi semiquantitativa effettuata ha evidenziato un grado di danno pari a 5, uguale negli animali di entrambi i sessi. (Fig. 4. 11)

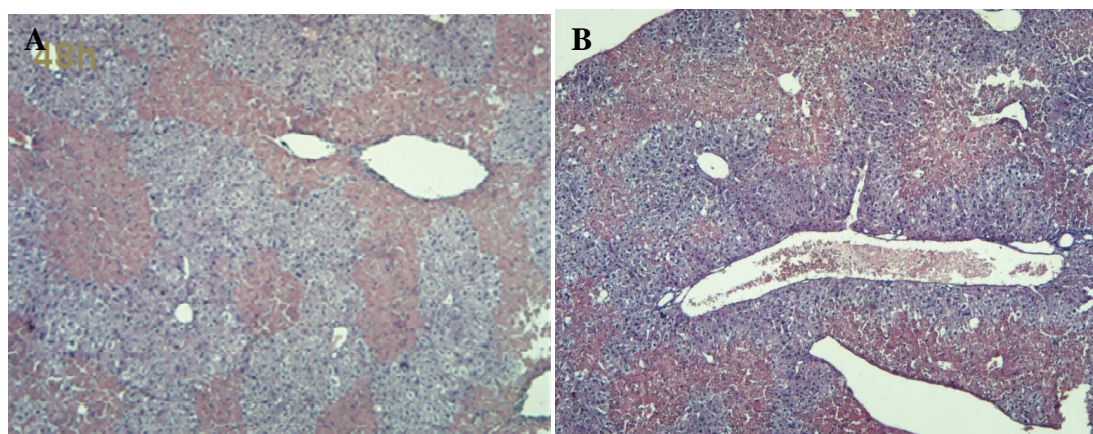


Fig. 4.11 Colorazione ematossilina-eosina di sezione epatiche di animali sacrificati a 48 ore dall'induzione del danno. A) Animali maschi B) Animali femmina (B). Ingrandimento 100x

Risultati

L'analisi istologica effettuata sulle sezioni degli animali sacrificati a 5 giorni dal danno mostra nelle femmine un quadro di risoluzione avanzata con piccole zone di necrosi residua e aree di citolisi determinata dall'infiammazione in corso (grado di danno intermedio tra il 3 e il 4). In alcune zone sono state individuate aree compatibili con macrofagi attivi (Fig. 4.12A). Gli animali di sesso maschile mostrano invece ancora aree di necrosi con infiltrato infiammatorio, senza evidenze di attivazione macrofagica (Fig. 4.12B). All'analisi semiquantitativa è stato assegnato per gli animali maschi sacrificati a 5 giorni un grado di danno intermedio tra 4 e 5.

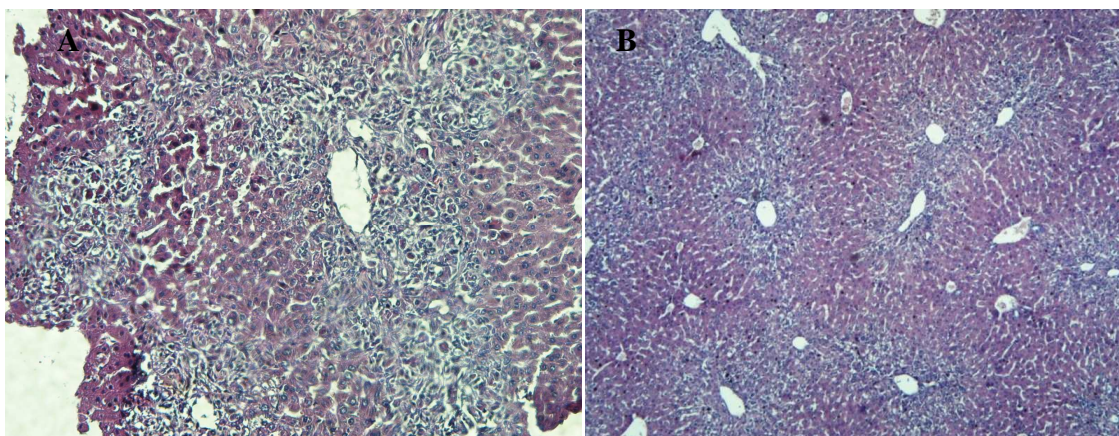


Fig. 4.12 Colorazione ematossilina-eosina di sezione epatiche di animali sacrificati a 5 giorni dall'induzione del danno. A) Animali maschi B) Animali femmina (B). Ingrandimento 100x

Ad otto giorni dal danno abbiamo riscontrato un quadro istologico paragonabile allo stesso end-point del primo esperimento. Evidenziamo, infatti, un quadro di rigenerazione pressochè totale nelle sezioni epatiche degli animali di sesso femminile, mentre nelle sezioni epatiche dei topi maschi compaiono gli agglomerati macrofagici (Fig. 4.13 A e B), che rimangono visibili sino a 12 giorni dal danno (Fig. 4.13 C e D).

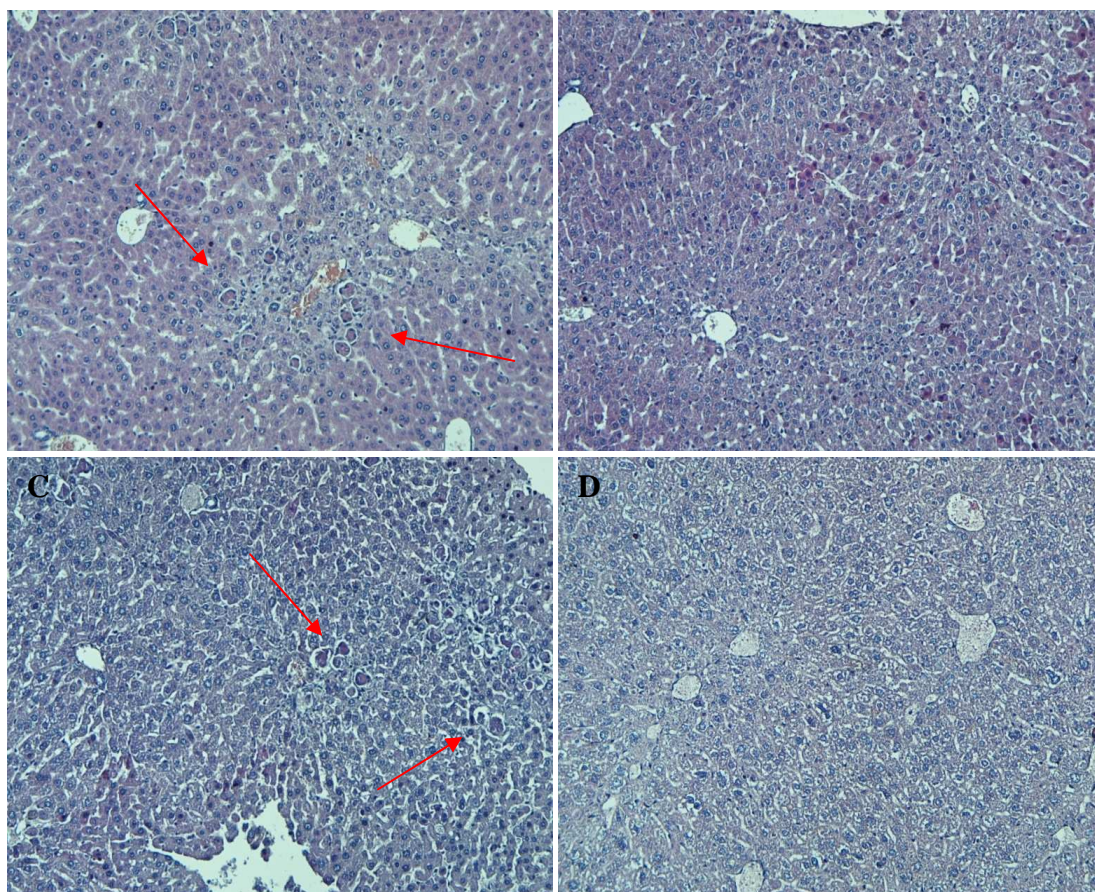


Fig. 4.13 Colorazione ematossilina-eosina di sezioni epatiche di: A) animali maschi sacrificati ad 8 giorni dall'induzione del danno, B) Animali femmina sacrificate ad 8 giorni dall'induzione del danno, C) animali maschi sacrificati a 12 giorni dall'induzione del danno, D) Animali femmina sacrificate ad 8 giorni dall'induzione del danno. Ingrandimento 100x. In A e C le frecce indicano gli aggregati macrofagici.

