

Università degli studi di Napoli Federico II

Dipartimento di Farmacia

PhD in Nutraceuticals, functional foods and human health - XXXV ciclo



*“La modulazione dei recettori GPBAR1 e CysLT₁R evidenzia
il ruolo meccanicistico degli acidi biliari e dei leucotrieni
nelle malattie metaboliche ed infiammatorie del fegato”*

Dottoranda

Dott.ssa Rosalinda Roselli

Tutor

Prof.ssa Angela Zampella

Coordinatore del PhD

Prof. Alberto Ritieni

Indice

Premessa	4
Introduzione	5
Capitolo 1	12
1.1 <i>G-protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1)</i>	12
1.1.1 Struttura, distribuzione e cascata di attivazione.....	12
1.1.2 Effetti biologici dell'attivazione di GPBAR1.....	14
1.1.3 Ruolo di GPBAR1 nel fegato	15
1.1.4 Agonisti naturali di GPBAR1	17
1.1.5 Derivati semisintetici degli acidi biliari.....	17
1.2 I Leucotrieni.....	18
1.2.1 Biosintesi e distribuzione	18
1.2.2 Recettori dei CysLTs 1 e 2 ed effetti biologici	20
1.2.3 Ruolo dei Cisteinil-leucotrieni (CysLTs) nelle malattie epatiche	21
1.2.4 Antagonisti del <i>CysLT₁R</i>	22
Capitolo 2	23
2.1 Steatosi epatica non alcolica (NAFLD/NASH)	23
2.1.1 Definizione ed epidemiologia.....	23
2.1.2 Patogenesi della NASH	25
2.1.3 Metabolismo lipidico.....	26
2.1.4 Sistema immunitario	27
2.1.5 Cellule immunitarie non parenchimali.....	29
2.1.6 Cellule parenchimali con funzioni immunitarie	30
2.2 Progressione della NASH	31
2.2.1 Fibrosi epatica	31
2.2.2 Cirrosi epatica.....	33
2.3 Approcci terapeutici	33
Obiettivo del primo studio	36
2.4 Materiali e metodi.....	38
2.4.1 GEO Data Sets.....	38
2.4.2 Modello animale	38

2.4.3	Determinazioni antropometriche	39
2.4.4	Analisi biochimiche.....	39
2.4.5	Test orale di tolleranza al glucosio (OGTT) e livelli di insulina	39
2.4.6	Immagini termiche	39
2.4.7	Istopatologia.....	39
2.4.8	Retrotrascrizione dell'mRNA e Real-Time PCR.....	40
2.4.9	Sequenziamento del trascrittoma.....	41
2.4.10	Analisi statistica.....	41
2.5	Risultati.....	42
2.5.1	Valutazione farmacologica <i>in vivo</i> del CHIN117.....	42
2.5.2	Effetti del CHIN117 sul tessuto adiposo.....	51
	Discussione	54
	Capitolo 3.....	56
3.1	Metabolismo epatico dei farmaci e danno epatico	56
3.2	Epatotossicità indotta da APAP	61
3.2.1	Infiammazione ed epatotossicità indotta da APAP	64
3.3	Approcci terapeutici	65
	Obiettivo del secondo studio	66
3.4	Materiali e metodi.....	68
3.4.1	GEO Data Sets.....	68
3.4.2	Modelli animali.....	68
3.4.3	Colture cellulari	69
3.4.4	Retrotrascrizione e RT-PCR	70
3.4.5	Sequenziamento del trascrittoma.....	71
3.4.6	Istologia e immunoistochimica	71
3.4.7	Immunofluorescenza.....	72
3.4.8	Purificazione di cellule murine primarie	73
3.4.9	Determinazione di GSH, SOD e NAPQI epatici.	73
3.4.10	Citometria a flusso	74
3.4.11	Analisi statistica.....	74
3.5	RISULTATI	75
3.5.1	Modulazione dell'espressione genica nel fegato di pazienti con insufficienza epatica acuta indotta da APAP.....	75

3.5.2 Valutazione dell'efficacia del CHIN117 <i>in vitro</i>	78
3.5.3 Valutazione dell'efficacia del CHIN117 <i>in vivo</i>	80
3.5.4 Il CHIN117 reverte l'infiammazione indotta dall'APAP	87
3.5.5 La regolazione dell'attività di GPBAR1 e CYSLT ₁ R modula l'attivazione epatica delle LSEC e delle KC in risposta all'APAP	90
3.5.6 Il CHIN117 protegge dallo sviluppo della fibrosi epatica in un modello di CCl ₄	95
Discussione e conclusioni	98
Bibliografia	102

Premessa

Negli ultimi decenni il progresso scientifico ha fornito informazioni sempre più avanzate sulle basi molecolari delle malattie consentendo nel tempo di identificare nuovi bersagli e sviluppare terapie sempre più efficaci. Tuttavia l'estrema variabilità del decorso delle malattie, dovuta alle differenti risposte dei pazienti alle terapie attualmente in uso, nonché ai problemi derivanti dall'insorgenza di effetti collaterali ha suscitato un enorme interesse clinico per l'identificazione di nuove molecole che possano bypassare i limiti di quelle attualmente disponibili. Questo scenario ha determinato la nascita di un programma di *drug discovery* nel quale si inserisce questo lavoro di tesi e che vede un'intensa collaborazione tra l'Università degli studi di Napoli Federico II e il laboratorio di Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Perugia, con lo scopo di individuare nuovi bersagli farmacologici, coinvolti nei processi infiammatori, e identificare nuove molecole di origine naturale e/o semisintetica in grado di interagire con gli stessi e con potenziale uso nella terapia di patologie epatiche e gastrointestinali. Nel corso di questi anni ho avuto quindi la possibilità di prendere parte a numerosi progetti, grazie ad un lungo periodo trascorso presso il Laboratorio di Gastroenterologia del Prof. Stefano Fiorucci. In particolare, parallelamente agli studi che ho presentato al Collegio docenti al termine di ogni anno di Dottorato, ho portato avanti una serie di ricerche riguardanti la caratterizzazione *in vitro* ed *in vivo* di un composto di neo-sintesi, identificato nei laboratori della Prof.ssa Angela Zampella, denominato CHIN117, che sarà oggetto del presente lavoro di tesi, il quale in seguito ai promettenti risultati derivanti dalla ricerca pre-clinica, è ora sottoposto a studi di tossicologia sugli animali.

Introduzione

Attualmente, i recettori accoppiati a proteine G (*G protein-coupled receptor*, GPCR) sono il bersaglio molecolare di \approx il 40% dei farmaci commercializzati e rappresentano le strutture più studiate per sviluppare nuove terapie. I recettori accoppiati a proteine G costituiscono una grande famiglia di recettori, a sette eliche transmembrana, che media una grande varietà di processi cellulari. Il recettore degli acidi biliari GPBAR1 (*G-protein-coupled bile acid receptor 1*) e i recettori dei cisteinil-leucotrieni (*Cysteinyl leukotriene receptors*, *CysLTRs*) sono parte di questa famiglia e sono distribuiti in diversi tipi cellulari. Essi risultano coinvolti nella regolazione di numerosi processi fisiologici e patologici. La loro modulazione, perciò, può avere potenziali applicazioni terapeutiche per un ampio spettro di malattie. Nel dettaglio, GPBAR1 è ampiamente espresso in cellule del sistema immunitario innato quali macrofagi tissutali, incluse le cellule di Kupffer (KC, macrofagi residenti nel fegato), monociti circolanti, cellule dendritiche (DC) ed NKT, ma anche in cellule non immunitarie quali cellule stellate epatiche (HSC), cellule endoteliali sinusoidali (LSEC), colangiociti, cellule epiteliali intestinali, cellule nervose e cellule adipose brune [1]. In generale, nelle cellule immunitarie GPBAR1 esercita una forte azione immunomodulatoria, promuovendo la loro polarizzazione verso un fenotipo antinfiammatorio, con conseguente riduzione dell'espressione e della secrezione di citochine e chemochine proinfiammatorie [2]. Inoltre determina una modulazione negativa di NF- κ B, un fattore di trascrizione che induce l'espressione di geni responsabili della produzione di proteine proinfiammatorie, determinando quindi una riduzione del rilascio di citochine come IL-6, IL-8 e TNF- α [2]. Nelle LSEC l'attivazione di GPBAR1 è responsabile di un aumento dell'attività dell'enzima eNOS che protegge l'endotelio epatico dallo stress ossidativo e dalla perossidazione dei lipidi, suggerendo il coinvolgimento del recettore nella regolazione del microcircolo epatico [2]. Nelle cellule enteroendocrine di tipo L induce invece la secrezione dell'ormone glucagone simile (GLP-1) che, interagendo con recettori delle cellule pancreatiche, determina un aumento dei livelli di cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*) e di ioni Ca^{++} intracellulari, favorendo il rilascio di insulina e regolando dunque i livelli ematici di glucosio e conseguentemente la glicemia post prandiale [3]. Il recettore è anche coinvolto nella regolazione del dispendio energetico con aumento del metabolismo basale, risultando preventivo per obesità e insulino-resistenza [4]. Questo avviene mediante la sua attivazione nei tessuti metabolici (tessuto adiposo bruno e muscolo scheletrico) con conseguente induzione dell'enzima iodotironina deiodinasi (D2), responsabile

della conversione della forma inattiva dell'ormone tiroideo T4 nella sua forma attiva T3, che porta di conseguenza ad un aumento della fosforilazione ossidativa nei mitocondri e dunque ad un maggiore dispendio energetico [4]. Infine analogamente al recettore nucleare degli acidi biliari FXR (*Farnesoid-X-receptor*), il recettore GPBAR1 regola l'omeostasi degli acidi biliari e del colesterolo mediante l'inibizione della sintesi di acidi biliari nel fegato e il loro recupero dalle vie biliari, aumentando l'associazione di colesterolo in LDL (*Low-density lipoprotein*) anziché in HDL (*High-density lipoprotein*) e riducendo l'accumulo di trigliceridi nel fegato e nel circolo ematico. Data la moltitudine di effetti derivanti dalla sua attivazione, si evince come GPBAR1 possa rappresentare un interessante target terapeutico oltre che per patologie infiammatorie e immunitarie, anche per malattie metaboliche come aterosclerosi, obesità, iperglicemia e steatosi epatica [5]. I più potenti agonisti endogeni identificati per il recettore GPBAR1 sono gli acidi biliari secondari e i loro derivati tauro- e glico- coniugati. Considerati gli effetti benefici dati dall'attivazione di GPBAR1, la manipolazione chimica degli acidi biliari (BA), utilizzata con l'intento di migliorarne la potenza, l'efficacia e la stabilità metabolica, recentemente ha portato all'identificazione di molti composti con promettenti profili farmacologici. L'introduzione, ad esempio di un gruppo metile in posizione C-23 nella catena laterale dell'acido 6-etilchenodesossicolico (6-ECDCA) ha portato alla sintesi dell'INT-777, un potente agonista selettivo di GPBAR1, considerato promettente nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 [6]. Successive modifiche nella lunghezza della catena laterale e nella natura del gruppo terminale sullo scaffold dell'acido biliare hanno portato alla sintesi del composto BAR501, il primo esempio di un derivato dell'UDCA C-6 β -sostituito con una potente e selettiva attività su GPBAR1 [7]. In un modello murino di NASH, BAR501 è riuscito a revertire l'insulino-resistenza, l'aumento del peso del grasso epididimale (epWAT) e la funzionalità del grasso bruno (BAT) promuovendo il dispendio energetico e il *browning* dell'epWAT [8]. Inoltre, BAR501 si è dimostrato efficace in modelli murini nella cura delle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBDs) [9].

I cisteinil leucotrieni (CysLTs) rappresentano una famiglia di potenti mediatori lipidici proinfiammatori prodotti a partire dall'acido arachidonico mediante l'azione della 5-lipossigenasi (5-Lox) e la proteina attivante la 5-lipossigenasi (FLAP) secreti dalle cellule immunitarie in risposta ad uno stimolo specifico. Essi sono prodotti principalmente da granulociti, macrofagi, mastociti, linfociti B ed eosinofili. Inoltre, anche altre cellule come fibroblasti bronchiali, piastrine, eritrociti, cellule epiteliali ed endoteliali possono produrre CysLTs [10]. Queste molecole svolgono numerose attività biologiche e sono state identificate

come responsabili di diversi processi patologici. In particolare sono coinvolte in reazioni asmatiche e allergiche e agiscono in modo tale da sostenere e amplificare localmente i processi infiammatori. Inoltre svolgono molteplici ruoli nelle epatopatie acute e croniche [11]. Ad esempio, numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo dei CysLTs nella patogenesi dell'epatite fulminante. In uno studio, in particolare, è stato osservato che in ratti trattati con la combinazione di un'endotossina e d-galattosamina a dosi non letali, la sintesi dei CysLTs aumenta in risposta al trattamento e che l'antagonismo dei recettori dei CysLTs protegge dal danno epatico, mentre gli inibitori della cicloossigenasi non sortiscono alcun effetto benefico [11]. È noto, inoltre, che i CysLTs stimolano la proliferazione cellulare e la sintesi del collagene, suggerendo che l'aumento della produzione di CysLTs può contribuire al processo di fibrosi [11]. I CysLTs, una volta sintetizzati, esercitano i loro effetti legandosi ai recettori dei cisteinil leucotrieni (CysLTRs), una famiglia di recettori accoppiati a proteine G transmembrana (*G protein-coupled receptor*, GPCR) della classe della rodopsina. Sono stati identificati due principali CysLTRs: CysLT₁R e CysLT₂R che riconoscono rispettivamente i loro ligandi nel seguente ordine di affinità LTD₄ > LTC₄ > LTE₄ e LTC₄ > LTD₄ > LTE₄, [12]. Il CysLT₁R è espresso nella maggior parte dei tessuti umani, incluso il fegato e, in particolare, si ritrova su monociti, macrofagi residenti, eosinofili, basofili, mastociti, neutrofilo, linfociti T e B, cellule dell'endotelio vascolare e cellule stellate epatiche (HSC). Il CysLT₂R è espresso prevalentemente a livello cardiaco e neuronale. L'importanza di questi recettori nel processo infiammatorio ha promosso, nel tempo, lo sviluppo di farmaci, cosiddetti antagonisti, che inibiscono la loro attività. Sebbene non siano noti antagonisti specifici per il CysLT₂R, diversi farmaci come Montelukast (MTK, Singulair®), Zafirlukast (Accolate®) e Pranlukast (Onon®, Azlaire®), sono stati già sviluppati e messi in commercio per essere impiegati nella prevenzione e nel controllo degli attacchi di asma. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato come il Montelukast sia in grado anche migliorare il danno epatico in modelli murini grazie alle sue attività antinfiammatoria ed antiossidante [13,14].

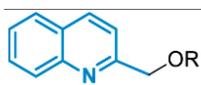
Oltre a queste molecole ben caratterizzate, nel corso degli anni sono stati segnalati molti altri antagonisti dei CysLTRs e alcuni di essi sono stati ampiamente testati in ambito preclinico e clinico, senza tuttavia raggiungere gli obiettivi necessari al fine di proseguire nelle fasi di sperimentazione. L'ultimo gruppo comprende, tra gli altri, l'alfa-pentil-3-[2-chinolinilmetossi] alcol benzilico (REV5901) [15].

Attualmente, un'area sempre più in crescita nel processo di sviluppo dei farmaci è quella del *drug reprofiling* o riposizionamento dei farmaci. In effetti, il processo di identificazione di

nuove applicazioni per molecole esistenti o accantonate è un approccio efficiente per massimizzare gli investimenti nella ricerca farmacologica in considerazione del fatto che queste molecole hanno già attraversato le numerose fasi di ricerca pre-clinica e clinica e quindi risultano già ben caratterizzate sotto il profilo di efficacia e sicurezza. Nel perseguire questo approccio, abbiamo scoperto che il REV5901, un antagonista del CysLT₁R attivo per via orale, lega e attiva il recettore degli acidi biliari GPBAR1, con una EC₅₀ di 2,5 µM, ospitando il sito di legame per il recettore come mostrato dall'analisi *in silico* ed esercitando un'attività antinfiammatoria GPBAR1-dipendente in modelli murini di infiammazione intestinale [15]. In questo scenario il presente progetto di tesi si inserisce in un ampio programma multidisciplinare che combina metodi computazionali (screening virtuale e dinamica molecolare), sintesi chimica e valutazione farmacologica sperimentale in modelli *in vitro* ed *in vivo*, con l'obiettivo di identificare molecole con attività duale nei confronti dei recettori CysLTRs e GPBAR1, in particolare antagonisti del CysLT₁R/agonisti di GPBAR1 e valutarne l'attività antinfiammatoria in modelli di epatite.

Sebbene i due recettori condividano poche somiglianze dal punto di vista strutturale, attraverso simulazioni avanzate di *binding* molecolare, accompagnate da successivi saggi *in vitro* di transattivazione, siamo stati in grado di sviluppare un farmacoforo unico a partire dalla struttura chinolinica del REV5901 identificando nello stesso un potenziale scaffold chimico per lo sviluppo di nuovi ligandi non steroidei duali antagonisti del CysLT₁R/agonisti di GPBAR1, da qui la prima famiglia di derivati del REV5901 denominati CHIN.

La **Tabella 1** riporta i dati ottenuti da saggi di attività della Luciferasi su cellule HEK-293T trasfettate con GPBAR1 umano effettuati nei nostri laboratori e i saggi funzionali sul CysLT₁R umano sviluppati dall'azienda Eurofins Cerep-Panlabs (Francia) [16].



Composti (CHIN)	^a GPBAR1	EC ₅₀ (µM)	^b CysLT ₁ R	IC ₅₀ (µM)
<p>REV5901</p>	116.8 ± 0.2	2.5 ± 1.2	136.7 ± 27.8	1.1 ± 0.5
<p>1</p>	56.91 ± 7.8	-	21 ± 6.5	-

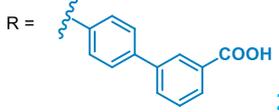
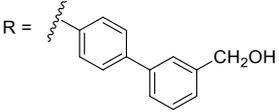
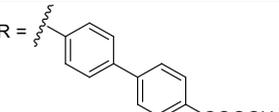
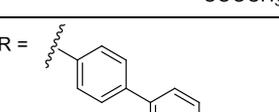
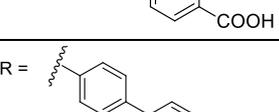
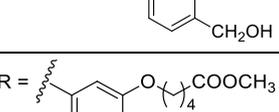
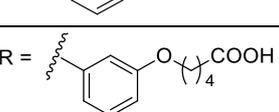
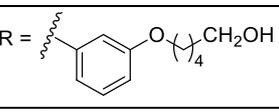
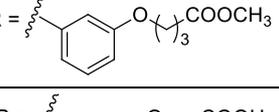
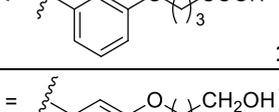
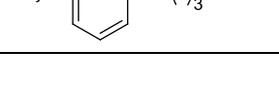
R =  2	82 ± 1.2	4.6 ± 1.5	109 ± 1.6	5.67 ± 0.77
R =  3	2.1 ± 0.06	-	59 ± 3.6	-
R =  4	13.5 ± 1	-	13 ± 7.9	-
R =  5	36.74 ± 3	-	43 ± 4.5	-
R =  6	64.9 ± 13	-	0.8 ± 1.5	-
R =  7	20.5 ± 2.4	-	76 ± 9.6	1.68 ± 0.28
R =  8	12 ± 1.3	-	99.6 ± 2.0	0.90 ± 0.50
R =  9	30.8 ± 7.5	-	106.9 ± 1.6	0.36 ± 0.58
R =  10	20.2 ± 4.5	-	92.1 ± 3.4	1.55 ± 0.43
R =  11	18.3 ± 4.8	-	92.8 ± 2.3	0.95 ± 0.2
R =  12	12.8 ± 3.3	-	108.6 ± 1.8	0.31 ± 0.24

Tabella 1: Valutazione *in vitro* dei derivati del REV5901. ^a % Efficacia dei composti a 10 μ M verso il TLCA usato come 100. Per la transattivazione mediata da GPBAR1, le cellule HEK-293T sono state trasfettate con 100 ng del vettore CMVSPORT6-GPBAR1 umano, 200 ng del vettore pGL4.29 (Promega, Madison WI) un vettore reporter contenente l'elemento 64 responsivo del cAMP (CRE) che guida la trascrizione del gene reporter della Luciferasi luc2P e 100 ng di pGL4.70 (vettore codificante per il gene umano della Renilla). Dopo la stimolazione, 10 μ L dei lisati cellulari sono stati usati per valutare le attività della Luciferasi e della Renilla usando il sistema Dual-Luciferase Reporter (E1980, Promega). La luminescenza è stata misurata usando il luminometro 20/20 Glomax (Promega). L'attività della Luciferasi (RLU) è stata normalizzata con l'attività della Renilla (RRU). ^b I saggi funzionali sul CysLT₁R umano sono stati effettuati dall'azienda Eurofins Cerep-Panlabs (Francia).

Come si può evincere dai dati di efficacia e di EC_{50} su GPBAR1 e IC_{50} sul CysLT₁R (**Tabella 1**), tra i composti della serie, il miglior candidato duale è risultato il composto numero 2 con una EC_{50} di 4.6 μ M e un IC_{50} di 5.7 μ M. Questo composto è stato denominato CHIN117 (**Figura 1 A, B**).

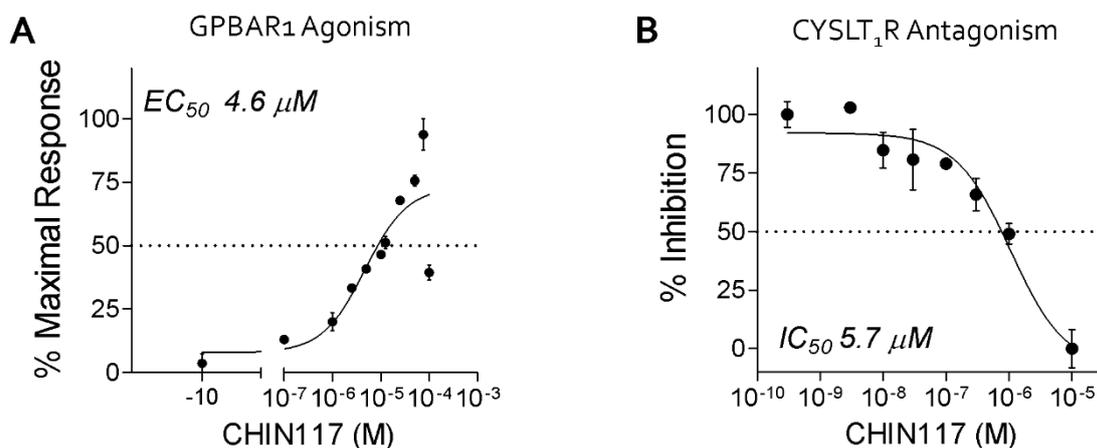


Figura 1: Valutazione *in vitro* del CHIN117 (**A**) Curva dose-risposta del CHIN117 in agonismo su GPBAR1 e (**B**) Curva dose-risposta del CHIN117 in antagonismo sul CysLT₁R.

CHIN117, infatti, si è rivelato un potente duale antagonista del CysLT₁R/agonista di GPBAR1, dotato di un eccellente profilo farmacodinamico e farmacocinetico [16].

Il passo successivo all'identificazione e alla profilazione del nostro miglior candidato, è stato quello di valutare la sua efficacia in un modello murino di epatite cronica indotta da una dieta ricca di grassi che simula la steatoepatite non alcolica (NASH) in quanto è stato già ampiamente dimostrato in diversi modelli animali di NAFLD/NASH che questi due recettori sono coinvolti nello sviluppo della malattia. Tuttavia non ci sono ancora studi sulla potenziale attività sinergica dei due recettori su questo modello [17]. Successivamente il CHIN117 è stato testato in un modello murino di epatite acuta indotta da paracetamolo mettendolo a confronto con il Montelukast, antagonista di riferimento del CysLT₁R (IC_{50} 2.3 nM) e il BAR501, agonista selettivo di GPBAR1 (EC_{50} 1 μ M) poiché l'efficacia dei due composti ad azione singola, BAR501 e Montelukast, in questo modello murino era stata già dimostrata da noi [18] e da altri gruppi di ricerca [14]. I risultati dei due studi presentati a seguire mostrano che il CHIN117 si è rivelato una promettente molecola in grado di ridurre la risposta proinfiammatoria sia in un modello di epatite cronica (NAFLD/NASH) che in un modello di danno epatico acuto indotto da

farmaci (in particolare da acetaminofene, APAP), mettendo in evidenza l'importanza dell'approccio combinato nel ridurre l'infiammazione epatica.

Capitolo 1

1.1 *G-protein-coupled bile acid receptor 1* (Gpbar1)

1.1.1 Struttura, distribuzione e cascata di attivazione

Noti una volta solo per la loro capacità di promuovere l'assorbimento dei nutrienti a livello intestinale, agli acidi biliari è stato riconosciuto un ruolo importante come molecole segnale, grazie alla loro capacità di esercitare attività pleiotropica in tessuti metabolici e non, mediante l'attivazione di una famiglia di recettori nucleari e di membrana altamente conservati, conosciuti con il nome di recettori attivati dagli acidi biliari o BARs [19]. Almeno quattro membri delle superfamiglie di recettori nucleari (NRs), vengono attivati, a concentrazioni fisiologiche, dagli acidi biliari primari e secondari [20, 21].

Nel 1999, fu scoperta la loro funzione come ligandi endogeni del recettore nucleare "*Farnesoid-X-Receptor*" (FXR), il quale si è dimostrato essere il recettore per l'acido chenodesossicolico (CDCA) e l'acido colico (CA), due acidi biliari primari nell'uomo [22]. Da allora, è stata evidenziata l'attività sui recettori nucleari "*constitutive androstane receptor*" (CAR), "*pregnane-X-receptor*" (PXR) e "*vitamin D receptor*" (VDR) [23,24,25,26,27]. Nel 2002 è stato scoperto che gli acidi biliari secondari, come l'acido litocolico (LCA) e acido desossicolico (DCA), possono attivare una famiglia di recettori completamente diversa e cioè quelli appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Il primo GPCR identificato come recettore attivato dagli acidi biliari è stato denominato M-BAR (*Membrane bile acid-activated receptor*) o TGR5 (*Takeda G protein receptor 5*) e poi ribattezzato come GPBAR1 (*G-protein-coupled bile acid receptor 1*) [28].

Il recettore GPBAR1 è un recettore metabotropico di membrana accoppiato alle proteine G e appartenente alla sottofamiglia dei recettori rodopsino-simili. Come anticipato, venne identificato per la prima volta da Maruyama et al. nel 2002, come il primo recettore di membrana per gli acidi biliari. La sequenza genica di questo recettore è lunga 993 bp e codifica per 330 aminoacidi, che formano sette domini transmembrana, caratteristici dei recettori GPCR. Nell'uomo il gene di *hBG37* è localizzato nel cromosoma 2q35 (37), nel topo è presente nel cromosoma 1c3. Inoltre, è stato osservato che la sequenza cDNA mostra la completa omologia (>80%) con quella di bovini, conigli, e altri roditori, ciò dimostra una conservazione filogenetica tra i mammiferi [29]. Nel dettaglio, strutturalmente il recettore è costituito da

un'unica catena polipeptidica formata da un dominio extracellulare N-terminale, sette α -eliche transmembrana ed un dominio intracellulare C-terminale. Le sette α -eliche sono collegate tra loro da tre segmenti (o loop) extracellulari e da tre segmenti intracellulari (**Figura 2**). Il terzo loop citoplasmatico dei recettori corrisponde alla regione della molecola che si accoppia alla proteina G, una molecola eterotrimerica costituita dalle subunità α , β e γ [5].

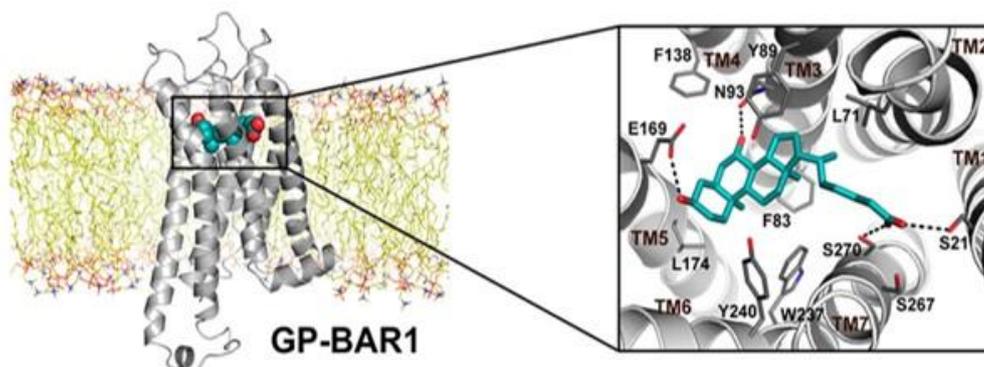


Figura 2: Struttura tridimensionale del recettore GPBAR1.

Sin dalla sua identificazione, l'espressione del gene *Gpbar1* è stata ampiamente rilevata sia negli esseri umani che negli animali, in particolare nella cistifellea, nel rene, nella placenta, nel polmone, nel tessuto adiposo, nel muscolo liscio, negli organi riproduttivi femminili, così come nel fegato e nel rene fetali [30]. Sono siti di espressione anche le ghiandole endocrine, gli organi immunitari come milza e linfonodi e il tratto gastrointestinale, principalmente ileo e colon. GPBAR1 è stato inoltre individuato negli astrociti, nei neuroni e nelle cellule immunitarie residenti (microglia) del sistema nervoso centrale, nel sistema nervoso enterico, negli astrociti e nei neuroni del sistema nervoso periferico, compresi i gangli della radice dorsale e i neuroni sensoriali primari. Per quanto riguarda le cellule immunitarie, il recettore è presente principalmente nei monociti CD14 positivi e nei macrofagi residenti nei tessuti. Nonostante il fegato sia il principale organo bersaglio degli acidi biliari, l'espressione di GPBAR1 negli epatociti è trascurabile rispetto alla sua presenza nelle cellule non parenchimali [31]. Grazie all'utilizzo di saggi di immunofluorescenza in fegati di ratto, topo e umani, il recettore è stato individuato infatti, sulla membrana plasmatica delle cellule endoteliali sinusoidali (LSEC), nei macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer, KC) e nei colangiociti.

Infine, sebbene non sia stata osservata alcuna traccia di GPBAR1 nelle cellule stellate epatiche quiescenti (HSC), il recettore viene upregolato durante la loro attivazione [28].

In base al tessuto in cui viene espresso, GPBAR1 è coinvolto in diversi processi cellulari. In generale, in condizioni di riposo, il recettore si trova in uno stato di bassa affinità per le proteine G ad esso accoppiate e in seguito al legame del recettore al proprio ligando seguono una cascata di eventi. In primo luogo, l'interazione ligando-recettore innesca il processo di internalizzazione, in cui i recettori presenti sono inglobati in specifiche vescicole, presenti a livello della membrana, perdendo così la capacità di trasdurre il segnale. È un meccanismo di autoregolazione, che ha la funzione di diminuire il numero dei recettori disponibili in modo non distruttivo, senza la necessità di una neo-sintesi dei recettori nel momento in cui si riattiva il percorso di trasduzione del segnale, che si verifica rapidamente con la riesposizione dei recettori sulla superficie della membrana. In secondo luogo, sulla superficie interna della membrana si verifica il legame tra il recettore e la guanosina 5'-O-3'trifosfato GTP- γ -S, un analogo della GTP resistente all'idrolisi, che rilascia la subunità G α dando il via alla trasduzione del segnale: viene attivato l'enzima Adenilato ciclasi (AC), che agisce generando cAMP, un secondo messaggero in grado di attivare la *Protein chinasi K* (PKA); questa fosforila il *response element binding protein* (CREB), generando CREB-P. Così il fattore di trascrizione va incontro a dimerizzazione e migra nel nucleo, dove legandosi alle regioni *cAMP response element* (CRE), sequenze di DNA presenti nel promotore, promuove la trascrizione dei geni target [22]. Il legame del ligando con il GPBAR1 può attivare anche altre vie chinasiche come quella della *protein chinasi B* (AKT), della *Src chinasi*, la *Rho chinasi*, del *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) e *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2) ed è stato dimostrato regolare negativamente la fosforilazione del fattore nucleare κ B (NF- κ B) [28].

1.1.2 Effetti biologici dell'attivazione di GPBAR1

Come già accennato in precedenza, GPBAR1 svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi biliare [30], energetica [4] e nel metabolismo glucidico [3,4]. Inoltre sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato il ruolo immunomodulatore del recettore. GPBAR1 è espresso da cellule dell'immunità innata, macrofagi, cellule NKT ed è ritenuto essenziale per mantenere l'omeostasi immunitaria intestinale ed epatica [9,32]. In particolare è stato osservato che l'attivazione di GPBAR1 riduce i livelli delle citochine proinfiammatorie, come l'interleuchina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6 e il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α),

sintetizzate dalle cellule di Kupffer in risposta a un antigene *non self* come il lipopolisaccaride (LPS).

A tal proposito, è stato dimostrato che la sintesi delle citochine proinfiammatorie dopo stimolazione con LPS è maggiore nei macrofagi di modelli murini knockout (KO) per Gpbar1, rispetto ai modelli wild type. Ciò testimonia il ruolo del recettore nella down-regolazione della risposta infiammatoria innescata da batteri Gram-negativi. Nei macrofagi di topi Gpbar1 knockout (KO), i livelli di mRNA dei vari geni proinfiammatori, sono più alti rispetto a quelli dei macrofagi dei modelli wild type.

In maniera analoga, nella linea cellulare di macrofagi RAW264.7, l'attivazione del recettore inibisce l'attivazione di NF- κ B tramite la via di segnalazione regolata dal rilascio di cAMP. Infatti, quando il recettore è attivato o over espresso, in seguito alla stimolazione con LPS, aumenta l'attività trascrizionale di NF- κ B. Tali risultati risultano invertiti in presenza di inibitori di cAMP [9].

È stato anche dimostrato che l'interazione degli acidi biliari con GPBAR1 influenza il differenziamento dei sottotipi di cellule dendritiche guidandole verso un fenotipo antinfiammatorio. Le cellule dendritiche, in quanto cellule presentanti l'antigene, sono regolatori centrali dell'immunità innata e acquisita.

È stato osservato che l'aggiunta di acidi biliari contrasta il loro differenziamento di monociti, isolati dal sangue umano periferico, in cellule dendritiche indotta da stimolazione con antigeni batterici, portando ad una riduzione della produzione di interleuchina 12 (IL-12). Tuttavia, gli effetti sul differenziamento sono stati osservati solo in presenza, nella coltura primitiva, di acidi biliari o di uno specifico agonista di GPBAR1 e non nelle cellule arrivate al termine del differenziamento. Inoltre, la down-regolazione dell'espressione di GPBAR1, dopo la differenziazione in cellule dendritiche supporta il ruolo critico di GPBAR1 sui monociti nella fase iniziale di differenziamento in cellule dendritiche.

1.1.3 Ruolo di GPBAR1 nel fegato

GPBAR1 non è espresso negli epatociti, lo è invece nelle cellule endoteliali sinusoidali (LSEC), nelle cellule di Kupffer e nei colangiociti. In particolare, le cellule endoteliali sinusoidali compongono la parete fenestrata dei sinusoidi epatici e sono esposte ad una concentrazione altamente variabile di nutrienti, inclusi gli acidi biliari.

La concentrazione degli acidi biliari nel sangue portale aumenta in risposta all'introduzione di alimenti dopo la contrazione della cistifellea e il riassorbimento degli acidi biliari dall'intestino. Nelle cellule endoteliali sinusoidali esposte ad alti livelli di acidi biliari, in particolare LCA e la sua forma tauro-coniugata (TLCA), l'attivazione del GPCR1 porta all'aumento dell'AMP ciclico e alla fosforilazione, mediata dalla proteina chinasi A (PKA), della serina dell'ossido nitrico sintasi (eNOS), la quale è responsabile della produzione di ossido nitrico (NO) [33]. L'ossido nitrico protegge l'endotelio epatico dallo stress ossidativo e dalla perossidazione lipidica, riducendo l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni con conseguente vasodilatazione. La stimolazione del recettore permette, inoltre, la fosforilazione della serina della cistationina gamma liasi (CSE), in maniera AKT-dipendente, promuovendo un aumento dei livelli di acido solfidrico H₂S [2, 34]. Il recettore supporta la generazione delle due molecole vasodilatatorie NO e H₂S anche attraverso l'induzione dell'espressione genica sia dell'eNOS che della CSE. Ciò suggerisce che GPCR1 regola la microcircolazione intraepatica [34, 35].

L'attivazione del recettore nelle cellule di Kupffer, inoltre, riduce il rilascio di citochine proinfiammatorie, dunque risulta essere coinvolto nell'attenuazione della reattività dei macrofagi.

È stato osservato che l'immuno-reattività di GPCR1 aumenta la concentrazione delle cellule di Kupffer murine in seguito alla legatura del dotto biliare, suggerendo un potenziale ruolo del recettore nella regolazione della risposta epatica autoimmune in una condizione di colestasi ostruttiva [36]. L'espressione del recettore è stata inoltre rilevata nei macrofagi derivanti da sangue periferico, una volta attivato promuove la loro polarizzazione verso un fenotipo antinfiammatorio, con conseguente riduzione dell'espressione e della secrezione di citochine e chemochine pro-infiammatorie. Il legame con il ligando porta infatti ad un aumento dei livelli di cAMP, che inibisce la fosforilazione della proteina inibitoria IκBα e la successiva traslocazione nucleare di NF-κB p65, prevenendone così l'attività trascrizionale. Il recettore è in grado inoltre di sopprimere la maturazione, caspasi-1- mediata, di citochine proinfiammatorie, come l'interleuchina-1 β (IL-1β) e l'IL-18 [28]. Dunque, l'attivazione GPCR1 in queste cellule media le azioni immunomodulatorie degli acidi biliari TLCA, LCA, DCA e CDCA.

I principali agonisti endogeni del recettore GPCR1 sono gli acidi biliari, non coniugati e coniugati con taurina o glicina con il seguente ordine di potenzialità: acido litocolico LCA > acido desossicolico DCA > acido chenodeossicolico CDCA > acido colico CA [5]. GPCR1 può

essere inoltre attivato da molti steroidi, come pregnenolone, allopregnenolone, pregnenediolo ed estradiolo [37].

1.1.4 Agonisti naturali di GPBAR1

Finora sono stati riportati solo pochi esempi di ligandi naturali di GPBAR1; tra i primi, l'acido oleanolico, un triterpene attivo proveniente dall'*Olea europaea*, è risultato in grado di attivare il recettore con un'EC₅₀ comparabile a quella dell'acido litocolico (LCA), ligando endogeno del GPBAR1 [38]. Ulteriori studi farmacologici hanno dimostrato che l'acido oleanolico esercita l'effetto antidiabetico nei topi alimentati con una dieta ricca di grassi, migliorando la tolleranza al glucosio e aumentando il rilascio di insulina dalle cellule beta-pancreatiche [39] e di recente altri acidi carbossilici pentaciclici triterpenici, come l'acido ursolico, quinovico, corosolico, betulinico e maslinico, ampiamente distribuiti nelle specie vegetali si sono dimostrati ligandi selettivi del recettore in grado di indurre la secrezione di GLP-1 dalle cellule L.

