

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN MALATTIE DELL'APPARATO RESPIRATORIO
XXIV CICLO
DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA CLINICA E MOLECOLARE

MARIA IEMMOLO

**EFFETTI PROTETTIVI DELLA TIMOSINA-*beta*4 IN UN MODELLO
MURINO DI DANNO POLMONARE DA BLEOMICINA**

TESI DI DOTTORATO

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. C. Vancheri

TUTOR:

Chiar.mo Prof. C. Vancheri

Anni Accademici 2008-2012

INDICE

1.	INTRODUZIONE	pag. 1
2.	SCOPO DEL LAVORO	pag. 15
3.	MATERIALI E METODI	pag. 17
3.1	<i>Stato Etico</i>	pag. 17
3.2	<i>Materiali</i>	pag. 17
3.3	<i>Animali</i>	pag. 17
3.4	<i>Gruppi Sperimentali</i>	pag. 18
3.5	<i>L'induzione del danno polmonare</i>	pag. 19
3.6	<i>Lavaggio Broncoalveolare</i>	pag. 19
3.7	<i>Saggio per l' attività Mieloperossidasi</i>	pag. 20
3.8	<i>Istologia</i>	pag. 21
3.9	<i>Immunoistochimica (IHC) per la T-beta4</i>	pag. 22
3.10	<i>Sircol Collagen Soluble Assay</i>	pag. 23
3.11	<i>Analisi Citofluorimetrica (FACS) per la valutazione di CD4, CD25, IL-17A e Fox-p3 sui linfociti ottenuti dal sangue periferico e dalla milza</i>	pag. 24
3.12	<i>Valutazione statistica</i>	pag. 24
4.	RISULTATI	pag. 25
4.1	<i>Effetti della T-beta4 sulla perdita di peso corporeo e sulla mortalità indotta dal trattamento con Bleomicina</i>	pag. 25
4.2	<i>Analisi Citobiologica del Lavaggio Bronco Alveolare</i>	pag. 25
4.3	<i>Attività Mieloperossidasi (MPO) ed Edema Polmonare</i>	pag. 26
4.4	<i>Istologia</i>	pag. 26

4.5	<i>Contenuto di collagene.....</i>	<i>pag. 27</i>
4.6	<i>Localizzazione di T-beta4 nel polmone.....</i>	<i>pag. 27</i>
4.7	<i>Analisi Citofluorimetrica (FACS) per la valutazione di CD4, CD25, IL-17A e Fox-p3 sui linfociti ottenuti dal sangue periferico e dalla milza</i>	<i>pag. 27</i>
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	<i>pag. 29</i>
6.	BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 36</i>
7.	FIGURE E TABELLE.....	<i>pag. 44</i>

1. INTRODUZIONE

L'isolamento dal timo delle Timosine, molecole biologicamente attive con proprietà simili agli ormoni, fu per la prima volta descritta da Goldstain and White nel 1966. La famiglia delle Timosine include polipeptidi biochimicamente e funzionalmente distinte con una nomenclatura ben definita basata sul punto isoelettrico.

La Timosina-*beta*4 (T-*beta*4) è un piccolo peptide di 43 aminoacidi, ubiquitario, presente sia nei tessuti cellulari sia nei fluidi corporei e particolarmente espresso nelle piastrine e nei leucociti polimorfonucleati (PMNc). È il membro più abbondante della famiglia delle *beta*-Timosine e risulta la principale proteina sequestrante l'actina cellulare. Ha attività biologica pleiotropica e le varie funzioni sono attribuite a particolari siti attivi contenuti nei peptidi prodotti da attività endoproteinasiche, da cui derivano: frammenti amino terminali a 4 aminoacidi, come Ac-SDKP (N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline) con funzioni antinfiammatorie e antifibrotiche; frammenti di 15 aminoacidi contenente Ac-SDKP che promuovono la sopravvivenza cellulare e inibiscono l'apoptosi;

frammenti come LKKTETQ, il dominio centrale che lega l'actina (aminoacidi 17-23) più un amino acido addizionale Q, che promuovono l'angiogenesi, la riparazione tissutale e la migrazione cellulare (Sosne G., Qiu Ping, *et al* 2010). (Tabella 1)

In un recente studio sono state descritte elevate concentrazioni di *beta*-Timosine (T-*beta*4, T-*beta*4-sulfoxide, T-*beta*10) nel BAL (lavaggio broncoalveolare) di una coorte di soggetti con sclerodermie a coinvolgimento polmonare ed una più veloce progressione della malattia quando tali concentrazioni diventavano più basse. La T-*beta*4-sulfoxide fu particolarmente riscontrata in soggetti fumatori ed in soggetti con sclerodermia e alveolite. (De Santis M., Inzitari R. *et al.* 2011).

L'ipotesi di un effetto cito-protettivo di T-*beta*4 al danno polmonare è confermata da ulteriori lavori che attribuiscono alla T-*beta*4-sulfoxide proprietà antiossidanti e antinfiammatorie e al sito amino terminale Ac-SDKP proprietà antinfiammatorie e antifibrotiche.

Infatti, la T-*beta*4-sulfoxide, prodotto dall'ossidazione dei residui di metionina in posizione 6, è in grado di ridurre sia gli effetti negativi dello stress ossidativo su altre proteine, modulando l'espressione dei geni che codificano per enzimi come la catalasi e Cu/Zn-SOD, sia la

perdita del potenziale di membrana nel mitocondrio. (Kumar S., Gupta S. 2011; Ho J.H., Chuang C.Y. *et al* 2008).

Inoltre, *in vitro*, la T-*beta*4-sulfoxide inibisce il richiamo di PMNc da parte dell' fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) batterico, mentre nel modello animale, ha mostrato effetti inibitori della formazione di edema indotto da carragenina (Conte E., Iemmolo M., *et al* 2012).

Proprietà antinfiammatorie sono state attribuite anche ad Ac-SDKP, in quanto limita: a) l' attivazione, la migrazione e la differenziazione dei macrofagi; b) la proliferazione dei linfociti (Sharma U., Rhaleb N.E. *et al* 2008; Volkov Quere L.P., Coudert F., *et al* 1996) e l' infiltrazione neutrofilica nei tessuti danneggiati (Girardi M., Sherling M.A. 2003). Anche se il meccanismo antinfiammatorio della T-*beta*4 e dei suoi siti attivi risulta ancora sconosciuto, in un recente lavoro su cellule epiteliali della cornea e della congiuntiva, è stato osservato che T-*beta*4 inibisce, in maniera dose-dipendente, l'attivazione di NF-*κ*B da parte del TNF-*alfa* con diversi meccanismi: a) regolando negativamente la subunità di RelA/p65 di NF-*κ*B ed impedendone la traslocazione nel nucleo; b) regolando i meccanismi proinfiammatori mediati dalla sovraespressione di proteine di adesione come PINCH-1 e ILK indipendentemente dalla

sua funzione actina-sequestrante. (Qiu P, Wheater M.K. *et al.* 2011); c) down-regolando il gene per IL-8, legandosi al sito “*kB*” del suo promotore.

Oltre all’azione antinfiammatoria è da sottolineare che *in vivo*, Ac-SDKP, riduce la fibrosi cardiaca in ratti con ipertensione e in ratti con infarto del miocardio (Yang F. *et al.* 2004) ed *in vitro* blocca la sintesi di collagene (Rhaleb N.E. *et al.* 2001).

La concentrazione sierica di Ac-SDKP è controllata dall’ ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) ed elevati livelli di Ac-SDKP possono derivare dall’inibizione di questo enzima; in questo modo Ac-SDKP mima gli effetti antifibrotici su cuore e rene degli inibitori dell’ ACE (Cavasin M.A, Tang-Dong Liao *et al.* 2007). Inoltre, se da un lato T-*beta4* potrebbe aumentare la sintesi del TGF- *beta1* (*Transforming growth factor-beta1*), citochina ad azione profibrotica, Ac-SDKP agisce sopprimendo l’attivazione di Smad (Kanasaki K., *et al.* 2003). Questo fa ipotizzare che Ac-SDKP si comporti da “segnale di stop” prevenendo l’eccessiva deposizione di collagene e cicatrizzazione tissutale, senza essere coinvolto direttamente nei processi di riparazione tissutale (Goldstein A.L. Hannapel E. *et al.* 2005).

Le potenzialità cito-protettive mostrate da questa proteina nei processi fibrosanti di occhio, rene e di cuore e la sua presenza ad alte concentrazioni nel BAL di soggetti con sclerodermia a coinvolgimento polmonare, hanno fatto ipotizzare che la *T-beta4* possa essere in grado di proteggere e rallentare i processi fibrotici anche nel polmone.

In questo lavoro, sono stati studiati gli effetti della *T-beta4* nella Fibrosi Polmonare Idiopatica (FPI), una patologia caratterizzata da gravi danni ai tessuti alveolare ed endoteliale, iperplasia di cellule alveolari, bronchiolari e fibroblastiche, accumulo di cellule infiammatorie, eccessiva deposizione di matrice extracellulare, cicatrizzazione tissutale aberrante e perdita della funzione respiratoria (American Thoracic Society 2002).

La FPI fino ad oggi non ha cure farmacologiche ed il trapianto di polmone rappresenta l'unica via da seguire per migliorare l'aspettativa di vita dei soggetti malati.

Nel normale processo di riparazione il danno all'epitelio e/o all'endotelio determina il rilascio di mediatori pro-infiammatori, l'attivazione della cascata anti-fibrinolitica, la formazione di coaguli piastrinici ed una temporanea sintesi di nuova matrice extracellulare (ECM). Mentre la degranolazione piastrinica promuove

vasodilatazione e aumenta la permeabilità dei vasi, i miofibroblasti (cellule fibroblastiche attivate positive per *alfa*-SMA e secernenti alte quantità di collagene) e le cellule epiteliali e/o endoteliali distruggono (mediante la sintesi di enzimi come le metalloproteasi, MMP) la membrana basale permettendo alle cellule infiammatorie di raggiungere il sito danneggiato. Tutto questo è alimentato dal rilascio di fattori di crescita, citochine e chemochine come il TGF-*beta*1, IL-13 e il PDGF che hanno azione chemiotattica e mitogena verso macrofagi, neutrofilo ed endotelio ed inducono i fibroblasti a differenziare in miofibroblasti. Questi ultimi migreranno verso il sito danneggiato e, attraverso la sintesi di nuova ECM e processi di contrazione tissutale, porteranno alla cicatrizzazione della ferita, mentre le cellule endoteliali ed epiteliali migreranno verso la membrana basale ripristinandone l'integrità e concludendo il processo di riparazione. La sintesi e la degradazione del collagene, regolate dalle MMP e dai rispettivi inibitori, contribuiscono fortemente al rimodellamento tissutale.