4.2.3 Analisi del quadro infiammatorio

Data l'importante componente infiammatoria che abbiamo riscontrato all'analisi istologica è stato analizzato il quadro citochinico mediante analisi dell'espressione genica con Real Time PCR nel fegato *in toto*. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i dati sono indicati come $media \pm SEM$.

Anche in questo caso abbiamo riscontrato una differenza nei due sessi, in particolare per quanto riguarda 3 delle 6 citochine testate: IFN- γ (tipica citochina Th1), IL-4 (tipica citochina Th2) e TNF- α (prodotto principalmente dai macrofagi). Calcolando l'espressione basale nei fegati degli animali non trattati, abbiamo

Risultati

osservato una sovra-regolazione del mRNA per l'IFN- γ già a partire dalle 48 ore dal danno negli animali maschi ($1,42 \pm 0,12$ volte rispetto al controllo). L'espressione rimane pressoché stabile anche a 5 giorni dal danno ($1,48 \pm 0,13$). Nei fegati dei topi femmina invece, abbiamo osservato un'importante attivazione della trascrizione dell'IFN- γ a 5 giorni dal danno ($3,96 \pm 0,06$) che è risultata essere statisticamente significativa ($p < 0,05$). A 8 giorni dal danno i valori tornano al di sotto del livello basale in entrambi i sessi ($0,86 \pm 0,01$ nei fegati dei topi maschi e $0,44 \pm 0,01$ nei fegati dei topi femmina). I valori sono rappresentati in grafico nella figura 4.6A.

Per quanto riguarda l'IL-4 abbiamo osservato un'attivazione molto tardiva dell'espressione, che supera il livello basale solo dopo 8 giorni dal danno ed esclusivamente nei fegati degli animali di sesso maschile raggiungendo un valore di $4,75 \pm 0,2$ ($p < 0,01$) (Fig. 4.14 B).

L'analisi dell'espressione del TNF- α ha evidenziato nei campioni epatici dei maschi una leggera sovra-regolazione ($1,5 \pm 0,9$) a 2 giorni dal danno, mentre raggiunge il livello massimo di espressione a 5 giorni quando raggiunge un valore di $9,1 \pm 0,02$, statisticamente significativo ($p < 0,01$). I valori tornano al valore basale a 8 giorni dal danno ($1,14 \pm 0,01$). Nei fegati degli animali di sesso femminile, al contrario abbiamo evidenziato una sovra-regolazione più contenuta rispetto ai campioni dei topi maschi ed esclusivamente a 5 giorni dal danno ($3,39 \pm 0,1$), valore che risulta in ogni caso statisticamente significativo ($p < 0,05$). L'andamento è evidenziato in grafico nella figura 4.14 C.

Al contrario, la citochina IL-6, riportata in letteratura essere legata al sesso non ha rilevato differenze significative nei 2 sessi anche se mostra un'attivazione dell'espressione leggermente maggiore nei campioni dei topi di sesso femminile rispetto a quelli maschili già a partire dalle 48 ore dall'induzione del danno. Infatti, a 2 giorni dall'induzione abbiamo riscontrato un valore di $0,28 \pm 0,2$ nei fegati dei topi maschi contro $1,59 \pm 0,5$ nei fegati di topi femmina. A 5 giorni dal danno l'espressione sale a $2,36 \pm 0,1$ nei campioni dei topi maschi e a $3,24 \pm 0,1$ nei campioni degli animali di sesso femminile. I valori tornano al di sotto dei valori basali a 8 giorni dal danno (Fig. 4.14 D).

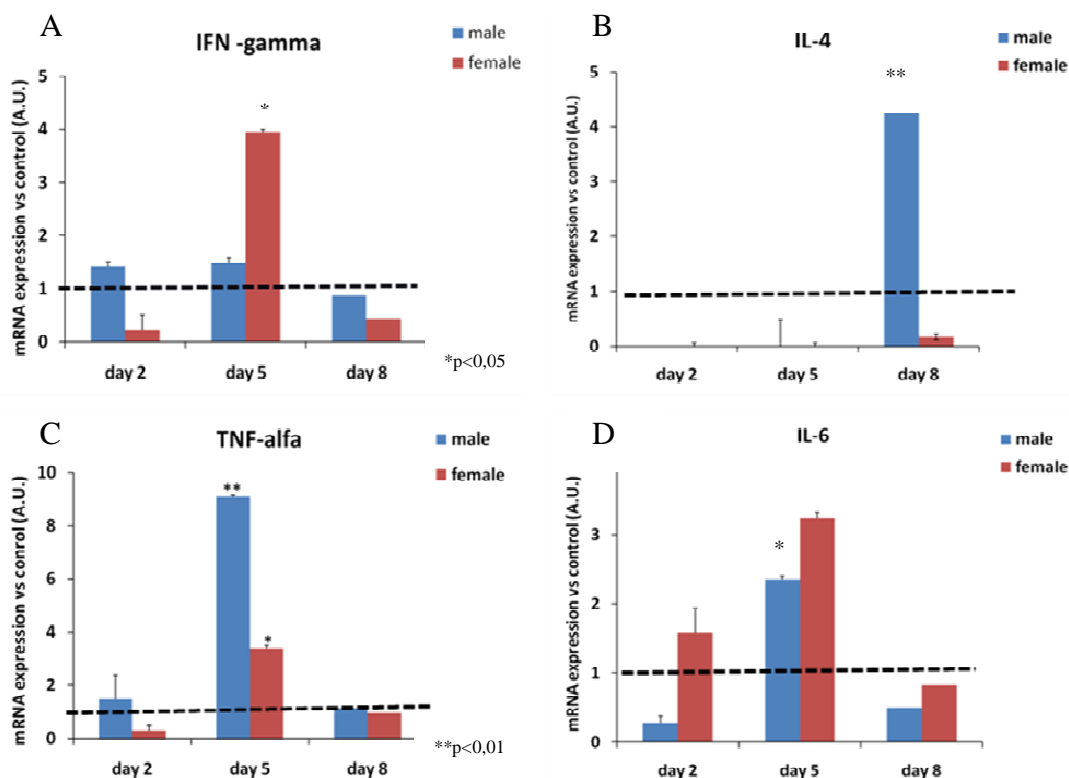


Fig. 4.14 Espressione genica di A) IFN gamma, B) IL-4 C) TNF-alfa e D) IL-6 I valori sono indicati come unità arbitrarie rispetto all'animale controllo non trattato. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

4.2.4 Analisi della presenza di cellule stellate attivate

Le sezioni ottenute dagli animali sacrificati a 48 ore, 5, 8 e 12 giorni dal danno sono stati analizzati per l'espressione del marcatore α SMA.

A 48 ore dal danno non si sono osservate cellule positive all' α SMA, compatibilmente con l'alto grado di danno e necrosi evidenziato (grado 5).

A 5 giorni dal danno abbiamo riscontrato un'iniziale attivazione delle cellule stellate comparabile nei due sessi. Nelle sezioni epatiche degli animali maschi il $50,3 \pm 2,2\%$ dei lobuli epatici ha presentato segmenti periportali positivi per il marcatore, mentre nelle sezioni degli animali femmina è risultato positivo il $53,6 \pm 4,2\%$ dei lobuli, senza alcuna differenza significativa.