1.1.5 Derivati semisintetici degli acidi biliari

Recentemente, la modifica chimica degli acidi biliari (BA), utilizzata con l'intento di migliorarne la potenza, l'efficacia e la stabilità metabolica, ha offerto molti composti con promettenti profili farmacologici. L'introduzione, ad esempio di un gruppo metile in posizione C-23 nella catena laterale dell'acido 6-etilchenodesossicolico (6-ECDCA) ha portato alla sintesi dell'INT-777, un agonista potente e selettivo di GPBAR1, considerato promettente nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 [6]. Successive modifiche nella lunghezza della catena laterale e nella natura del gruppo terminale sullo scaffold dell'acido biliare hanno poi portato alla sintesi del composto BAR501, il primo esempio di un derivato dell'UDCA C-6β-sostituito con una potente e selettiva attività su GPBAR1 [7]. In un modello murino di NASH, BAR501 è riuscito a revertire l'insulino-resistenza, l'aumento del peso del grasso epididimale (epWAT) e la funzionalità del grasso bruno (BAT) promuovendo il dispendio energetico e il *browning* dell'epWAT [8]. Inoltre, BAR501 si è affermato come promettente composto nella cura delle IBD. Nei modelli murini di colite, BAR501 attenua l'infiammazione e la disfunzione immunitaria spostando la polarizzazione dei macrofagi del colon dal fenotipo infiammatorio M1 al fenotipo anti-infiammatorio M2 [9].

1.2 I Leucotrieni

1.2.1 Biosintesi e distribuzione

I Leucotrieni sono potenti mediatori lipidici coinvolti nella patogenesi di molteplici processi infiammatori, tra i quali quelli coinvolti nelle malattie allergiche. Essi sono prevalentemente prodotti a partire dall'acido arachidonico (AA), un acido grasso essenziale polinsaturo a 20 atomi di carbonio. L'acido arachidonico appartiene alla famiglia degli acidi grassi polinsaturi ω -6 e di solito si trova esterificato nella seconda posizione del carbonio nei fosfolipidi delle membrane. Funge inoltre da precursore di diversi mediatori pro-infiammatori lipidici come le prostaglandine (PG), le prostaciline, i trombossani (TXA), le lipoxine ed i leucotrieni stessi (LT), che hanno funzioni individuali e sovrapposte nell'infiammazione acuta e cronica. Il metabolismo aberrante dell'acido arachidonico è spesso collegato alla produzione di eicosanoidi pro-infiammatori, malattie infiammatorie croniche e carcinogenesi. L'acido arachidonico, che viene immagazzinato come diacilglicerolo (DAG), viene rilasciato dal fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) presente nell'involucro nucleare esterno delle cellule, da cui viene mobilizzato nel citoplasma mediante l'attivazione della PLA2 citosolica calcio-dipendente oppure dall'azione combinata della fosfolipasi C (PLC) e della lipasi DAG. Una volta nel citosol, l'acido arachidonico può essere metabolizzato enzimaticamente in modo tridirezionale dal citocromo P450 o dalla via COX in prostaglandine, prostaciline o trombossani, o attraverso la via della 5-lipossigenasi nei leucotrieni A₄ (LTA₄), B₄ (LTB₄), C₄ (LTC₄), D₄ (LTD₄) e E₄ (LTE₄). Gli ultimi tre derivati alternativi a LTA₄ sono definiti collettivamente "cisteinil leucotrieni" (CysLT) a causa della presenza di un residuo di cisteina e sono strutturalmente simili ma funzionalmente distinti [12] (**Figura 3**).

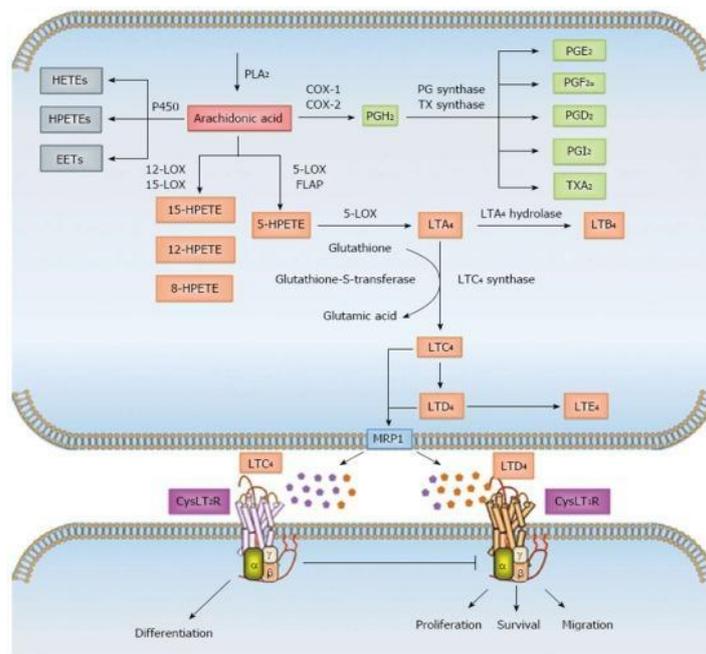


Figura 3: Panoramica del metabolismo dell'acido arachidonico [12].

I cisteinil leucotrieni (CysLTs) sono una famiglia di potenti mediatori lipidici proinfiammatori, sintetizzati da una varietà di cellule, inclusi mastociti, eosinofili, basofili e macrofagi. I mediatori dell'infiammazione sono importanti perché evocano i segni dell'infiammazione, compreso l'accumulo di leucociti e la fuoriuscita di plasma dai piccoli vasi nel tessuto infiammato. Sono prodotti a partire dall'acido arachidonico mediante una cascata enzimatica, in cui la 5-lipossigenasi (5-LOX) e la proteina attivante la 5-lipossigenasi (FLAP) esercitano un ruolo importante: agiscono come enzimi "primi" e "limitanti". La 5-LOX, in particolare, ha due funzioni catalitiche: l'inserimento di ossigeno molecolare mediante l'attività della diossigenasi e la formazione di epossido mediante l'attività del leucotriene A₄ (LTA₄) sintasi [40]. Il LTA₄ è l'intermedio centrale che può essere convertito in leucotriene B₄ (LTB₄) da LTA₄ idrolasi o può essere coniugato con glutathione ridotto dalla sintasi leucotriene C₄ (LTC₄), per formare LTC₄.

A questo punto, una γ -glutamyltransferasi rimuove il residuo di γ -glutamyl portando al Leucotriene D₄ (LTD₄) e, nella fase finale, le dipeptidasi rimuovono il residuo di glicina con la formazione del Leucotriene E₄ (LTE₄) [40]. LTB₄ e LTC₄ vengono esportati dalla cellula da proteine trasportatrici specifiche [41]. La capacità di generare grandi quantità di leucotrieni a partire dall'arachidonato è ampiamente limitato ai leucociti (neutrofili, eosinofili, monociti,

macrofagi e mastociti); tuttavia, le quantità di LTB₄ e cisteinil leucotrieni che i vari tipi di leucociti producono dipendono dagli enzimi distali LTA₄ idrolasi e LTC₄ sintasi, rispettivamente. Anche se le cellule non leucocitarie generalmente non hanno sufficiente 5-lipossigenasi e FLAP per sintetizzare quantità apprezzabili di leucotrieni dall'arachidonato, tali cellule che esprimono gli enzimi distali che metabolizzano l'LTA₄ possono assorbire l'LTA₄ derivato dai leucociti e metabolizzarlo in leucotrieni bioattivi, un processo chiamato "biosintesi transcellulare". L'interazione tra neutrofili e cellule endoteliali è un esempio di questo fenomeno: un neutrofilo (la cellula donatrice) contenente 5-lipossigenasi fornisce LTA₄ alla cellula endoteliale (la cellula accettrice), che manca di 5-lipossigenasi ma esprime LTC₄ sintasi e può quindi metabolizzare l'LTA₄ donato in LTC₄.

L'output della via di sintesi dei leucotrieni è regolato dalla quantità di arachidonato libero che la fosfolipasi A2 rilascia dai fosfolipidi di membrana, dal livello di ciascuna delle proteine nella via della 5-lipossigenasi e la disponibilità di piccole molecole (ad esempio, ATP, ossido nitrico e reattivi intermedi dell'ossigeno) che modulano l'attività 5-lipossigenasica. Un'altra variabile che influenza la sintesi dei leucotrieni è la localizzazione intracellulare della 5-lipossigenasi. Nei leucociti a riposo, questo enzima può risiedere nel citoplasma o nel nucleoplasma, e fa la spola tra di loro mediante processi di importazione ed esportazione nucleari regolamentati. Quando la 5-lipossigenasi viene attivata, si riposiziona nella membrana nucleare esterna o interna. Il movimento della 5-lipossigenasi dal nucleoplasma alla membrana nucleare interna è associato a una massima sintesi di LTB₄ [40].

1.2.2 Recettori dei CysLTs 1 e 2 ed effetti biologici

I CysLTs, una volta sintetizzati, esercitano i loro effetti legandosi ai recettori dei cisteinil leucotrieni (CysLTRs), una famiglia di recettori accoppiati a proteine G transmembrana (GPCR) della classe della rodopsina. Sono stati identificati due principali CysLTRs: CysLT₁R e CysLT₂R che riconoscono i loro ligandi nel seguente ordine di affinità LTD₄ > LTC₄ > LTE₄ e LTC₄ > LTD₄ > LTE₄, rispettivamente [12]. Il CysLT₁R è espresso nella maggior parte dei tessuti umani, quali appendice esofago, linfonodi, polmoni [42], piccolo intestino, colon, fegato e, in particolare, si ritrova su monociti, macrofagi, eosinofili, basofili, mastociti, neutrofili, linfociti T e B, cellule staminali ematopoietiche, cellule interstiziali della mucosa gastrica, muscolatura liscia delle vie aeree, fibroblasti bronchiali e cellule dell'endotelio vascolare. Il CysLT₂R è espresso

prevalentemente a livello cardiaco e neuronale. I recettori dei cisteinil leucotrieni (CysLTRs) promuovono l'accumulo e la funzione di tutti i sottogruppi di leucociti nei siti di infiammazione e sono coinvolti nella fisiopatologia di varie malattie allergiche respiratorie, tra cui asma bronchiale, asma indotta da esercizio fisico e da aspirina e rinite allergica, nonché dermatite atopica, congiuntivite allergica e anafilassi [42].

1.2.3 Ruolo dei Cisteinil-leucotrieni (CysLTs) nelle malattie epatiche

I Cisteinil-leucotrieni (CysLTs) sono potenti mediatori biologici con molteplici ruoli nelle epatopatie acute e croniche [11]. Ad esempio, numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo dei CysLTs nella patogenesi dell'epatite fulminante. In uno studio, in particolare, è stato osservato che in ratti trattati con la combinazione di un'endotossina e d-galattosamina a dosi non letali, la sintesi dei CysLTs aumenta in risposta al trattamento e che l'antagonismo dei recettori dei CysLTs protegge dal danno epatico, mentre gli inibitori della cicloossigenasi non sortiscono alcun effetto benefico [11]. Dunque questi dati confermano i CysLTs come mediatori specifici dell'infiammazione e del danno cellulare. Da ulteriori studi sono emersi, poi, come possibili mediatori della colestasi. I CysLT infatti sono responsabili dell'aumento della permeabilità vascolare nella microcircolazione causando edema epatico che porta alla colestasi per aumento della resistenza al flusso biliare. Infatti in modelli murini i CysLT causano lo stravasamento del plasma attorno ai dotti biliari. Nei ratti un effetto simile è stato prodotto dall'azione sinergica di LTD₄ e PGE₂ [43]. Inoltre, l'interesse per il ruolo dei CysLTs nell'ipertensione portale è stato suscitato dall'osservazione che l'LTD₄ aumenta la pressione portale nel fegato di ratto isolato e perfuso. Studi sull'uomo indicano un aumento dell'escrezione urinaria dell'LTE₄ in pazienti con cirrosi (con o senza ascite) suggerendo un'associazione tra i CysLTs e la malattia epatica cronica. In più l'aumentata escrezione di CysLTs è correlata alla gravità della malattia epatica. La prova diretta a sostegno del ruolo dei CysLTs nell'ipertensione portale deriva da uno studio completo di Titos et al. [44] in cui le cellule di Kupffer isolate da ratti con cirrosi trattati con il CCl₄ avevano una maggiore espressione genica della 5-lipossigenasi e gli epatociti di ratti cirrotici mostravano una maggiore produzione basale di CysLTs. In modo più significativo, l'aggiunta di LTD₄ o di terreno condizionato da epatociti a cellule stellate epatiche in coltura provocava un aumento della concentrazione di calcio intracellulare e la contrazione cellulare. Questi effetti sono stati completamente inibiti da uno specifico antagonista del recettore per LTD₄ (MK 571). Presi

insieme, questi dati sono coerenti con l'ipotesi che la LTD₄ sintetizzata dagli epatociti si diffonda nello spazio di Disse e attivi la contrazione cellulare nella cellula stellata epatica, un ben noto regolatore del flusso sanguigno sinusoidale [11]. E' infine noto che i CysLTs stimolano la proliferazione cellulare e la sintesi del collagene, suggerendo che l'aumento della produzione di CysLTs può contribuire al processo di fibrosi [11].

1.2.4 Antagonisti del *CysLT₁R*

L'importanza che i CysLTs rivestono nel processo infiammatorio ha portato allo sviluppo di farmaci, cosiddetti antagonisti, che inibiscono la loro produzione o la loro azione al fine di inibirne l'attività.

Una molecola può essere definita antagonista quando, legandosi al recettore di interesse, interrompe la sua attività bloccando la trasduzione del segnale.

Sebbene non siano noti antagonisti specifici per il CysLT₂R, diversi antagonisti del CysLT₁R come Montelukast (MTK, Singulair®), Zafirlukast (Accolate®) e Pranlukast (Onon®, Azlaire®), sono stati già sviluppati e messi in commercio per essere impiegati nella prevenzione e nel controllo degli attacchi di asma. Recenti studi hanno dimostrato, inoltre, che il Montelukast sembra migliorare il danno epatico grazie alle sue attività anti-infiammatoria ed anti-ossidante [13,14]. Oltre a queste molecole ben caratterizzate, nel corso degli anni sono stati segnalati molti altri antagonisti dei CysLTRs e alcuni di essi sono stati ampiamente testati in ambito preclinico e clinico, senza tuttavia raggiungere gli obiettivi necessari al fine di proseguire nelle fasi di sperimentazione. L'ultimo gruppo comprende, tra gli altri, l'alfa-pentil-3-[2-chinolinilmetossi] alcol benzilico (REV5901) [15].

Capitolo 2

2.1 Steatosi epatica non alcolica (NAFLD/NASH)

2.1.1 Definizione ed epidemiologia

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è caratterizzata dalla presenza di grasso epatico con accumulo superiore al 5% degli epatociti in assenza di un consumo significativo di alcool (20 g al giorno per gli uomini e 10 g al giorno per le donne), infezione virale, o qualsiasi altra eziologia specifica per epatopatia. Per molto tempo, il fegato grasso è stato considerato come una malattia lieve e non c'era molto interesse intorno a questa patologia. Oggi, la NAFLD è una patologia emergente che comprende un ampio spettro di condizioni che interessano la ghiandola epatica, dalla semplice steatosi a quadri clinici più complessi che comprendono, fibrosi e necroinfiammazione (NASH), fino ad arrivare allo sviluppo della cirrosi (LC) e del carcinoma epatocellulare (HCC) [45, 46]. La NAFLD è una malattia pandemica in tutto il mondo, strettamente collegata all'obesità, al diabete di tipo 2 e alla sindrome metabolica. Colpisce il 25-30% della popolazione generale dell'Europa e degli Stati Uniti, ma questa cifra sale all'80% - 90% in coorti selezionate di individui dismetabolici [47, 48]. I meccanismi alla base della genesi della steatosi epatica non sono ancora completamente chiariti. È noto che l'accumulo epatico di lipidi si associa a obesità viscerale, insulino-resistenza e dislipidemia, nel complesso quadro della sindrome metabolica. In alcuni studi è stato riscontrato che la steatosi epatica precedeva la manifestazione del diabete mellito e/o della sindrome metabolica, ipotizzando che la NAFLD possa quindi essere considerata un fattore di rischio per lo sviluppo di entrambe le condizioni. Secondo la teoria della patogenesi *multiple hit*, numerosi fattori interagiscono per determinare l'insorgenza di NAFLD in soggetti geneticamente predisposti; tali fattori includono dieta, insulino-resistenza, alterazioni del microbiota intestinale, predisposizione genetica e modificazioni epigenetiche. Per quanto riguarda il microbiota, l'alterazione della composizione e della capacità metabolica della flora batterica intestinale ha un effetto diretto sul fegato e uno indiretto, favorendo l'obesità e il diabete di tipo 2. Diversi metaboliti batterici, quali lipopolisaccaridi (LPS), acidi grassi a catena corta, colina, trimetilammina-N-ossido (TMAO), con meccanismi molto complessi regolano la permeabilità intestinale, l'appetito, l'accumulo di grasso e l'infiammazione [49] (**Figura 4**).

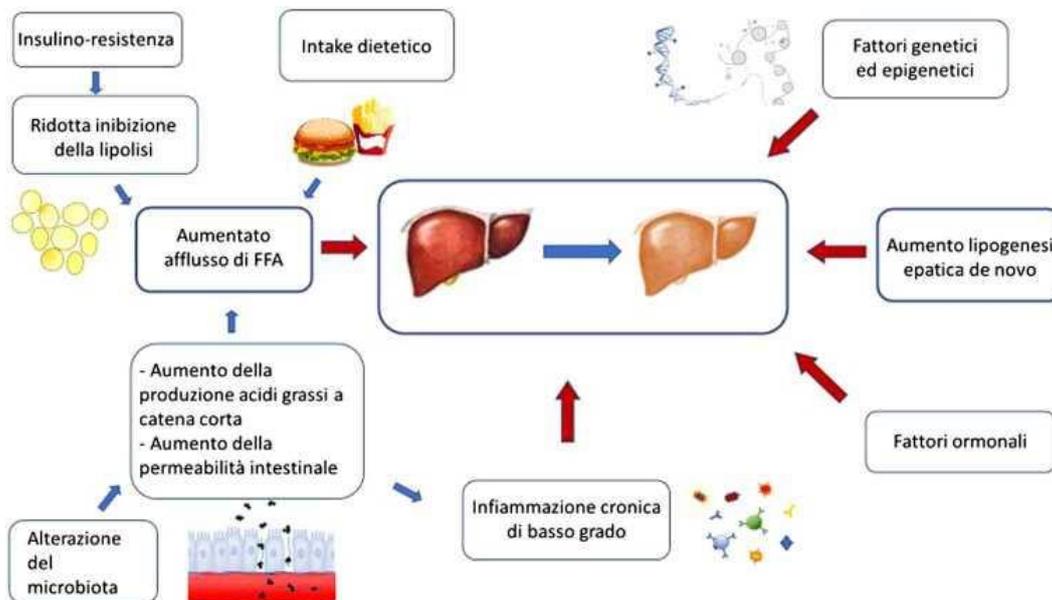


Figura 4: Patogenesi *multiple hit* della NAFLD [49]

Recentemente, proprio per la patogenesi così complessa della malattia, per il fatto che nel singolo paziente possa prevalere uno dei fattori patogenetici e che la gestione dei pazienti migliori grazie a una loro stratificazione in tal senso, è stata proposta una nuova terminologia per la NAFLD. Nel 2020, infatti, una consensus di esperti ha proposto di sostituire la definizione di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) con uno più appropriato e cioè steatosi epatica associata a disfunzione metabolica (MAFLD) [50]. Questa nuova definizione stabilisce chiaramente che questa malattia è un disordine metabolico. Secondo gli esperti, per soddisfare la diagnosi di MAFLD, è richiesta la presenza di steatosi epatica (istologia, imaging, marcatori ematici o punteggi di evidenza di accumulo di grasso) accompagnata da una delle seguenti caratteristiche: sovrappeso o obesità, diabete mellito di tipo 2 (DMT2) o segni di disregolazione metabolica. Quest'ultima è definita come la presenza di due o più condizioni: (a) aumento della circonferenza della vita; (b) aumento della pressione sanguigna o trattamento farmacologico specifico; (c) aumento dei trigliceridi (TG) o trattamento farmacologico specifico; (d) basso colesterolo lipoproteico ad alta densità (HDL-C); (e) prediabete; (f) alto punteggio di valutazione del modello omeostatico dell'IR (HOMA-IR); (g) infiammazione con livelli elevati di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hsPCR). Nel complesso, tuttavia, la possibilità di discriminare tra NAFLD e MAFLD attraverso la valutazione di queste caratteristiche dovrà essere confermata in studi futuri [50].

La NAFLD è classificata istologicamente in fegato grasso non alcolico (NAFL) e steatoepatite non alcolica (NASH). Mentre la NAFL è una semplice steatosi senza evidenza di danno epatocellulare, la NASH è caratterizzata dalla presenza di steatosi, infiammazione con danno epatocitario (*ballooning*) e fibrosi. A differenza della NAFL, la NASH è una malattia progressiva che, parallelamente allo sviluppo delle pandemie del diabete e dell'obesità, è diventata la principale causa di malattie del fegato su scala globale e si prevede che aumenterà ulteriormente nei prossimi 10-15 anni, con una percentuale maggiore di pazienti che sviluppano fibrosi, la principale causa di mortalità sia epatica che complessiva [50].

2.1.2 Patogenesi della NASH

La patogenesi della NAFLD è multifattoriale e coinvolge fattori ambientali e genetici, nonché eventi extraepatici e intraepatici. Un importante contributo alla patogenesi della NAFLD è costituito dalla disregolazione del metabolismo lipidico e dall'attivazione del sistema immunitario [51] (**Figura 5**).

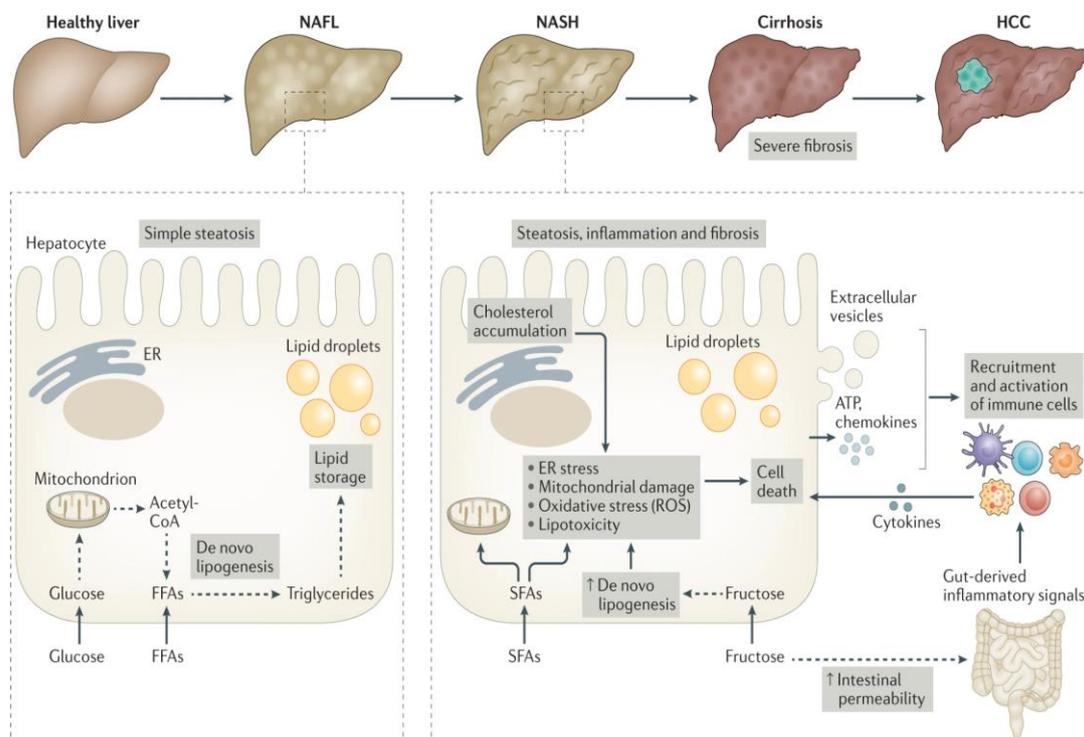


Figura 5: Fattori che contribuiscono alla progressione della NAFLD e alla patogenesi della NASH [52]

2.1.3 Metabolismo lipidico

Come detto in precedenza, la NAFLD è caratterizzata dall'accumulo patologico di lipidi negli epatociti, un processo che comporta un aumento dell'assorbimento o un aumento della sintesi di lipidi che supera la capacità degli epatociti di esportare o utilizzare i lipidi per scopi metabolici. Quando l'accumulo di lipidi supera i meccanismi protettivi, gli epatociti vengono danneggiati, un processo noto come lipotossicità, che rappresenta un obiettivo terapeutico ben definito nella NASH (**Figura 6**).

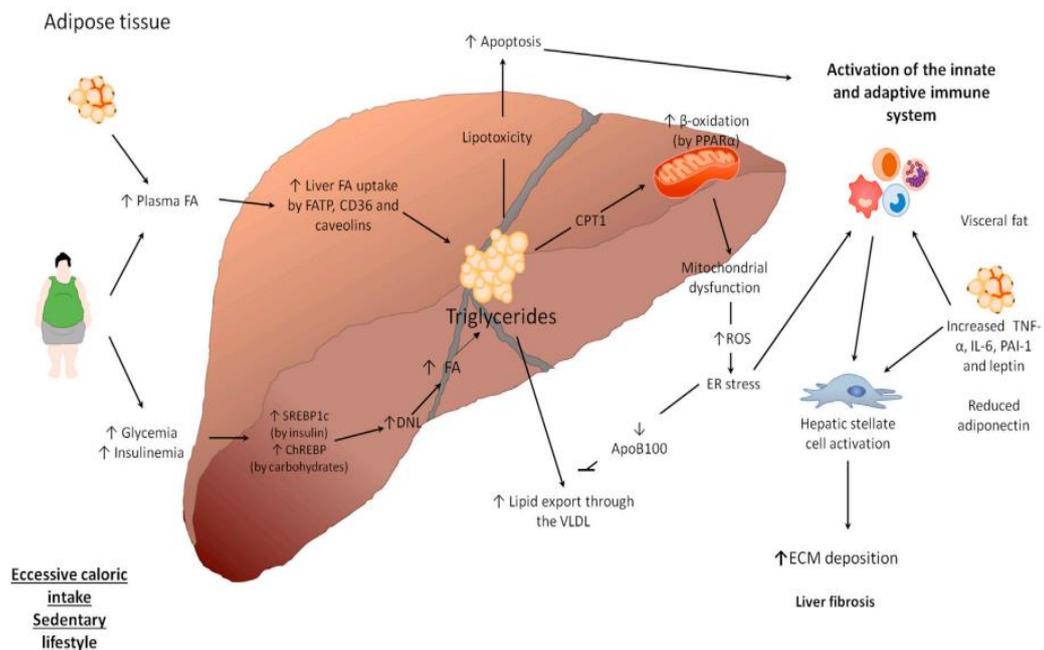


Figura 6: Disregolazione del metabolismo lipidico [51].

Nel fegato umano, la lipotossicità si manifesta istologicamente con un aumento del volume cellulare (*ballooning*) e la presenza e l'entità di tale fenomeno sono utilizzate per la classificazione istologica e la stadiazione della NASH [17]. I triacilgliceroli (TG) sono il principale componente lipidico rilevato negli epatociti, tuttavia, non sono direttamente epatotossici di per sé e quindi la lipotossicità è dovuta ad altri lipidi, come gli acidi grassi (FA), il diacilglicerolo, gli ossisteroli, il colesterolo e i fosfolipidi. Gli acidi grassi sono potenti lipidi epatotossici, rilasciati dagli adipociti in condizioni di surplus energetico. Un elevato apporto calorico sposta il fenotipo degli adipociti da piccoli a grandi, un sottotipo cellulare caratterizzato da ridotta

secrezione di adiponectina e aumentata produzione di TNF- α e resistina [17]. Questi cambiamenti impediscono l'ulteriore immagazzinamento di acidi grassi e promuovono il loro rilascio come acidi grassi liberi (FFA), che vengono poi consegnati agli epatociti. L'aumento dell'assorbimento di FFA e il loro accumulo da parte degli epatociti spinge la sintesi di trigliceridi, un meccanismo che aiuterà a smaltire i grassi. Pertanto, la relazione reciproca tra l'assorbimento di FFA e la sintesi di TG determinerà se si manifesterà o meno la lipotossicità. La lipotossicità è mediata da diversi meccanismi cellulari, incluso il danno diretto ai perossisomi e ai mitocondri [17]. I mitocondri danneggiati diventano incapaci di eseguire in modo efficiente la β -ossidazione e il metabolismo energetico, aggravando ulteriormente l'accumulo di acidi grassi. Gli epatociti danneggiati rilasciano una serie di mediatori infiammatori tra cui: 1) la proteina sonic hedgehog che attiva la via del segnale di hedgehog (hedgehog signaling pathway), essenziale per la riparazione e la rigenerazione del fegato e che, se attivata in modo persistente, può indurre fibrosi, 2) fattori pro-apoptotici come la caspasi 9 (Cas9); e 3) modelli molecolari associati al danno cellulare (DAMPs), come la proteina HMGB1 (High Mobility Group Box 1), le heat shock proteins, DNA nucleare e mitocondriale, gli istoni, nucleotidi purinici (ATP, UTP) che sono riconosciuti dai recettori di riconoscimento del modello di superficie cellulare, come il recettore Toll-like 2, 4 e i recettori citosolici, come il recettore Toll-like 7-9, espressi dalle cellule dell'immunità innata che ne determinano l'attivazione. Inoltre, gli epatociti sono caratterizzati da un'eccessiva attivazione della c-Jun N-terminal kinase (JNK) che contribuisce anche al reclutamento di cellule infiammatorie [17]. Alla fine, gli epatociti diventeranno apoptotici o necrotici (se una grave depolarizzazione della membrana mitocondriale si traduce in una completa cessazione del trasporto di elettroni mitocondriali e della sintesi di ATP). Negli epatociti che si deteriorano progressivamente, gli acidi grassi peggiorano la resistenza all'insulina spingendo l'infiammazione e la fibrosi, che contribuiscono ulteriormente al danno degli epatociti. Inflammasomi, citochine e chemochine e i loro recettori, insieme alle cellule dell'immunità innata (neutrofili, macrofagi, cellule NK e NKT) e adattativa (cellule T e B) contribuiscono all'infiammazione del fegato e sono bersagli terapeutici nella NASH [17].

2.1.4 Sistema immunitario

Il fegato, negli ultimi anni, ha assunto un ruolo sempre più importante non solo come organo metabolico ma anche come organo immunologico; diversi studi, infatti, indicano che le

cellule immunitarie nel fegato svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi della NAFL e della NASH. La natura altamente vascolarizzata del fegato, insieme al ridotto flusso sanguigno nei sinusoidi, costituisce un ambiente unico per massimizzare l'esposizione delle cellule immunitarie ai patogeni trasmessi dal sangue e dall'intestino [52]. Nella NAFLD/NASH, il sistema immunitario del fegato si attiva per far fronte al danno epatocitario. In questo contesto gli epatociti danneggiati rilasciano molecole denominate "modelli molecolari associati al danno" (Damage Associated Molecular Patterns, DAMPs) che innescano una risposta immunitaria. Il reclutamento di cellule infiammatorie, a questo punto, non solo produce la tipica infiammazione lobulare che caratterizza la NASH, ma è un potente driver per la progressione della malattia verso la fibrosi, la cirrosi e il carcinoma epatocellulare. Inoltre, l'infiammazione contribuisce allo sviluppo di complicanze extraepatiche come malattie cardiovascolari e malattie renali croniche [17]. Le cellule dell'immunità innata sono il principale motore della disfunzione immunitaria nella NAFLD/NASH. Queste includono le cellule di Kupffer (KCs), le cellule dendritiche (DCs), mastociti (Mast Cells) e cellule linfoidi innate (ILCs), che passano da uno stato tollerogenico (con produzione di IL-10 e TGF- β) ad un fenotipo attivo proinfiammatorio e che costituiscono la prima linea di difesa attraverso il legame con i recettori dell'immunità innata (PRRs), i recettori del complemento (CRs) e i recettori scavenger (SRs). Tuttavia anche linfociti T, linfociti B e Natural-Killer T (NKT) contribuiscono alla progressione della malattia. Oltre alle cellule immunitarie convenzionali, anche gli epatociti e le LSEC svolgono funzioni immunologiche quando il fegato è in una condizione di stress [53] **(Figura 7)**.

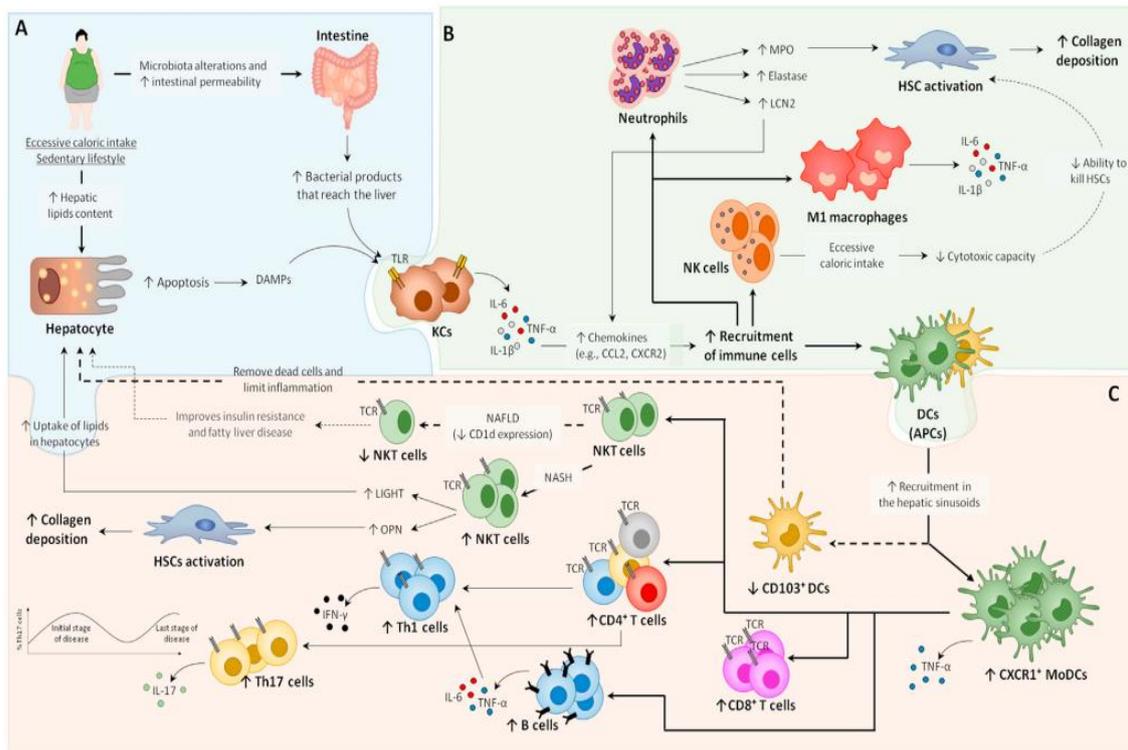


Figura 7: Immunità nella NAFLD [51].

2.1.5 Cellule immunitarie non parenchimali

Il passaggio da semplice steatosi (NAFL) alla steatoepatite e fibrosi (NASH) è mediata dai macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer). Essi rappresentano la prima linea di difesa avviando la risposta immunitaria locale e la progressione infiammatoria mediante il legame con i PRRs [53]. L'eccesso di lipidi induce da un lato un aumento della deposizione di lipidi nel fegato con conseguente induzione di apoptosi e rilascio di DAMPs e dall'altro un aumento della permeabilità intestinale che porta ad un maggior passaggio di batteri e prodotti batterici dal lume intestinale alla circolazione e quindi al fegato. Sia i DAMPs che i prodotti batterici che raggiungono il fegato sono in grado di attivare le cellule di Kupffer legandosi ai recettori Toll-like (TLR) [51]. L'attivazione delle KCs rappresenta l'evento chiave che porta all'attivazione prima della risposta immunitaria innata e successivamente della risposta immunitaria adattativa. Le cellule di Kupffer attivate producono citochine proinfiammatorie (cioè IL-6, IL-1β e TNF-α) che inducono un'upregolazione delle chemochine con conseguente richiamo di cellule immunitarie nel fegato [51]. I neutrofili che raggiungono il fegato

producono alti livelli di MPO, elastasi e lipocalina 2 (LCN2) che inducono un'ulteriore sovraregolazione delle chemochine e attivazione delle cellule stellate (HSC). I macrofagi provenienti dal circolo mediante stimoli proinfiammatori presenti nel fegato si polarizzano verso il fenotipo M1, producendo anche citochine proinfiammatorie. Nella NAFLD, l'eccessivo apporto calorico riduce invece la capacità citotossica delle cellule NK che mostrano una ridotta capacità di uccidere le HSC attivate con un conseguente aumento della deposizione di collagene. Le cellule dendritiche (DC), che vengono reclutate nel fegato, funzionano come cellule presentanti l'antigene (APC), inducendo la conseguente attivazione del sistema immunitario adattativo. Nella NAFLD si osserva un aumento del reclutamento di DC a livello dei sinusoidi epatici. Queste cellule si differenziano maggiormente verso un fenotipo CXCR1 positivo che produce TNF- α e induce l'attivazione della risposta immunitaria adattativa. Al contrario, c'è una riduzione nel sottogruppo di cellule dendritiche CD103 positive che svolgono la funzione di rimuovere le cellule morte e limitare l'infiammazione con conseguente aumento dei DAMPs [51]. Le cellule NKT nella NAFLD esercitano un ruolo protettivo migliorando la resistenza all'insulina e la steatosi, ma il loro numero diminuisce a causa della riduzione dell'espressione di CD1d. Al contrario, nella NASH c'è un aumento del numero di cellule NKT epatiche che rilasciano osteopontina (OPN) che attiva le cellule stellate con deposizione di collagene e LIGHT (noto anche come membro della superfamiglia del fattore di necrosi tumorale 14 (TNFSF14) che aumenta l'assorbimento epatico dei lipidi, peggiorando la steatosi. Inoltre i linfociti T CD4 positivi si differenziano preferenzialmente verso i sottogruppi Th1 e Th17 che producono rispettivamente IFN- γ e IL-17. Nella NAFLD, c'è anche un aumento dei linfociti T CD8 positivi e linfociti B [51].

