

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA AVANZATA
XXIV° CICLO**

**“Obesità e steatosi epatica in ratti alimentati con
dieta iperlipidica ed ipercalorica”**

Coordinatore

Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Tutor

Ch.ma Prof.ssa

Rosalba Putti

Candidata

Immacolata Donizzetti

INTRODUZIONE	p. 6
CAPITOLO 1: IL FEGATO	
1.1 Anatomia del fegato	p. 9
1.2 Istologia del fegato	p. 13
CAPITOLO 2: LE CELLULE EPATICHE	
2.1 Gli epatociti	p. 18
2.2 Le cellule di Kupffer	p. 20
2.3 Le cellule stellate epatiche	p. 22
2.4 I fibroblasti	p. 24
2.5 Le pit cells	p. 27
CAPITOLO 3: STEATOSI EPATICA	
3.1 La sindrome del “fegato grasso”	p. 28
3.2 Meccanismi cellulari	p. 29
3.3 Meccanismi subcellulari	p. 33
3.3.1 Il reticolo endoplasmatico e la risposta UPR	p. 33
3.3.2 I mitocondri e la dinamica mitocondriale	p. 39
3.3.3 Fissione mitocondriale	p. 42
3.3.4 Fusione mitocondriale	p. 45
3.3.5 Mitocondri e NAFLD	p. 50
3.3.6 Lo stress ossidativo nel fegato	p. 52
3.3.7 Gli antiossidanti	p. 54
CAPITOLO 4: SCOPO DELLA TESI	p. 59
CAPITOLO 5: MATERIALI E METODI	
5.1 Modelli animali	p. 62
5.2 Preparazione dei campioni istologici	p. 63

5.3	Picro sirius red	p. 64
5.4	Reazione immunoistochimica	p. 64
5.5	Rivelazione dell'apoptosi (Tunel Assay)	p. 68
5.6	Valutazione della steatosi	p. 69
5.7	Detreminazione dei livelli serici di trigliceridi	p. 69
5.8	Detreminazione del contenuto epatico di trigliceridi	p. 70
5.9	Determinazione del contenuto serico di insulina, adiponectina, leptina	p. 71
5.10	Analisi delle proteine mediante Western Blot	p. 72
5.11	Analisi statistiche	p. 76
5.12	Microscopia elettronica	p. 77
5.13	Morfometria	p. 79
5.14	Misura dell'attività respiratoria dei mitocondri	p. 79
5.15	Misura del potenziale di membrana dei mitocondri	p. 81
5.16	Misura della conduttanza protonica basale	p. 82
5.17	Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi	p. 85
5.18	Determinazione dell'attività totale della Carnitina palmitoil transferasi	p. 85
5.19	Detreminazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale	p. 87
	CAPITOLO 6: RISULTATI	p. 89
	CAPITOLO 7: CONCLUSIONI E DISCUSSIONE	p. 126
	BIBLIOGRAFIA	p. 143

INTRODUZIONE

L'obesità è una malattia cronico degenerativa, causata da una combinazione di fattori: ereditari, genetici, metabolici, alimentari, culturali, sociali e psicologici, con ripercussione nell'ingestione esagerata di cibo (Eaton et al., 1988).

Quantità eccessive di grasso corporeo costituiscono un pericolo per la salute, soprattutto per il rischio di insorgenza di alcune malattie, quali ipertensione arteriosa, malattie dell'apparato cardiocircolatorio, diabete, osteoporosi, steatosi epatica che nel complesso sono conosciute come sindrome metabolica (Vague, 1947; Avogadro et al., 1967; Haller, 1977).

Il peso corporeo rappresenta l'espressione tangibile del "bilancio energetico" tra entrate ed uscite caloriche.

L'energia viene introdotta con gli alimenti ed utilizzata dal corpo sia durante il riposo (per mantenere in funzione i suoi organi, quali cervello, cuore, polmoni ecc.), sia durante l'attività fisica (per far funzionare i muscoli).

Se si introduce più energia di quanta se ne consuma, l'eccesso si accumula nell'organismo sotto forma di grasso, determinando un aumento di peso oltre la norma. Se invece si introduce meno energia di quanta se ne

consumata, il corpo utilizza le sue riserve di grasso per far fronte alle richieste energetiche.

Un bilancio energetico cronicamente positivo può comportare l'instaurarsi di uno stato di insulino-resistenza prima nel tessuto adiposo, ed in seguito in tutti i tessuti sensibili all'insulina. Infatti, se la capacità di espansione degli adipociti è bassa, questi divengono ipertrofici, e questa ipertrofia degli adipociti rappresenta una possibile condizione di stress per la cellula, in particolare per il RE (Chunyan Xu et al., 2005) che potrebbe attivare pathway metabolici che comportano insulino-resistenza, rilascio di proteine chemoattrattanti dei macrofagi, e se l'infiammazione persiste, la morte dell'adipocita. L'insulino-resistenza degli adipociti, caratterizzata da una bassa capacità liposintetica ed alta capacità lipolitica, causa un aumento in circolo di acidi grassi liberi, questi ultimi si accumulano in maniera ectopica in molti tessuti bersaglio, tra cui il fegato, comportando lipotossicità ed insulino-resistenza (Lionetti et al., 2009).

La NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), fa riferimento ad una gamma di disfunzioni epatiche, che vanno da una condizione benigna, la steatosi epatica (NAFL), a forme progressive di patologie, come la steatoepatite (NASH), la quale può evolvere in cirrosi e carcinoma epatico. Recenti lavori suggeriscono che la disfunzione di alcuni importanti organelli cellulari può causare l'insorgere di questo tipo di

patologie, gli organelli maggiormente interessati sono il reticolo endoplasmatico (RE) ed i mitocondri (Pessayre et al., 2005). Il malfunzionamento del RE provoca la risposta UPR (risposta della proteina non-ripiegata) che è un meccanismo che in primo luogo tende a ripristinare l'omeostasi del RE comportando una condizione di ripresa dell'intera cellula. Se l'UPR fallisce la cellula andrà incontro all'apoptosi e verrà fagocitata dalle cellule di Kupffer ed altri fagociti attivati in situ dal rilascio di citochine. I mitocondri giocano un ruolo importante nel metabolismo della cellula, essendo il principale sito di ossidazione degli acidi grassi e della fosforilazione ossidativa e, al tempo stesso, il più importante sito cellulare di produzione di ROS. I mitocondri negli epatociti sono abbondanti, infatti occupano circa il 18% dell'intero volume cellulare. Le anomalie mitocondriali associate con la NAFLD includono lesioni ultrastrutturali, riduzione del DNA mitocondriale (mtDNA) che codifica per proteine importanti nella catena di trasporto degli elettroni, diminuzione dell'attività dei complessi della catena respiratoria I, III, IV, V, alterata β -ossidazione (Pérez-Carreras et al., 2003). L'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è uno dei possibili meccanismi che spiegano la disfunzione mitocondriale che si ritrova nei pazienti e nei modelli animali con NAFLD. In queste condizioni si hanno variazioni strutturali e funzionali non solo nell'ambito del singolo mitocondrio ma dell'intero set mitocondriale della

cellula, che nel suo complesso può funzionare come una rete mitocondriale, in cui i singoli elementi non sono più visti come organelli isolati ma in costante comunicazione fra loro tramite meccanismi di fusione e di fissione mitocondriale (Nunnari et al., 1997): grazie a questa dinamica mitocondriale i mitocondri, tramite il citoscheletro, vengono distribuiti nelle varie regioni della cellula o spostati dove vi è un maggiore bisogno energetico, in stretta dipendenza delle esigenze della cellula (Berman et al., 2008).

CAPITOLO 1

IL FEGATO

1.1 Anatomia del fegato

Il fegato è certamente l'organo che possiede tra le più complesse funzioni del corpo umano.

Organo unico (molti sono doppi, ad esempio i reni e i polmoni), il fegato con i suoi 1500 grammi rappresenta la ghiandola più grande del corpo.

Esso ottempera ad un ruolo metabolico di primo piano, fondamentale per il corretto funzionamento dell'intero organismo.

Circa il 6-7% del suo peso è costituito da glicogeno, per un totale approssimativo di 100 grammi.

Strategicamente localizzato a livello della parte alta dell'addome destro, nell'ipocondrio destro, la maggior parte dell'epigastrio ed una piccola porzione di ipocondrio sinistro, il fegato ha come compito fondamentale quello di drenare il sangue di provenienza intestinale, catturarne le sostanze nutritive (derivanti dalla dieta) in esso contenute, metabolizzarle e distribuirle agli altri organi.

È, secondo un'accezione comune, il laboratorio chimico dell'organismo.

Esso riceve sangue sia arterioso, ricco in ossigeno, tramite l'arteria epatica, sia venoso, tramite la vena-porta, che raccoglie il sangue proveniente dall'apparato digerente e dalla milza, ricco di sostanze nutritive; tutto il sangue in uscita dal fegato giunge alle vene sovraepatiche che sboccano immediatamente nella vena cava inferiore.

Nel fegato si trovano inoltre le vie biliari: esse raccolgono la bile che, prodotta dalle cellule epatiche, viene convogliata al coledoco (fig. 1).

In comunicazione con il coledoco vi è il dotto cistico, il quale permette l'entrata e l'uscita della bile dalla colecisti (o cistifellea), formazione grossolanamente a forma di pera situata subito al disotto della faccia inferiore del fegato.

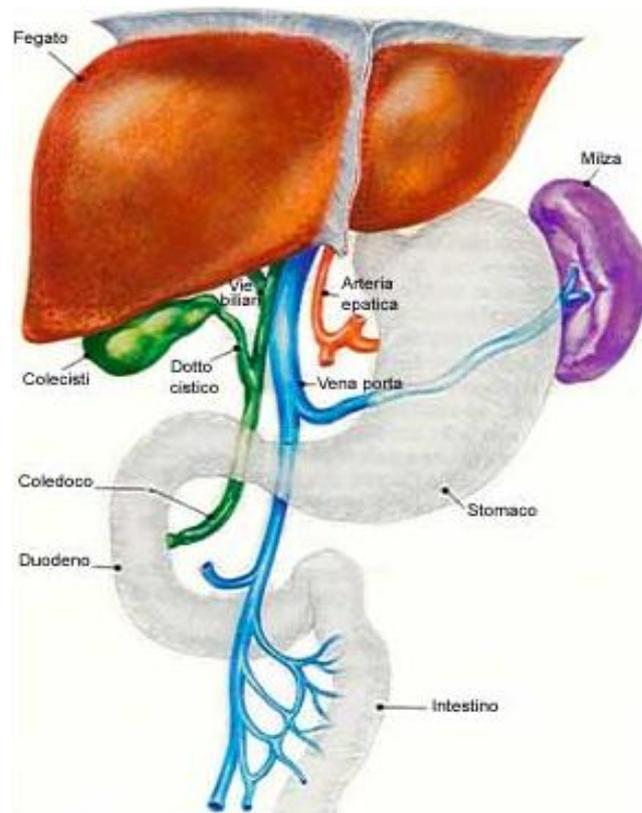


Figura 1: Anatomia del fegato

Le funzioni del fegato sono molteplici, e spaziano dall'attività esocrina fino alla regolazione dei parametri morfo-chimici del sangue. Oltre a secernere la bile per emulsionare i grassi, esso partecipa al metabolismo e accumulo delle diverse sostanze nutritive. Il metabolismo dei carboidrati avviene attraverso tre importanti processi: 1) la gluconeogenesi, che permette la sintesi di glucosio a partire da un composto non saccaridico, quali piruvato, lattato e aminoacidi; 2) la glicogenolisi, cioè la degradazione del glicogeno che permette di ottenere il glucosio grazie soprattutto all'azione della

glicogeno fosforilasi; 3) la sintesi di glicogeno a partire da glucosio mediante l'utilizzo, questa volta, di chinasi. Il fegato utilizza, inoltre, una piccola porzione di acidi grassi liberi captati dal sistema circolatorio per trarne energia tramite un processo di ossidazione, mentre la maggior parte di essi viene convertita in trigliceridi o esteri del colesterolo. Gli aminoacidi subiscono nel fegato la transaminazione e la deaminazione; i loro scheletri carboniosi vengono trasformati in corpi chetonici, acidi grassi e glucosio mentre i gruppi amminici sono eliminati tramite sintesi dell'urea. Il fegato immagazzina le vitamine liposolubili (A, D, K, B12) e il ferro, sintetizza proteine del sangue, quali fibrinogeno e trombina, ed elimina da esso molte sostanze di rifiuto (azione detossificante). Quest'organo contiene poi numerose cellule specializzate del sistema immunitario che agiscono da filtro nei confronti degli antigeni trasportati dal sistema della vena porta.

Questo organo così "affascinante" e complesso può, però, ammalarsi molto più spesso di quanto pensiamo.

La sua dimensione è tale che solo il 30% circa del fegato è necessario per svolgere le funzioni che gli competono. Ne deriva che i primi sintomi di malattia epatica si manifesteranno solo quando più del 70% delle cellule epatiche sia stato in qualche modo danneggiato, cosa che richiede tempo. Inoltre il fegato è l'unico organo del nostro organismo che rigenera, cioè è in grado di ricrescere. Purtroppo, però, soprattutto quando i fattori lesivi che aggrediscono il fegato lo fanno in modo costante e cronico, senza dare

segnali di allarme, e ciò purtroppo accade molto spesso, la crescita del fegato può essere anomala e dare luogo a grosse cicatrici che sconvolgono tutta l'anatomia e la circolazione del fegato, dando luogo a quella che viene chiamata cirrosi (fig. 2).

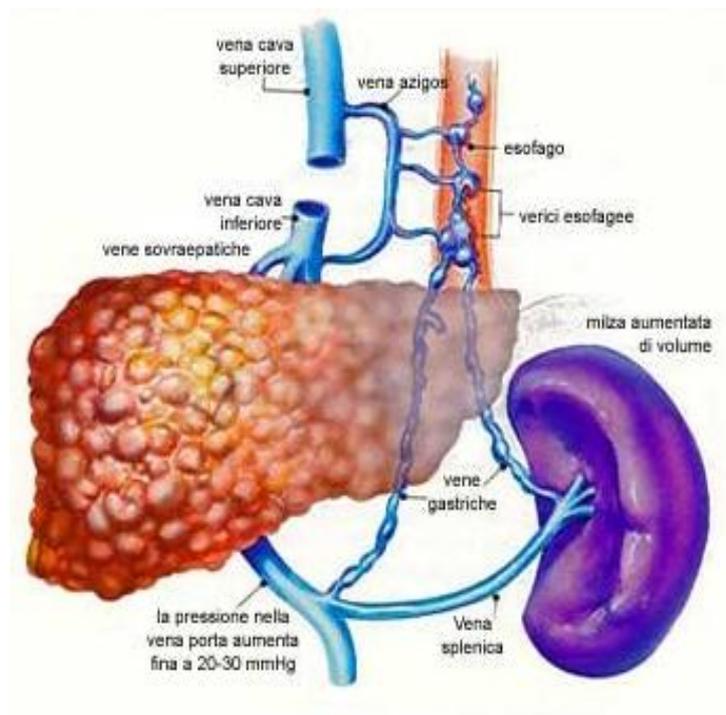


Figura 2: Fegato affetto da cirrosi avanzata

1.2 Istologia del fegato

Il fegato è completamente rivestito da una tonaca sierosa di derivazione peritoneale e, al di sotto di essa, si trova un denso strato di tessuto connettivo, detto capsula di Glisson, in cui decorrono vasi sanguigni, vasi linfatici e nervi che penetrano nel parenchima sottostante. In corrispondenza

dell'ilo del fegato, la capsula penetra ramificandosi più volte e delimitando aree più piccole dette lobuli con forma poligonale a base esagonale.

Il lobulo epatico è l'unità strutturale del fegato, ai suoi vertici è presente la triade portale e al centro una vena, la vena centrale o centro-lobulare. Le triadi sono così denominate perché vi decorrono tre vasi: la vena portale epatica, l'arteria epatica e il dotto epatico.

Le vene centrali si uniscono per formare le vene epatiche, che escono dal fegato dalla sua superficie posteriore e superiore e si gettano nella vena cava inferiore.

Cordoni epatici si irradiano dalla lacuna contenente la vena centrale di ogni lobulo come i raggi di una ruota. I cordoni epatici sono composti da epatociti, le cellule funzionali del fegato. Gli spazi tra i cordoni epatici sono vasi capillari sanguigni chiamati sinusoidi epatici per la loro forma irregolare.

I sinusoidi sono rivestiti da uno strato di endotelio fenestrato molto sottile formato da cellule endoteliali. Nel lume dei sinusoidi, spesso vicino alla parete, si ritrovano le cellule fagocitiche epatiche (cellule di Kupffer). Tra le facce apicali degli epatociti si formano i canalicoli biliari formati dalle membrane apicali degli epatociti, che presentano al centro una doccia. Dalla giustapposizione delle docce di più cellule contigue si forma la parete del canalicolo biliare che convoglia la bile in direzione opposta al flusso

sanguigno, verso gli spazi portali, e poi in dotti di calibro maggiore, sino al coledoco, e da questo, all'intestino.

La esile membrana basale dei sinusoidi e la superficie degli epatociti sono separati da uno spazio interstiziale, lo spazio di Disse o spazio perisinusoidale. Nello spazio di Disse sono presenti altre cellule, le cellule stellate o cellule di ITO, implicate non solo nella secrezione di elementi della matrice extracellulare, ma anche nell'accumulo di lipidi e vitamina A.

L'unità funzionale epatica è l'acino epatico, che è di difficile visualizzazione, ma è identificabile come una zona di epatociti di forma ellissoidale, che contornano e circondano le arterie epatiche e le venule portali, dove esse si anastomizzano nei sinusoidi. L'acino, quindi, si estende in due lobuli contigui e comprende gli epatociti contenuti tra due spazi portali adiacenti (Rappaport et al., 1954). Quest'organizzazione funzionale comporterebbe che la zona 1 dell'acino è quella con la massima concentrazione di soluti e sarebbe adibita alla sintesi proteica nel RER, con richiesta maggiore di amminoacidi e metaboliti; la zona 2 intermedia; la zona 3 minima concentrazione di soluti, assorbiti in buona parte dalle zone precedenti, adibita alla sintesi di lipidi, che richiedono un minore apporto di O₂.

L'acino è suddivisibile in tre zone concentriche in base alla distanza dai vasi nutritivi di cui quella più vicina allo spazio portale, e di conseguenza vicino all'arteria, è maggiormente ossigenata e le cellule in essa presenti sono le

prime a ricevere le sostanze presenti nel sangue portale proveniente dall'intestino tenue. La tradizionale regione centrozonale del lobulo in realtà è, quindi, la parte periferica (zona 3) di 2 o più acini; ciascuna triade portale, invece, è concepita come il centro, e non come la periferia, di un'unità funzionale microvascolare o acino.

CAPITOLO 2

LE CELLULE EPATICHE

Nel fegato si riconoscono principalmente quattro tipi di cellule:

- 1) Gli epatociti: costituiscono la maggior parte dell'intero organo e sono il centro di tutte le attività funzionali del tessuto epatico.
- 2) Le cellule sinusoidali endoteliali: delimitano il percorso del sangue dall'ingresso nell'organo alla sua uscita, permettendo lo scambio continuo di molecole in esso contenute con gli epatociti.
- 3) Le cellule di Kupffer: sono i macrofagi epatici, hanno il compito di eliminare cellule morte ed adempiono ad altre importanti funzioni legate al sistema immunitario.

- 4) Le cellule stellate (HSC) o di Ito: rivestono un ruolo importante nel metabolismo della vitamina A e sono responsabili della deposizione di matrice extracellulare

Tuttavia, altre cellule non residenti possono essere osservate in condizioni non fisiologiche o di malattia. Un esempio sono i mastociti.

I mastociti sono cellule del sistema immunitario che si originano nel midollo osseo e in seguito migrano nel torrente circolatorio dove raggiungono differenti organi del corpo umano. I mastociti rappresentano un gruppo di cellule eterogeneo per funzione, ricche d'enzimi che entrano in gioco principalmente nel danno epatico acuto.

L'immagine mostrata rappresenta una porzione di tessuto epatico di un paziente affetto da epatite da virus C e concomitante presenza di steatosi. Le cellule colorate in marrone sono i mastociti. Essi sono stati richiamati nell'organo dalla presenza di uno stato patologico (fig. 3).

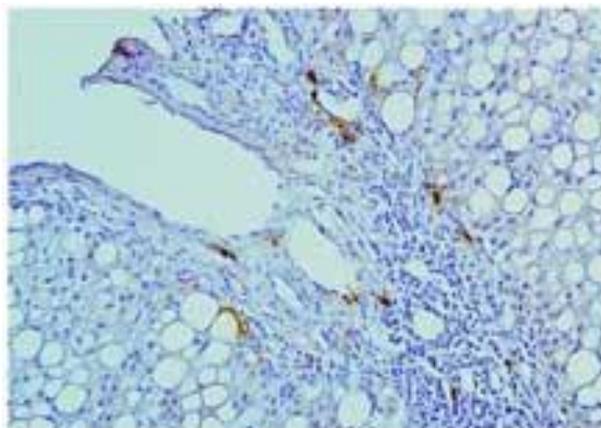


Figura 3: Presenza di mastociti in tessuto epatico di paziente affetto da epatite C e steatosi

2.1 Gli epatociti

Gli epatociti sono sicuramente le cellule più numerose e presentano, in condizioni normali, forma poliedrica, contorni ben definiti e misurano circa 20 – 25 μm . Queste cellule sono disposte in lamine costituite da circa 20 cellule, che dalla periferia del lobulo si spingono fino alla vena centrolobulare.

Le facce degli epatociti sono a stretto contatto fra loro e formano dalla faccia apicale i canalicoli biliari (in questo caso sono dette poli biliari), mentre la faccia rivolta verso le pareti sinusoidali forma il polo vascolare. Sulle facce degli epatociti rivolte verso i sinusoidi, sono presenti piccole vescicole e numerosi microvilli che si proiettano nello spazio di Disse e aumentano la superficie della membrana plasmatica a contatto con il plasma. Le superfici cellulari rivolte verso i sinusoidi sono più ampie rispetto ai poli biliari; ciò è importante se si considera che gli epatociti sono maggiormente impegnati nei processi di assorbimento e secrezione che avvengono a livello del polo vascolare piuttosto che nella secrezione della bile.

Gli epatociti sono uniti da giunzioni serrate per impedire che la bile si infiltri tra gli spazi intercellulari in quanto tossica, da desmosomi e giunzioni comunicanti che suggeriscono l'attuazione di un accoppiamento elettrico.

Il nucleo è disposto al centro della cellula e contiene uno o più nucleoli ben sviluppati, spesso sono presenti due nuclei all'interno di una stessa cellula.

Al pari delle altre cellule, nel citoplasma epatocitario si trovano tutti gli organuli cellulari che qui assumono una localizzazione precisa in relazione ad una specifica funzione dell'epatocita. Ad esempio, le vescicole dell'apparato di Golgi sono localizzati in prossimità del polo biliare in quanto sono impegnate in funzioni secretive.

Il reticolo endoplasmatico è presente in entrambe le sue forme in maniera abbondante ma variabile a seconda della funzione che deve svolgere l'epatocita in quel momento. Sappiamo infatti che il reticolo endoplasmatico liscio ha sulla sua membrana gli enzimi implicati nella sintesi del colesterolo a partire dai lipidi assorbiti dal sangue attraverso il polo vascolare dell'epatocita. Il reticolo endoplasmatico rugoso e i ribosomi liberi sono invece impegnati nella sintesi delle proteine plasmatiche, quali albumina e fibrinogeno, riversate in circolo attraverso il polo vascolare.

I mitocondri sono numerosi e di diversa forma (sferica, bastoncellare o filamentosa) a seconda della diversa posizione che la cellula occupa nel lobulo e quindi della sua attività metabolica.

Come in precedenza riportato, è da tener conto che la struttura e il metabolismo degli epatociti variano in rapporto alla loro distanza dall'afflusso del sangue dallo spazio portale. Nell'acino le cellule epatiche in posizione più periferica (zona 1) hanno un metabolismo più elevato e un maggior numero di mitocondri poiché maggiormente favorite a ricevere sangue arterioso rispetto agli epatociti delle zone intermedie e delle zone

circostanti la vena centrolobulare (zona 3). Inoltre, gli enzimi glicolitici sono maggiormente presenti negli epatociti disposti vicino alla vena centrale, mentre quelli gluconeogenici sono espressi principalmente negli epatociti in zona periportale.

Nei preparati istologici si osservano piccole aree citoplasmatiche chiare corrispondenti a zone di accumulo di glicogeno. Nel citoplasma epatocitario sono inoltre visibili anche goccioline lipidiche, la cui quantità è inversamente proporzionale a quella del glicogeno.

In diversi casi patologici, quali steatoepatiti, gli epatociti presenti per lo più in zona pericentrale, risultano gonfi e hanno dimensioni duplicate o triplicate rispetto a quelli adiacenti; mostrano inoltre un citoplasma chiaro con nucleo centrale (talvolta picnotico) e corpi di Mallory (inclusioni eosinofile) . Questo assetto morfologico può, a volte, corrispondere a quelli che sono chiamati epatociti balloons. La causa di tali modifiche risiede in una degenerazione a livello citoscheletrico, probabilmente nei filamenti intermedi (Lackner et al., 2008), e/o accumuli di ubiquitina e proteine ubiquinate (Rangwala et al., 2011).

2.2 Le cellule di Kupffer

Nel fegato sono presenti macrofagi specializzati, appartenenti al sistema reticoloendoteliale, detti cellule di Kupffer, le quali sono localizzate vicino alla parete dei sinusoidi e rappresentano circa il 20 % delle cellule presenti in

un fegato sano. Hanno un citoplasma voluminoso, superficie irregolare ricca di microvilli, numerosi lisosomi e sono capaci di fagocitare batteri e detriti cellulari, assicurando una difesa immunitaria, ma anche eritrociti, giocando un ruolo nel metabolismo del ferro con l'accumulo di emosiderina e ferritina. Le cellule di Kupffer svolgono un ruolo importante sia durante la rimozione di parti del fegato, producendo citochine quali IL-6 e TNF- α che promuovono l'avvio della crescita del fegato attraverso l'attivazione di STAT-3 e NF- κ B; sia durante un processo infiammatorio, producendo TGF- β che inibisce la proliferazione degli epatociti o ne induce l'apoptosi (Zhongjun et al., 2007).

Studi in ratti leptina - resistenti (fa / fa) hanno fornito informazioni sulla possibilità che una disfunzione delle cellule di Kupffer potrebbe essere coinvolta nella patogenesi della NAFLD (Nonalcoholic Fatty Liver Disease) (Yang, 1997) . I ratti fa / fa sono obesi e insulino - resistenti, sviluppano fegati grassi e sono particolarmente vulnerabili al danno epatico indotto da lipopolisaccaridi batterici; infatti, vari trattamenti che inibiscono l'attivazione delle cellule di Kupffer, proteggono il fegato da questo tipo di lesione.

La disfunzione di queste cellule, è probabilmente dovuto al fenotipo anormale che queste cellule sviluppano durante il deficit di leptina, piuttosto che ad una loro diminuzione. Questo concetto è supportato da prove che i macrofagi derivati da topi leptina deficienti, mostrano una riduzione dell'attività fagocitaria in vitro che viene invece migliorata dall'aggiunta di

leptina ai terreni di coltura (Loffreda 1998). Le cellule di Kupffer si mettono in evidenza con reazioni immunocitochimiche contro CD68, una glicoproteina presente nei lisosomi ed endosomi, e sulla superficie della cellula. Essa è una proteina integrale di membrana, membro della famiglia dei recettori scavenger, che funzionano per eliminare i detriti cellulari, promuovere la fagocitosi e mediare il reclutamento dei macrofagi (Leong et al., 2003).

2.3 Le cellule stellate epatiche

Le cellule stellate epatiche (HSC), note anche come cellule di ITO o fat-storing, sono periciti presenti nello spazio perisinusoidale del fegato aventi lunghe estroflessioni che conferiscono la tipica forma a stella.

Contengono, all'interno di goccioline lipidiche citoplasmatiche, grandi quantità di vitamina A. Ciò avviene perché, dopo l'assorbimento intestinale, a livello epatocitario giungono gli esteri del retinolo che vengono poi idrolizzati rilasciando il retinolo che, secreto dall'epatocita, viene trasferito alle cellule stellate. Quest'ultime lo captano grazie alla proteina CRBP-1 (cellular retinol binding protein-1) e lo trattengono nel citoplasma, dopo averlo nuovamente esterificato tramite legame con molecole lipidiche, come l'acido palmitico.

Nel fegato sano, le cellule stellate sono descritte come in uno stato di quiescenza e rappresentano il 5-8% del numero totale delle cellule del

fegato. Ogni cellula ha prolungamenti che si estendono dal corpo cellulare e avvolgono i sinusoidi. Quando il fegato è danneggiato, gli epatociti rilasciano sostanze ad azione mitogena, mentre le cellule di Kupffer rilasciano specie reattive dell'ossigeno (Takeyama et al., 1996). Tutti questi fattori agiscono in maniera paracrina sulle cellule stellate che vengono attivate.

La cellula stellata attivata è caratterizzata da proliferazione, perdita della forma stellata, contrattilità e chemiotassi, acquisendo così un fenotipo simile a quello miofibroblastico, reso evidente da un incremento nell'espressione di α -SMA (actina specifica del muscolo liscio) (Kinnman et al., 2003). In questo stato, mentre la quantità di vitamina A accumulata diminuisce progressivamente, aumenta la produzione di collagene responsabile della formazione di tessuto cicatriziale (Knittel et al., 1999). Questo aumento nella produzione di collagene è attribuibile al fattore TGF- β il quale agisce in maniera reversibile su queste cellule, infatti una soppressione del suo pathway di segnalazione riduce in maniera evidente la fibrosi in condizioni sperimentali (Qi et al., 1999). I componenti della matrice extracellulare sono laminine e collagene di tipo IV, il cui turnover viene regolato tramite produzione di metalloproteasi e dei loro inibitori.

Nella regolazione dell'attivazione delle HSC sono coinvolte anche adipocitochine quali leptina, che ne induce proliferazione tramite

l'attivazione della via JAK/STAT, e adiponectina, che avrebbe invece effetto opposto (Xiaokun Ding et al., 2005).

Le cellule stellate epatiche appartengono, dunque, al gruppo di cellule con attività fibrogenetica, ma devono essere distinte dai miofibroblasti periportali. Molti ricercatori sostengono che nei fegati di ratto sani le HSC sono distribuite nel parenchima epatico, mentre i miofibroblasti si trovano a livello portale, nelle pareti delle vene centrolobulari e solo occasionalmente nel parenchima. In presenza di lesioni acute, si riscontra un aumento principalmente per le HSC, mentre il numero di miofibroblasti risulta quasi invariato. Nelle fasi iniziali della fibrosi, sia le HSC che i miofibroblasti sono stati individuati all'interno del tessuto cicatriziale che si sta sviluppando. Negli stadi avanzati, invece, le HSC sono presenti soprattutto nell'interfaccia parenchimale delle cicatrici, mentre i miofibroblasti si trovano principalmente all'interno delle cicatrici (Knittel et al., 1999; Skalli et al., 1989).

2.4 I fibroblasti

Il tessuto connettivo portale del fegato sano contiene fibroblasti quiescenti (fibroblasti periportali), implicati nella sintesi delle componenti della matrice extracellulare. Queste cellule mostrano un citoplasma vacuolizzato e un nucleo ellittico con uno o due nucleoli. È stato dimostrato il coinvolgimento dei fibroblasti periportali nella fibrosi indotta dalla legatura dei dotti biliari

(una metodica che simula molte caratteristiche istologiche della fibrosi biliare e della cirrosi). Infatti, soprattutto nelle fasi iniziali, si nota una proliferazione dei fibroblasti che si dispongono intorno alle strutture biliari (Kinnman et al., 2003; Tuchweber et al., 1996), mentre nelle fasi avanzate essi divengono miofibroblasti e depongono gran quantità di matrice extracellulare nella zona portale, ancor prima dell'intervento delle cellule stellate.