Una aberrante risposta fibro-proliferativa ai danni ricorrenti del tessuto alveolare, bronchiolare ed endoteliale determina l'organizzazione di aree polmonari altamente fibrotiche (foci fibroblastici), la migrazione miofibroblastica e la deposizione

incontrollata di ECM a livello della parete alveolare (Wynn TA 2008). Le cellule maggiormente coinvolte nella patogenesi dell' FPI sono i miofibroblasti, la cui origine deriva dalla differenziazione di tre diversi tipi cellulari: a) le cellule mesenchimali *in situ*; b) cellule staminali CD34+ CD45+ produttrici di collagene di tipo I, provenienti dal circolo sanguigno; c) cellule epiteliali che vanno incontro a transizione epitelio-mesenchimale (TEM) (Kalluri R. *et al.* 2003; Moore B.B. *et al.* 2005)

I miofibroblasti sono attivati da una grande varietà di meccanismi, che includono segnali paracrini provenienti da linfociti e macrofagi, segnali autocrini secreti dagli stessi miofibroblasti, e segnali provenienti da organismi patogeni come i PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) che interagiscono con pattern recettoriali fibroblastici. Il TGF-*beta*1 è il principale regolatore della sintesi di ECM e viene inizialmente secreto quasi esclusivamente da monociti circolanti e macrofagi polmonari. Nell'avanzamento del processo fibrotico, il TGF-*beta*1 diventa attivatore di molte pathway molecolari ad azione profibrotica e la sua sintesi viene attribuita a diversi tipi cellulari (Tomasek J.J., Gabbiani G. *et al* 2002).

Infatti, la sua interazione con recettori transmembrana serina/treonina chinasi identificati come ALK-5 (type-I activin

receptor-like kinase 5), attiva i meccanismi di trasduzione del segnale Smad-dipendenti e/o Smad-indipendenti (Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ *et al.* 2004).

Nel primo caso il TGF- *beta1*, legandosi al complesso recettoriale induce la fosforilazione dei diversi fattori di trascrizione Smad tra i quali Smad2 e Smad3, che così si legano a Smad4 formando un complesso eterodimerico che è capace di entrare all'interno del nucleo e regolare l'attività genica (Heldin CH, Miyazono K *et al.* 1997). Ad esempio l'ANG II, uno dei componenti del sistema renina-angiotensina-aldosterone, alimenta il sistema di traduzione del segnale del TGF-*beta1* aumentando i livelli di SMAD2 e la traslocazione nel nucleo della forma fosforilata di SMAD3. Questo sistema è in grado di autosostenersi attraverso l'attivazione del miofibroblasto che non solo aumenterà la produzione di collagene, fibronectina e proteoglicani della matrice extracellulare ma sarà stimolato alla sintesi di nuovo TGF-*beta1*, stabilendo un ciclo autocrino di differenziazione e attivazione (Rosenkranz S. 2002; Bataller R, Schwabe RF *et al.* 2003).

Tra le vie di trasduzione del segnale Smad-indipendenti è compresa la via delle MAP Kinasi, ERK1/2 (extracellular-signal regulated Kinase 1/2). Questa via è coinvolta attivamente nella trasformazione

fenotipica dei fibroblasti polmonari in miofibroblasti. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che il trattamento dei fibroblasti polmonari umani con TGF- *beta*1 è in grado di indurre l'aumento dell'espressione dell'*alfa*-SMA e l'incremento della produzione di collagene attraverso una sequenza di eventi molecolari che coinvolgono l'attivazione di ERK 1/2, l'inibizione della GSK-3*beta* (glicogeno sintetasi chinasi) e la conseguente traslocazione della *beta*-catenina nel nucleo; quest' ultima proteina legandosi a specifici fattori di trascrizione, induce l'espressione di numerosi geni tra i quali quelli delle metalloproteasi, della fibronectina, della matrilisina e della ciclina D1, tutte molecole coinvolte nei processi di rimodellamento tissutale, di proliferazione e di fibrosi (Caraci F, Gili E. *et al.* 2008). Oltre ai pattern citati è stato dimostrato che gli effetti profibrotici del TGF- *beta*1 sono anche dovuti all'attivazione di PI3Ks, con particolare coinvolgimento delle isoforme p110 *gamma* e p110 *alfa* (Conte E., Fruciano M. *et al* 2011).

Come molte patologie fibrotiche croniche, anche se ad eziologia diversa, la FPI presenta uno stato infiammatorio cronico in cui la produzione di citochine e chemochine contribuiscono alla progressione della malattia. Altrettanto importanti sono le reazioni

infiammatorie acute (esacerbazioni) che nel soggetto con fibrosi, possono essere fatali nel giro di pochi mesi o addirittura settimane.

Quindi, anche se la FPI non è definita una malattia infiammatoria, non si può non tener conto che lo stato infiammatorio cronico nella fase precoce della malattia concorre all'espressione del fenotipo fibrotico mentre le esacerbazioni ne aggravano la prognosi.

La fibrogenesi è associata ad una risposta cellulare Th2 caratterizzata dalla sintesi di IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13.

Le citochine Th2 up-regolano la trascrizione di geni coinvolti nei meccanismi di riparazione tissutale e fibrosi come il pro-collagene I e III, arginasi, lisil-ossidasi, metalloproteasi 2 e 9 (MMP2,9), inibitore della matrice metalloproteasi 1 (TIMP1).

Il principale mediatore pro-fibrotico rilasciato dai linfociti Th2 è IL-13 che, stimolando la secrezione macrofagica di TGF- *beta*1, attiva non solo i fibroblasti alla sintesi di componenti della matrice extracellulare, ma anche cellule T *alfa beta* CD4+ Th17 e cellule T *gamma delta* alla sintesi di IL-17A.

In particolare, questa citochina svolge diverse funzioni profibrotiche, in quanto: a) facilita la distruzione tissutale inducendo direttamente la collagenasi MMP-1 (Cortez D.M., Feldman M.D., *et al* 2007) e la progelatinasi MMP-3 (Beklen A, Ainola M., *et al* 2007) in vari

fibroblasti; b) promuove granulopoiesi (Schwarzenberger P.V., La Russa A. *et al.* 1998) ed infiammazione stimolando la sintesi di IL-6, IL-8 ed MCP-1 dall'epitelio bronchiolare e/o dai fibroblasti; c) risulta inducibile da IL-1 β e IL-23, così come è dimostrato nel lavoro di Gasse P., Riteau N., *et al* 2011.

La sintesi di IL-17A da parte di Th17 e cellule T *gamma delta* è fortemente influenzata da IL-10, IL-6 e TGF- β 1. In particolare, IL-10 ha effetti inibitori su IL-17A ed è, in parte, sintetizzata dalle stesse cellule Th17 e cellule T *gamma delta* per poter regolare in maniera autocrina la propria funzione effettrice (Wilson M.S., Madala S.K. *et al* 2010).

Di contro, IL-6 e il TGF- β 1 sinergizzano ed inducono più dell'80% di cellule T naive a produrre IL-17A (Veldhoen M, Hocking R J *et al* 2006). Il TGF- β 1 regola la sintesi di IL-17A in maniera dose dipendente: a basse concentrazioni si associa con IL-6 e diventa induttore di IL-17A, a più alte concentrazioni induce la differenziazione di cellule antagoniste alle Th17 e alle T *gamma delta* come le cellule T regolatorie (T_{reg}) (Zhou Liang, Lopes E. J. *et al* 2008).

Quindi le cellule T *gamma delta*, Th17 e le T_{reg} non sono solo funzionalmente antagoniste ma hanno anche dicotomia generazionale (Bettelli E., Carrier Y. *et al* 2011).

Le T_{reg} appartengono al naturale pool delle cellule T CD25+ CD4+, e giocano un ruolo fondamentale nell'immunoregolazione dell'autoimmunità: infatti sono attivamente coinvolte nel mantenimento della tolleranza periferica verso gli antigeni self e nella regolazione della risposta immunitaria di tipo innata e adattativa contro i patogeni. Data la loro capacità di inibire efficientemente la proliferazione delle cellule T, queste cellule sono un elemento chiave nei meccanismi omeostatici sistemici che controllano il numero totale dei linfociti. Infatti, le cellule T_{reg} sotto la stimolazione mediata dal recettore T cellulare (TCR) sono caratterizzate da una potente capacità sia *in vivo* che *in vitro* di sopprimere la proliferazione e la funzione effettrice delle cellule CD4+ e CD8+.

Inoltre, hanno caratteristiche immunologiche di tipo regolatorio e soppressive verso le altre cellule T: l'attività soppressiva delle cellule T_{reg} non si realizza in maniera antigenicamente specifica ma per contatto diretto con interazioni cellula-cellula e/o la produzione di alcune citochine come il TGF- *beta*1 e IL-10.

Studi sperimentali *in vivo*, in cui sono state utilizzate cellule T_{reg} in differenti settings e in diversi modelli di autoimmunità, hanno chiaramente dimostrato l'importanza di entrambe le citochine nell'indurre il meccanismo della soppressione immunitaria. Infatti, IL-10 è una citochina in grado di indurre uno stato long-lasting di anergia antigene-specifica delle cellule T CD4+, determinando una perdita nella capacità proliferativa e nella produzione di citochine.

Il TGF-*beta*1 oltre ad indurre il meccanismo di soppressione immunitaria e regolare la differenziazione delle T_{reg} (induced regulatory T cell) e delle Th17, protegge le cellule T_{reg} dall'apoptosi e dalla destabilizzazione in caso di stimoli infiammatori continui (Dat Q. Tran 2012).

Sono necessari ulteriori studi per meglio trattare la malattia e per comprendere i meccanismi molecolari che stanno alla base del suo sviluppo e della sua progressione. Anche se nessun animale può mimare esattamente l'evoluzione del processo fibrotico nel polmone umano, il modello murino trattato con Bleomicina è quello più rappresentativo. La Bleomicina è un farmaco antitumorale tossico per il polmone in maniera dose-dipendente ed induce un danno polmonare e fibrosi in molti esperimenti che utilizzano modelli murini.

In questo lavoro il modello murino fu rappresentato da topi appartenenti al ceppo C57BL/6 trattati con Bleomicina e T-*beta*4 per 7 giorni. Dai dati ottenuti possiamo evincere che la T-*beta*4 esercita un ruolo protettivo nella fibrosi polmonare dimostrando chiare proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, inoltre dall'analisi istologica e dal *Sircol Soluble Collagen Assay* si registra un calo di collagene nella ECM polmonare dei topi trattati con T-*beta*4.