2.1.6 Cellule parenchimali con funzioni immunitarie

A causa della sua posizione anatomica, tutte le sostanze assorbite nell'intestino passano necessariamente attraverso il fegato. Di conseguenza, il fegato ha sviluppato la capacità di ricevere, processare e immagazzinare i nutrienti senza sviluppare una risposta infiammatoria ma anche di rispondere agli antigeni esogeni quando ciò è necessario. Dunque, il fegato ha la capacità di modulare sia la risposta immunitaria locale che quella sistemica interagendo con le cellule del sistema immunitario stesso. In questa prospettiva, è importante ricordare che sia le cellule epatiche parenchimali che quelle non parenchimali partecipano alla risposta immunitaria [45]. Gli epatociti, infatti, esprimono alcuni TLRs e, in particolare, i TLR2 e

TLR4 sono upregolati in diversi contesti infiammatori, rendendo gli epatociti in grado di rispondere all'infiammazione. Gli epatociti sono anche in grado di rimuovere i lipopolisaccaridi (LPS) dalla circolazione. Le cellule endoteliali sinusoidali (LSEC) sono le cellule che compongono i sinusoidi epatici. Queste cellule esprimono una varietà di recettori per molecole di adesione, chemochine e TLR1-9 reclutando neutrofili e monociti al fegato per amplificare la risposta infiammatoria locale e la loro esposizione a lipopolisaccaridi, attiva la via del segnale di NF- κ B [45].

2.2 Progressione della NASH

2.2.1 Fibrosi epatica

Le risposte immunitarie nelle malattie epatiche croniche come la NAFLD, non solo portano al ripristino della funzione tissutale, ma anche al danno tissutale. Una risposta immunitaria iperattiva o esagerata può causare disfunzione d'organo e portare alla deposizione di tessuto fibrotico parallelamente alla perdita cellulare. Queste risposte immunitarie comprendono sia risposte innate che adattative. Ad esempio, l'infiltrazione dei neutrofili è spesso osservata nei campioni istologici dei pazienti con NASH. Inoltre, i pazienti con NASH e fibrosi avanzata correlata alla NASH hanno un rapporto neutrofili/linfociti più elevato rispetto ai pazienti senza NASH. Allo stesso modo, i linfociti CD8 positivi sono stati osservati anche nell'infiltrato infiammatorio nella NASH [54]. L'infiltrazione delle cellule immunitarie attiva la trans-differenziazione delle HSCs in miofibroblasti produttori di collagene. Di solito, questo processo è coinvolto nella riparazione dei tessuti in caso di lesioni a breve termine. Quando si verifica un danno epatico, le HSC vengono attivate e si differenziano dal fenotipo quiescente a miofibroblasti proliferativi e contrattili [55] (**Figura 8**).

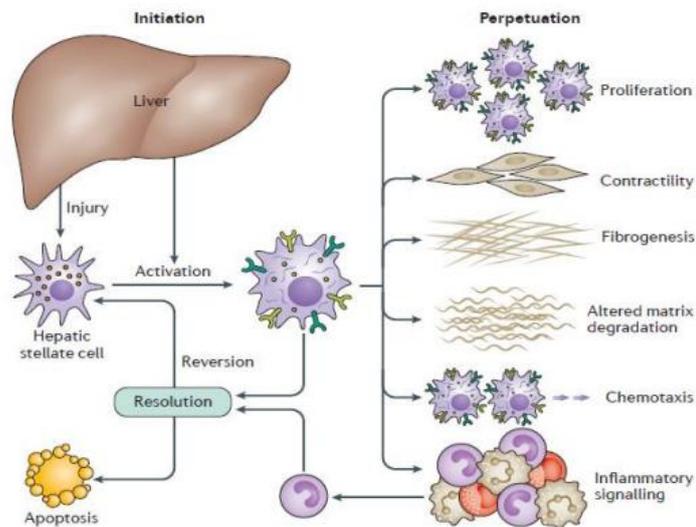


Figura 8: Aspetti chiave dell'attivazione delle HSCs [55].

Nella loro fase quiescente, le HSCs immagazzinano i retinoidi e sintetizzano la proteina fibrillare acida della glia (GFAP). Quando attivate, le HSCs perdono gradualmente retinoidi e GFAP e differenziano in miofibroblasti con la sintesi di prodotti della matrice extracellulare (ECM) come il collagene di tipo I, di tipo III e di tipo IV ma anche l'acido ialuronico (HA) [55]. L'accumulo di collagene è accompagnato da un aumento delle metalloproteinasi (MMP) come MMP-9, che degradano i prodotti dell'ECM. L'upregolazione di MMP-9 e l'accumulo di collagene di tipo III porta a un'abbondanza di prodotti derivanti dalla scissione del collagene di tipo III come il propeptide N-terminale plasmatico del procollagene di tipo III (PIIIPN) o il neo-epitopo PRO-C3. Normalmente le MMP sono tenute sotto controllo da inibitori tissutali della metalloproteinasi (TIMP). Esistono quattro TIMP di cui TIMP-1 è secreto da macrofagi e fibroblasti. Nei fegati fibrotici murini, parallelamente all'aumento delle MMP, sono state riscontrate elevate concentrazioni di TIMP-1. Ciò crea un disturbo nell'equilibrio MMP/TIMP e, quindi, uno spostamento verso la sintesi della ECM e quindi la fibrogenesi [54]. Oltre ai prodotti della matrice extracellulare, i miofibroblasti sintetizzano anche l' α -actina del muscolo liscio (α -SMA). Ramzi et al. ha indicato che l'aumento di α -SMA è un marker di attivazione delle cellule stellate [55]. Durante la differenziazione, la caratteristica forma a stella delle HSC cambia in una forma più a goccioline. Il processo è quindi bilanciato dai meccanismi antifibrotici contrastanti che determinano l'inattivazione o l'apoptosi dei miofibroblasti e la risoluzione della cicatrice. Nelle malattie croniche, come la NAFLD, c'è uno squilibrio in questi

processi. Lo squilibrio causerà l'attivazione persistente dei fibroblasti proliferanti, contrattili e migratori. Questo porta alla produzione eccessiva di ECM. L'abbondanza di ECM distruggerà l'architettura fisiologica del fegato. I regolatori di questo equilibrio sono le cellule non parenchimali come le cellule di Kupffer e altre cellule immunitarie, che sono, come accennato in precedenza, reclutate nel sito di danno. Le cellule non parenchimali inizieranno a produrre citochine pro-fibrogeniche. Su base molecolare, nasce una complessa rete di percorsi indotti dalle citochine per coordinare le interazioni cellulari pro-fibrogeniche. Le vie di segnale associate all'attivazione delle HSCs e alla progressione della fibrosi sono il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), l'inflammasoma (NLRP3)-caspasi 1 e il WNT/ β -catenina [55].

2.2.2 Cirrosi epatica

La progressione della fibrosi epatica alla cirrosi epatica varia tra le persone a seconda dei fattori ambientali e dell'ospite. La cirrosi è una conseguenza della fibrogenesi di lunga data che provoca l'incapsulamento del parenchima epatico danneggiato da una cicatrice collagenica. Istologicamente, la cirrosi è caratterizzata da setti fibrotici che collegano i tratti portalici tra loro e con le vene centrali. Ciò porta a una disconnessione degli epatociti dalla vena centrale, creando isole di epatociti. Si verificano anche alterazioni vascolari, tra cui la perdita delle finestre sinusoidali e la comparsa di una membrana basale, o la cosiddetta capillarizzazione dei sinusoidi epatici, un altro segno distintivo della cirrosi. I cambiamenti nella struttura del fegato alla fine portano ad un aumento della resistenza intravascolare all'interno del sistema portale e ad una diminuzione della perfusione epatica. La conseguenza è una perdita della funzionalità epatica [56, 57].

2.3 Approcci terapeutici

Fino ad oggi non sono ancora stati approvati agenti terapeutici per il trattamento di steatosi e steatoepatite non alcolica, ma i pazienti con NAFLD hanno un aumento della mortalità totale rispetto ai pazienti senza NAFLD, principalmente a causa di malattie cardiovascolari, neoplasie extra-epatiche (specie gastrointestinali) e complicazioni epatiche

[58]. La gestione della NAFLD si concentra sulla malattia del fegato, principalmente la fibrosi epatica, che rappresenta il principale fattore prognostico nella NAFLD, ma deve includere anche il trattamento delle comorbidità metaboliche associate come obesità, dislipidemia e diabete tipo 2 [59]. Infatti, la maggior parte degli sforzi clinici è diretta al trattamento di queste componenti. Altri sono rivolti verso specifici pathway coinvolti nella patogenesi della NAFLD, come lo stress ossidativo, l'insulino-resistenza, l'attivazione di citochine proinfiammatorie e l'apoptosi.

Il trattamento più importante ed efficace per la gestione della NAFLD è la perdita di peso attraverso le modifiche dello stile di vita. Una dieta sana ed un'attività fisica regolare sono altamente raccomandate come misure di prima linea in tutti i pazienti con NAFLD [60]. Inoltre, attualmente, la terapia farmacologica dovrebbe essere principalmente riservata ai pazienti NAFLD, che hanno una malattia epatica più avanzata (NASH con fibrosi). Ad oggi, non esistono farmaci, che siano stati approvati dalle Agenzie regolatorie del farmaco per il trattamento specifico della NAFLD/NASH. Poiché la NAFLD è collegata al diabete tipo 2, vari farmaci antidiabetici sono stati valutati e/o sono in fase di valutazione per il trattamento della NASH. Ad esempio, il pioglitazone, un agonista del recettore PPAR γ migliora l'IR sistemica ed epatica, in parte aumentando l'espressione dell'adiponectina e, inoltre, ha mostrato efficacia nel migliorare l'istologia epatica nei pazienti con NASH [61]. Tuttavia, l'uso del pioglitazone ha dimostrato a lungo termine di indurre moderato incremento ponderale (specie del tessuto adiposo sottocutaneo), ritenzione di liquidi e rischio di fratture non traumatiche nelle donne in postmenopausa. Studi recenti hanno valutato l'effetto degli inibitori del cotrasportatore sodio glucosio-2 (SGLT-2), che sono farmaci antidiabetici che riducono l'iperglicemia attraverso l'inibizione del riassorbimento del glucosio a livello del tubulo renale e inducono anche una moderata riduzione del peso. Tali farmaci sono stati valutati nei pazienti con NAFLD dimostrando un miglioramento degli enzimi epatici e della steatosi epatica [62]. Sono stati presi in considerazione anche gli agonisti del recettore del GLP-1: i più utilizzati sono Liraglutide, Dulaglutide, Semaglutide (uno studio ha mostrato un potenziale beneficio sulla prevenzione degli eventi cardiovascolari [63], migliore controllo del glucosio e perdita di peso nei pazienti con T2DM). Secondo le linee guida dell'AASLD, tuttavia, è prematuro considerare questi agonisti come trattamento specifico nei pazienti con NASH/NAFLD senza diabete a causa di prove insufficienti [64]. La vitamina E è un farmaco antiossidante che protegge le membrane cellulari dal danno ossidativo e possibilmente regola l'apoptosi. È stato dimostrato che il trattamento con vitamina E riduce la steatosi e l'infiammazione epatica nei pazienti con

NASH, specie in quelli senza diabete. Tuttavia, la vitamina E non ha mostrato alcun effetto benefico sulla fibrosi epatica. Inoltre, dovrebbero essere presi in considerazione i suoi potenziali effetti avversi a lungo termine, come un aumento della mortalità cardiovascolare e del cancro alla prostata. La vitamina E è attualmente raccomandata per l'uso off-label in pazienti con NASH, specialmente quelli senza diabete, dopo un'attenta valutazione del rapporto rischio/beneficio. L'acido obeticolico, un acido biliare sintetico che agisce come un agonista del *Farnesoid-X-receptor* (FXR), è un agente promettente per il trattamento della NASH, poiché studi preclinici e sull'uomo hanno indicato un miglioramento istologico della steatosi epatica, dell'infiammazione ed anche della fibrosi epatica [65]. Il Tipelukast è un nuovo composto a piccole molecole biodisponibile per via orale che esercita i suoi effetti attraverso diversi meccanismi per produrre la sua attività antifibrotica e antinfiammatoria in modelli preclinici, tra cui l'antagonismo del recettore dei leucotrieni (LT), l'inibizione delle fosfodiesterasi (PDE) e inibizione della 5-lipossigenasi (5-LOX) [17].

Sono stati, poi, presi in considerazione anche costituenti naturali come potenziali candidati per il trattamento della NASH. Ad esempio, la Luteolina, la Tomatidina, l'Ossimatrina e l'acido oleanolico regolano l'omeostasi del glucosio e la sintesi lipidica attraverso la riduzione dell'espressione di SREBP-1C, ACC e FAS. Inoltre è stato dimostrato che la sintesi totale dei trigliceridi e le lesioni epatiche nei topi ob/ob e db/db vengono attenuate dal trattamento con dioscina o acetilshikonina rispettivamente. Infine l'Acido betulinico, la tiliamosina e il cicloastragenolo, mediante l'attivazione di FXR, migliorano lo stress reticolo endoplasmatico (stress ER), il metabolismo del colesterolo e contemporaneamente i disordini metabolici. Tra gli agenti antinfiammatori, il resveratrolo e la quercetina hanno un'attività antinfiammatoria nella NASH. In particolare, il resveratrolo upregola l'autofagia e l'attività antiossidante mediata da Nrf-2, mentre downregola la risposta infiammatoria mediata da NF- κ B negli epatociti e negli adipociti. La Quercetina, un flavonoide tipicamente presente in frutta tra cui broccoli, cipolle e verdure a foglia verde riduce l'infiammazione, l'infiltrazione cellulare e la fibrosi portale. Fatta eccezione per i meccanismi sovrapposti al resveratrolo, anche la quercetina riduce la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), cruciali nella patogenesi della NASH [66].

Obiettivo del primo studio

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è una malattia altamente prevalente che colpisce circa un quarto della popolazione mondiale. La NAFLD è caratterizzata da un'eccessiva deposizione di grasso nel fegato ed è spesso considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica causata da un'esposizione cronica ad un elevato apporto calorico e da uno stile di vita sedentario. Poiché l'insulino-resistenza è la causa principale, lo sviluppo di questa malattia aumenta notevolmente tra i pazienti con diabete di tipo 2 (T2DM), obesità e dislipidemia. La NAFLD è classificata in steatosi semplice (NAFL) e steatoepatite non alcolica (NASH). Sebbene la NAFL sia generalmente considerata una malattia epatica benigna e non progressiva, la NASH è istologicamente caratterizzata dalla presenza di steatoepatite, *ballooning* epatocitario e fibrosi che, insieme, comportano un rischio significativo di sviluppo di cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare [16]. Oltre all'un aumentato rischio di sviluppare cirrosi epatica, una grande percentuale di pazienti con NAFLD/NASH rischia di sviluppare un profilo lipidico aterosclerotico e una malattia cardiovascolare aterosclerotica (CVD).

E' sempre più riconosciuto che la NAFLD/NASH è associata ad uno stato di infiammazione del fegato. Nel fegato, l'afflusso di mediatori infiammatori dal microbiota intestinale e dagli epatociti danneggiati/necrotici attivano le cellule di Kupffer, i macrofagi residenti nel fegato, che, a loro volta, promuovono una risposta infiammatoria e fibrogenica inducendo la trans-differenziazione delle cellule stellate epatiche quiescenti (HSC) in miofibroblasti attivati, che sono i responsabili dell'eccessiva deposizione di matrice extracellulare. L'infiammazione epatica è uno dei principali motori della progressione della malattia da NAFLD a NASH e sono stati sviluppati specifici approcci antinfiammatori per trattare l'infiammazione e la fibrosi guidata dall'infiammazione come monoterapie o terapie combinate.

Il CysLT₁R e GPBAR1 sono espressi da numerosi tipi cellulari inclusi i macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer) e le cellule stellate epatiche (HSC) [16]. L'attivazione di questi recettori nelle cellule di Kupffer promuove effetti opposti. Pertanto, sebbene il CysLT₁R promuova una risposta infiammatoria, gli agonisti di GPBAR1 attenuano la produzione di mediatori infiammatori attraverso vari meccanismi molecolari, suggerendo che gli antagonisti CysLT₁R potrebbero sinergizzare con gli agonisti GPBAR1 nel ridurre l'infiammazione del fegato [16]. Inoltre, i due recettori sono espressi da diversi tessuti metabolicamente attivi, inclusi il tessuto adiposo bianco (WAT) esercitando effetti antagonisti negli adipociti. Pertanto, sebbene

l'agonismo del CysLT₁R promuova la resistenza all'insulina e l'infiammazione nel WAT, GPBAR1 esercita attività antinfiammatorie e promuove l'imbrunimento degli adipociti e l'espressione di geni anti-obesogenici come UCP1, PGC1 α e PPAR α . Sulla base di questo background, abbiamo ipotizzato che l'identificazione di un nuovo ligando duale antagonista del CysLT₁R/agonista di GPBAR1, denominato CHIN117, potrebbe essere utile nel trattamento della NAFLD/NASH.

2.4 Materiali e metodi

2.4.1 GEO Data Sets

La serie GSE135251 include profili di espressione genica (analisi RNA-seq, sistema Illumina NextSeq 500) di 216 biopsie epatiche congelate, comprendenti 206 casi di NAFLD con diversi stadi di fibrosi e 10 controlli [67, 68].

2.4.2 Modello animale

I topi maschi C57BL/6J sono stati alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) contenente il 59 KJ% di grassi più l'1% di colesterolo, senza zucchero (ssniff® EF R/M secondo D12330 mod. 22,7 ME/kg) e con l'aggiunta di fruttosio (HFD-F) nell'acqua da bere (42 g/L), oppure con una dieta normale (dieta standard Mucedola S.r.l. 4RF21: 18,5% di proteine, 53,5% di carboidrati, 3% di grassi) per 61 giorni. L'assunzione di cibo è stata stimata come differenza di peso tra la quantità di cibo messa a disposizione e quella rimanente a intervalli di tre giorni. Il cibo è stato fornito sotto forma di pellet. Dopo 7 giorni, i topi HFD-F sono stati randomizzati a ricevere la dieta HFD-F da sola o in combinazione con il CHIN117 (30 mg/kg/die), somministrato mediante sonda gastrica fino alla fine dell'esperimento. I topi sono stati mantenuti ad una temperatura di 22°C e fotoperiodo controllati (ciclo di luce/buio di 12:12 ore) e hanno avuto accesso illimitato al cibo per topi standard e acqua di rubinetto. I protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato per la Cura e l'Uso degli Animali dell'Università di Perugia e dal Ministero della Salute e dall'Istituto Superiore di Sanità (Italia) e sono in accordo con le linee guida europee per l'uso degli animali da esperimento (autorizzazione n. 583 /2017-PR). Lo stato di salute generale degli animali è stato monitorato quotidianamente dal Veterinario della struttura. Il giorno del sacrificio, i topi sono stati anestetizzati con una miscela di ipocloruro di tiletamina e ipocloruro di zolazepam/xylazina alla dose di 50/5 mg/Kg e sacrificati prima delle ore 12 del mattino.

2.4.3 Determinazioni antropometriche

Il peso corporeo e la lunghezza del corpo (lunghezza naso-ano o ano-naso) sono stati misurati nei topi anestetizzati al momento del sacrificio e sono stati utilizzati per calcolare l'indice di massa corporea (IMC) (= peso corporeo (g)/lunghezza² (cm²)) e l'indice di Lee (= radice cubica del peso corporeo (g)/lunghezza dal naso all'ano (cm)).

2.4.4 Analisi biochimiche

I livelli plasmatici di AST, ALT, colesterolo totale e HDL e trigliceridi sono stati quantificati utilizzando un analizzatore di chimica clinica automatizzato (Cobas, Roche Basel, Svizzera).

2.4.5 Test orale di tolleranza al glucosio (OGTT) e livelli di insulina

Dopo 8 settimane di HFD-F i topi sono stati tenuti a digiuno durante la notte e gli è stato somministrato glucosio per via orale (1,5 g/kg di peso corporeo) per eseguire l'OGTT. Le concentrazioni di glucosio nel sangue sono state misurate a 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minuti dopo la somministrazione del glucosio utilizzando un glucometro portatile (Accu-Check Go, Roche Basel, Svizzera).

2.4.6 Immagini termiche

La temperatura del tessuto adiposo bruno (BAT) è stata registrata utilizzando una tecnologia non invasiva. In breve, i topi sono stati mantenuti a 25°C e le immagini termiche sono state acquisite da una termocamera FLIR E6 (FLIR System, Wilsonville, Oregon) e la temperatura superficiale è stata quantificata dai FLIR Tools.

2.4.7 Istopatologia

Per l'esame istologico, porzioni dei lobi epatici destro e sinistro sono state fissate in formalina al 10%, incluse in paraffina, sezionate e colorate con Sirius Red e/o ematossilina/eosina (H&E),

per l'analisi morfometrica. La gravità della NASH (steatosi, *ballooning* degli epatociti, infiammazione lobulare e infiammazione portale) è stata valutata nelle sezioni trasversali colorate con H&E utilizzando un sistema di classificazione adattato della NASH umana [8].

2.4.8 Retrotrascrizione dell'mRNA e Real-Time PCR

L'RNA è stato estratto dal tessuto adiposo epididimale (eWAT) e dal colon utilizzando il TRIreagent (Zymo Research) e le colonnine Direct-zol™ RNA MiniPrep w/ Zymo-Spin™ IIC (Zymo Research, Irvine, CA) ed è stato successivamente retrotrascritto con il Kit FastGene Scriptase Basic (Nippon Genetics Europe) in un volume di reazione di 20 µL. Per la RT-PCR, 50 ng di cDNA sono stati amplificati in una soluzione da 20 µL contenente 200 nM di ciascun primer e 10 µL di SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stati Uniti). Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato utilizzando le seguenti condizioni: 10 min a 95°C, seguiti da 40 cicli di 95°C per 10 s e 60°C per 45 s con la QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'espressione relativa dell'mRNA è stata calcolata ed espressa come $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. L'espressione del rispettivo gene è stata normalizzata rispetto all'mRNA della Gapdh come controllo interno.

I primer utilizzati sono stati i seguenti (forward e reverse):

m-Gapdh (for ctgagtatgtcgtggagtctac)	(rev gttggtggtgcaggatgcattg)
m-Srebf1 (for gatcaaagaggagccagtgc)	(rev tagatggtggctgctgagtg)
m-Fasn (for tcaagatgaaggtggcagaggtgct)	(rev ttgagcagtgccgggattcgg)
m-Pgc1α (for cttagcactcagaacatgcag)	(rev aatgctcttcgctttattgctc)
m-Fxr (for actggaccacgaagatcagatt)	(rev gagcgtactcctctgagtcatt)
m-Adiponectin (for tgacagatcagctcgagtgg)	(rev cagtgccgtcagttctgtg)
m-Tnf-α (for ccaccacgctcttctgtcta)	(rev agggctctgggcatagaact)
m-Ucp2 (for ttgccgtaatgccattgtc)	(rev gcaagggaggtcatctgtca)
m-Cd11b (for gtcagagtctgcctccgtgt)	(rev cagggtctaaagccagggtca)
m-Ppary (for gccagtttcgatccgtagaa)	(rev aatccttggcctctgagat)
m-Ii-1β (for gctgaaagctctccacctca)	(rev aggccacaggtatcttctgctg)
m-Gcg (for ccaagattttgtgcagtggtt)	(rev ccttcagcatgcctctcaaa)

Tabella 2: Sequenze dei primer Forward e Reverse utilizzati per l'analisi RT-PCR.

2.4.9 Sequenziamento del trascrittoma

L'analisi dei campioni di fegato di topo è stata effettuata utilizzando il sequenziatore Ion S5™ con software Torrent Suite™ v6. L'RNA di alta qualità è stato estratto dal fegato dei topi utilizzando il mini kit PureLink™ RNA, secondo le istruzioni del produttore. La qualità e la quantità di RNA sono state valutate con il kit di analisi Qubit® RNA HS e il fluorometro Qubit 3.0 (Invitrogen) ed è stata eseguita sui campioni un'elettroforesi di verifica su gel di agarosio. Le librerie sono state generate utilizzando il pannello di espressione genica del trascrittoma di topo (Ion AmpliSeq™ Transcriptome Mouse Gene Expression Core Panel) e il kit Chef-Ready. In breve, 10 ng di RNA sono stati retrotrascritti con il kit di sintesi cDNA SuperScript™ Vilo™ prima della preparazione della libreria nello strumento Ion Chef™. Il cDNA risultante è stato amplificato per preparare librerie con barcode utilizzando la piastra PCR Ion Code™ e il pannello di espressione genica per il trascrittoma di topo Ion AmpliSeq™, kit Chef-Ready, secondo le istruzioni del produttore. Le librerie con codice a barre sono state portate ad una concentrazione finale di 100 pM e utilizzate per preparare particelle Template-Positive Ion Sphere™ da caricare sui chips Ion 540™, utilizzando l'Ion 540™ Kit-Chef. Il sequenziamento è stato eseguito dal sequenziatore Ion S5™ con software Torrent Suite™ v6. Le analisi sono state eseguite con un fold change < -2.0 e > +2.0, utilizzando il software Transcriptome Analysis Console (versione 4.0.1), certificato per l'analisi AmpliSeq (Thermo-Fisher). I dati trascrittomici sono stati depositati come dataset su Mendeley data repository (reference number linking al repository: Fiorucci, Stefano; Biagioli, Michele; Marchianò, Silvia; Di Giorgio, Cristina (2021), "Discovery of potent dual GPBAR1/CysLT1R modulator for the treatment of metabolic fatty liver disease," Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/6dnrk9fc72.1).

2.4.10 Analisi statistica

È stato utilizzato il test ANOVA seguito dal test U non-parametrico di Mann-Whitney o un test t di Student a due code non appaiate per confronti statistici (*p <0.05) utilizzando il software Prism 6.0 (GraphPad)

2.5 Risultati

2.5.1 Valutazione farmacologica *in vivo* del CHIN117

Poiché il CHIN117 è un ligando duale (antagonista del CysLT₁R/agonista di GPBAR1) e non ci sono studi su molecole simili utilizzate su modelli di steatosi epatica di NAFLD/NASH [17], l'obiettivo che ci siamo prefissati è stato quello di indagare se questa nuova molecola fosse efficace nella protezione contro lo sviluppo di steatosi e fibrosi in un modello murino di NASH.

In un'analisi preliminare, per validare la rilevanza dell'asse CysLT₁R/GPBAR1 in questo modello di malattia, abbiamo indagato la modulazione delle due pathway in campioni di fegati di pazienti con NAFLD/NASH sfruttando il repository GSE135251 [67,68] che contiene i profili di espressione genica (analisi RNA-seq, sistema Illumina NextSeq 500) di 216 biopsie epatiche congelate, comprendenti 206 casi di NAFLD classificati come NAFLD precoce e moderata e 10 controlli. Come mostrato in **Figura 9B-E**, mentre l'espressione genica del CysLT₁R è rimasta invariata nel fegato di questi pazienti, l'espressione di GPBAR1 è notevolmente aumentata in entrambi i sottogruppi di pazienti (**Figura 9B,E**). Inoltre, l'analisi dei geni chiave coinvolti nella biosintesi dei leucotrieni (**Figura 9A**) ha dimostrato che sia la 5-lipossigenasi (ALOX5) che la FLAP (nota anche come ALOX5AP) sono significativamente upregolate e che l'upregolazione della FLAP segue la stessa tendenza della progressione della malattia (**Figura 9C,D**).

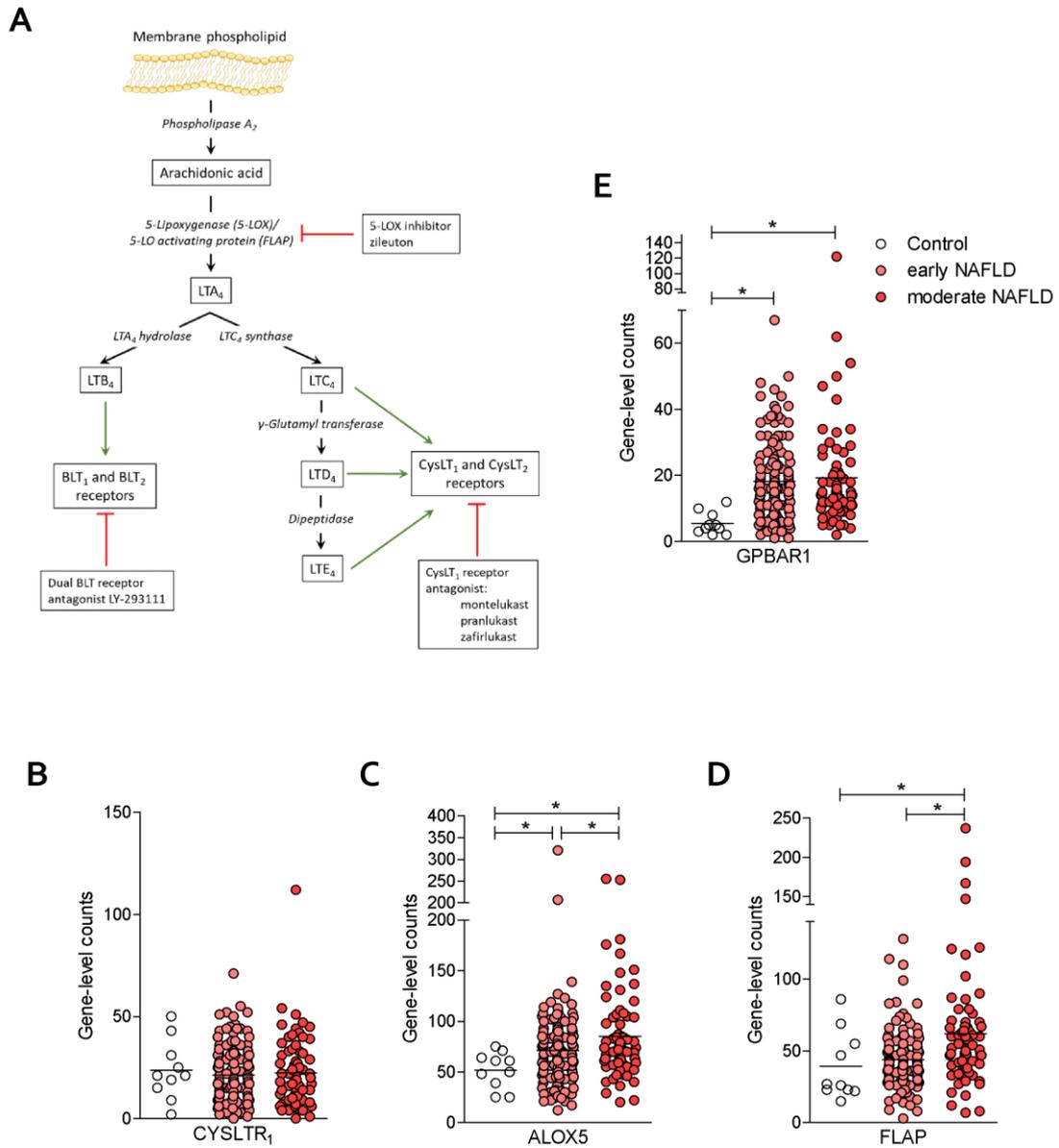
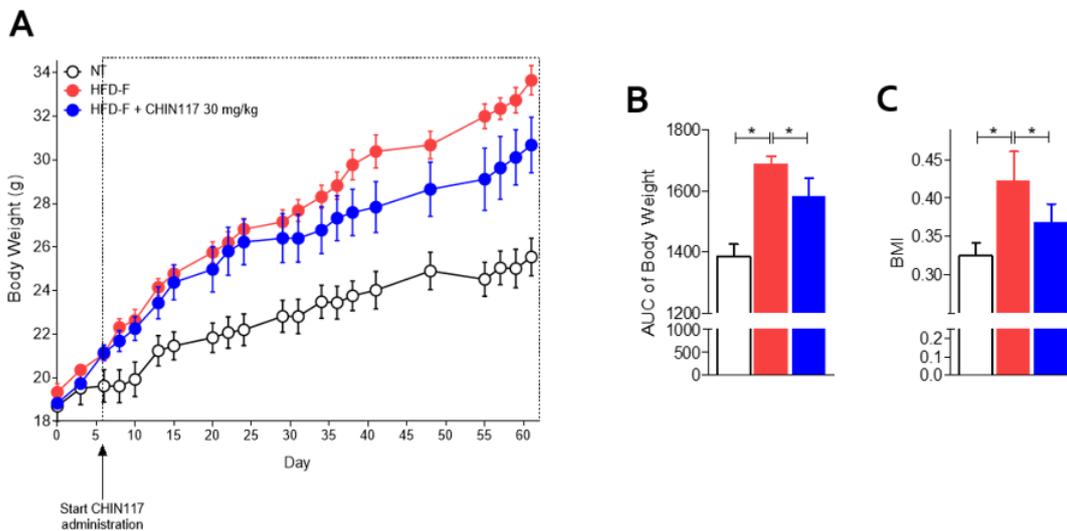


Figura 9: La sintesi dei leucotrieni è upregolata nel fegato dei pazienti con NAFLD. **(A)** Percorso di sintesi dei leucotrieni che indica gli enzimi coinvolti in ogni fase della sintesi **(B-E)** Analisi RNA-seq dal repository GSE135251 di campioni di biopsia epatica da pazienti con NAFLD precoce e pazienti con NAFLD moderata. Ogni punto rappresenta un paziente. Espressione del profilo genico di **(B)** CYSLTR₁, **(C)** ALOX5, **(D)** FLAP e **(E)** GPBAR1. * $p < 0,05$

A partire da questi dati che dimostravano come entrambe le pathway fossero modulate nei pazienti con NAFLD, abbiamo deciso di indagare se questa modulazione risultasse vantaggiosa in un modello murino di steatosi epatica indotta da una dieta ad alto contenuto calorico arricchita in colesterolo (la cosiddetta dieta occidentale) e con l'aggiunta di fruttosio, somministrata per 61 giorni. I topi alimentati con questa dieta per una settimana sono stati in seguito randomizzati per ricevere il CHIN117, a 30 mg/kg o nessun trattamento. Come mostrato in **Figura 10**, tutti i topi avevano un peso corporeo simile all'inizio dello studio, ma in seguito ad alimentazione con dieta occidentale per 8 settimane hanno guadagnato circa il 32% di peso in più rispetto ai topi nutriti con dieta standard (**Figura 10A**). Questi cambiamenti sono stati significativamente attenuati somministrando il CHIN117 (**Figura 10A**). È importante sottolineare che il trattamento con il CHIN117 non solo ha ridotto l'aumento del peso corporeo e l'indice di massa corporea (BMI) (**Figura 10A–C**), ma ha anche aumentato la sensibilità all'insulina (come dimostrato dal risultato ottenuto dal test orale di tolleranza al glucosio (OGTT) riportato in **Figura 10D,E**).



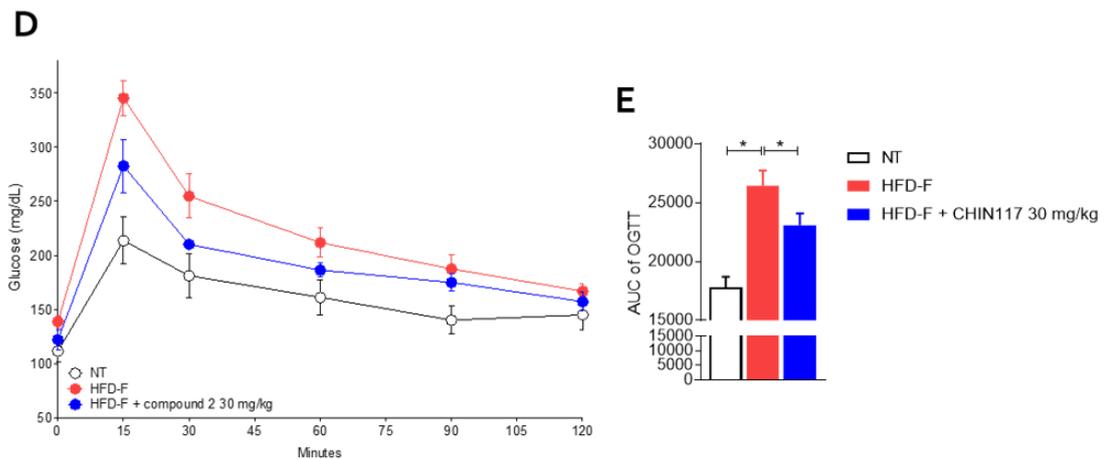


Figura 10: Effetti benefici del CHIN117 sull'aumento del peso corporeo e sulla sensibilità all'insulina. I topi maschi C57BL/6 sono stati alimentati con una dieta ricca di grassi e fruttosio (HFD-F) o una normale dieta per 61 giorni. Dal giorno 7 il CHIN 117 è stato somministrato mediante sonda gastrica alla dose di 30 mg/kg/die. **(A)** Variazioni del peso corporeo (%) e **(B)** Area sotto la curva (AUC) del peso corporeo espresso in unità arbitrarie. **(C)** Indice di massa corporea (BMI) alla fine dell'esperimento. **(D)** Livelli plasmatici di glucosio in risposta all'OGTT e **(E)** AUC dei livelli plasmatici di glucosio espressi in unità arbitrarie. I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

Per caratterizzare ulteriormente l'impatto dell'alimentazione occidentale sul profilo biochimico, abbiamo misurato i livelli dei principali marcatori di danno epatico e analizzato il profilo lipidico nel siero dei topi. Come si può osservare nella **Figura 11**, l'alimentazione con una dieta occidentale ha provocato danni agli epatociti, come dimostrato dalle variazioni dei livelli plasmatici di AST e ALT (**Figura 11A,B**), e lo sviluppo di un profilo lipidico pro-aterogeno, come dimostrato dalle variazioni dei livelli plasmatici di colesterolo, trigliceridi e HDL (**Figura 11C-F**); queste variazioni sono state parzialmente revertite dal CHIN117 (**Figura 11A-F**). Inoltre l'analisi macroscopica del fegato (**Figura 11G, H**) alla fine dell'esperimento ha mostrato un aumento del peso del fegato negli animali trattati con HFD-F rispetto al gruppo di controllo. La somministrazione del CHIN117 ha revertito ancora una volta l'effetto esercitato dalla dieta (**Figura 11G, H**).