Sono state individuate anche cellule circolanti con caratteristiche simili a quelle fibroblastiche, i cosiddetti "fibrociti", che non sono cellule del connettivo propriamente detto (Bucala, 1994). Queste cellule dal sangue periferico possono rapidamente entrare nel sito danneggiato e, probabilmente, agire come fonte di fibroblasti durante il processo riparatorio. Non ci sono, tuttavia, evidenze su un possibile coinvolgimento dei fibrociti nell'ambito della fibrosi epatica.

A livello fenotipico, le differenze tra i fibroblasti quiescenti e i miofibroblasti sono tre:

1. fasci di filamenti contrattili;
2. ampi siti di legame cellula-matrice;
3. formazione di giunzioni tra le cellule stesse.

Il differenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti può essere distinto in 2 fasi:

1. La prima fase è quella in cui i fibroblasti acquisiscono capacità migratorie grazie allo sviluppo di filamenti contrattili. Queste fibre sono inizialmente composte da actina globulare e permettono di generare piccole forze di trazione. Si parla a questo stadio di proto-miofibroblasti. Questo iniziale cambiamento fenotipico è accompagnato da variazioni nella composizione e nelle proprietà meccaniche della matrice extracellulare.
2. Nell'ultima fase, con l'aumentare dello stress che la matrice extracellulare subisce in seguito al suo rimodellamento, i proto-miofibroblasti si sviluppano ulteriormente in miofibroblasti, esprimendo α -SMA, l'actina del muscolo liscio. L'incorporazione di molecole di α -SMA nelle fibre da stress aumenta notevolmente l'attività contrattile dei fibroblasti (Hinz et al., 2001). Inoltre l' α -SMA agisce, tramite l'attivazione del fattore nucleare (NF)- κ B, nella sovraespressione del gene codificante per il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), consentendo ai miofibroblasti di intervenire, a differenziamento ultimato, nel processo di fibrogenesi. L'espressione di α -SMA è regolata grazie all'azione congiunta del fattore di crescita TGF- β 1 e di proteine della ECM come la fibronectina.

2.5 Le pit cells

In aggiunta alle cellule di Kupffer, sono presenti nel fegato altre cellule con funzioni immunitarie: un gruppo di linfociti chiamati pit cells. Essi corrispondono alle cellule natural killer di altri organi e insieme costituiscono la famiglia LGL (large granular lymphocytes). Probabilmente originarie del midollo osseo, circolano attraverso il sangue e giungono nel fegato, dove il loro spessore diminuisce e aumenta il numero di granuli. Qui sono in grado di legare e uccidere diverse cellulari tumorali, tramite esocitosi di granuli contenenti perforina / granzima, o cellule infettate da virus, tramite il rilascio di citochine e l'attivazione dell'apoptosi (Nakatani 2004). Rimangono nel fegato circa due settimane e la loro sopravvivenza è strettamente dipendente dalla presenza delle cellule di Kupffer (Vanderkerken at al., 1995).

CAPITOLO 3

STEATOSI EPATICA

3.1 La sindrome del “fegato grasso”

Tra le molteplici funzioni del fegato, un ruolo di primaria importanza è ricoperto dallo smistamento e dalla sintesi dei grassi. In particolari condizioni di sovraccarico funzionale, tale metabolismo può andare in crisi favorendo l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti. Quando il contenuto lipidico del fegato supera il 5% del suo peso si parla di steatosi epatica o più comunemente di fegato grasso (Reddy, 2006).

La steatosi epatica è definita da alcuni "malattia del benessere", perchè favorita dalla dieta ipercalorica e troppo ricca di grassi saturi, tipica della nostra società consumistica. Caratterizzata da accumulo di lipidi, in particolare i trigliceridi, la steatosi riguarda oggi sempre più persone: ne soffre circa un quarto della popolazione adulta nei Paesi occidentali, ma nelle persone più a rischio, cioè diabetici o con colesterolo e trigliceridi elevati, le percentuali salgono al 70-80 per cento (non a caso si associa alla sindrome metabolica), mentre fra gli adulti in sovrappeso arriva addirittura al 90 per cento. Il fegato grasso non risparmia neppure i bambini: colpisce un quinto di quelli con chili di troppo.

La AFLD (*alcoholic fatty liver disease*) è dovuta all'abuso di alcool, mentre, si è già accennato alla NAFLD (*Nonalcoholic fatty liver disease*) che si sviluppa invece in soggetti con consumo modesto (inferiore a 20 g/die) o nullo di alcolici. La steatosi è associata al sovrappeso nella stragrande maggioranza dei casi, mentre alterazioni di tipo metabolico sono riscontrabili nel 9-12% dei soggetti diabetici e nel 20-40% di quelli dislipidemici (Grattagliano et al., 2006).

3.2 Meccanismi cellulari

Secondo la teoria denominata “*two hits*”, difetti genetici, obesità, stile di vita e insulino-resistenza sono tra i meccanismi primari (*first hit*) che possono influire sull'insorgenza della steatosi epatica, mentre alterazioni nell'attività mitocondriale, stress ossidativo e infiammazione sono processi secondari (*second hit*), i quali potrebbero causare la progressione di tale patologia (Portincasa et al., 2005; Day, 1998).

Questa patologia è stata considerata per molto tempo una condizione benigna e stazionaria. In realtà, essendo asintomatica, la sua diagnosi avviene tardivamente, quando ha già raggiunto stadi più avanzati. La steatosi può infatti sfociare nella *NASH* (steatoepatite non alcolica, caratterizzata non solo da accumulo di lipidi ma anche da un quadro infiammatorio più o meno

grave), *fibrosi* (formazione di tessuto cicatriziale dovuto ad un' eccessiva deposizione di collagene) e *cirrosi* (formazione di noduli rigenerativi di parenchima epatico separati da setti fibrotici e conseguente cambiamento dell'architettura epatica) (Browning et al., 2004) (fig. 4).

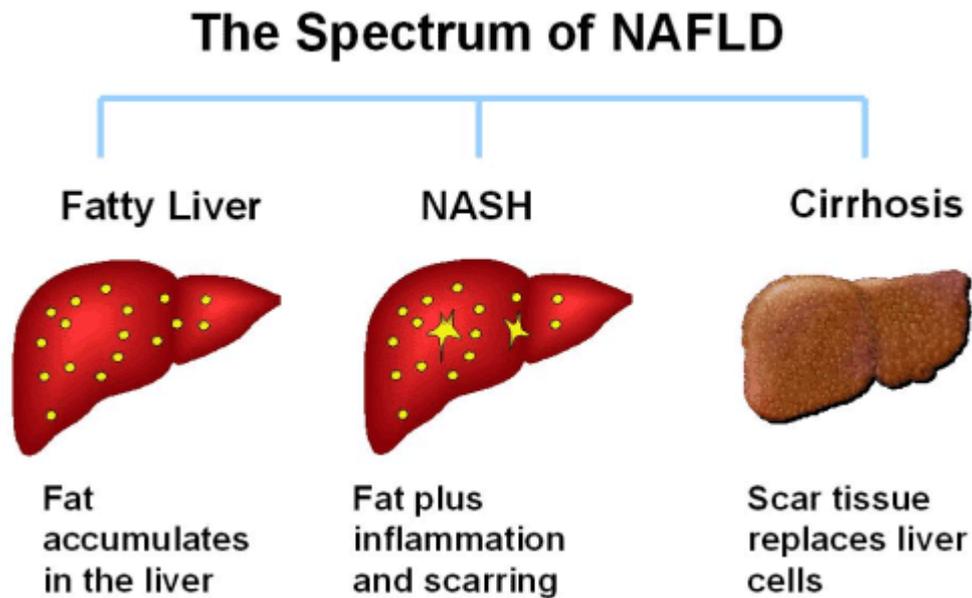


Figura 4: Evoluzione della malattia del fegato grasso

La comparsa dell'infiammazione è dovuta all'azione lipotossica dei trigliceridi i quali alterano la funzionalità dei mitocondri, determinando un aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e portando all'insorgenza di una risposta infiammatoria da parte delle cellule di Kupffer. Le citochine infiammatorie così prodotte stimolano l'attivazione dei fibroblasti e delle cellule stellate che producono così grandi quantità di

collagene, determinando l'instaurarsi di uno stato fibrotico (Gramlich et al., 2004).

In condizioni fisiologiche, la lesione epatica viene rapidamente riparata e il materiale fibrotico depositato, viene degradato per permettere la rigenerazione del tessuto parenchimale; lo spazio di Disse contiene una matrice a bassa densità costituita da collagene di tipo I, III e IV (quest'ultimo ha una struttura a “maglie aperte” che consente un ottimo scambio di soluti).

Quando però il danno persiste, i meccanismi fibrogenici di riparazione sono continuamente attivati depositando elevate quantità di matrice extracellulare la cui composizione cambia, soprattutto nelle zone periportalì e perisinusoidali. Qui il tessuto fibrotico viene ad essere costituito soprattutto da proteoglicani, acido ialuronico, collagene di tipo I e III, cioè collagene fibrillare che rende più difficili gli scambi di soluti. Inoltre vengono a mancare quei normali processi di degradazione delle componenti danneggiate dovuti ad una fine regolazione tra l'azione delle metalloproteasi (endopeptidasi zinco-calcio dipendenti) e i loro inibitori (Dixon et al., 2001).

La fibrosi comporta alterazioni della funzionalità epatica a seconda di dove si va a localizzare:

- se la disposizione è pericellulare, danneggia la nutrizione delle cellule e causa un'atrofia epatocellulare;

- all'interno dello spazio di Disse, ostruisce il libero passaggio di sostanze dal sangue agli epatociti;
- intorno alle venule epatiche e agli spazi portali altera la vascolarizzazione del fegato.

Dalla fibrosi può evolvere o meno la *cirrosi* in base al tipo di danno causato e a come il fegato risponde. Potrebbero quindi essere implicati in questa evoluzione, polimorfismi di geni implicati nella risposta immunitaria e fibrogenica (Bataller, 2003). La cirrosi è una condizione patologica che consegue a tutta una varietà di epatopatie croniche irreversibili che danno luogo a diffusa distruzione del parenchima epatico con necrosi degli epatociti e dei lobuli funzionali, che viene sostituito con tessuto collageneo cicatriziale con distorta architettura lobulare e vascolare del fegato. Le principali complicanze cliniche della cirrosi comprendono ipertensione portale ed epatocarcinoma (Alba & Lindor , 2003).

La biopsia epatica ha permesso la valutazione e stadiazione di queste epatopatie (Brunt, 1999).

Inizialmente l'accumulo di lipidi, può interessare circa il 50% degli epatociti, rappresentando una condizione steatosica ancora benigna. I lipidi possono essere accumulati in macrovescicole, ossia un unico grande vacuolo che disloca lateralmente il nucleo, o in microvescicole, cioè piccole gocce lipidiche che circondano il nucleo centrale.

Con l'aumentare degli epatociti coinvolti (più del 66 %), inizia il quadro necroinfiammatorio distinto in tre gradi di gravità:

1. La steatosi risulta essere soprattutto macrovescicolare, si osservano rari epatociti ballooning, perlopiù disposti nella zona 3 dell'acino epatico. L'infiammazione a livello parenchimale è acuta o cronica, mentre non risulta infiammazione a livello portale.
2. Sono presenti sia micro che macro-vesciole e gli epatociti ballooning sono numerosi. L'infiammazione a livello parenchimale richiama leucociti polimorfonucleati ed è spesso associata a fibrosi pericellulare; l'infiammazione portale risulta essere lieve o moderata.
3. La steatosi interessa la totalità dell'acino, con aggravamento della fibrosi e marcata infiammazione parenchimale, soprattutto nella zona 3 e perisinusoidale, mentre la zona portale è interessata da infiammazione moderata; questa può sfociare in cirrosi (Chalasani et al., 2008).

3.3 Meccanismi subcellulari

3.3.1 Il reticolo endoplasmatico e la risposta UPR

In seguito a sovraccarico cronico di nutrienti, gli adipociti del tessuto adiposo bianco (WAT) divengono ipertrofici, aumentano il loro volume a causa del continuo accumulo di grassi, e subiscono stress ossidativo e

meccanico. In seguito all'ipertrofia del tessuto adiposo si instaurano dei fenomeni infiammatori e di insulino-resistenza, che successivamente coinvolgono anche il fegato (Bays et al., 2008). I fattori di stress precedentemente descritti, comportano una disfunzione degli organelli, in particolare del reticolo endoplasmatico, che perde la sua omeostasi, accumulando al suo interno le proteine neo-sintetizzate e non correttamente strutturate, situazione definita stress del RE. L'eccessiva quantità di proteine non ripiegate o mal ripiegate è ritraslocata nel citoplasma e degradata dal sistema di degradazione ubiquitina/proteasoma (ERAD). Quando la quantità di proteine non ripiegate eccede la capacità del sistema ERAD, queste si accumulano nel RE e stimolano la morte cellulare (Nakagawa et al., 2000). In risposta a questo stress iniziale, viene attivata l'*UPR*, ossia risposta della proteina non ripiegata (unfolding protein response). Questo processo è mediato da sensori presenti sulla membrana del reticolo endoplasmatico, ossia PERK (la chinasi del fattore d'inizio della trascrizione 2α , eIF2 α , simile alla PKR), IRE-1 (l'enzima che richiede l'inositolo-1) e ATF-6 (il fattore-6 che attiva la trascrizione).

In particolare la chinasi PERK, in condizioni di stress del RE, oligomerizza, si autofosforila e fosforila a sua volta l'eIF2 α , che in queste condizioni non può più operare la sintesi proteica. In tal modo si ottiene un'attenuazione della traduzione che cerca di non ingolfare il RE con altre proteine (Yan et al., 2002). L'enzima IRE-1, attivato tramite autofosforilazione, rimuove 26

nucleotidi dal mRNA codificante per il fattore trascrizionale XBP-1 (X - box - binding protein). Il fattore ATF – 6, attivato mediante proteolisi, migra nel nucleo dove agisce sull' espressione di geni bersaglio (Lin et al., 2008; gentile and Pagliassotti, 2008).

Lo stress del RE porta all'attivazione di due vie:

1. la via di JNK;
2. la via di NF-kB.

NF-kB si trova nel citosol legata al suo inibitore *IKB*; la chinasi dell'inibitore *IKB*, *IKBKB*, andando a fosforilare l'inibitore, fa sì che questo si stacchi dal fattore NF-kB e in questo modo NF-kB è attivo.

IKBKB, inoltre, insieme a *JNK*, va a fosforilare le IRS (insuline responsive site, substrati del recettore dell'insulina) che vengono così inattivate, inattivando la via di segnalazione dell'insulina (Schröder, 2008).

L'insulina, infatti, agisce tramite un recettore transmembrana che ha attività intrinseca tirosin-chinasica e quando l'insulina vi si lega, il recettore subisce un cambiamento conformazionale così che il sito attivo (catalitico) vada a transfosforilare su Tyr l'altro sito. Quando le tirosine del sito catalitico sono fosforilate, il recettore è competente a fosforilare su tirosina altre proteine tra cui le IRS; le IRS così fosforilate diventano oggetto di interesse di altre proteine che si legano a esse. Una di queste è la *fosfatidil inositolo 3 chinasi* (PI3K), un dimero con una subunità catalitica di 110 KDa e una subunità regolatoria di 85 KDa. La subunità regolatoria si lega alla IRS e quella

catalitica viene fosforilata e attivata dal recettore dell'insulina. La subunità catalitica attivata, può a sua volta fosforilare il *fosfatidil inositolo 4,5 difosfato* a *fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato* che diventa oggetto di interesse di altre due chinasi che sono la PDK1 e la PDK2 (chinasi dipendenti dal fosfatidil inositolo). Queste due chinasi fosforilano rispettivamente su Ser e Thr un'altra chinasi, la chinasi AKT o PKB (Ji-Wu Han et al., 2010).

Quando c'è ER-STRESS, quello che succede con l'attivazione di queste due vie è che JNK e IKK fosforilano le IRS non su Tyr ma su Ser 307, di conseguenza, IRS non si lega più in modo adeguato al recettore dell'insulina e la via di segnalazione di quest'ormone è bloccata.

Ciò comporta una mancata risposta degli adipociti nei confronti dell'insulina, di fatto l'*insulino – resistenza*. In tale condizione, gli adipociti rilasciano acidi grassi liberi che legano e attivano recettori Toll- like 4, provocando una secrezione di MCP-1 (proteina chemioattrattante i monociti -1), una molecola che stimola l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo, e la produzione e secrezione di TNF- α (fattore di necrosi tumorale α) che permette di innescare la risposta infiammatoria. I macrofagi residenti formano delle strutture simili a corone intorno agli adipociti morenti e ne fagocitano le gocce di grasso. A loro volta i macrofagi residenti producono MCP-1 che richiama i monociti/macrofagi provenienti dal sangue che rilasciano anch'essi MCP-1, TNF- α ed inducono iNOS (sintetasi inducibile

dell'ossido nitrico) amplificando la risposta infiammatoria in tutto il tessuto adiposo (Lionetti et al., 2009)

A questo punto i lipidi in eccesso vengono riversati in circolo, giungendo al fegato, il quale non è più in grado di produrre *VLDL*, lipoproteine a bassissima densità costituite da trigliceridi e apoB. Infatti, da studi di Tsuguhito Ota nel 2008, si è visto che se i lipidi giunti al fegato aumentano in maniera modesta, apoB verrà prodotta maggiormente nonostante lo stress che subisce il reticolo endoplasmatico. Invece un aumento più significativo dei lipidi, comporta un maggiore stress per il reticolo endoplasmatico che riduce così la secrezione di apoB. Ciò fa sì che i trigliceridi e gli esteri del colesterolo si accumulino negli epatociti, provocando, come negli adipociti, insulino-resistenza.

In circolo aumentano anche i livelli di *leptina*, una citochina derivata dagli adipociti, che stimola il rilascio dagli epatociti di una citochina pro-infiammatoria, l'osteopontina. Quest'ultima lega integrine di membrana e richiama cellule della linea macrofagica inducendo in esse la produzione di fattori infiammatori. Inoltre, i macrofagi così attivati, producono essi stessi gran quantità di osteopontina (Ramaiah, 2008).

Diminuiscono invece i livelli ematici di *adiponectina*, un' adipochina che non solo migliora la sensibilità dei tessuti all'insulina, ma ha anche funzioni anti-infiammatorie inibendo la sintesi e l'azione di TNF- α (Tsochatzis, 2009).

A livello epatico, avvengono probabilmente gli stessi meccanismi precedentemente descritti per il tessuto adiposo portando ad insulino-resistenza, attivazione di fattori trascrizionali, quali AP-1, e attivazione trascrizionale di geni coinvolti nella produzione di chemochine e citochine, quali MCP-1. Le cellule di Kupffer attivate da questi fattori, rilasciano a loro volta TGF- β , MCP-1 e IL-6 che amplificano il processo infiammatorio tramite il reclutamento di altre cellule di Kupffer.

In condizioni di stress prolungato del reticolo endoplasmatico, UPR attiva l'*apoptosi* degli epatociti, i quali formano corpi apoptotici successivamente fagocitati dalle cellule di Kupffer. È stato dimostrato che anche le cellule stellate possono fagocitare i corpi apoptotici, internalizzando i frammenti di DNA epatocitario. Questo CpG DNA viene riconosciuto, nelle cellule stellate, dal recettore Toll Like 9 il quale ha su queste cellule un duplice ruolo: blocca la loro migrazione e contribuisce alla loro attivazione e al loro differenziamento (Zhang, 2006).

Le cellule stellate, attivate dalle chemochine rilasciate dagli epatociti apoptotici, producono TGF- β e α -SMA e acquisiscono un fenotipo miofibroblastico-simile caratterizzato dalla produzione di collagene di tipo IV e laminina. Ciò comporta una maggiore deposizione di matrice extracellulare che può evolvere in fibrosi e cirrosi.

3.3.2 I mitocondri e la dinamica mitocondriale

I mitocondri sono organelli citoplasmatici in grado di svolgere molteplici funzioni. La più importante tra esse consiste nell'estrarre energia dai substrati organici per produrre un gradiente ionico che viene sfruttato per produrre adenosina trifosfato (ATP).

La struttura dei mitocondri è molto peculiare: sono formati da due membrane, quella esterna permette il passaggio di piccole molecole, quella interna permeabile, è ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali, che ne aumentano la superficie. Le due membrane identificano due differenti regioni: lo *spazio intermembrana*, quello delimitato dalla membrana esterna e quella interna, e la *matrice*, circoscritto dalla membrana interna (fig.5).

La funzione delle creste è aumentare la superficie di membrana che permette di disporre di un numero maggiore di complessi di ATP sintetasi.

La produzione di energia viene svolta utilizzando i principali prodotti della glicolisi: il piruvato ed il NADH. Essi vengono sfruttati nel ciclo di Krebs, nella fosforilazione ossidativa e nell'ossidazione degli acidi grassi.

Durante la fosforilazione ossidativa, i trasportatori ridotti di elettroni NADH e FADH₂ (prodotti dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs) trasferiscono, con un meccanismo a navetta, i loro equivalenti di riduzione nella matrice mitocondriale. Cinque complessi enzimatici sono inclusi nella membrana mitocondriale interna (I, II, III, IV e V). I complessi I e II ricevono gli

elettroni dall'ossidazione, rispettivamente del NADH e del succinato e li trasferiscono ad un trasportatore di elettroni lipidico, il coenzima Q (Koopman et al., 2009; Tamitsuka et al., 2009). Il complesso III ossida la forma ridotta del coenzima Q e riduce il citocromo c, un trasportatore proteico di elettroni. Il complesso IV accoppia l'ossidazione del citocromo c alla riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua.

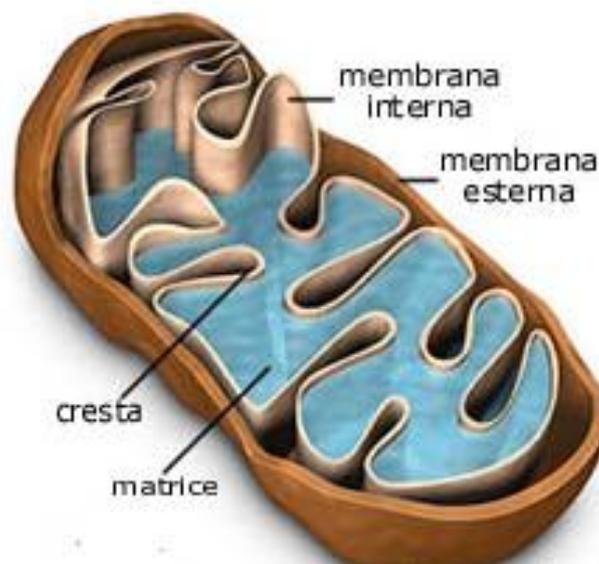


Figura 5: Struttura di un mitocondrio

Le reazioni catalizzate dai complessi I, III e IV forniscono anche l'energia per trasportare i protoni (H^+) nello spazio intermembrana, rendendolo più acido della matrice mitocondriale. La dissipazione del risultante gradiente protonico, con il rientro degli H^+ nella matrice, attraverso uno specifico canale ionico presente nel complesso V (ATP sintetasi), genera l'energia che

è usata da questo complesso per promuovere la sintesi endoergonica di ATP, a partire da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorganico (Palade Ge, 1952).

I mitocondri sono organelli dinamici il cui numero, misura e posizione, variano all'interno di ciascun tipo cellulare, anche in risposta alle diverse richieste di energia da parte della cellula stessa. I mitocondri, infatti, si fondono e dividono continuamente a formare un network dinamico attraverso i due processi di fusione e fissione.

La fissione e la fusione mitocondriale sono due processi fondamentali per il mantenimento della morfologia e distribuzione dei mitocondri ed anche per la proliferazione e differenziazione cellulare (Chan, 2006).

Il processo di fusione mitocondriale è necessario per il mantenimento della rete dei mitocondri e per il buon funzionamento di questi organelli. Infatti, una rete fittamente interconnessa, può facilitare il trasferimento del potenziale di membrana da regioni povere a regioni ricche di ossigeno (Skulachev, 2001). In *Drosophila*, per esempio, la fusione è necessaria durante lo sviluppo, perché regola la spermatogenesi. Infatti, bloccando la fusione, mediante la mutazione del gene fuzzy onion (Fzo), si ottengono dei maschi sterili (Hales and Fuller, 1997).

Inoltre è noto che un eccesso di fissione e la mancanza di fusione, comportano la rottura della rete mitocondriale con conseguente perdita del

DNA mitocondriale, difetti nella catena respiratoria e un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano l'equilibrio dinamico tra fissione e fusione, non sono ancora stati chiariti completamente. Studi condotti in *lievito*, *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*, hanno identificato una serie di fattori chiave, il cui ruolo è fondamentale per i processi di fusione e fissione (Zorzano et al., 2009; Pellegrini et al., 2009).

Infine, i mitocondri, proprio con questi continui processi di fusione e fissione, svolgono un ruolo centrale nell'attivazione e nel controllo della morte cellulare programmata (apoptosi); uno degli step dell'apoptosi infatti, è rappresentato da una eccessiva frammentazione (fissione) mitocondriale.

3.3.3 Fissione mitocondriale

Nelle cellule di mammifero, la fissione mitocondriale, è regolata dalla proteina Dynamin-related protein 1 (Drp-1) (nel lievito Dnm-1), una grande proteina ad attività GTPasica (Smirnova et al., 1998; Smirnova et al., 2001) la cui sequenza amminoacidica presenta delle significative similitudini con quella delle dinamine. Le dinamine sono delle proteine ad attività GTPasica, che regolano il traffico vescicolare e l'endocitosi, tuttavia le funzioni molecolari delle dinamine e di Drp-1 non sono ancora molto chiare.

DRP1, oltre ad essere coinvolto nel meccanismo di fissione mitocondriale, è anche il mediatore richiesto per la formazione delle vescicole nelle fasi

iniziali del pathway di secrezione, e coinvolto nel controllo della morfologia del RE (Imoto et al., 1998; Pitts et al., 1999; Yoon et al., 1998). E' stato visto che una inibizione della sua attività comporta una marcata alterazione della morfologia mitocondriale, portando alla formazione di mitocondri dalla forma estremamente allungata (Pitt set al., 1999 ; Smirnova et al., 1998).

Drp1 presenta un dominio con attività GTPasica, una porzione centrale, necessaria per la sua oligomerizzazione, ed un dominio GED o dominio di assemblaggio (Smirnova et al., 1998). L'idrolisi di GTP è richiesta per fornire la forza necessaria per produrre l'oligomerizzazione di DRP1, che forma in tal modo, una spirale a livello del sito di scissione (Hoppins et al., 2007,; Ingerman et al., 2005) . A tal riguardo, mutazioni che impediscono l'idrolisi del GTP generano, anche in questo caso, mitocondri dalla forma allungata ed interconnessi. Questi mutanti di DRP non solo inattivano ma sequestrano anche molecole di DRP1 endogene riducendone la localizzazione mitocondriale (Van der Bliet et al., 1993; Yoon et al., 2001; James et al., 2003).

Alcuni lavori hanno dimostrato che DRP1 ed i suoi effetti sulla dinamica mitocondriale sono regolati dalla fosforilazione. Il meccanismo di fosforilazione avverrebbe su diversi siti; uno di questi è la Ser-585 in un'isoforma di DRP1 nel cervello di ratto (che corrisponde all'omologa umana Ser-616). La fosforilazione avviene ad opera della chinasi ciclina dipendente (Cdk1/cicli B), durante il processo di mitosi e tale fosforilazione

promuoverebbe la fissione mitocondriale (Taguchi et al., 2007). Un'altra protein chinasi responsabile della fosforilazione della Ser-637 nell'uomo è la PKA. Gli studi condotti dimostrano che in seguito a questa fosforilazione si ha un'inibizione dell'interazione intramolecolare tra il dominio GED ed il dominio GTPasico, che ha come conseguenza una diminuzione dell'attività GTPasica (Chang et al., 2007).

Un terzo sito di fosforilazione è stato inoltre trovato a livello della Ser-600, ad opera della protein chinasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente (CaMKI_{II}), in seguito al flusso di Ca attraverso i canali voltaggio dipendenti attivati da alti livelli di potassio extracellulare (Han et al., 2008).

Il reclutamento di DRP1 a livello dei mitocondri, avviene attraverso la proteina mitocondriale Fis1 (hFis1 nell'uomo), una piccola proteina di fissione la cui localizzazione a livello della membrana mitocondriale esterna dipende dalla composizione lipidica della stessa (Kemper et al., 2008).

Il dominio COOH-terminale è quello responsabile della sua localizzazione (Hales et al., 1997; Jagasia et al., 2005).

La porzione NH₂-terminale possiede cinque regioni ad alfa elica, una delle quali è cruciale affinché Fis possa promuovere la fissione mitocondriale (Jofuku et al., 2005).

Un'overespressione di Fis1 induce una frammentazione mitocondriale ed il rilascio del citocromo c, suggerendo che la fissione mitocondriale operata da Fis1 stimoli anche l'apoptosi (James et al., 2003; Lee et al., 2004).

Sebbene Fis1 e Drp-1 siano i regolatori chiave della fissione mitocondriale nei mammiferi, anche altre proteine sono coinvolte in questo processo, esse sono Mdv1 e Caf4. (Mozdy et al., 2000). Mdv1 e Caf4 legano Fis1 attraverso il dominio N-terminale e Drp1 attraverso la porzione COOH-terminale. In particolare Fis1 lega Mdv1 e Caf4 attraverso un dominio TPR (tetratricopeptide ripetuto in tandem) che si trova nella porzione citosolica (Zhang and Chan, 2007). Diversi lavori dimostrano che questa proteina Fis1 interagisce fisicamente e in modo diretto con Mdv1 e Caf4 ma non con Drp-1, ciò fa quindi ipotizzare che le prime due possano essere necessarie per il reclutamento della terza (Hoppins et al., 2007).

3.3.4 Fusione mitocondriale

Il meccanismo di fusione, d'altra parte, nonostante sia legato a quello di fissione, utilizza un set di proteine effettrici evolutivamente conservate ma diverse da quelle di fissione. Tra queste ci sono le proteine trans membrana ad attività GTPasica Mfn1 e Mfn2 (Santel and Fuller, 2001).

Il processo di fusione va distinto in due fasi, ovvero, la fusione della membrana interna e la fusione della membrana esterna. Le proteine coinvolte nel processo di fusione mitocondriale mostrano, infatti, una diversa sublocalizzazione mitocondriale: le Mitofusine 1 e 2 situate sulla membrana mitocondriale esterna ed OPA1 localizzata sulla membrana mitocondriale interna. La MFN1 fu identificata nei mammiferi, insieme alla Mfn2, come

l'omologo umano della proteina Fuzzy onions di *Drosophila*, il primo gene scoperto essere coinvolto nella fusione mitocondriale (Hales and Fuller, 2001). Mfn1 è una proteina transmembrana ad attività GTPasica. La sua localizzazione richiede la presenza del dominio C-terminale e di due domini superavvolti HR2 (heptad-repeat) (Santel et al., 2003) responsabili della prima fase del processo di fusione, promuovendo il legame tra due mitocondri adiacenti attraverso un dominio dimerico e antiparallelo. Questi dimeri o complessi possono essere omotipici (Mfn1-Mfn1) o eterotipici (Mfn1-Mfn2) (Koshiba et al., 2004).

La porzione NH₂-terminale contiene il dominio che lega il GTP (GTP-binding domain) ed un dominio HR1 (Santel et al., 2003; Koshiba et al., 2004). l'attività GTPasica è fondamentale per la fusione mitocondriale, come riportato da studi che dimostrano che mutanti Mfn1 in questo dominio perdono la capacità di allungamento e di fusione dei mitocondri. (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2004; Santel et al., 2003).

Mfn1 interagisce fisicamente con Mfn2 (Chen et al., 2003; Detmer et al., 2007; Koshiba et al., 2004) e con OPA (Guillery et al., 2008).

Come dimostrato dai fenotipi di topi knockout per Mfn1 e Mfn2, le due proteine giocano ruoli distinti nel processo di fusione mitocondriale, malgrado presentino un'omologia dell'80% nella sequenza primaria. Il dominio citosolico di Mfn1 interagisce con la proteina Mib (Mitofusin-binding protein). Mib è un membro della superfamiglia delle proteine

reduzzasi a catena media, che possiede un dominio conservato che lega il coenzima. Mib controlla la morfologia mitocondriale e una sua overespressione causa una frammentazione mitocondriale, mentre, la sua repressione induce la formazione di mitocondri dalla forma allungata. Non è ancora chiaro se Mib interagisca direttamente con Mfn2 o attraverso il legame con Mfn1 (Eura et al., 2006).