2. SCOPO DEL LAVORO

In questo studio si vogliono valutare i potenziali effetti protettivi della T-*beta*4 nella Fibrosi Polmonare Idiopatica.

L'ipotesi nasce dalla considerazione dei dati mostrati in letteratura sulla capacità antiossidante, antinfiammatoria ed antifibrotica di questa proteina e dai peptidi da essa derivati in organi come l'occhio, il rene, il fegato ed il cuore.

Infatti, molti lavori attribuiscono a T-*beta*4-sulfoxide proprietà antiossidanti dirette a limitare i danni tissutali provocati dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Ho, J.H., Chuang, C.H *et al* 2007; Ho, J.H., Tseng, K.C *et al* 2008; Kumar, S.& Gupta, S., 2011) e ad Ac-SDKP proprietà antinfiammatorie dirette a limitare l'infiltrazione neutrofilica nei tessuti danneggiati (Girardi, M., Sherling, M.A, *et al.* 2003).

Inoltre, studi sulla fibrosi cardiaca e sull'infarto del miocardio, hanno dimostrato che Ac-SDKP presenta anche proprietà antifibrotiche probabilmente associate alla capacità inibitoria su alcuni componenti della via di Smad e alla capacità emulativa del comportamento antifibrotico degli inibitori dell' ACE (Rhaleb, N.E., *et al.* 2001; Peng, H., Carretero, O.A, *et al.* 2003). La presenza di alte

concentrazioni di *T-beta4* e *T-beta4*-sulfoxide nel BAL di soggetti con sclerodermia a coinvolgimento polmonare, ha generato l'ipotesi, o meglio l'interrogativo di quale possa essere il ruolo della *T-beta4* in caso di danno polmonare.

Nella FPI, il danno polmonare viene messo in evidenza dalla morte apoptotica di cellule alveolari ed endoteliali che, nella maggior parte dei casi, è inizialmente provocata dall'accumulo intra ed extracellulare di ROS, di cui le cellule infiammatorie e i miofibroblasti attivati sono la principale fonte.

Lo scopo di questa tesi è studiare i potenziali effetti protettivi della *T-beta4* nella FPI. Tali effetti risulterebbero particolarmente utili per rallentare la fase precoce del processo fibrotico, dove danni tissutali da ROS e da cellule infiammatorie concorrono attivamente all'espressione del fenotipo fibrotico

Inoltre riteniamo che sia altrettanto interessante valutare gli effetti antifibrotici del peptide Ac-SDKP, obiettivo prefissato per le prossime ricerche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Stato Etico*

Il mantenimento in salute degli animali è stato conforme alla normativa italiana in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (DM 116192), nonché con la normativa CEE (G.U. di E.C. L 358/1 1986/12/18). Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell' Università di Messina.

3.2 *Materiali*

La *T-beta4* è stata gentilmente fornita da RegeneRx Biopharmaceuticals Inc. Rockville, MD USA. Tutti gli altri prodotti chimici sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich Company Ltd. (Poole, Dorset, Regno Unito). Tutte le soluzioni madre sono state preparate in soluzione fisiologica apirogena (0,9% NaCl, Baxter, Italia, Regno Unito).

3.3 *Animali*

Topi Maschi C57BL/6 (25-35 g; Harlan Nossan, Italia) sono stati alloggiati in un ambiente controllato provvisti di cibo standard e di

acqua.

3.4 Gruppi Sperimentali

In due esperimenti separati, i topi sono stati randomizzati nei seguenti gruppi:

- Gruppo Bleo + veicolo (N = 10): i topi sono stati sottoposti a danno polmonare indotto da Bleo, come sarà descritto di seguito, e hanno ricevuto soluzione salina per via intraperitoneale (ip) sia subito dopo la somministrazione di Bleo sia ogni 3 giorni a partire dal 1° fino al 7° giorno.
- Gruppo Bleo + T-beta4 (N = 10): ai topi è stata somministrata T-beta4 (6mg/kg) per via ip subito dopo Bleo e ogni 3 giorni a partire dal giorno 1° fino al 7° giorno.
- Gruppo Sham + veicolo (N = 5): i topi appartenenti a questo gruppo sono stati sottoposti alle stesse procedure operatorie e ai tempi di trattamento del gruppo Bleo e dei gruppi T-beta4. In questo gruppo sono stati utilizzati sali anziché Bleo e il veicolo anziché T-beta4.

- Gruppo Sham + T-*beta*4 (N = 5): così come il gruppo Sham descritto nel punto precedente, ma a cui è stata somministrata la T-*beta*4.

I vari gruppi di topi sono stati osservati giornalmente per tutto il periodo per determinare le differenze di sopravvivenza.

Al 7° giorno, i topi sono stati sacrificati con una overdose di pentobarbitone.

3.5 *L'induzione del danno polmonare*

I topi hanno ricevuto tramite catetere (tubo per tracheotomia) una singola instillazione intratracheale di soluzione fisiologica (0,9%) o salina contenente Bleomicina solfato (0.1U/mouse) in un volume finale di 100 ul, e il liquido è stato immediatamente seguito da 300ul di aria per garantirne la distribuzione anche nelle vie aeree distali.

3.6 *Lavaggio Broncoalveolare (BAL)*

Sette giorni dopo l'induzione della fibrosi, i topi sono stati sacrificati e la trachea è stata immediatamente cannulata con un catetere endovenoso in polietilene (Neo Delta Ven. 2, Delta Med, Viadana, Italia) equipaggiato con un 24-gauge su un 1-ml siringa. I polmoni sono stati lavati una volta con 0,5 ml di D-PBS (GIBCO, UK).

Nel 95% dei topi, il volume di ripristino supera 0,4 ml.

Il BAL fluido è stato centrifugato a 800 rpm, il surnatante è stato rimosso e il pellet cellulare è stato risospeso in PBS. Il numero di cellule nel BAL è stato ottenuto contando su un emocitometro in presenza di trypan blu. Le Cytospin sono state preparate dalle cellule risospese in PBS. I vetrini sono stati asciugati ad aria secca e sono stati poi colorati con Diff-Quick Set Stain (Diff-Quick, Baxter scientifico, Miami, FL). Mediante microscopia ottica, un totale di 400 cellule è stato esaminato da ciascun campione in campi scelti casualmente.

3.7 Saggio per l'attività Mieloperossidasi

L'attività Mieloperossidasi (MPO), un indicatore di accumulo di leucociti polimorfonucleati (PMN), è stata determinata come precedentemente descritto in omogenati polmonari (Mullane, K.M., Kraemer, R. *et al* 1985). Il tasso di variazione in assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 650 nm. Attività MPO è stata definita come la quantità di enzima che degrada 1 uMole di perossido / min a 37 ° C ed è stata espressa in milliunità per grammo di tessuto bagnato.

3.8 Istologia

Le biopsie polmonari sono state fissate in formaldeide al 10% (w/v) a temperatura ambiente, disidratate con diversi gradi di etanolo, ed inclusi in Paraplast (Sherwood Medical, Mahwah, NJ, USA). Le sezioni sono state poi deparaffinate con xilene, e colorati con ematossilina e eosina o il metodo van Gieson per il collagene. Tutte le sezioni sono state studiate utilizzando la microscopia ottica (Dialux 22 Leitz). La severità della fibrosi è stata valutata secondo il metodo di Ashcroft et al. (Ashcroft, T., Simpson, J.M. *et al* 1988). Brevemente, il grado di fibrosi polmonare è stata valutata su una scala da 0 a 8 esaminando campi scelti a caso del lobo centrale sinistro con un ingrandimento di $\times 100$. Criteri per la classificazione di fibrosi polmonare sono stati i seguenti: grado 0, polmone normale, grado 1, minimo ispessimento fibroso delle pareti alveolari o bronchiolari; grado 3, moderato ispessimento delle pareti senza danni evidenti all'architettura del polmone; grado 5, aumento della fibrosi con danni definitivi alla struttura del polmone e la formazione di bande fibrose o masse fibrose piccole; di grado 7, gravi distorsioni di struttura e grandi aree fibrose; di grado 8, obliterazione fibrosa totale dei campi. Gradi 2, 4 e 6 sono stati utilizzati come immagini intermedi dei suddetti criteri.

3.9 *Immunoistochimica (IHC) per T-beta4*

La colorazione per *T-beta4* è stata effettuata su sezioni di tessuto polmonare fissate in formalina ed incluse in paraffina. I vetrini sono stati deparaffinati, il tessuto reidratato e l'attività perossidasi endogena è stata spenta (30 min) con una soluzione di metanolo allo 0,3% di perossido di idrogeno. I vetrini sono stati quindi sottoposti ad ebollizione con la soluzione di antigen retrieval (20 min) in 10 mM di tampone citrato a pH 6, successivamente incubate con 10% di siero di capra normale in PBS per 60 minuti per bloccare il legame non specifico, infine incubate (20 h, 4 ° C) con anticorpi policlonali anti-*Tbeta4* (Bachem-Penisola Lab, San Carlos, CA, USA) 1:100 diluito in blocking solution. I vetrini sono stati quindi ampiamente lavate con PBS contenente 0,01% Triton X-100 ed incubate con un reagente secondario (Envision kit) secondo le istruzioni del produttore (Dako Glostrup, Danimarca). Dopo ulteriori lavaggi, il colore è stato sviluppato utilizzando AEC reagente (Dako). Le sezioni sono state colorate con ematossilina e montate. I campioni immunocolorati sono stati esaminati da un patologo esperto (G.F.).

3.10 *Sircol Soluble Collagen Assay*

Il contenuto totale di collagene polmonare è stato misurato mediante il dosaggio Sircol Soluble Collagen Assay (Biocolor, Newtownabbey, Irlanda del Nord), sulla base di una modifica del metodo sirius rosso, seguendo le istruzioni del produttore. In breve, dopo che i topi sono stati sacrificati, i loro polmoni sono stati rimossi ed omogeneizzati. I campioni sono stati quindi incubati a 4°C per 2 ore e centrifugati a $15.000 \times g$. I surnatanti (20 μ l) sono stati diluiti cinque volte in tampone di lisi, aggiunti a 1 ml di Sircol Dye Reagent, e poi miscelati per 30 minuti a temperatura ambiente con un agitatore meccanico. Il collagene colorato è stato raccolto per centrifugazione a $10.000 \times g$ per 10 minuti. Il colorante in eccesso in soluzione è stato accuratamente rimosso. Il complesso precipitato è stato risospeso in 1 ml di alcali reagente. La soluzione ottenuta è stata infine dispensata in una piastra a 96 pozzetti e valutati in un lettore di piastre (assorbanza = 540 nm).

Il contenuto assoluto di collagene è stata calcolato confrontando valori del campione a una curva standard pertinente.