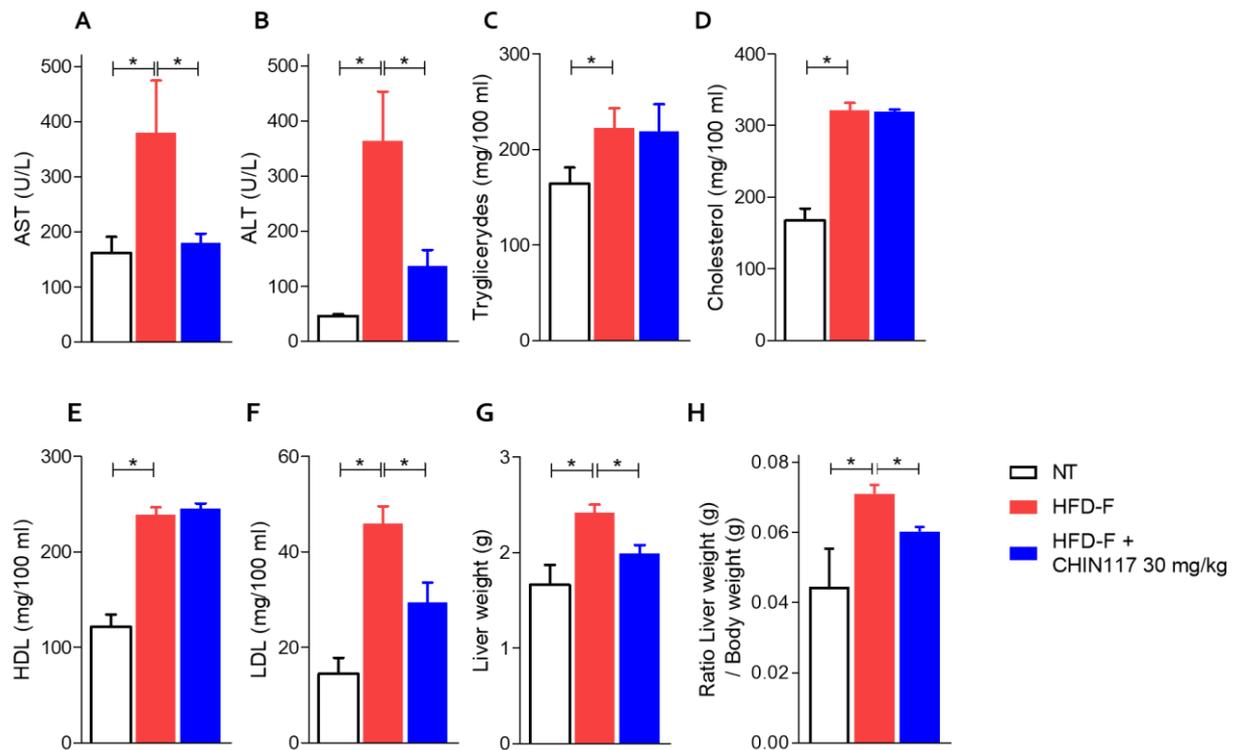


Figura 11: Effetti benefici del CHIN117 sui parametri biochimici del fegato. Livelli plasmatici di (A) AST, (B) ALT, (C) Trigliceridi, (D) Colesterolo, (E) HDL e (F) LDL alla fine dello studio. Caratteristiche macroscopiche e microscopiche del fegato: (G) peso del fegato (g), (H) rapporto tra peso del fegato (g) e peso corporeo (g). I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

Successivamente è stato indagato se l'esposizione ad un elevato apporto calorico cronico avesse un impatto sull'istopatologia epatica. A questo scopo sono state analizzate sezioni di fegato colorate in ematosilina ed eosina con un ingrandimento 10x mentre la gravità della steatosi epatica è stata valutata considerando l'estensione del *ballooning* epatico, il grado di steatosi e il grado di infiammazione, come descritto in un altro studio [69]. Come mostrato in **Figura 12A,B**, i topi HFD-F hanno sviluppato steatosi epatica e *ballooning* epatocitario, mentre il CHIN117 è stato altamente efficace nel revertire queste caratteristiche (**Figura 12A,B**).

Come anticipato in precedenza, la fibrosi epatica è una caratteristica fondamentale che distingue la NASH dalla NAFLD. Per valutare l'impatto del CHIN117 sulla fibrosi epatica causata dall'esposizione a una dieta ad alto contenuto di grassi, le sezioni di fegato sono state colorate mediante colorazione Sirius red e sono state analizzate come descritto in un precedente lavoro

[70]. I risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che l'alimentazione con una dieta occidentale per 8 settimane ha portato allo sviluppo di una lieve fibrosi epatica e un aumento della deposizione di collagene nel fegato (**Figura 12C**) confermata anche dalla valutazione dell'espressione epatica dei biomarcatori della fibrosi, α -Sma e Col1a1 (**Figura 12D,E**), mentre il trattamento con il CHIN117 ha revertito questo pattern (**Figura 12C-E**).

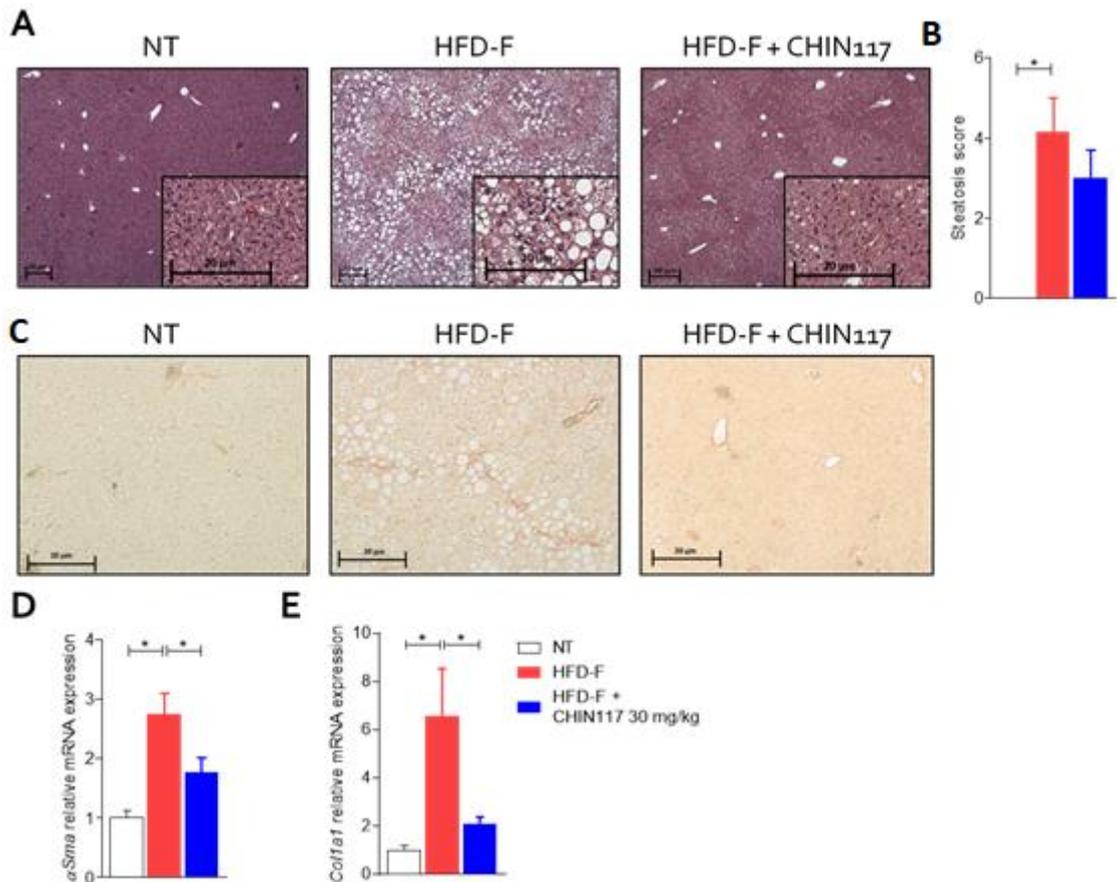


Figura 12: Effetti benefici del CHIN117 sull'istopatologia. **(A)** Colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) sui tessuti epatici (ingrandimento 4x, riquadri 10x) con **(B)** punteggio di steatosi e **(C)** colorazione Sirius Red dei tessuti epatici ottenuti alla fine dello studio (ingrandimento 10x). Espressione relativa dell'mRNA di **(D)** α Sma e **(E)** Col1a1, misurati nel fegato. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. * $p < 0.05$. I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

Per approfondire gli effetti benefici esercitati dal CHIN117 sulla steatosi epatica, l'RNA totale estratto dai fegati di ciascun gruppo di topi è stato sottoposto ad analisi di RNAseq che

ha permesso di sequenziare e analizzare l'intero trascrittoma (**Figura 13**). Nel dettaglio, mentre l'esposizione alla dieta HFD-F ha modulato l'espressione di 647 geni rispetto al gruppo alimentato con una dieta normale, il trattamento dei topi con il CHIN117 ha portato ad una robusta modulazione dell'espressione 154 geni (**Figura 13B**). In particolare, abbiamo osservato che il CHIN117 ha ridotto l'espressione dei geni chiave coinvolti nella lipogenesi *de novo* inclusi Fasn (**13C**) Fabp2 (**13I**), Mogat1 (**13H**), Cd36 (**13J**), Cidea e Cidec (**13M,N**), Serpine1 (**13R**).

Oltre ad aver modulato la pathway lipogenica, il CHIN117 è risultato efficace nel ridurre l'espressione di marker infiammatori epatici come Ccl3, Ccl2 e Cxcl2 (**Figura 13O,P,Q**). È importante sottolineare che livelli elevati della chemochina Ccl3 sono stati ritrovati nel siero e nel fegato dei pazienti con NASH e, in più, topi knockout per questo gene sono risultati protetti dallo sviluppo di steatoepatite indotta dalla dieta, dalla fibrosi e dall'insulino-resistenza [71]. Di rilevanza è anche l'aumento dell'espressione di Cyp7a1 (**Figura 13T**), indice di un aumento della sintesi degli acidi biliari e quindi dello smaltimento del colesterolo e la riduzione dell'espressione di Fgf21 (**Figura 13S**), responsabile dell'uptake degli acidi grassi e delle lipoproteine epatiche.

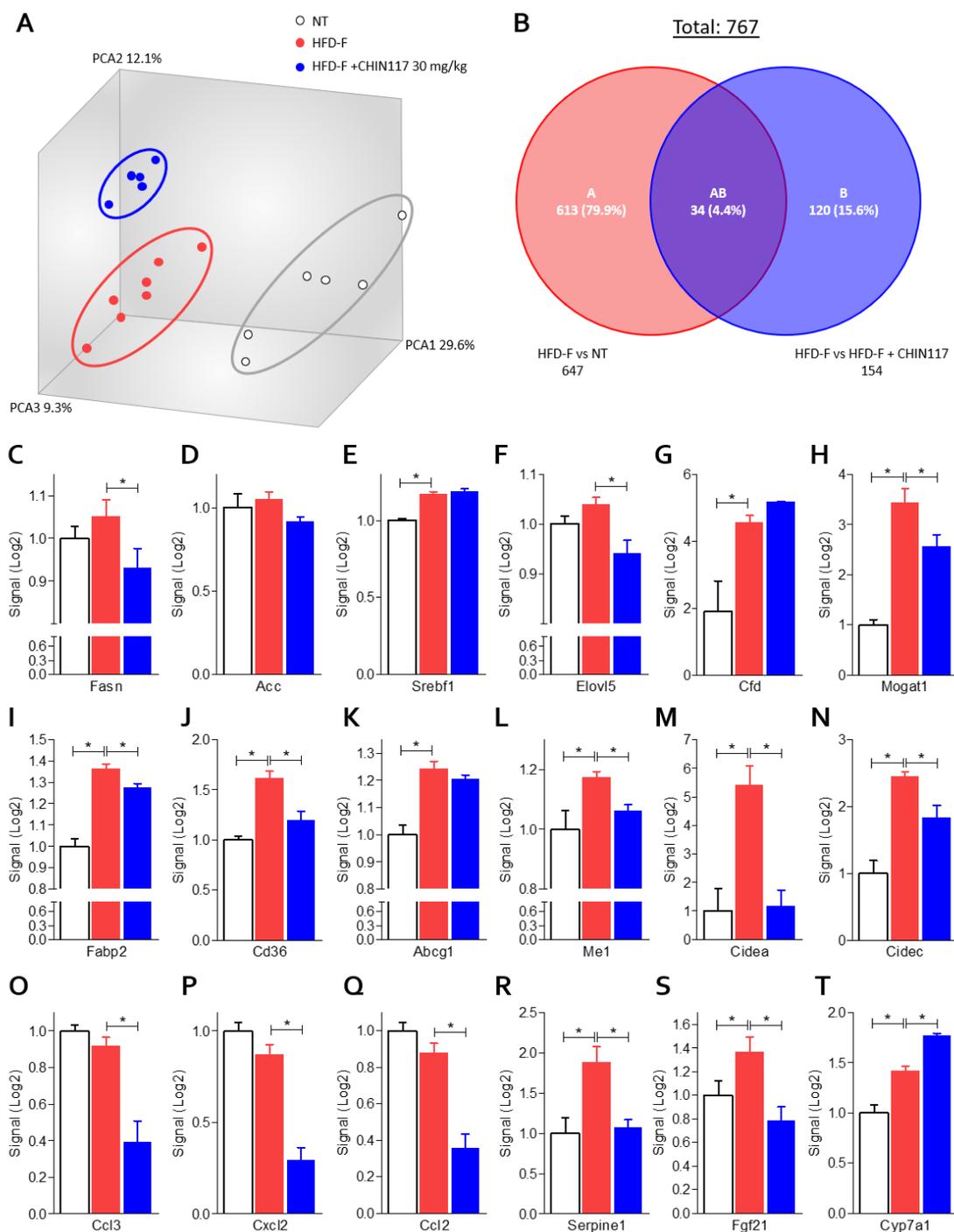


Figura 13: Analisi del trascrittoma epatico. I topi maschi C57BL/6 sono stati alimentati con una dieta ricca di grassi e fruttosio (HFD-F) o una normale dieta per 61 giorni. Dal giorno 7 il CHIN117 è stato somministrato mediante sonda gastrica alla dose di 30 mg/kg/die. (A) Caratterizzazione dell'eterogeneità dei tre gruppi sperimentali mostrati dall'analisi delle componenti principali (PCA) (B) Diagramma di Venn dei geni espressi in modo differenziale che mostra le regioni sovrapposte tra i due gruppi di geni di confronto (fold change <math><-2</math> o >2, *\pm SEM di 5-7 topi per gruppo; * $p<0,05</math>.$

Non abbiamo osservato invece una modulazione significativa nell'espressione di GPBAR1 (**Figura 14A**), FXR (**Figura 14B**) e suoi geni target (**Figura 14C, D**) e, mentre l'espressione del CysLT₁R non è risultata modulata (**Figura 14G**), abbiamo osservato che il CHIN117 ha ridotto significativamente l'espressione della 5-lipossigenasi (Alox5) (**Figura 14H**). Infine il CHIN117 è risultato in grado di ridurre l'espressione di Ppar α (**Figura 14E**).

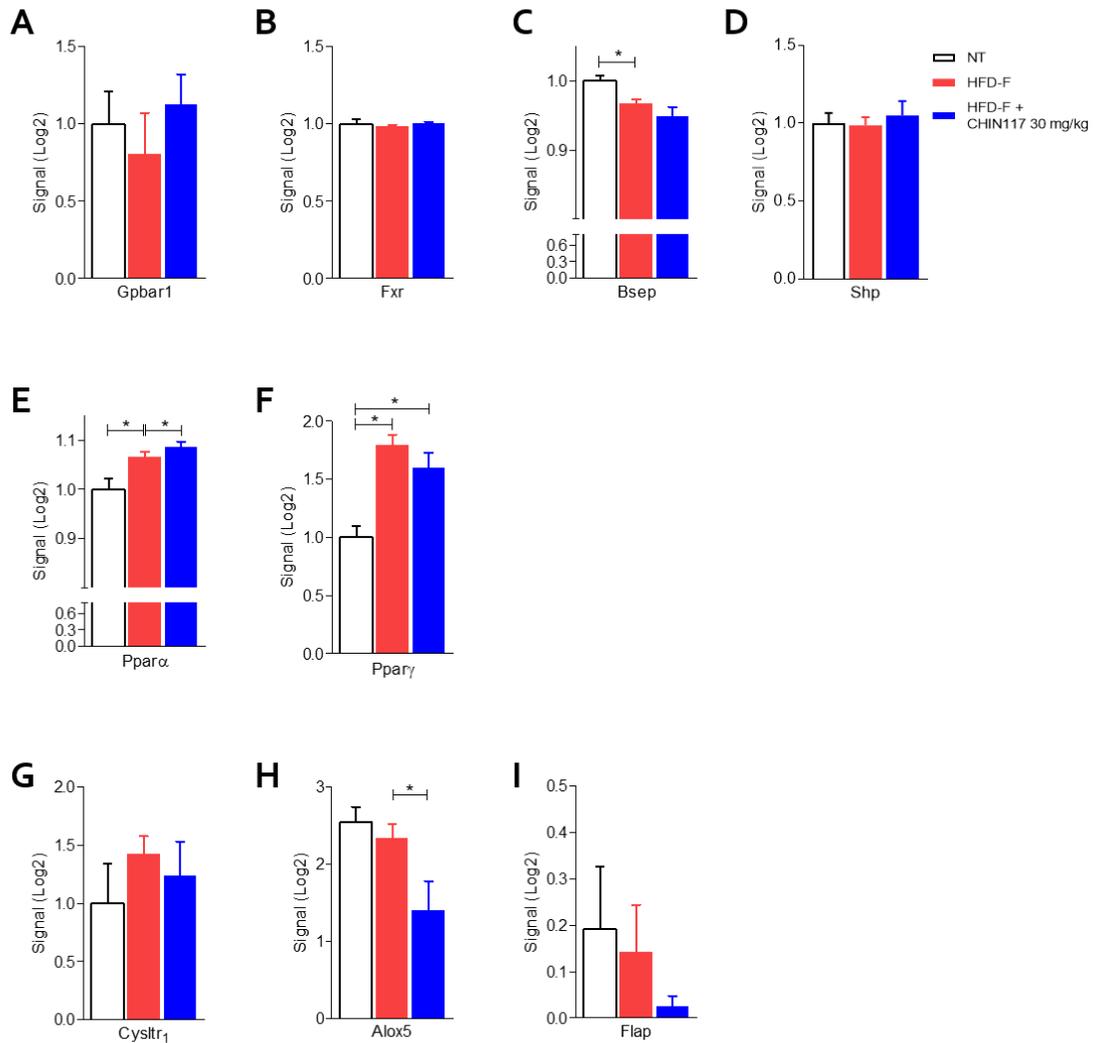


Figura 14: Effetti del CHIN117 sull'espressione epatica dei recettori. I topi maschi C57BL/6 sono stati alimentati con una dieta ricca di grassi e fruttosio (HFD-F) o una normale dieta per 61 giorni. Dal giorno 7 il CHIN117 è stato somministrato mediante sonda gastrica alla dose di 30 mg/kg/die. Espressione relativa dell'mRNA estrapolata dall'analisi di RNA-seq di: **(A)** Gpbar1, **(B)** Fxr, **(C)** Bsep, **(D)** Shp, **(E)** Ppar α , **(F)** Ppar γ , **(G)** CysLT₁R, **(H)** Alox5, e **(I)** Flap. I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; *p<0,05.

2.5.2 Effetti del CHIN117 sul tessuto adiposo

Poiché il tessuto adiposo è uno dei principali bersagli terapeutici nella NASH e sia il CysLT₁R che GPBAR1 sono espressi in questo tessuto, abbiamo valutato come il CHIN117 moduli la funzionalità del tessuto adiposo bruno e bianco (BAT e eWAT). I risultati mostrati in **Figura 15A–C** dimostrano che il trattamento dei topi con il CHIN117 ha ridotto il peso del BAT e il rapporto peso del BAT/peso corporeo. Poiché l'aumento del BAT è generalmente considerato un evento protettivo nel contesto di un elevato apporto calorico, i nostri risultati sul volume del BAT sono probabilmente dovuti alla riduzione del peso corporeo e dell'indice di massa corporea esercitata dal nostro composto. Inoltre, poiché l'eWAT è il principale tessuto di stoccaggio del grasso e rappresenta la controparte murina del grasso viscerale nell'uomo, abbiamo esaminato se il trattamento con il CHIN117 modulasse il suo metabolismo. Come mostrato nella **Figura 15D, E** l'esposizione dei topi alla dieta HFD-F ha aumentato significativamente il peso del grasso bianco epididimale (eWAT) e il suo rapporto con il peso corporeo (**Figura 15D, E**). L'HFD-F, inoltre, ha aumentato l'espressione di GPBAR1 e del CysLT₁R (**Figura 15F,G**) e ha promosso l'infiammazione, come dimostrato dall'aumento dei livelli di Tnf- α e Cd11b (**Figura 15M–N**). Al contrario, il CHIN117 non solo ha ridotto il peso dell'eWAT, ma ha anche ridotto significativamente il fenotipo proinfiammatorio, tipicamente osservato nei pazienti con NASH.

Non è stata osservata nessuna differenza statistica nella modulazione dei geni lipogenici (**Figura 15H,I,L**); l'alimentazione con una dieta HFD-F ha mostrato solo una tendenza a down-regolare l'espressione di Ppar γ e Pgc1 α (**Figura 15K,O**). Il CHIN117 ha up-regolato l'espressione di Ucp2, un marker di trans differenziazione marrone/beige (**Figura 15J**).

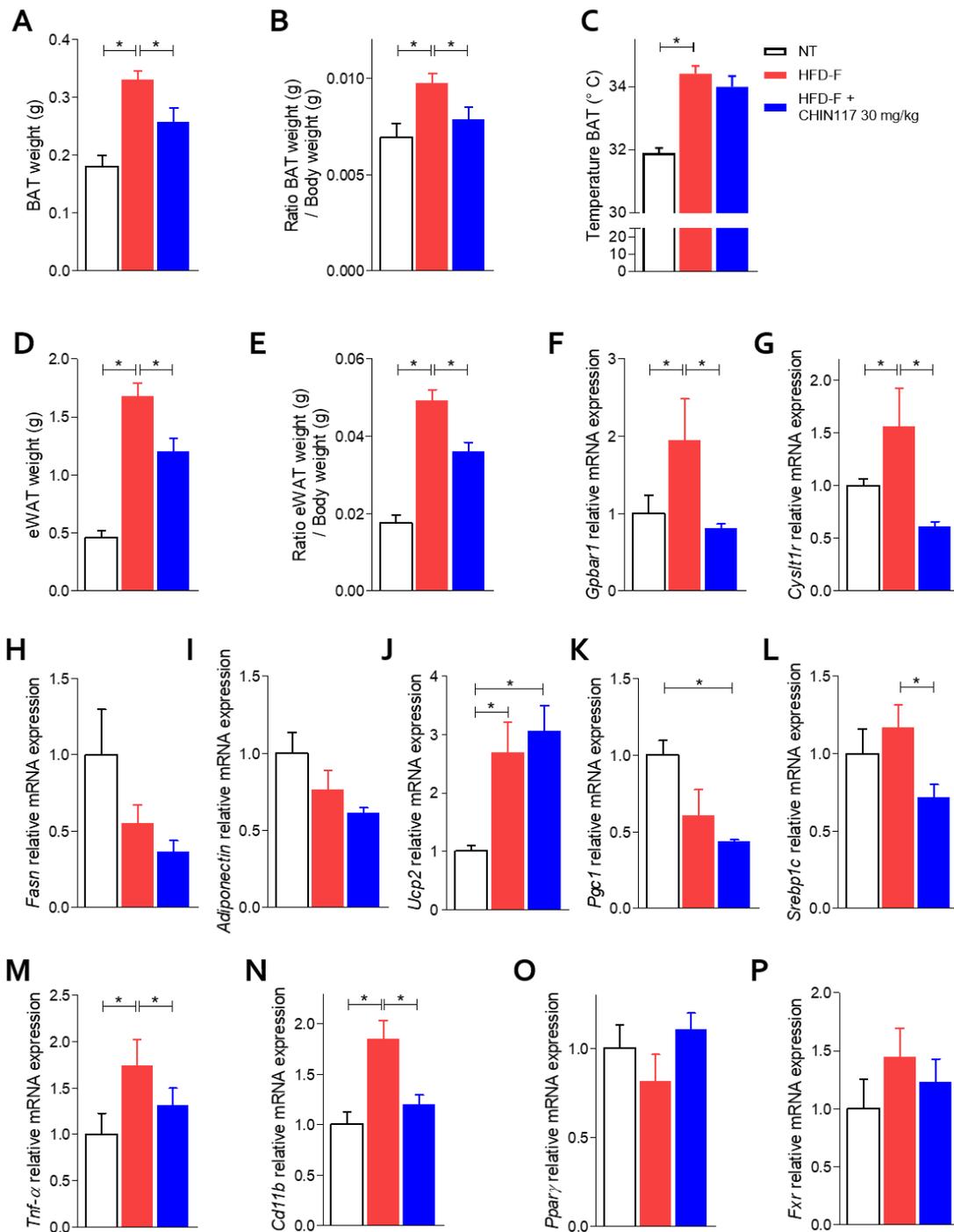


Figura 15: Effetti del CHIN17 sul tessuto adiposo. I topi maschi C57BL/6 sono stati alimentati con una dieta ricca di grassi e fruttosio (HFD-F) o una normale dieta per 61 giorni. Dal giorno 7 il CHIN17 è stato somministrato mediante sonda gastrica alla dose di 30 mg/kg/die. (A) peso BAT, (B) rapporto peso BAT (g)/peso corporeo (g) e (C) temperatura del BAT (°C) il giorno 51. (D) peso eWAT e (E) rapporto peso eWAT (g)/peso corporeo (g). Espressione relativa dell'mRNA di (F) GPBAR1, (G) CysLT₁R, (H) Fasn, (I) Adiponectina, (J) Ucp2, (K) Pgc1, (L) Srebp1c, (M) Tnf- α , (N) Cd11b, (O) Ppar γ e (P) Fxr nell'eWAT. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. * $p < 0,05$. I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

E' noto come l'attivazione di GPBAR1 provochi l'aumento della secrezione di GLP-1 [72], un ormone prodotto dall'intestino che stimola la secrezione di insulina e inibisce la secrezione di glucagone da parte del pancreas. Pertanto, per confermare l'attivazione di GPBAR1, abbiamo misurato l'espressione di Gcg, gene che codifica per GLP-1, nel colon dei topi del nostro modello. I dati hanno mostrato come il CHIN117 up-regoli il gene Gcg (**Figura 16B**) e come riduca l'espressione della citochina pro-infiammatoria Il-1 β , confermando la sua attivit  antinfiammatoria anche nel colon (**Figura 16A**).

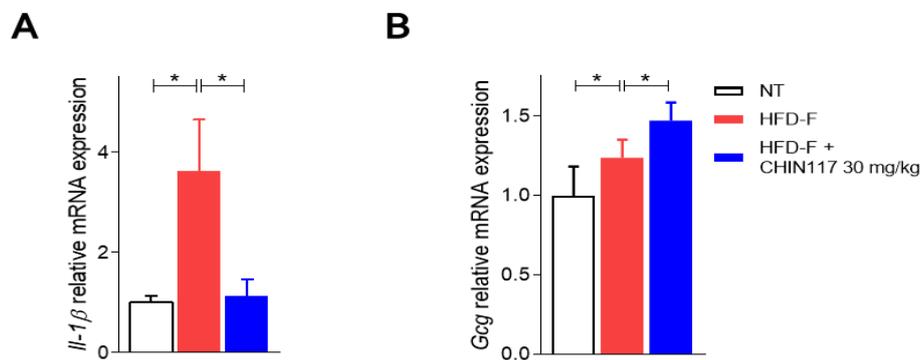


Figura 16: Espressione dell'mRNA nel colon dei topi della citochina proinfiammatoria (A) Il1 β e del gene che codifica per GLP-1 (B) Gcg. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. *p <0.05. I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; *p<0,05.

Discussione

In questo studio abbiamo riportato l'efficacia del nuovo ligando duale CHIN117 in un modello murino di NASH. A tale scopo, il CHIN117 è stato somministrato in topi maschi C57BL/6J alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) e fruttosio (HFD-F) per 61 giorni.

In primo luogo, i dati ottenuti dimostrano che il CHIN117 protegge efficacemente dall'aumento di peso corporeo e dallo sviluppo di steatosi epatica e di lesioni agli epatociti come dimostrato dall'analisi istopatologica e dalla riduzione dei livelli plasmatici di AST e ALT. Questi dati sono supportati da un forte modulazione del trascrittoma epatico. Infatti mentre la dieta HFD-F ha modificato l'espressione di 767 geni rispetto ai topi alimentati con una dieta normale, questo pattern è stato significativamente rimodellato dal trattamento con il CHIN117. Tra i geni modulati dal CHIN117 compaiono quelli coinvolti nella lipogenesi *de novo* come *Fasn*, *Fabp2*, *Mogat1* e *Ppara*. In particolare *PPAR α* è un gene coinvolto nell'ossidazione degli acidi grassi ed è un target validato nel trattamento della steatosi in modelli preclinici di NASH e nonostante diversi agonisti singoli o duali *Ppara*/*Ppar δ* si siano rivelati efficaci nel migliorare la sensibilità all'insulina e la steatosi epatica in modelli preclinici, i trials clinici hanno mostrato grossi limiti di queste molecole, supportando la necessità di un approccio multitarget per il trattamento della NASH.

Oltre a modulare le pathway della lipogenesi, il CHIN117 si è mostrato efficace nel ridurre l'espressione epatica di marker infiammatori come *Ccl3*, *Ccl2* e *Cxcl2*. È stato dimostrato che questa famiglia di chemochine svolge un importante ruolo nello sviluppo dell'infiammazione e del processo fibrotico e, in particolare, *CCL2* è un altro target ben caratterizzato per il trattamento della fibrosi in pazienti con NASH. Abbiamo dimostrato inoltre che il CHIN117 non esercita alcuna attività su *FXR* e sui suoi geni target *Shp* e *Bsep*, mentre aumenta l'espressione di *Cyp7a1*. La regolazione di *Cyp7a1* in un modello di NASH è rilevante in quanto *Cyp7a1* è l'enzima limitante della sintesi degli acidi biliari primari nel fegato. Abbiamo recentemente dimostrato che i topi rispondono alla dieta HFD-F aumentando il tasso di conversione del colesterolo in acidi biliari [69] e che questo meccanismo consente di aumentare l'escrezione fecale del colesterolo, un meccanismo protettivo che potrebbe contribuire a limitare l'accumulo di grasso nel fegato nei topi. Nonostante la regolazione del *Cyp7a1* sia diversa nell'uomo e nel topo, vi sono solide prove che l'attivazione di *Cyp7a1* sia protettivo contro l'accumulo di colesterolo nel fegato (steatosi), infiammazione e fibrosi.

Oltre al fegato, il CHIN117 ha esercitato effetti benefici sul tessuto adiposo. Infatti, oltre a ridurre il peso del BAT, probabilmente a causa dei suoi effetti benefici sul peso corporeo, promuove anche una serie di cambiamenti sull'eWAT (la controparte murina del grasso viscerale umano), riducendo anche l'espressione di geni infiammatori come il Tnf- α e Cd11b, e revertendo così il fenotipo pro-infiammatorio tipico dei pazienti con NASH. In sintesi, abbiamo identificato un nuovo ligando duale antagonista del CysLT₁R e agonista di GPBAR1 che esercita effetti benefici in un modello murino di NASH. In particolare la caratterizzazione farmacologica del CHIN117 ci ha permesso di mettere in evidenza ancora una volta l'importanza di un approccio multi target nel trattamento della NASH, confermando inoltre la rilevanza di alcuni target già ben convalidati.

Capitolo 3

3.1 Metabolismo epatico dei farmaci e danno epatico

Il fegato è l'organo più esposto ai farmaci e alle tossine assorbite dall'intestino a causa della circolazione portale ed è in grado di metabolizzare queste sostanze grazie ad una serie inducibile di vie metaboliche, che includono quelle che agiscono direttamente sulla sostanza assunta (vie metaboliche di fase 1), quelle che si attivano in un secondo momento e che sintetizzano coniugati del farmaco o dei suoi metaboliti con una molecola più idrosolubile, ad esempio uno zucchero, un amminoacido o una molecola di solfato (vie metaboliche di fase 2) e quelle deputate alla rimozione finale nella bile della sostanza principale o dei suoi metaboliti o dei prodotti della coniugazione con un meccanismo dipendente dall'energia (vie metaboliche di fase 3). Per ogni composto assunto potrebbero essere necessarie tutte e tre le fasi, considerando che queste sono regolate in maniera coordinata, in quanto l'espressione e la sede subcellulare delle proteine (enzimi, trasportatori di membrana), che mediano questi passaggi, sono controllate da una serie di recettori nucleari in grado di regolarne la trascrizione.

Nel dettaglio, le vie del metabolismo epatico di fase 1 prevedono principalmente reazioni di ossidazione, riduzione ed idrolisi e generano prodotti che sono prontamente coniugati dagli enzimi di fase 2 oppure che sono escreti senza ulteriori modifiche. La maggior parte delle reazioni di tipo 1 è catalizzata dalle ossidasi microsomiali a funzione mista, alle quali appartiene la superfamiglia del citocromo P450 (Cytochrome P450, CYP). L'evidente promiscuità di questi enzimi nei confronti di farmaci, tossine ambientali, ormoni steroidei, lipidi e acidi biliari deriva dall'esistenza di proteine CYP multiple strettamente correlate tra di loro nel fegato umano ne sono presenti più di 20. Il ciclo di reazione implica il legame dell'ossigeno molecolare al ferro nel gruppo prostetico dell'eme, la conseguente riduzione dell'ossigeno attraverso l'accettazione di un elettrone e la successiva incorporazione dell'"ossigeno attivato" nel farmaco o in un altro composto lipofilo. La riduzione dell'ossigeno e l'inserimento in un farmaco substrato generano intermedi chimicamente reattivi, inclusi i radicali liberi. L'esempio tipico è l'N-acetil-p-benzochinoneimina (NAPQI), il metabolita reattivo del paracetamolo, ottenuto per azione del CYP2E1 e responsabile della epatotossicità indotta dal farmaco. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) contribuiscono significativamente al danno

tissutale, in particolare inducendo stress ossidativo e attivando vie di morte cellulare. Il contenuto epatico di proteine del citocromo P450 è più alto nella zona 3 dell'acino epatico piuttosto che nella zona 1 e questo spiega in parte la settorialità delle lesioni epatiche prodotte da farmaci, come l'APAP e da tossine.

L'espressione epatica di ogni enzima del CYP è determinata geneticamente, per cui possono esserci differenze nel tasso di metabolizzazione dei farmaci tra i vari soggetti ed è regolata anche dallo sviluppo, in quanto diminuisce leggermente (fino al 10%) con l'avanzare dell'età, sebbene questa variazione sia inferiore se paragonata al cambiamento indotto dalla variazione genetica, dall'influenza ambientale e dallo sviluppo di epatopatie. Esistono anche differenze di genere nell'espressione dei CYP (come il CYP3A4 e 2E1), che spiegano il metabolismo leggermente aumentato di alcuni farmaci nelle donne rispetto agli uomini. Inoltre, lo stato nutrizionale di una persona e l'insorgenza di patologie possono influenzare l'espressione di alcuni CYP; ad esempio l'espressione del CYP2E1 è aumentata dall'obesità e dall'alto consumo di grassi, mentre le malattie, che alterano il livello dei CYP epatici, includono il diabete mellito (CYP2E1 aumentato) l'ipotiroidismo (CYP1A diminuito), l'ipopituitarismo (CYP3A4 diminuito) e la cirrosi, i cui effetti variano per i differenti CYP.

Le reazioni di fase 2 sono catalizzate da enzimi, quali glucosiltransferasi, sulfotransferasi, glutatione S-transferasi, acetiltransferasi e aminoacido N-transferasi ed implicano la formazione di legami esteri tra il composto originario o un metabolita del farmaco e una molecola idrosolubile per formare coniugati, che possono essere escreti facilmente con la bile o con l'urina. In generale, i coniugati del farmaco non sono tossici e le reazioni di fase 2 sono considerate reazioni di detossificazione. Queste sono alterate solo in maniera marginale nelle malattie del fegato, con l'eccezione della loro riduzione, riscontrata nei pazienti affetti da cirrosi scompensata.

Infine, la fase 3 implica la secrezione dei farmaci, dei loro metaboliti o dei loro coniugati nella bile e prevede il coinvolgimento di molti trasportatori, tra cui le proteine ABC (ATP-Binding Cassette), che sfruttano l'energia derivata dall'idrolisi dell'adenosina trifosfato (ATP). La superfamiglia dei trasportatori ABC è ampiamente presente in natura e include il regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) e le proteine associate alla resistenza multifarmaco (Multidrug Resistance Associated Proteins, MRP). Almeno due membri di questa famiglia eliminano i coniugati di farmaci e di altre sostanze dagli epatociti: l'MRP3 (gene simbolo ABCC3), presente sulla superficie basolaterale, è in grado di facilitare il passaggio del coniugato del farmaco nella

circolazione sinusoidale e l'MRP2 (gene simbolo ABCC2), espresso nella membrana canalicolare, è invece capace di pompare composti endogeni e coniugati del farmaco nella bile. La pompa di esportazione dei sali biliari (Bile Salt Export Pump, BSEP) e l'MDR3 sono altri trasportatori canalicolari che si occupano, rispettivamente, dell'estruzione degli acidi biliari e dei fosfolipidi nella bile e che possono interagire con diversi farmaci. La regolazione dell'espressione e dell'attività delle proteine responsabili dell'eliminazione dei farmaci è complessa, considerando che espressioni alterate o attività compromesse (dalla competizione tra sostanze, cambiamenti nella composizione lipidica della membrana o danno causato da metaboliti reattivi o legami covalenti) potrebbero indurre un accumulo del farmaco, una compromissione del flusso biliare o un danno epatico colestatico.

L'epatite è definita in termini generali come una lesione necro-infiammatoria del fegato nella cui patogenesi sono implicati diversi agenti eziologici. Si parla di epatite acuta nel caso in cui il processo infiammatorio sia autolimitante, entro un periodo di tempo pari o inferiore a 6 mesi, al termine del quale il paziente si ristabilisce completamente. L'epatite acuta può essere classificata in varie forme sulla base dell'eziologia, distinguendo le epatiti virali da quelle batteriche, da protozoi, da micoplasmi, da farmaci, da alcol o da ridotto apporto vascolare.

Per danno epatico indotto da farmaci (DEF) si intende un ampio spettro di sindromi clinico-patologiche in cui il danno epatico è dovuto all'assunzione di farmaci. La loro gravità può variare da modeste alterazioni del valore delle transaminasi, talora transitorie e non associate a segni di deficit funzionale, fino a quadri di necrosi epatica massiva con insufficienza epatica severa [73]. In particolare, il fegato rappresenta la sede principale del metabolismo dei composti esogeni quali i farmaci (xenobiotici) o endogeni (prodotti nel fegato stesso o in altri organi e tessuti). Pertanto l'assunzione di farmaci o sostanze tossiche può indurre una situazione di danno, noto come danno epatico da farmaci (DEF). Inoltre, in base all'entità dell'insulto e della gravità dell'insufficienza epatica che ne consegue, tali molecole possono provocare un'epatite fulminante.

Il DEF è responsabile dell'1,2-6,6% del danno epatico acuto, la sua incidenza nella popolazione generale è stimata tra 1 e 2 casi per 100.000 abitanti all'anno, con ampie variazioni geografiche sia in Europa che negli Stati Uniti.

La suscettibilità al danno epatico dipende dall'interrelazione di vari fattori legati al soggetto (età, sesso, peso corporeo, aspetti genetici, immunologici, coesistenza di altre patologie), e all'ambiente (dieta, quantità di alcol assunto, assunzione di più farmaci). Oltre a

questi, gioca un ruolo importante il potenziale tossico del farmaco legato alla classe a cui appartiene, alla dose assunta e alla durata dell'assunzione (**Figura 17**).