Mfn2 possiede gli stessi domini funzionali di Mfn1 (Rojo et al., 2002; Santel and Fuller 2001). È stato recentemente dimostrato che Mfn2 è presente anche a livello del RE, controllandone la morfologia e l'interazione con i mitocondri (De Brito and Scorrano, 2008.)

Mfn2 gioca un ruolo centrale nel metabolismo mitocondriale e potrebbe essere associata con l'obesità e/o con il processo apoptotico. Inoltre, gioca un ruolo importante nella regolazione della proliferazione delle cellule muscolari lisce (Guo et al., 2007).

Sia l'eccessiva presenza, sia la scarsa presenza di mitofusina provoca un'alterazione del fisiologico equilibrio tra processi di fusione e fissione mitocondriale, portando come conseguenza, ad un'alterazione nella morfologia e nella funzionalità mitocondriale.

La repressione di Mfn2 causa una disfunzione morfologica e funzionale della rete mitocondriale: riduce processi quali l'ossidazione del glucosio, la respirazione cellulare e porta ad alterazioni del potenziale di membrana. Tutto ciò è dimostrato in ratti obesi, cioè il controllo dei meccanismi

mitocondriali dipendenti dalla mitofusina è danneggiato nell'obesità, a causa di una sua riduzione. L'espressione della mitofusina è cruciale nel metabolismo mitocondriale per il mantenimento dell'architettura della rete mitocondriale ed una diminuzione nei livelli di espressione della MFN2 potrebbe spiegare in questo modo la presenza di alterazioni metaboliche associate all'obesità (Bach et al., 2003).

Anche l'overespressione di mitofusina causa danni. L'eccesso di Mfn2 non ha effetti sull'integrità delle membrane mitocondriali interna e esterna ma quello che cambia è la morfologia mitocondriale.

Normalmente i mitocondri hanno una morfologia sferica o tubulare con un diametro minimo compreso tra 250-350 nm, sono delimitati da doppia membrana e hanno una matrice con un'alta densità di elettroni.

La Mfn2 overespressa provoca un significativo incremento del diametro mitocondriale che arriva fino a 1µm. Anche la struttura interna è danneggiata: mentre le creste mitocondriali appaiono normali nei mitocondri più piccoli, sono gonfie nei mitocondri di media taglia e sono difficili da identificare nei mitocondri più grandi. Questo potrebbe portare ad una rilocalizzazione delle creste della membrana interna alla periferia nei mitocondri grandi (Rojo et al., 2002).

OPA-1 è un altro fattore implicato nella fusione mitocondriale, si tratta di una proteina ad attività GTPasica. Essa fu identificata in seguito alla sua omologia con l'ortologo Mgm1 in lievito (Alexander et al., 2000). OPA1

controlla sia la fusione mitocondriale che la morfologia delle creste (Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Ishihara et al., 2006).

Sebbene sia espresso in tutti i tessuti, esso mostra un più alto pattern di espressione a livello della retina, del cervello, testicolo, fegato, cuore, muscolo scheletrico, e pancreas (Alexander et al 2000; Delettre et al., 2000).

OPA1 si localizza a livello dello spazio intermembrana in forma solubile o si trova strettamente legato alla membrana mitocondriale interna. OPA1 contiene un dominio NH₂-terminale con una sequenza MIS (mitochondrial import sequence), caratterizzata dalla presenza di aminoacidi carichi positivamente, che conferiscono la caratteristica localizzazione mitocondriale di OPA (Akepati et al., 2008; Delettre et al., 2000). Oltre a MIS, OPA1 possiede un dominio trans membrana che è deputato all'ancoraggio e all'associazione alla membrana mitocondriale, e due domini superavvolti: uno localizzato all'estremità NH₂-terminale, il secondo all'interno della porzione COOH-terminale, chiamato dominio GED (GTPase effector domain) (Praefcke ET AL., 2004). Entrambi i domini potrebbero essere responsabili della formazione di complessi omotipici tra distinte molecole di OPA. Inoltre il dominio GED potrebbe essere responsabile dell'interazione di OPA1 con le proteine della membrana mitocondriale esterna (Mfn1 e Mfn2). Il ruolo del dominio GTPasico è cruciale per l'attività di OPA: fibroblasti con mutazioni in questo dominio presentano, infatti, mitocondri frammentati (Olichon et al., 2007).

Sia l'overespressione che una perdita di funzione di OPA, comporta una frammentazione del network mitocondriale (Arnoult et al., 2003; Griparic et al., 2007). Studi su una ridotta funzionalità di OPA1 hanno dimostrato che la repressione di OPA mediata da RNAi attiverrebbe l'apoptosi ed un'aberrante struttura delle creste (Arnoult et al., 2005). Un recente studio riporta che la regolazione post-traduzionale della fusione mitocondriale mediata da OPA opera il controllo di una fase cruciale del destino dei mitocondri, ovvero la loro eliminazione attraverso l'autofagia. I mitocondri danneggiati normalmente mostrano una diminuzione del potenziale di membrana, che successivamente comporta, la completa degradazione di OPA. Se il danno persiste e i mitocondri non sono in grado di ristabilire il potenziale di membrana vanno incontro ad autofagia (Song et al., 2007; Twig et al., 2008).

3.3.5 Mitocondri e NAFLD

Alterazioni strutturali, morfologiche e di conseguenza funzionali dei mitocondri sono fortemente riscontrate nella NAFLD.

La presenza di un'ipertrofia mitocondriale negli epatociti è tipica della NAFLD; i meccanismi che inducono questa ipertrofia mitocondriale sono ancora oscuri ma si pensa che questo sia il primo stadio di una "anomalia" mitocondriale.

La NAFLD nei bambini ha una maggiore prevalenza nei maschi ed è lo stesso caratterizzata da una diminuzione nella funzione mitocondriale epatica. Le malattie del fegato dell'infanzia sono associate a cambiamenti dal punto di vista morfologico e funzionale dei mitocondri e ad un incremento nel numero di tali organelli. C'è una correlazione con le anomalie a livello della catena respiratoria e quindi della fosforilazione ossidativa (Perez-Carreras et al., 2003; Morris, 1999). Quando si ha questo tipo di alterazione, succede che vengono generate le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e a causa dell'alterata capacità ossidativa mitocondriale, gli acidi grassi vengono accumulati nel citosol, ribadendo la presenza di una stretta relazione tra steatosi e mitocondriopatia; le alterazioni mitocondriali nella NAFLD culminano con la deposizione di lipidi negli epatociti.

In ogni caso, il danneggiamento della catena respiratoria o di alcuni enzimi mitocondriali, può portare ad una stagnazione nella β -ossidazione o nella fosforilazione ossidativa; è stato anche dimostrato che si ha un incrementato volume mitocondriale. In particolare, la membrana mitocondriale interna (e le creste), come anche lo spazio intermembrana (siti in cui avvengono la β -ossidazione e la fosforilazione ossidativa) aumentano di grandezza nell'intento di porre rimedio alla parziale o completa interruzione dei processi metabolici (Da Silva et al., 2009). I mitocondri osservati in questo stato si trovano nella cosiddetta forma "ortodossa", caratterizzata da un ampio volume della matrice e dal sistema di membrane separato da piccoli

spazi nelle zone di giunzione. Ricostruzioni di mitocondri di fegato di ratto “ortodossi”, isolati e *in situ*, mostrano il sistema di cristae appiattito, con poche interconnessioni fra loro, oppure completamente tubulare. I segmenti tubulari delle cristae sono sottili (30-40 nm di diametro) e lunghi qualche centinaio di nanometri. Nella forma condensata, invece, la matrice sembra contrarsi in relazione ai cambiamenti osmotici o di stato metabolico, durante i quali la membrana interna si allontana da quella esterna ad eccezione di punti chiamati “siti di contatto” (contact sites) (Hackenbrock et al., 1986).

3.3.6 Lo stress ossidativo nel fegato

I radicali liberi sono atomi e molecole con elettroni spaiati, altamente instabili e reattivi. Nell'organismo i radicali liberi reagiscono con qualsiasi molecola che incontrano, quali proteine, carboidrati, lipidi ed acidi nucleici, alterandone la struttura e la funzione. Le cellule producono normalmente una certa quota di radicali liberi in seguito alla loro attività metabolica ed alle loro funzioni, come ad esempio quelle dei macrofagi e granulociti neutrofili. Piccole quote vengono tollerate e neutralizzate da sistemi enzimatici antiossidanti. Quando la produzione di radicali liberi è eccessiva si genera una condizione di stress definita come stress ossidativo. A questo punto i sistemi enzimatici e gli antiossidanti intracellulari non riescono a neutralizzarli e si genera danno cellulare (Fig.6).

Fra i radicali liberi, i ROS (specie reattive dell'ossigeno) sono importanti mediatori citotossici e delle vie di segnalazione cellulari nella patofisiologia delle malattie infiammatorie epatiche. Essi possono essere generati da fagociti residenti o di infiltrazione oppure da ciascun tipo di cellula epatica in seguito a stimolazione con citochine. Il danno epatico nella steatoepatite non alcolica è da molti ricercatori attribuito all'azione dei ROS (Pessayre et al., 2002). Nei topi obesi gli epatociti sono riforniti con grandi quantità di acidi grassi che portano ad un'aumentata attività respiratoria mitocondriale. Dal momento che i mitocondri sono tra le maggiori fonti di ROS, un aumentato approvvigionamento alimentare può causare un incremento nella produzione di ROS mitocondriali e può innescare lo stress ossidativo nel fegato. Sebbene i ROS siano in grado di causare la morte cellulare per mezzo di una massiva perossidazione lipidica che distrugge le membrane cellulari (Wendel et al., 1981; Yan et al., 2010; Halliwell, 2003), per lo più essi sono implicati nella modulazione delle vie di trasduzione del segnale, influenzando enzimi sensibili al potenziale redox, organelli quali i mitocondri, e fattori di trascrizione, inducendo o regolando in questo modo la morte cellulare per apoptosi e necrosi. Così lo stress ossidativo generato dai ROS può attivare la via della c-jun-N-terminal chinasi (JNK) e le caspasi per innescare la morte per apoptosi, mentre l'esposizione di culture primarie di epatociti di ratto a perossido d'idrogeno causa necrosi. La ragione di questa discrepanza fra gli effetti del superossido che innesca l'apoptosi e del

perossido d'idrogeno che provoca necrosi potrebbe essere dovuta alle differenti dosi usate dai ricercatori (Conde de la Rosa et al., 2006; Nieminen et al., 1997). Molti di questi effetti dei ROS possono avvenire simultaneamente o sequenzialmente nei processi patofisiologici.

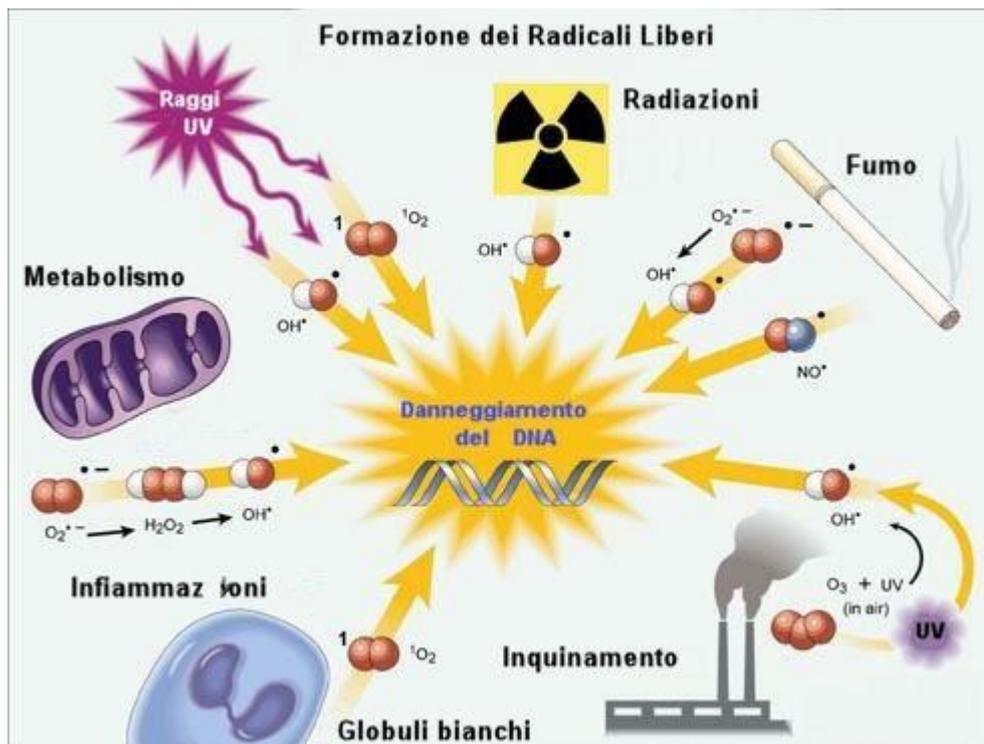


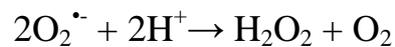
Figura 6: Teoria dei radicali liberi

3.3.7 Gli antiossidanti

L'organismo ha sviluppato numerosi meccanismi per proteggersi dagli effetti dannosi dei radicali liberi; esistono alcuni enzimi in grado di decomporre e sequestrare gli agenti ossidanti che fanno parte, quindi, degli *antiossidanti endogeni*.

- *Superossido dismutasi*

Le superossido dismutasi (SOD) costituiscono una classe di metalloproteine ubiquitarie, utilizzata dagli organismi aerobi come sistema di difesa contro la tossicità dei ROS. Il meccanismo attuato dalle SOD consiste nella catalizzazione della dismutazione dello ione superossido ($O_2^{\bullet -}$) in ossigeno molecolare e acqua ossigenata (Nelson et al., 2006).



Nell'uomo, sono presenti tre forme di superossido dismutasi: la Cu,Zn SOD1 citoplasmatica, la Mn SOD2 mitocondriale e la SOD3 extracellulare. La prima è un dimero mentre le altre due sono tetrameri. La SOD1 e la SOD3 contengono rame e zinco, mentre la SOD2 ha il manganese nel suo centro di reazione.

La SOD2 è localizzata nella matrice mitocondriale così che la localizzazione cellulare contribuisce alla sua capacità di proteggere i mitocondri da stress ossidativo; la SOD2 converte il superossido in perossido di idrogeno più ossigeno e funge da prima difesa contro il superossido mitocondriale (Cadenas et al., 2000).

La localizzazione della SOD1, oltre che nel citoplasma, è presente anche nello spazio intermembrana mitocondriale suggerendo una relazione funzionale con l'anione superossido ($O_2^{\bullet -}$) rilasciato in questo compartimento. Nei mitocondri intatti, l'enzima SOD1 nello spazio

intermembrana è inattivo; per l'attivazione è necessaria una modificazione ossidativa dei gruppi tiolici dell'enzima stesso; durante la reazione catalitica della Cu,Zn SOD lo ione Cu^{2+} è ciclicamente ridotto ed ossidato durante successive interazioni con il substrato superossido nel sito attivo. In una prima fase, un elettrone dallo ione superossido radicalico viene donato al centro catalitico con formazione di ossigeno molecolare e Cu^+ che, a sua volta, dona un elettrone ad un secondo ione superossido che unendosi a due protoni, genera perossido di idrogeno (Bordo et al., 1994).

L' $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , generati nei mitocondri, possono anche diffondere nel citosol (Han et al., 2002). In aggiunta ai loro potenziali effetti dannosi sui costituenti cellulari, $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , a bassi livelli, sono essenziali per la regolazione della crescita cellulare, differenziazione e morte.

I primi studi sulla distribuzione della superossido dismutasi, hanno dimostrato che la Mn-superossido dismutasi (SOD2) era localizzata nella matrice mitocondriale, mentre la Cu, Zn-superossido dismutasi (SOD1) era localizzata solo nel citosol. Studi successivi hanno dimostrato che solo la forma immatura della Cu, Zn-superossido dismutasi, non contenente né Cu né Zn, può entrare nei mitocondri.

Secondo alcuni autori (Peeters-Joris et al., 1975) la Cu, Zn-superossido dismutasi è in uno stato latente nei mitocondri intatti e diventa attiva dopo la rottura delle membrane mitocondriali.

Studi più recenti confermano che l'attività della superossido dismutasi mitocondriale è quasi equamente suddivisa tra la matrice (Mn-superossido dismutasi) e i compartimenti dello spazio intermembrana (Cu, Zn superossido-dismutasi), suggerendo che lo spazio intermembrana può essere uno dei maggiori siti di esposizione al radicale superossido ($O_2^{\bullet-}$).

I pathway biochimici che sono implicati nell'attivazione della Cu, Zn-superossido dismutasi nello spazio intermembrana, non sono ancora conosciuti. È stato però osservato che, l'esposizione di mitocondri intatti a basse concentrazioni (10^{-6} M) di H_2O_2 , portano all'attivazione della Cu, Zn-superossido dismutasi nello spazio intermembrana (Inarrea et al., 2005).

Alcuni studi hanno messo in evidenza la possibile relazione dei livelli di SOD1 con l'isoforma del recettore dell'adiponectina presente nel fegato (AdipoR2). Ratti obesi fa/fa Zucker, alimentati con dieta ad elevato contenuto di grassi e di colesterolo, sviluppano "fegato grasso" con infiammazione e fibrosi caratteristici della NASH, dopo 4, 8 o 12 settimane di trattamento con tale dieta (Matsunami et al., 2010). In questi ratti, l'espressione di AdipoR2 è significativamente diminuita, mentre l'espressione dei geni del complesso della NADPH ossidasi è incrementata. Come risultato della diminuzione dell'espressione del recettore AdipoR2, l'espressione dei geni localizzati a valle dell'AdipoR2, come per esempio la Cu, Zn-superossido dismutasi (SOD1) e la Mn-superossido dismutasi (SOD2), diminuisce anch'essa. Inoltre, l'espressione dei geni relativi

all'infiammazione aumentano. L'aumento dello stress ossidativo e dell'infiammazione, attraverso "down-regulation" dell'AdipoR2 potrebbe contribuire alla progressione della NASH (Matsunami et al., 2010).

Altri lavori hanno però riportato una sovraespressione degli enzimi antiossidanti sia in modelli murini affetti da NASH (Santamaria et al., 2003) sia in pazienti con NAFLD. Infatti, studi condotti su questi pazienti con NAFLD per saggiare il livello di difesa antiossidante sia su biopsie epatiche che dimostrassero l'esistenza dello stress ossidativo in questi pazienti, sia a livello degli eritrociti e del plasma per verificare se il meccanismo antiossidante ivi prodotto riflettesse lo stress ossidativo a livello epatico, hanno dimostrato che, mentre negli eritrociti e nel plasma non si sono apprezzate variazioni nell'attività degli enzimi antiossidanti, a livello delle biopsie epatiche, invece, si è assistito ad un aumento significativo del sistema di difesa antiossidante, che si è tradotto in un aumento della Cu,Zn-SOD, catalasi e GPX (glutazione perossidasi). Questo dato quindi dimostra la possibilità che lo stress ossidativo possa essere coinvolto nel processo di infiammazione e fibrogenesi nella NAFLD (Perlemuter et al., 2005).

CAPITOLO 4

SCOPO DELLA TESI

Gli esperimenti da me svolti hanno avuto come scopo lo studio delle interazioni cellulari che intercorrono fra i vari tipi di cellule epatiche con l'identificazione dei meccanismi cellulari e molecolari che regolano l'insorgenza e l'evoluzione del danno epatico.

Sono partita dal verificare che la dieta utilizzata, iperlipidica ricca in lardo della durata di 6 settimane, avesse provocato nei ratti trattati l'ipertrofia degli adipociti viscerali, che da questo momento subiscono stress del reticolo endoplasmatico, si infiammano e diventano insulino-resistenti e quindi lipolitici, liberando FFA in circolo, che poi raggiungono altri organi, primo fra tutti il fegato.

Per valutare i livelli di lipidi circolanti nel sangue, ho effettuato determinazioni quantitative del contenuto dei lipidi serici (trigliceridi serici), poi il contenuto dei lipidi che si depositavano nel fegato (trigliceridi epatici) e di alcune attività enzimatiche del fegato (es. alanina aminotransferasi, ALT) per evidenziare l'eventuale presenza di danno epatico. Ho inoltre dosato con il metodo ELISA il contenuto di glucosio ed insulina, ricavando dalla loro relazione l'indice Homa per valutare l'insorgenza di fenomeni di insulino-resistenza. Ho anche misurato il livello serico di leptina ed

adiponectina, che mi avrebbero fornito informazioni su una possibile forma di leptino-resistenza e di perdita di sensibilità dei tessuti all'insulina.

Ho poi analizzato a livello morfologico il parenchima epatico ed il grado della steatosi, l'aumento del numero delle cellule del Kupffer e HSC, la presenza e l'estensione di eventuali focolai infiammatori.

Ho utilizzato l'immunoistochimica, servendomi di anticorpi specifici per i markers molecolari che individuano selettivamente la presenza e l'attivazione delle cellule responsabili dell'infiammazione, quali ad es. CD68 e Mac-2/galectina-3, per le cellule del Kupffer, e CRBP-1 ed α -SMA per le cellule stellate, HSC e miofibroblasti.

Ho valutato la presenza di epatociti degenerati, i cosiddetti "ballooned hepatocytes", di corpi apoptotici, di corpi di Mallory.

Determinazioni semiquantitative dei markers molecolari già usati per l'individuazione immunoistochimica sono state da me effettuate mediante Western Blot.

Poiché le HSC e i fibroblasti, una volta attivati, divengono responsabili dell'eccessiva deposizione di matrice e fibre che portano alla fibrosi, ho valutato le eventuali variazioni nel contenuto di matrice extracellulare con la colorazione Picrosirius Red. Il contenuto di glicogeno presente negli epatociti è stato invece evidenziato con la reazione istochimica PAS (acido periodico + reattivo di Schiff).

Ho infine focalizzato la mia attenzione sugli organelli cellulari che intervengono nell'attività metabolica della cellula: il reticolo endoplasmatico ed i mitocondri. Per il reticolo ho indagato con opportuni markers la presenza di stress dovuto al sovraccarico di grassi. Per i mitocondri, deputati alla conversione dell'energia, ne ho studiato a livello ultrastrutturale la morfologia e la loro dinamica; la loro funzionalità è stata determinata sperimentalmente mediante l'utilizzo di tecniche enzimatiche, polarografiche e spettrofotometriche, in quanto lavori recenti indicano che una disfunzione nella loro dinamica e funzionalità, con un aumento del numero e difetti nella catena respiratoria e nella fosforilazione ossidativa è associata a molte patologie ivi compresa la steatosi epatica.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 Modelli animali

Come modelli sperimentali, sono stati utilizzati ratti maschi Wistar di 60 giorni di età, del peso di circa 400g . I ratti sono stati suddivisi in 2 gruppi di trattamento, costituiti ciascuno da 8 animali:

- Un primo gruppo è stato sottoposto ad un trattamento con dieta standard di laboratorio per 6 settimane (ratti N);
- Un secondo gruppo è stato sottoposto ad un trattamento con dieta ad elevato contenuto di grassi, ricca in lardo (40%) per 6 settimane (ratti D);

Il contenuto energetico della dieta standard di laboratorio è di 15,88 KJ/g, mentre il contenuto energetico della dieta iperlipidica somministrata ai ratti D è di 20 KJ/g.

Tutti i ratti sono stati stabulati individualmente, acclimatati in una stanza a temperatura controllata (24°C) e sottoposti ad un ciclo circadiano luce-buio (12 ore luce /12 ore buio).

Durante il periodo di trattamento sono stati controllati sia il peso corporeo che la quantità di cibo introdotta, sottraendo dalla quantità aggiunta giornalmente quella lasciata e quella eventualmente caduta nella gabbia durante il pasto. Alla fine del periodo sperimentale i ratti sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo) e sono stati sacrificati mediante decapitazione.

Trattamento, stabulazione e sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità Italiana.

5.2 Preparazione dei campioni istologici

La preparazione dei campioni atti alle valutazioni istologiche ha previsto innanzitutto il *prelievo* del fegato.

Dell'organo prelevato, una parte è stata congelata in azoto liquido e poi utilizzata per i Western Blots, e l'altra è stata posta nel fissativo Bouin o Carnoy per i campioni da usare in microscopia ottica.

Dal campione incluso in paraffina, sono state ricavate sezioni spesse 5 µm, le quali, distese su vetrini, sono state utilizzate per diversi tipi di colorazione o per effettuare reazioni immunostochimiche.

5.3 Picrosirius Red

Questa colorazione permette di visualizzare le fibre di collagene.

Dopo sparaffinatura e idratazione delle sezioni, si immergono i vetrini in emallume per circa 10 min. Passato questo tempo, si effettua uno sciacquo in acqua distillata per eliminare il colorante e poi si effettua il viraggio in acqua di fonte.

Viene utilizzata una soluzione allo 0.1 % del colorante Red 80 in acido picrico, vi si immergono i vetrini e si lasciano per un'ora.

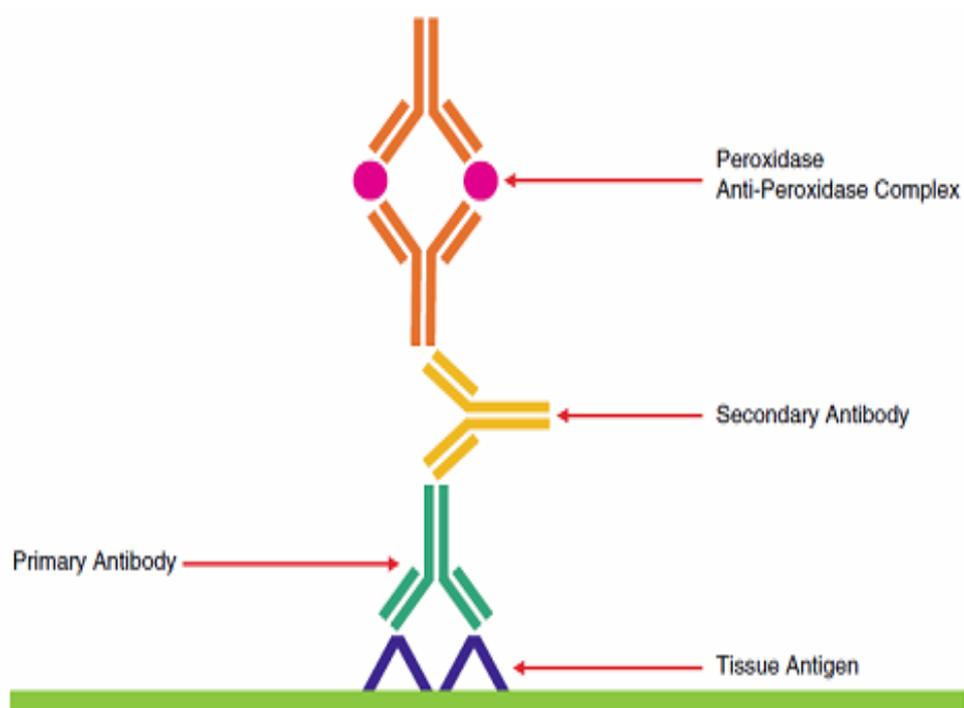
Si eseguono poi due lavaggi con acqua acidificata al 20 % , si disidrata e si montano i vetrini. Al microscopio ottico le fibre di collagene risulteranno rosse.

5.4 Reazione immunoistochimica

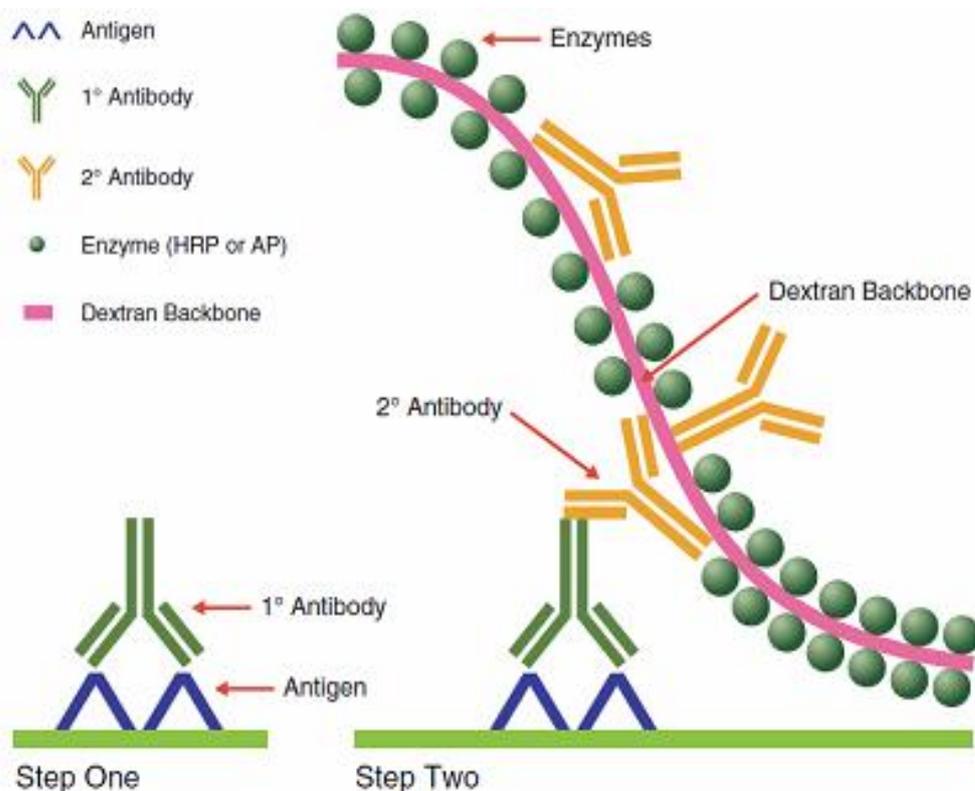
La reazione immunoistochimica da me utilizzata è basata sulla metodica PAP (perossidasi anti - perossidasi) e quella basata sull'uso di polimeri. Questa tecnica permette di rilevare la presenza di determinate proteine mediante il legame di anticorpi specifici. A quest'ultimi si legano, poi, anticorpi secondari i quali legano a loro volta o il complesso perossidasi anti-perossidasi o polimeri di destrano a cui sono legati gli anticorpi secondari e gli enzimi con attività perossidasi. Questi enzimi agiscono sul perossido d'idrogeno e su un donatore di elettroni quale il cromogeno DAB

(3,3'-diaminobenzidina), permettendo lo sviluppo di colore laddove è avvenuto il legame.

Metodica PAP



Metodica dei polimeri



Prima di iniziare, i vetrini sono stati posti in stufa per 1 ora a 60°C per migliorare l'aderenza delle sezioni sul vetrino stesso. A seconda degli anticorpi usati, i vetrini possono essere incubati in Tampone citrato a 70°C in microonde. Questa metodica consente lo smascheramento degli antigeni, laddove questi fossero stati modificati durante la fissazione.

Successivamente le sezioni sono state sparaffinate, idratate e circondate mediante l'utilizzo di una PAP – pen. Su ogni sezione è stata posta una piccola quantità di perossido d' idrogeno al 3 % che consente di inattivare l'attività perossidasi endogena presente nel tessuto.

Le sezioni sono allora state incubate per 30 minuti con BSA (albumina di siero bovino) che blocca l' eccessiva reattività di fondo dovuta ad un legame non specifico degli anticorpi primari con proteine particolarmente reattive (es. collagene).

A questo punto le sezioni sono state incubate overnight a 4 °C con un determinato anticorpo primario diluito in PBS.

Il giorno seguente, dopo aver allontanato l'Ab primario, ed aver sciacquato la sezione, è stato posto su ogni fetta l' Envision, costituito da un polimero di destrano a cui sono legate numerose molecole sia di Ab secondario, sia di enzima perossidasi.

Per la rilevazione della perossidasi, e quindi del legame degli anticorpi, è stato utilizzato il cromogeno DAB. Inizialmente la perossidasi forma un complesso con il perossido d'idrogeno che reagisce con il donatore d'elettroni, il DAB. Quest'ultimo si ossida e diventa una molecola colorata in rosso-mattone che precipita nei siti in cui è avvenuta la reazione.