3.11 Analisi Citofluorimetrica (FACS) per la valutazione di CD4, CD25, IL-17A e Fox-p3 sui linfociti ottenuti dal sangue periferico e dalla milza

La milza di ogni topo è stata prelevata ed omogenizzata con un pestello in vetro. L'omogenizzato è stato risospeso in PBS al 2% di FBS, filtrato con un filtro da 100 μm e successivamente con un filtro da 40 μm , e alla fine centrifugato a $350 \times g$ per 10 minuti. Le cellule pellettate sono state raccolte. Sia l'omogenizzato della milza sia il sangue intero periferico sono stati sottoposti a separazione con ficoll e i mononucleati sono stati contati, fissati, e marcati per gli antigeni di superficie CD4 e CD25. La permeabilizzazione cellulare è stata necessaria per la marcatura degli antigeni intracellulari IL-17A e Fox-p3. Infine, i campioni sono stati letti al FACS.

3.12 Valutazione Statistica

Tutti i valori numerici nelle figure e nel testo sono espressi come media +/- della media (SEM) di N osservazioni. N rappresenta il numero totale di animali studiati in ciascuno esperimenti separati. I risultati sono stati analizzati mediante ANOVA seguita da una post-hoc test di Bonferroni per più confronti. Un p-value inferiore a 0,05 è stato considerato significativo. L'analisi statistica dei dati di sopravvivenza è stata calcolata con il test esatto di Fisher.

4. RISULTATI

4.1 Effetti della T-beta4 sulla perdita di peso corporeo e sulla mortalità indotta dal trattamento con Bleomicina

La perdita di peso corporeo registrata in seguito a trattamento con Bleomicina è stata attenuata dalla somministrazione della *T-beta4* (FIG.1A) al 3° e al 7° giorno. Allo stesso modo il tasso di mortalità è stato più alto nel gruppo Bleo rispetto al gruppo Sham di controllo. Al contrario non ci sono state differenze statisticamente significative tra il gruppo trattato con *T-beta4* e il gruppo di controllo Sham. (FIG.1B)

4.2 Analisi Citobiologica del Lavaggio Bronco Alveolare

Nel BAL è possibile riscontrare macrofagi residenti negli alveoli ed infiltrati leucocitari, soprattutto di linfociti e neutrofili. Come è mostrato in (FIG 2.A) dopo una settimana, la cellularità totale nel BAL di topi trattati con Bleo aumenta in maniera significativa rispetto ai topi trattati con *T-beta4* e naturalmente al gruppo Sham. Dalla conta differenziale è stato osservato che nel gruppo Bleo vi è

un decremento di macrofagi accompagnato da un aumento di neutrofili e linfociti mentre nei topi trattati con T-*beta4* questi aumenti significativi furono molto meno evidenti rispetto al gruppo Bleo. (FIG 2.B)

4.3 Attività Mieloperossidasi (MPO) ed Edema Polmonare

La somministrazione di Bleo ha indotto uno stato infiammatorio che già dopo una settimana, era caratterizzato anche da un' aumentata attività mieloperossidasi, come risulta dall'infiltrazione di polimorfonucleati e da edema polmonare. Il trattamento con T-*beta4* ha ridotto significativamente sia l'infiltrazione leucocitaria sia l'edema. (FIG 2.C- FIG 4.A)

4.4 Istologia

Dopo 7 giorni dal trattamento con Bleomicina, l'analisi istologica mostra:

- infiltrazione leucocitaria soprattutto lungo tutto il tratto alveolare
- granulomi nella regione perivascolare

- deposizione di matrice extracellulare, come evidenziata dalla colorazione di van Gieson , specifica per il collagene.

Al contrario la *T-beta4* previene sia l'infiammazione che il danno tissutale. (FIG. 3)

4.5 Contenuto di Collagene

In accordo con i dati mostrati in istologia, l'aumento di collagene totale nel gruppo Bleo è stato meno evidente quando i topi sono stati trattati con *T-beta4*. (FIG. 4B)

4.6 Localizzazione di T-beta4 nel polmone

Ci siamo chiesti se la *T-beta4* esogena somministrata per ip possa arricchire il contenuto di *T-beta4* nel polmone ed avere effetti protettivi al danno polmonare indotto dalla Bleo. L'immunoistochimica sui tessuti polmonari dei diversi gruppi sperimentali (FIG.5) mostra che la *T-beta4* è espressa nel tessuto polmonare normale a bassi livelli, soprattutto nei vasi sanguigni di piccola e media dimensione e nei macrofagi residenti (controllo positivo interno). Nel tessuto polmonare dei topi trattati con Bleo si osserva un debole e diffuso segnale positivo per la *T-beta4* probabilmente dovuto all'infiltrato cellulare, mentre nei topi trattati

con T-*beta*4 si ha un segnale molto più forte, a dimostrazione che la T-*beta*4 viene assorbita specialmente dalle cellule alveolari.

4.7 Analisi al FACS per la valutazione di CD4, CD25, IL-17A e Fox-p3 sui linfociti ottenuti dal sangue periferico e dalla milza

I topi ai quali è stato indotto un danno polmonare da Bleomicina e trattati con T-*beta*4 hanno una riduzione della percentuale di cellule positive per IL-17A rispetto ai topi appartenenti al gruppo Bleo, sia nel sangue che nella milza. (FIG.6) Inoltre dati preliminari su cellule T_{reg} mostrano un aumento di cellule CD25^{high} Fox-p3⁺ (FIG.7).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Nella Fibrosi Polmonare Idiopatica i tessuti alveolare ed endoteliale sono quelli maggiormente danneggiati e l'apoptosi cellulare da stress ossidativo è stata dimostrata soprattutto nella fase precoce del processo fibrotico (Koli, K. *et al.* 2008). Lo stress ossidativo è dovuto all'accumulo di molecole di ossigeno reattivo (ROS) e può essere causato da un disaccoppiamento nella catena respiratoria mitocondriale e/o da una ridotta attività di enzimi come la catalasi e la superossido dismutasi (Cu/Zn-SOD) e/o dalla stimolazione di sorgenti enzimatiche come xantina ossidasi, ciclo-ossigenasi, ossido nitrico sintasi e NAD(P)H ossidasi non-fagocitica.

Anche se l'infiammazione non è considerata la principale causa di sviluppo di interstiziopatia e di fibrosi polmonare, molti fattori rilasciati dalla risposta infiammatoria concorrono all'apoptosi delle cellule alveolari AEC II. Basta pensare che la principale sorgente di ROS extracellulare sono le cellule infiammatorie e i miofibroblasti attivati. In questo studio *in vivo* gli effetti della T-*beta*4 sono stati valutati dopo 7 giorni di trattamento, fase in cui, il danno polmonare

indotto da Bleomicina, presenta un processo infiammatorio pienamente attivo e un processo fibrotico in via di sviluppo. Attraverso la valutazione di parametri quali, grado di infiltrazione leucocitaria, attività mieloperossidasi ed edema, la T-*beta4* ha mostrato di avere forti poteri antinfiammatori. Infatti, dalla conta differenziale su BAL, il gruppo Bleo ha mostrato un decremento di macrofagi accompagnato da un aumento di neutrofili e linfociti mentre nel gruppo T-*beta4* questi aumenti significativi sono stati molto meno evidenti inoltre, l'attività mieloperossidasi e l'edema polmonare risultarono ridotte; questi dati probabilmente sono legati al meccanismo, già citato nel primo capitolo, secondo il quale la T-*beta4* inibisce l'attivazione di NF-*κ*B dal TNF-*alfa* e la conseguente sintesi di citochine proinfiammatorie. La riduzione di cellule positive a IL-17A, più evidente nel sangue periferico rispetto alle cellule isolate dalla milza, diventa un'ulteriore risposta di T-*beta4* nei confronti dei processi infiammatori e fibrotici. La citochina IL-17A, con funzione protettiva contro agenti patogeni, controlla la risposta infiammatoria ed induce, nel caso di danno polmonare, il richiamo *in situ* di cellule fagocitarie, inoltre corrobora l'azione profibrotica del TGF-*beta1* inducendo direttamente la collagenasi MMP-1 e la progelatinasi MMP-3 in vari fibroblasti.

Nella FPI, le cellule Th17 e cellule T *gamma delta* pur non essendo delle sottopopolazioni di Th2 concorrono all'espressione del fenotipo fibrotico, probabilmente anche a causa della carenza numerica e la presenza funzionalmente deficitaria di T_{reg} . (Kotsianidis, Ioannis, Nakou E. *et al.* 2009). Bisogna ultimare gli studi per definire se la FPI presenta un asse immunologico costituito da cellule positive a IL-17A e T_{reg} , quanto questo asse possa essere sbilanciato verso le cellule effettrici e se la T-*beta4* interviene a ripristinare il giusto equilibrio fra i due tipi cellulari. Dai dati ottenuti dalle nostre ricerche si evince che nel sangue periferico del gruppo sperimentale trattato con T-*beta4* si ha un calo di cellule positive a IL-17A rispetto al gruppo Bleo e, da dati preliminari sui mononucleati ottenuti dalla milza, un contemporaneo aumento di T_{reg} Fox-p3.

Considerato che il TGF-*beta1* rappresenta il fattore di differenziamento più importante per le T_{reg} è ipotizzabile che la T-*beta4* aumentando la sintesi di TGF-*beta1* possa agevolare tale processo. E' dimostrato che il TGF-*beta1*, insieme ad altre citochine, orchestra la differenziazione di Th17 e di T_{reg} in maniera dose dipendente: a basse concentrazioni sinergizza con IL-6 e IL-21 promuovendo l'espressione del recettore di IL-23 (*il23r*) e

favorendo la differenziazione di Th17, a più alte concentrazioni ed in assenza di citochine pro-infiammatorie come IL-6 e IL-21, inibisce l'espressione di *il23r* per interazione di Fox-p3 con ROR γ mat. (Zhou, L., Lopes, J.E., *et al* 2008)

I delicati equilibri che stanno attorno a questo fattore lo mettono in una posizione critica nello sviluppo della FPI. Il TGF-*beta*1 secreto da molte cellule anche nella sua forma latente (TGF-*beta*1/LAP), viene trasportato e ancorato alla matrice extracellulare. Situazioni di stress ossidativo e la presenza di ROS, come nella risposta infiammatoria, radiazioni ionizzanti e asbestosi, possono indurre lo switch alla sua forma matura. Inoltre, il TGF-*beta*1 può indurre la sintesi di ROS intracellulare tramite la subunità catalica Nox4 della NADPH ossidasi. I processi regolati dal TGF-*beta*1 indotto da ROS includono la proliferazione delle cellule muscolari delle arterie polmonari, alterazioni citoscheletriche nelle cellule endoteliali, angiogenesi, EMT, modulazione di proteine di matrice e la regolazione dell'espressione dei geni CTGF, PAI-1 e p21. Ed ancora, la downregolazione dell'espressione di enzimi ad azione antiossidante come la MnSOD (Manganese superossido dismutasi), ECSOD (superossido dismutasi extracellulare) la GCL (Glutamate cysteine ligase), tioredoxina e la Glutaredoxina 1. L'aumento di

ROS altera l'infiammazione tramite l'attivazione di fattori di trascrizione come NF- κ B e AP-1 che vanno a regolare l'espressione di citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e segnali apoptotici. Studi *in vitro* hanno mostrato che il perossido di idrogeno (H₂O₂) stimola la proliferazione dei fibroblasti polmonari. Ed i fibroblasti prelevati da pazienti con FPI se messi in cocultura con cellule epiteliali alveolari sono in grado di indurre l'apoptosi. (Kliment, C.R., Oury, T.D., 2010). Sicuramente il TGF- β 1 è il fattore di crescita maggiormente coinvolto, infatti inibisce la proliferazione delle cellule alveolari e l'espressione del surfactante diventando il principale effettore della fibrosi polmonare. (Zhang, F., Nielsen L. D., *et al.* 2004).