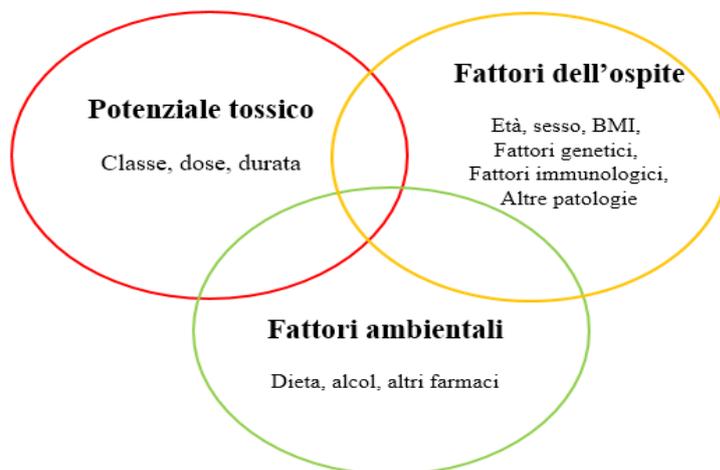


Figura 17: Fattori coinvolti nella patogenesi del danno epatico.

I meccanismi attraverso cui i farmaci determinano l'epatotossicità sono principalmente: l'effetto tossico diretto sul fegato dose-dipendente (reazioni avverse di tipo A) e idiosincrasico (reazioni avverse di tipo B).

Le reazioni avverse di tipo A costituiscono circa l'80% del totale. I farmaci e le tossine caratterizzati da tossicità "farmacologica" (tipo A) hanno una curva dose-risposta prevedibile e cioè più è alta la concentrazione plasmatica del farmaco, maggiore è la probabilità di provocare un danno epatico.

Per quel che riguarda i meccanismi di tossicità appaiono ben noti il danno diretto a carico degli epatociti o l'inibizione di un particolare processo metabolico. In genere, questo tipo di danno si osserva poco dopo il raggiungimento della soglia di tossicità per una particolare sostanza; un esempio è dato dal paracetamolo assunto in dosi molto alte a scopo di suicidio.

Al contrario, il danno epatico di tipo B (reazione idiosincrasica) avviene in maniera inaspettata: una sostanza provoca una reazione non prevedibile in un soggetto geneticamente predisposto, in misura non correlata alla dose e con una latenza variabile. Alterazioni genetiche determinano la presenza di enzimi alterati o la loro totale assenza; tale condizione può portare alla formazione di metaboliti tossici (**Figura 18**). In questo tipo di danno non si riscontra una chiara correlazione temporale con l'assunzione del farmaco, né una relazione dose-risposta; il più delle volte non è possibile tracciare un modello predittivo [74].

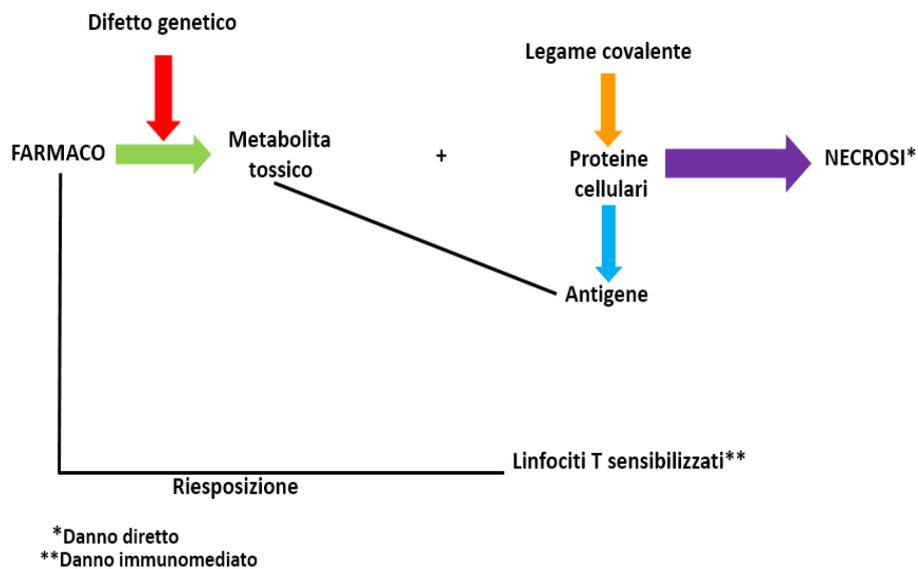


Figura 18: Meccanismo patogenetico del danno epatico da farmaci.

Entrambi i meccanismi coinvolgono uno o più tipi cellulari presenti nel fegato: epatociti, colangiociti, cellule epiteliali sinusoidali, cellule stellate e cellule di Kupffer. Le reazioni idiosincrasiche possono essere metaboliche o immunomediate con possibili aspetti di *overlap*. Il DEF ha un ampio spettro di manifestazioni e il quadro clinico può simulare l'epatite acuta virale, la steatosi, la colangite acuta, la colangite biliare primitiva, la colangite sclerosante primitiva, la NASH, la malattia veno-occlusiva acuta o subacuta, l'epatite autoimmune e la cirrosi criptogenetica.

Dal punto di vista clinico, il DEF può determinare moderati aumenti delle transaminasi fino all'insufficienza epatica fulminante, tuttavia il quadro tipico è quello dell'epatite acuta. Il danno epatico severo è caratterizzato da un incremento delle transaminasi (>10 volte il limite normale), iperbilirubinemia, ittero e ridotta attività protidosintetica.

Il DEF, sulla base del pattern biochimico, può essere classificato in tre gruppi: epatocellulare, colestatico e misto.

3.2 Epatotossicità indotta da APAP

L'acetaminofene, meglio conosciuto con il nome di paracetamolo (N-acetil-para-aminofenolo, APAP), è un farmaco da banco, un analgesico e antipiretico ampiamente utilizzato sia da solo che in associazione ad altre sostanze per il trattamento del dolore acuto o cronico e delle patologie virali causate da raffreddamento. Sebbene l'APAP fosse stato approvato per uso clinico già negli anni '50, le preoccupazioni riguardanti la sua sicurezza divennero rilevanti solo negli anni '70.

Nel 1966 infatti iniziarono a comparire le prime notizie riguardanti la sua associazione con danno epatico dagli esiti fatali. Negli anni '70, il paracetamolo divenne l'agente suicida più utilizzato nel Regno Unito; al Kings College Hospital di Londra, nel 1972, venne istituita la prima unità di terapia intensiva per insufficienza epatica, in genere piena di giovani donne arrivate in seguito a tentativi di autolesionismo.

Tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, iniziarono ad emergere inoltre numerose segnalazioni riguardanti gravi lesioni al fegato associate non a tentativi di suicidio ma dovute a cosiddette "disavventure terapeutiche", overdose involontarie, spesso accompagnate dal consumo di alcol. Nel decennio successivo, gli epatologi statunitensi divennero sempre più consapevoli dell'entità della problematica correlata all'uso dell'APAP.

L'intossicazione da APAP, ad oggi è la causa più comune di insufficienza epatica acuta (ALF), è responsabile del 46 % di tutti i casi di ALF negli Stati Uniti e tra il 40 e il 70% di tutti i casi in Gran Bretagna ed Europa. Più di 100.000 chiamate ai centri antiveleni, 56.000 visite al pronto soccorso, 2.600 ricoveri e quasi 500 morti vengono attribuiti ogni anno all'utilizzo dell'acetaminofene negli Stati Uniti [75]. I meccanismi alla base del danno epatico indotto da APAP sono stati ampiamente studiati [76], l'APAP viene assorbito dall'intestino nelle prime ore dopo il consumo. A dosi terapeutiche, la maggior parte (circa il 90%) dell'APAP viene metabolizzata principalmente attraverso reazioni di Fase II (glucuronidazione e solfatazione) ed escreta nelle urine attraverso i reni. Il resto, circa il 10% viene ulteriormente metabolizzato dagli enzimi del citocromo P450, prevalentemente citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e CYP1A2, per formare un metabolita reattivo, l'N-acetil-p-benzochinone immina (NAPQI). Il NAPQI altamente reattivo si coniuga rapidamente con il glutatione epatico (GSH) e viene escreto nella bile senza evidenti effetti dannosi sugli epatociti (**Figura 19**).

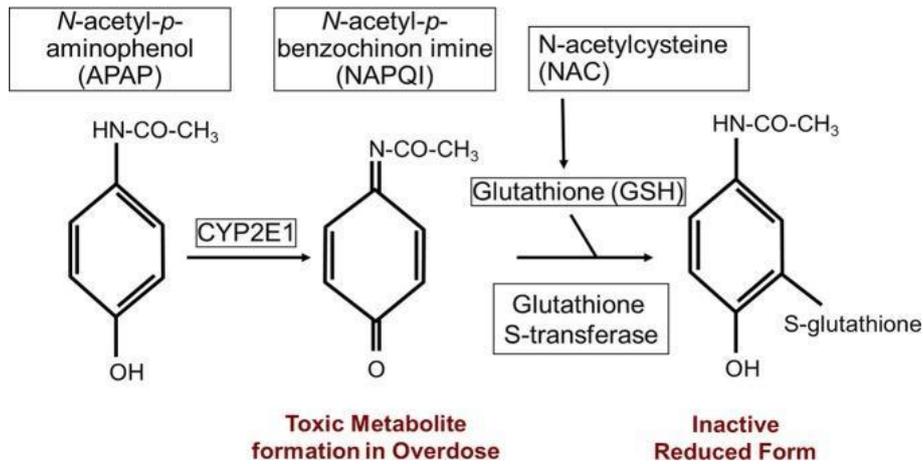


Figura 19: Formazione del N-acetil-p-benzochinone immina (NAPQI)

Tuttavia, a seguito del sovradosaggio di APAP, le vie di glucuronidazione e solfatazione sono sature e l'eccessiva generazione di NAPQI esaurisce il GSH intracellulare e mitocondriale nel fegato (**Figura 19**). Il NAPQI in eccesso reagisce e forma legami covalenti con macromolecole biologiche cellulari, in particolare le proteine mitocondriali, con conseguenti danni mitocondriali e morte cellulare (**Figura 20**).

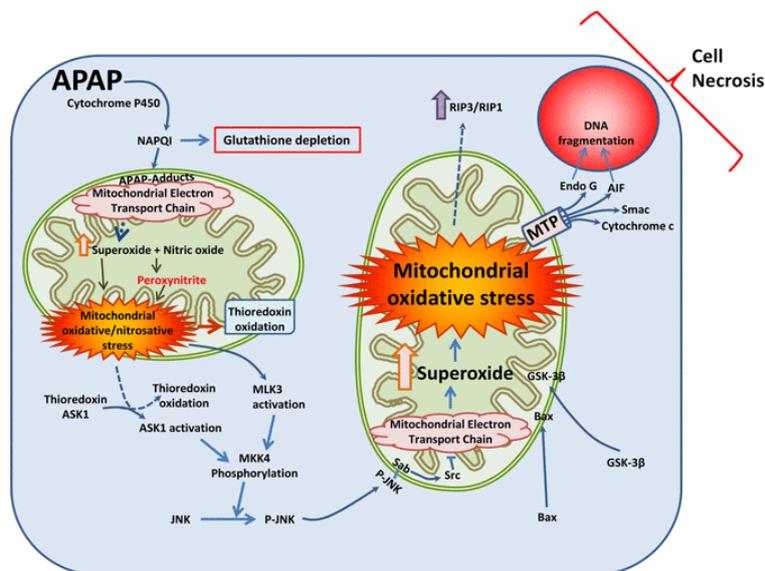


Figura 20: Meccanismo di morte cellulare degli epatociti indotto da acetaminofene (APAP) [77]

Quando il NAPQI si lega alle proteine mediante i loro residui di cisteina, si formano addotti proteici (APAP-AD). Analisi di proteomica hanno identificato un certo numero di proteine mitocondriali con addotti di APAP, tra cui ATP sintasi e glutazione perossidasi [78]. La principale caratteristica della disfunzione mitocondriale indotta dagli addotti APAP è l'aumento della generazione di ROS come il superossido e il perossinitrito, che possono modificare le proteine mediante nitrurazione dei loro residui di tirosina [77]. I ROS inibiscono il fattore di trascrizione NF- κ B pro-sopravvivenza e successivamente innescano l'autofosforilazione e l'attivazione della chinasi N-terminale (JNK) c-Jun.

Il JNK attivato causa l'ulteriore aumento della produzione di ROS, con conseguente destabilizzazione del potenziale di membrana che porta a gonfiore mitocondriale e rottura delle membrane [79]. Dopo la rottura della membrana, c'è un massiccio rilascio di fattore induttore dell'apoptosi (AIF), endonucleasi G e attivatori delle caspasi nel citoplasma con successiva traslocazione nel nucleo frammentazione del DNA nucleare [80]. La compromissione mitocondriale insieme alla frammentazione del DNA sono la principale causa di necrosi epatocitaria osservata nella tossicità epatica indotta da APAP [77]. Studi più recenti sulla patogenesi dell'insufficienza epatica acuta indotta da APAP hanno rivelato che non solo la tossicità epatica indotta da APAP, ma anche le successive risposte infiammatorie del sistema immunitario, prevalentemente innato, determinano la gravità e l'esito della malattia [81].

3.2.1 Infiammazione ed epatotossicità indotta da APAP

L'ampia necrosi cellulare dopo un sovradosaggio di APAP porta al rilascio di modelli molecolari associati al danno (DAMPs) tra cui DNA mitocondriale, frammenti di DNA nucleare, proteina di gruppo 1 ad alta mobilità (HMGB1) e proteine da shock termico-70 (HSP-70) (**Figura 21**).

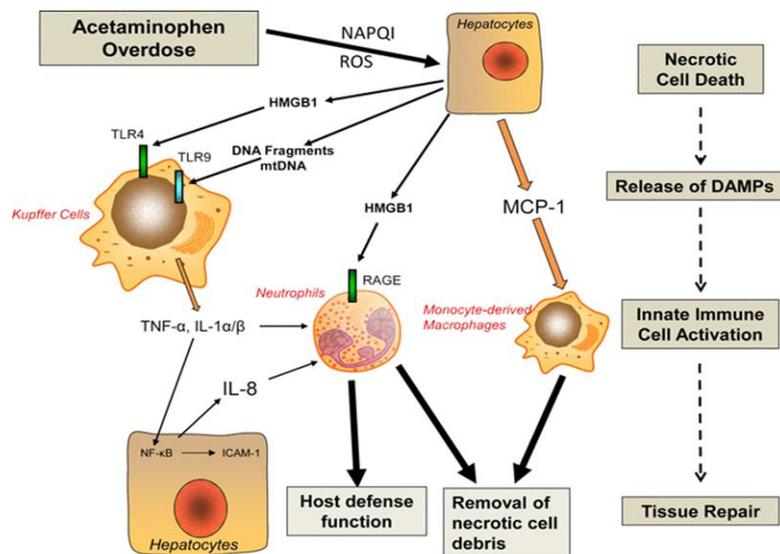


Figura 21: Coinvolgimento di diverse cellule immunitarie nell'insufficienza epatica acuta indotta da acetaminofene [77]

I DAMPs sono riconosciuti dalle cellule di Kupffer, altri macrofagi epatici e neutrofili, tramite i *Toll like receptors* (TLR), che portano successivamente alla loro attivazione e al rilascio di citochine. Le KC attivate iniziano a secernere citochine come TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, da cui TNF- α e chemochine come CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8 promuovono il reclutamento di monociti e neutrofili nelle aree di necrosi [79]. Un passo importante nel generare la risposta infiammatoria è la formazione dell'inflammasoma, un complesso multiproteico citosolico, nei macrofagi. Dopo la formazione dell'inflammasoma, le KC rilasciano sia citochine come TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 e chemochine come CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8, attivando ulteriormente il sistema immunitario innato, portando al reclutamento delle cellule immunitarie nel sito di infiammazione e facendo progredire la necrosi epatocitaria [79].

Inoltre, in un modello alternativo di epatotossicità indotta da APAP, i peptidi dell'addotto proteico che si forma a causa dell'eccesso di NAPQI possono essere rilevati dalle cellule che esprimono l'antigene leucocitario umano (HLA) come le APC, cellule presentanti l'antigene, le

quali portano al reclutamento cellulo-mediato dei linfociti T helper (Th), dei linfociti T citotossici e all'attivazione del processo di apoptosi mediato da Fas / FasL, perforina e granzima delle cellule epatiche [79].

3.3 Approcci terapeutici

Nel 1973, Mitchell e Jollow presso il *National Institutes of Health* (NIH) aveva delineato la via metabolica dell'APAP, suggerendo che la N-acetilcisteina (NAC) potesse essere un antidoto adatto, in quanto in grado di ricostituire i depositi di glutazione epatico (GSH). La NAC orale (Muco Myst®) è entrata in uso in pochi anni e la NAC per via endovenosa poco dopo, sebbene considerevolmente più tardi negli Stati Uniti, nel 2004.

L'N-acetilcisteina riduce significativamente il rischio di epatotossicità grave e garantisce la sopravvivenza dell'individuo, se somministrata entro le prime ore dall'ingestione del sovradosaggio di APAP; la sua efficacia viene notevolmente ridotta se somministrata più di 8 ore dopo l'ingestione, in quanto la cascata di eventi tossici a livello epatico è già in atto [75]. La somministrazione dell'antidoto N-acetil-cisteina rappresenta l'unico trattamento per la tossicità da paracetamolo attualmente disponibile in campo clinico. A causa della ristretta finestra temporale di questo intervento, è necessario sviluppare ulteriori approcci terapeutici, che possano essere applicati anche ai pazienti nei quali la malattia viene diagnosticata tardivamente. Le ricerche sulle nuove opzioni terapeutiche si sono focalizzate principalmente sulla riduzione dello stress ossidativo, riconosciuto come evento critico nell'epatotossicità da paracetamolo. Pertanto, sono stati analizzati un gran numero di composti naturali dotati di capacità antiossidante e che in virtù di questa proprietà potrebbero rappresentare potenziali farmaci per il trattamento del danno epatico indotto da APAP. L'attività antiossidante di questi prodotti è dovuta alla loro capacità di aumentare i livelli di GSH, di superossido dismutasi e di catalasi e alla capacità di inibire il metabolismo dell'APAP e di indurre un recupero più rapido dalla lesione [82].

Obiettivo del secondo studio

Il danno epatico indotto da farmaci (DEF) è una causa relativamente comune di danno epatico attribuibile all'esposizione a xenobiotici, inclusi farmaci, erbe e farmaci alternativi. Meccanicamente, questo danno è attribuibile alla tossicità intrinseca, che è dose-dipendente e si sviluppa in un breve periodo dopo l'esposizione allo xenobiotico, o alla tossicità idiosincratca, che è indiretta e potrebbe svilupparsi in qualsiasi intervallo di tempo dopo l'esposizione allo xenobiotico. La causa principale di DEF intrinseco è il paracetamolo (APAP; noto anche come acetaminofene), un farmaco comunemente prescritto e utilizzato in tutto il mondo come antipiretico/analgesico. L'intossicazione da APAP, intenzionale o non intenzionale, rappresenta la causa di più del 50% di insufficienza epatica acuta (ALF) e circa il 20% dei trapianti di fegato negli Stati Uniti e nel Nord Europa, in particolare nel Regno Unito.

Attualmente, la N-acetilcisteina (NAC) rappresenta la terapia centrale per il trattamento dell'intossicazione acuta da APAP. Tuttavia, l'efficacia della NAC è sostanzialmente ridotta nei pazienti che si presentano tardi dopo l'ingestione del farmaco (cioè più di 10 ore dopo) [83]. Studi su modelli animali hanno dimostrato che la progressione del danno epatico in risposta al sovradosaggio di APAP coinvolge una risposta infiammatoria secondaria promossa dal rilascio di mediatori infiammatori, noti come modelli molecolari associati al danno (DAMPs) e questa risposta è associata all'esito clinico. Questa risposta immunitaria si sviluppa all'interfaccia delle cellule endoteliali sinusoidali del fegato (LSEC) e coinvolge i macrofagi residenti nel fegato, le cellule di Kupffer (KC), insieme a molti altri tipi di cellule immunitarie come cellule dendritiche e natural killer T (NKT) e cellule della linea linfoide. Si ritiene che questa risposta immunitaria medi lo sviluppo di una sindrome da risposta infiammatoria sistemica che porta all'insufficienza multiorgano e alla morte. Ci sono diverse prove sull'importanza delle interazioni cellula-cellula all'interfaccia cellula sinusoidale/cellula immunitaria negli interventi terapeutici nel sovradosaggio di APAP.

I cisteinil leucotrieni (CysLT)—leucotriene C₄ (LTC₄), leucotriene D₄ (LTD₄) e leucotriene E₄ (LTE₄) sono una famiglia di mediatori lipidici dotati di una potente attività proinfiammatoria generata dalla degradazione dell'acido arachidonico da parte della 5-lipossigenasi (ALOX-5; noto anche come 5-LOX o ALOX). Gli antagonisti del recettore CysLT_{1R}, come Montelukast, Zafirlukast, Pranlukast e altri, sono attualmente prescritti per la gestione dell'asma e di altri disturbi allergici/immunitari polmonari e non polmonari, ma hanno mostrato una certa

efficacia nella prevenzione dell'ALF indotta da APAP [14], anche se il preciso meccanismo d'azione rimane poco definito.

Nella ricerca di terapie efficaci nel trattamento del DEF, è stato recentemente dimostrato che il recettore degli acidi biliari, GPBAR1, protegge efficacemente dallo sviluppo di ALF causato dall'APAP [18]. GPBAR1 è un recettore per gli acidi biliari secondari, l'acido litocolico e desossicolico, che è altamente espresso nell'intestino, nelle KC e nelle LSEC, ma non negli epatociti. Nei modelli murini di ALF indotta da APAP, il trattamento con agonisti di GPBAR1 protegge efficacemente dallo sviluppo di ALF prevenendo/revertendo l'attivazione delle cellule di Kupffer e il reclutamento di monociti circolanti, mentre nei topi knock out per GPBAR1 aumenta la gravità del danno epatico e inverte la protezione esercitata da un agonista selettivo di GPBAR1 [18]. Sulla base di questo background, abbiamo recentemente individuato una classe di antagonisti del CYSLT₁R e agonisti di GPBAR1. Il primo della classe di queste molecole, CHIN117, si è rivelato efficace in un modello murini di steatosi epatica metabolica, come mostrato nel lavoro precedentemente trattato. Alla luce di questi dati, abbiamo investigato il ruolo del CYSLT₁R e di GPBAR1 sia in un modello acuto che cronico di epatite indotti rispettivamente dall'esposizione ad APAP e CCl₄ [83].

3.4 Materiali e metodi

3.4.1 GEO Data Sets

La serie GSE120652 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM3407031>) include l'analisi del trascrittoma (Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array) di campioni epatici di pazienti con ALF e campioni di pazienti sani.

3.4.2 Modelli animali

I topi C57BL/6 provengono dalla Charles River. I topi Gpbar1^{-/-} e i loro congenici Gpbar1^{+/+} generati su background C57BL/6 sono stati originariamente donati dalla Dr.ssa Galya Vassileva (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth). Le colonie sono state mantenute nello stabulario dell'Università di Perugia. Lo studio è stato condotto in accordo con la normativa europea/italiana e il protocollo è stato approvato dal comitato etico dell'Università di Perugia e da un comitato nazionale del Ministero della Salute italiano (autorizzazione n.: 214/2017-PR). In ogni esperimento sono stati utilizzati solo topi maschi di età compresa tra 10 e 12 settimane.

Per il modello di epatite acuta indotta da APAP, ai topi C57BL/6 (Charles River, Milano, Italia), Gpbar1^{+/+} e Gpbar1^{-/-} è stata somministrata una singola dose di APAP (500 mg/kg, per via orale). I topi sono stati quindi randomizzati a ricevere uno dei seguenti trattamenti 45 minuti dopo: BAR501 (5, 15 e 30 mg/kg); Montelukast (5, 15 e 30 mg/kg); o CHIN117 (5, 15 e 30 mg/kg). In un altro set sperimentale, ai topi è stato somministrato il CHIN117 (30 mg/kg) 6 ore dopo la somministrazione di APAP (500 mg/kg). I topi sopravvissuti sono stati sacrificati 24 ore dopo l'induzione dell'epatite.

Per studiare gli effetti dell'ablazione del gene Cyslt_{1r}, ai topi C57BL6 è stato somministrato in vivo un Cyslt_{1r} gene small interfering RNA (siRNA) mediante iniezione endovenosa, alla dose di 1 mg/kg e sciolto in InvivoFectamine 3.0 (ThermoFisherScientific), secondo le istruzioni del produttore, una settimana prima dell'induzione dell'epatite. L'efficacia del silenziamento del Cyslt_{1r} è stata valutata 4 giorni dopo la somministrazione del siRNA.

La fibrosi epatica è stata indotta mediante iniezione intraperitoneale di CCl₄ (500 µl/kg) disciolto in un uguale volume di olio d'oliva, due volte a settimana per 1 settimana. I topi CCl₄

sono stati randomizzati a ricevere il CHIN117 (30 mg/kg) giornalmente mediante sonda gastrica dal primo giorno dell'esperimento.

3.4.3 Colture cellulari

Le cellule sinusoidali del fegato umano (LSEC) sono state acquistate da Innoprot (cat. N° P10652; Barcellona, Spagna). Le LSEC sono state coltivate in terreno cellulare endoteliale ECM (Innoprot) addizionato con siero bovino fetale al 5%, un integratore per la crescita delle cellule endoteliali (ECGS) (Innoprot) e antibiotici. Le linee cellulari THP1 (TIB-202), U937, HEK-293T, HepG2 (HB-8065) e LX2 sono state acquistate da ATCC (Manassas, VA; USA). Le cellule THP1 e U937 sono state coltivate in RPMI integrato con 10% FBS, 1% glutammina, 1% penicillina/streptomicina. Le cellule HepG2 sono state coltivate in E-MEM integrato con 10% FBS, 1% glutammina, 1% penicillina/streptomicina. Le cellule HEK-293T sono state coltivate in D-MEM integrato con 10% FBS, 1% glutammina, 1% penicillina/streptomicina. Le cellule LX2 sono state coltivate in D-MEM integrato con 2% FBS, 1% glutammina, 1% penicillina/streptomicina. Tutte le cellule sono state regolarmente passate per mantenere la crescita esponenziale. In due set sperimentali differenti, le cellule U937 e LX2 sono state attivate simultaneamente con TNF- α (100 ng/ml, Sino Biological, Cina) + LTD₄ (100 nM, Cayman Chemical, USA) e stimulate o meno con il CHIN117 a concentrazioni di 1, 5 e 10 μ M o 1,10 e 100 nM rispettivamente. Dopo 24 ore, le cellule sono state raccolte ed è stato estratto l'RNA per la successiva valutazione dell'espressione genica. Per eseguire gli esperimenti di co-coltura e adesione, le cellule HepG2 (5×10^6) sono state piastrate, starvate e stimulate con APAP (10 mM) per 16 ore. Il sovrinatante cellulare è stato raccolto e utilizzato come terreno di condizionamento per stimolare le cellule U937 e le LSEC con o senza CHIN117 (20 μ M) per 16 ore. Per l'esperimento di co-coltura dopo 16 ore entrambi i tipi di cellule sono stati raccolti separatamente per eseguire l'estrazione dell'RNA. Per il test di adesione le cellule U937 sono state marcate e aggiunte alle LSEC piastrate e incubate per 105 minuti a 37 ° C. Quindi, i monociti non aderenti sono stati rimossi e sono stati aggiunti 500 μ l di tampone di lisi (tampone Tris [pH 7,6] e 1% SDS); l'intensità della fluorescenza è stata misurata (eccitazione a 485 nm ed emissione a 520-560 nm) utilizzando un lettore di micropiastre. L'intensità della fluorescenza è stata normalizzata utilizzando i risultati del test MTS eseguito in parallelo con le stesse condizioni di coltura e trattamento.

3.4.4 Retrotrascrizione e RT-PCR

I campioni di fegato sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'uso, risospesi in 1 ml di Trizol (ThermoFisher Scientific) e omogeneizzati meccanicamente con biglie metalliche. L'RNA è stato estratto da campioni di fegato e cellule secondo il protocollo del produttore. Dopo la purificazione dal DNA genomico mediante trattamento con DNase-I (ThermoFisher Scientific), 1 µg di RNA da ciascun campione è stato retrotrascritto utilizzando primer esameri casuali con Superscript-II (ThermoFisher Scientific) in un volume di reazione di 20 µL; 10 ng di cDNA sono stati amplificati in una soluzione da 20 µL contenente 200 nM di ciascun primer e 10 µL di SYBR Select Master Mix (ThermoFisher Scientific). Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato e le condizioni dei cicli termici sono state le seguenti: 3 min a 95°C, seguiti da 40 cicli di 95°C per 15 s, 56°C per 20 s e 72°C per 30 s, utilizzando una macchina Step One Plus (Applied Biosystem). L'espressione relativa dell'mRNA è stata calcolata secondo il metodo $2^{-\Delta Ct}$. I primer utilizzati in questo studio sono stati progettati utilizzando il software PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) utilizzando il database NCBI. In alternativa, per alcuni geni sono state utilizzate le sonde TaqMan e la TaqMan GEX Master Mix (ThermoFisher Scientific). I primer utilizzati sono i seguenti:

m-Tnf- α for (CCACCAGCTCTTCTGTCTA)	(rev AGGGTCTGGGCCATAGAACT)
m-II-6 (for CTTCAACAAGTCGGAGGCTTA)	(rev TTCTGCAAGTGCATCATCGT)
m-II-1 β (for GCTGAAAGCTCTCCACCTCA)	(rev AGGCCACAGGTATTTTGTGCG)
m-Col1a1 (for TGA CTGGAAGAGCGGAGAGT)	(rev AGACGGCTGAGTAGGGAACA)
m-Gpbar1 (for GGCCTGGA ACTCTGTTATCG)	(rev GTCCCTCTGGCTCTTCTCTC)
m-Cysltr1 (for TGTGAAGCTTGAATCAGCA)	(rev TGGTACCTCAGCACCTTTCA)
m-Bax (for CGTGGTTGCCCTCTTCTACT)	(rev GGAGGAAGTCCAGTCTCCAG)
m-Cyp2e1 (for TCACTGGACATCAACTGCC)	(rev GTCGGCCAAAGTACAGAAA)
m-Nqo1 (for ACAGGTGAGCTGAAGGACTC)	(rev TATCACCAGGTCTGCAGCTT)
m-Cd11b (for GTCAGAGTCTGCTCCGTGT)	(rev CAGGGTCTAAAGCCAGGTCA)
m-Ccl2 (for AAGAGGATCACCAGCAGCAG)	(rev TCTGGACCCATTCTTCTTG)
m-Ccr2 (for ACCACATGTGCTAAGAATTGAAC)	(rev GCCGTGGATGAACTGAGGTA)
<i>hIL-1β</i> (for GTGGCAATGAGGATGACTTG)	(rev GGAGATTCGTAGCTGGATGC)
<i>hTNF-α</i> (for AGCCCATGTTGTAGCAAACC)	(rev TGAGGTACAGGCCCTCTGAT)
<i>hIL-10</i> (for TGCCTCAGCAGAGTGAAGA)	(rev CTCAGACAAGGCTTGGAAC)
<i>hTGF-β</i> (for CGTCTGCTGAGGCTCAAGTT)	(rev AAGATAACCACTCTGGCGAGTC)
<i>hCCL2</i> (for TAGCAGCCACCTTCATTCCC)	(rev CTGCACTGAGATCTTCTATTGG)
<i>hE-SELECTIN</i> (for GCCACGGTGAATGTGTAGAG)	(rev GTGACTGCAAACCAGGCTTC)
<i>hCOL1A1</i> (for CCAAGGCTTCCAAGGTC)	(rev GACCAGGTTTTCCAGCTTCC)
<i>hMMP2</i> (for CAAGGAGAGCTGCAACCTGT)	(rev CGCATGGTCTCGATGGTATT)
<i>hTIMP1</i> (for AGACGGCCTTCTGCAATTC)	(rev TCATAACGCTGGTATAAGGTGGT)

Tabella 3: Sequenze dei primer forward e reverse utilizzati per l'analisi RT-PCR.

3.4.5 Sequenziamento del trascrittoma

L'analisi dei campioni di fegato di topo è stata effettuata utilizzando il sequenziatore Ion S5™ con software Torrent Suite™ v6. L'RNA di alta qualità è stato estratto dal fegato dei topi utilizzando il mini kit PureLink™ RNA, secondo le istruzioni del produttore. La qualità e la quantità di RNA sono state valutate con il kit di analisi Qubit® RNA HS e il fluorometro Qubit 3.0 (Invitrogen) ed è stata eseguita sui campioni un'elettroforesi di verifica su gel di agarosio. Le librerie sono state generate utilizzando il pannello di espressione genica del trascrittoma di topo (Ion AmpliSeq™ Transcriptome Mouse Gene Expression Core Panel) e il kit Chef-Ready. In breve, 10 ng di RNA sono stati retrotrascritti con il kit di sintesi cDNA SuperScript™ Vilo™ prima della preparazione della libreria sullo strumento Ion Chef™. Il cDNA risultante è stato amplificato per preparare librerie con barcode utilizzando la piastra PCR Ion Code™ e il pannello di espressione genica per il trascrittoma di topo Ion AmpliSeq™, kit Chef-Ready, secondo le istruzioni del produttore. Le librerie con codice a barre sono state portate ad una concentrazione finale di 100 pM e utilizzate per preparare particelle Template-Positive Ion Sphere™ da caricare sui chips Ion 540™, utilizzando l'Ion 540™ Kit-Chef. Il sequenziamento è stato eseguito dal sequenziatore Ion S5™ con software Torrent Suite™ v6. Le analisi sono state eseguite con un fold change <-2.0 e> +2.0, utilizzando il software Transcriptome Analysis Console (versione 4.0.1), certificato per l'analisi AmpliSeq (Thermo-Fisher). I dati trascrittomici che supportano i risultati di questo studio sono apertamente disponibili nell'archivio di dati Mendeley (numero di riferimento che collega al repository: "Discovery of dual GPBAR1 agonist and cysteinyl leukotriene receptor (CysLTR) 1 antagonist for treating drug induced liver injury", Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/3xvs65zmhm.1).

3.4.6 Istologia e immunoistochimica

I campioni di fegato sono stati dapprima fissati in formalina tamponata, tagliati in sezioni di 5 µm di spessore e quindi colorate con ematossilina ed eosina (H&E) e/o Sirius Red. L'immunoistochimica è stata eseguita su fegati paraffinati. In breve, lo smascheramento antigenico è stato ottenuto mediante incubazione dei vetrini, contenenti le sezioni, per 90 minuti nel tampone sodio citrato caldo (95° C e pH 6,0) ed il successivo raffreddamento a temperatura ambiente per 30 minuti. Le perossidasi endogene sono state inattivate incubando

i vetrini in metanolo con il 3% di H₂O₂ per 10 minuti. I legami non specifici sono stati bloccati mediante trattamento in PBS con BSA (albumina sierica bovina) all'8% più Triton-X100 allo 0,2%, per 1 ora. Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo Anti-F4/80 (Abcam, Cambridge, UK) overnight a +4° C. Successivamente, le sezioni sono state incubate con Polyperoxidase-anti-Mouse/Rabbit IgG e quindi con DAB Working Solution. I vetrini sono stati controcolorati con ematossilina, disidratati con etanolo e xilene e coperti con un mezzo di montaggio a base di xilene, quindi osservati al microscopio con ingrandimento 40x e 100x.

3.4.7 Immunofluorescenza

La colorazione per immunofluorescenza è stata effettuata sulle linee cellulari LSEC, LX2 e U937. Le cellule sono state piastrate su vetrini usando il cytospin. Sono state dapprima fissate in PFA al 4% per 20 minuti e poi sono state lavate 3 volte con PBS 1X. Successivamente, le cellule sono state incubate con un tampone bloccante (PBS 1X con siero di cavallo al 10% e BSA all'1%) per 1 ora a temperatura ambiente. Gli anticorpi primari anti-TGR5/GPBAR1 (NBP2-23669) (Novus biologicos, Centennial, CO, USA) e anti-CYSLT₁R (PA5-97651), (Invitrogen, Thermofisher scientific Waltham, Massachusetts, USA), a una diluizione di 1 :100, sono stati incubati durante la notte a 4°. Il giorno successivo, dopo 3 lavaggi con PBS 1X contenente lo 0,1 % Tween 20 (PBST), le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488) (ab150077) per TGR5/GPBAR1 e con Goat anti -Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, (Alexa Fluor™ 568) (Invitrogen, Thermofisher scientific Waltham, Massachusetts, USA) per CYSLT₁R, a una diluizione di 1:200 per 1 ora a temperatura ambiente al buio. Dopo 3 lavaggi con PBS 1X contenente lo 0,1% di Tween 20 (PBST), il nucleo è stato controcolorato con DAPI 1X per 1 minuto al buio e la reazione è stata fermata con un lavaggio finale in PBS 1X per 5 minuti. Quindi i vetrini sono stati montati con ProLong Glass Antifade Mountant (P36980) (Invitrogen, Thermofisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA), sigillati con smalto e osservati al microscopio a fluorescenza con ingrandimento 40x e 100x.

3.4.8 Purificazione di cellule murine primarie

Abbiamo purificato le cellule sinusoidali epatiche (LSEC) e le cellule di Kupffer (KC) dal fegato totale dei topi C57BL/6 non trattati. Per la purificazione abbiamo prima separato gli epatociti dal resto delle cellule epatiche, attraverso una centrifugata a bassa velocità (50 g), e successivamente abbiamo purificato le LSEC con una selezione positiva con anticorpo anti-CD146 (Miltenyi Biotec). Le KC sono state separate dalla sospensione delle cellule intatte mediante protocollo di adesione. La purezza delle cellule ottenute è stata verificata mediante analisi IC-FACS, utilizzando una configurazione standard a 3 laser ATTUNE NxT (Life Technologies), con anticorpi anti-CD45 e anti-CD31 per le LSEC (CD45 negative CD31 positive) e con anticorpi anti-TIM4 per le KC (TIM4 positive). I monociti circolanti di topo sono stati purificati dal sangue periferico dei topi non trattati, trattati con APAP 500 mg/kg e trattati con APAP 500 mg/kg + CHIN117 30 mg/kg. Il sangue è stato raccolto in provette con anticoagulante (EDTA), diluito 1: 1 con PBS e stratificato su un volume uguale di Histopaque (Sigma-Aldrich). I campioni sono stati centrifugati a 400 g, 20 °C, senza freno per 30 min. Abbiamo rimosso la parte superiore del plasma e recuperato l'anello formato all'interfaccia contenente i globuli bianchi (WBC). I monociti sono stati quindi isolati mediante protocollo di adesione.