Nei casi in cui è stata effettuata l' immunocitochimica doppia, dopo la colorazione con il DAB, i vetrini sono stati sottoposti a passaggi in soluzioni tampone acide per allontanare gli Ab della prima reazione. Si ripetono gli stessi passaggi effettuati per la prima colorazione, ed infine, viene utilizzato come cromogeno il 4 cloronaftolo attivato da perossido d'idrogeno al 5%.

I vetrini, disidratate le sezioni, sono stati montati con vetrino coprioggetto e osservate al microscopio ottico per poi acquisirne le immagini digitali al microscopio Zeiss Axiovision collegato a una telecamera.

5.5 Rilevazione dell'apoptosi (Tunel Assay)

L'apoptosi rappresenta un processo di morte cellulare finemente regolato. Caratteristica importante per la sua rilevazione è la frammentazione del DNA in tipici frammenti di circa 200 bp .

Dopo la sparaffinatura e l'idratazione, le sezioni sono state incubate per 15 minuti con Proteinasi K, un'endopeptidasi che permette di digerire le nucleasi, e poi per 5 minuti con perossido d'idrogeno, per inattivare l'attività perossidasi endogena.

Sulle fette è stata posta per un'ora una soluzione contenente l'enzima *deossinucleotidil transferasi terminale (TdT)*, che permette di aggiungere nucleotidi alle estremità 3'-OH dei frammenti presenti in cellule apoptotiche. I nucleotidi da incorporare sono miscelati in maniera random con quelli marcati con *digossigenina* e quelli non marcati. Successivamente le sezioni sono state incubate per 30 minuti con anticorpo anti- digossigenina coniugato con perossidasi.

A questo punto, viene aggiunto il DAB. In seguito alla reazione perossidasi, si ha un precipitato marrone laddove il DNA è frammentato e quindi la cellula è apoptotica. Come contrasto viene invece utilizzato il verde di metile che lega il DNA intatto rendendo i nuclei verdi.

È stata infine effettuata una conta a 40x dei nuclei apoptotici all'interno di 6 campi per ogni campione.

5.6 Valutazione della steatosi

Il grado di steatosi è stato valutato su una scala da 0 a 3 in base alla percentuale di epatociti coinvolti:

grado 0: <5% nessuna

grado 1: 5–33% lieve,

grado 2: 34–66% moderata

grado 3: >66% severa

5.7 Determinazione dei livelli serici di trigliceridi

I campioni di sangue che sono stati prelevati durante il sacrificio dalla vena cava inferiore dei ratti, sono stati posti in apposite provette e centrifugati alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti, alla temperatura di 20°C. Applicando questa procedura è stato possibile separare il siero, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet.

I campioni di siero sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli serici di trigliceridi inviando i sieri ad un laboratorio di analisi esterno, dove sono state effettuate le analisi con kit enzimatici commerciali.

5.8 Determinazione del contenuto epatico di trigliceridi

L'estrazione dei lipidi dal fegato è stata effettuata mediante omogeneizzazione in una miscela di cloroformio-metanolo (2:1). L'omogenato è stato agitato a temperatura ambiente per 2 ore. La fase organica e la fase acquosa sono state separate mediante l'aggiunta di 0,2 volumi di NaCl e una successiva centrifugazione a 2400 rpm per 20 minuti a 21°C. La fase acquosa viene eliminata per aspirazione e l'interfaccia viene lavata con una miscela di cloroformio:metanolo: NaCl 0,58% .

La fase lipidica così ottenuta viene posta in provette di vetro da cui si fa evaporare cloroformio. Sottraendo il peso della provetta vuota dal peso complessivo della provetta contenente i lipidi si ottiene il contenuto lipidico estratto dal tessuto.

I trigliceridi sono stati determinati nell'estratto lipidico del fegato, mediante l'utilizzo di un Kit commerciale (*Serum Triglyceride Determination Kit*).

5.9 Determinazione del contenuto serico di insulina, adiponectina e leptina

Il saggio ELISA utilizzato per effettuare queste determinazioni è basato sul legame simultaneo della proteina d'interesse da parte di due anticorpi monoclonali (Sandwich Enzyme Immunoassay), uno dei quali è già immobilizzato nella micropiastra.

L'altro anticorpo è coniugato con l'enzima perossidasi e l'incubazione dei campioni con esso è avvenuto su un agitatore per 2 ore a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, sono stati effettuati dei lavaggi al fine di allontanare l'anticorpo non legato.

Nel caso della leptina, il secondo anticorpo non era direttamente legato alla perossidasi ma alla biotina, la quale lega una molecola di streptavidina coniugata con l'enzima.

Il substrato per l'identificazione della perossidasi è costituito da perossido d'idrogeno e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), un cromogeno che sviluppa, in seguito alla reazione enzimatica, una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop Solution (contenente acido solforico H₂SO₄).

La misura dell'assorbanza a 450 nm di ogni pozzetto è stata elaborata da un sistema computerizzato che l'ha convertita in termini di concentrazione.

5.10 Analisi delle proteine mediante Western Blot

Il Western blot è una tecnica immunochimica che permette di valutare l'espressione quantitativa di una determinata proteina e la sua localizzazione in una miscela di proteine precedentemente sottoposte ad elettroforesi. I western blot sono stati eseguiti sia su lisati di fegato, sia su mitocondri estratti da fegato.

- **Preparazione dei mitocondri da fegato**

Subito dopo il sacrificio, il fegato è stato prelevato, finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM e 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4 (diluizione 1:10), in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) settato a 500 rpm (4 colpi/min). L'omogenato è stato, poi, filtrato attraverso delle garze sterili e privato di cellule intatte e nuclei attraverso una centrifugazione a 1000g per 10 minuti; i surnatanti ottenuti sono stati di nuovo centrifugati a 3000g per 10 minuti. Il pellet mitocondriale così ottenuto è stato lavato due volte ed infine risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi a pH 7.0. Caratterizzazioni microscopiche ed enzimatiche hanno mostrato che la nostra procedura di isolamento

(centrifugazione a 3000g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri.

- **Preparazione dei lisati di fegato**

Dal tessuto prelevato al momento del sacrificio e conservato a -80°C, ne sono stati prelevati 100-150 mg e questi sono stati omogeneizzati, usando il politron, in 1 mL di Lysis Buffer. È stata poi effettuata una centrifugazione a 12000 rpm per 10 min a 4°C nella centrifuga refrigerata ed è stato prelevato il soprannatante.

Nel frattempo è stato preparato il gel in percentuale adeguata al tipo di proteina da evidenziare.

È stato effettuato il *dosaggio proteico* per conoscere la concentrazione di proteine contenute nel campione e, quindi, per calcolare la quantità di campione da caricare in ogni pozzetto. Il dosaggio è stato condotto secondo il metodo di Hartree. Tale metodo combina la reazione del biuretto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina, dal triptofano e dalla tirosina

delle proteine in ambiente alcalino. L'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione.

Nel gel, in presenza del detergente sodio dodecil solfato (SDS) che denatura le proteine, avviene la separazione di quest' ultime in funzione della loro massa, annullando le cariche degli amminoacidi che influenzano la migrazione.

I campioni proteici che sono stati caricati nei pozzetti, sono stati diluiti in una soluzione, il Laemly, e prima di essere caricati sul gel sono stati denaturati a 90° C per 5 minuti. Per rendere possibile l'individuazione della proteina di interesse, è stata carica anche una proteina, un marker formato da proteine di peso molecolare noto.

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 200V, 60mA/gel per 1h/2h, utilizzando TGS come tampone, di cui è stata riempita la camera elettroforetica.

Dopo la corsa elettroforetica, il materiale proteico è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa o di polivinil-difluoruro, con un processo detto *blotting*. Il blottaggio è stato effettuato utilizzando un voltaggio di 100 V, 350mA per 1h.

La membrana è stata, quindi, lavata per 5 minuti nel tampone TBS-tween e poi incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione di TBS-tween e latte al 5% per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine.

Successivamente la membrana è stata incubata tutta la notte a 4°C con 1µg/ml di anticorpo primario nel tampone che contiene TBS-tween-latte 2%. In seguito per allontanare l'anticorpo non legato, la membrana è stata sottoposta a 4 lavaggi di 15 minuti. Terminati i lavaggi, il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato, coniugato con l'enzima perossidasi diluito 1:4000 in TBS-tween e latte. Anche questa volta, per allontanare l'anticorpo secondario non legato, sono stati effettuati gli stessi lavaggi.

Per rilevare il segnale della proteina viene utilizzata la reazione di chemiluminescenza effettuata grazie a una soluzione contenente luminolo, acido cumarico e H₂O₂.

La membrana è stata, quindi, incubata con questo mix per 1 minuto e poi è stata esposta su una lastra per autoradiografia in cassette radiografiche a temperatura ambiente per un tempo variabile. Sulla lastra è stato possibile osservare delle bande corrispondenti alla proteina di interesse. Le lastre sono scannerizzate e sottoposte ad analisi densitometrica con il programma UN-SCAN-IT gel 6.1, e le densità relative delle bande immunoreattive sono misurate e normalizzate rispetto alla β-actina, per quanto riguarda i western condotti sull'omogenato, e con la COXIV per quelli eseguiti sull'estratto mitocondriale.

5.11 Analisi statistiche

I dati sono stati riportati come le medie \pm deviazione standard. Le analisi statistiche sono state compiute usando il sistema d'analisi Anova. Il confronto tra i singoli gruppi è stato fatto tramite il Newmann-Keuls. Il livello minimo di significatività scelto è stato $P < 0,05$. Tutte le analisi sono state compiute usando il programma Graphpad Prism (Graphad software inc., San Diego, CA, USA).

Gli anticorpi utilizzati per le reazioni di immunocitochimica e per le analisi di Western blot sono stati i seguenti:

- SCD1 (Rabbit polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)
- Cd-68 (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)
- CRBP (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)
- GAL3 (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)
- MCP1 (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:2000, Abcam)
- TGF- β (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)
- PPAR- α (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:200, Santa Cruz)
- α -SMA (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)

- Mitofusina 2 (Mouse Monoclonal Antibody, diluizione 3:1300, Santa Cruz)
- DRP1 (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:200, Santa Cruz)
- hFIS1 (Rabbit polyclonal Antibody, diluizione 1:400, Santa Cruz)
- SOD1 (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:1000, Abcam)
- SOD2 (Rabbit Polyclonal Antibody, diluizione 1:200, Abcam)

5.12 Microscopia elettronica

Piccoli pezzi di tessuto di circa 1 mm³ sono stati prelevati e fissati in *Gluteraldeide* 2,5% in tampone fosfato di Millonig per 45' -60'. Poiché la *gluteraldeide* è capace solo di fissare le strutture proteiche, occorre una seconda fissazione con tetrossido di osmio all'1-2% per preservare le strutture lipidiche e in particolar modo le membrane. Il passaggio successivo è la *disidratazione*, operando con dei passaggi in soluzione di cloruro di sodio allo 0,5% per 10' e poi in soluzioni di alcool in una scala crescente di concentrazioni: 50,70,90 e 100%. Tutti questi passaggi sono eseguiti su ghiaccio.

Dopo aver finito la disidratazione del campione, dobbiamo sostituire l'alcool con l'*ossido di propilene*. Successivamente si prepara una miscela di resina e

ossido di propilene al 50% che verrà aggiunta al campione. La provetta contenente i campioni dovrà essere tenuta aperta per tutta la notte a temperatura ambiente, in modo che l'ossido di propilene evapori lentamente, ottenendo un'infiltrazione del preparato in resina pura. L'ultimo passaggio è l'*inclusione*, che permette di impregnare e "intrappolare" il campione in un materiale abbastanza duro e omogeneo tale da poter essere tagliato in fette molto sottili. Tale materiale è in genere costituito da resine, fra le quali quelle più comunemente usate sono di tipo epossidico termoindurente, in particolare l'*Epon* e l'*Araldite*.

Si versa in una bottiglia di plastica 24,25 ml di Epon 812, 9,25 ml DDSA e 16,5 ml MNA, per un volume totale di 50 ml; Infine si aggiunge BDMA(benzidilmetilammina). La soluzione così ottenuta si pone su un agitatore meccanico che permette di ottenere una miscela perfetta: è importante ottenere una miscela omogenea in ogni sua parte in modo tale da ottenere un'impregnazione ottimale del campione.

A questo punto si preleva il campione dal contenitore in cui era stato prima posto con delle pinzette e si ripone nelle cellette di formelle. Una volta sistemato il campione in tali cellette, la formella si pone nella stufa per 3 giorni a 60°C.

Il taglio delle sezioni fini per il microscopio elettronico è preceduto dalla preparazione di sezioni semifini, la cui osservazione al microscopio ottico permette di controllare la riuscita delle operazioni precedenti e selezionare i campi utili da destinare all'esame ultrastrutturale. Infine si passa all'affettatura e si ottengono sezioni sottili di colore argento.

5.13 Morfometria

Le misurazioni dei diametri dei mitocondri sono state effettuate con il sistema interattivo di analisi d'immagine Axiovision 4 al ME (calcolati in nm). Le misure sono state effettuate su 5 animali per ogni gruppo, per ogni animale sono state prese in considerazione 5 immagini. Sono state effettuate poi le analisi statistiche per confrontare le dimensioni mitocondriali nel gruppo in trattamento rispetto ai controlli.

Le misurazioni dei diametri degli adipociti sono state effettuate con il sistema interattivo di analisi d'immagine Axiovision 4 al m.o., (calcolati in μm). Le misure sono state effettuate per ogni animale N e D sottoposto a trattamento, a 20x, prendendo in considerazione 10 campi non sovrapponibili appartenenti ad ogni campione.

5.14 Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri

Il consumo di ossigeno è stato misurato nei mitocondri polarograficamente con un elettrodo di Clark (Yellow springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e un anodo d'argento entrambi immersi in una soluzione di KCl e separati dalla soluzione in esame tramite una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. Così l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui agli elettrodi è applicato un voltaggio di 0.5-0.8 Volts. All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola di ossigeno al catodo. L'elettrodo di Clark consente, quindi, di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sono state realizzate in camere termostatate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per il fegato, un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, K_2HPO_4 5 mM, PH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA. Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori per la β -ossidazione, quali la palmitoil-carnitina (40 μ M) e malato (2,5 mM).

Le misure sono state effettuate in assenza (Stato 4 o stato non fosforilante della respirazione) o in presenza (Stato 3 o stato fosforilante della respirazione) di 0,6 mM di ADP. In tal modo è stato possibile misurare il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR, velocità dello stato3 diviso velocità stato 4) in accordo con il metodo di Estabrook, e pertanto verificare l'integrità dei mitocondri isolati.

Il consumo di ossigeno è espresso in ng di atomi di O al minuto per mg di proteine mitocondriali.

5.15 Misura del potenziale di membrana nei mitocondri

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbestico della safranina, cioè quel punto dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di

membrana dai valori dell'assorbanza, si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3 μM , un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0.1 - 20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione.

Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ($\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times$

$\log \left(\frac{[\text{K}^+]_{\text{in}}}{[\text{K}^+]_{\text{out}}} \right)$), si può calcolare il potenziale di membrana dei

mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. A questo punto dalla curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

5.16 Misura della conduttanza protonica basale

L'applicazione del metodo di Brand ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale. Tale metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo stato 4, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni. Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità F_o . In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

Per una determinazione accurata della conduttanza protonica basale può essere valutata la risposta cinetica del potenziale di membrana mitocondriale a variazioni del consumo di ossigeno, ottenute diminuendo progressivamente le reazioni di ossidazione del succinato del mitocondrio nello Stato 4 con un inibitore della catena di trasporto degli elettroni, quale il malonato. Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato diminuisce la velocità di pompaggio di protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. La variazione del consumo di ossigeno in funzione del potenziale

di membrana, in mitocondri che respirano in assenza di fosforilazione, ci permette di valutare la variazione cinetica della conduttanza protonica in funzione del potenziale di membrana. Infatti le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perché, in stato stazionario, la velocità del consumo di ossigeno (cioè il flusso protonico in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica. In effetti il potenziale di membrana (Δp) è costituito da due componenti:

la differenza di potenziale elettrico ai capi della membrana mitocondriale ($\Delta\Psi$);

la differenza di potenziale chimico protonico (ΔpH).

Sperimentalmente è possibile abolire il ΔpH facendo in modo che il Δp risulti uguale al $\Delta\Psi$ a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore H^+/K^+ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale interna, e di conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale elettrico. Le misure sono state effettuate a 30°C in una soluzione contenente per il fegato LiCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, Tris-PO₄ 5 mM, pH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA libera da acidi grassi. Per ogni misura a questa soluzione è stato aggiunto succinato 10 mM, rotenone 3.75 μM , oligomicina 2 $\mu\text{g/ml}$, safranina (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml).

La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato a concentrazioni crescenti fino a 5 mM.

5.17 Misura della conduttanza protonica indotta da acidi grassi

Per avere informazioni più precise sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato.

5.18 Determinazione dell'attività totale della Carnitina-palmitoil- transferasi.

L'attività totale della Carnitina-Palmitoil-Transferasi (CPT) è stata misurata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm, seguendo la cinetica della produzione di CoA-SH carnitina-dipendente in presenza di acido 5,5 -ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) usando palmitoil-CoA come substrato. Il metodo spettrofotometrico è basato sul rilascio di CoA dai tioesteri dell'Acil-CoA. Ciò induce la riduzione del DTNB ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico che determinerà lo sviluppo di un colore giallo. La reazione è stata misurata seguendo la metodica di Alexon e Nedergard, incubando i

mitocondri in: 75 mM di Hepes (pH 7.5), 10 mM di EDTA, 10 mg/ml di BSA, 2.5 ml di Palmitoil-CoA, 3 mM di DTNB. Tutte le provette contenenti le soluzioni sono state incubate per 3 minuti a 35°C prima di aggiungere Palmitoil-CoA e carnitina. La concentrazione dei tioli rilasciati è stata calcolata dal coefficiente di estinzione molare $E_{412\text{nm}}^{-1} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dopo aver corretto per la reazione aspecifica dei gruppi sulfidrilici dell'enzima con DTNB e per l'idrolisi non specifica della Palmitoil-CoA.

5.19 Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale. Il

dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare “in vivo” i danni prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche (Gardner, 2002). Infatti l'aconitasi è un enzima particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali dell'ossigeno (Fridovich, 1995; Drapier and Hibbs, 1996) per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi nel suo sito attivo, un cluster [4Fe-4S], che è il principale bersaglio dei radicali liberi. Il meccanismo di inattivazione dell'aconitasi da parte dei radicali liberi è il rilascio di ferro dal cluster [4Fe-4S]. L'aconitasi è un enzima del ciclo di Krebs, che catalizza la conversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad α -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto (NADPH). Il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto alla formazione di NADPH. La misura è stata realizzata in presenza di Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. Il livello dell'attività di questo enzima, misurata nell'estratto mitocondriale, eguaglia l'aconitasi attiva (livello basale). L'aconitasi inibita dai ROS è stata riattivata affinché l'attività totale potesse essere misurata mediante l'incubazione degli estratti

mitocondriali in un mezzo contenente ditioneitolio (DTT) 50 mM, Na₂S₂O₄ 0,2 mM e solfato ammonio ferroso 0,2 mM.

CAPITOLO 6

RISULTATI

Tutti i ratti sono stati pesati all'inizio dell'esperimento e subito prima del sacrificio. I ratti D hanno avuto il maggior incremento ponderale (tab. 1).

Tabella 1

Incremento ponderale dopo 6 settimane			
N	111,6±10,0gr	D	175,0±12,0*gr

* P <0,05 rispetto a N

Parametri biochimici

Livello serico di insulina

Il livello di insulina basale nel siero (dopo 16 ore di digiuno) è risultato essere significativamente più alto nei ratti D che in quelli N. Il contenuto di glucosio è significativamente più alto nei D rispetto ai controlli N. L'indice HOMA è significativamente più elevato nei ratti D che negli N (tab. 2).

Tabella 2

	N	D
Glucose mg/dL	84,1±2,5	106,8±5,3*
Insulin µg/L	0,598±0,156	1,234±0,228*
HOMA index	2,94±0,80	7,74±1,61*

* = P<0,05 rispetto a N

Livello serico ed epatico dei trigliceridi, adipochine e ALT

I livelli serici di trigliceridi e della leptina sono risultati essere significativamente più alti nei ratti D rispetto agli N. Il contenuto epatico di trigliceridi è risultato più elevato nei ratti D rispetto a quello dei ratti N.

Anche i livelli di leptina sono significativamente maggiori nei D che negli N, al contrario per l'adiponectina che è superiore negli N rispetto ai D. I livelli dell'ALT sono significativamente maggiori nei ratti D rispetto agli N (tab. 3)

Tabella 3

	N	D
Trigliceridi serici mg/dL	51,6±4,00	73,25±2,40*
Cont.epatico di trg (%)	4,1± 0.2	8,5±0.8*
Leptina, ng/ml	10,7±0.9	19,2±1,2*

Adiponectina, µg/ml	5.96±0.28	4.28±0.59*
ALT U/L	41,03 ± 3.6	67,8±1,5*

* = P<0,05 rispetto a N

Tessuto adiposo

Microscopia ottica

Il tessuto adiposo bianco si distingue grossolanamente in sottocutaneo e viscerale, ma in realtà la denominazione è più complessa riflettendo la distribuzione locale dei due tipi di grasso. Ad esempio per il grasso viscerale il tessuto adiposo portale (che drena i prodotti della lipolisi nel circolo portale) viene definito grasso omentale e mesenterico. Nella mia tesi faccio riferimento al grasso viscerale, in particolar modo a quello epididimale

Animali di controllo (ratti N)

Nei ratti normali dopo 6 settimane di dieta gli adipociti presentano un diametro medio di 8 µm. Non si notano alterazioni dell'architettura del tessuto.

Animali trattati (D)

Dopo sei settimane di dieta il tessuto adiposo epididimale dei ratti D presenta un aumento delle dimensioni degli adipociti con un diametro di $9\pm 0,7\ \mu\text{m}$. Nel tessuto si notano segni di infiammazione, con la presenza di adipociti ipertrofici circondati da più strati di macrofagi a formare le caratteristiche strutture simili a corona (CLS) (fig. 7). Con la reazione immunocitochimica (tecnica del polimero) usando un anticorpo policlonale anti-CD68 si mettono in evidenza appunto la grande abbondanza di macrofagi residenti (fig. 8).

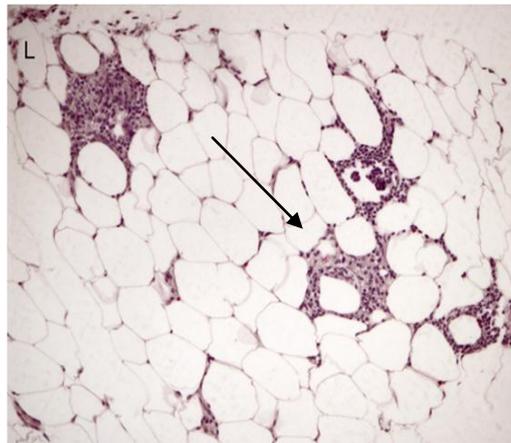


Figura 7: strutture CLS

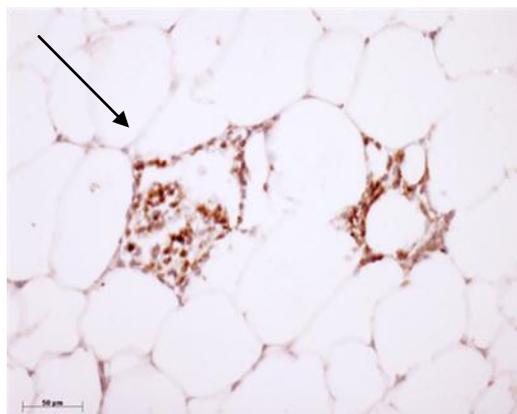


Figura 8: immunopositività per CD68

Microscopia elettronica

Gli adipociti dei ratti N a livello ultrastrutturale presentano un nucleo piuttosto eterocromatico ed un esile alone citoplasmatico schiacciato dal grande liposoma (Fig.9), REL e RER non particolarmente abbondanti, Golgi ben sviluppato (Fig 10) , mitocondri distribuiti, spesso, in fila lungo la sottile striscia di citoplasma. I mitocondri presentano una matrice abbastanza elettrondensa con lunghe creste, ed a volte ricordano un chicco di caffè (fig. 11-12).

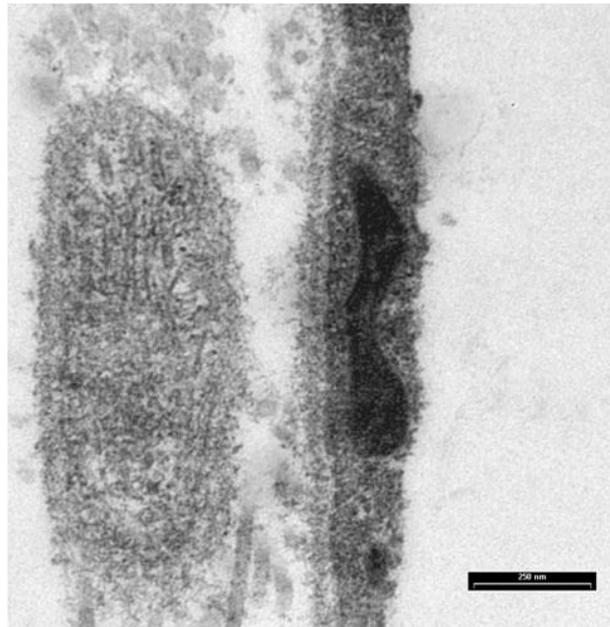


Figura 9

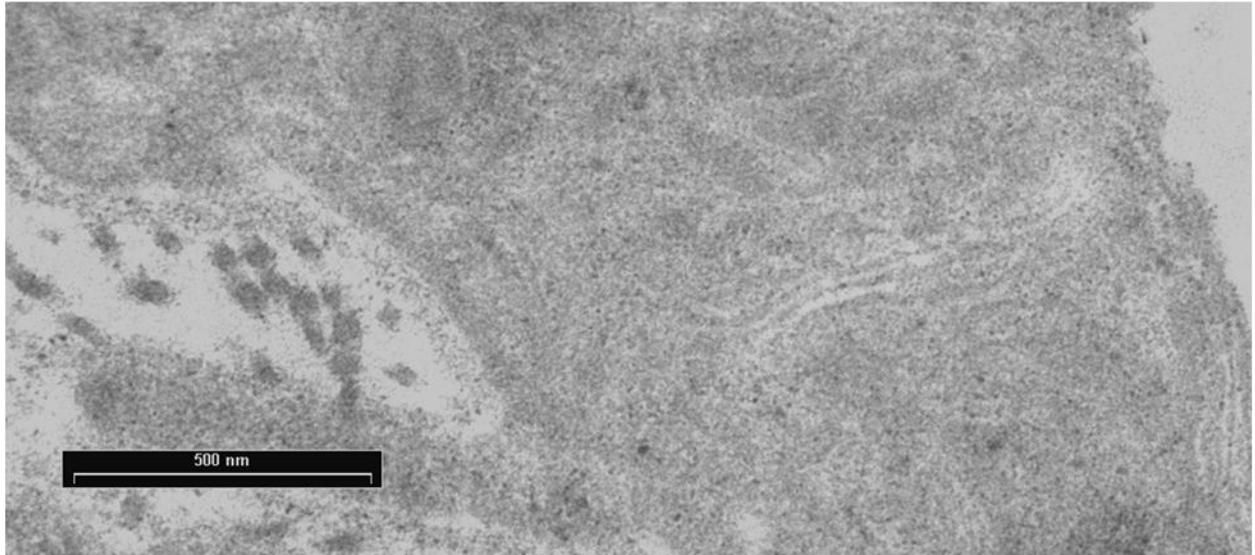


Figura 10

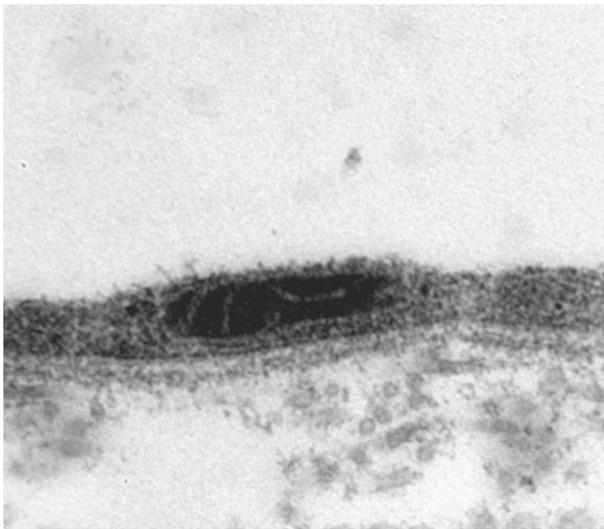


Figura 11

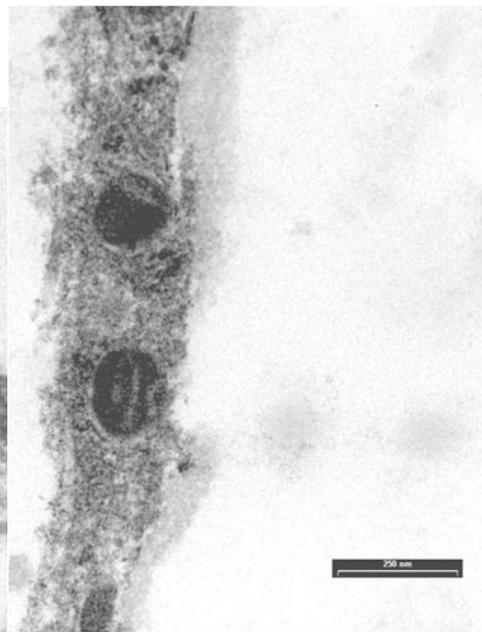


Figura 12

Nei *ratti D* il nucleo si presenta più eucromatico (fig.13), nel citoplasma si notano un gran numero di vescicole di circa 60-80nm, i mitocondri si trovano anche addensati nella zona di citoplasma più spesso che contiene il nucleo. Alcuni di essi sono particolarmente lunghi. Il reticolo si presenta con

cisterne molto dilatate che suggerisce una possibile condizione di stress. Alla superficie delle cellule si notano un gran numero di fossette legate probabilmente all'internalizzazione dei lipidi (fig.14-15-1).

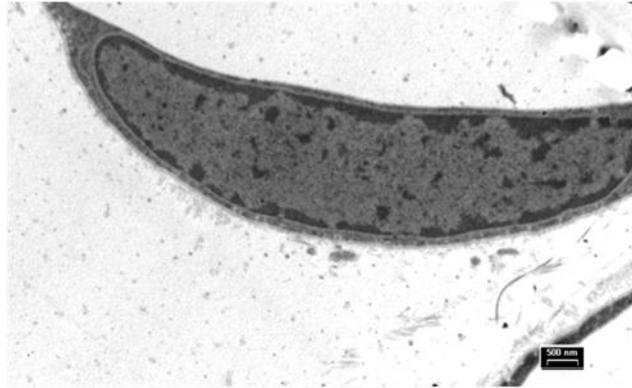


Figura 13

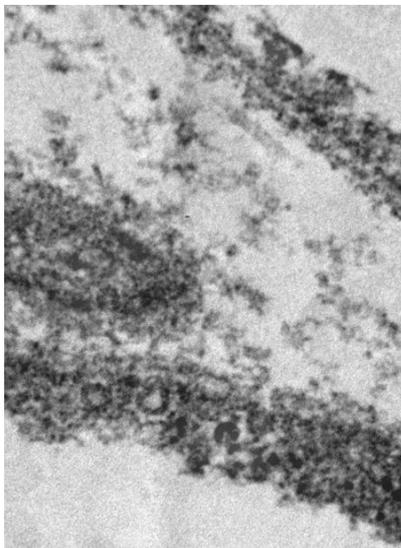


Figura 14

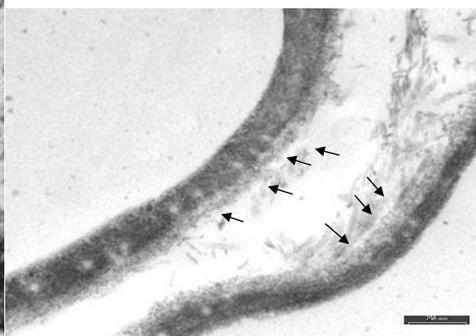


Figura 15

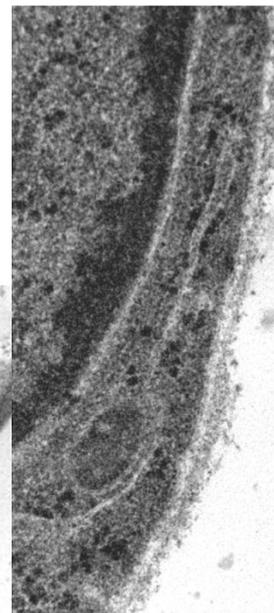


Figura 16

Fegato

Microscopia ottica

All'osservazione al microscopio ottico il fegato degli animali di controllo non presenta depositi di grasso oppure mostra piccole gocce lipidiche sparse in quantità molto modesta (fig. 17). I nuclei si presentano eucromatici, una piccola percentuale di epatociti è binucleato. Sono rari gli epatociti in apoptosi.