Ad 8 giorni dal danno il quadro di attivazione delle cellule stellate è pressoché comparabile con quello evidenziato nel primo esperimento. I lobuli con

Risultati

segmenti periportali costituiti da cellule stellate attivate sono risultati l'87,4±5.2% nei fegati dei topi maschi e l'85,5±6.1% nei topi femmina. La differenza tra i due sessi non è risultata statisticamente significativa, mentre la differenza tra i 5 e gli 8 giorni è risultata statisticamente significativa ($p<0,05$).

A 12 giorni dal danno abbiamo osservato una riduzione importante della reattività compatibilmente con il grado di risoluzione del danno mediato dalle cellule infiammatorie e dalla proliferazione degli epatociti. Nelle sezioni epatiche degli animali maschi sono stati riscontrati il 33,7±2.1% dei lobuli con cellule stellate attivate, mentre nelle sezioni dei topi femmina 29,3±3.3%. La differenza riscontrata tra gli animali sacrificati a 8 giorni e gli animali sacrificati a 12 giorni è risultata statisticamente significativa ($p<0,05$).

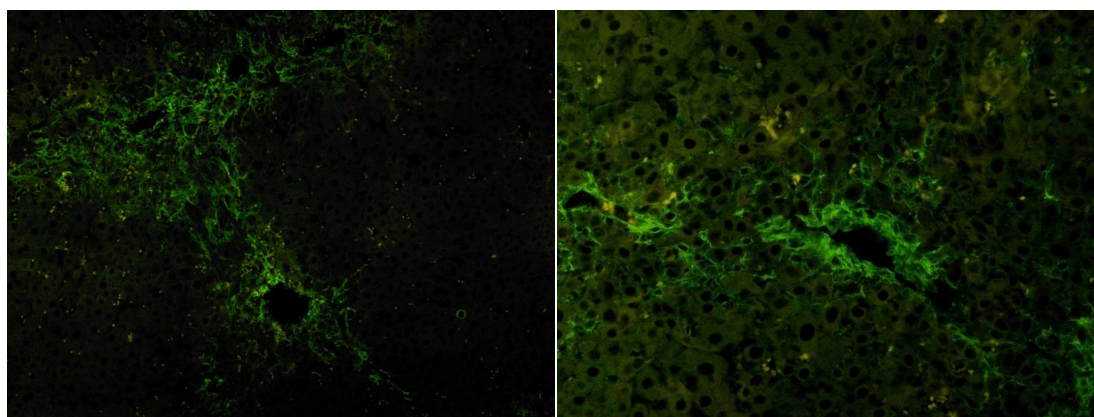


Fig. 14.15 IHC per α SMA (marcatore cellule stellate). La figura riporta due immagini rappresentative del segnale positivo per il marcatore α SMA riscontrato nelle sezioni di entrambi i sessi a partire dai 5 giorni dopo il danno.

4.3 Danno cronico potenzialmente cancerogeno

4.3.1 Sopravvivenza ed esame macroscopico

Gli animali trattati con DEN fino a 5 mesi non hanno riscontrato segni visibili di malessere generale e sono sopravvissuti tutti fino alla fine del trattamento (0% di decessi).

All'esame macroscopico il fegato non presentava alterazioni morfologiche. Dal secondo mese di trattamento è stata riscontrata epatomegalia che si è ripresentata anche nei tempi successivi fino al 5 mese. Questa alterazione non è stata riscontrata negli animali controllo.

Nessuna alterazione macroscopica è stata riscontrata negli altri organi prelevati (rene, milza e piccolo intestino) e nella cavità peritoneale.

4.3.2 Quadro istologico

La DEN, come noto in letteratura, è un forte agente cancerogeno ma nei nostri animali non sono stati individuati focolai tumorali nemmeno dopo 5 mesi di trattamento continuativo. L'analisi istologica del fegato mostra un importante infiltrato infiammatorio che risulta visibile a partire già dal primo mese di trattamento. Il quadro infiammatorio progredisce poi nei mesi successivi con una netta prevalenza della componente linfocitaria. Al fine di valutare questo andamento abbiamo effettuato un'analisi semiquantitativa valutando il numero di focolai infiammatori visibili all'analisi istologica in 10 campi ottici (ingrandimento 100x). Ad un mese dal trattamento abbiamo evidenziato $1,5 \pm 0,53$ focolai infiammatori totali in 10 campi ottici nelle sezioni epatiche sia degli animali maschi che nelle femmine. A due mesi dal trattamento il numero evidenziato è risultato pari a $2,75 \pm 0,95$ focolai per i maschi e $4 \pm 1,1$ per le femmine. A 3 mesi dal trattamento il numero rimane invariato per i maschi ($2,7 \pm 0,9$ focolai) mentre sale a $5,4 \pm 1,7$ per le femmine. Dopo 5 mesi di trattamento la situazione rimane pressoché invariata. Non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra i due sessi in nessuno dei tempi di sacrificio.

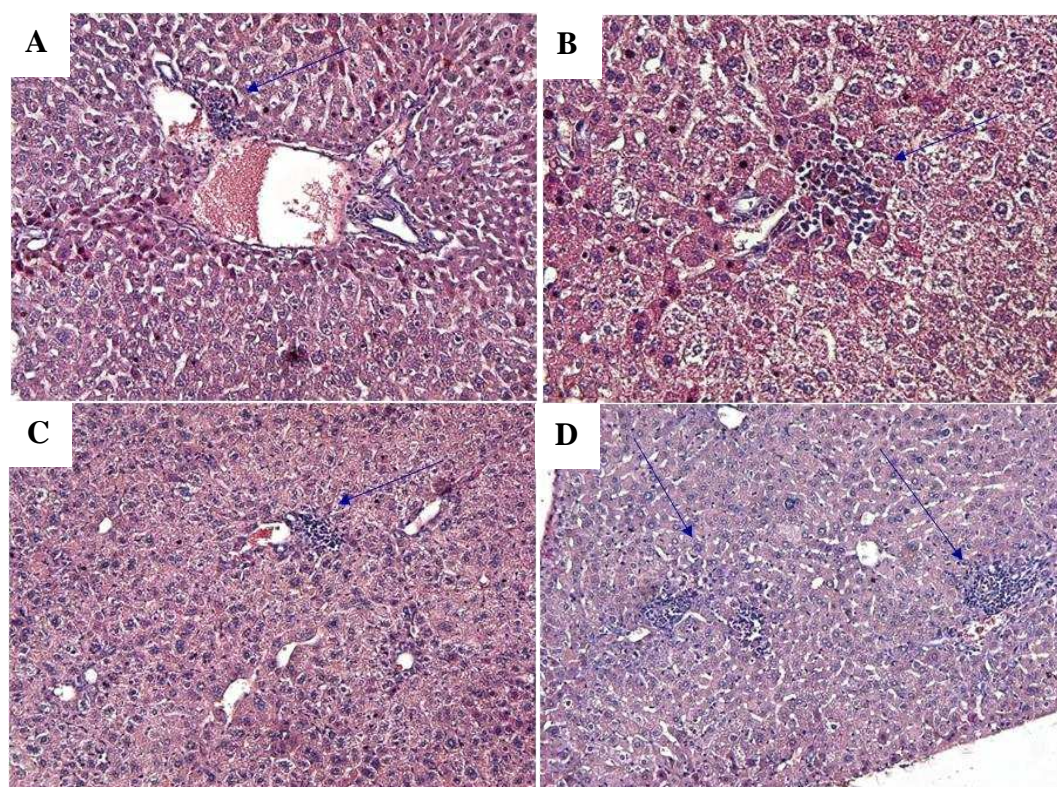


Fig. 4.16 Colorazione ematossilina-eosina degli animali trattati con DEN. Le sezioni corrispondono a: A) Animali maschi sacrificati a 1 mese di trattamento B) Animali femmine sacrificati a 1 mese di trattamento C) Animali maschi sacrificati a 5 mese di trattamento D) Animali femmine sacrificati a 1 mese di trattamento. A, C, D Ingrandimento 50x. B ingrandimento 100x

4.3.3 Analisi biumorali

I valori ematici di funzionalità e necrosi epatica considerati presentano anche in questo caso un'alta variabilità interindividuale probabilmente dovuta alla sensibilità del metodo sviluppato su campioni di sangue umano.