3.4.9 Determinazione di GSH, SOD e NAPQI epatici.

I tessuti epatici congelati sono stati scongelati e risciacquati con PBS. I tessuti sono stati quindi omogeneizzati in tampone MES freddo per la determinazione del GSH, in soluzione salina per la determinazione del NAPQI e in PBS freddo per la determinazione della SOD contenente inibitori della proteasi per la determinazione di MDA. L'omogenato è stato centrifugato a 1600 g, a 4°C per 10 minuti e i surnatanti sono stati analizzati per i livelli di GSH, superossido dismutasi (SOD) e N-acetil-1,4-benzochinone immina (NAPQI) utilizzando i kit di analisi disponibili in commercio secondo le istruzioni del produttore (kit Cayman Chemical Glutathione Assay n. 703002, kit test Superossido Dismutasi n. 706002, kit Mybiosource Mouse N-acetil-1,4-benzochinone immina ELISA n. MBS3807124).

3.4.10 Citometria a flusso

Le analisi di citometria a flusso sono state eseguite utilizzando una configurazione standard a 3 laser ATTUNE NxT (Life Technologies). I dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo (TreeStar) e i gates sono stati impostati utilizzando una strategia di controllo Fluorescence Minus One (FMO). I controlli FMO sono campioni che includono tutti gli anticorpi coniugati presenti nei campioni del test tranne uno. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAbs): anti-CD4 SB 436 (Clone GK1.5; Ref. 62-0041-82 Invitrogen); anti-CD8 SB 702 (Clone 53-6.7; Ref. 67-0081-82 Invitrogen); anti-FoxP3 APC (Clone FJK-16S; Ref. 17-5773-82 eBioscience); anti-IL-10 Alexa Fluor 700 (Clone JES5-16E3; Ref. 56-7101-82 eBioscience); anti-CD3 PerCP-Cyanine 5.5 (Clone 145-2C11; Ref. 45-0031-82 Invitrogen); anti-CD49b (DX5) APC-eFluor780 (Clone DX5; Ref. 47-5971-82 Invotrogen); anti-CD11b Alexa Fluor 488 (Clone M1/70; Ref. 53-0112-82 Invirogen); anti-CD11c PE-Cyanine 7 (Clone N418; Ref. 25-0114-82 eBioscience); anti-CD206 APC (Clone MR6F3; Ref. 17-2061-82 Invitrogen) e anti-IL-6 PE (Clone MP5-20F3; Ref. 12-7061-82 eBioscience).

3.4.11 Analisi statistica

È stato utilizzato il test ANOVA seguito dal test U non-parametrico di Mann-Whitney o un test t di Student a due code non appaiate per confronti statistici (*p <0.05) utilizzando il software Prism 6.0 (GraphPad).

3.5 RISULTATI

3.5.1 Modulazione dell'espressione genica nel fegato di pazienti con insufficienza epatica acuta indotta da APAP

In primo luogo, abbiamo analizzato l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi dei leucotrieni, i loro recettori e l'espressione di GPBAR1 in biopsie epatiche di pazienti sottoposti a trapianto di fegato in seguito ad insufficienza epatica acuta indotta da APAP (APAP-ALF), sfruttando il repository GSM3407031 che include dati di espressione genica di pazienti sani e pazienti con APAP-ALF. Dalle analisi ottenute abbiamo osservato che l'espressione del CYSLT₁R, della 5-lipossigenasi (ALOX5) e della proteina attivante la 5-lipossigenasi (ALOX5AP) era aumentata nei pazienti intossicati da APAP rispetto al gruppo di pazienti sani, senza tuttavia raggiungere la significatività statistica (**Figura 22A**). Al contrario l'espressione di GPBAR1 non è risultata modulata (**Figura 22B**). Inoltre, nei pazienti intossicati da APAP abbiamo osservato un aumento dell'espressione di citochine e chemochine proinfiammatorie come IL-6 e CXCL8 (**Figura 22D, E**) e l'up-regolazione di BAX (**Figura 22F**), un regolatore dell'apoptosi che indica un aumento del tasso di morte cellulare degli epatociti per spiegare la ridotta capacità disintossicante del fegato, come mostrato anche dalla ridotta espressione dell'mRNA del CYP2E1 (**Figura 22C**).

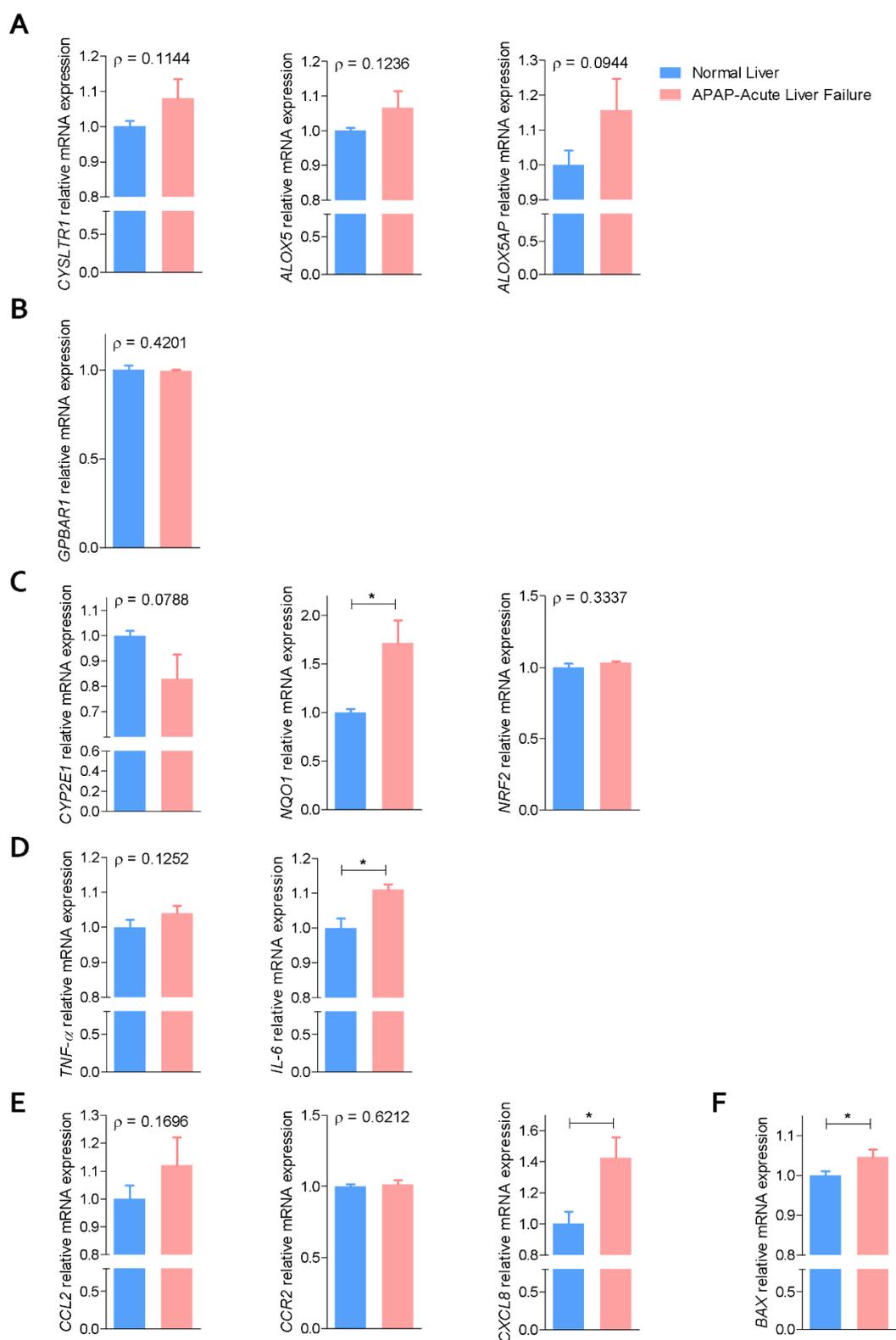
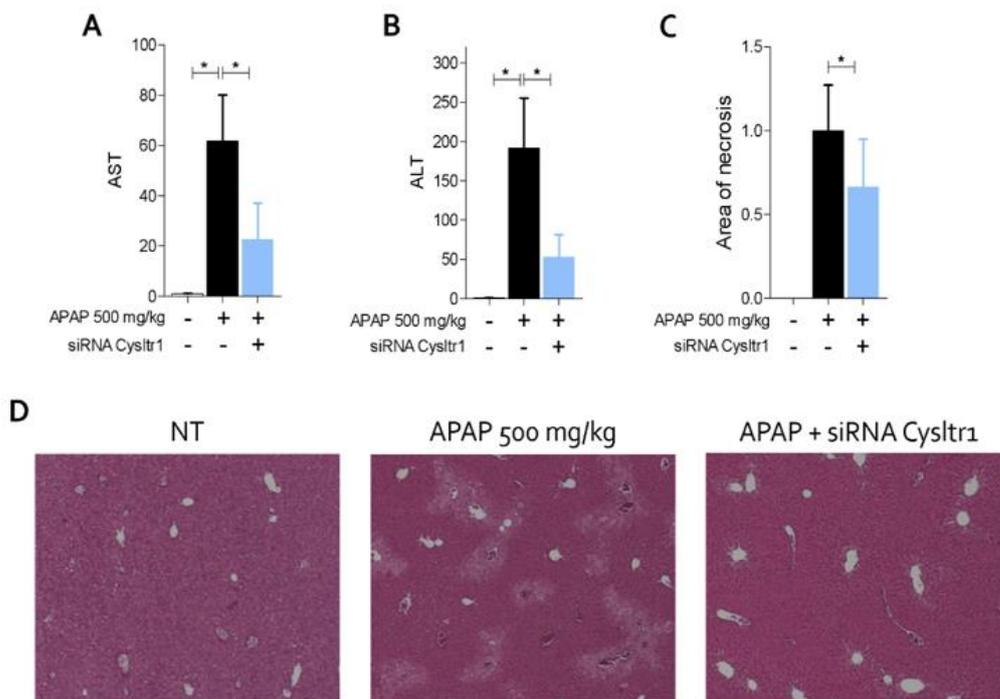


Figura 22: Analisi RNA-seq dal repository GSM3407031 su biopsie epatiche di pazienti sottoposti a trapianto di fegato in seguito ad insufficienza epatica indotta da APAP. Espressione del profilo genico di (A) CYSLT₁R, ALOX5, ALOOX5AP (B) GPBAR1 (C) CYP2E1, NQO1, NRF2 (D) TNF- α , IL-6 (E) CCL2, CCR2, CXCL8 (F) BAX. * $p < 0,05$

A questo punto, per chiarire la funzione del CYSLT₁R e di GPBAR1 nello sviluppo di insufficienza epatica acuta indotta da APAP, abbiamo indotto un'epatite acuta in topi maschi C57BL/6J non trattati o pretrattati con un Cyslt₁r gene small interfering RNA (siRNA) mediante iniezione endovenosa, e parallelamente un'epatite acuta in topi maschi Gpbar1^{-/-} e i loro congenici Gpbar1^{+/+} attraverso la somministrazione orale (os) di APAP alla dose di 500 mg/kg. Come mostrato dalle analisi dei principali marker biochimici di danno epatico e cioè AST e ALT (**Figura 23A,B**) e dalle aree di necrosi calcolate su sezioni di fegati colorate con H&E (**Figura 23C,D**), il silenziamento del Cyslt₁r ha determinato un'attenuazione della gravità del danno epatico causato da APAP (**Figura 23-D**) e, d'altra parte, nei topi GPBAR1^{-/-} la gravità del danno epatico è stata esacerbata dalla somministrazione di APAP (**Figura 23E-H**). Questi dati confermano che l'ablazione del CYSLT₁R in un modello murino protegge dal danno epatico, mentre l'ablazione di GPBAR1 esacerba la severità del danno [9].



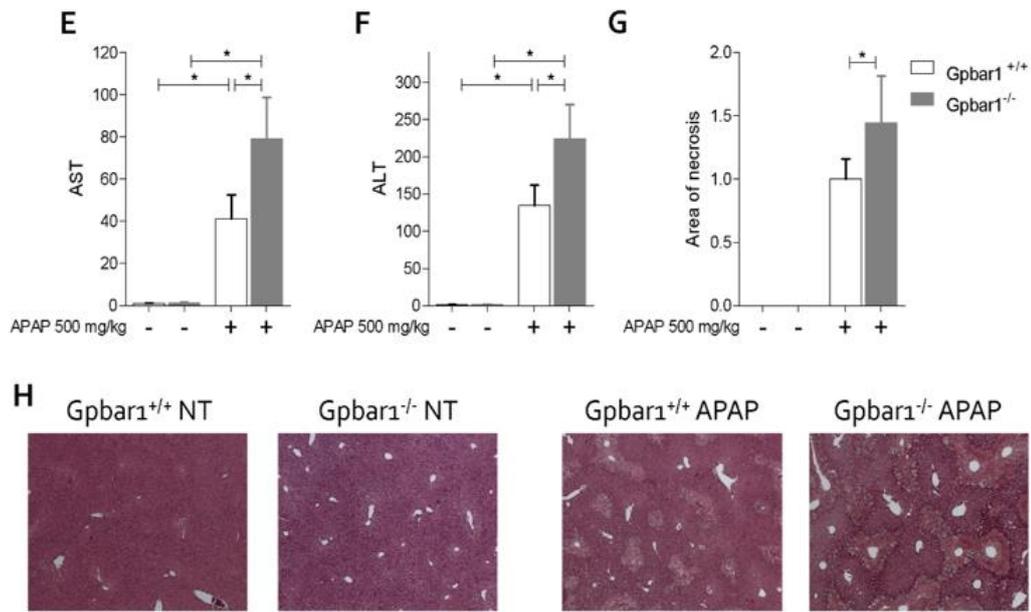


Figura 23: Il silenziamento del Cyslt_{1r} protegge dal danno epatico mentre l'ablazione di GPBAR1 esacerba la severità del danno. L'epatite acuta è stata indotta in topi maschi C57BL/6J non trattati o pretrattati con un Cyslt_{1r} gene small interfering RNA (siRNA) e in topi maschi Gpbar1^{-/-} e Gpbar1^{+/+} attraverso la somministrazione orale (os) di APAP alla dose di 500 mg/kg. Livelli plasmatici di (A) AST e (B) ALT e (C,D) valutazione dell'area di necrosi nei topi wild-type e nei topi trattati con il siRNA del Cyslt_{1r} nelle sezioni epatiche colorate con H&E. Livelli plasmatici di (E) AST e (F) ALT e (G,H) valutazione dell'area di necrosi nei topi Gpbar1^{+/+} e Gpbar1^{-/-} nelle sezioni epatiche colorate con ematossilina ed eosina (H&E). I risultati sono la media ± SEM di 6-10 topi per gruppo; * p < 0,05.

3.5.2 Valutazione dell'efficacia del CHIN117 *in vitro*

Poiché i dati precedenti avevano suggerito che il CYSLT_{1R} e GPBAR1 potevano essere sfruttati come bersagli terapeutici per il trattamento dell'insufficienza epatica acuta indotta da APAP, abbiamo deciso di valutare dapprima l'efficacia *in vitro* del nostro composto duale di neo-sintesi, CHIN117, agonista del recettore Gpbar1 e antagonista del recettore Cyslt_{1r}. A tale scopo abbiamo stimolato le U937, una linea di monociti umani che esprime entrambi i recettori, con TNF-α (100 ng/ml) + LTD₄ (100 nM) da soli o in combinazione con il nostro composto a concentrazioni crescenti. Come si può osservare dalla **Figura 24**, il CHIN117 *in vitro* ha antagonizzato l'attivazione dei monociti indotta da TNF-α + LTD₄ (**Figura 24C, D, F**) e ha aumentato l'espressione genica dell'mRNA di IL-10, una citochina anti-infiammatoria, in modo dose-dipendente (**Figura 24E**).

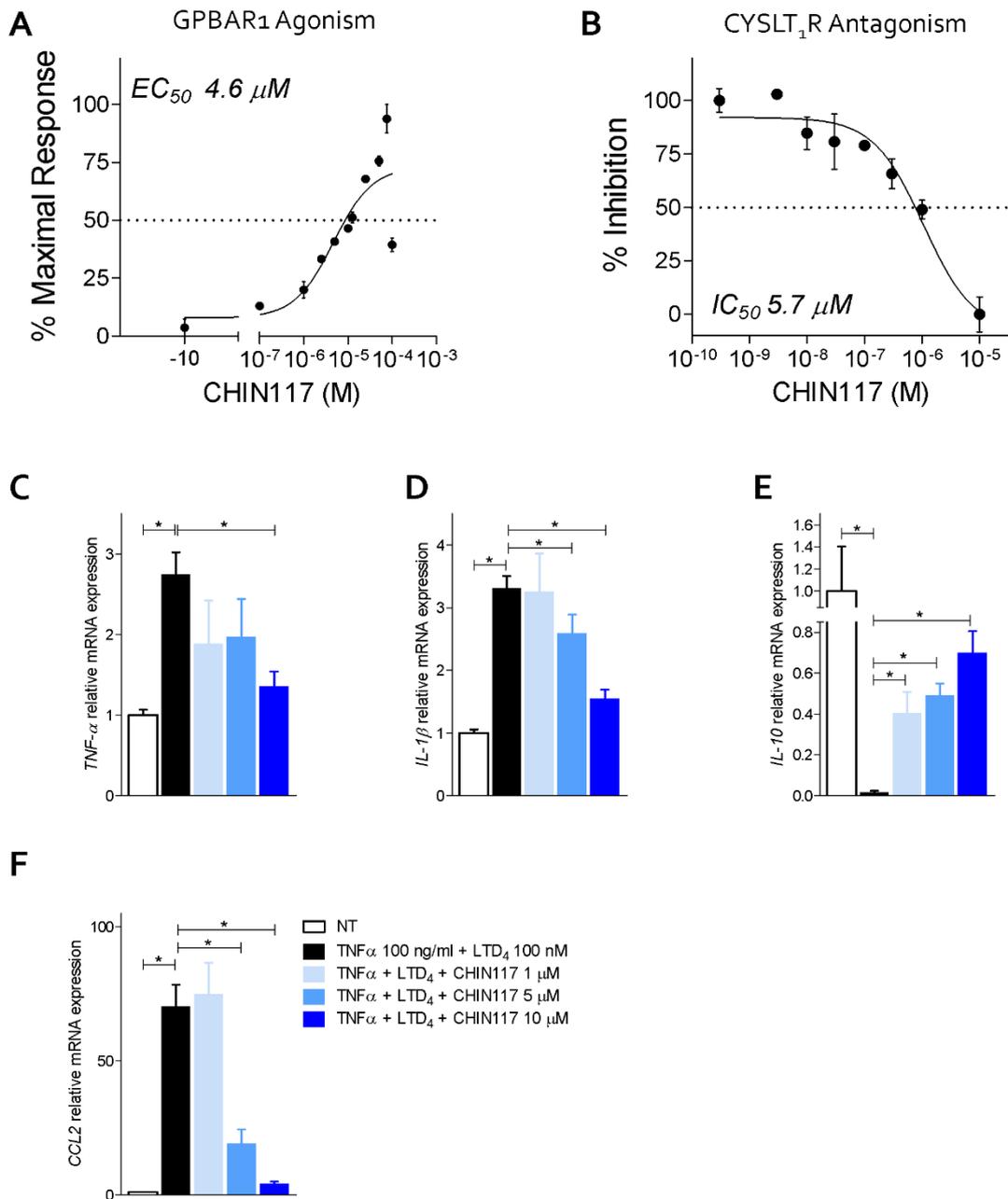


Figura 24: CHIN117 riduce l'attivazione dei monociti *in vitro* esercitando il suo effetto attraverso l'attività duale su GPBAR₁ e CYSLT₁R. (A) curva dose-risposta del CHIN117 in agonismo su GPBAR₁ e (B) curva dose-risposta del CHIN117 in antagonismo sul CYSLT₁R. Le U937 sono state stimulate con TNF-α (100 ng/ml) + LTD₄ (100 nM) da soli o in combinazione con il CHIN117 a 1, 5 e 10 μM. Espressione relativa dell'mRNA delle citochine proinfiammatorie (C) TNF-α (D) IL-1β; della citochina anti-infiammatoria (E) IL-10 e della chemochina (F) CCL2. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. *p < 0.05.

3.5.3 Valutazione dell'efficacia del CHIN117 *in vivo*

Visto i precedenti dati *in vivo* sui singoli recettori (**Figura 23**) e considerati gli effetti benefici del nostro ligando duale CHIN117 ottenuti *in vitro* su monociti attivati (**Figura 24**), per valutare se la modulazione simultanea dei due recettori potesse proteggere dallo sviluppo di insufficienza epatica indotta da APAP, abbiamo deciso di testare il ruolo del CHIN117 in un modello murino di epatite acuta indotta da paracetamolo, mettendolo a confronto con il Montelukast, antagonista di riferimento del Cyslt1R, e con il BAR501, agonista selettivo di GPBAR1 (**Figura 25**). L'efficacia dei due composti ad azione singola, BAR501 e Montelukast, in questo modello murino è stata già dimostrata da noi e da altri gruppi di ricerca [14,18]. L'epatite è stata indotta in topi maschi C57BL/6 mediante la somministrazione orale di APAP (500 mg/kg) e 45 minuti dopo l'induzione della malattia sono state somministrate le diverse molecole. I composti sono stati testati a tre diverse concentrazioni (5, 15 e 30 mg/kg) così da poter confrontare anche l'effetto dose-risposta.

I valori di AST e ALT (**Figura 25B,C**) mostrano che tutti e tre i composti sono in grado di alleviare il danno epatico indotto da APAP quando somministrati alla concentrazione di 30 mg/kg, tuttavia soltanto il composto duale CHIN117 riduce in maniera statistica i valori di AST e ALT anche a dosi più basse (5 e 15 mg/kg) con una riduzione dei valori delle transaminasi di circa 5 volte già alla dose di 5 mg/kg, rispetto ai dati osservati per i topi trattati con solo APAP (**Figura 25B,C**).

Inoltre, l'analisi macroscopica e microscopica del fegato evidenzia che anche alla dose più elevata il CHIN117 esercita una maggiore azione protettiva sul fegato rispetto al BAR501 e Montelukast (**Figura 25D,J,K**). Le ulteriori analisi delle concentrazioni di GSH, SOD e del NAPQI a livello epatico 24 ore dopo la somministrazione di APAP confermano che tutti e tre i composti esercitano un'attività protettiva, tuttavia il CHIN117 sembra essere il più efficace garantendo quindi una maggiore capacità detossificante del fegato (**Figura 25F,G,H**). Inoltre, poiché la coniugazione rappresenta la principale via di detossificazione da APAP, abbiamo misurato il rapporto tra APAP coniugato (CoAPAP) e APAP non coniugato (UnCoAPAP) e abbiamo osservato che il CHIN117 ha migliorato il rapporto di CoAPAP/UnCoAPAP (**Figura 25I**), indicando il mantenimento della capacità disintossicante del fegato.

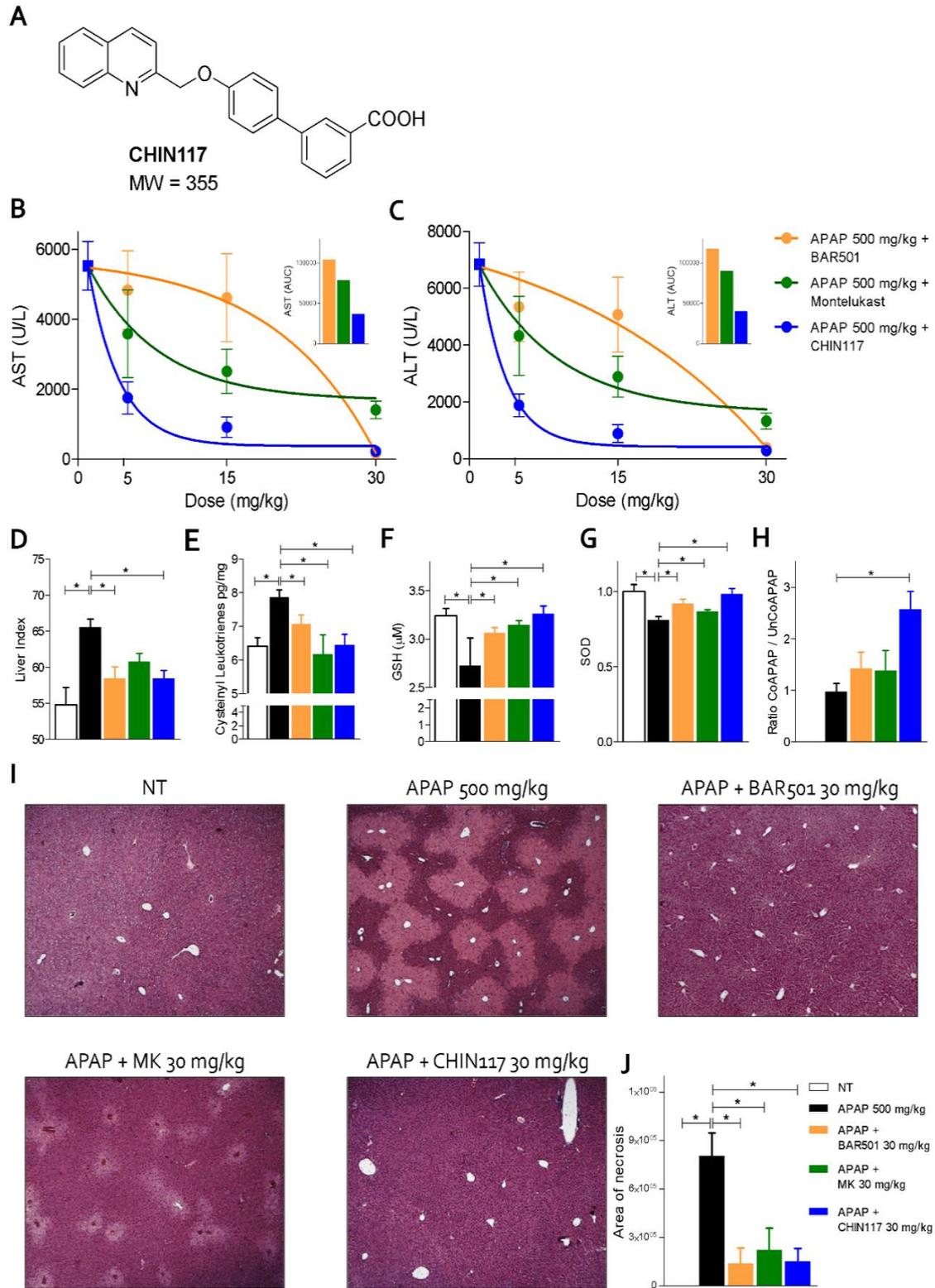


Figura 25: Il danno epatico è stato indotto in topi maschi C57BL/6 attraverso la somministrazione orale di APAP (500 mg/kg) da solo o in combinazione con BAR501, Montelukast e CHIN117 alle concentrazioni di 5, 15 o 30 mg/Kg, 45 minuti dopo la somministrazione dell'APAP. **(A)** Struttura chimica del nuovo composto CHIN117. Andamento dei livelli plasmatici di **(B)** AST(U/L) e **(C)** ALT (U/L) di ciascun gruppo

sperimentale. (D) Indice epatico o liver index (ottenuto dal rapporto tra il peso del fegato (g) ed il peso corporeo (g) x 1000). Livelli epatici di (E) cisteinil leucotrieni, (F) GSH, (G) SOD e (H) rapporto tra CoAPAP e UnCoAPAP nel sangue 24 ore dopo l'induzione dell'epatite. (I) Colorazione ematossilina ed eosina (H&E) sui tessuti epatici dei topi (ingrandimento, 4x) con (J) valutazione dell'area di necrosi in unità arbitrarie. I risultati sono la media \pm SEM di 8-12 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

Inoltre, abbiamo osservato che, in accordo con i dati umani, il trattamento dei topi con il paracetamolo ha indotto uno stato infiammatorio e ridotto l'espressione degli enzimi di detossificazione epatica (Figura 26). In particolare, sebbene l'analisi dell'espressione epatica del gene Bax, marker di apoptosi, mostri che tutti e tre i composti riducono l'espressione di quest'ultimo (Figura 26B), l'analisi dell'espressione dei geni pro-infiammatori come Il-6 e Ccl2 mostra che il CHIN117 esercita un effetto antinfiammatorio più importante rispetto al BAR501 e Montelukast (Figura 26A).

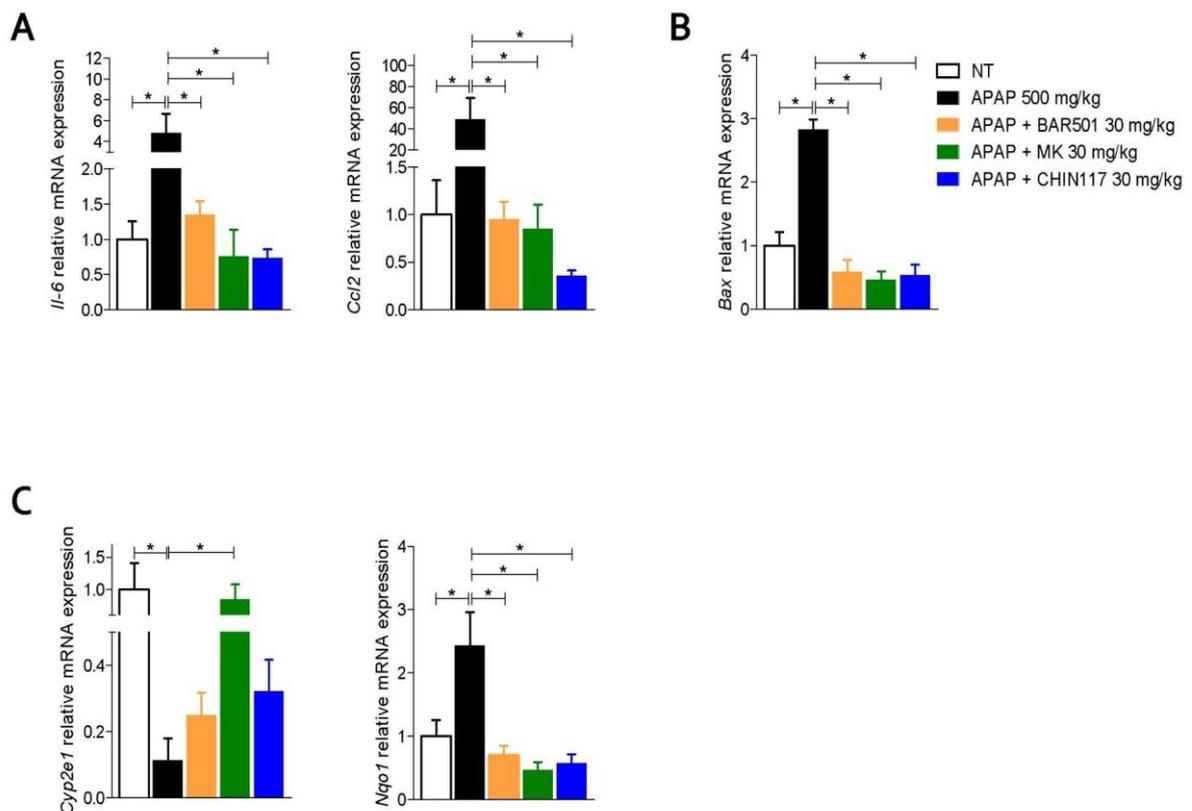


Figura 26: Espressione relativa dell'mRNA (A) del gene proinfiammatorio Il-6 e del gene per la chemochina Ccl2 nel fegato totale (B) del gene pro-apoptotico Bax e (C) enzimi di detossificazione epatici Cyp2a1 e Nqo1. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. * $p < 0.05$. I risultati sono la media \pm SEM di 8-12 topi per gruppo. * $p \leq 0.05$.

Per approfondire gli effetti esercitati dal CHIN117, l'RNA totale estratto dai fegati di ciascun gruppo di topi è stato sottoposto ad analisi di RNAseq che ha permesso di sequenziare e analizzare l'intero trascrittoma. Come si può osservare dalla **Figura 27** il trattamento dei topi con l'APAP, ha modulato in totale 5181 geni rispetto al gruppo dei non trattati, mentre il BAR501, il Montelukast e il CHIN117 hanno modulato rispettivamente 1239, 3281 e 4893 geni. Il CHIN117 ha modulato in maniera evidente il maggior numero di geni rispetto al gruppo trattato con solo APAP.

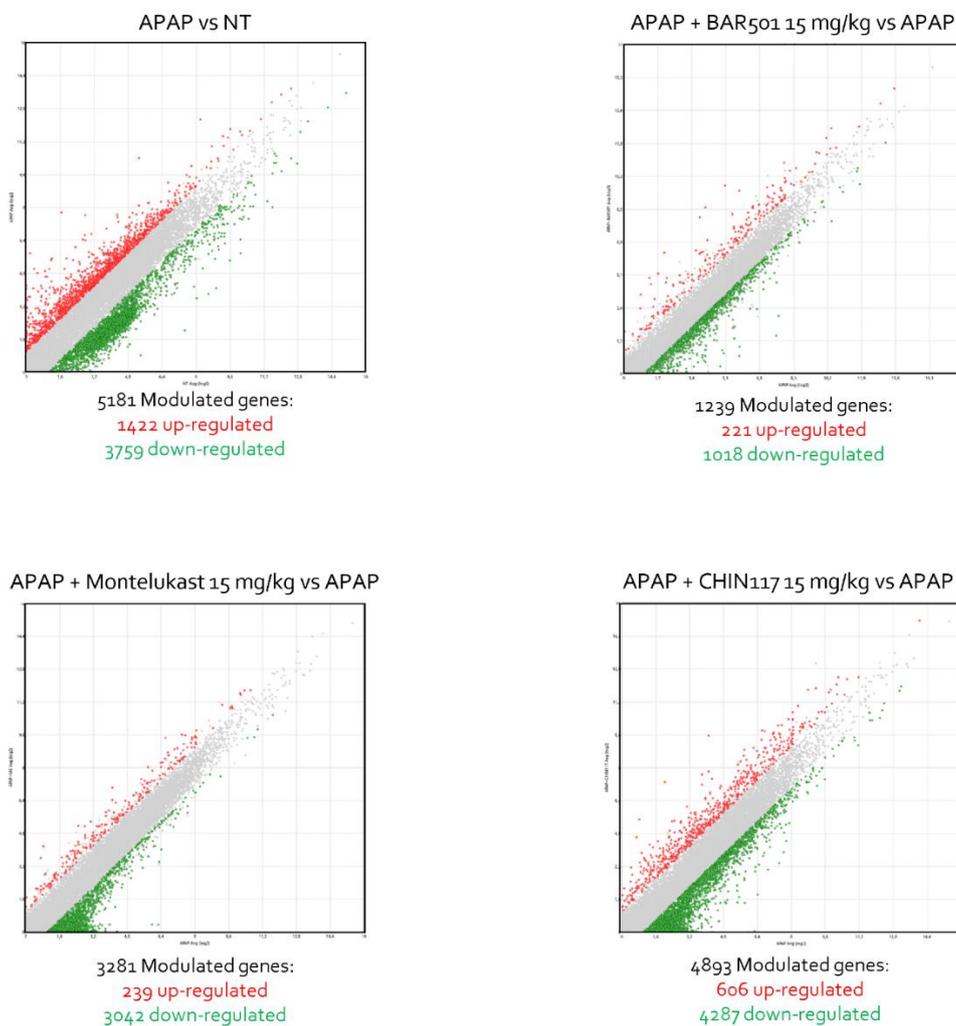
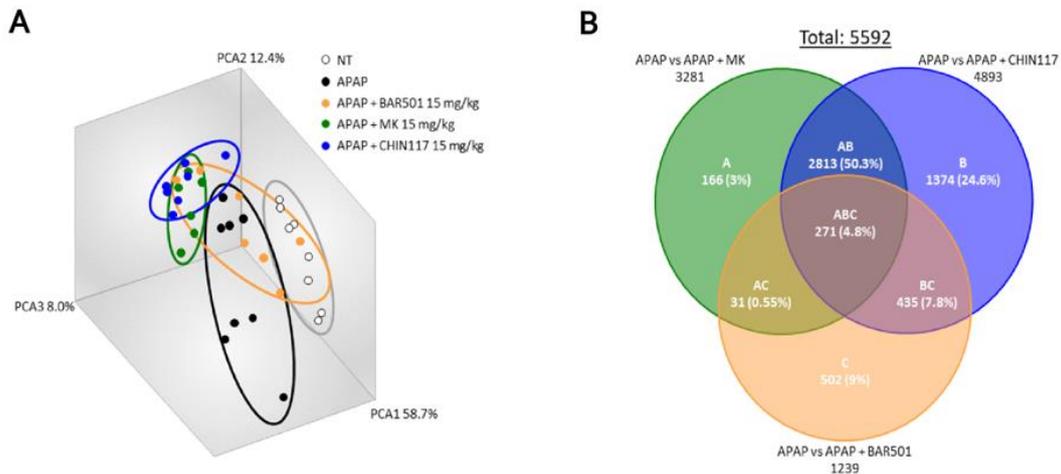


Figura 27: Scatter plot dei trascritti differenzialmente espressi tra i diversi gruppi sperimentali. Il rosso rappresenta i geni upregolati statisticamente; il verde i geni downregolati statisticamente (fold change <-2 o >2 , $*p < 0,05$).

In particolare, come mostrato dall'analisi del diagramma di Venn in cui viene rappresentata l'espressione differenziale dei vari geni e che mostra le regioni sovrapposte (identificate come insiemi ABC, AC, AB e BC) tra i tre gruppi di geni di confronto (fold change <-2 o >2 , p value $<0,05$), gli effetti del nostro composto erano sbilanciati verso il Montelukast piuttosto che verso il BAR501 (**Figura 28B**). Infatti, il CHIN117 e il Montelukast condividevano circa il 63% di geni modulati (intersezione ABC + AB; **Figura 28B**). D'altra parte, prendendo in considerazione i 4893 trascritti modulati dal trattamento con CHIN117, solo il 14,4% è stato modulato anche dal BAR501 (intersezione ABC + BC; **Figura 28B**).

L'analisi dettagliata delle pathway (**Figura 28C-I**) ha poi dimostrato che tra i geni maggiormente up-regolati o down-regolati dall'APAP (20 geni totali), vi erano quelli appartenenti al signaling delle chemochine, all'infiammazione, al signaling dell'IL-6 e dello stress ossidativo, al signaling del recettore del TGF- β , del TNF- α e Kf-kb e alla pathway dell'adesione integrino-mediata (**Figura 28C-I**). Circa il 70% di questi geni è risultato modulato dai trattamenti con i farmaci in maniera opposta all'APAP da solo ma l'effetto maggiore è stato sortito dal CHIN117 che ha modulato negativamente 14 geni (**Figura 28C-I**).