Nei ratti D, il fegato che all'osservazione macroscopica appare di colore giallo, grasso ed aumentato di volume, mostra gli epatociti con numerose gocce lipidiche. Per lo più sono presenti gocce di piccole dimensioni, ma se ne ritrovano anche di grandi. Quindi è presente una steatosi mista, diffusa in tutte le zone del parenchima, ma più concentrata nella zona 3 o pericentrale.

La steatosi si presenta di grado 2 (fig.18).

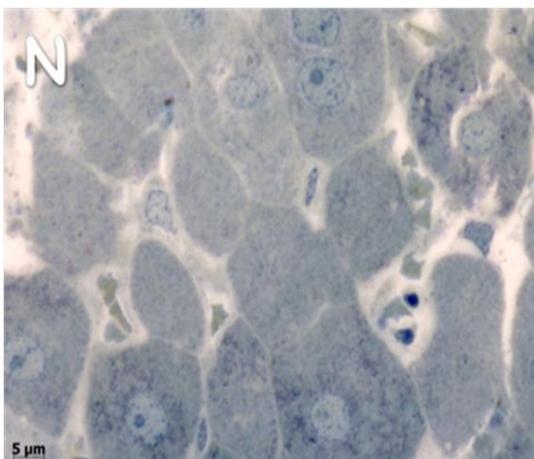


Figura 17: fegato ratto N

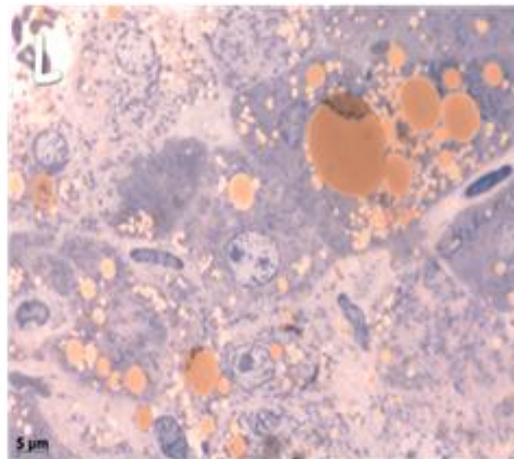
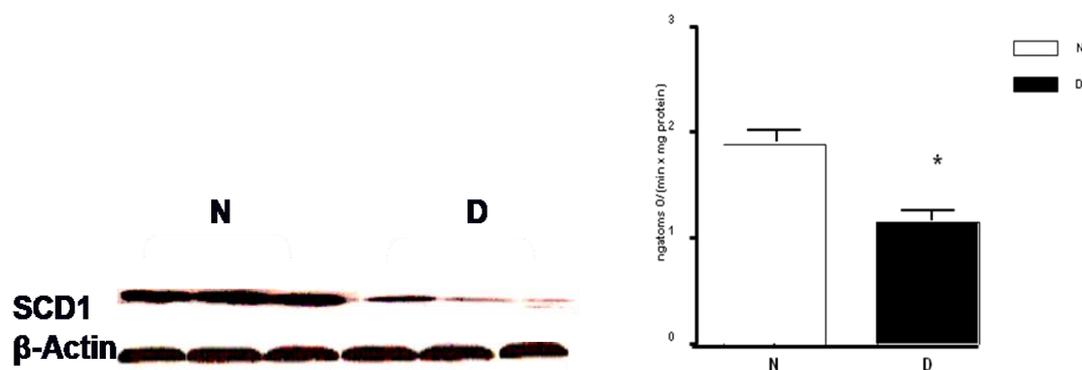


Figura 18: fegato ratto D

Immunocitochimica e Western blot

SCD-1 and PPAR α

Il contenuto epatico della Δ 9-desaturasi SCD-1 misurato in maniera semiquantitativa con analisi densitometrica mostra che esso è maggiore nei ratti N che non nei D (Fig.19).



Western Blot SCD1.* = $P < 0,05$ nei confronti dei controlli;

Figura 19

L'immunocolorazione per il PPAR α si localizza nel compartimento citoplasmatico di entrambi i gruppi di ratti, mentre quella nucleare, dovuta all'attivazione e traslocazione nei nuclei del PPAR α . Anche se osservata in entrambi i gruppi di ratti, è decisamente predominante nei D (Fig.20-21).

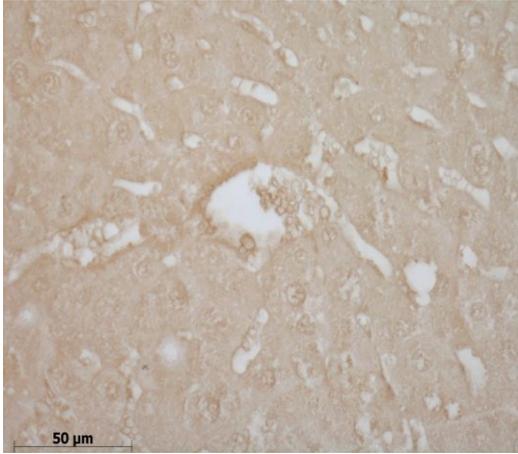


Figura 20: immunocolorezione per PPAR α in ratto N

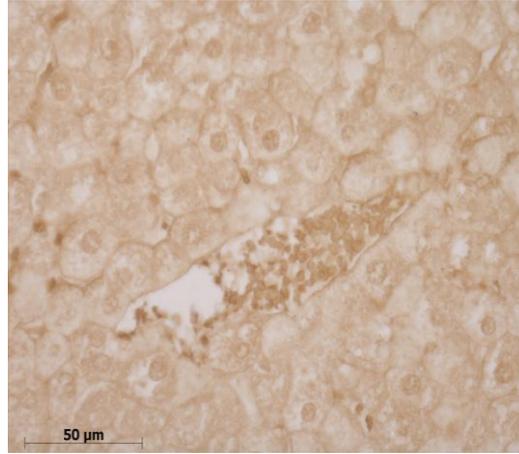


Figura 21: immunocolorezione per PPAR α in ratto D

ER stress: osservazione di immunocitochimica e ME. Western blot

L'eventuale presenza di epatociti stressati è messa in evidenza dagli anticorpi anti-Perk ed anti-Perk fosforilata (pPerk). Nei ratti N è presente una debole immunocolorezione per la Perk con l'eccezione di pochi epatociti più fortemente immunoreattivi, anche per la pPerk si osserva una debole positività in tutte le zone del fegato (Fig. 22-23). I ratti D presentano una più evidente positività in particolar modo per la pPerk principalmente nelle zone pericentrali e periportali (Fig. 24-25).

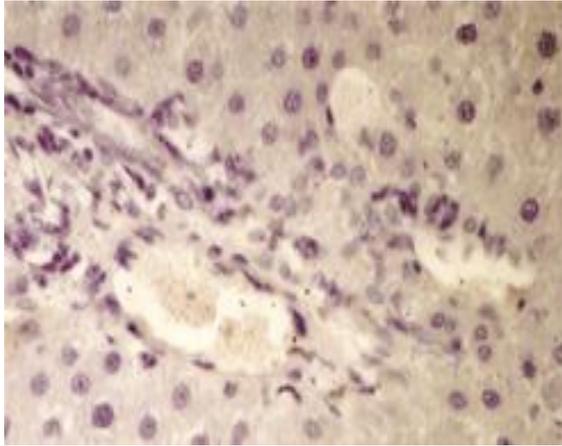


Figura 22: immunocolorazione per Perk in ratto N

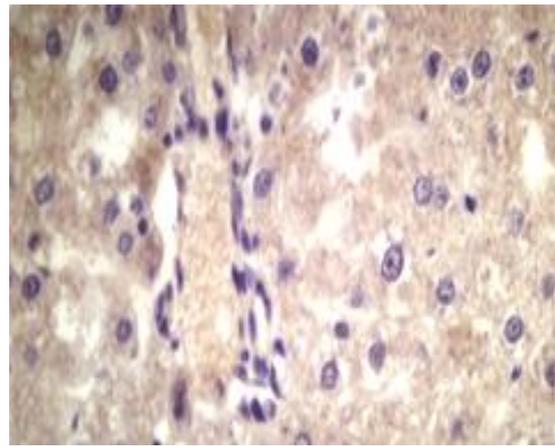


Figura 23: immunocolorazione per pPerk in ratto N

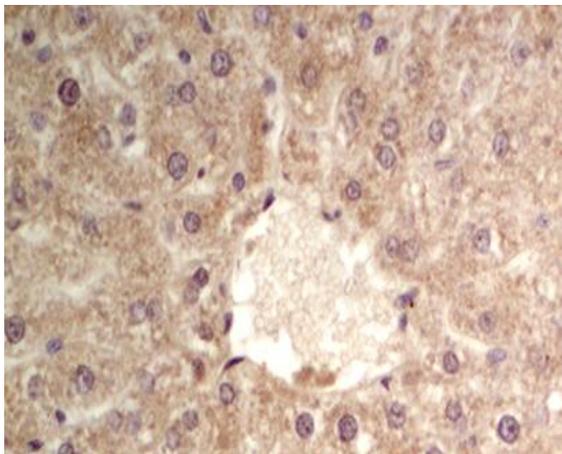


Figura 24: immunocolorazione per Perk in ratto D

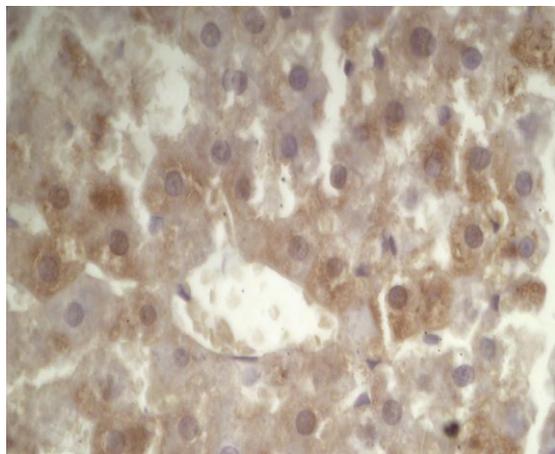


Figura 25: immunocolorazione per pPerk in ratto D

Al microscopio elettronico gli epatociti dei ratti N presentano nuclei eucromatici, un reticolo molto sviluppato nelle due forme liscio e rugoso, un apparato di Golgi con cisterne terminali molto ampie e ripiene di materiale, numerosi mitocondri. Il reticolo ruvido si presenta sottoforma di cisterne parallele dal diametro abbastanza regolare con ribosomi addossati alle membrane, spesso fra le cisterne del RE si ritrovano i mitocondri.

Negli esemplari D Il RE ruvido si presenta sottoforma di cisterne con un calibro irregolare con dilatazioni e restringimenti, a volte le cisterne sono particolarmente dilatate, a volte presentano al loro interno un accumulo di materiale elettrondenso, a volte i ribosomi addossati alle membrane sembrano aggregarsi in formazioni cristalline (Fig.26-27).

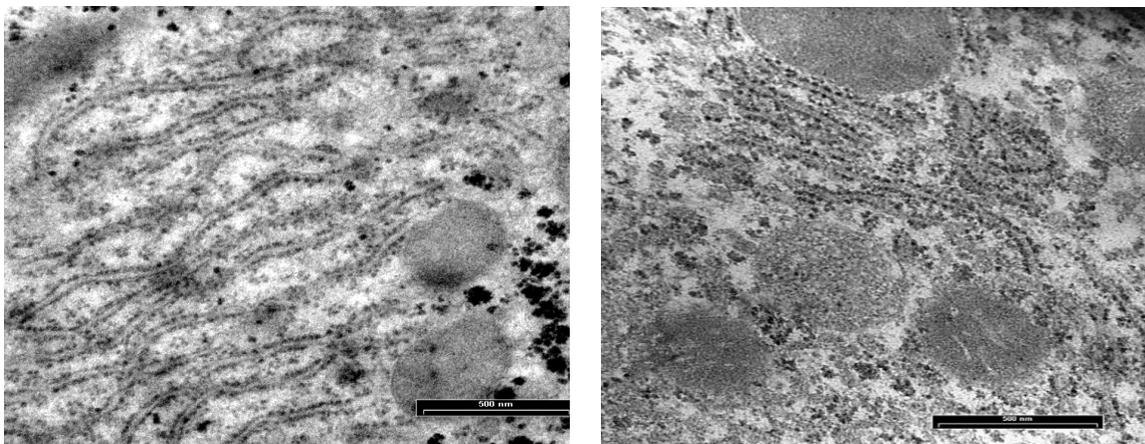


Figura 26: immagine di microscopia elettronica di reticolo endoplasmatico di ratto di controllo e trattato.

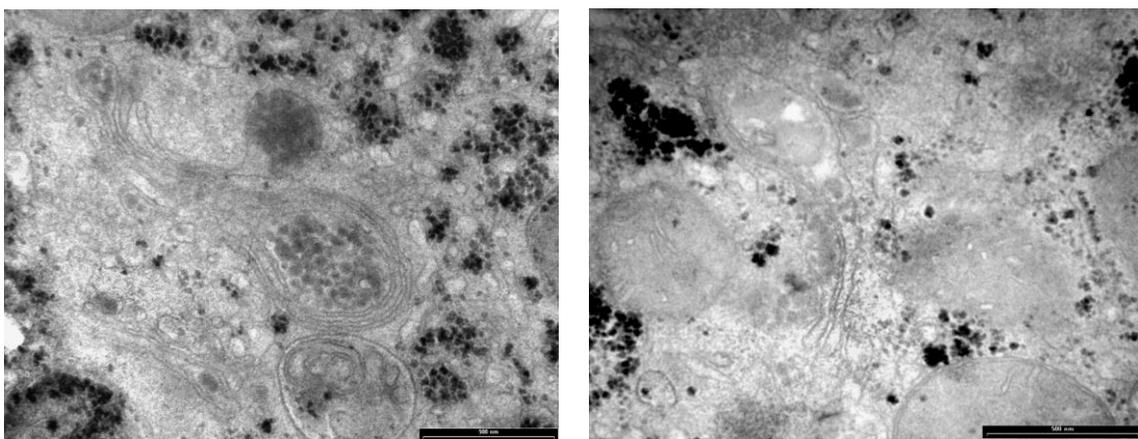


Figura 27: immagine di microscopia elettronica del l' apparato del Golgi di ratto di controllo e trattato.

Il contenuto di eIF2 α attivo e fosforilato è stato valutato tramite analisi densitometrica dei western blots eseguiti dagli omogenati epatici. Sia l'eIF2 α attivo che fosforilato è più elevato nei D rispetto agli N (Fig.28).

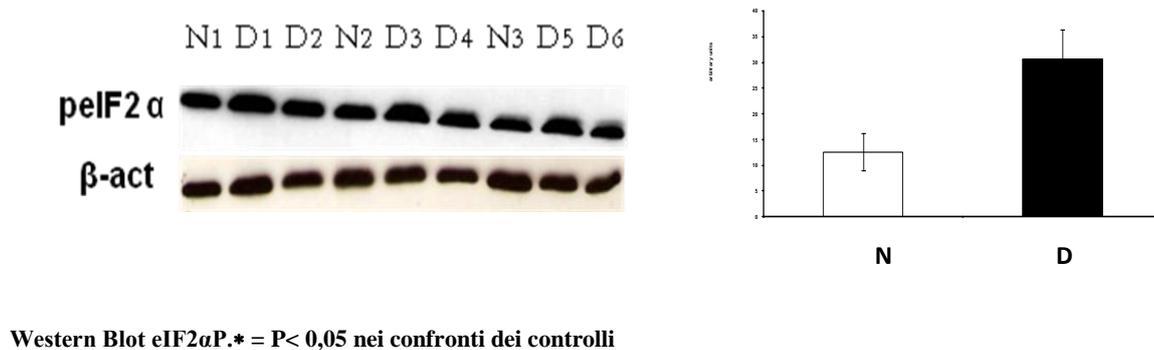
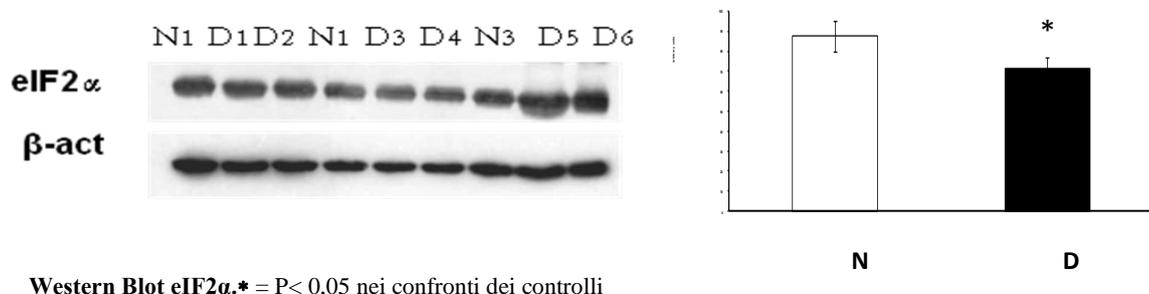


Figura 28

Sintesi di citochine

MCP-1

La positività per l' MCP-1 è solo raramente osservata nel gruppo N, mentre è ben evidente nei ratti D (Fig. 29-30) soprattutto a livello degli epatociti situati intorno alla vena centrale in zona 3 (pericentrale) e in zona 1

(periportale). Gli epatociti positivi sembrano presentare una distribuzione a scacchiera e spesso circondano epatociti “ballooned”. Una forte immunoreattività è presentata anche dalle cellule perisinusoidali HSCs, che si riconoscono per l’elevato contenuto di gocce lipidiche (Fig.29-30).

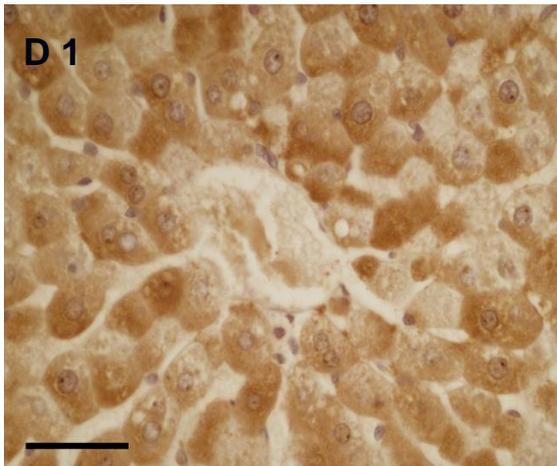


Figure 29

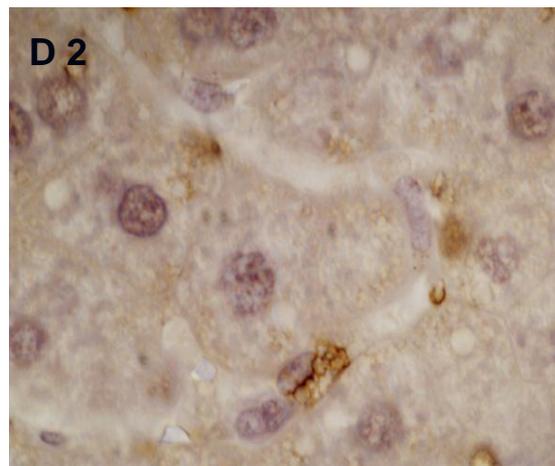


Figura 30

Infiammazione e degenerazione ballooning

La maggiore presenza di cellule positive per MCP-1 nei ratti ipernutriti portano all’infiltrazione di cellule infiammatorie nel fegato: nei ratti D sono presenti almeno 1-2 focolai infiammatori in una stessa sezione. Gli epatociti vicini al focolaio infiammatorio sono danneggiati, come può essere messo in evidenza dalla loro negatività per la reazione PAS, dal momento che essi perdono il loro contenuto di glicogeno (Fig. 31). Diversi epatociti “ballooned”, con slargamento delle cellule e contenuto intracellulare

otticamente vuoto, si osservano nel parenchima, in particolar modo vicino alla vena centrolobulare (zona 3). Corpi apoptotici eosinofili (corpi di Councilman), sono evidenti in zona 3 e zona 2. Essi si staccano dalle altre cellule della lamina e possono essere circondate dalle cellule di Kupffer con o senza linfociti e neutrofili. Sia nei ratti N che D sono presenti numerosi nuclei glicogenati (Fig.31-32-33).

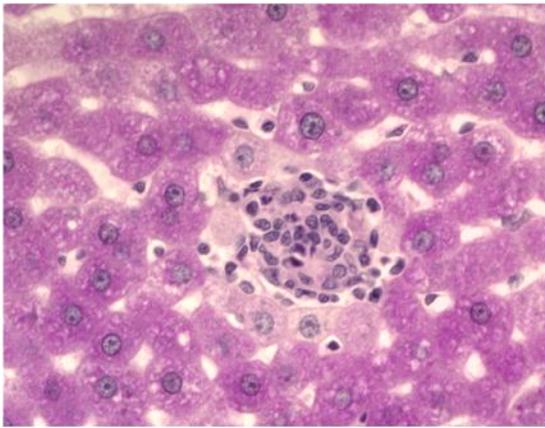


Figura 31

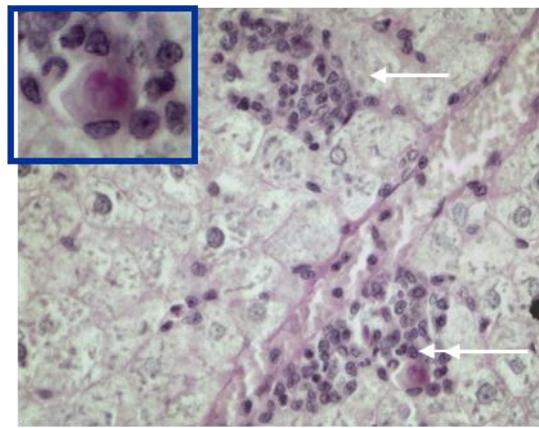


Figura 32

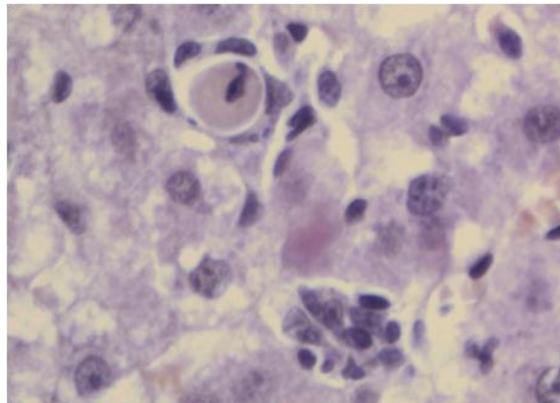


Figura 33

CD68 e Mac-2/galectina-3

Accanto ai dati istologici dell'infiltrazione di cellule infiammatorie nel fegato, le reazioni immunocitochimiche mettono in evidenza cellule immunoreattive (ir) per il CD 68 che identifica la linea dei monociti-macrofagi e, di conseguenza, le cellule di Kupffer. Le cellule CD68-ir presentano una notevole eterogeneità e si mostrano come cellule rotonde, allungate, fusiformi e qualche volta ameboidi, distribuite nei sinusoidi in tutto il parenchima epatico. Le cellule di Kupffer sono sempre abbondanti nei ratti N e D ma il loro numero aumenta nei D dove tendono a formare dei raggruppamenti in particolare in zona 3 e 1, dove è maggiore la steatosi. L'immunocolorazione per Mac-2/galectina-3 (Gal3), una proteina di 32-kDa espressa in maniera predominante alla superficie dei macrofagi infiammatori, nei ratti N evidenzia le cellule di Kupffer e l'epitelio dei dotti biliari mostrando una distribuzione simile a quella delle cellule CD68-ir. Anche le cellule Gal3-ir mostrano la tendenza a formare aggregati e le protusioni di queste cellule si estendono come una rete nel parenchima epatico, che va a circondare gli epatociti, in particolar modo quelli moribondi. Non sono solo le cellule di Kupffer ad esprimere questa proteina, a giudicare dal maggior numero di cellule Gal3-ir rispetto a quelle CD68-ir: infatti cellule con le caratteristiche morfologiche di HSC, e.g. la presenza di numerose goccioline lipidiche, sono marcate da questo anticorpo (Fig.34-35-36-37). Inoltre il

reclutamento di monociti dal sangue può contribuire all'aumento delle cellule Gal3-ir.

L'aumento del numero di cellule CD68-ir e Gal3-ir nei ratti D è stato confermato dall'analisi dei western blot che indicano che il contenuto in CD68 e Gal-3 degli omogenati epatici è significativamente superiore nel gruppo D rispetto agli N (Fig.38).

Infine una doppia reazione immunocitochimica per Gal-3/CD68 mostra cellule di Kupffer doppiamente marcate, però ci sono alcune cellule allungate che risultano positive esclusivamente alla Gal3: queste cellule potrebbero essere HSC che si stanno trans differenziando in miofibroblasti (Fig.37).

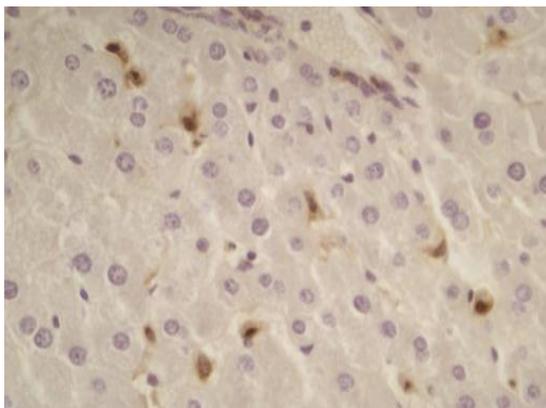


Figura 34: immunoreattività per cd-68 in ratto N

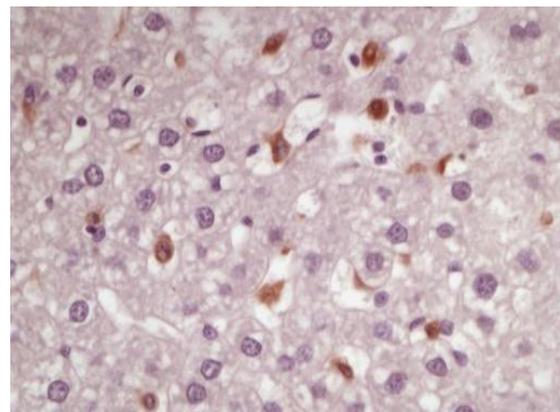


Figura 35: immunoreattività per Mac-2/Gal-3 in ratto N

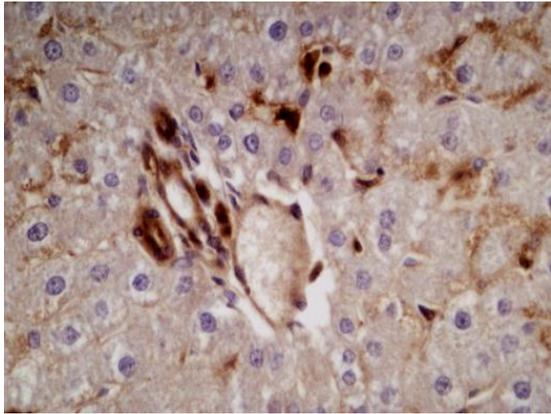


Figura 36: immunoreattività per Mac-2/Gal-3 in ratto D

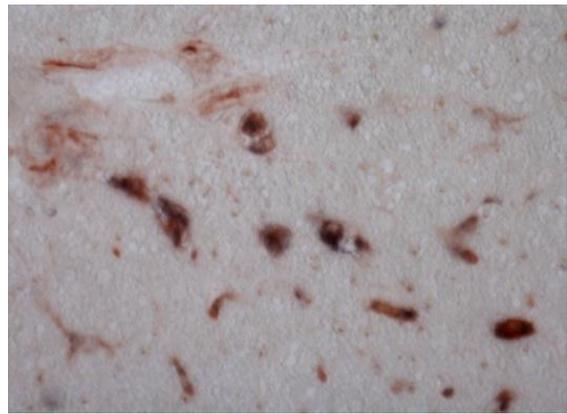
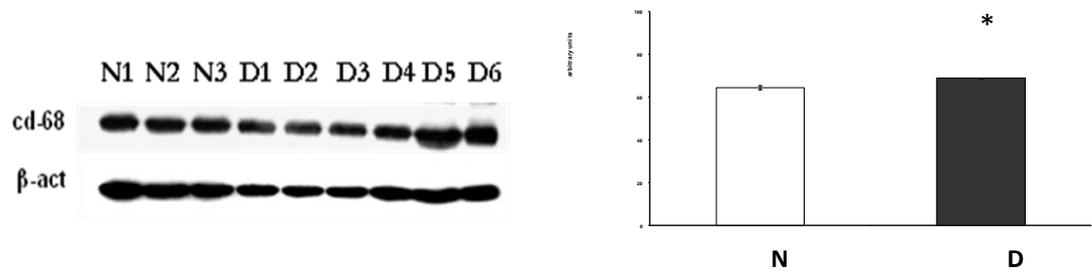
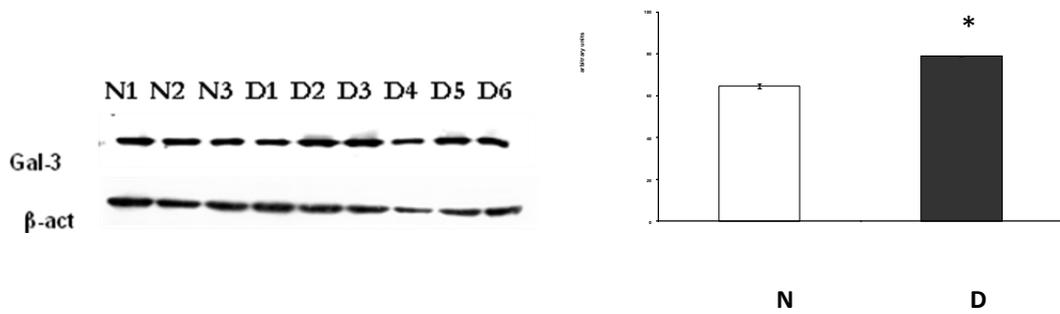


Figura 37: immunoreattività per cd-68/Gal-3 in ratto D



Western Blot CD 68.* = P < 0,05 nei confronti dei controlli



Western Blot Gal 3.* = P < 0,05 nei confronti dei control

Figura 38

TNF α

La positività per il TNF α nei ratti N è debole e ristretta in alcune aree portali dove è osservata in alcune cellule mononucleate. Nei ratti D la positività risulta diffusa lungo le pareti dei sinusoidi, dovuta a cellule di Kupffer e/o HSC. A volte è possibile mettere in evidenza tale positività in cellule di Kupffer allungate o in rari epatociti (Fig.39-40).

Le determinazioni seriche del contenuto di TNF- α mostrano un aumento significativo nei ratti D rispetto ai controlli (tab. 4).