I valori di funzionalità epatica bilirubina totale e bilirubina non coniugata risultano generalmente aumentati rispetto al controllo in entrambi i sessi con un aumento maggiore nelle femmine rispetto ai maschi. I valori di bilirubina coniugata rimangono invece stabili a 0,1 umol/L sia negli animali controllo sia negli animali trattati. I valori di ALT e AST subiscono piccolissime variazioni, non significative, durante tutto il trattamento senza alcun andamento definito in entrambi i sessi.

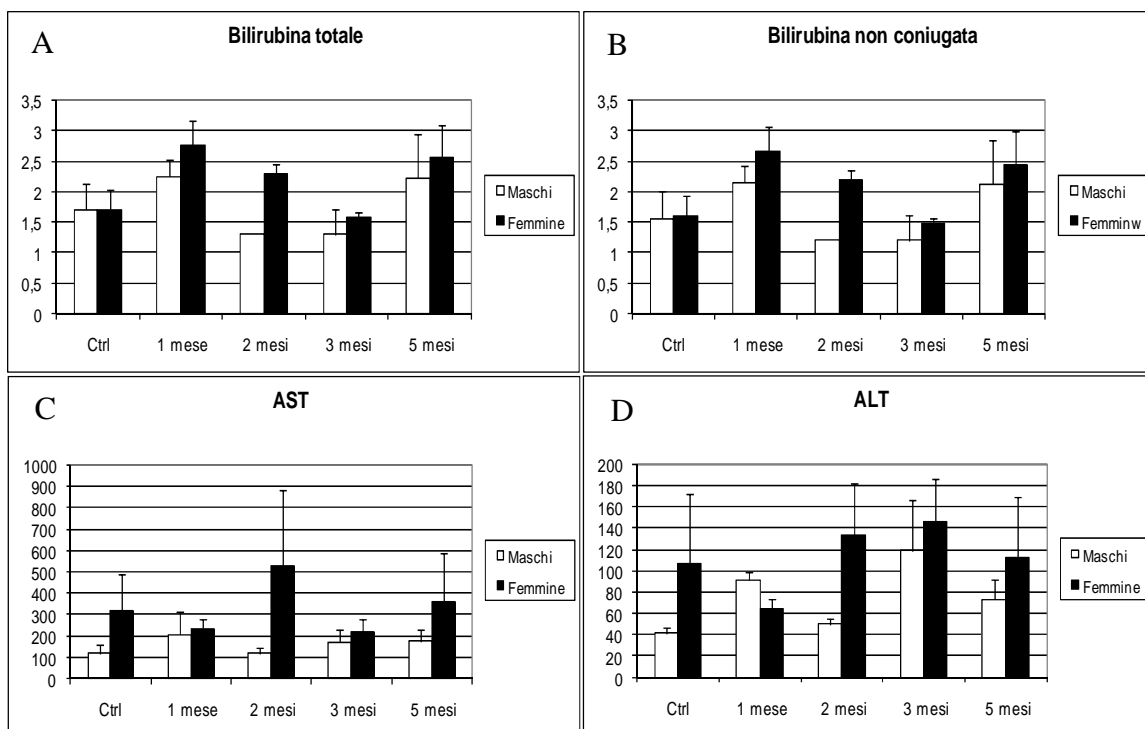


Fig. 4.17 Analisi dei campioni ematici per A) bilirubina totale, B) bilirubina non coniugata, C) AST, D) ALT. I parametri assumono valori molto eterogenei e senza andamento specifico.

L'analisi immunohistochimica effettuata per i marcatori delle cellule progenitrici epatiche (panticocheratine) mostra una loro aumentata proliferazione a partire dai 2 mesi di trattamento sia nei maschi che nelle femmine (Fig. 4.20). L'analisi semiquantitativa effettuata ha evidenziato a 2 mesi di trattamento una media di $10,3 \pm 2,2$ cellule nei maschi e di $9,5 \pm 3,1$ cellule nelle femmine per campo ottico (ingrandimento 200x). Il numero di cellule non subisce alterazioni durante tutto il corso dell'esperimento.

L'espressione dell' α SMA non risulta invece significativa ad indicare una mancata attivazione delle cellule stellate.

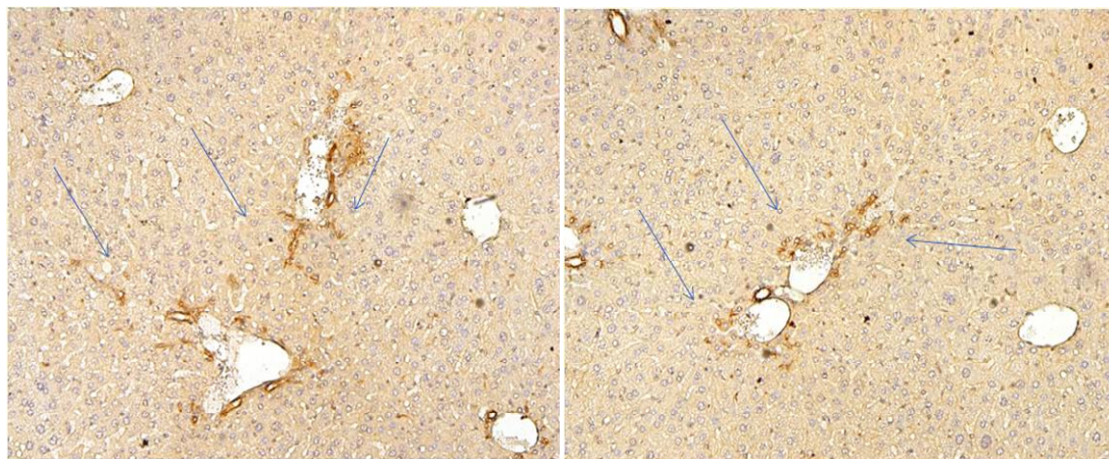


Fig. 4. 18 Immunoistochimica per CK (marcatore cellule ovali). Le immagini sono rappresentative per l'attivazione delle cellule ovali a partire dai 2 mesi di trattamento

L'analisi dell'espressione genica effettuata mediante Real Time PCR evidenzia un'aumentata espressione dei messaggeri codificanti per citochine pro-infiammatorie. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i dati sono indicati come $media \pm SEM$. In particolare risulta statisticamente significativa la sovra-regolazione di circa il doppio rispetto all'espressione basale misurata nei fegati controllo del TNF- α (1,63 volte nei fegati di topi maschi e 1,37 volte nei fegati delle femmine rispetto al controllo) e dell'INF γ (1,45 volte nei maschi e 1,06 volte nelle femmine rispetto al controllo). Le differenze riscontrate tra i due sessi non sono risultate significative. Tale sovra-regolazione si mantiene pressoché costante nei primi 3 mesi di trattamento per poi aumentare ulteriormente (2,78 volte rispetto al controllo in entrambi i sessi) dopo 5 mesi di trattamento.

4.4 Valutazione dell'effetto di CCl₄ e DEN *in vitro*

Dai dati ottenuti *in vivo* per quanto riguarda sia il modello di danno acuto con CCl₄ sia del danno cronico con DEN abbiamo riscontrato un'importante componente infiammatoria nella patogenesi del danno sia dal punto di vista istologico, sia dal punto di vista dell'espressione genica di citochine infiammatorie. Abbiamo quindi allestito un modello *in vitro* per valutare il ruolo che tali sostanze hanno nell'indurre la stimolazione di una risposta infiammatoria. A tal fine abbiamo

utilizzato le cellule Raw 264.7, una linea cellulare monocitica-macrofagica di origine murina. Abbiamo quindi valutato come tali cellule rispondano dal punto di vista funzionale e trascrizionale ad uno stimolo effettuato con le stesse sostanze utilizzate negli esperimenti *in vivo*. A tal fine abbiamo stimolato le cellule con CCl_4 e DEN confrontando la risposta con quella ottenuta dalla stimolazione con l'LPS, sostanza attivatrice delle cellule macrofagiche. Abbiamo quindi effettuato la misurazione dell'attivazione cellulare indirettamente misurando la produzione di NO con il saggio di Griess. Per poter fare una quantificazione del NO prodotto abbiamo creato una retta di taratura facendo reagire il reattivo di Griess con soluzioni a concentrazioni note di NaNO_2 (Fig. 4.15).