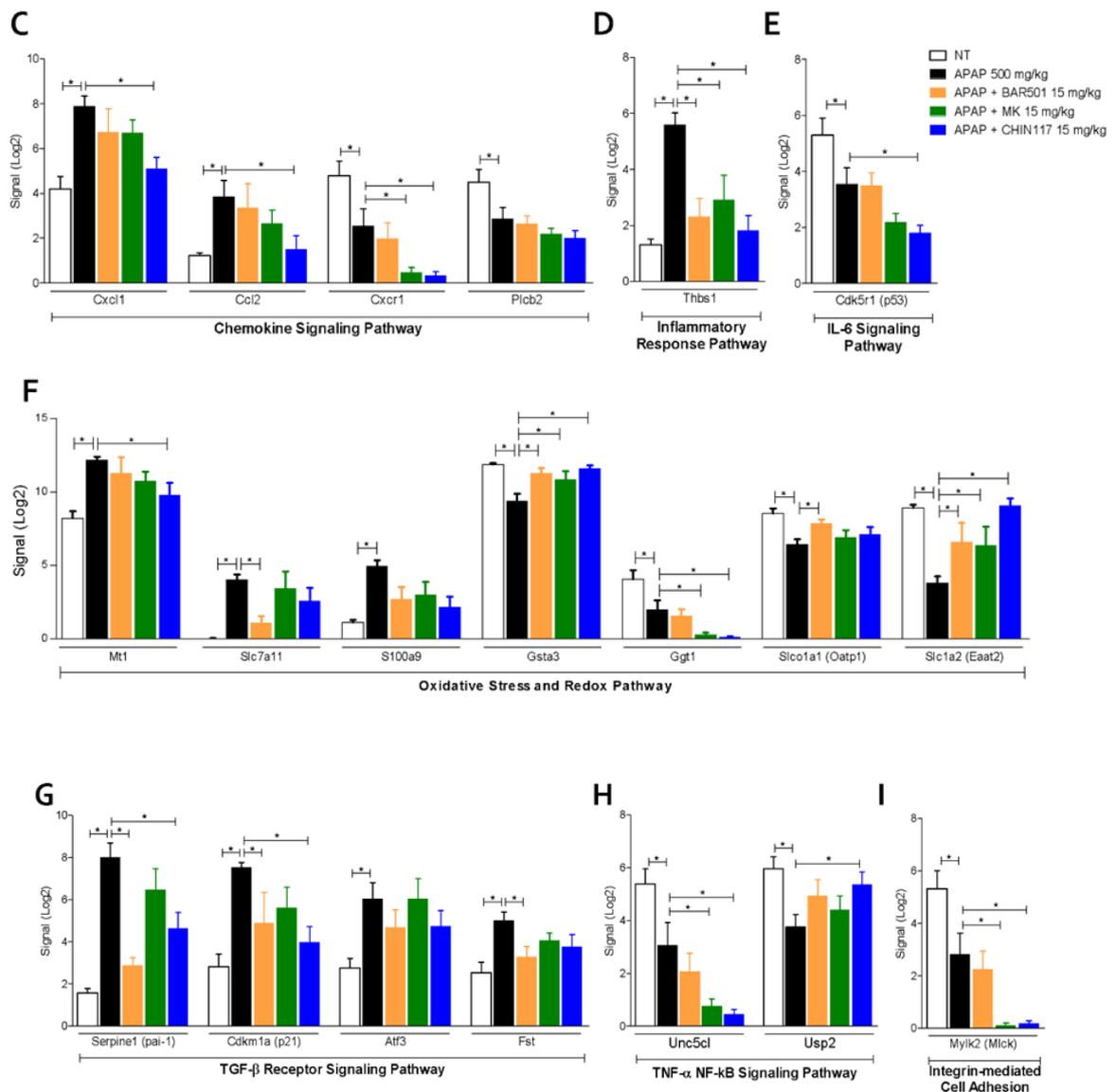
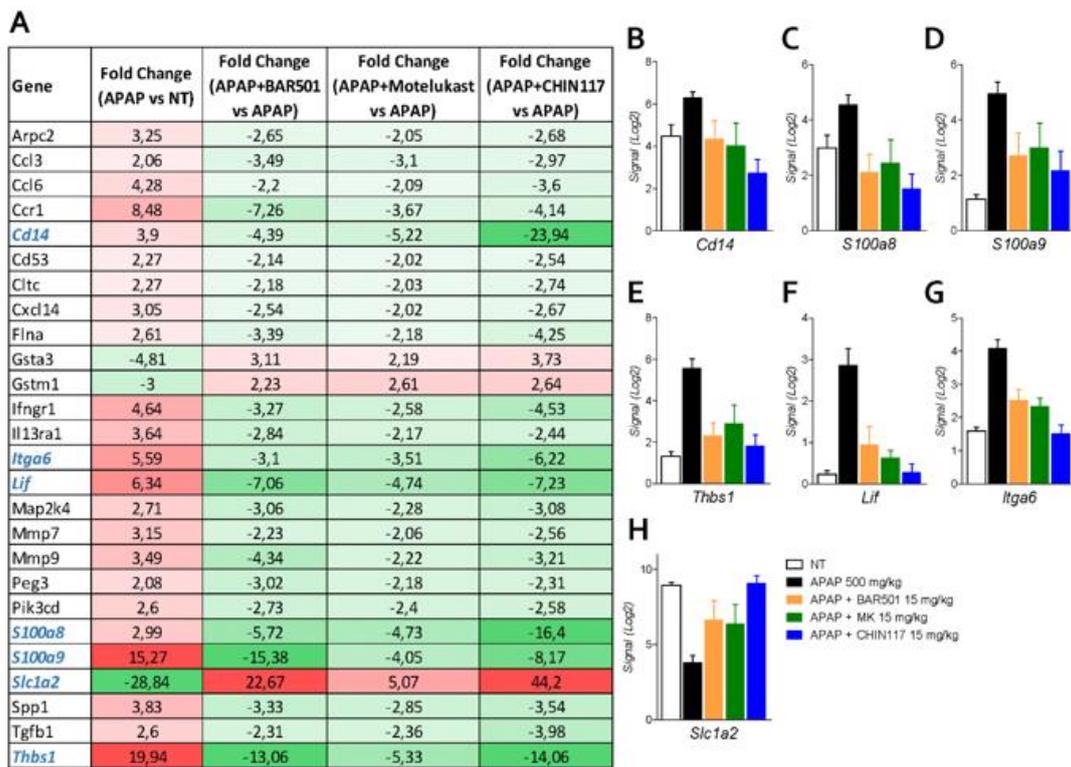


Figura 28: Analisi degli effetti di BAR501, Montelukast e CHIN117 sull'epatite indotta da APAP mediante RNAseq. L'epatite è stata indotta nei topi C57BL/6 attraverso la somministrazione orale (os) di APAP a 500 mg/kg da solo o in combinazione con BAR501 (15 mg/kg), Montelukast (15 mg/kg) e CHIN117 (15 mg/kg) 45 min dopo la somministrazione di APAP. (A) Caratterizzazione dell'eterogeneità dei tre gruppi sperimentali mostrati dall'analisi delle componenti principali (PCA) (B) Diagramma di Venn dei geni espressi in modo differenziale che mostra le regioni sovrapposte (identificate come insiemi ABC, AC, AB e BC) tra i tre gruppi di geni di confronto (fold change <-2 o >2 , p value $<0,05$). Espressione relativa dell'mRNA dei 10 geni più up- e downregolati dall'APAP, estrapolati dall'analisi RNAseq, appartenenti a (C) signaling di chemochine, (D) risposta infiammatoria, (E) signaling di IL-6, (F) stress ossidativo (G) TGF- β , (H) signaling del TNF α e NF- κ B e (I) vie dell'adesione integrino-mediata. I risultati sono la media \pm SEM di 5-7 topi per gruppo; * $p <0,05$.

Mediante un'ulteriore analisi del diagramma di Venn mostrato nella **Figura 28B**, abbiamo selezionato l'intersezione tra i tre insiemi (ABC), mostrando che 271 geni sono stati modulati da tutti e tre i trattamenti. Di questi geni, 26 fanno parte delle vie infiammatorie (**Figura 29A**) e sono stati regolati ugualmente dai tre trattamenti e in modo opposto rispetto all'APAP. Ventitré geni sono stati down-regolati da tutti e tre i farmaci, mentre solo tre sono stati up-regolati (**Figura 29A**). BAR501, montelukast e CHIN117 hanno esercitato un effetto sostanzialmente simile sull'espressione di questi geni (**Figura 29A**), ad eccezione dei geni indicati in **Figura 29B-H**. In sintesi, dei 5181 geni modulati dall'APAP, 3677 sono stati modulati anche dal CHIN117 (sezione AB del diagramma di Venn; **Figura 29I**). L'analisi delle pathway infiammatorie ha chiaramente dimostrato che il CHIN117 ha revertito l'effetto infiammatorio esercitato dall'APAP (**Figura 29J**).



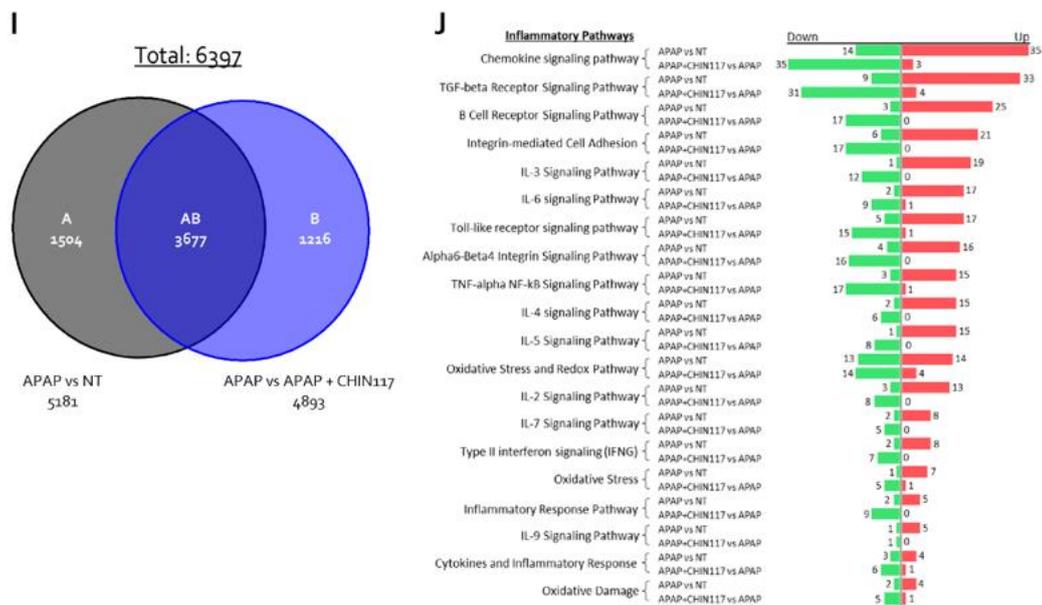


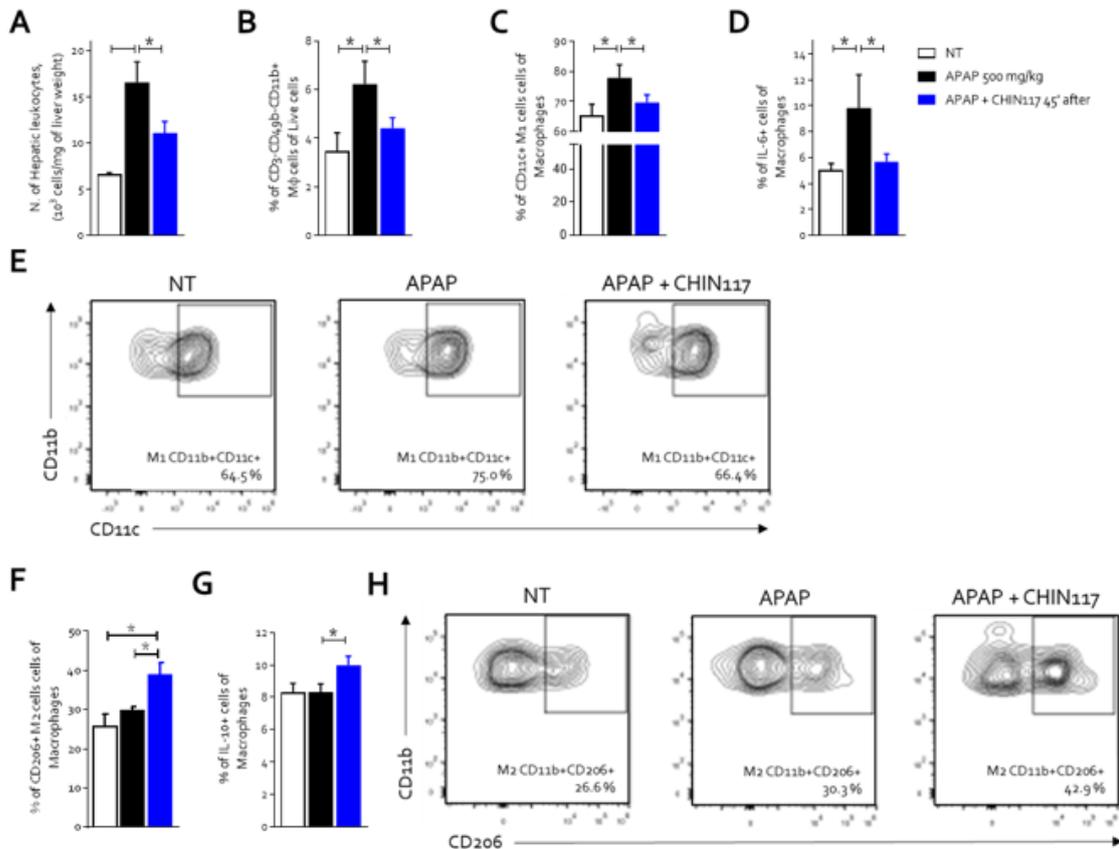
Figura 29: Analisi degli effetti di BAR501, montelukast e CHIN117 sull'epatite indotta da APAP mediante RNAseq. **(A)** Tabella che mostra il fold change dei trascritti modulati da BAR501, montelukast e CHIN117 rispetto all'APAP; livelli di espressione dei geni più up- e downregolati dai diversi trattamenti, estratti dalla tabella: **(B)** CD14, **(C)** S100a8, **(D)** S100a9, **(E)** Thbs1, **(F)** Lif, **(G)** Itga6 e **(H)** Slc1a2. **(I)** Diagramma di Venn dei geni espressi in modo differenziato che mostra la regione sovrapposta AB tra APAP rispetto al gruppo NT e APAP+CHIN117 rispetto al gruppo APAP (fold change <-2 o >2 , $*p < 0.05$) e **(J)** analisi delle vie infiammatorie sul sottoinsieme di geni inclusi nella regione AB del corrispondente diagramma di Venn.

3.5.4 Il CHIN117 reverte l'infiammazione indotta dall'APAP

Per analizzare ulteriormente i meccanismi che supportano l'attività antinfiammatoria del CHIN117, abbiamo studiato l'impatto del ligando duale sulle cellule immunitarie del fegato mediante analisi di citometria a flusso (IC-FACS) (**Figura 30**). Mentre il trattamento con APAP ha provocato un robusto afflusso di cellule infiammatorie nella microcircolazione epatica, questo andamento è stato revertito dal CHIN117, così come è stata revertita l'upregolazione di citochine e chemochine esercitata da questo ligando (**Figura 30A**). L'analisi della citometria a flusso dei leucociti isolati dal fegato ha dimostrato che il danno epatico causato dall'APAP era associato a un robusto afflusso nel fegato di macrofagi attivati (CD3 negativi CD49 negativi CD11b positivi; **Figura 30B**) e questo risultato è stato confermato anche dall'analisi immunohistochimica dell'espressione epatica di F4/80, il principale marker macrofagico murino (**Figura 30I**). La somministrazione del CHIN117, invece, ha contrastato la polarizzazione dei

macrofagi verso un fenotipo proinfiammatorio, causando una riduzione della percentuale di macrofagi M1 (CD3 negativi CD49 negativi CD11b positivi e CD11c positivi) accompagnata da una riduzione di macrofagi IL-6 positivi (**Figura 30C-E**), mentre sono aumentati i macrofagi M2 antinfiammatori (CD3 negativi CD49 negativi CD11b positivi e CD206 positivi) e la percentuale di macrofagi IL-10 positivi (**Figura 30F-H**).

Considerando che il tempo medio di arrivo in ospedale a seguito di un sovradosaggio volontario da APAP è inferiore a 6 ore nella maggior parte dei casi [84], in un altro set sperimentale, abbiamo somministrato il CHIN117 a 6 ore dopo l'induzione dell'epatite acuta da APAP. (**Figura 30J- L**). I dati hanno dimostrato che, anche in questo lasso di tempo, CHIN117 era in grado di ridurre in modo molto efficace il danno epatico (**Figura 30J- L**). Questi dati sottolineano l'elevata rilevanza traslazionale del trattamento con il CHIN117 nel trattamento di pazienti con intossicazione acuta da APAP.



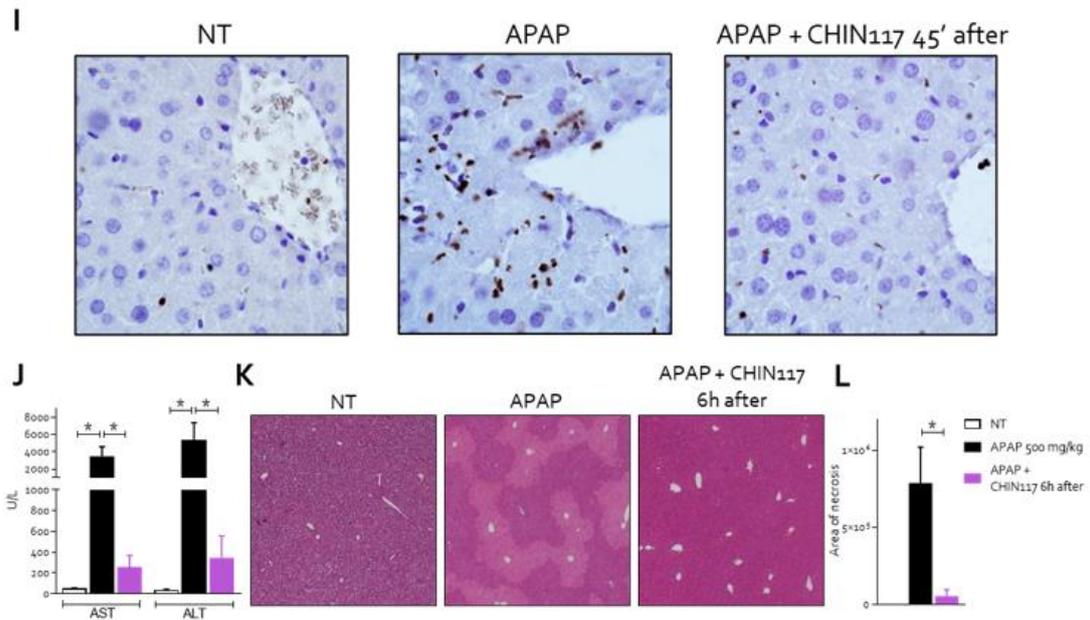


Figura 30: Il CHIN117 riduce la percentuale di macrofagi M1 e aumenta la frazione di macrofagi antinfiammatori M2. Il danno acuto al fegato è stato indotto nei topi Gpbar1^{+/+} dalla somministrazione di 500 mg/kg di APAP per via orale (os) e il CHIN117 è stato somministrato alla dose di 30 mg/kg per via os 45 minuti dopo l'induzione dell'epatite. I tessuti epatici sono stati utilizzati per eseguire una caratterizzazione dettagliata delle cellule infiltranti il fegato mediante analisi IC-FACS. I dati mostrano (A) il numero di cellule leucocitarie epatiche totali e (B) la percentuale della sottopopolazione di macrofagi (CD3 negativi CD49 negativi e CD11b positivi). (C-E) Caratterizzazione dei macrofagi proinfiammatori: (C) percentuale di M1 CD11c positivi e (D) macrofagi IL-6 positivi sui macrofagi epatici totali e (E) analisi di citometria a flusso dell'espressione di CD11c e CD11b in cellule macrofagiche reclutate nel fegato per ciascun gruppo sperimentale. (F-H) Caratterizzazione dei macrofagi proinfiammatori: (F) percentuale di macrofagi M2 CD206 positivi e (G) macrofagi IL-10 positivi dei macrofagi epatici totali e (H) analisi della citometria a flusso dell'espressione di CD206 e CD11b nelle cellule macrofagiche reclutate nel fegato per ogni gruppo sperimentale. I risultati sono la media \pm SEM di 8-12 topi per gruppo; * $p < 0,05$. (I) Colorazione IHC delle sezioni epatiche (ingrandimento 100x) con anticorpo anti-F4/80. In un altro set sperimentale, il danno epatico acuto è stato indotto in topi Gpbar1^{+/+} mediante la somministrazione di 500 mg/kg di APAP per os, e il CHIN117 è stato somministrato alla dose di 30 mg/kg per os 6 ore dopo l'induzione dell'epatite. La gravità del danno epatico è stata valutata dai livelli plasmatici di (J) AST e ALT e (K) ematossilina ed eosina (H&E) sui tessuti epatici dei topi (ingrandimento 4x) con (L) valutazione dell'area di necrosi epatica in unità arbitrarie. I risultati sono la media \pm SEM di 6-8 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

3.5.5 La regolazione dell'attività di GPBAR1 e CYSLT₁R modula l'attivazione epatica delle LSEC e delle KC in risposta all'APAP

Poiché il danno epatico indotto da APAP è in gran parte mediato dall'attivazione e/o dall'afflusso di cellule immunitarie nella microcircolazione epatica, abbiamo deciso di studiare l'effetto della modulazione di GPBAR1 e del CYSLT₁R all'interfaccia LSEC/ monociti/macrofagi. A tale scopo, le LSEC e le cellule di Kupffer sono state purificate dal fegato di topi naïve ed è stata valutata mediante RT-PCR l'espressione genica dei due recettori (**Figura 31**). La purezza delle cellule ottenute in questi esperimenti è stata verificata mediante analisi IC-FACS utilizzando anticorpi anti-CD45 e anti-CD31 per le LSEC (CD45 negative CD31 positive; **Figura 31A**) e anticorpi anti-TIM4 (immunoglobulina delle cellule T e proteina-4 contenente il dominio della mucina) per le KC (TIM4 positive; **Figura 31B**). L'analisi dell'espressione genica ha confermato che sia le LSEC che le cellule di Kupffer esprimono i recettori Gpbar1 e Cyslt₁r (**Figura 31C**).

Per confermare questi risultati a livello traslazionale in due set sperimentali diversi abbiamo eseguito un esperimento di co-coltura e un saggio di adesione utilizzando le U937, una linea cellulare di monociti umani e le LSEC, una linea umana di cellule sinusoidali endoteliali epatiche. In un'analisi preliminare di immunofluorescenza (**Figura 31D**), abbiamo mostrato che sia LSEC che U937 erano caratterizzati dall'espressione sulla membrana cellulare di alti livelli di GPBAR1 (in verde) e del CYSLT₁R (in rosso), indicando che entrambi i tipi di cellule potevano essere modulati direttamente dal CHIN117. Successivamente le cellule HepG2 sono state piastrate e stimulate con APAP (10 mM) per 16 ore. Il sovranatante cellulare è stato raccolto e utilizzato come terreno di condizionamento per stimolare le cellule U937 e le LSEC con o senza CHIN117 per 16 ore. Per l'esperimento di co-coltura dopo 16 ore entrambi i tipi di cellule sono stati raccolti separatamente per eseguire l'estrazione dell'RNA. Per il test di adesione le cellule U937 sono state marcate, aggiunte alle LSEC piastrate e incubate per 105 minuti a 37 ° C. Quindi, i monociti non aderenti sono stati rimossi e sono stati aggiunti 500 µl di tampone di lisi per leggere la fluorescenza emessa dai monociti adesi. Come si può evincere dai dati ottenuti il trattamento con APAP ha promosso l'adesione e l'attivazione cellulare, come mostrato dall'aumentata espressione della molecola di adesione E-SELECTIN sulle LSEC e di citochine proinfiammatorie e chemochine IL-1β, TNF-α e CCL2 sulle U937, mentre il CHIN117 ha revertito questa condizione in modo dipendente dalla concentrazione (**Figura 32G-J**).

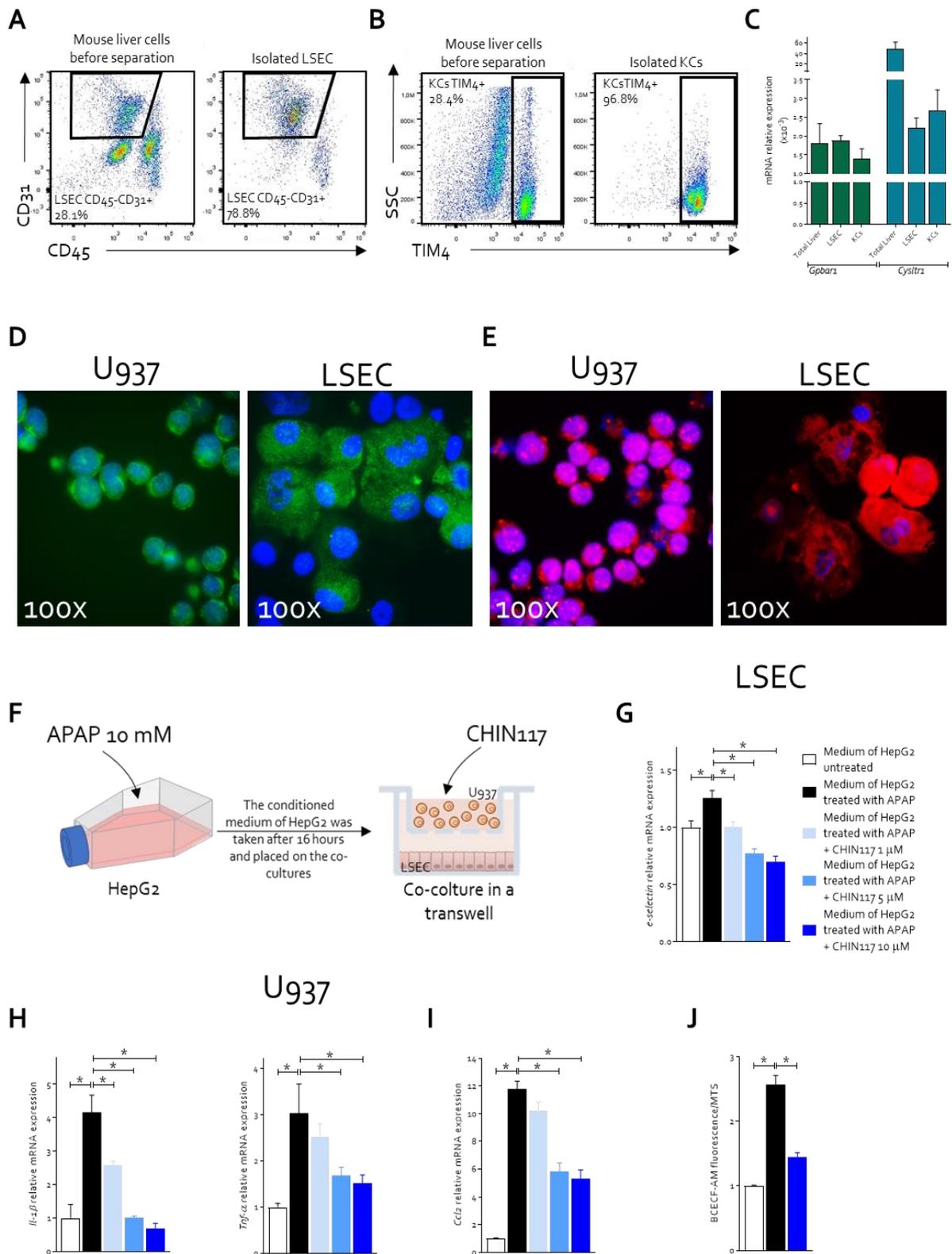
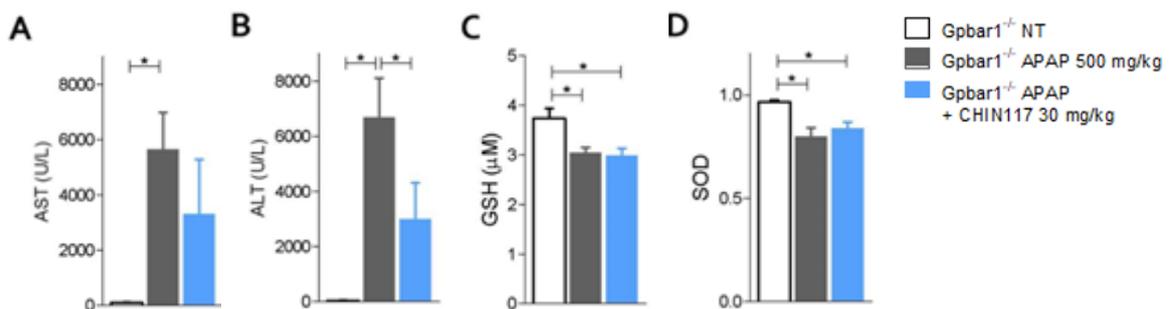


Figura 31: Il CHIN117 esercita un ruolo protettivo all'interfaccia cellula sinusoidale/macrofago. Analisi della citometria a flusso dell'espressione di (A) CD31 e CD45 nel fegato totale e nelle LSEC isolate e (B) TIM4 nel fegato totale e nelle cellule di Kupffer isolate. (C) Espressione relativa dell'mRNA di Gpbar1 e del Cyslt1r nel fegato totale e nelle cellule murine primarie isolate, LSEC e KC. I dati sono stati

normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. * $p < 0.05$. I risultati sono la media \pm SEM di 5 campioni per gruppo; * $p < 0,05$._Analisi di immunofluorescenza di (D) Gpbar1 e (E) Cyslt1r nelle cellule U937 e LSEC. L'ingrandimento è 100 \times . Il DAPI è stato utilizzato per l'identificazione dei nuclei. (F) Co-cultura di cellule umane LSEC e U937; entrambe le popolazioni cellulari sono state stimulate con un terreno di condizionamento ottenuto da cellule HepG2 trattate con APAP 10 mM da solo o in combinazione con il CHIN117 alla concentrazione di 1, 5 o 10 μ M. Espressione relativa dell'mRNA di (G) E-SELECTIN nelle LSEC e (H) IL-1 β , TNF- α e (I) CCL2 nelle cellule U937. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. * $p < 0.05$. I risultati sono la media \pm SEM di 5 campioni per gruppo. * $p < 0,05$. (J) Adesione delle U937 alle cellule LSEC stimulate con un terreno di condizionamento ottenuto da cellule HepG2 trattate con APAP 10 mM da solo o in combinazione con il CHIN117 (10 μ M). I risultati sono la media \pm SEM di cinque campioni per gruppo. * $p < 0,05$. BCECF-AM, bis(carbossietil)carbossifluoresceina acetossimetil estere.

Per confermare che gli effetti benefici esercitati dal CHIN117 nel modello di tossicità acuta indotta da APAP fossero correlati all'attivazione di GPBAR1, abbiamo investigato i suoi effetti in topi knockout per Gpbar1. somministrando il CHIN117 (30 mg/kg) 6 ore dopo il trattamento con APAP (500 mg/kg). I topi sopravvissuti sono stati sacrificati 24 ore dopo l'induzione dell'epatite. Dalle analisi dei principali marker biochimici di danno epatico AST e ALT (**Figura 32A-B**) e dalle analisi delle sezioni di fegato colorate con ematosilina ed eosina (**Figura 32E-F**) abbiamo osservato che l'assenza di Gpbar1 non solo aveva esacerbato la gravità del danno epatico causato da APAP, ma che il CHIN117 aveva revertito il danno solo parzialmente (**Figura 32A-B e E-F**). Coerentemente con questi risultati, il CHIN117 ha modulato solo parzialmente i livelli epatici di GSH e SOD (**Figura 32C-D**) e delle principali citochine e chemochine proinfiammatorie (**Figura 32G-K**).



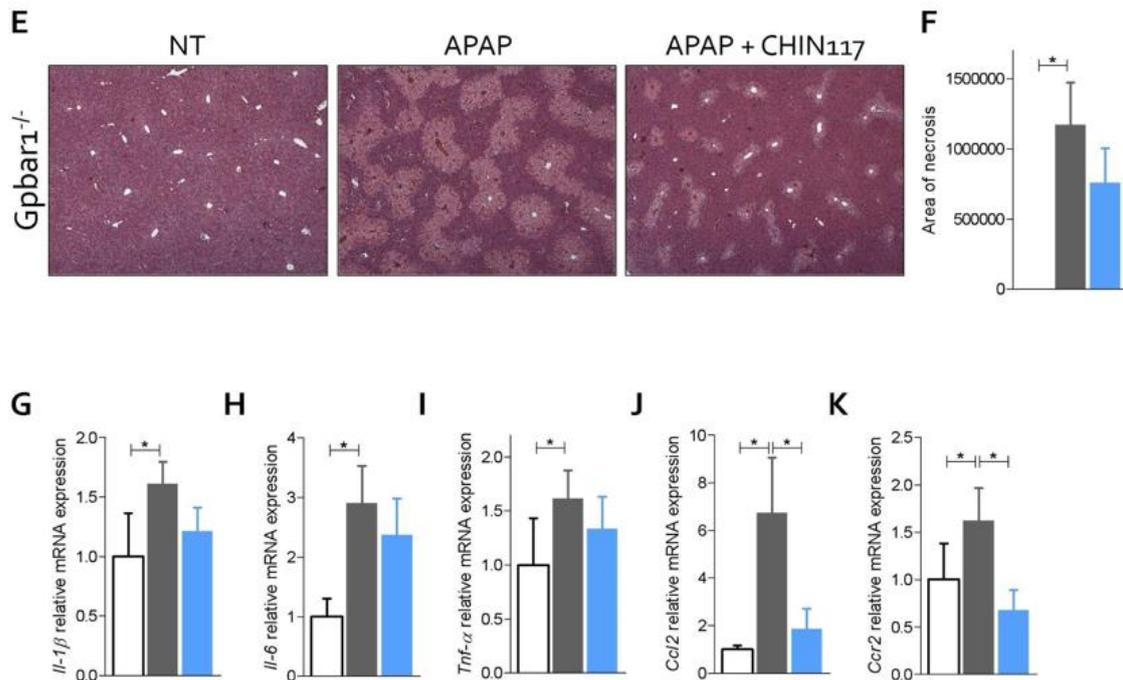


Figura 32: L'ablazione di Gpbar1 esacerba il danno epatico acuto indotto da APAP e riduce gli effetti benefici del CHIN117. Il danno epatico è stato indotto nei topi Gpbar1^{-/-} mediante somministrazione orale di APAP (500 mg/kg) da solo o in combinazione con il CHIN117 (30 mg/kg) 45 minuti dopo l'induzione della malattia. La gravità del danno epatico è stata valutata dai livelli plasmatici di (A) AST (B) ALT (C) GSH (D) attività della SOD e (E) colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) sui tessuti epatici dei topi (ingrandimento 4x) con (F) valutazione dell'area di necrosi epatica in unità arbitrarie. I risultati sono la media ± SEM di 5 campioni per gruppo. **p* < 0,05. Espressione relativa dell'mRNA di (G) IL-1-β (H) IL-6 (I) Tnf-α (J) Ccl2 (K) Ccr2. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. **p* < 0,05. I risultati sono la media ± SEM di 5 topi per gruppo. **p* < 0,05.

L'analisi dell'effetto del CHIN117 sui leucociti infiltranti ha dimostrato inoltre che l'assenza di Gpbar1 ha abrogato la maggior parte degli effetti benefici esercitati dal CHIN117 sullo sviluppo del fenotipo M2, mentre è stata mantenuta l'inibizione dell'afflusso dei macrofagi M1 (**Figura 33**). Pertanto, sebbene il trattamento dei topi Gpbar1^{-/-} con APAP e con il CHIN117 aveva ridotto ancora la percentuale di macrofagi IL-6 positivi (la percentuale di macrofagi IL-6 positivi era del 4,88% nei topi non trattati e aumentata al 10,8% nei topi trattati con APAP e sceso al 7,18% nel gruppo con il CHIN117; **Figura 33D**), il nostro composto non è riuscito ad aumentare la percentuale dei macrofagi IL-10 positivi (**Figura 33G**). Insieme, questi dati suggeriscono che l'attivazione di GPBAR1 da parte del CHIN117 è necessaria per la regolazione mediata dall'IL-10.

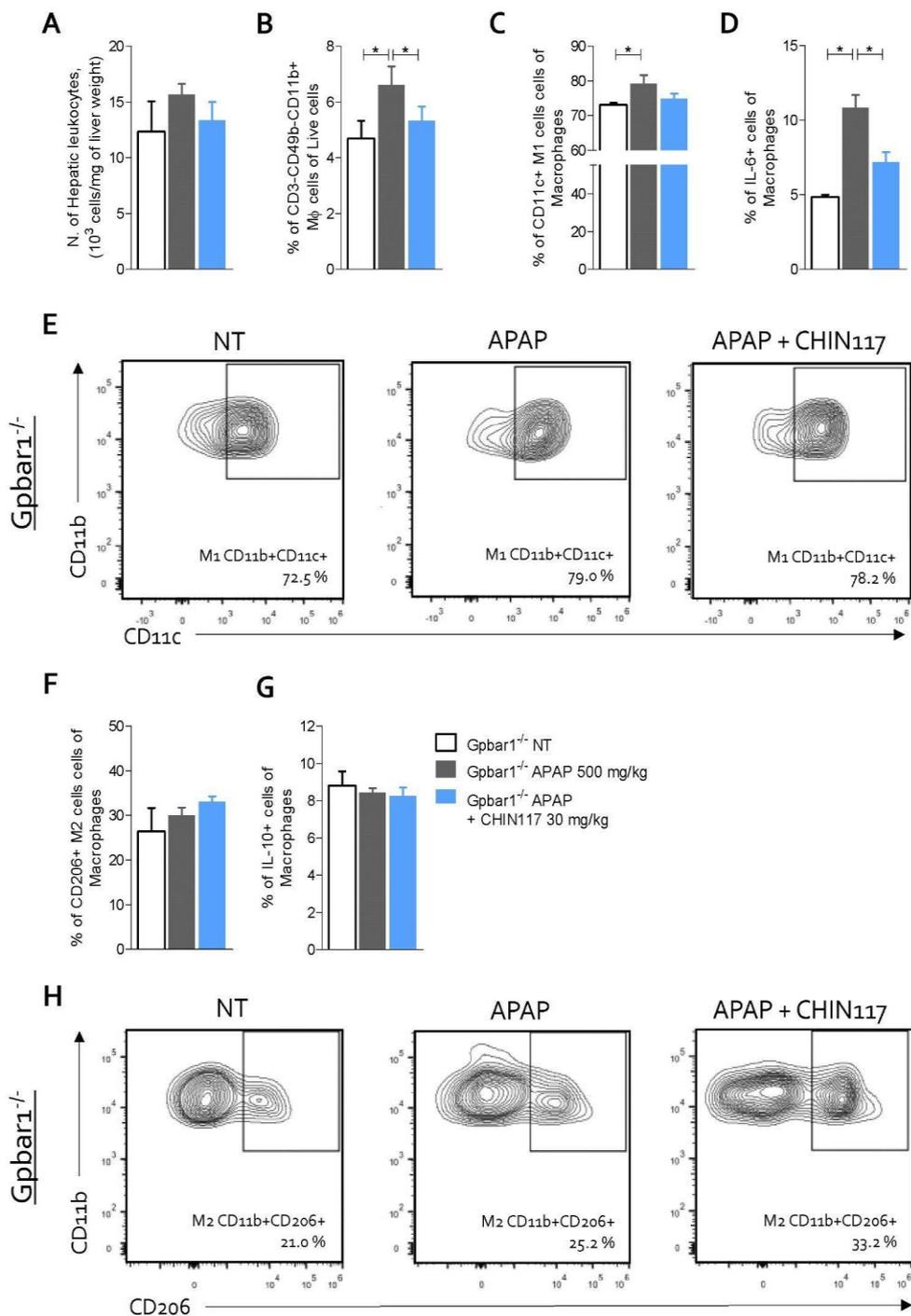


Figura 33: Il danno acuto al fegato è stato indotto nei topi $Gpbar1^{+/+}$ dalla somministrazione di 500 mg/kg di APAP per via orale (os) e il CHIN117 è stato somministrato alla dose di 30 mg/kg per via os 45 minuti dopo l'induzione dell'epatite. I tessuti epatici sono stati utilizzati per eseguire una caratterizzazione dettagliata delle cellule infiltranti il fegato mediante analisi IC-FACS. I dati mostrano (A) il numero di cellule leucitarie epatiche totali e (B) la percentuale della sottopopolazione di macrofagi (CD3 negativi CD49 negativi e CD11b positivi). (C-E) Caratterizzazione dei macrofagi proinfiammatori: (C) percentuale di M1 CD11c positivi e (D) percentuale di macrofagi IL-6 positivi sui macrofagi epatici totali e

(E) analisi di citometria a flusso dell'espressione di CD11c e CD11b in cellule macrofagiche reclutate nel fegato per ciascun gruppo sperimentale. (F-H) Caratterizzazione dei macrofagi proinfiammatori: (F) percentuale di macrofagi M2 CD206 positivi e (G) percentuale di macrofagi IL-10 positivi dei macrofagi epatici totali e (H) analisi della citometria a flusso dell'espressione di CD206 e CD11b nelle cellule macrofagiche reclutate nel fegato per ogni gruppo sperimentale. I risultati sono la media \pm SEM di 5 topi per gruppo; * $p < 0,05$.