In vivo, gli effetti del TGF- β 1 in combinazione con condizioni di stress ossidativo, possono determinare conseguenze multiple nel sistema di difesa del polmone sottoposto ad insulti dannosi. (Koli, K., Millarniemi, M. *et al.* 2008). E' probabile che *in vivo* la T- β 4 presenta un ruolo protettivo grazie all'azione combinata di T- β 4 -sulfoxide e di Ac-SDKP, probabilmente attenuando l'azione coordinata del TGF- β 1 e dei ROS.

L'ipotesi che la T- β 4 possa avere proprietà antifibrotiche viene rafforzata da ultimi studi su ACE (*angiotensin converting enzyme*) e

Ac-SDKP. Il sistema angiotensina-renina, attivato dopo un danno tissutale, promuove la riparazione tissutale e, se la sua attivazione avviene in maniera incontrollata, genera fibrosi. E' stato osservato che inibendo il dominio N-terminale dell'ACE viene meno la degradazione di Ac-SDKP, ed il polmone risulta protetto dagli effetti dannosi della Bleomicina (Ping, Li, Hong, D. Xiao 2010). L'effetto antifibrotico non è stato associato all'inibizione della sintesi di ANGII, la cui concentrazione sierica e polmonare è stata mantenuta come nel topo wild-type, ma all'aumento di Ac-SDKP. Anche se il meccanismo molecolare risulta ancora sconosciuto, probabilmente Ac-SDKP agendo sulla via di Smad attenua gli effetti del TGF-*beta*1. Altri lavori dimostrano che la T-*beta*4 riduce la fosforilazione di AKT in cellule stellate del fegato (Barnaeva, E., Nadhezda, A, *et al* 2007) e sapendo quanto sia cruciale l'asse PI3K/AKT nella differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti, diventa auspicabile pensare che la T-*beta*4 potrebbe avere effetti antifibrotici comportandosi allo stesso modo.

Inoltre dai dati mostrati in questo lavoro, la localizzazione alveolare della T-*beta*4 esogena dimostra un effetto protettivo diretto sulle cellule alveolari probabilmente comportandosi da "scavenger"

molecolare nei processi ossidativi e/o attraverso altri effetti sistemici.

Sono necessari ulteriori studi per valutare la durata degli effetti della T-*beta*4 o dei peptidi da essa derivati sul tessuto polmonare sottoposto a danno tissutale e se la T-*beta*4 può essere una molecola candidata nella formulazione di nuove terapie contro la FPI.

BIBLIOGRAFIA

American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. 2002. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **165**: 277–304.

Ashcroft, T., Simpson, J.M., & Timbrell, V. 1988. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* **41**: 467–470.

Barnaeva, E., Nadezhda, A., *et al.* 2007. Thymosin beta4 upregulates the expression of hepatocyte growth factor and downregulates the expression of PDGF-beta receptor in human hepatic stellate cells. *Ann N.Y. Acad Sci.* **1112**: 154-160.

Battaller, R, Schwabe, RF, Choi, YH., Yang, L, Paik, YH, Lindquist, J, *et al.* 2003. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest*; **112**(9):1383–1394.

Bettelli, E., Carrier, Y., *et al.* 2006. Reciprocal development pathway for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cell. *Nature* **441**, 235-238.

- Beklen, A., Aiola, M. *et al.* 2007. MMPs, IL-1beta, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J. Dent. Res.* **86**:347–351
- Caraci, F., Gili, E. *et al.* 2008. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res*; **57**:274-82.
- Cavasin, M.A., Liao, T.D., Yang, X.P., *et al.* 2007. Decreased endogenous levels of Ac-SDKP promote organ fibrosis. *Hypertension* **50**: 130–136.
- Conte, E., Genovese, T., Gili, E., Esposito, E., Iemmolo, M. *et al.* 2012 Protective effects of thymosin beta4 in a mouse model of lung fibrosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1269(1):69-73.
- Conte, E., Frusciano, M., Iemmolo M. *et al.* 2011. Inhibition of PI3K prevents the proliferation and differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts: the role of Class I P110 Isoforms. *PloS One* **6**:10-e24663
- Cortez, D.M., Feldman, M.D. *et al.* 2007. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**:H3356–H3365

- De Santis, S.M., Inzitari R., Bosello S.L, *et al.* 2011. beta-Thymosins and interstitial lung disease: study of a scleroderma cohort with a one-year follow-up. *Respir. Res.* **12**: 22.
- Gasse, P., Mary, C. *et al.* 2007. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117:3786–3799
- Girardi, M., Sherling, M.A, Filler, R.B. *et al.* 2003. Anti-inflammatory effects in the skin of thymosin-beta4 splice-variants. *Immunology* **109**(1): 1–7.
- Goldstein, A.L., Hannappel, E.& Kleinman, H.K. 2005. Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol. Med.* **11**: 421- 429
- Ho, J.H., Chuang, C.H., Ho, C.Y., *et al.* 2007. Internalization is essential for the antiapoptotic effects of exogenous thymosin beta-4 on human corneal epithelial cells. *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**: 27–33.
- Ho, J.H., Tseng, K.C., Ma, W.H. *et al.* 2008. Thymosin beta-4 upregulates anti-oxidative enzymes and protects human cornea epithelial cells against oxidative damage. *Br. J. Ophthalmol.* **92**: 992–997.

- Huff, T., Muller, C. S.G, Hannappell, E. *et al.* 2001. β -Thymosin, small acid peptides with multiple function. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33: 205–220
- Kalluri, R., Neilson, N.G. *et al.* 2003. Epithelial–Mesenchymal transition and its implication for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**(12): 1776-1784
- Kanasaki, K., *et al.* 2003. N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits TGF-beta-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression via inhibition of Smad pathway in human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 863-872.
- Kliment, C. R., Oury, T. D. 2010. Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radical Biology & Medicine* **49**: 707-717.
- Koli, K, Myllarniemi, M. *et al.* 2008. Transforming Growth Factor-Activation in the Lung: Focus on Fibrosis and Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling* **10** (2): 333-341
- Kotsianidis, I., Nakou, E., Bouchliou I. *et al.* 2009. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med* **179**: 1121-1130.

- Kumar, S.& Gupta, S. 2011. Thymosin beta 4 prevents oxidative stress by targeting antioxidant and anti-apoptotic genes in cardiac fibroblasts. *PLoS One* **6**:e26912.
- Moore, B.B., Kolodzik, J.E. *et al.* 2005. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am. J. Pathol.* **166**(3): 675-684
- Mullane, K.M. *et al.* 1985. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods* **14**(3): 157-67
- Peng, H., Carretero, O.A., Brigstock, D.R., *et al.* 2003. Ac-SDKP reverses cardiac fibrosis in rats with renovascular hypertension. *Hypertension* **42**:1164–1170.
- Ping, Li, Xiao, Hong, D., *et al.* 2010. Angiotensin-Converting Enzyme N-terminal inactivation alleviates Bleomycin-induced lung injury. *Am J of Pathol.* **177**(3): 113-1121.
- Qiu, P., Wheeler, M.K., Qiu, Y. 2011. Thymosin beta 4 inhibits TNF- α -induced NF-kB activation, IL-8 expression, and the sensitizing effects by its partners PINCH-1 and ILK *FASEB J.* **25**(6): 1815–1826

- Rhaleb, N.E. *et al.* 2001. Effect of N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl - proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* **37**, 827-832
- Rosenkranz, S., Flesch, M., *et al.* 2002. Alterations of *beta*-adrenergic signalling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF β 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283(3):H1253–1262.
- Schwarzenberger, P., La Russa, V., *et al.* 1998. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J. Immunol.* 161: 6383–6389.
- Sharma, U., Rhaleb, N.E., Pokharel, S. *et al.* 2008. Novel anti-inflammatory mechanisms of N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **294**(3):H1226-32.
- Sosne, G., Qiu, P., Goldstein A.L., Wheater, M. 2010. Biological activities of Thymosin beta4 defined by ctive sites in short peptide sequence. *FASEB J.* **24**, (2144-2151).
- Tomasek, J.J., Gabbiani G., *et al.* 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature* **3**: 349-363.

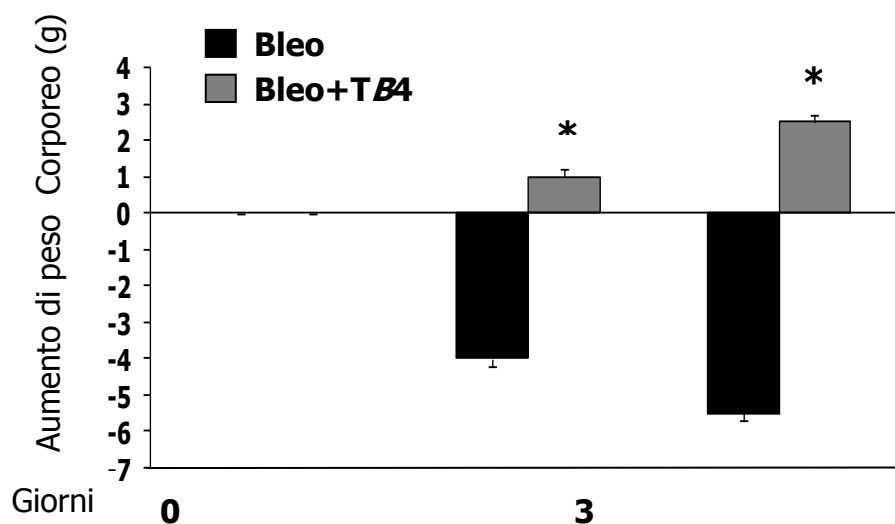
- Tran Dat Q. 2012. TGF-beta1: the sword , the wand and the shield of FoxP3+ regulatory T cells. *J. of Mol. Cell Biology* **4**, 29-37.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J. *et al.* 2006. TGFbeta in the context of un inflammatory cytokine milieu support de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189
- Volkov, L., Quèrè, P., Coudert, F. *et al.* 1996. The tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of cell cycle entry, inhibits the proliferation of human and chicken lymphocytes. *Cellular Immunology* **168**, 302–306
- Wilson, M.S., Madala, S.K., *et al.* 2010. Bleomycin and IL-1betaβ-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J. Exp. Med.* **207**(3) 535-552
- Wynn T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* **214**(2): 199-210
- Yang F. *et al.* 2004. Ac-SDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction. *Hypertension* **43** 229-236
- Zhang, F., Nielsen, L.D. *et al.* 2004. TGF-beta antonized Alveolar Type II Cell proliferation induced by Keratinocyte growth factor. *Am J Resp Cell Mol Biol* **31**: 679-686.