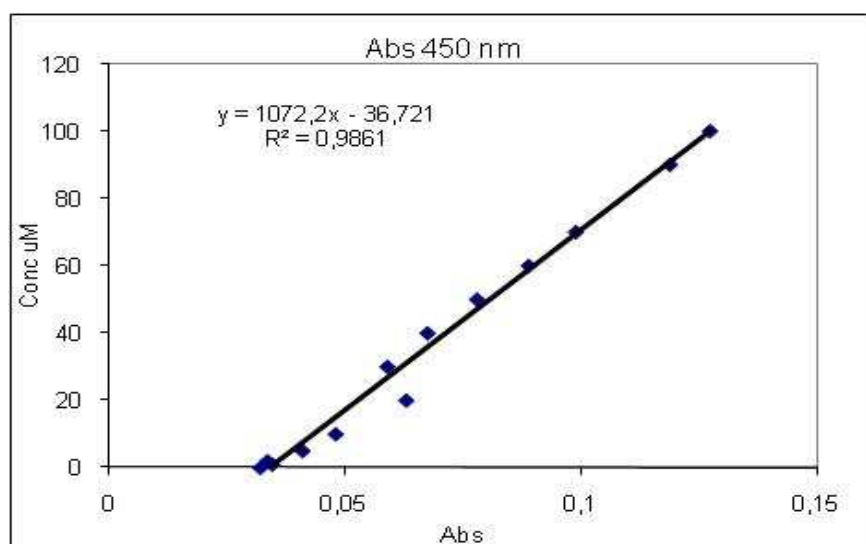


Fig. 4. 19 Retta di taratura effettuata con NaNO_2 e reattivo di Griess in rapporto 1:1

A 24 ore di stimolazione abbiamo riscontrato l'attivazione delle cellule Raw trattate sia con CCl_4 sia con DEN, raggiungendo una concentrazione di NO pari a $2,71 \mu\text{M}$ nella stimolazione con CCl_4 e una concentrazione di $3,38 \mu\text{M}$ stimolando le cellule con DEN (Fig. 4.16). Le concentrazioni di NO prodotte dopo stimolazione con le due sostanze è molto minore rispetto a quelle raggiunto dopo stimolazione con LPS, ma sono comunque indicatrici di attivazione delle cellule.

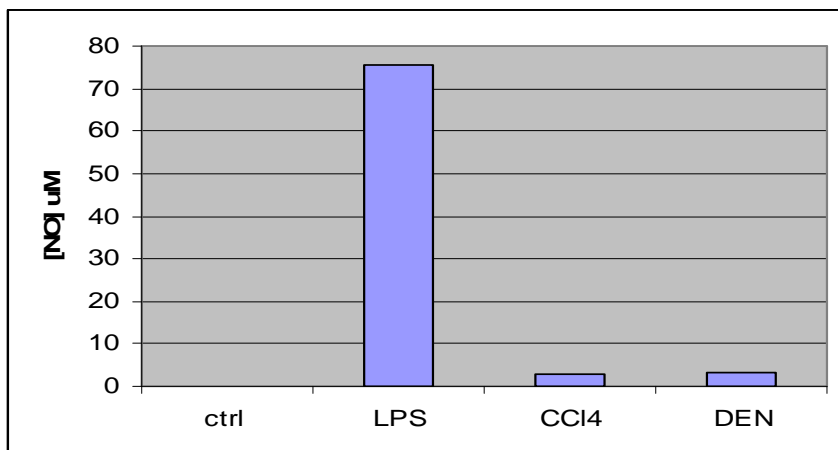


Fig. 4.20 produzione di NO da parte di cellule Raw stimulate per 24 ore con LPS, CCl₄ e DEN. La produzione di NO in seguito a stimolazione con DEN risulta maggiore rispetto alla stimolazione con CCl₄.

Una volta stabilita l'azione di stimolazione sulle cellule Raw 264.7 abbiamo valutato come tali cellule rispondono dal punto di vista della produzione di citochine mediante Real Time PCR. I dati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato e sono indicati come media \pm SEM. La valutazione è stata effettuata su cellule trattate con CCl₄ e DEN per 2, 4 e 24 ore.

La stimolazione con CCl₄ per 2 ore ha determinato l'up-regolazione del TGF β ($2,14 \pm 0,2$ volte rispetto al controllo) e dell'HIF ($1,88 \pm 0,5$ volte), mentre non è stata osservata alterazione rispetto al controllo per quanto riguarda IL-6 e TNF γ . In seguito a 4 ore di stimolazione l'IL-6 rimane ai valori basali ($1,16 \pm 0,3$) mentre HIF diminuisce leggermente arrivando ad un valore di $1,38 \pm 0,2$ ed il TGF β ritorna a valori comparabili al controllo ($0,99 \pm 0,2$). Tutti i valori ritornano ai livelli del controllo nelle 24 ore di stimolazione. La figura 4.21A mostra l'andamento nel tempo delle 3 citochine considerate.

La stimolazione con DEN ha determinato, al contrario, nelle prime 2 ore l'sovra-regolazione di IL-6 e HIF ($3,9 \pm 0,2$ e $2,1 \pm 0,1$ volte rispettivamente) mentre il TGF β rimane ai valori basali. L'IL-6 si mantiene stabile dopo 4 ore di stimolazione ($3,75 \pm 0,3$ volte), mentre l'HIF ritorna a valori comparabili con il controllo ($0,97 \pm 0,01$). A 24 ore la produzione di IL-6 continua a salire fino a raggiungere $9,48 \pm 0,2$ volte rispetto al controllo mentre gli altri valori ritornano a

livello basale. La figura 4.21B mostra l'andamento nel tempo delle 3 citochine considerate.

È stata valutata inoltre la produzione di TNF in tutti i campioni, ma non è mai stata riscontrata una sovra-regolazione significativa rispetto al controllo.

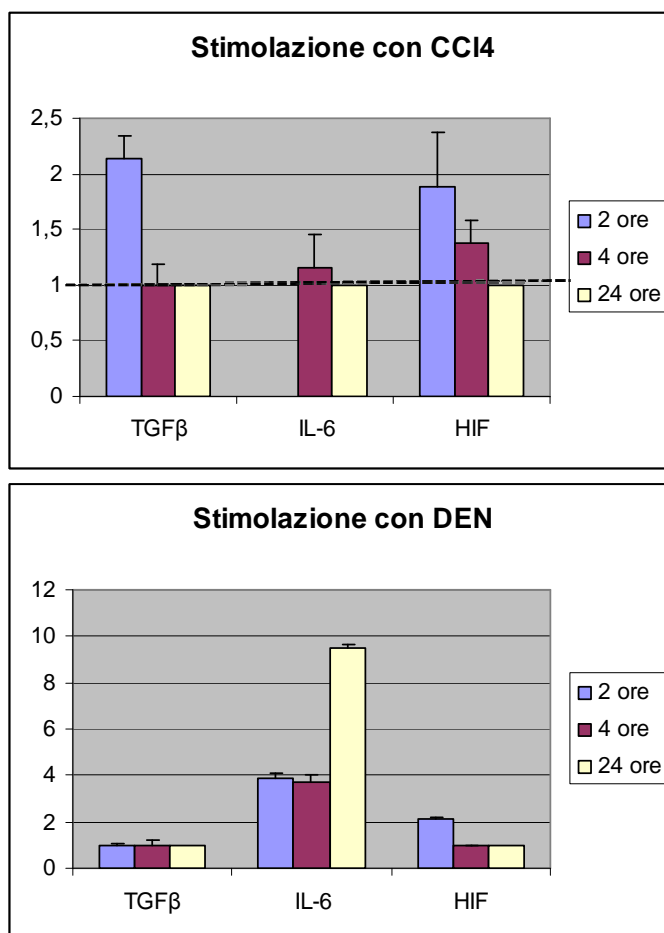


Fig. 4.21 Andamento nel tempo della produzione di TGF β , IL-6 e HIF in cellule Raw 264.7 trattate con CCl₄ (A) e DEN (B) per 2, 4 e 24 ore. I valori si riferiscono ad esperimenti condotti in triplicato (media \pm SEM)

5. DISCUSSIONE

La rigenerazione epatica, processo fisiologico indispensabile per la normale omeostasi del fegato, rappresenta il risultato di un complesso processo che implica l'interazione di molti tipi cellulari e segnali molecolari che compongono il microambiente del fegato. Tra i segnali molecolari hanno un ruolo fondamentale gli ormoni steroidei sessuali e le molecole infiammatorie.