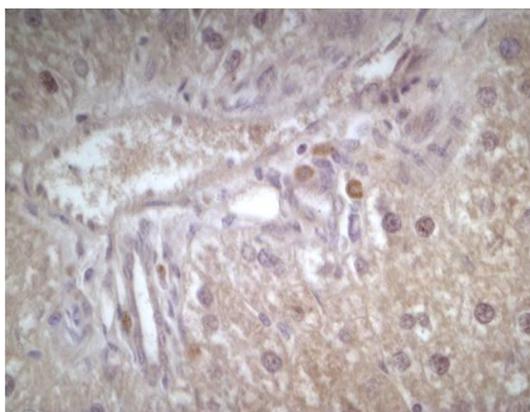


Figura 39: immunoreattività per TNF- α in ratto N

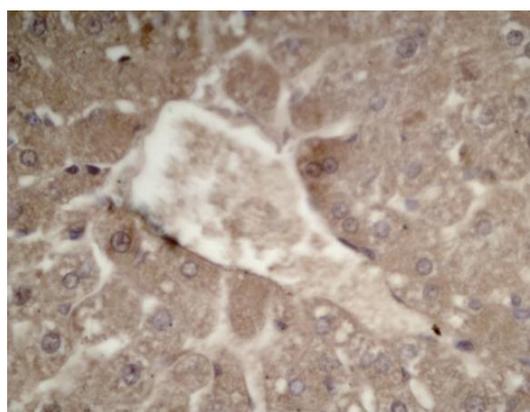


Figura 40: immunoreattività per TNF- α in ratto D

	N	D
TNF-α ng/ml	0,112 \pm0,02	0,207\pm0,04*

* = P < 0,05 rispetto a N

Tabella 4

CRBP and α -SMA

Le HSC che giacciono nello spazio di Disse nelle sezioni istologiche appaiono molto vicine alle cellule di Kupffer. In un fegato normale le HSC quiescenti sono fornite di sottili e lunghi prolungamenti in contatto con la parete dei sinusoidi ma anche potenzialmente con le cellule di Kupffer. Esse grazie al loro contenuto di retinolo vengono messe in evidenza con l'anticorpo anti-CRBP-1 (cellular retinol-binding protein-1). Le cellule CRBP-1-ir sono abbondanti sia nei ratti N che D. Il loro numero però aumenta nei ratti D rispetto agli N (Fig.41-42). Infatti l'analisi dei western blot degli omogenati di fegato mostra un aumento significativo del contenuto di CRBP-1 nei ratti D rispetto agli N (Fig.43). Poiché durante il danno epatico le cellule HSC si attivano in miofibroblasti che esprimono l' α -SMA (α -actina del tessuto muscolare liscio), per verificare l'avvenuto processo di trans-differenziamento, ho eseguito reazioni immunocitochimiche per l' α -SMA, senza ritrovare nessuna positività nei ratti N mentre nel gruppo D una immunoreattività per l' α -SMA è stata localizzata nelle pareti dei sinusoidi in stretta vicinanza con gli epatociti (Fig.44).

Anche l'analisi del western blot per l' α -SMA dimostra che è presente in quantità significativamente maggiore nei ratti D (Fig.45).

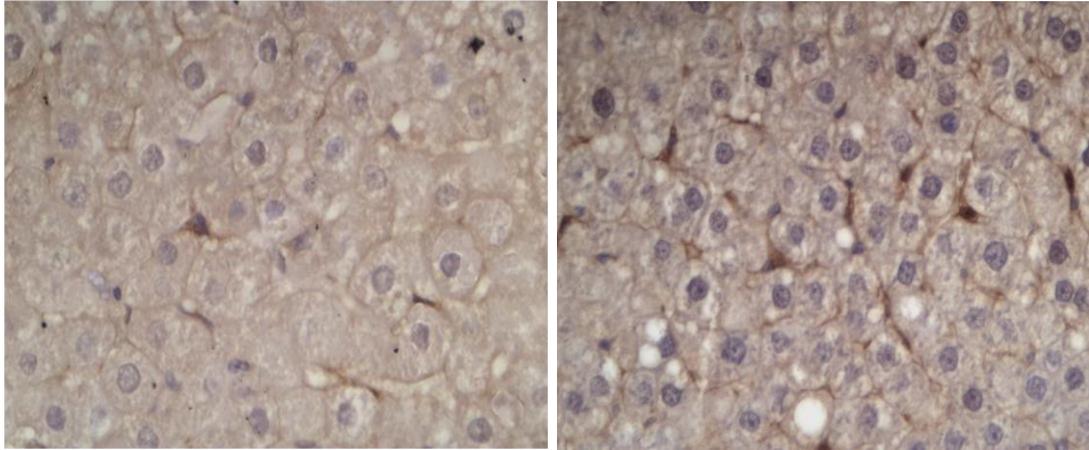
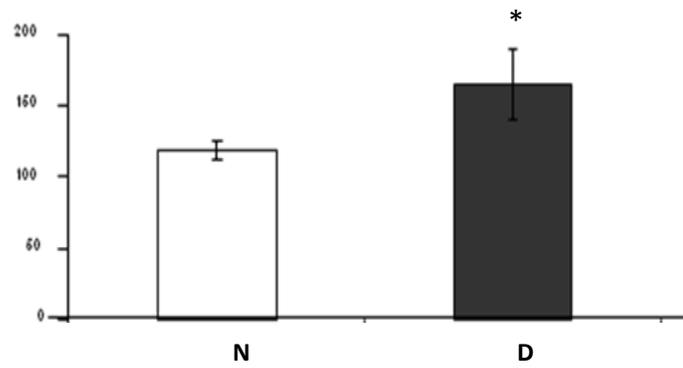
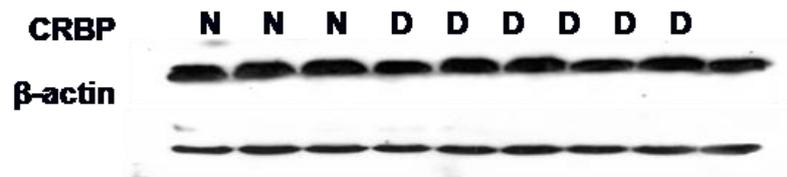


Figura 41: immunoreattività per CRBP-1 in ratto N **Figura 42:** immunoreattività per CRBP-1 in ratto D



Western Blot CRBP.* = $P < 0,05$ nei confronti dei control

Figura 43

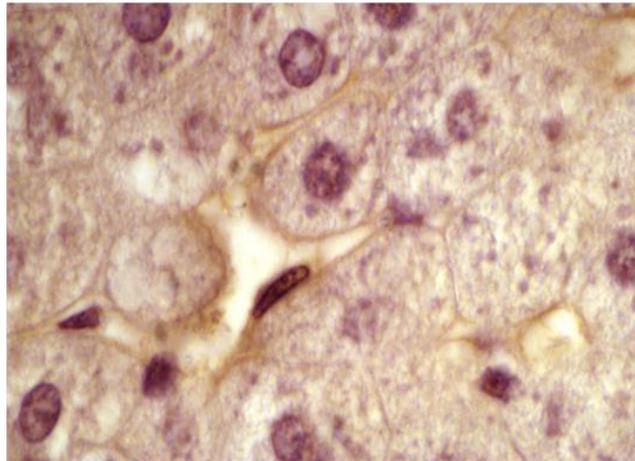
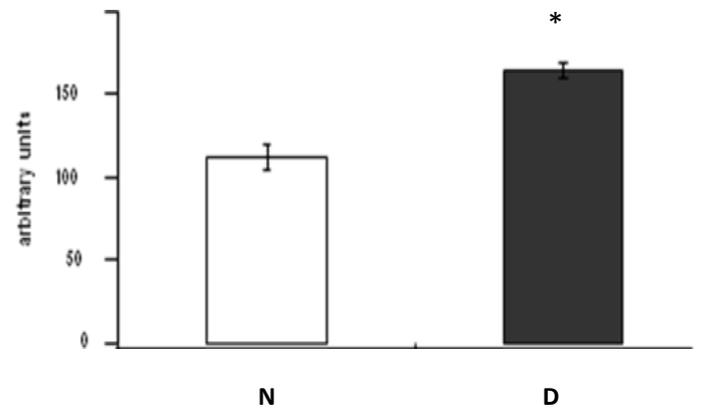
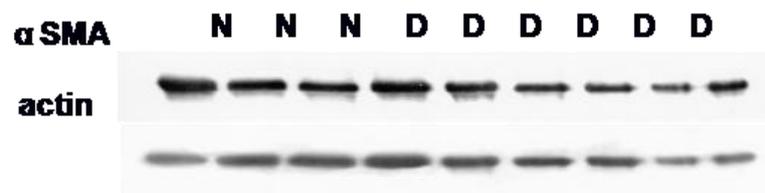


Figura 44: immunoreattività per α -SMA in ratto D



Western Blot α -SMA.* = $P < 0,05$ nei confronti dei controlli

Figura 45

TGFβ-1

L'immunoreattività per questa citochina che gioca un ruolo di primo piano nella risposta infiammatoria, nei ratti N è presente in zone ristrette del parenchima, all'interno ed intorno alla parete dei sinusoidi. Negli animali D la immunocolorazione è estremamente diffusa e molto forte, in alcuni casi il lume dei capillari è pieno di materiale immunoreattivo. Oltre alle cellule di Kupffer e le HSC che risultano positive, anche alcuni epatociti sono immunoreattivi (Fig.46-47). Le doppie immunocolorazioni effettuate sulla stessa sezione usando anticorpi anti-CRBP1 ed anti- TGFβ-1 mostrano che la maggior parte delle cellule in lo sono simultaneamente per i due anticorpi utilizzati.

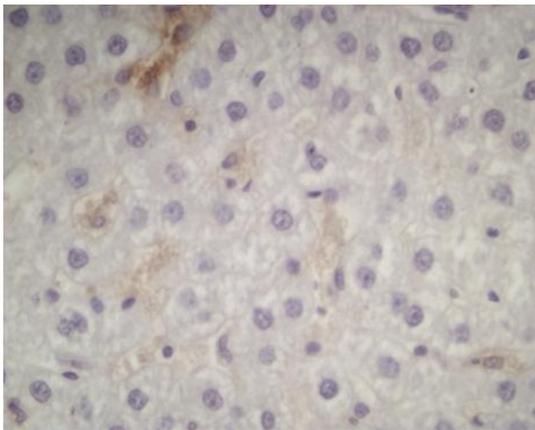


Figura 46: immunoreattività per TGF-β in ratto N

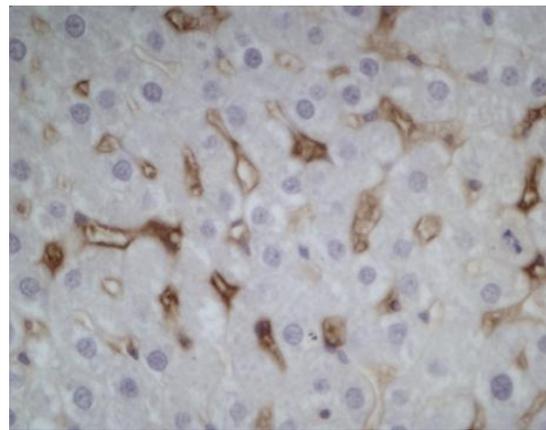


Figura 47: immunoreattività per TGF-β in ratto D

Deposizione di collagene

Non ci sono grosse differenze nella deposizione delle fibre collagene nel fegato degli animali trattati rispetto ai controlli nelle sezioni colorate con il Picosirius red che mette appunto in evidenza le fibre collagene (Fig. 48-49).

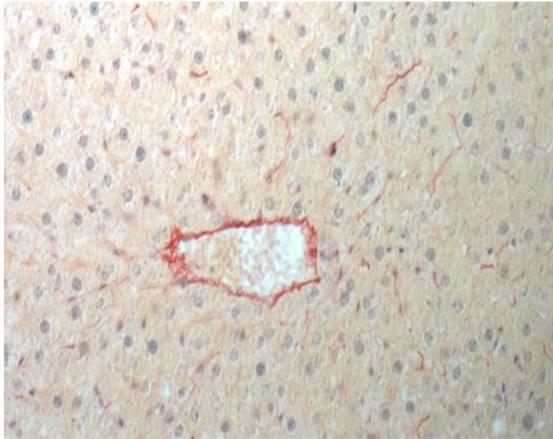


Figura 48: Picosirius red per ratto N



Figura 49: Picosirius red per ratto D

Apoptosi

Insieme alle immagini delle apoptosi di sezioni di fegato colorate con le H&E, sono state effettuate reazioni Tunel. Nei fegati dei ratti N un numero estremamente ridotto di cellule presenta nuclei-tunel positivi (fig.50). Nei ratti D il numero aumenta (n cellule apoptotiche/campo x400), come indicato in tabella 5.

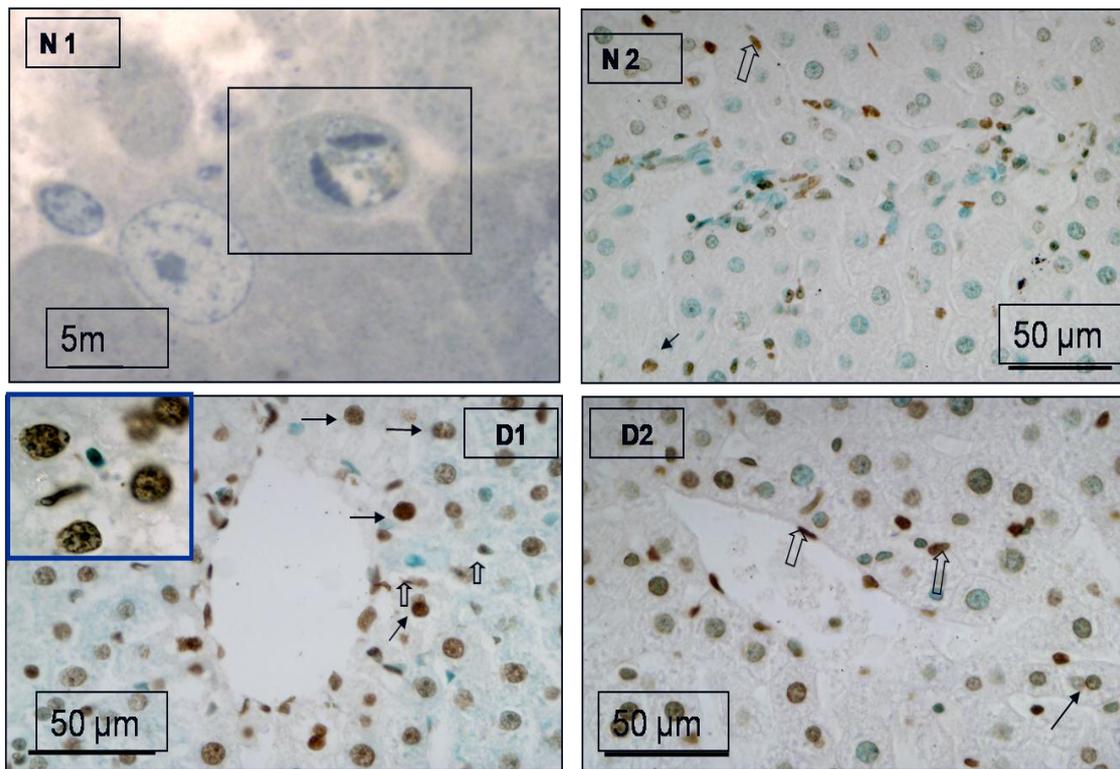


Figura 50

	N	D
Tunel positive nuclei	1,5 ± 0,2	4,01 ± 0,4

Tabella 5

Parametri mitocondriali epatici

(Questi dati sono stati ottenuti presso la sezione di fisiologia con la collaborazione del gruppo dei prof. A. Barletta, L. Lionetti, M.P. Mollica)

Le misure dell'attività CS indicano che l'attività enzimatica misurata nell'omogenato ed espresso per g di fegato fresco (Tab. 6), è simile nei due gruppi di ratti. Mentre l'attività specifica di CS, espressa per mg di proteine mitocondriali è significativamente più bassa nei D che negli N, da questo risulta che la massa proteica mitocondriale (Tab. 6), calcolata come rapporto dell'attività di CS nell'omogenato e nei mitocondri isolati,, è significativamente più elevata nei ratti D rispetto agli N.

La velocità della respirazione nei mitocondri nello Stato 3 e Stato 4 calcolata usando come substrato il succinato è significativamente ridotta nei ratti D (vs. N). La velocità di ossidazione degli acidi grassi (misurata in presenza di palmitoyl-carnitina come substrato) e l'attività del sistema della CPT è aumentata nei ratti D (Tab. 6)

Confrontati con i ratti N, quelli D mostrano un aumento della produzione mitocondriale di ROS (come confermato dal rapporto fra l'attività dell'aconitasi basale/totale, un marker dello stress ossidativo) (Tab. 6).

Per quanto concerne l'efficienza mitocondriale in condizioni basali i ratti D mostrano una conduttanza protonica simile a quella dei ratti di controllo (Fig. 51). Al contrario invece per quanto concerne le misure della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi che risulta significativamente diminuita nei ratti D, indice del fatto che devono ossidare meno substrati per mantenere gli stessi livelli di potenziale di membrana (Fig. 52).

	N	D
Homogente CS(μmol/min x gr tessuto)	11,9±0,7	11,1±0,37
Mitochondria CS (μmol/min*mg protein)	0,46±0,02	0,31±0,02*
Mitochondrial protein mass (mg/g wet liver)	25,8±1,41	35,4±1,0*
Fatty acid oxydation rate, ngatoms O/(min x mg proteins)	78,1± 5	97,7 ± 8*
CPT system activity, nmol/(min x mg proteins)	8,1±0,6	11,5±0,5*
Basal aconitase/total aconitase	0,84±0,013	0,71±0,014*

Values are means ± SE of 7 different experiments. *P<0.05 compared to N

Tabella 6

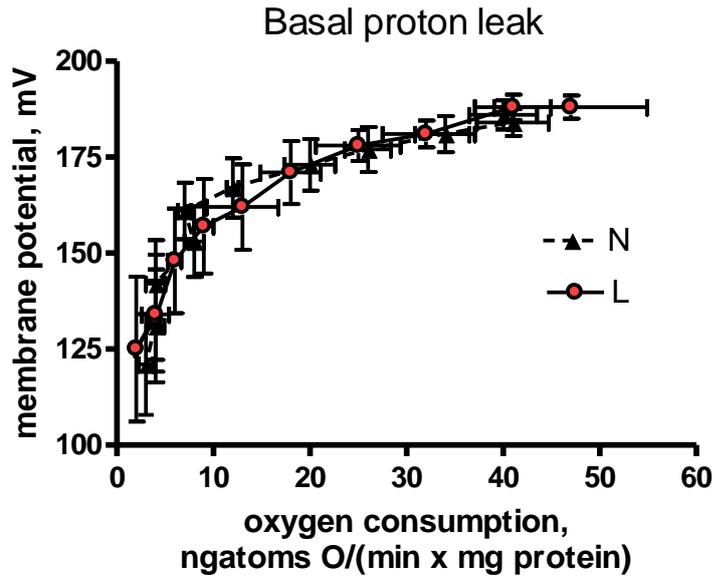


Figura 51

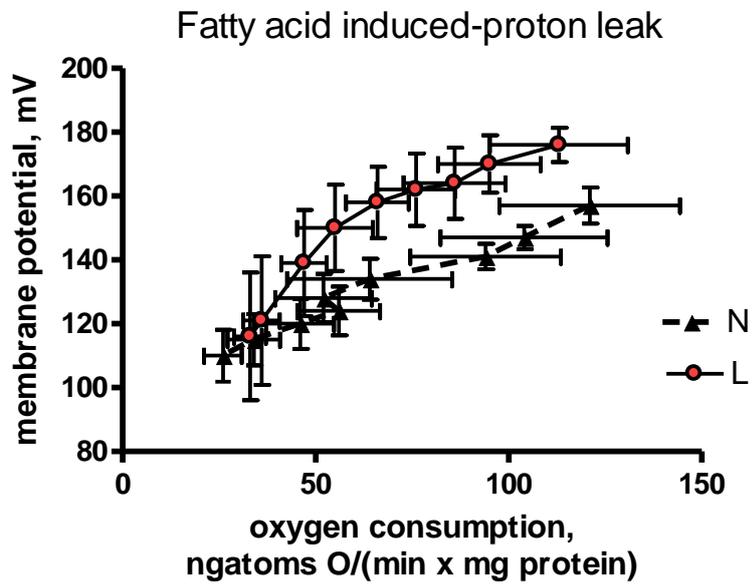


Figura 52

Osservazioni di Microscopia elettronica: ultrastruttura dei mitocondri

Negli epatociti dei ratti N i mitocondri presentano forma allungata o a racchetta, alcuni sono circolari (Fig. 53). La matrice è poco densa, le creste sono laminari, il diametro longitudinale medio è riportato in tabella 7.

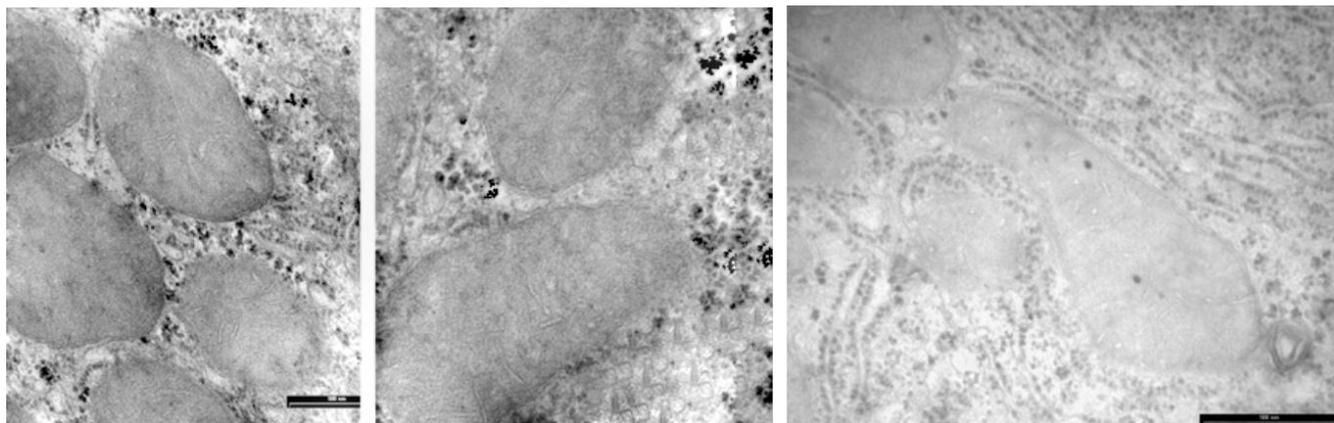


Figura 53

Nei ratti D, la forma, le dimensioni ed i contorni dei mitocondri variano: si notano mitocondri circolari di piccole dimensioni spesso disposti in fila, altri sono molto allungati con una forma a manubrio e molto stretti al centro suggerendo un processo di fissione; alcuni presentano gocce lipidiche al loro interno, altri circondano grosse gocce lipidiche. Più raramente si osservano mitocondri strettamente raggruppati, in alcune micrografie si vede un mitocondrio che si avvolge intorno ad un altro, immagini che suggeriscono processi di fusione. Generalmente la matrice appare condensata e le creste dilatate ed a volte, ma non sempre, ridotte di numero, spesso limitate solo

alla periferia dell'organello. Qualche volta lo spazio intermembrana (IMS) appare dilatato e la membrana esterna (OMM) interrotta (fig. 54).

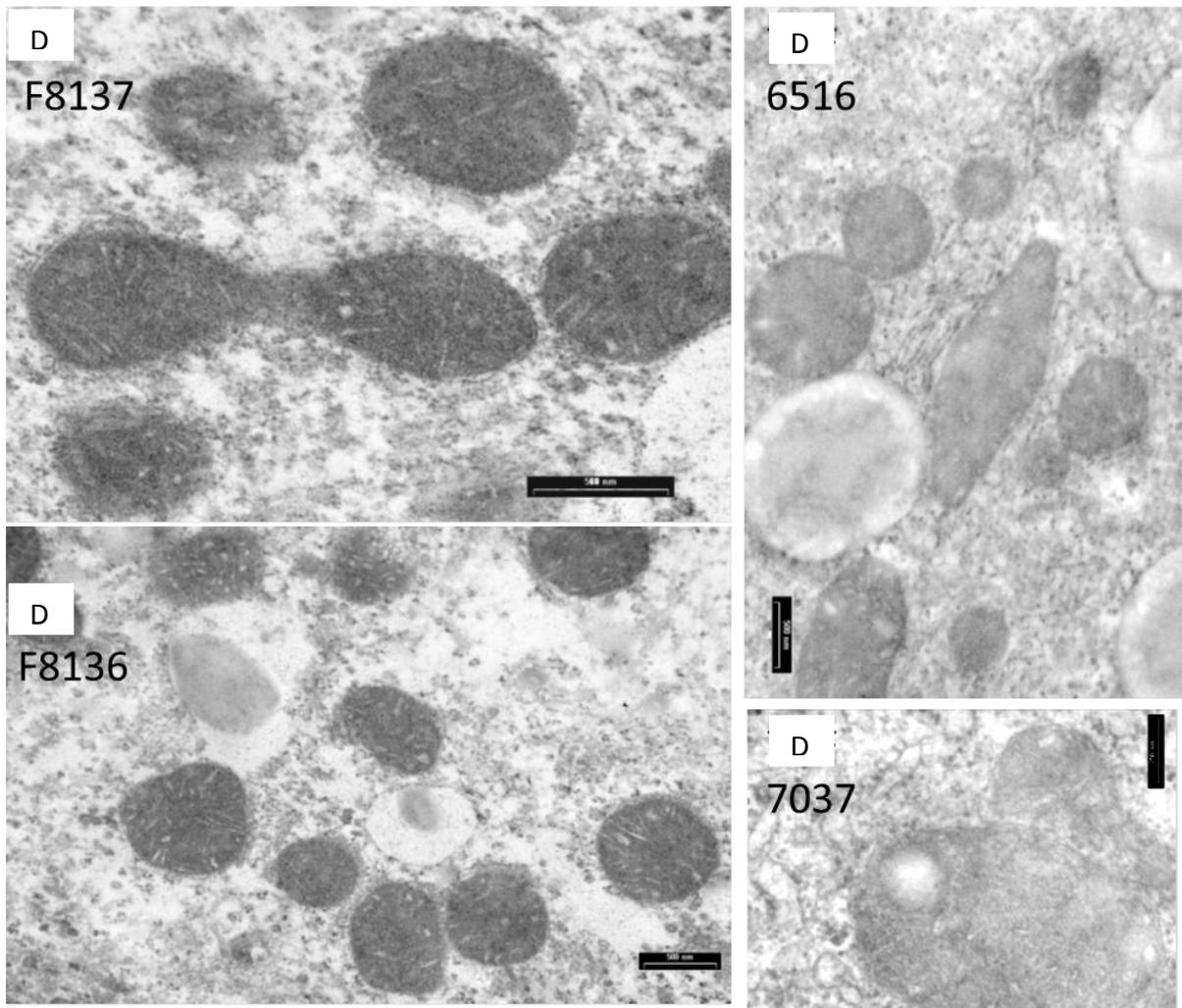


Figura 54

	Tubular mitochondrial length	Circular mitochondrial length
N	1290,0±54,5	659,8±16,2
D	1066,5±34,4*	602,6±13,5

*P<0.05 rispetto ai controlli N

Tabella 7

Immunocitochimica e Western Blot

Mitofusina

L'immunocolorazione per la mitofusina di sezioni di fegato mostra che sia gli epatociti che le cellule di origine mesodermica (HSC e Kupffer) sono immunoreattive per la mitofusina in entrambi i gruppi in studio. L'immunoreattività, però, è meno evidente nei ratti D, rispetto ai ratti N (fig. 55).

Le analisi densitometriche dei western blots, eseguite sull'omogenato indicano un lieve aumento di espressione di Mfn2 nel gruppo D rispetto agli N, mentre quelli eseguiti su estratti mitocondriali, mostrano che il contenuto della proteina è significativamente più elevato nel gruppo N che nei D (fig. 56).

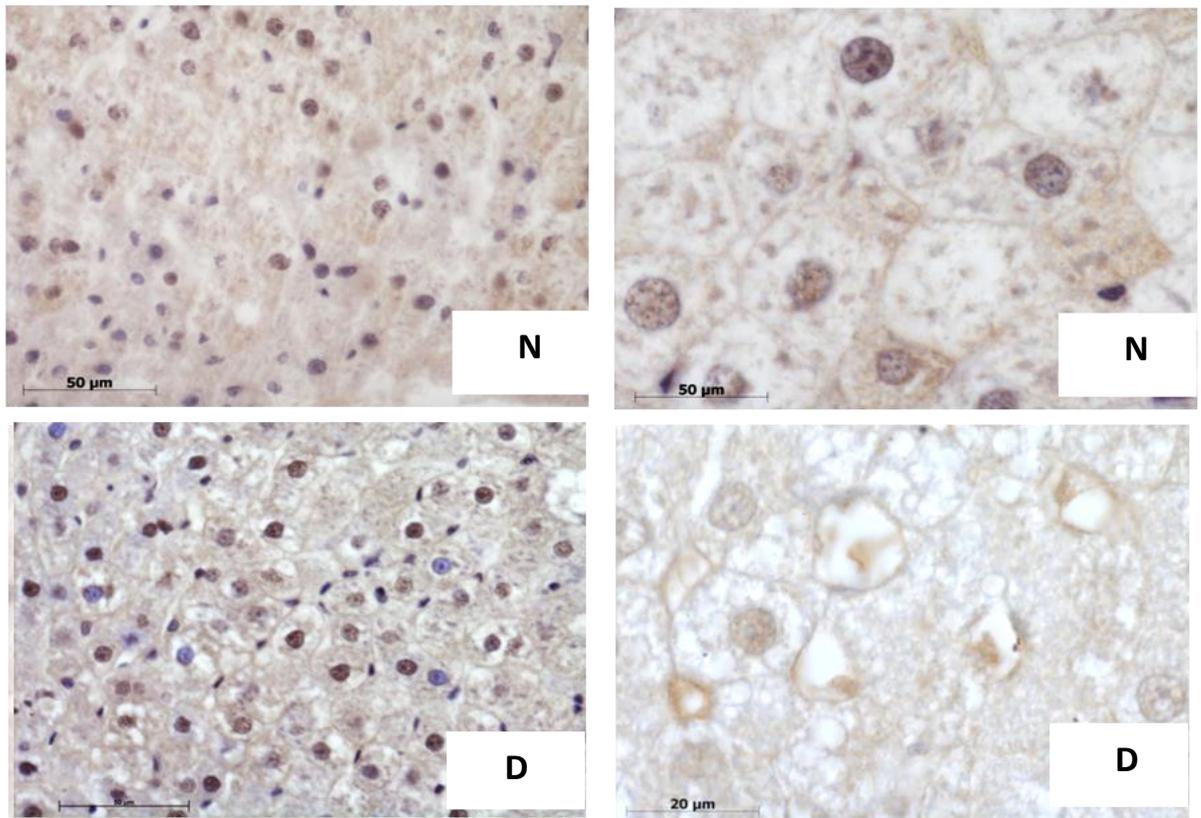


Figura 55

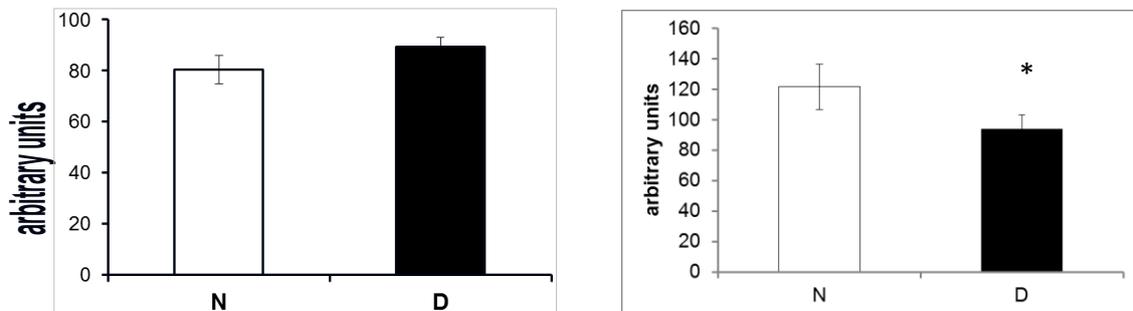


Figura 56

DRP1 e Fis1

L'immunocolorazione per DRP1 mostra che la positività per tale proteina è molto elevata sui mitocondri dei ratti D (Fig. 58).