3.5.6 Il CHIN117 protegge dallo sviluppo della fibrosi epatica in un modello di CCl₄

Abbiamo poi indagato se il CHIN117 fosse in grado di revertire la fibrosi epatica in topi maschi C57BL6/J trattati con il CCl₄ alla dose di 0,5 ml/kg due volte a settimana, da solo o in combinazione con il CHIN117, alla dose di 30 mg/kg/die per 1 settimana. Come mostrato in **Figura 34** i topi trattati con CCl₄ per 1 settimana hanno sviluppato un moderato danno epatico, confermato dai livelli plasmatici di AST e ALT (**Figura 34A**). Lo staining di campioni di tessuto epatico con le colorazioni H&E (**Figura 34B**) e Sirius red (**Figura 34D**) hanno confermato le caratteristiche biochimiche, mostrando all'esame istologico la presenza di modeste lesioni a livello del fegato. L'analisi quantitativa delle aree di fibrosi mediante il software Image J delle sezioni colorate con Sirius Red, ha dimostrato che il trattamento dei topi con CCl₄ aumenta l'estensione della superficie fibrotica di circa 5 volte rispetto ai topi naïve (**Figura 34E**). Questi dati sono stati confermati dall'analisi dell'espressione genica condotta mediante Real-Time PCR in cui il trattamento con CCl₄ causa un incremento dei livelli di espressione del gene pro-fibrotico Col1 α 1, di citochine e chemochine proinfiammatorie come Tnf- α , IL-1 β , Ccl2 e Ccr2 e il reclutamento di macrofagi proinfiammatori M1, mentre ha ridotto l'espressione di c-Myc, un marker dei macrofagi M2 (dati non mostrati). Inoltre, nel gruppo dei topi trattati con solo CCl₄ abbiamo riscontrato un aumento del contenuto epatico di CysLT (**Figura 34C**), e un aumento dell'espressione dell'mRNA di Gpbar1 e del CysLT_{1r} (**Figura 34F-G**). La somministrazione del CHIN117 ai topi CCl₄, reverte completamente questo pattern.

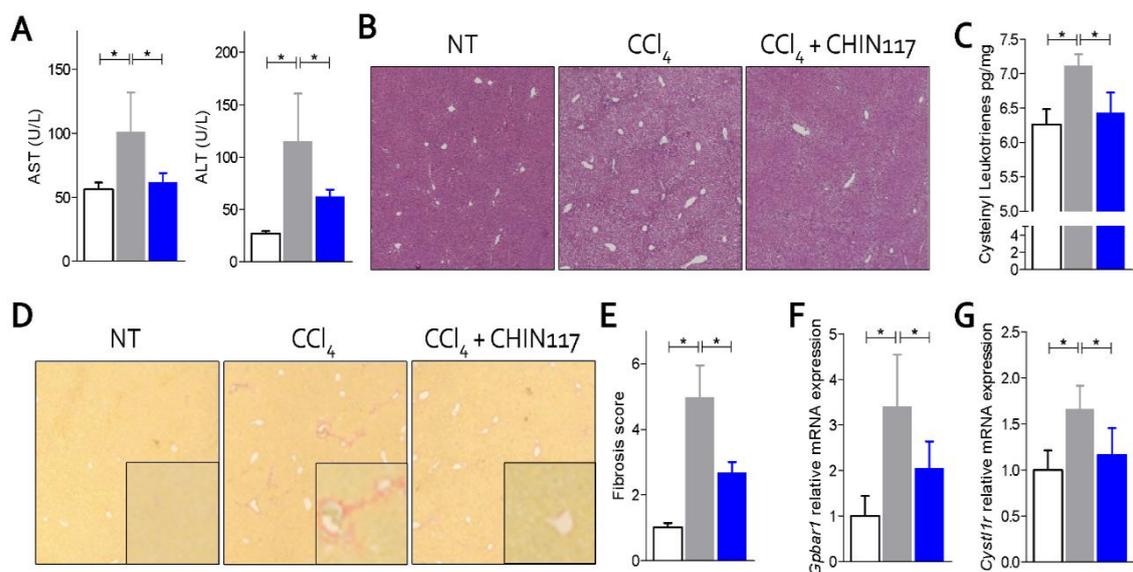


Figura 34: il CHIN117 protegge dallo sviluppo di danno epatico e fibrosi indotta dal CCl₄. Il danno epatico è stato indotto in topi maschi C57BL6/J attraverso la somministrazione di 0,5 ml/kg di CCl₄ due volte a settimana, da solo o in combinazione con il CHIN117, alla dose di 30 mg/kg/die per 1 settimana. La gravità della malattia epatica è stata valutata mediante la valutazione di (A) AST e ALT. (B) Colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) sui tessuti epatici dei topi (ingrandimento, 4x) e (C) livelli epatici di CysLT. (D) Colorazione con Sirius Red delle sezioni del fegato (ingrandimento 4x e 10x) con (E) punteggio di fibrosi espresso in unità arbitrarie e espressione relativa dell'mRNA di (F) Gpbar1 e (G) Cyslt1r. I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. *p < 0.05.

Infine per valutare gli effetti farmacologici *in vitro* del CHIN117 su una linea di cellule stellate umane (LX2), abbiamo dapprima dimostrato che LX2 esprimono sulla membrana cellulare alti livelli di GPBAR1 (in verde) e del CysLT₁R (in rosso) (Figura 35A). Successivamente, in un altro set sperimentale, le LX2 sono state attivate simultaneamente con TNF- α (100 ng/ml) e LTD₄ (100 nM) e stimolate o meno con il CHIN117 a concentrazioni di 1, 10 e 100 nM. Dopo 24 ore, le cellule sono state raccolte ed è stato estratto l'RNA per la successiva valutazione dell'espressione genica. Come mostrato dall'analisi dell'espressione genica (Figura 35B-E) dei principali marker profibrotici, il CHIN117 ha revertito questo pattern in maniera concentrazione-dipendente (Figura 35B-E), confermando ancora una volta i risultati precedentemente ottenuti.

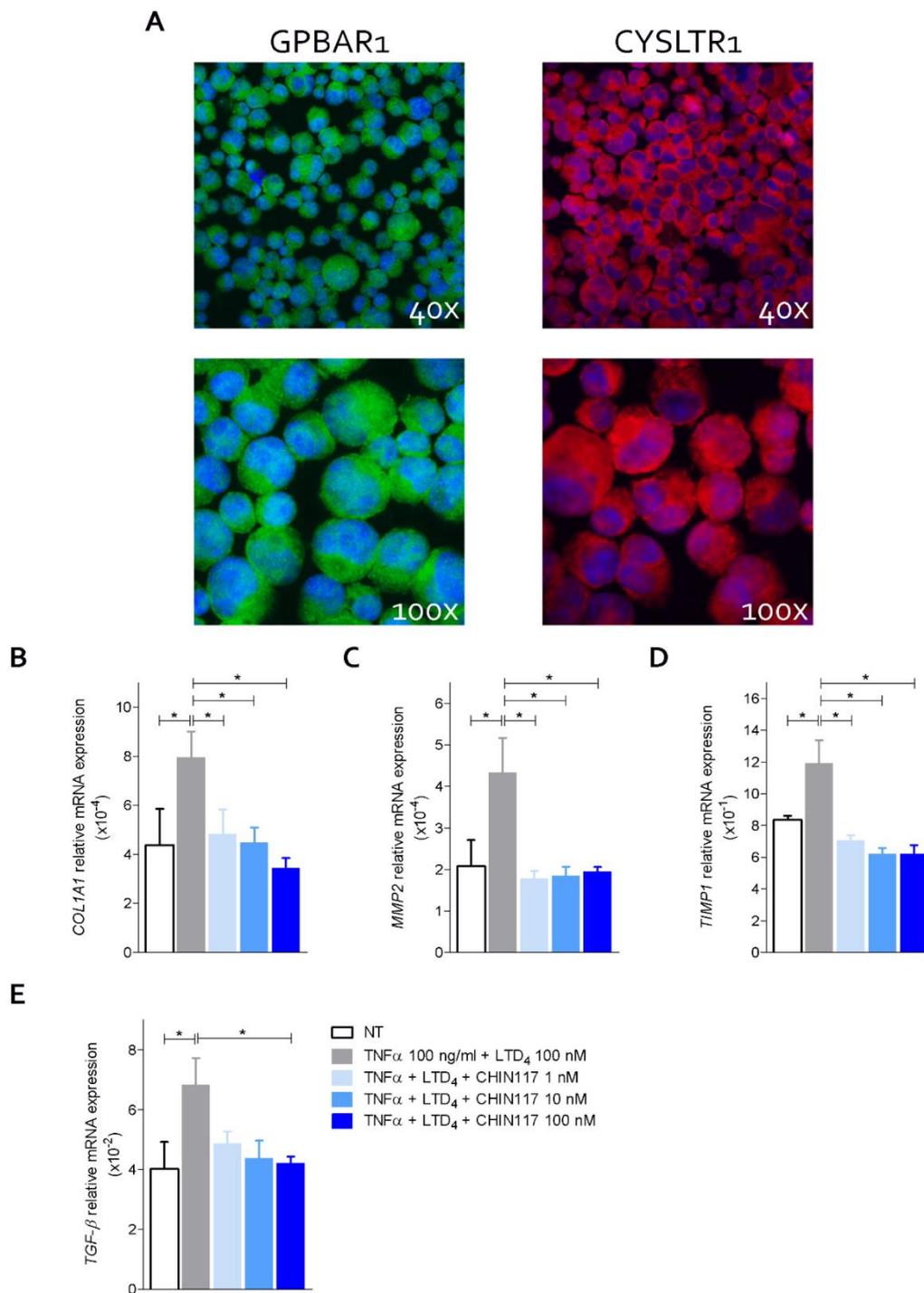


Figura 35: Effetto farmacologico di CHIN117 sull'attivazione delle cellule LX2 (**A**) Analisi di immunofluorescenza di Gpbar1 e Cyslt_{1r} nelle cellule LX2. Gli ingrandimenti sono 40x e 100x. Il DAPI è stato utilizzato per l'identificazione dei nuclei. L'effetto farmacologico in vitro di CHIN117 è stato valutato su una linea di cellule stellate umane, LX2. Le cellule sono state stimulate per 24 ore con TNF- α + LTD₄ e trattate con il CHIN117 a 1, 10 e 100 nM. Espressione relativa dell'mRNA di (**B**) Col1 α 1, (**C**) Mmp2, (**D**) Timp1 e (**E**) Tgf- β . I dati sono stati normalizzati con i livelli di espressione dell'mRNA della GAPDH. *p <0.05. I risultati sono la media \pm SEM di cinque campioni per gruppo; * p <0,05.

Discussione e conclusioni

Attualmente, i recettori accoppiati a proteine G (G protein-coupled receptor, GPCR) sono il bersaglio molecolare di \approx il 40% dei farmaci commercializzati e rappresentano le strutture più studiate per sviluppare nuove terapie. Nel lavoro appena riportato abbiamo dimostrato la capacità di un ligando duale antagonista del CYSLT₁R e agonista di GPBAR1, due recettori accoppiati a proteine G, di ridurre il danno epatico in un modello murino di epatotossicità indotta da farmaci (DEF).

Nonostante i due recettori condividano poche somiglianze dal punto di vista strutturale, siamo stati in grado di sviluppare un farmaco unico a partire dalla struttura chinolinica del REV5901, un antagonista del CYSLT₁R attivo per via orale che tuttavia non ha raggiunto gli obiettivi necessari al fine di proseguire nelle fasi di sperimentazione [15]. Il primo della classe di questi nuovi ligandi ibridi, il CHIN117, aveva precedentemente mostrato un potenziale nel trattamento dei disordini metabolici e del fegato [16]. Sebbene esistano diversi antagonisti del CYSLT₁R con attività antinfiammatoria clinicamente approvati, non esistono ancora agonisti di GPBAR1 clinicamente approvati. GPBAR1, conosciuto anche come TGR5, è un recettore di membrana per gli acidi biliari secondari [29], LCA e DCA, generati nell'intestino dalla 7 α -deidrossilazione dell'acido colico (CA) e dell'acido chenodesossicolico (CDCA), i due acidi biliari primari formati nel fegato dalla degradazione del colesterolo. Contrariamente al CYSLT₁R, GPBAR1 è un recettore relativamente promiscuo che condivide ligandi con il Farnesoid-X-Receptor (FXR), un recettore nucleare che è principalmente attivato dagli acidi biliari primari. Nonostante una relativa mancanza di specificità verso i loro ligandi endogeni, GPBAR1 e FXR sono espressi in modo differenziato nei vari tessuti. Nel fegato, FXR è espresso principalmente da epatociti, cellule di Kupffer e monociti-macrofagi e cellule stellate (HSC), mentre l'espressione di GPBAR1 è limitata alle cellule di Kupffer, LSEC e alle HSC attivate. Qui, abbiamo dimostrato che nelle cellule epatiche non parenchimali, il CYSLT₁R condivide lo stesso modello di distribuzione di GPBAR1, con la massima espressione a livello delle cellule di Kupffer, LSEC e nelle HSC, mentre le cellule parenchimali del fegato non esprimono nessuno dei due recettori. Inoltre, nelle cellule epatiche non parenchimali, i due recettori esercitano importanti effetti regolatori agendo in maniera opposta.

Infatti, mentre l'agonismo del CYSLT₁R da parte dei leucotrieni LTB₄ e LTD₄, promuove l'attivazione delle cellule di Kupffer e delle LSEC [44,85], le attività chemiotattiche, l'adesione cellula-cellula, aumenta l'espressione delle molecole di adesione e la produzione di mediatori

infiammatori, comprese le chemochine e i loro recettori, GPBAR1 esercita effetti controregolatori di natura inibitoria. L'agonismo di GPBAR1 *in vivo* e *in vitro*, infatti, controregola l'attivazione delle cellule di Kupffer, riduce la produzione di citochine e chemochine, promuovendo lo sviluppo di un fenotipo tolerogenico [1,86]. Di conseguenza, i topi *Gpbar1*^{-/-} sono più inclini rispetto ai loro congenici a sviluppare infiammazione con l'età o in risposta a stimoli infiammatori [32]. Sono stati descritti simili effetti opposti di GPBAR1 e del CYSLT₁R anche nella regolazione delle cellule stellate (HSC). Infatti, mentre i cisteinil-leucotrieni promuovono l'attivazione delle HSC e la deposizione di matrice extracellulare [44,87], sia gli antagonisti del CYSLT₁R che gli agonisti di GPBAR1 reversiono questi effetti [8]. Questo background suggerisce che l'approccio combinato antagonismo del CYSLT₁R/agonismo di GPBAR1 potrebbe determinare un effetto additivo in quei contesti in cui entrambi i recettori sono coinvolti.

L'insufficienza epatica acuta (ALF) che si sviluppa nei pazienti e nei modelli murini di intossicazione da APAP coinvolge molteplici meccanismi. Dopo una lesione tissutale acuta, le componenti intracellulari, definiti come modelli molecolari associati al danno (DAMPs), vengono rilasciati da cellule necrotiche e apoptotiche che agiscono come molecole segnale di "pericolo" e che innescano una risposta infiammatoria organo-specifica e sistemica (SIRS) che è in gran parte mediata dalle cellule della linea mieloide [88,89,90]. I dati sugli animali hanno dimostrato che il danno epatico nei topi intossicati da APAP dipende dai macrofagi ed è prevenuto da numerosi approcci mirati all'inibizione o alla deplezione dei macrofagi [91, 92]. Questi risultati sugli animali hanno una rilevanza traslazionale poiché una riduzione del numero di monociti circolanti (a causa del loro accumulo nella microcircolazione epatica), è fortemente correlata con lo sviluppo di una SIRS e di una disfunzione multiorgano e predice un esito sfavorevole nell'ALF [93].

In questo studio abbiamo confermato che l'intossicazione da APAP è associata ad un drammatico aumento del numero di leucociti epatici, una popolazione cellulare costituita da cellule di Kupffer, macrofagi derivati da monociti insieme a cellule dendritiche, cellule NKT e cellule della linea linfoide. Questa risposta immunitaria si sviluppa a livello del sinusoidale epatico e abbiamo dimostrato che il CYSLT₁R e GPBAR1 sono una parte essenziale delle comunicazioni chimiche che governano le interazioni LSEC-leucociti.

Ciò viene confermato dai molteplici risultati ottenuti nel presente studio: in primo luogo, combinando l'analisi del trascrittoma di fegati da pazienti con ALF indotta da APAP e i risultati ottenuti dal sovradosaggio di APAP nei topi *Gpbar1*^{-/-} e silenziati per il CYSLT₁R,

abbiamo dimostrato che mentre i geni nella via della 5-lipossigenasi sono relativamente indotti in risposta all'APAP negli esseri umani, l'ablazione del gene del CYSLT₁R nei topi protegge dal danno epatico mentre l'ablazione del gene GPBAR1 aggrava il danno epatico nel modello. In secondo luogo, per avvalorare ulteriormente il potenziale terapeutico additivo dei due recettori, l'approccio combinato progettato per attivare simultaneamente GPBAR1 e inibire CYSLT₁R, ha quasi completamente revertito il danno epatico causato dall' APAP, anche quando il CHIN117 è somministrato in modo terapeutico (cioè quando somministrato 45 min dopo l'induzione della malattia). Il trattamento con il CHIN117 ha determinato una protezione del fegato (livelli di AST/ALT) statisticamente superiore a quella conferita dal singolo targeting del CYSLT₁R e di GPBAR1 con i loro ligandi selettivi, rispettivamente Montelukast e BAR501. Inoltre, la modulazione simultanea di GPBAR1 e del CYSLT₁R ha consentito la regolazione di un massimo di 1374 geni la cui espressione non era modulata dal BAR501 o dal Montelukast. Nell'insieme, questi risultati supportano fortemente la rilevanza meccanicistica di queste pathway e il loro potenziale terapeutico.

Dal punto di vista meccanicistico abbiamo dimostrato che la modulazione nell'interfaccia sinusoidale cellula/macrofago rappresenta il target principale di questo approccio. Innanzitutto, abbiamo dimostrato, per la prima volta, che entrambi i recettori sono co-espressi dalle LSEC e dalle cellule di Kupffer umane e murine e dai monociti umani. In secondo luogo, mentre l'attivazione del CYSLT₁R con LTD₄ promuove l'adesione tra LSEC e monociti umani, l'agonismo di GPBAR1 con il BAR501 reverte questo effetto e il ligando duale CHIN117 attenua fortemente l'adesione indotta dall'esposizione delle LSEC e dei monociti umani al sovratanante ottenuto dagli epatociti stimolati con APAP. Combinando i dati di espressione genica con l'IC-FACS e i dati di immunistochemica abbiamo osservato che il trattamento dei topi ai quali è stato somministrato l'APAP con il CHIN117 ha portato a una forte riduzione del numero di macrofagi epatici, suggerendo così un'attenuazione del processo di migrazione dei monociti dal sangue al tessuto epatico. Ciò è stato dimostrato dal fatto che il CHIN117 ha revertito in maniera diretta l'induzione delle molecole di adesione e delle chemochine promossa dall'esposizione delle LSEC al sovratanante delle HepG2.

Inoltre, il trattamento con il CHIN117 rimodula l'espressione di diverse chemochine. Infatti, sono stati regolati numerosi geni coinvolti nella pathway delle chemochine in modo differenziato dal CHIN117 rispetto al solo APAP, tra cui CCL2 e il suo recettore CCR2 e CXCL1 la cui espressione è stata indotta in campioni di fegato da pazienti intossicati da APAP.

Ccl2 e Cxcl1, sono le due chemochine maggiormente upregolate nel fegato di pazienti intossicati da APAP e, insieme al fatto che l'antagonismo di Ccl2 protegge dal danno epatico nei modelli murini di, questi dati supportano fortemente la rilevanza meccanicistica di questi mediatori nel modello. È importante sottolineare che l'induzione di entrambe le chemochine è stata revertita dalla somministrazione del CHIN117, ma non dall'agonismo selettivo di GPBAR1 o dall'antagonismo del CYSLT₁R. Inoltre, Cxcl1 era anche tra i geni più up-regolati nei topi trattati con il CCl₄ e più down-regolato nei topi CCl₄ trattati con il CHIN117.

In sintesi, i recettori GPBAR1 e CYSLT₁R sono co-espressi dalle LSEC, dai monociti circolanti e dai macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer) che esercitano funzioni opposte nella microcircolazione epatica. Inoltre, abbiamo fornito la prova che un approccio combinato che ha come target il CYSLT₁R e GPBAR1 con una piccola molecola ibrida, attiva per via orale, è efficace nel ridurre il danno epatico in un modello murino di epatite acuta indotta da APAP.

Bibliografia

1. Fiorucci S, Distrutti E, Carino A, Zampella A, Biagioli M. Bile acids and their receptors in metabolic disorders. *Prog Lipid Res.* 2021 Apr;82:101094. doi: 10.1016/j.plipres.2021.101094. Epub 2021 Feb 23. PMID: 33636214.
2. Keitel V, Stindt J, Häussinger D. Bile Acid-Activated Receptors: GPBAR1 (TGR5) and Other G Protein-Coupled Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2019 ;256:19-49. DOI: 10.1007/164_2019_230. PMID: 31302759.
3. S. Katsuma, A. Hirasawa, and G. Tsujimoto, "Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 329, no. 1, pp. 386–390, 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.139.
4. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2009; 10(3):167-77.
5. Duboc H, Taché Y, Hofmann AF. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. *Dig Liver Dis.* 2014; 46(4):302-12
6. Yu DD, Sousa KM, Mattern DL, Wagner J, Fu X, Vaidehi N et al. Stereoselective synthesis, biological evaluation, and modeling of novel bile acid-derived G-protein coupled bile acid receptor 1 (GP-BAR1, TGR5) agonists. *Bioorg Med Chem.* 2015; 23:1613 –1628.
7. Festa C, Renga B, D'Amore C, Sepe V, Finamore C, De Marino S et al. Exploitation of cholane scaffold for the discovery of potent and selective farnesoid X receptor (FXR) and G-protein coupled bile acid receptor 1 (GP-BAR1) ligands. *J Med Chem.* 2014; 8477 -8495
8. Carino A, Cipriani S, Marchianò S, Biagioli M, Scarpelli P, Zampella A et al. GPBAR1 agonism promotes a Pgc-1 α -dependent browning of white adipose tissue and energy expenditure and reverses diet-induced steatohepatitis in mice. *Sci Rep* 2017; 7:13689.
9. Biagioli M, Carino A, Cipriani S, Francisci D, Marchianò S, Scarpelli P, Sorcini D, Zampella A, Fiorucci S (2017) The bile acid receptor GPBAR1 regulates the M1/M2 phenotype of intestinal macrophages and activation of GPBAR1 rescues mice from murine colitis. *J Immunol* 199:718–733
10. Sven-Erik Dahlén (2006). Treatment of asthma with antileukotrienes: First line or last resort therapy?. , 533(1-3), 40–56. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.070.
11. Farzaneh-Far R, Moore K. Cysteinyl-leukotrienes and the liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003 Oct;72(1-2):35-50. doi: 10.1016/s1098-8823(03)00076-5. PMID: 14626495
12. Savari, S.; Vinnakota, K.; Zhang, Y.; Sjölander, A. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Bridging Inflammation and Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 968–977, doi:10.3748/wjg.v20.i4.968.

13. Kuru, S.; Kismet, K.; Barlas, A.M.; Tuncal, S.; Celepli, P.; Surer, H.; Ogun, E.; Ertas, E. The Effect of Montelukast on Liver Damage in an Experimental Obstructive Jaundice Model. *Visc. Med.* 2015, 31, 131–138, doi:10.1159/000375434.
14. Pu S, Liu Q, Li Y, Li R, Wu T, Zhang Z, Huang C, Yang X, He J. Montelukast Prevents Mice Against Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Front Pharmacol.* 2019 Sep 18;10:1070. doi: 10.3389/fphar.2019.01070. PMID: 31620001; PMCID: PMC6759817.
15. Biagioli, M., Carino, A., Marchianò, S., Roselli, R., Di Giorgio, C., Bordoni, M., et al. (2020b). Identification of Cysteinyl-Leukotriene-Receptor 1 Antagonists as Ligands for the Bile Acid Receptor GPBAR1. *Biochem. Pharmacol.* 177, 113987. doi:10.1016/j.bcp.2020.113987.
16. Fiorucci S, Rapacciuolo P, Fiorillo B, Roselli R, Marchianò S, Di Giorgio C, Bordoni M, Bellini R, Cassiano C, Conflitti P, Catalanotti B, Limongelli V, Sepe V, Biagioli M, Zampella A. Discovery of a Potent and Orally Active Dual GPBAR1/CysLT1R Modulator for the Treatment of Metabolic Fatty Liver Disease. *Front Pharmacol.* 2022 Apr 25;13:858137. doi: 10.3389/fphar.2022.858137. PMID: 35559268; PMCID: PMC9085577.
17. Stefano Fiorucci, Michele Biagioli, Eleonora Distrutti, Review: “Future trends in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis”. *Pharmacological Research* Volume 134, August 2018, Pages 289-298
18. Michele Biagioli, Adriana Carino, Chiara Fiorucci, Silvia Marchianò, Cristina Di Giorgio, Martina Bordoni, Rosalinda Roselli, Monia Baldoni, Eleonora Distrutti, Angela Zampella, Stefano Fiorucci; The Bile Acid Receptor GPBAR1 Modulates CCL2/CCR2 Signaling at the Liver Sinusoidal/Macrophage Interface and Reverses Acetaminophen-Induced Liver Toxicity. *J Immunol* 1 May 2020; 204 (9): 2535–2551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901427>
19. Fiorucci S and Distrutti E. Bile Acid-Activated Receptors, Intestinal Microbiota, and the Treatment of Metabolic Disorders. *Trends Mol Med.* 2015; 21:702-714.
20. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al (2002). Identification of membrane type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 714–719.53.
21. Sheikh Abdul Kadir SH, Miragoli M, Abu-Hayyeh S, Moshkov AV, Xie Q, Keitel V, et al (2010) Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *PLoS One*, 5: e9689.
22. Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30(11):570-80.
23. Makishima M, Okamoto A Y, Repa J J, Tu H, Learned RM, Luk A, et al (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284: 1362–1365
24. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA et al (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 284(5418): 1365-1368.

25. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*, 3: 543-553.
26. Xie W, Radominska-Pandy A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, et al (2001). An essential role for nuclear receptors SHP/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 3375-3380.
27. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al (2002). Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*, 296: 1313–1316.
28. Fiorucci S, Distrutti E. The Pharmacology of Bile Acids and Their Receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;256:3-18. doi: 10.1007/164_2019_238. PMID: 31201555.
29. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.*2003; 278:9435–9440.
30. Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, Abbondanzo SJ, Zeng M, Yang S et al. Targeted deletion of Gpbar1 Protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J*. 2006; 398(3):423-30.
31. Keitel V, Häussinger D. Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012; 36(5):412–419
32. Cipriani S, Mencarelli A, Chini MG, Distrutti E, Renga B, Bifulco G, Baldelli F, Donini A, Fiorucci S (2011) The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS One* 6:e25637.
33. Reich M, Klindt C, Deutschmann K, Spomer L, Häussinger D, Keitel V. Role of the Gprotein-coupled bile acid receptor TGR5 in liver damage. *Dig Dis*. 2017; 35(3):235 – 240.
34. Renga B, Bucci M, Cipriani S, Carino A, Monti MC, Zampella A et al. Cystathionine gamma-lyase, a H₂S-generating enzyme, is a GPBAR1-regulated gene and contributes to vasodilation caused by secondary bile acids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(1):H114 –H126
35. Keitel V, Häussinger D. Role of TGR5 (GPBAR1) in Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2018 Nov;38(4):333-339. doi: 10.1055/s-0038-1669940. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30357770.
36. Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Häussinger D. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2008; 372:78–84.
37. Sato H, Macchiarulo A, Thomas C, Gioiello A, Une M, Hofmann AF et al. Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* 2008; 51(6):1831 – 1841.
38. Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A et al. Antihyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea* . *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 362:793–798.

39. Kumar DP, Rajagopal S, Mahavadi S, Mirshahi F, Grider JR, Murthy KS et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 427:600–605
40. Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 2007 Nov 1;357(18):1841-54. doi: 10.1056/NEJMra071371. PMID: 17978293.
41. O. Rådmark, O. Werz, D. Steinhilber, and B. Samuelsson, "5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1851, no. 4, pp. 331–339, 2015.
42. Marques, C.F.; Marques, M.M.; Justino, G.C. Leukotrienes vs. Montelukast—Activity, Metabolism, and Toxicity Hints for Repurposing. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1039. <https://doi.org/10.3390/ph15091039>.
43. Hagmann W, Keppler D. Leukotrienes and other eicosanoids in liver pathophysiology. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, editors. *The liver: biology and pathobiology*. 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd.; 1988.
44. Titos E, Claria J, Bataller R, Bosch-Marce M, Gines P, Jimenez W, et al. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. *Gastroenterology* 2000;119:794–805
45. Nascimbeni F, Pais R, Bellentani S et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol.* 2013;59:859–871.
46. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol.* 2017;23(36):6571-6592. doi:10.3748/wjg.v23.i36.6571
47. Italian Association for the Study of the Liver (AISF) AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Dig Liver Dis.* 2017;49:471–483.13
48. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Study Group. Epidemiological modifiers of nonalcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis.* 2015;47:997–1006.16.
49. Gangitano E, Ginanni Corradini S, Lubrano C, Gnessi L. La Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, una patologia epatica di interesse endocrinologico. *L'Endocrinologo.* 2021;22(5):436–40. Italian. doi: 10.1007/s40619-021-00955-9. Epub 2021 Sep 15. PMID: PMC8442522.
50. Fiorucci S, Biagioli M, Sepe V, Zampella A, Distrutti E. Bile acid modulators for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Expert Opin Investig Drugs.* 2020 Jun;29(6):623-632. doi: 10.1080/13543784.2020.1763302. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32552182.
51. Biagioli, M.; Fiorucci, S. Bile Acid Activated Receptors: Integrating Immune and Metabolic Regulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Liver Res.* 2021, 5, 119–141.
52. Huby, T., Gautier, E.L. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Immunol* 22, 429–443 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00639-3>

53. Cai J, Zhang XJ, Li H. The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019 Sep;70(3):1026-1037. doi: 10.1002/hep.30506. PMID: 30653691.
54. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 2007;133:80-90. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.012
55. Tsuchida, T., Friedman, S. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 397–411 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
56. Heyens LJM, Busschots D, Koek GH, Robaey G, Francque S. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Apr 14;8:615978. doi: 10.3389/fmed.2021.615978. PMID: 33937277; PMCID: PMC8079659.
57. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl*. 1996 May;54:S39-45. PMID: 8731193.
58. M. Sayiner et al., “Variables Associated With Inpatient and Outpatient Resource Utilization Among Medicare Beneficiaries With Nonalcoholic Fatty Liver Disease With or Without Cirrhosis,” *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 51, no. 3. pp. 254–260, 2017.
59. S. A. Polyzos, J. Kountouras, C. Zavas, and G. Deretzi, “Nonalcoholic fatty liver disease: Multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease,” *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 46, no. 4. pp. 272–284, 2012.
60. G. Marchesini et al., “EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease,” *Obesity Facts*, vol. 9, no. 2. pp. 65–90, 2016.
61. S. A. Polyzos and C. S. Mantzoros, “Adiponectin as a target for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with thiazolidinediones: A systematic review,” *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 65, no. 9. pp. 1297–1306, 2016.
62. D. Barb, P. Portillo-Sanchez, and K. Cusi, “Pharmacological management of nonalcoholic fatty liver disease,” *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 65, no. 8. pp. 1183–1195, 2016.
63. Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al; “SUSTAIN-6 Investigators. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes.”, *N Engl J Med*. 2016;375:1834–44.
64. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. “The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases.”, *Hepatology*
65. V. Venetsanaki, Z. Karabouta, and S. A. Polyzos, “Farnesoid X nuclear receptor agonists for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 863. 2019.

66. Leng YR, Zhang MH, Luo JG, Zhang H. Pathogenesis of NASH and Promising Natural Products. *Chin J Nat Med.* 2021 Jan;19(1):12-27. doi: 10.1016/S1875-5364(21)60002-X. PMID: 33516448.
67. Govaere, O., Cockell, S., Tiniakos, D., Queen, R., Younes, R., Vacca, M., et al. (2020). Transcriptomic Profiling across the Nonalcoholic Fatty Liver Disease Spectrum Reveals Gene Signatures for Steatohepatitis and Fibrosis. *Sci. Transl. Med.* 12, eaba4448. doi:10.1126/scitranslmed.aba4448
68. Pfister, D., Núñez, N. G., Pinyol, R., Govaere, O., Pinter, M., Szydłowska, M., et al. (2021). NASH Limits Anti-tumour Surveillance in Immunotherapy-Treated HCC. *Nature* 592, 450–456. doi:10.1038/s41586-021-03362-0
69. Marchianò, S., Biagioli, M., Roselli, R., Zampella, A., Di Giorgio, C., Bordoni, M., et al. (2022). Atorvastatin Protects against Liver and Vascular Damage in a Model of Diet Induced Steatohepatitis by Resetting FXR and GPBAR1 Signaling. *FASEB J.* 36, e22060. doi:10.1096/fj.202101397R.
70. Fiorucci, S. et al. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 127, 1497–1512 (2004).
71. Xu L, Chen Y, Nagashimada M, Ni Y, Zhuge F, Chen G, Li H, Pan T, Yamashita T, Mukaida N, Kaneko S, Ota T, Nagata N. CC chemokine ligand 3 deficiency ameliorates diet-induced steatohepatitis by regulating liver macrophage recruitment and M1/M2 status in mice. *Metabolism.* 2021 Dec;125:154914. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154914. Epub 2021 Oct 14. PMID: 34656648.
72. Harach, T., Pols, T., Nomura, M. et al. TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* 2, 430 (2012). <https://doi.org/10.1038/srep00430>
73. Dienstag JL, McHutchison JG, American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130:225-30.
74. Coordinamento Nazionale Docenti universitari di Gastroenterologia. *Manuale di Gastroenterologia Unigastro.* Edizione 2007-2009. Editrice Gastroenterologia Italiana.
75. Ghanem CI, Pérez MJ, Manautou JE, Mottino AD. Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacol Res.* 2016 Jul;109:119-31.
76. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007;11(3):525–48
77. Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expr.* 2018;18(1):19-30.
78. Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL. Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17940–53.
79. Krenkel O, Mossanen JC, Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3(6):331-43.

80. Bajt ML., Cover C., Lemasters JJ, Jaeschke H. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicol. Sci.* 2006;94:217–225.
81. Antoniadis CG, Quaglia A, Taams LS, Mitry RR, Hussain M, Abeles R et al. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. *Hepatology* 2012; 56:735-46.
82. Mingzhu Yan, Yazhen Huo, Shutao Yin, Hongbo Hu, *Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions*, *Redox Biology*, Volume 17, July 2018, Pages 274-283.
83. Biagioli, M, Marchianò, S, di Giorgio, C, Roselli, R, Bordoni, M, Bellini, R, et al. Combinatorial targeting of G-protein-coupled bile acid receptor 1 and cysteinyl leukotriene receptor 1 reveals a mechanistic role for bile acids and leukotrienes in drug-induced liver injury. *Hepatology.* 2022; 00: 1– 18. <https://doi.org/10.1002/hep.32787>
84. Pholmoo N, Bunchorntavakul C. Characteristics and outcomes of acetaminophen overdose and hepatotoxicity in Thailand. *J Clin Transl Hepatol.* 2019; 7(2): 132– 9.
85. Duah E, Adapala RK, Al-Azzam N, Kondeti V, Gombedza F, Thodeti CK, et al. Cysteinyl leukotrienes regulate endothelial cell inflammatory and proliferative signals through CysLT₂ and CysLT₁ receptors. *Sci Rep.* 2013;3:3274
86. Fiorucci S, Biagioli M, Zampella A, Distrutti E. Bile acids activated receptors regulate innate immunity. *Front Immunol.* 2018;9:1853.
87. El-Swefy S, Hassanen SI. Improvement of hepatic fibrosis by leukotriene inhibition in cholestatic rats. *Ann Hepatol.* 2009;8(1):41–9.
88. Antoniadis CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J. Hepatol.* 2008;49:845–861.
89. Liu Z-X, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 2004;127:1760–1774.
90. Berry PA, Antoniadis CG, Hussain MJ, McPhail MJW, Bernal W, Vergani D, et al. Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 2010;30:733–740.
91. Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Feb;312(2):509-16. doi: 10.1124/jpet.104.075945. Epub 2004 Oct 1. PMID: 15466245.

92. Lee WM. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology*. 2004 Jul;40(1):6-9. doi: 10.1002/hep.20293. PMID: 15239078.
93. Antoniadou CG, Berry PA, Davies ET, Hussain M, Bernal W, Vergani D, Wendon J. Reduced monocyte HLA-DR expression: a novel biomarker of disease severity and outcome in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatology*. 2006 Jul;44(1):34-43. doi: 10.1002/hep.21240. PMID: 16799971.