È nota in letteratura la differenza legata al sesso riguardante l'incidenza di diverse patologie epatiche, nonché nella risposta a vari tipi di stress. Un possibile ruolo in tale dimorfismo tra i sessi è imputabile al livello degli ormoni sessuali circolanti e all'espressione epatica dei recettori degli ormoni sessuali (*Yokoyama, 2005*). Tuttavia, il preciso meccanismo responsabile di tale differenza rimane da stabilire.

Nel presente studio sono state riscontrate differenze significative a livello cellulare e molecolare in un modello murino di danno epatico acuto e cronico (associato o meno a Monocrotalina). Abbiamo posto particolare attenzione al grado di risoluzione del danno, all'attivazione delle cellule progenitrici epatiche, cellule stellate e cellule di Kupffer, valutando al contempo la diversa risposta infiammatoria nei due sessi. Infatti, nonostante l'azione degli estrogeni come agenti favorenti la proliferazione degli epatociti sia già nota (*Dubik, 1992*), poco si sa circa il ruolo che tali ormoni hanno sulle altre cellule del microambiente epatico e come modulano la risposta infiammatoria specificatamente durante un danno epatico acuto.

Dai risultati ottenuti nel primo esperimento di danno acuto in cui abbiamo confrontato il solo danno epatico con CCl_4 e il danno associato alla somministrazione di Monocrotalina, un alcaloide che blocca la proliferazione degli epatociti, abbiamo potuto mettere in evidenza che esiste una diversa risposta sia tra i due tipi di trattamento sia tra i due sessi.

Confrontando gli animali trattati con Monocrotalina con gli animali che non l'avevano ricevuta, abbiamo osservato tra le differenze più significative una maggiore mortalità, un quadro istologico più compromesso ed una maggiore attivazione delle cellule stellate, mentre non sono state riscontrate differenze

significative circa l'attivazione delle cellule ovali. Negli animali a cui è stata somministrata la Monocrotalina, infatti, abbiamo riscontrato tasso di mortalità del 12,5% vs lo 0% degli animali con solo danno ed una durata maggiore del danno epatico confermato istologicamente, non ancora risolto con residue aree di necrosi dopo 8 giorni dall'induzione, in particolare negli animali di sesso femminile. Tale risultato è compatibile con quanto riportato in letteratura circa la diversa espressione delle isoforme del citocromo p450 nel sesso femminile rispetto a quello maschile (*Snadlyn, 2008, Hanada, 2010*). Il citocromo p450 epatico è un importante enzima coinvolto nel metabolismo di sostanze endogene come colesterolo, steroidi, lipidi e di xenobiotici come farmaci e sostanze chimiche tra cui la Monocrotalina (*Rooney, 2004; Song, 2004*). L'espressione di tale enzima sembra influenzato dai livelli circolanti di ormone della crescita che presenta un diverso pattern di secrezione nei due sessi (*Waxman, 1992*). Mentre nei ratti maschi, l'ormone della crescita viene secreto con picchi episodici ogni 3-4 ore, con livelli bassi o non rilevabili tra i picchi (*Enen, 1979*), nei ratti di sesso femminile viene secreto in modo continuativo. Questa diversa secrezione determina la differente espressione delle isoforme del citocromo p450, da cui deriva una maggiore biotrasformazione a livello epatico degli xenobiotici in metaboliti intermedi attivi con conseguenti maggiori effetti collaterali, come nella nostra serie di esperimenti con l'utilizzo della Monocrotalina, nelle femmine rispetto ai maschi (*Nicolas, 2009*).

In ultima analisi abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa nel grado di attivazione delle cellule stellate, molto maggiore negli animali trattati con Monocrotalina rispetto all'altro gruppo. I risultati ottenuti portano a ipotizzare che il CCl₄ utilizzato per indurre il danno epatico acuto sia in grado di agire direttamente su più tipi cellulari epatici: epatociti, cellule ovali e cellule stellate. Il trattamento con solo CCl₄, infatti, non induce solo la necrosi degli epatociti, ma sembra ridurre anche la proliferazione delle cellule stellate, che nel modello di danno con Monocrotalina sono invece indotte a proliferare come via alternativa al blocco degli epatociti indotto dall'azione della Monocrotalina.

Valutando specificatamente la differenza della risposta tra i due sessi, il presente studio ha rilevato un significativo dimorfismo che riguarda prevalentemente il tipo ed il grado della risposta infiammatoria suscitata dal danno indotto con il medesimo agente tossico. Come messo in evidenza da entrambi gli esperimenti di danno acuto che sono stati condotti, gli animali di sesso femminile

mostrano un miglioramento del quadro istologico epatico molto più precoce rispetto ai maschi ed in particolare mostrano attivazione dei macrofagi, seppur circoscritta a piccole zone, molto precoce seguita da una clearance altrettanto precoce. Al contrario, nelle sezioni di fegato degli animali di sesso maschile viene osservata la comparsa di cellule macrofagiche esclusivamente a 8 giorni dal danno, in quasi il 90% degli spazi portali, per poi permanere nel tessuto fino ai 12 giorni dal danno. Ipotizzando una correlazione tra quadro istologico, sesso ed infiammazione abbiamo ricercato una possibile spiegazione alle differenze osservate andando a valutare l'espressione genica di specifici mediatori dell'infiammazione. Valutando l'espressione genica nel fegato *in toto*, abbiamo osservato una sovra-regolazione significativa per il TNF α ($p < 0,01$) e l'IL-6 ($p < 0,05$) negli animali di entrambi i sessi trattati con CCl₄, con una maggiore espressione del TNF α negli animali maschi (9 volte vs 3 volte nelle femmine). Inoltre, abbiamo evidenziato una significativa sovra-regolazione dell'espressione di IFN γ nei fegati dei topi femmina ($p < 0,05$), mentre abbiamo riscontrato una aumentata espressione di IL-4 ($p < 0,01$), una tipica citochina Th2, nei fegati dei topi maschi. Una prima conclusione desumibile dai nostri dati è che nelle femmine sembra esserci una predominanza di citochine di tipo Th1 (rappresentate dall'IFN γ), mentre nei fegati degli animali di sesso maschile predomina un'infiammazione di tipo Th2 (rappresentata da IL-4). È stato quindi evidenziato che gli animali dei due sessi rispondono attivando due vie di infiammazione diverse per lo stesso stimolo nocivo. Il profilo citochinico rilevato concorda con il quadro istologico che abbiamo evidenziato nelle sezioni epatiche degli animali di sesso femminile nei quali la risoluzione del danno è più rapida e con una componente macrofagica minore. L'azione combinata di estrogeni ed IFN γ , entrambi con spiccata azione mitogena, diretta per gli estrogeni (*Dubik, 1992*), indiretta per l'IFN γ (*Lowes et al 2003*), favorisce la proliferazione degli epatociti e delle altre cellule che concorrono alla rigenerazione (cellule ovali e cellule stellate), mentre la minore produzione di TNF α indica una ridotta attivazione macrofagica.