Zhou, L., Lopes, J.E. *et al.* 2008. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature* **453**, 236-240

Zhu, S, Goldschmidt-Clermont, PJ, Dong, C. 2004. TGF-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ Res*; **94**:617-25.

FIGURE

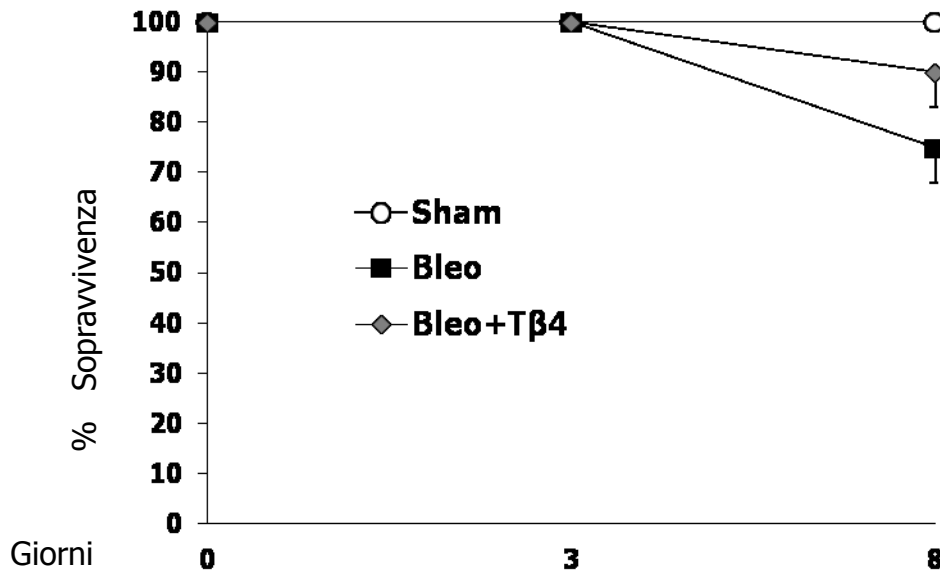
1.A)



Effetto della TB4 sulla perdita del peso corporeo indotta dal trattamento con Bleomicina. I valori indicano il rapporto perdita/guadagno di peso in grammi. Lo 0 indica il peso di riferimento del gruppo Sham. La TB4 attenua la perdita di peso registrata nel gruppo Bleo.

Tutti i dati sono mediati \pm e.s. di due esperimenti separati (in ogni esperimento n=10 topi per il gruppo Bleo e il gruppo Bleo+TB4, n=5 topi per il gruppo Sham) * $p < 0,05$ versus Gruppo Sham

1.B)

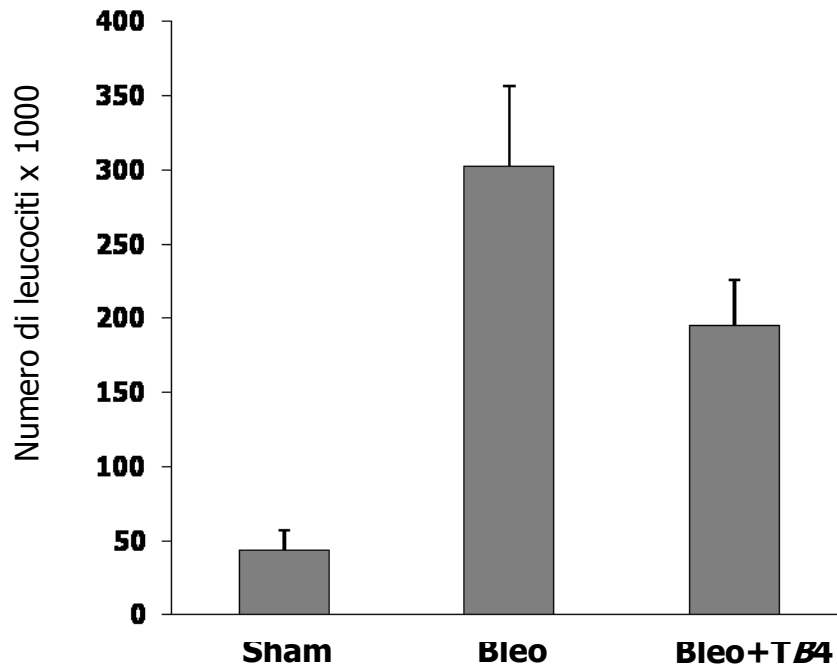


Il tasso di mortalità aumentato dal trattamento con Bleomicina è ridotto dalla somministrazione di TB4. Il gruppo Sham rappresenta il gruppo di controllo.

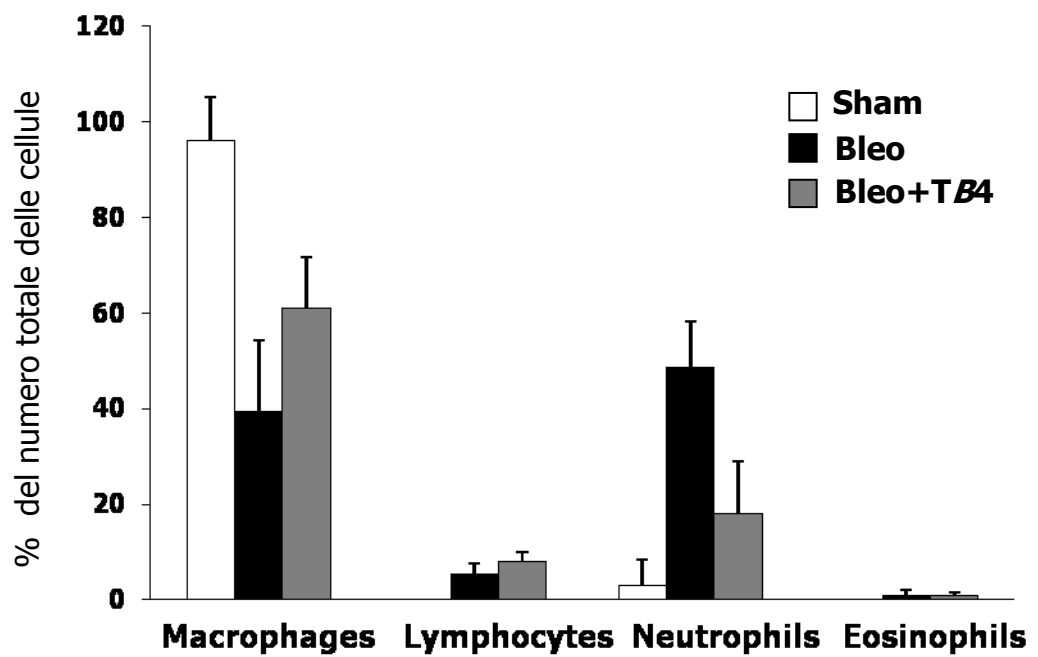
Tutti i dati sono mediati \pm e.s. di due esperimenti separati (in ogni esperimento n=10 topi per il gruppo Bleo e il gruppo Bleo+TB4, n=5 topi per il gruppo Sham) * $p < 0,05$ versus Gruppo Sham

FIG. 2

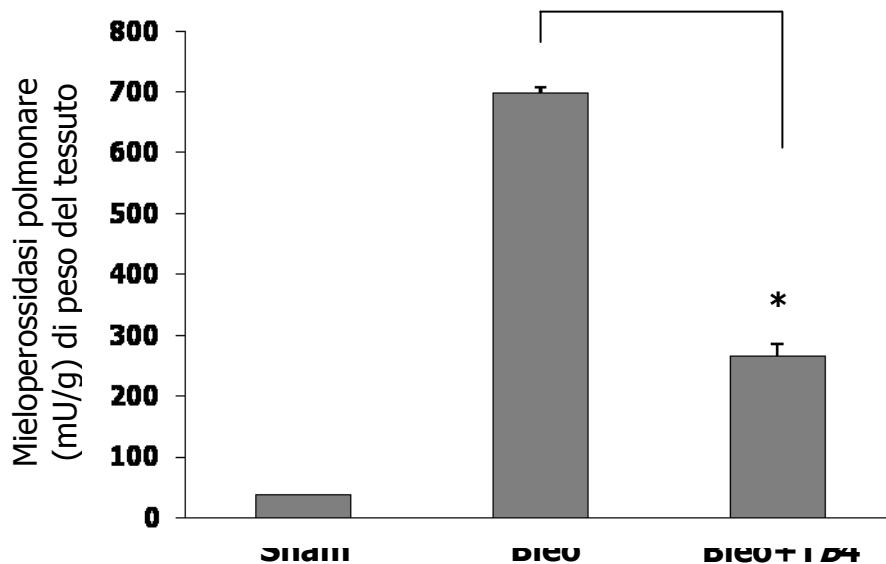
2.A)



2.B)



2.C)