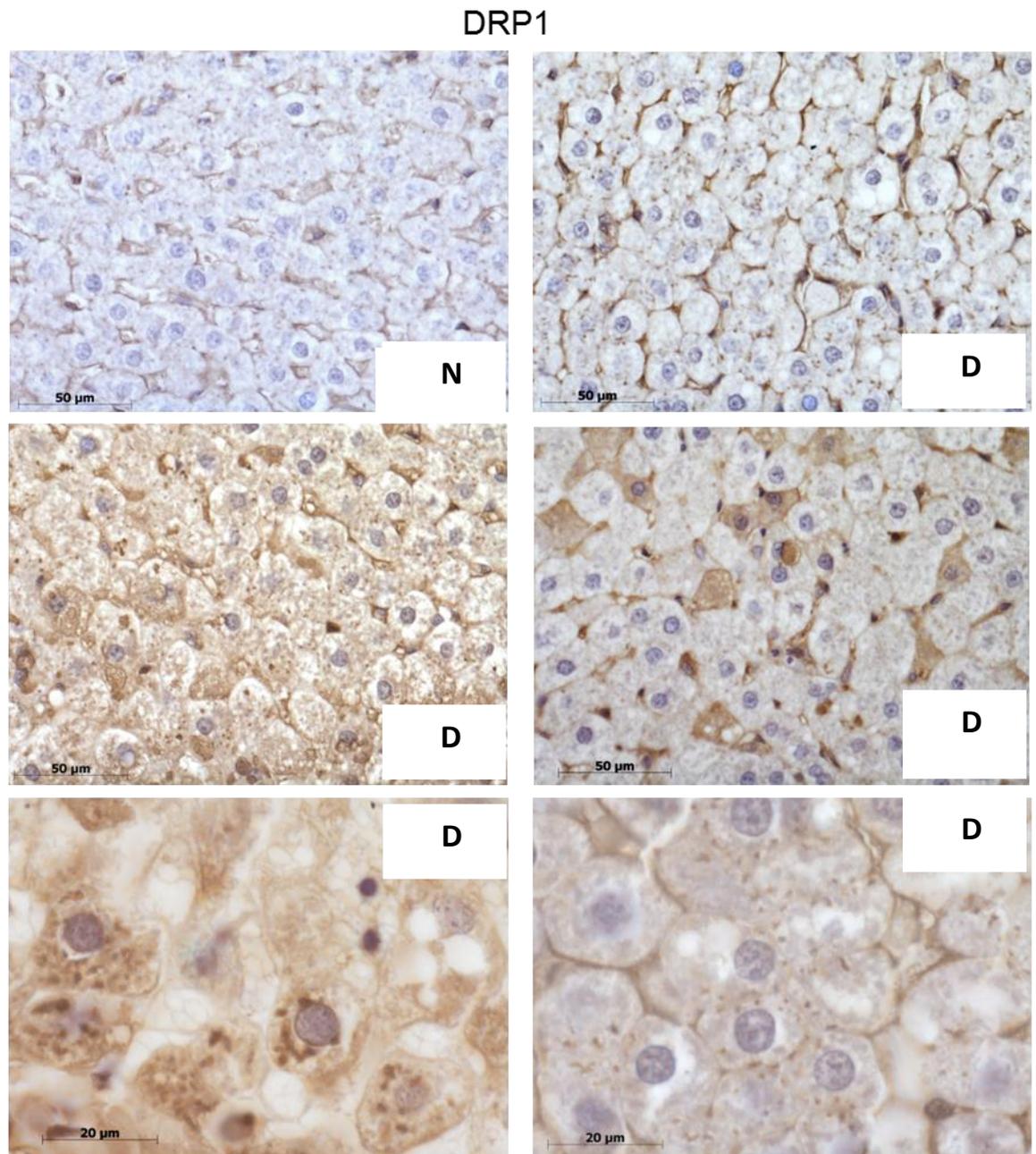
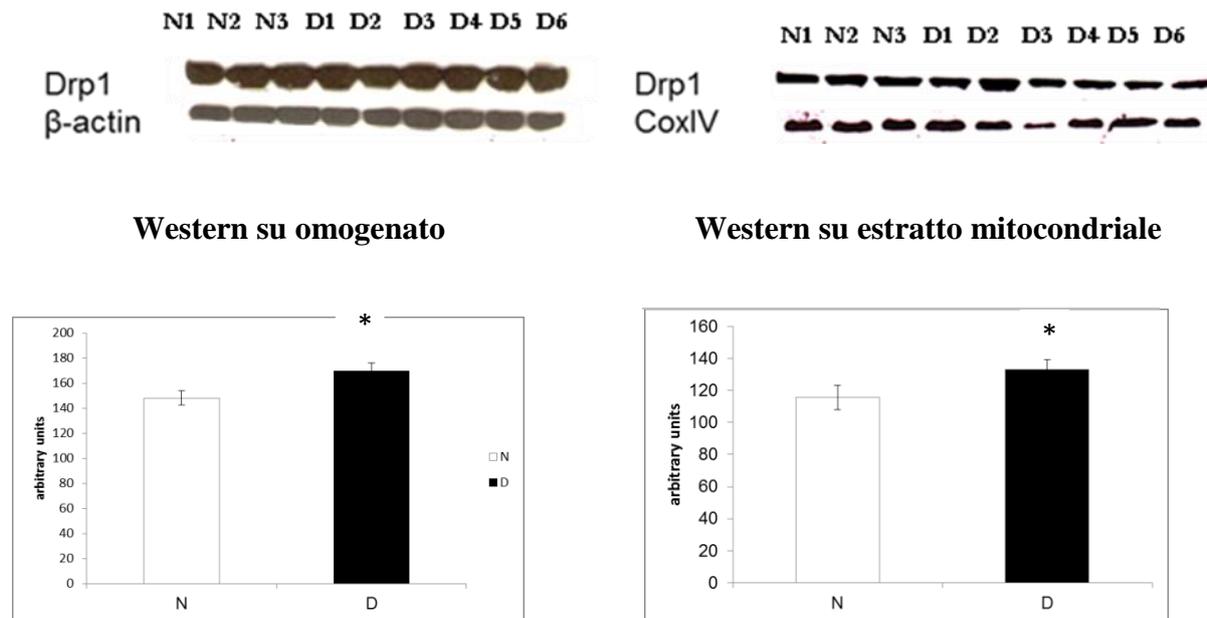


Figura 58

L'analisi dei western blot eseguiti sia su estratti mitocondriali che sull'omogenato conferma il dato istologico mostrando una significativa differenza fra ratti D e N nel contenuto di DRP1 (Fig. 59).



*P<0.05 rispetto ai controlli N

Figura 59

Anche l'analisi dei western blot di Fis 1 eseguiti sia su estratti mitocondriali che sull'omogenato conferma che Fis1 è particolarmente abbondante in D rispetto ad N. (Fig. 60).

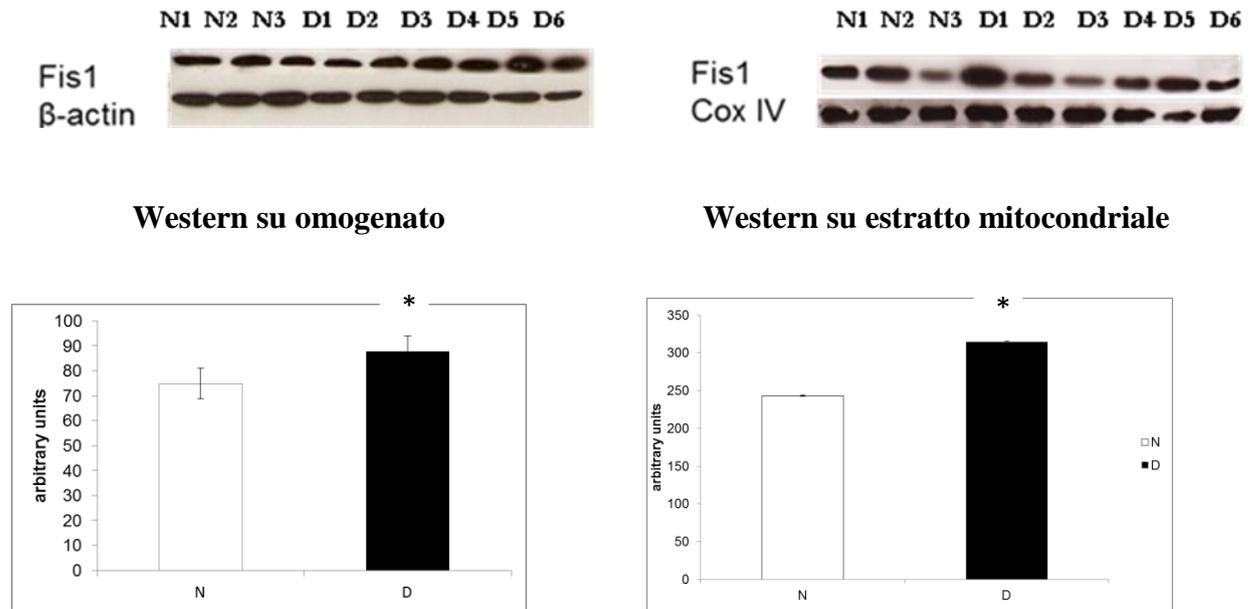


Figura 60

SOD1 e SOD2

Le sezioni di fegato di entrambi i gruppi di ratti sono immunoreattive per la SOD1 e per la SOD2.

L'immunocolorazione per entrambi gli enzimi si presenta particolarmente forte nel gruppo D, meno evidente in N (fig. 61-64).

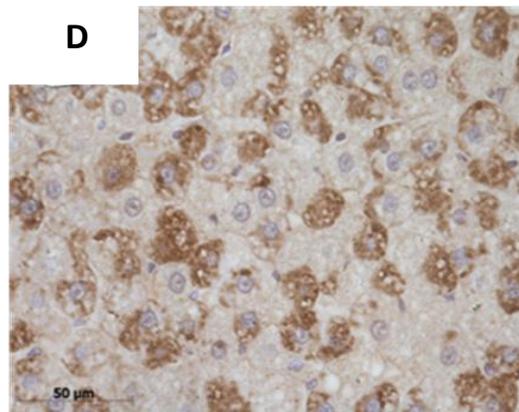
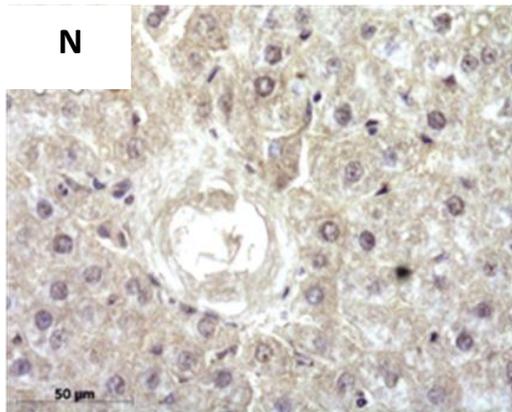


Figura 61: immunoreattività per SOD1 in ratto N **Figura 62:** immunoreattività per SOD1 in ratto D

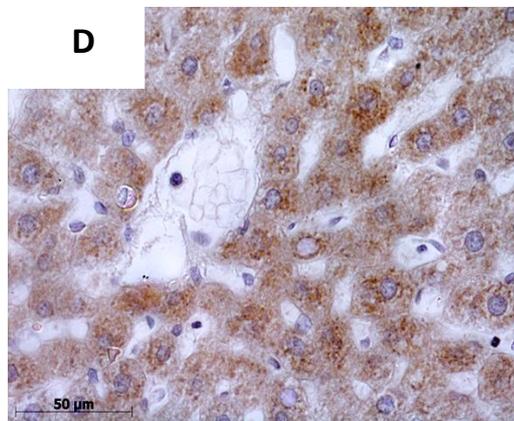
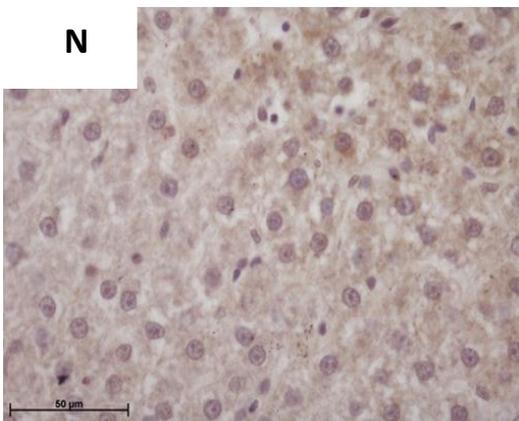
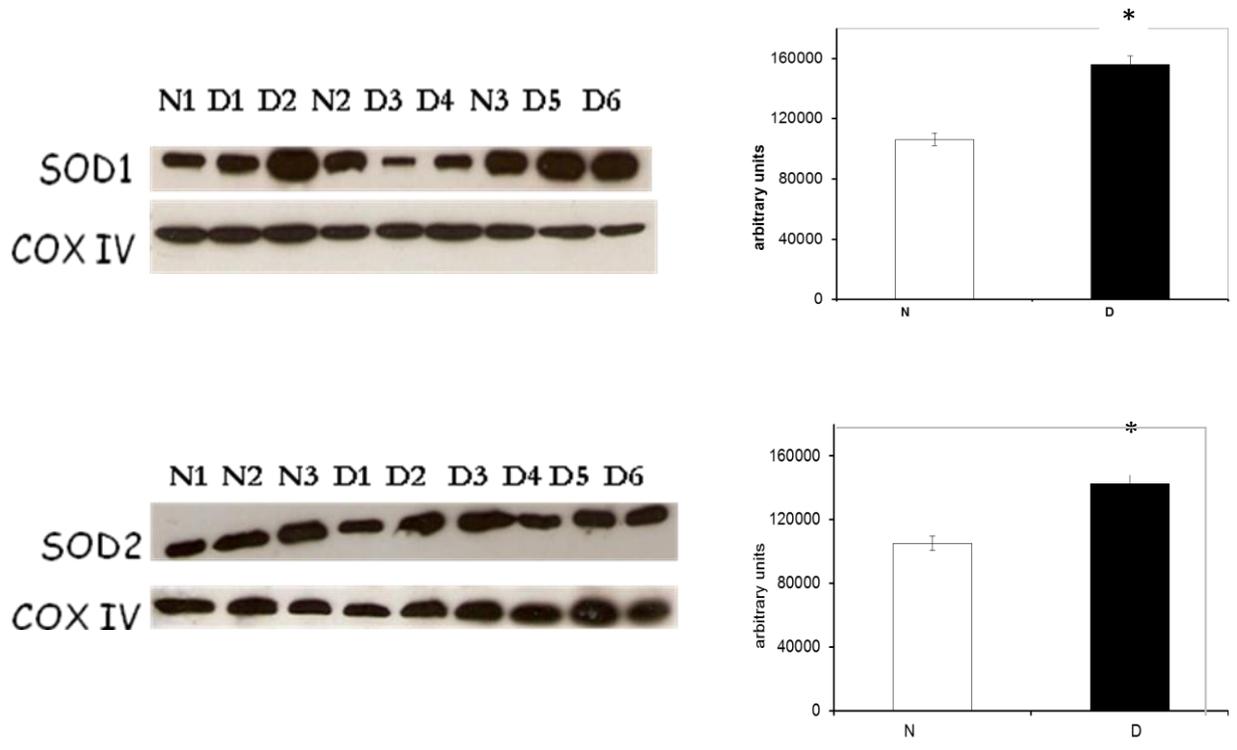


Figura 63: immunoreattività per SOD2 in ratto N **Figura 64:** immunoreattività per SOD2 in ratto D

Le analisi densitometriche dei western blots, eseguiti su estratti mitocondriali, colorati con il kit del luminolo mostrano che il contenuto dei due enzimi a livello mitocondriale è significativamente più elevato nel gruppo D che nei controlli N (fig. 65).



*P<0.05 rispetto ai controlli N

Figura 65

CONCLUSIONE E DISCUSSIONE

Nel corso del mio lavoro sperimentale di tesi sono stati valutati gli effetti di una dieta iperlipidica sul fegato di ratti per verificare l'insorgenza della steatosi e i meccanismi che sono alla base di tale condizione giudicata al limite della patologia (Dhibi et al., 2011).

Lo studio è partito dall'analisi delle variazioni indotte a livello del tessuto adiposo epididimale da una dieta iperlipidica somministrata per 6 settimane, che provoca un accumulo di lipidi con aumento delle dimensioni degli adipociti dei ratti D (con dieta iperlipidica) rispetto a quelli dei ratti N (con dieta normale di laboratorio). Questo sovraccarico di lipidi produce, com'era prevedibile, un aumento ponderale nei ratti D. I controlli dei parametri serici dei trigliceridi hanno dimostrato che nei ratti D circolano quantità maggiori di grassi rispetto ai ratti N (Bays et al., 2004). I dosaggi di glucosio e di insulina plasmatici effettuati col metodo ELISA indicano che a 6 settimane già si comincia ad osservare nei ratti D l'instaurarsi di una modesta insulino-resistenza confermata dai valori dell'indice Homa. Questo dato concorda con quelli di altri ricercatori che hanno riportato l'insorgenza dell'insulino-resistenza in seguito ad un regime dietetico ipercalorico che ha provocato l'ipertrofia del tessuto adiposo viscerale, infiammazione e di qui resistenza all'insulina (Ruan & Lodish, 2003). Anche il contenuto di leptina plasmatica aumenta significativamente nei ratti D in relazione alla massa di tessuto

adiposo accumulato (Margetic et al., 2002). I livelli di adiponectina, invece, sono più bassi nei D rispetto agli N e questo peggiora l'insulino-resistenza (Frayn, 2001). Quindi i ratti D presentano un forte incremento ponderale, un elevato contenuto di lipidi corporei (obesità) e resistenza all'insulina, caratteristiche tipiche della sindrome metabolica (Neuschwander-Tetri, 2007).

Le immagini ultrastrutturali mostrano gli adipociti come grosse cellule in cui lo spazio occupato dal liposoma con il suo carico di trigliceridi appare vuoto. Negli adipociti degli esemplari trattati, in modo particolare nei D, si notano numerose vescicole che si staccano dalla membrana plasmatica ed attraversano il citoplasma e/o viceversa. A maggiore ingrandimento appaiono come fossette e vescicole di 60-100nm. In considerazione della loro abbondanza negli esemplari normali ed ancora di più nei trattati sembra di poter dire che si tratta di invaginazioni e vescicole circondate da particolari proteine, fra cui la caveolina, dette appunto caveolae (Simons & Toomre, 2000; van Meer & Lisman, 2002) che si suppone siano implicate in diverse funzioni. Molti ricercatori ritengono che le caveolae costituiscono il sito in cui è presente il recettore dell'insulina e quindi della sua via di segnalazione negli adipociti. (Chang et al., 2004; Foti et al., 2007). Quando adipociti 3T3-L1 in coltura vengono trattati con TNF α diventano insulino-resistenti si ha una riduzione dei recettori dell'insulina nelle caveolae, che

potrebbe essere dovuto ad un aumento del ganglioside acido GM3. Così avviene nei ratti obesi Zucker fa/fa e nei topi ob/ob *in vivo* (Kabayama, 2006). L'altra funzione delle caveolae sarebbe quella di essere implicate nel traffico dei lipidi. Gli acidi grassi (FA) rilasciati dagli adipociti in seguito alla lipolisi possono raggiungere delle concentrazioni potenzialmente pericolose per l'organismo, per cui le caveolae potrebbero servire a modulare o tamponare il flusso di FA attraverso la membrana, cosa che dovrebbe proteggere le cellule dagli effetti detergenti di alte concentrazioni di FA (Simard et al., 2010).

La grande abbondanza di caveolae negli animali trattati D, è in accordo con le osservazioni di Razani et al. 2002 che mostrano un aumento di caveolina nei topi obesi.

Il RE è il luogo responsabile della sintesi, assemblaggio e/o modificazione delle proteine secretorie e di membrana. Nell'adipocita il RER è formato di strette cisterne circondato da ribosomi. In condizioni di iperalimentazione, può essere indotto lo stress del RE, dovuto all'accumulo ed all'aggregazione di proteine non ripiegate o mal-ripiegate nel lume che porta all'attivazione di una risposta di segnali, denominati la risposta della proteina non ripiegata (UPR), un sistema di adattamento che allevia lo stress e ristabilisce l'omeostasi. Le proteine mal ripiegate possono essere esportate dal RE e degradate attraverso la via del proteasoma (Ogata et al., 2006; Yorimitsu et

al., 2006). Se l'UPR non riesce a ristabilire l'omeostasi viene attivata la via dell'apoptosi (Szegezdi et al., 2006). Gli adipociti dei ratti trattati D sono di dimensioni superiori al normale e questi lipidi che ingolfano la cellula fanno sentire i loro effetti tossici causando probabilmente condizioni di stress. In tali animali le immagini elettroniche mostrano il RE con cisterne spesso dilatate con materiale elettrondenso all'interno, aspetto che ben si confà con lo stress del RE.

Dagli adipociti ipertrofici, infiammati, insulino-resistenti e lipolitici gli FFA liberati raggiungono il fegato e si depositano nelle sue cellule (Lionetti et al., 2009).

In questa parte della tesi dedicata alla NAFLD ho studiato le interazioni cellulari fra gli epatociti e le cellule non-parenchimali epatiche che comunicano fra loro attraverso la produzione ed il rilascio di differenti molecole segnale. A livello subcellulare ho focalizzato l'attenzione su due importanti tipi di organuli citoplasmatici che intervengono nei processi metabolici della cellula: il reticolo endoplasmatico ed i mitocondri che con la loro disfunzione possono contribuire all'instaurarsi ed alla progressione della steatosi. (Mollica et al., 2011; Gregor et al., 2007; De Brito & Scorrano, 2008).

Gli epatociti dei ratti D accumulano grandi quantità di trigliceridi, per cui mi sarei aspettata di trovare un alto contenuto di SCD1 nel loro fegato. Al

contrario il livello di quest'enzima è più elevato nei ratti N che nei D. L'SCD1 è una desaturasi che converte gli FA in MUFA. I MUFA sono substrati chiave nella formazione di lipidi complessi come trigliceridi, esteri del colesterolo, esteri delle cere e diacilgliceroli. L'aumento dell'attività cellulare di SCD1 sembra influenzare il destino metabolico degli FA promuovendone la sintesi, ma riducendone l'ossidazione (Hulver et al., 2005; Sampath et al., 2007; Jiang et al., 2005).

I dati della letteratura dimostrano che l'attività di questo enzima è regolata positivamente dal segnale dell'insulina e negativamente dalla leptina. Nei topi D c'è una maggiore produzione di leptina che inibisce l'SCD1 (Cohen et al., 2002), inoltre, essi si presentano insulino-resistenti per cui il segnale non funziona in modo adeguato; nei ratti di controllo, invece il segnale dell'insulina è attivo ed i livelli di leptina sono più bassi e non inibiscono l'SCD1, pertanto, in questi animali N diversamente dai ratti D, essa può agire per attivare SREBP-1c, un fattore di trascrizione chiave nella regolazione dei geni della sintesi degli acidi grassi e trigliceridi (Flowers & Ntambi, 2009). Però i roditori obesi ed insulino-resistenti non cessano del tutto i processi di deposizione dei grassi ma continuano ad essere lipogenetici nonostante l'insulino-resistenza. Sembra infatti che lo stress del RE possa portare all'attivazione di SREBP-1c anche in condizioni di insulino-resistenza (Kammoun et al., 2009). Infatti l'UPR indotta

dall'omocisteina è in grado di attivare SREBP-1c ed indurre l'espressione dei geni lipogenici (Werstuck et al., 2001). Kammoun et al. (2009) hanno proposto che è proprio l'ER stress l'anello di congiunzione che può spiegare l'alto livello di lipogenesi nei roditori obesi ed insulino-resistenti. L'ER stress in vitro attiva le vie lipogenetiche aumentando il clivaggio di SREBP-1c e la concentrazione nucleare di ChREBP. Una spiegazione verosimile per l'attivazione di ChREBP risiede nel fatto che l'attivazione di SREBP-1c induce l'espressione del gene che codifica per la glucochinasi. Questo è un passaggio obbligatorio per l'attivazione di ChREBP perché consente un elevato flusso di glicolisi e la generazione di metaboliti che attivano ChREBP. L'inibizione dell'ER stress epatico in vivo riduce l'attivazione di SREBP-1c e ChREBP, che a loro volta riducono la steatosi tramite la riduzione della sintesi degli acidi grassi. L'aumentata ossidazione degli acidi grassi potrebbe contribuire alla disinibizione della carnitina palmitoil-transferasi I per mezzo di una riduzione della concentrazione di malonil-CoA. Quindi una possibile spiegazione dei miei risultati circa il ridotto livello di SCD1 ed l'aumento della β -ossidazione nei trattati rispetto ai controlli, devo far ricorso ai differenti momenti in cui si attivano questi processi. Con l'inizio della dieta ipercalorica, infatti, si attivano nel tessuto adiposo e nel fegato sotto stimolazione dell'insulina le vie lipogeniche e probabilmente s'innalza il livello di SCD1. Con il progredire della dieta c'è un momento in cui l'insorgere della resistenza all'insulina fa ridurre il livello

di SCD1 mentre aumenta la β -ossidazione degli acidi grassi. Nei miei animali steatosici a 6 settimane, infatti, non sono inibiti i processi di ossidazione dei grassi come dimostrano e la maggiore traslocazione del PPAR α nei nuclei dei ratti D e l'aumento della β -ossidazione. In questa maniera il tessuto epatico si comporta da sistema tampone assumendo e rilasciando grandi quantità di grasso nelle prime settimane di dieta ipercalorica (Lavoie & Gauthier, 2006).

I meccanismi molecolari sopradescritti avvengono una volta che gli epatociti, , vanno incontro a fenomeni di stress ossidativo e meccanico. Le immagini al microscopio ottico mostrano epatociti con steatosi microvescicolare e mista nei ratti D, con alcuni epatociti che presentano segni di degenerazione, come si nota dalla presenza di epatociti “ballooned” e corpi apoptotici. Secondo Ozcan et al. (2004), gli epatociti steatosici per l'eccessivo accumulo di lipidi vanno incontro a stress attivando le vie infiammatorie dell'JNK-AP-1 e della IKK β NF κ B e diventano insulino-resistenti. Tali vie una volta attivate causano il rilascio di chemochine (quali l'MCP-1) e citochine (quali il TGF- β 1 e il TNF- α) che stimolerebbero un afflusso di cellule di Kupffer e di HSC intorno agli epatociti steatosici stressati. Nei miei preparati istologici ho potuto evidenziare la presenza di epatociti immunoreattivi per l'MCP-1 così come la presenza di un più elevato numero di cellule di Kupffer positive per CD68 e di cellule HSC

positive per CRBP-1 negli animali D rispetto agli N. I dati semiquantitativi dei Western blots hanno confermato le osservazioni al m.o., mostrando una differenza significativa nel contenuto di queste proteine che è maggiore nei ratti D rispetto agli N. Per quanto riguarda il succedersi degli eventi in chiave temporale, posso formulare delle ipotesi ma non fornire una precisa scansione nel tempo perché a sei settimane di dieta iperlipidica le cellule hanno già ampiamente interagito fra di loro e ciò che sono andata ad analizzare è una serie di meccanismi già in atto da qualche settimana. In un primo momento lo stress degli epatociti avrebbe stimolato la sintesi, da parte degli stessi, di molecole come l'MPC-1 che avrebbero poi provocato l'afflusso delle cellule di Kupffer residenti, e successivamente reclutato una popolazione di monociti/macrofagi dal sangue. Le cellule del Kupffer a loro volta produrrebbero molecole chemiotattiche che insieme a quelle rilasciate dagli epatociti avrebbero attivato le HSC. In un secondo tempo le cellule del Kupffer e le HSC così attivate avrebbero proliferato, come viene suggerito dall'alto contenuto di CD68 e CRBP-1 nei western blots dei ratti D, amplificando la risposta infiammatoria, (Wobser et al., 2009).

L'attivazione delle cellule Di Kupffer e HSC è confermata dall'immunoreattività alla Gal-3/Mac2, un altro parametro che aumenta nei ratti trattati D. La Gal-3 appartiene alla famiglia di lectine animali che legano i β -galattosidi e mediano l'adesione cellula-cellula, le interazioni cellula-matrice extracellulare, lo splicing dei pre-mRNA e l'apoptosi. Il valore

riscontrato nei ratti trattati conferma, quindi, l'attivazione delle cellule di Kupffer e delle HSC da parte delle citochine e chemochine prodotte dagli epatociti stressati (Henderson et al., 2006).

Un numero variabile di epatociti stressati non riesce a superare questa condizione di stress e va in apoptosi. La presenza di stress del RE è testimoniata dalle immagini di ME, in alcune di esse sono presenti ribosomi che sembrano aggregarsi e ricordano un pò quelli degli ovociti di rettili in ibernazione, i cosiddetti corpi ribosomici, che sono stati appunto interpretati come strutture inattive nella sintesi proteica (Ghiara & Taddei, 1966). Dei tre sensori dell'UPR ho scelto di usare la PERK e la sua forma fosforilata per valutare a livello immunocitochimico la presenza di stress del RE. L'immunocolorazione ha evidenziato la positività per la pPerk principalmente nei ratti D e questo dato, insieme con i risultati del western blot sull'eIF2 α attivo e fosforilato, concordano sulla presenza di stress del RE nei ratti D. I miei dati sperimentali trovano conferma e conforto in altri lavori (Wey et al., 2006; Lee & Glimcher, 2009; Ozcan et al., 2004; Arkan et al., 2005).

Epatociti apoptotici sono stati da me osservati con la reazione Tunel ed anche nelle sezioni colorate con Emallume-Eosina come corpi acidofili o corpi apoptotici spesso circondati da macrofagi. E questo a testimonianza che alcuni epatociti vanno in apoptosi perché l'UPR fallisce a ripristinare

l'omeostasi. Secondo Canbay et al. (2003), la fagocitosi dei corpi apoptotici da parte delle cellule di Kupffer promuove a cascata altre apoptosi di epatociti tramite il TNF α prodotto dalle stesse Kupffer e il TGF β -1, che provocano un ulteriore danno epatico.

Anche il DNA degli epatociti apoptotici agisce come importante mediatore del differenziamento delle HSC fornendo, da un lato, un segnale di stop alla migrazione di queste cellule quando esse hanno raggiunto l'area degli epatociti apoptotici, dall'altro inducendo una regolazione positiva alla produzione di collagene (Watanabe et al., 2007).

Le HSC sono le cellule considerate responsabili del deposito di matrice extracellulare nel fegato danneggiato perchè se stimolate da adeguati segnali si trans-differenziano in cellule con fenotipo simile a quello dei miofibroblasti (Friedmsa, 1993; Kinnman et al., 2003).

Il marker dell'avvenuta attivazione e del loro trans-differenziamento è l' α -actina del tessuto muscolare liscio. Nelle sezioni istologiche ho potuto evidenziare la presenza di α -actina solo nei ratti D, in cellule allungate situate nella parete dei sinusoidi, a testimonianza che in questi ratti sono state attivate le HSC e da qui in poi comincerà la deposizione del collagene (Milanis , Herbsth , Schuppand et al., 1990).

In questi ratti nutriti per 6 settimane con diete iperlipidiche non ho riscontrato però fibrosi, ma una lieve maggiore presenza di fibre positive al Picrosirius red in posizione perisinusoidale nei ratti D.

Infine mi sono occupata di studiare i mitocondri particolarmente importanti per la loro funzione nel bilancio energetico, in quello redox, nella sopravvivenza cellulare e nel metabolismo del calcio.