Nella valutazione del quadro complessivo degli animali di sesso maschile, la mancanza degli estrogeni ed il solo profilo citochinico caratterizzato da sovra-regolazione particolarmente elevata a 5 giorni dal danno del TNF α e dell'IL-4 ad 8 giorni dal danno, non sono sufficienti a dare una spiegazione plausibile al quadro istologico osservato nelle sezioni epatiche dei topi maschi. Una possibile interpretazione dei dati viene suggerita da un recente lavoro pubblicato nel

dicembre 2009 (Lai, 2009). In tale studio gli autori identificano un ruolo dei recettori per gli androgeni nel dimorfismo osservato nei due sessi nella riparazione di danno cutaneo. In particolare, gli autori, evidenziano che il recettore degli androgeni presente nei macrofagi può essere modulato, al fine di aumentare la risposta infiammatoria indotta dal danno. Hanno infatti dimostrato che la stimolazione di tale recettore da parte degli androgeni induce aumento dell'espressione locale del TNF α , attraverso l'incremento del numero di monociti circolanti, l'aumento della chemiotassi dei monociti nel tessuto e aumentando l'espressione del TNF α da parte dei macrofagi stessi. A sua volta il TNF α è in grado di ridurre la capacità ripartiva del tessuto, inibendo la proliferazione cellulare e riducendo la capacità di deposito di collagene. Questi interessanti risultati possono essere utili per ipotizzare un meccanismo di danno nei nostri topi maschi: l'espressione del TNF α aumenta in modo significativo nei maschi a partire da 5 giorni di danno in risposta all'azione degli ormoni androgeni, la popolazione macrofagica aumenta di conseguenza sia per attivazione delle cellule di Kupffer già residenti sia per richiamo di monociti circolanti. In conseguenza a ciò viene prodotto ulteriormente TNF α a cui consegue che il danno viene riparato in minor misura con la permanenza di aree necrotiche fino agli 8 giorni dal danno. Ad 8 giorni dal danno abbiamo poi osservato l'aumento dell'espressione di IL-4, una citochina che induce l'inibizione dei macrofagi che si traduce in una diminuzione nel numero di macrofagi osservato nel tessuto epatico degli animali sacrificati ad 12 giorni dal danno. Ulteriori studi sono previsti per confermare tale ipotesi.

Il modello animale di danno cronico indotto mediante DEN somministrata nell'acqua di abbeveraggio, purtroppo non ha portato all'induzione di neoplasia epatica, neppure prolungando i tempi di somministrazione oltre a quanto previsto dai protocolli pubblicati in letteratura (Matsuda, 2005; Verna, 1996). Non possiamo quindi trarre conclusioni circa il ruolo delle cellule ovali nel processo di cancerogenesi epatica, pur avendo evidenziato una loro attivazione durante l'esperimento. Nonostante ciò, è stata individuato ugualmente una componente infiammatoria che non presenta però differenze significative tra gli animali dei due sessi. Possiamo concludere ipotizzando che il metodo di somministrazione non è risultato adeguato per il ceppo di topi usati (Balb/c), prevediamo quindi di ripetere l'esperimento somministrando la DEN mediante iniezione intraperitoneale, valutando la formazione di noduli neoplastici a tempi intermedi.

Data l'importante componente infiammatoria che abbiamo evidenziato negli esperimenti *in vivo*, abbiamo provato a valutare in un modello *in vitro* l'azione dei macrofagi in seguito a stimolazione con CCl₄ e DEN. La stimolazione con entrambe le sostanze delle cellule Raw 264.7, una linea cellulare macrofagica derivante da topi maschi, ha determinato l'attivazione delle cellule con entrambe le sostanze e l'aumento della produzione di alcune citochine. Il profilo citochinico che abbiamo evidenziato nell'esperimento *in vitro*, non sono però sovrapponibili con quanto evidenziato nel fegato *in toto* ottenuto dagli esperimenti *in vivo*. Possiamo quindi concludere affermando che sicuramente *in vivo* c'è una partecipazione tra diverse cellule che concorrono al profilo citochinico evidenziato. Obiettivo successivo sarà quello di isolare le singole popolazioni cellulari del fegato (in particolare cellule di Kupffer, cellule stellate ed epatociti) ed utilizzando sistemi di co-coltura valutare il ruolo di ciascuno tipo cellulare e le eventuali cooperazioni ed interazioni che si instaurano in risposta ad un danno chimico.

Dal presente studio è quindi emerso che in corso di rigenerazione epatica il microambiente epatico gioca un ruolo fondamentale ed in particolare è emersa l'importanza della componente ormonale e infiammatoria e della loro interazione nell'intero processo. Il fatto che gli ormoni sessuali possono modulare la risposta infiammatoria e quindi la capacità rigenerativa può essere di fondamentale importanza per l'approccio clinico di diverse patologie infiammatorie che presentano dimorfismo sessuale.

6. BIBLIOGRAFIA

Akhurst B, Croager Ej, Farley-Roche Ca, Ong Jk, Dumble MI, Knight B, Yeoh Gc. A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology*, 2001; 34(3):519-22

Al-Hajj, M. , Becker, M.W. , Wicha, M. , Weissman, I. & Clarke, M.F. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004;14:43–47.

Alison M Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:710–715

Alison MR, Golding MH, Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Proliferation*. 1996;29(7):373-402.

Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009;217:282–98.

Arai M, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Chiba T, Sumi H, Kato M, Takiguchi M, Saisho H, Muramatsu M, Seki N. Gene expression profiles in liver regeneration with oval cell induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004;30:317(2), 370-6

Balkwill F. and A. Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow?, *Lancet* 2001;357:539–545.

Beltrami A, Urbanek K, Kajstura J, yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Ieri A, Beltram CA., Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N engl J Med* 2001;344(23):1750–1757

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5–S16.

Brooling JT, Campbell JS, Mitchell C, Differential regulation of rodent hepatocyte and oval cell proliferation by interferon gamma. *Hepatology* 2005;41:906–915.

Bucher NLR, Malt RA. Regeneration of liver and kidney. *Little, Brown Boston*. 1971.

Butler WH, Mattocks AR Barnes JM. Lesions in the liver and lungs of rats given pyrrole derivatives of pyrrolizidine alkaloids, *J. Pathol.* 1970;100:169–175.

Crosnier C, Stamataki D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 2006;7:349–59.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I : Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006;8:315–317

Dubik, D., and Shiu, R. P. C. Mechanism of estrogen activation of *c-myc* oncogene expression. *Oncogene*,1992; 7: 1587–1594,.

Eden, S. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1979 105: 555,

Erker L, Grompe M. Signaling networks in hepatic oval cells activation. *Stem cell research*. 2008 1:90-102.

Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND. Regeneration of hepatocyte “buds” in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 2003;39:357–364

Farber E. Similarities of the sequence of the early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956;16:142–148.

Fausto N. Liver stem cells. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The Liver*. New York: Raven, 1994; 1501–18.

Fausto N., Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells, *Hepatology* 2004;39:1477–1487

Gale RP, Sparkes RS, Golde DW: Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 1978, 202:937-938.

Gaudio E, Carpino G, Cardinale V, Franchitto A, Onori P, Alvaro D. new insight into liver stem cells. *Dig. Liver Dis.* 2009 Jul; 41(7):455-62.

Geerts A. *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells.* *Semin Liver Dis.* 2001; 21(3):311-35.

Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. . *Am J Pathol* . 2000b, 157: 771–786.

Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* . 2000a, 156:607–619.

Griess, J., P., Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1879, 12; 426

Hanada S, Snider NT, Brunt EM, Hollenberg PF, Omary MB. Gender dimorphic formation of mouse Mallory-Denk bodies and the role of xenobiotic metabolism and oxidative stress. *Gastroenterology*. 2010 Jan 8 (In press).