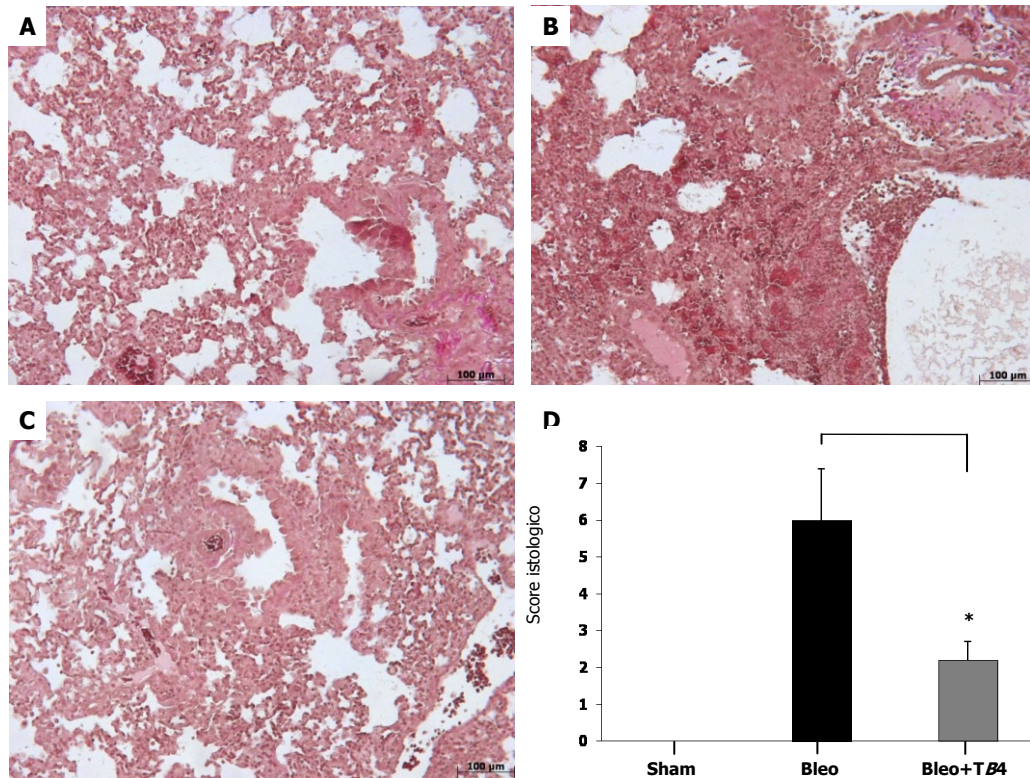


La FIG 2.A mette in evidenza l'aumento di cellule totali nel gruppo Bleo rispetto al gruppo Bleo + TB4 : il numero totale delle cellule per ml (media \pm d.s.) di BAL sono riportati per ogni gruppo.

La FIG 2.B rappresenta la conta differenziale su BAL. Nel gruppo Bleo si registra un infiltrato neutrofilico che in seguito alla somministrazione di TB4 si annulla. I dati riportati sono ottenuti dalla osservazione al microscopio ottico di 400 cellule in aree del vetrino scelte a random per ogni campione.

L'attività Mieloperossidasi rappresentata in FIG 2.C è stata ottenuta mediante saggio colorimetrico dall'omogenato polmonare. I dati confermano la presenza di infiltrazione neutrofilica nel gruppo Bleo e il calo nel gruppo Bleo+TB4 è indice di attività antinfiammatoria e antiossidante della TB4. I grafici mostrano i valori medi \pm d.s. di almeno 5 topi per gruppo. * $p < 0,05$ versus Bleo.

FIG. 3)



La FIG. 3 mostra gli effetti della TB4 sul danno polmonare indotto da Bleomicina.

Le sezioni di tessuto polmonare deparaffinati sono stati colorati mediante la colorazione di Van Gieson specifica per il collagene. I fotogrammi (150x) più rappresentativi sono suddivisi:

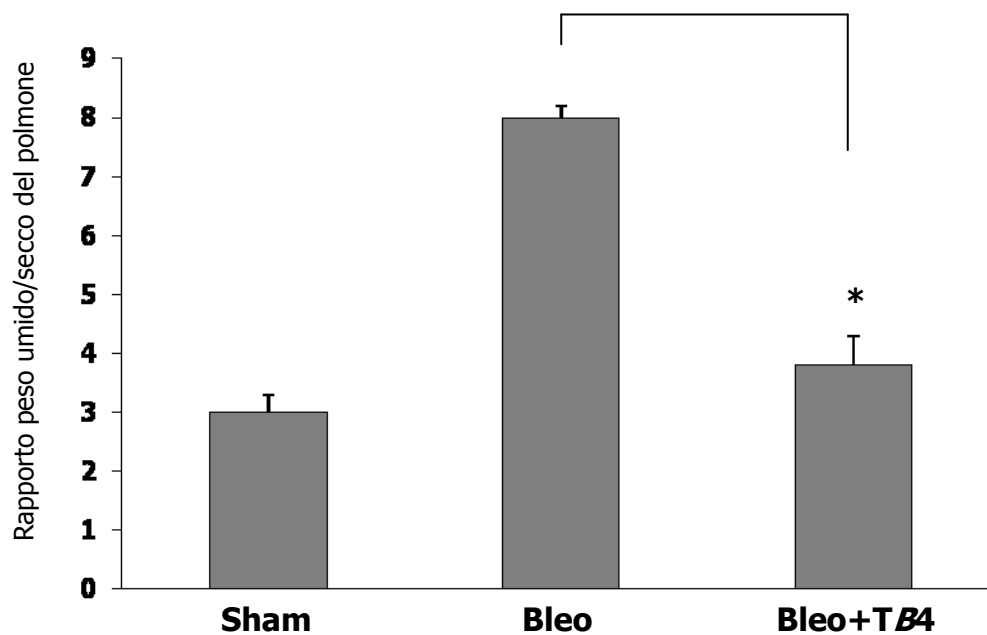
A) Gruppo Sham, B) Gruppo Bleo, C) Gruppo Bleo+TB4.

Per la classificazione di fibrosi polmonare sono stati seguiti i criteri dettati dalla scala di Ashcroft: grado 0, polmone normale, grado 1, minimo ispessimento fibroso delle pareti alveolari o bronchiolari; grado 3, moderato ispessimento delle pareti senza danni evidenti all'architettura del polmone; grado 5, aumento della fibrosi con danni

definitivi alla struttura del polmone e la formazione di bande fibrose o masse fibrose piccole; di grado 7, gravi distorsioni di struttura e grandi aree fibrose; di grado 8, obliterazione fibrosa totale dei campi. Gradi 2, 4 e 6 sono stati utilizzati come immagini intermedi dei suddetti criteri.

FIG. 4

4.A)

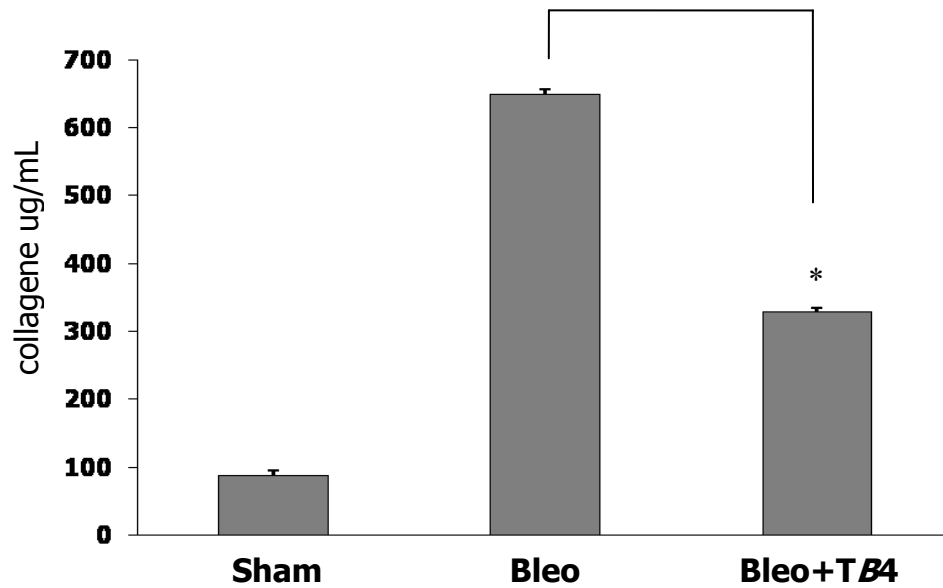


Il peso del polmone è stato misurato dopo l'accurata eliminazione di pezzi di tessuto extrapolmonare. Il polmone fu esposto a 180 °C per 48 h ed il peso secco misurato. E' stato riportato il peso secco misurato per ogni gruppo.

Il grafico riporta i valori medi \pm e.s. di almeno 5 topi per gruppo.

* $p < 0,05$ versus Sham.

4.B)

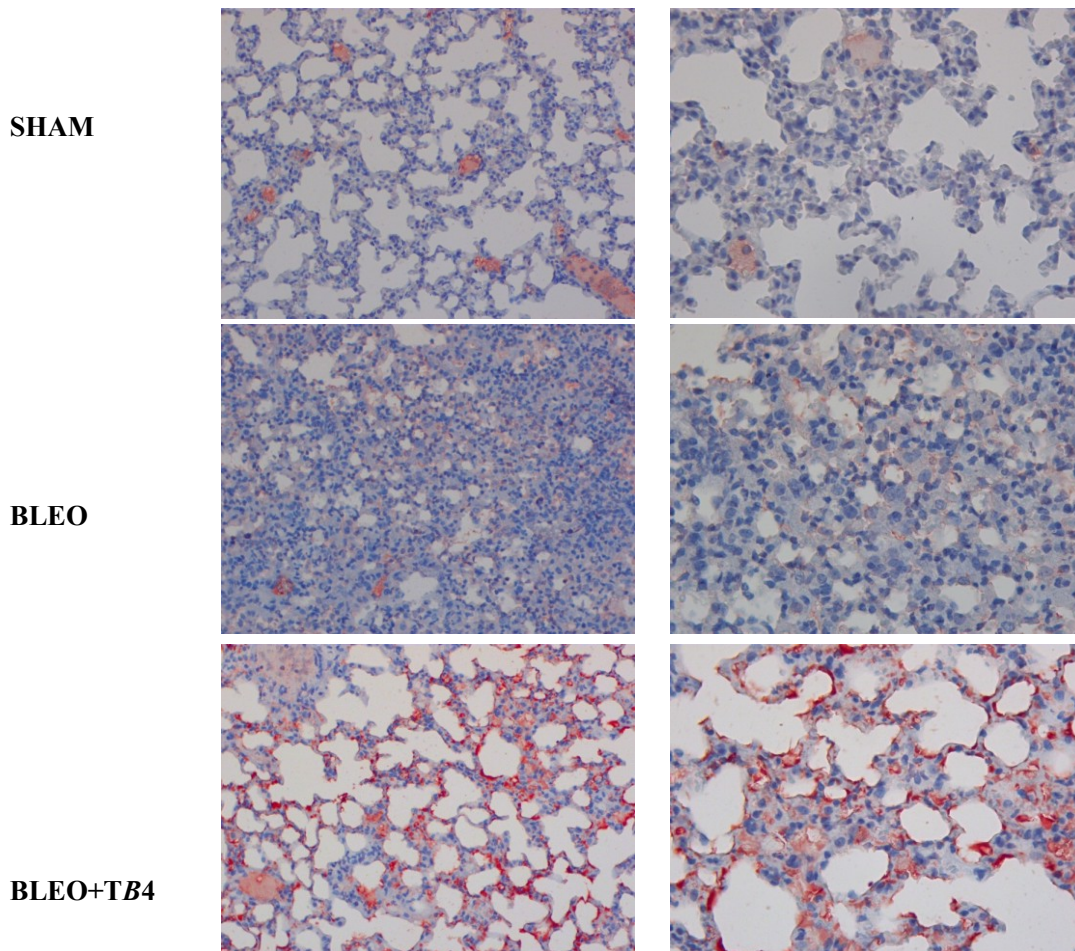


Contenuto di collagene è misurato mediante il Sircol Soluble Collagen Assay nell'omogenato di polmone.