Un crescente numero di ricerche dimostra che una disfunzione mitocondriale è causa di molte patologie umane come le malattie neurodegenerative (Reddy, 2009; Petrozzi et al, 2007) e l'obesità ed il diabete di II tipo (Schrauwen, 2004;Schrauwen, 2001; Vickers, 2009). In particolare nella NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) è ormai riconosciuto che la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo giocano un ruolo centrale (Pessayre & Fromenty, 2005; Begriche et al., 2006; Petrosillo et al., 2007), Attualmente nella patogenesi della NASH il fattore eziologico è considerato l'accumulo di grasso negli epatociti accoppiato con la disfunzione mitocondriale, che si può manifestare con il blocco dell'ossidazione dei grassi, riduzione della bionergetica ed aumento dello stress ossidativo dovuto ad un'aumento della generazione dei ROS (Mantena et al., 2008). Sutherland et al. (2008) hanno dimostrato che in animali sottoposti ad una dieta ricca di grassi le riduzioni nelle proteine mitocondriali sono indotte dall'aumento degli FA plasmatici, che però compaiono solo dopo lo sviluppo di un'alterata omeostasi del glucosio. Inoltre in adipociti 3T3-L1 in coltura per 48h in un mezzo con alto contenuto di glucosio ed FA i mitocondri diventano più piccoli e più compatti, i livelli di Mfn1 diminuiscono mentre quelli di Drp1 aumentano nei trattati rispetto ai controlli, aumentano i ROS e

si ha una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale. Nessuna differenza è stata riscontrata nei livelli di ATP (Gao et al., 2009)

I ratti da me trattati per sei settimane con dieta iperlipidica presentano un'elevata efficienza nell'utilizzazione del substrato rispetto ai controlli, quindi un'aumentata produzione di ATP ed una riduzione del proton leak indotto dagli FA a livello mitocondriale. Inoltre, i ratti D esibiscono un aumento dei parametri dello stress ossidativo mitocondriale come si evince dall'aumento nella produzione di H₂O₂ e dall'inibizione dell'attività dell'aconitasi. Tale risultato può essere dovuto all'aumento della velocità della β -ossidazione di per se che può portare ad una significativa generazione di ROS mitocondriali, probabilmente tramite l'aumento e degli equivalenti riducenti e del trasferimento di elettroni entro la catena respiratoria (Seo et al., 2010).

Le osservazioni di ME dimostrano che l'aspetto dei mitocondri è alterato e che tali variazioni riguardano non solo i singoli mitocondri ma la cosiddetta rete mitocondriale dove l'intero set di mitocondri viene considerato come un'entità. Negli anni più recenti è infatti cresciuta la convinzione (Nunnari et al., 1997; Bach et al., 2003; Liesa et al., 2009) che all'interno delle cellule essi formino un sistema integrato, la rete mitocondriale, appunto, che subisce continue modificazioni in una sorta di equilibrio dinamico fra processi di fissione e fusione, eventi controllati da numerose proteine tra cui le GTPasi

simili a dinamine (Smirnova et al., 2001; Scorrano et al., 2002; Pellegrini et al., 2009; Zorzano et al., 2009).

Nelle mie sezioni ultrasottili ho notato variazioni della forme e dimensione dei mitocondri nei trattati D con prevalenza di mitocondri piccoli e circolari, e questo dipende da un spostamento dell'equilibrio fra fusione e fissione. I dati di ME sono ampiamente supportati dalle immagini di immunocitochimica in mo e dalle analisi dei western blots che dimostrano una minore espressione di mitofusina nei ratti D rispetto ai ratti di controllo negli estratti mitocondriali, ed un significativo aumento di DRP1 e FIS1 negli estratti mitocondriali nei ratti D rispetto agli N. Nei ratti D sembra che l'equilibrio fra fusione e fissione sia più spostato verso il processo di fissione, come ritrovato anche da Neuspiel et al. (2005). Una ulteriore conferma dei miei risultati proviene da uno studio effettuato da Nadal-casellas et al. (2010) che in risposta ad una dieta ricca di grassi la capacità ossidativa dei mitocondri è mantenuta tramite un aumentata proliferazione di questi organelli che controbilancia gli effetti nocivi della dieta sulla funzione del singolo mitocondrio.

Nel complesso, le micrografie elettroniche suggeriscono che i processi di fusione e fissione sono sempre in atto e spostamenti in un senso o nell'altro comportano il raggiungimento di un nuovo equilibrio. Quando questo non può essere raggiunto si va incontro alla morte cellulare.

Probabilmente il processo di fusione opera per:

- distribuire il mtDNA alla popolazione di mitocondri;
- mantenere organelli funzionali

Il processo di fissione, invece, opera per:

- distribuire gli organelli a tutti i distretti della cellula;
- generazione di variabilità nei fenotipi dei mitocondri per rispondere a necessità diverse nei vari distretti cellulari.
- Avviare i mitocondri danneggiati all'autofagia generando mitocondri piccoli e più facilmente circondabili dalle membrane di isolamento.

Fra l'altro la regolazione negativa della Mfn2 non è massiva, perché il livello di questa proteina nel citoplasma dei ratti D è simile a quello degli N. E' ciò può essere importante perchè Mfn2 sembra fornire protezione da differenti stimoli apoptotici (Sugioka et al., 2004). Infatti i ratti D pur presentando un indice apoptotico superiore a quello degli N, non mostrano a 6 settimane di trattamento elevati livelli di apoptosi.

I ROS che si sono generati nei mitocondri sono contrastati con i sistemi antiossidanti della cellula. Essi comprendono meccanismi enzimatici e meccanismi non-enzimatici. Tra i primi vi è la superossidodismutasi 1 e 2, e la catalasi. Nel fegato dei ratti ho evidenziato a livello immunocitochimico e di western blot la presenza di marker del danno ossidativo quali SOD1,

generalmente a localizzazione citoplasmatica, e SOD2 presente nella matrice mitocondriale. Laurent et al. (2004) hanno riportato che l'attività delle SOD si riducono in maniera marcata nel fegato dei topi ob/ob che sviluppano una NASH sperimentale, così come Vilela et al. (2004) riferiscono di una riduzione della SOD nel fegato di pazienti con NAFLD.

Nella mia tesi, le immagini di immunocitochimica ed i dati dell'analisi dei western blots dimostrano un maggiore contenuto di SOD nei ratti D rispetto ai ratti N ad indicare che un trattamento prolungato con diete iperlipidiche porta ad un aumento di stress ossidativo che viene combattuto con un'incrementata attività degli enzimi antiossidanti cellulari come è stato anche evidenziato da Perlemuter et al. (2005) e da Feldstein et al., (2011).

Per quanto concerne la SOD1 ho anche voluto indagare sull'effettiva presenza di questo enzima nello spazio intermembrana, riportata da alcuni ricercatori (Weisiger et al., 1973; Iñarra et al., 2005) eseguendo dei western blots sugli estratti mitocondriali. I risultati hanno confermato la presenza di SOD1 nei mitocondri con differenze significative nel contenuto di questa proteina nei trattati rispetto ai controlli.

La SOD1 mitocondriale sembra esercitare una funzione protettiva contro il danno ossidativo, infatti cellule di lievito arricchite con SOD1 nello spazio intermembrana esibiscono una sopravvivenza prolungata nello stato

stazionario, stato in cui si assiste ad un aumento nella produzione di ROS mitocondriale (Sturtz et al., 2001).

Per quanto concerne i ratti D, pur presentano un contenuto di SOD1 più elevato degli N, posso supporre che se il quantitativo di radicali liberi prodotto è notevolmente maggiore di quello fisiologico, il sistema antiossidante non è più in grado di neutralizzare questo eccesso, come risulta anche dal rapporto aconitasi basale/aconitasi totale, che è ridotto nei ratti D per la presenza del danno ossidativo (Gardner, 2002).

Concludendo posso affermare che i ratti trattati con diete iperlipidiche per sei settimane presentano a) steatosi microvescicolare e mista, infiammazione e un basso livello di apoptosi, quindi steatoepatite. Questa condizione è dovuta al carico di trigliceridi che si accumulano nel fegato, in seguito alla lipolisi effettuata dagli adipociti viscerali.

b) un ruolo importante nell'infiammazione ed insulin-resistenza è dato dallo stress del RE che attiva vie infiammatorie che indeboliscono anche il segnale dell'insulina

c) a livello mitocondriale v'è un'elevata efficienza nell'utilizzazione del substrato, una maggiore produzione di ATP ed un abbassamento del leak ptotonico indotto dagli FA che si accompagnano ad una maggiore produzione di ROS. I mitocondri con cambiamenti nella loro dinamica

influenzano il loro stato metabolico, spostando l'equilibrio fra fusione e fissione. Se un nuovo equilibrio non può essere raggiunto, la cellula sarà condannata all'apoptosi. A sei settimane di trattamento i processi apoptotici sono modesti.

d) il sistema antiossidante della cellula cerca di rispondere alla elevata produzione di ROS con una maggiore produzione delle proteine enzimatiche implicate in questi processi.

Probabilmente una dieta di più lunga durata potrebbe provocare una patologia più severa, a sei settimane gli animali sembrano adattarsi al regime alimentare a cui sono sottoposti manifestando un'iniziale steatoepatite e variazione verso l'alto del profilo ematico dei lipidi.

Bibliografia

1. Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C. Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* 106: 372–383, (2008).
2. Alba LM, Lindor K. Nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.*;17(8):977-86 (2003).
3. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26: 211–215, (2000).
4. Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Blackstone C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160: 189–200, (2003).

5. Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Blackstone C. *Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. J Biol Chem* 280: 35742–35750, (2005).
6. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM. *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. Nat Med.*11(2):191-8 (2005).
7. P. Avogadro, G. Crepaldi, G. Enzi, A. Tiengo *Associazione di iperlipidemia, diabete mellito e obesità di medio grado. Acta Diabetol Lat* 4: 572-590; (1967).
8. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. *Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. J Biol Chem.*; 278(19):17190-7 (2003).
9. Bataller R. *Genetic polymorphisms and liver diseases. Gastroenterol Hepatol.*; 26(5):307-9 (2003).
10. Battin EE, Brumaghim JL, *Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging,*

- glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. In "Cell Biochem Biophys";55(1):1-23 (2009).*
11. *Bays Harold E; Gonzlez-Campoy, J Michael Bray, George A Kitabch, Abbas E; Bergman, Donald A; Schorr, Alan Bruce; Rodbard, Helena W; Henry, Robert R. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increate visceral adiposity. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 6, 3: 343-368(26) (2008).*
12. *Berman S B, F J Pineda and J M Hardwick. Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it. Cell Death and Differentiation 15, 1147–1152. (2008).*
13. *Bordo D., Matak D., Djinovic-Carugo K., Rosano C., Pesce A., Bolognesi M., Stroppolo M.E., Falconi M., Battistoni A., Desideri A. Evolutionary constraints for dimer formation in prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase. J Mol Biol, 285(1):283-96. (1999).*
14. *Brahmi M F, Mnari A, Houas Z, Chargui I, Bchir L, Gazzah N, Alsaif MA, Hammami M. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. Nutr Metab. 23;8(1):65 (2011).*

15. Browning JD, Horton JD. *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest; 114: 147-152 (2004).*
16. Brunt EM. *Nonalcoholic steatohepatitis (NASH): further expansion of this clinical entity? Liver.; 19(4):263-4 (1999).*
17. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med.; 1(1):71-81 (1994).*
18. Cadenas E, Davies KJ. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med.; 29(3-4):222-30 (2000).*
19. Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE, Cummings OW, Brunt EM, Unalp A. *Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol.; 48(5):829-34 (2008).*
20. Chan D.C. *Mitochondrial fusion and fission in mammals. Annual review of cell and developmental biology; 22: 79-99 (2009).*
21. Chang CR, Blackstone C. *Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity*

- and mitochondrial morphology. J Biol Chem* 282: 21583–21587 (2007).
22. Chang, J.G. *Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers Int. J. Mol. Med.* 14, 577–582 (2004).
23. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. J Cell Biol* 160: 189–200 (2003).
24. Chunyan Xu, Beatrice Bailly-Maitre and John C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. J Clin Invest.*;115(10):2656–2664 . (2005).
25. Cipolat S, Martinis de Brito O, Dal Zilio B, and Scorrano L. *OPA1 requires mitofusin1 to promote mitochondrial fusion. PNAS*, 101; 45:15927-15932 (2004).
26. Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM *Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. Science* 297(5579):240–243 (2002).
27. Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE et al. *Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte*

- death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. J.Hepatol.; 44: 918–29 (2006).*
28. *Danny V Jeyaraju, Cisbani G, Pellegrini L. Calcium Regulation of mitochondrial motility and morphology. Biochimica et Biophysica Acta. Elsevier B.V 1787,: 11: 1363-1373 (2009).*
29. *Da Silva GH, Coelho KI, Coelho CA, Escanhoela CA. Mitochondrial alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Pediatric case description of three submitted sequential biopsies. J Gastrointestin Liver Dis.; 18(2):215-9 (2009).*
30. *Day CP, James OF. "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?". Gastroenterology. 114 (4): 842–5 (1998).*
31. *De Brito M. & Scorrano. Mitofusin-2 Tethers Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. Nature, 456: 605-610 (2008).*
32. *Deleltre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is*

- mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet 26: 207–210, (2000).*
33. *Detmer SA, Chan DC. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. J Cell Biol 176: 405–414, (2007).*
34. *Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE, Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. Gastroenterology.;121(1):91-100 (2001).*
35. *Drapier JC, Hibbs JB Jr, Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis in Methods Enzymol.; 269: pp. 26-36 (1996).*
36. *Estabrook RW, Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios in Methods Enzymol.; 10: pp. 41-47 (1967).*
37. *Eaton S.Boyd M.D, Konner Melvin Ph.D., M.D., Stone Marjorie agers in the fast lane: Chronic degenerative diseases in evolutionary perspective Shostak American J of Medicine 84: 739-749, (1988).*
38. *Eura Y, Ishihara N, Oka T, Mihara K. Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by*

- modulating mitofusin (Mfn) protein function. J Cell Sci 119: 4913–4925, (2006).*
39. *Feldstein A. E. and Bailey S. M. and. Antioxidants & Redox Signaling. 424 Emerging Role of Redox Dysregulation in Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease, 15(2): 421-424 (2011).*
40. *Flowers M. T., Ntambi J. M. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity 1791; 2: 85-91 (2009).*
41. *Foti M., Porcheron G., Fournier M., Maeder C., and Carpentier J.L. The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 in adipocytes. PNAS 104 ; 4: 1242-1247 (2007).*
42. *Frayn K N. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. Proceeding of the Nutrition Society, 60, 375.380. (2001).*
43. *Fridovich I, Superoxide radical and superoxide dismutases Annu. Rev. Biochem. 64:. 97-112 (1995).*
44. *Friedmsa LN. The cellular basis of hepatic fibrosis. N Engl J Med 25: 1828-35 (1993).*
45. *Fukushima NH, Brisch E, Keegan BR, Bleazard W, Shaw JM. The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p*

- GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. Mol Biol Cell.; 12(9):2756-66. (2001).*
46. *Gardner PR. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide in Methods Enzymol.. 349: 9-23 (2002).*
47. *Gentile CL, Pagliassotti MJ. The endoplasmic reticulum as a potential therapeutic target in nonalcoholic fatty liver disease Curr Opin Investig Drugs.;9(10):1084-8 (2008).*
48. *Ghiara G, Taddei C Dati citologici e ultrastrutturali su di un particolare tipo di costituenti basofili del citoplasma dicellule follicolari e di ovociti ovarici di rettili. Boll Soc Ital Biol Sper 42:784-788 (1966).*
49. *Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. Hum. Pathol. 35 (2): 196–9 (2004).*
50. *Grattagliano I, D'Ambrosio G, Palasciano G. DECISION MAKING Steatosi e steatoepatite non alcolica (NAFLD, NASH). Inquadramento e trattamento in Medicina Generale. (2006).*

51. Gregor MG, Hotamisligil GS. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*;48:1905-14 (2007).
52. Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Bliek AM. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279: 18792–18798. (2004).
53. Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178: 757–764 (2007).
54. Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100: 315–325 (2008).
55. Guo YH, Chen K, Gao W, Li Q., Chen L, Wang GS, Tang J. Overexpression of Mitofusin 2 inhibited oxidized low-density lipoprotein induced vascular smooth muscle cell proliferation and reduced atherosclerotic lesion formation in rabbit. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;363(2):411-7 (2007).

56. Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupte S.S. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 331-368 (1986).
57. Hales KG, Fuller MT. *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. Cell.*; 90(1):121-9 (1997).
58. Hales KG, Fuller MT. *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, and predicted GTPase. Cell* 90: 121–129 (1997).
59. Halliwell B. *Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? FEBS.Lett.*; 540; 3-6 (2003).
60. Haller H. *Epidemiologie und assoziierte Risikofaktoren der Hyperlipoproteinämie. Z Gesamte Inn Med* 32(8): 124-128; (1977).
61. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. *The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. Ann. Intern. Med.* 143 (10): 722–8 (2005).
62. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. *Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. J Biol Chem.* 278(8):5557-63 (2003).

63. Han XJ, Lu YF, Li SA, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, Nairn AC, Takei K, Matsui H, Matsushita M. *CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. J Cell Biol* 182: 573–585 (2008).
64. Han J.-W., Zhan X.-R, Li X.-Y., Xia B., Wang Y.-Y., Zhang J., and Li B.-X. *Impaired PI3K/Akt signal pathway and hepatocellular injury in high-fat fed rats. World J Gastroenterol.;* 16:6111-8 (2010).
65. Harold Bays, Lawrence Mandarino, Ralph A. De Fronzo. *Role of the adipocyte in Pathogenesis of Type 2 diabetes Mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonist provide a rational therapeutic approach. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(2):463–478. (2004).
66. Henderson N. C., Mackinnon A. C., Farnworth, S. L Francoise Poirier, Russo F. P., Iredale J. P., Haslett C., Simpson K. J., and Sethi T.. *Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. PNAS,* 103; 13: 5060–5065 (2006).
67. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. *Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol Biol Cell.;* 12(9):2730-41 (2001).

68. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. *The machines that divide and fuse mitochondria. Annu Rev Biochem.*; 76:751-80 (2007).
69. Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP, Thyfault JP, Stevens R, Dohm GL, Houmard JA, Muoio DM. *Elevated stearyl-Co-A desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. Cell Metab.*; 2(4):251-61 (2005).
70. Imoto M, Tachibana I, Urrutia R. *Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. J Cell Sci* 111: 1341–1349 (1998).
71. Iñarrea P, Moini H, Rettori D, Han D, Martínez J, García I, Fernández-Vizarra E, Iturralde M, CASadenas E. *Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,Zn-superoxide dismutase. Biochem J.*; 387(Pt 1):203-9 (2005).
72. Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J. *Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. J Cell Biol* 170: 1021–1027 (2005).

73. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117: 6535–6546 (2004).
74. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25: 2966–2977 (2006).
75. Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433: 754–760 (2005).
76. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278: 36373–36379 (2003).
77. Jiang G, Li Z, Liu F, Ellsworth K, Dallas-Yang Q, Wu M, Ronan J, Esau C, Murphy C, Szalkowski D, Bergeron R, Doebber T and Zhang B B. Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearyl-CoA desaturase-1. *J Clin Invest.*;115(4):1030–1038 (2005).
78. Jofuku A, Ishihara N, Mihara K. Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 650–659 (2005).

79. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin-resistance. *Biol Pharm Bull.* 29(8):1532-7 (2006).
80. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P, Foufelle F. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.*;119(5):1201-15 (2009).
81. Karima Begriche, Anissa Igoudjil, Dominique Pessayre, Bernard Fromenty. (Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6:1-28 (2006).
82. Kemper C, Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, Rapaport D. Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci* 121: 1990–1998 (2008).
83. Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from

hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. Lab Invest.; 83(2):163-73 (2003).

84. Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. *Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. Histochem Cell Biol.; 112(5):387-401 (1999).*

85. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH, *Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, Regulation and Reactive Oxygen Species generation in “Antioxid Redox Signal.” (2009).*

86. Koshihara T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. Science 305: 858–862 (2004).*

87. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk H. *Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. J Hepatol. 48(5):821-8 (2008).*

88. Laurent A., Nicco C., Tran Van Nhieu J., Borderie D., Chereau C., Conti F., Jaffray P., Soubrane O., Calmus Y., Weill B., and Batteux F. Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis, *Hepatology* 39, 1277-1285 (2004).
89. Lavoie J.M. and Gauthier Regulation M.-S. of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:1393–1409 (2006).
90. Lee AH and Glimcher LH. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci*; 66:2835-2850 (2009).
91. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15: 5001–5011 (2004).
92. Leong, Anthony S-Y; Cooper, Kumarason; Leong, F Joel W-M. *Manual of Diagnostic Cytology* (2 ed.). Greenwich Medical Media, Ltd.. pp. 135–136. ISBN 1-84110-100-1 (2003).

93. Liesa M, Palaci'n M, and Zorzano A. *Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. Physiol Rev* 89: 799–845, (2009).
94. Lin J.H., Walter P., and Benedict Yen T.S. *Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3:399–425 (2008).
95. Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. *From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 19(2):146-52. (2009).
96. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. *Leptin regulates proinflammatory immune responses. FASEB J.;* 12(1):57-65 (1998).
97. Mantena, S. K., King, A. L., Andringa, K. K., Eccleston, H. B. and Bailey, S. M. *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. Free Radical Biol. Med.* 44, 1259–1272 (2008).
98. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. *"Leptin: a review of its peripheral actions and interactions". Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26 (11): 1407–1433. (2002).

99. Matsunami T, Sato Y, Ariga S, Sato T, Kashimura H, Hasegawa Y, Yukawa M. Regulation of oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor 2 in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Clin Exp Pathol.*; 3(5):472-8 (2010).
100. Major C A, Ryan K, Bennett A J, Lock A L., Bauman D E., and Salter A M. Inhibition of stearyl CoA desaturase activity induces hypercholesterolemia in the cholesterol-fed hamster. *JLR*, 49:1456-1465 (2008).
101. Milanis , Herbsth , Schuppand , Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol*; 137: 59-70 (1990).
102. Mollica M.P., Lionetti L., Putti R., Cavaliere G., Gaita M., Barletta A. From chronic overfeeding to hepatic injury: Role of endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 21, Issue 3 : 222-230 (2011).
103. Morris AA. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. *Liver*; 19: 357-368 (1999).
104. Nakagawa T, Zhu H., Morishima N., Li E, Xu J., Yankner B.A & Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-

- reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β*
Nature. 403, 98-103 (2000).
105. Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc.*; 37(1):29-36 (2004).
106. Nelson S. K., Bose S. K., Grunwald G. K., Myhill P., McCord J. M. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine.* 40 341 – 347 (2006).
107. Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol.*;23(2):193-8 (2007).
108. Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem.*; 280(26):25060-70 (2005).
109. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.*; 272: C1286–C1294 (1997).

110. Nunnari J, Marshall W F, Straight A, Murray A, Sedat J W, Walter P. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular Biology of the Cell*. 8: 1233–1242 (1997).
111. Ogata M., Hino S., Saito A., Morikawa K., Kondo S., Kanemoto S., Murakami T. Taniguchi M., Tanii I., Yoshinaga K., Shiosaka S., Hammarback J.A., Urano F., and Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol* 26; 24 9220-9231 (2006).
112. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* ; 523(1-3):171-6 (2002).
113. Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, Delettre C, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G, Belenguer P. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and

- apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. J Cell Physiol*
211: 423–430 (2007).
114. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest.*; *118(1):316-32 (2008).*
115. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*; *306:457-461 (2004).*
116. Palade Ge. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec.* *114(3):427-51 (1952).*
117. Peeters-Joris C, Vandevoorde AM, Baudhuin P. Subcellular localization of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.*; *150, 31–39 (1975).*
118. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*; *38: 999-1007 (2003).*
119. Perlemuter Gabriel Davit-Spraul Anne, Cosson Claudine, Conti Marc, Bigorgne Amélie, Paradis Valérie, Corre Marie-Pierre, Prat Lydie, Kuoch Viceth, Basdevant Arnaud,

- Pelletier Gilles, Oppert Jean-Michel, Buffet Catherine. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non alcoholic fatty liver disease. Liver international 25:946-953 (2005).*
120. *Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 282: G193–G199 (2002).*
121. *Pessayre D, Fromenty B, NASH: a mitochondrial disease. J. Hepatol. 42: 928-940 (2005).*
122. *Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. Biochim Biophys Acta.; 1767(10):1260-7 (2007).*
123. *Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondria and neurodegeneration. Biosci Rep. 27:87-104 (2007).*
124. *Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D, Fromenty B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. Cell Biol Toxicol.; 15(6):367-73 (1999).*

125. Pitts KR, Yoon Y, Krueger EW, McNiven MA. *The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. Mol Biol Cell* 10: 4403–4417 (1999).
126. Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. *The emerging problem of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Rom J Gastroenterol.*; 14(1):43-51 (2005).
127. Praefcke GJ, McMahon HT. *The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133–147 (2004).
128. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. *Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A.*; 96(5):2345-9 (1999).
129. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. *Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. Anat Rec.*; 119(1):11-33 (1954).
130. Ramaiah S and Rittling S. *Pathophysiological Role of Osteopontin in Hepatic Inflammation, Toxicity, and Cancer. Toxicological Science.* 103: 4–13 (2008).

131. Rangwala F., Guy C.D., Lu J., Suzuki A., Burchette J.L., Abdelmalek M.F., Chen W., Mae Dei A. Increased production of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes. *J. of Path.* 224, 3; 401-410 (2011).
132. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, Li M, Tang B, Jelicks LA, Scherer PE & Lisanti MP. Caveolin-1 deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8635–8647 (2002).
133. Reaven GM. The metabolic syndrome: *requiescat in pace.*, 51, 931-938 (2005).
134. Reddy JK, Rao MS. "Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation". *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (5): G852–8 (2006).
135. Reddy PH. Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS Spectr.*; 14(8 Suppl 7):8-13 (2009).
136. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins,

- ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. J Cell Sci.; 115(Pt 8):1663-74 (2002).*
137. *Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue:direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. Cytokine Growth Factor Rev.14(5):447-55 (2003).*
138. *Sampath, H., Miyazaki, M., Dobrzyn, A., and Ntambi, J. M. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. J. Biol. Chem. 282, 2483–2493 (2007).*
139. *Santamaria E, Avila M A, Latasa M U, Rubio A, Martin-Duce A, Lu S C, et al. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. Proc Natl Acad Sci USA; 100: 3065–70 (2003).*
140. *Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J Cell Sci.; 114(Pt 5):867-74 (2001).*
141. *Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. J Cell Sci 116: 2763–2774 (2003).*

142. Schrauwen P, Hesselink MK. *The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? Proc Nutr Soc.; 63(2):287-92 (2004).*
143. Schrauwen P, Saris WH, Hesselink MK. *An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. FASEB J.; 15(13):2497-502 (2001).*
144. Schröder M.. *Endoplasmic reticulum stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 65: 862 – 894 (2008).*
145. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ. *A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. Dev Cell. ; 2(1):55-67 (2002).*
146. Seo A Y., Anna-Maria Joseph¹, Debapriya Dutta, Judy C. Y. Hwang¹, John P. Aris², and Christiaan Leeuwenburgh. *New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. Journal of Cell Science 123, 2533-2542(2010)*
147. Simard JR, Meshulam T, Pillai BK, Kirber MT, Brunaldi K, Xu S, Pilch PF, Hamilton JA. *Caveolins sequester FA on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane , augment*

- triglyceride formation, and protect cells from lipotoxicity J Lipid Res. 51(5):914-22 (2010).*
148. *Simons K. and Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1:31–39 (2000).*
149. *Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. Trends Biochem Sci.; 26(1):23-9 (2001).*
150. *Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. Mol Biol Cell. ; 12(8):2245-56 (2001).*
151. *Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliek AM. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. J Cell Biol.; 143(2):351-8 (1998).*
152. *Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, Yme1L. J Cell Biol 178: 749–755 (2007).*
153. *Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space*

- of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. J Biol Chem. 12; 276(41):38084-9 (2001).*
154. Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. *Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. J Biol Chem. 10; 279(50):52726-34 (2004).*
155. Szegezdi E, Susan E L, Gorman A. M & Samali A. *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO reports 7: 880–885 (2006).*
156. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. *Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. J Biol Chem 282: 11521–11529 (2007).*
157. Takeyama Y, Kamimura S, Kuroiwa A, Sohda T, Irie M, Shijo H, Okumura M. *Role of Kupffer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats in vivo. Alcohol Clin Exp Res.; 20(9 Suppl):335A-339A (1996).*
158. Tamitsuka E, Kita K., Esumi H, *Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit In “Proc jpn Acad ser B Phys Biol.Sci”;85(7):258-65 (2009).*

159. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. *Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. Mediators Inflamm.* (2009).
160. Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabbiani G. *Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. Lab Invest.*; 74(1):265-78 (1996).
161. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J* 27: 433–446 (2008).
162. Vague J. *La différentiation sexuelle facteur déterminant des formes de l'obésité. Presse Med*; 30: 339-340 (1947).
163. Van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. *Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. J Cell Biol* 122 (3):553-63 (1993).
164. Vanderkerken K, Bouwens L, Van Rooijen N, Van den Berg K, Baekeland M, Wisse E. *The role of Kupffer cells in*

- the differentiation process of hepatic natural killer cells. Hepatology*; 22(1):283-90 (1995).
165. Van Meer G. and Lisman Q *Sphingolipid transport: rafts and translocators. J Biol Chem* 277:25855–25858 (2002).
166. Vickers AE. *Characterization of Hepatic Mitochondrial Injury Induced by Fatty Acid Oxidation Inhibitors. Toxicologic Pathology*; 37: 78-88 (2009).
167. Videla L., Rodrigo R, Araya J, Poniachik J *Oxidative stress and depletion of hepatic longchainpolyunsaturated fatty acids may contribute tonon-alcoholic fatty liver disease. Free Radic Biol Med*37: 1499-1507 (2004).
168. Videla, L. A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quinones, L., Varela, N., Contreras, J., Lazarte, R., Csendes, A., Rojas, J., Maluenda, F., Burdiles, P., Diaz, J. C., Smok, G., Thielemann, L., and Poniachik, J. *Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. Clin. Sci.* 106: 261-268 (2004).
169. Watanabe A., Hashmi A., Gomes D. A, Town T., Badou A., Flavell R. A., and Mehall W. Z. *Apoptotic Hepatocyte DNA Inhibits Hepatic Stellate Cell Chemotaxis via Toll-Like Receptor 9 HEPATOLOGY*, 46; 5: 1509-18. (2007).

170. Weisiger, R. A. and Fridovich, I. *Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. J. Biol. Chem.*; 248, 4793–4796 (1973).
171. Wendel A, Feuerstein S. *Drug-induced lipid peroxidation in mice—I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. Biochem. Pharmacol.* 30: 2513–20 (1981).
172. Werstuck, G.H., et al *Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. J. Clin. Invest.* 107:1263-1273). (2001)
173. Wey Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. *Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. Am J Physiol Endocrinol Metab*;291:E275-281 (2006).
174. Wobser H, Dorn C, Weiss TS, Amann T, Bollheimer C, Buttner R et al. *Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. Cell Research*; 19:996-1005 (2009).
175. Xiaokun Ding, Neeraj K. Saxena, Songbai Lin, Amin Xu, Shanthi Srinivasan, and Frank A. Anania . *The Roles of*

- Leptin and Adiponectin. A Novel Paradigm in Adipocytokine Regulation of Liver Fibrosis and Stellate Cell Biology. Am J Pathol. 166: 1655–1679 (2005).*
176. Yan HM, Ramachandran A, Bajt ML, Lemasters JJ, Jaeschke H. The oxygen tension modulates acetaminophen-induced mitochondrial oxidant stress and cell injury in cultured hepatocytes. *Toxicol. Sci.*; 117: 515–23 (2010).
177. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18; 94(6):2557-62 (1997).
178. Wei Yan, Christopher L. Frank, Marcus J. Korth, Bryce L. Sopher, Isabel Novoa, David Ron, and Michael G. Katze. Control of PERK eIF2_γ kinase activity by the **endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK**. *PNAS.* 10, 99: 25 15920-15925 (2002).
179. Yan Zhang and David C. Chan Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1 *PNAS* 20. 104; 47: 18526-18530 (2007).
180. Yoon Y, McNiven MA. Mitochondrial division: new partners in membrane pinching. *Curr Biol.*; 11(2):R67-70 (2001).

181. Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12: 2894–2905 (2001).
182. Yoon Y, Pitts KR, Dahan S, McNiven MA. A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol* 140: 779–793 (1998).
183. Yorimitsu T., Nair U., Yang Z. and Klionsky D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 281; 40: 30299–30304 (2006).
184. Zhang H., Ye Q. H., Ren N., Zhao L., Wang Y. F., Wu X., Sun H. C., Wang L., Zhang B. H., Liu Y. K., et al.. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132,709–717 (2006).
185. Zhongjun Dong, Haiming Wei, Rui Sun and Zhigang Tian. The Roles of Innate Immune Cells in Liver Injury and Regeneration. *Cellular & Molecular Immunology.* 4:241-252 (2007).

186. Zorzano A., Leisa M., Palacin M., *Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. Physiol Rev* 89: 799–845 (2009).