Higgins G. M. and Anderson, R. M. *Experimental pathology of liver: restoration of liver in white rat following partial surgical removal.* 1931 *Arch.Path.* 12, 186-202

Jackson L. and Evers B.M., Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers, *Cancer Treat. Res.* 2006, 130:39–65

Bibliografia

Jung Y, Brown KD, Witek RP, Accumulation of hedgehogresponsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans. *Gastroenterology* 2008;134:1532–1543

Katoonizadeh A, Nevens F, Verslype C, Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int.* 2006;26:1225–33.

Kershenobich SD, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann- Hepatol.* 2003; 2: 159.

Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 634-659

Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008;47:1994–2002.

Laconi S, Curreli F, Diana S, Pasciu D, De Filippo G, Sarma DS, Pani P, Laconi E Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999; 31:1069–1074

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

Lamé M.W., Jones A.D., Wilson D.W. and Segall H.J., Monocrotaline pyrrole targets proteins with and without cysteine residues in the cytosol and membranes of human pulmonary artery endothelial cells, *Proteomics* 2005; 5:4398–4413

Leduc Wilson. *J Pathol Bacteriol.* 1958.

Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol* 2000;192:373–8.

Libbrecht L., Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2002, Vol. 13, 389-96.

Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 537–41

Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ and Yeoh GCT Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003;18:4-12

Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GCT. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003;18:4–12

Lu H., Ouyang W. and Huang C., Inflammation, a key event in cancer development, *Mol. Cancer Res.* 2006; 4:221–233

Mall FP. A study of structural unit of the liver. *Am J Anat.* 1906 5:227-308.

Mancino MG, Carpino G, Onori P Hepatic "stem" cells: state of the art. *Ital J Anat Embryol.* 2007;112:93-109.

Marshall A, Rushbrook S, Davies SE, Morris LS, Scott IS, Vowler SL, Coleman N, Alexander G Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005; 128:33–42

Bibliografia

Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T Kaneko S Interferon-c-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine Laboratory Investigation 2005; 85:655–663

Matsuzaki K., Murata M., Yoshida K., Sekimoto G., Uemura Y., Sakaida N., Kaibori M, Kamiyama Y., Nishizawa M., Fujisawa J., Okazaki K. and Seki T., Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 2007;46:48–57

Matthews VB, Klinken E, Yeoh GC. Direct effects of interleukin-6 on liver progenitor oval cells in culture. *Wound Repair Regen* 2004;12:650–656.

Michalopoulos G.K. and DeFrances M.C., Liver regeneration, *Science*, 1997; 276:60–66

Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006;311:1880–5.

Morrison T.B., Weiss J.J., Winwer C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-962;

Mrass P, Weninger W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev* 2006; 213:195–212

Mueller M.M. and Fusenig N.E., Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer, *Nat. Rev. Cancer* 4, 2004, 839–849.

Nagy P, Kiss A, Schnur J, Thorgeirsson SS. Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. *Hepatology* 1998; 28:423–435

Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. *Development*, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 1997;39:350-64.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 2007; 317:121-124

Naveiras O, Daley GQ. Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:760–6.

Nicolas JM, Espie P, Molimard M. Gender and interindividual variability in pharmacokinetics. *Drug Metab Rev.* 2009;41(3):408-21

Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007;132:1077-1087.

Ohki E, Kato S, Ohgo H. Effect of chronic ethanol feeding on endotoxin –induced hepatic injury: role of adhesion molecules on leukocytes and hepatic sinusoid. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1998;22: 129S,

Paku S, Nagy P, Kopper L, 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* 2004;39:1353–61.

Perwez Hussain S. and Harris C.C., Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int. J. Cancer* 2007; 121, 2373–2380

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.

Philip M., Rowley D.A and Schreiber H., Inflammation as a tumor promoter in cancer induction, *Semin. Cancer Biol.* 2004; 14,433–439

Bibliografia

Philpott M. and Ferguson L.R., Immunonutrition and cancer, *Mutat. Res.* 2004; 551; 29–42.

Ponder, KP.,. Analysis of liver development, regeneration and carcinogenesis by genetic marking studies. *FASEB J.* 1996, 10, 673-682.

Preisegger Kh, Factor Vm, Fuchsbichler A, Stumptner C, Denk H, Thorgeirsson Ss. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidinmouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab. Invest.* 1999, 79, 103–109,

Quinn LS, Nameroff M, Holtzer H Age-dependent changes in myogenic precursor cell compartment sizes. Evidence for the existence of a stem cell. *Exp Cell Res.* 1984 Sep;154(1):65-82.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transferred by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978, Sep 15(1) 261-7

Reynolds BA; Weiss (). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system". *Science* 1992; 255 (5052): 1707–10.

Rooney, P. H., Telfer, C., McFadyen, M. C., Melvin, W. T., and Murray, G. I. The role of cytochrome P450 in cytotoxic bioactivation: Future therapeutic directions. *Curr. Cancer DrugTargets* 2004; 4: 257,

Roskams T Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. *J Hepatol* 2003; 39:431–434

Roskams T, De Vos R, Oord JJ van den, Desmet V () Cells with neuroendocrine features in regenerating human liver. *APMIS* 1991 Suppl 23:32–39

Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM) Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol*; 2003a ;163:1301–1311

Roskams T. Different types of liver progenitor cells and their niches. *J Hepatol* 2006;45:1–4.

Roskams TA, Theise ND, Balabaud C Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules and ductular reactions in human liver. *Hepatology*. 2004, Vol. 39, 1739-45.

Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1807-21.

Sanchez-Munoz D, Castellano-Megias VM, Romero-Gomez M. Expression of bcl-2 in ductular proliferation is related to periportal hepatic stellate cell activation and fibrosis progression in patients with autoimmune cholestasis. *Dig Liver Dis* 2007;39:262–6.

Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson SS, Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *Apmis* 2005;113:876–902.

Scandlyn MJ, Stuart EC, Rosengren RJ. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:413-24.

Schottenfeld D. and Beebe-Dimmer J., Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia, *CA Cancer J. Clin.* 2006; 56: 69–83

Seki S, Habu Y, Kawamura T, : The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the role of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells and T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000, 174:35-46.

Bibliografia

Shafritz DA, Oertel M, Menthena A Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells . *Hepatology*. 2006; 43,. S89-94.

Shinozuka H, Lombardi B, Sell S. Early histological and functional alterations in ethionine liver cancerogenesis in rats fed a choline deficient diet. *Cancer Res*. 1978; 38: 1092-1098.

Song S, Witek RP, Lu Y, Choi YK, Zheng D, Jorgensen M, Li C Flotte TR Petersen BE. Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice. *Hepatology*. 2004 Oct;40(4):918-24.

Sun R, Gao B. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma). *Gastroenterology* 2004;127:1525–1539

Surh Y.-J., Chun K.S., Cha H.H., Han S.S., Keum Y.S., Park K.K. and Lee S.S., Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation, *Mutat. Res*. 2001; **480–481**:243–268

Tacke F, Luedde T, Trautwein C Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36:4–12

Takeyama N, Shoji Y, Ohashi K, Tanaka T. Role of reactive oxygen intermediates in LPS-mediated hepatic injury in the rat. *J. Surg. Res* 1992. 60:1236.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *NatRev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 836-847

Tsakamoto H. redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid. Redox Signal*. 2002 ; 4:741,

Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Sempoux C, Horsmans Y, Leclercq IA. Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a

CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 2009 ;49(5):1625-35

Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.* 1996;71(1-2):57-81

Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury. *J Surg. Res.* 1996; 60: 49

Waxman D.J., Pampori N.A, Ram P.A., Agrawal A.K. and Shapiro B.H., Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 6868

Wick MJ, Leithäuser F, Reimann J () The hepatic immune system. *Crit Rev Immunol* 2002; 22:47–103 M3

Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 2002;16:935–942

Yang S, Koteish A, Lin H, Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004;39:403–11.

Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, Chaudry IH. Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology. *J. Surg. Res* 2005, 128(1): 147-56

Zhang L, Theise N, Chua M, The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 2008;48:1598–607