Il grafico riporta i valori medi \pm e.s. di almeno 5 topi per gruppo.

* $p < 0,05$ versus Sham.

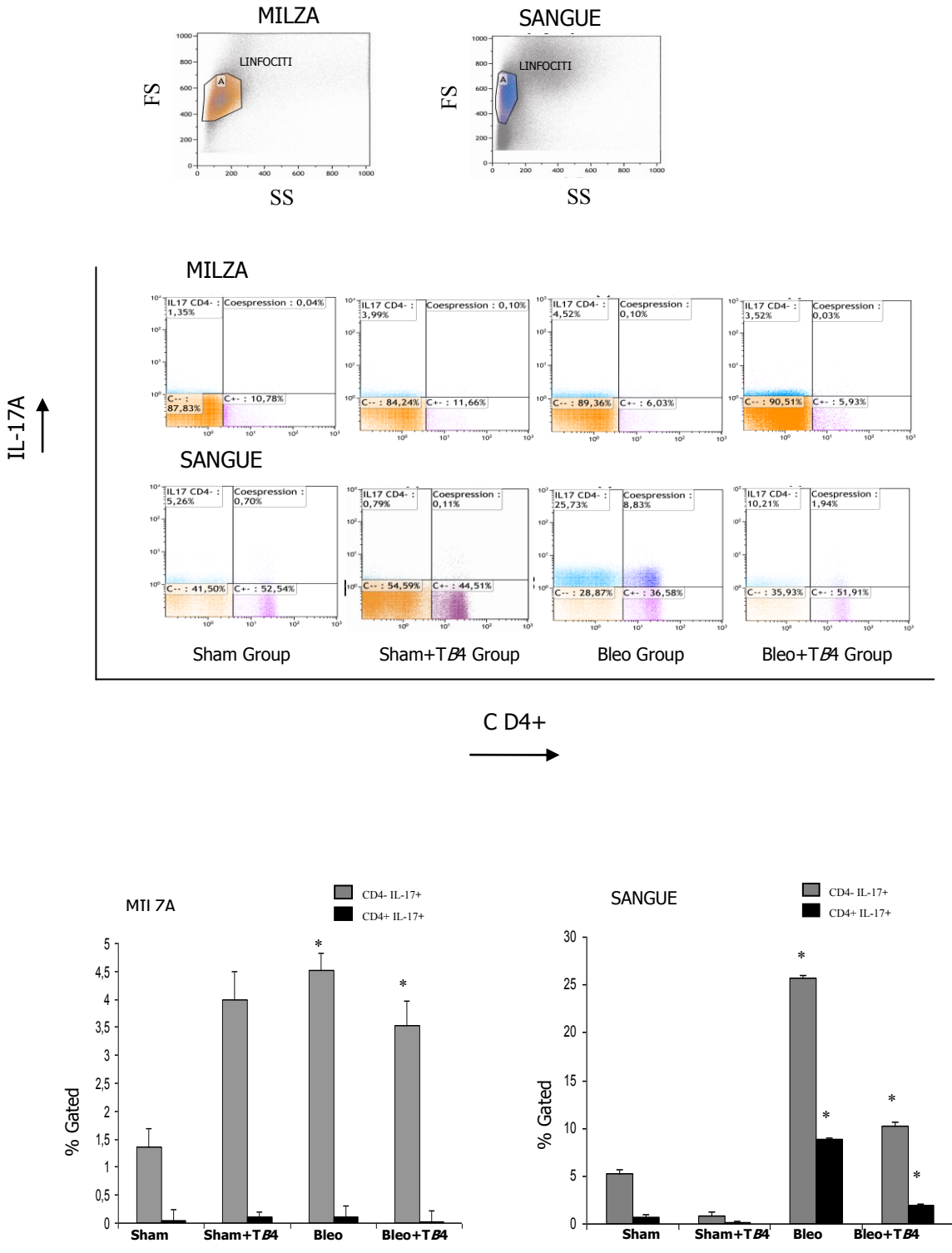
FIG. 5



Localizzazione della T-B4 nel tessuto polmonare.

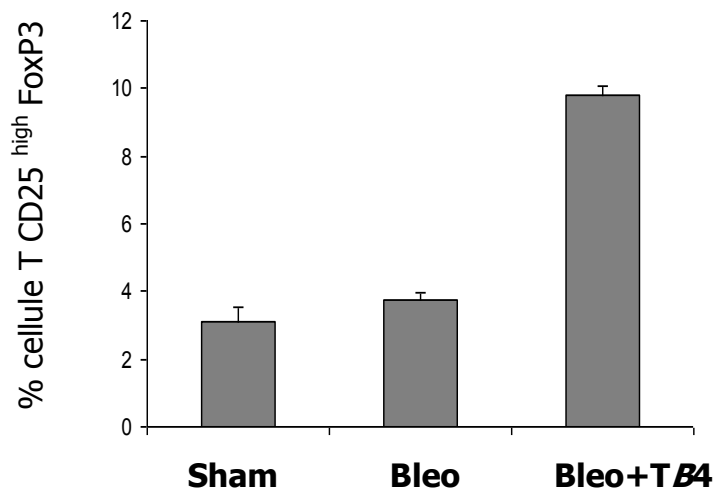
L'immunoistochimica per T-B4 è stata eseguita su slides di tessuto polmonare deparaffinato e colorato. Sono stati scelti i fotogrammi più rappresentativi (150x sulla colonna di sinistra e 300x sulla colonna di destra) e la T-B4 viene mostrata colorata in rosso. Nel tessuto polmonare dei topi trattati con Bleo si osserva un debole e diffuso segnale positivo per la TB4 probabilmente dovuto all'infiltrato cellulare, mentre nei topi trattati con TB4 si ha un segnale molto più forte, a dimostrazione che la TB4 viene assorbita specialmente dalle cellule alveolari.

FIG. 6



Nella FIG .6 i linfociti sono stati selezionati secondo parametri fisici standard (FS/SS) sia nel sangue che nella milza. Le cellule sono state marcate per CD4 (marc. di superficie) e dopo permeabilizzazione cellulare per IL-17A (marc. intracitoplasmatico). I dotplot rappresentano la doppia marcatura sia nei linfociti della milza (dotplot in alto) sia in quelli del sangue (dotplot in basso) riportando i seguenti risultati: i topi ai quali è stato indotto un danno polmonare da Bleomicina e trattati con *T-beta4* hanno una riduzione della percentuale di cellule positive per IL-17A rispetto ai topi appartenenti al gruppo Bleo, sia nei linfociti ottenuti dal sangue che dalla milza.

FIG. 7



Nella FIG .7 i linfociti ottenuti dalla milza sono stati selezionati secondo parametri fisici standard (FS/SS). Le cellule sono state

marcate per CD4, CD25 (marc. di superficie) e dopo permeabilizzazione cellulare per Fox-p3 (marc. intracitoplasmatico). I dati mostrano un aumento di espressione di Fox-p3 nei topi co-trattati con TB4.

TABELLA 1

		5	10	15	20	25	30	35	40
	Helix.....				G-actin binding	Helix.....	
Tβ ₄	ac -SDKP	DMAEI	EKFDK	SKLKK	TETQE	KNPLP	SKETI	EQEKQ	AGES
Tβ ₄ ^{Ala}	ac -ADKP	DMAEI	EKFDK	SKLKK	TETQE	KNPLP	SKETI	EQEKQ	AGES
Tβ ₄ ^{Xen}	ac -SDKP	DMAEI	EKFDK	AKLKK	TETQE	KNPLP	SKETI	EQEKQ	STES
Tβ ₉	ac -ADKP	DLGEI	NSFDK	AKLKK	TETQE	KNTLP	TKETI	EQEKQ	AK
Tβ ₉ ^{Met}	ac -ADKP	DMGEI	NSFDK	AKLKK	TETQE	KNTLP	TKETI	EQEKQ	AK
Tβ ₁₀	ac -ADKP	DMGEI	ASFDK	AKLKK	TETQE	KNTLP	TKETI	EQEKR	SEIS
Tβ ₁₁	ac -SDKP	NLEEV	ASFDK	TKLKK	TETQE	KNPLP	TKETI	EQEKQ	AS
Tβ ₁₂	ac -SDKP	DLAEV	SNFDK	TKLKK	TETQE	KNPLP	TKETI	EQEKQ	ATA
Tβ ₁₂ ^{perch}	ac -SDKP	DISEV	TSFDK	TKLKK	TETQE	KNPLP	SKETI	EQEKA	AATS
Tβ ₁₃	ac -ADKP	DMGEI	ASFDK	AKLKK	TETQE	KNTLP	TKETI	EQEKQ	AK
Tβ ₁₄	ac -SDKP	DISEV	SSFDK	TKLKK	TETAE	KNTLP	TKETI	EQEKT	A
Tβ ₁₅	ac -SDKP	DLSEV	ETFDK	SKLKK	TNTEE	KNTLP	SKETI	QQEKE	YNQRS
Tβ ^{scallop}	ac -SDKP	DVSEV	ANFDK	SKLKK	TETAE	KNTLP	TKETI	QQEKS	A
Tβ ^{sea urchin}	ac -ADKP	DVSEV	STFDK	SKLKK	TETQE	KNTLP	TKDTI	EQEKQ	G
Tβ ^{zebrafish}	ac -ADKP	NMTEI	TSFDK	SKLRK	TETQE	KNPLP	TKETI	EQERQ	GESTP

Questa Tabella mostra la sequenza aminoacidica delle B-Timosine. La colorazione in grassetto indica i residui aminoacidici altamente conservati in tutti gli esseri viventi. L'uomo sintetizza la TB4, TB10 e TB15. (Huff, T., Muller, C.S.G. *et al.* 2000)