

**UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Dottorato di ricerca in “Sperimentazione tecnologica, immunologica ed immunogenetica: sua applicazione negli xenotrapianti e nei prelievi di organo per trapianto umano” - XXII CICLO

Dott.ssa Agata Spatola

**Studio della funzione del VEGF in modelli sperimentali
di cellule da epatocarcinoma umano e possibili interventi
terapeutici nel processo di rigenerazione epatica**

TESI DI DOTTORATO

Tutor:
Prof. S. Travali

Coordinatore:
Prof.G.Vadalà

Anno Accademico 2010/2011

Il danno epatico è la conseguenza dell'azione di diversi agenti che causano epatotossicità con meccanismi che sono ancora oggetto di studio. Esso si può manifestare in vari modi, in base al tipo di agente tossico, alla gravità dell'intossicazione, al tipo di esposizione (acuta o cronica) etc... Pertanto si può presentare sottoforma di:

- steatosi (accumulo di grassi negli epatociti)
- necrosi (processo degenerativo che porta a morte cellulare)
- apoptosi (morte cellulare geneticamente programmata)
- colestasi (blocco del flusso biliare a livello intra o extraepatico)
- cirrosi (fibrosi progressiva e ingravescente che sostituisce il tessuto epatico)
- epatite (processo infiammatorio del tessuto epatico)
- stress ossidativo (alterato equilibrio tra agenti ossidanti e antiossidanti con conseguente ossidazione di diverse molecole quali DNA, RNA, proteine e lipidi)
- epatocarcinoma (HCC)

Per quanto riguarda l'epatocarcinoma, esso è il quinto tumore più diffuso al mondo. La più alta incidenza si ha in Asia e Africa ma vi è un incremento in occidente per l'aumento di casi di epatite virale e etilismo cronico.

Nei soggetti colpiti da questa neoplasia, sono state trovate diverse

anomalie molecolari, quali l'attivazione della via di segnale AKT e la disregolazione di geni oncosoppressori come la p53 (proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi, ma anche nei processi di differenziazione cellulare) che, comunque, appare mutata in oltre il 50% di neoplasie.

È stata anche dimostrata una sovra espressione dei recettori ad attività tirosin chinasi ERBB (che consta di 4 membri coinvolti in diverse neoplasie): la sovraespressione di ERBB1 e ERBB3 è connessa a una maggiore aggressività dell'HCC. Infine sono stati oggetto di studio anche i recettori Notch, che normalmente sono coinvolti nella proliferazione nel differenziamento e nell'apoptosi e che sono alterati nelle neoplasie umane. Nell'uomo i geni Notch codificano per quattro recettori transmembrana: Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4 caratterizzati da una elevata omologia strutturale. Da alcuni esperimenti si è visto che vi è una iper-espressione del Notch3 nel 75% degli HCC mentre il Notch1 e Notch4 risultano espressi allo stesso modo sia nell'epatocarcinoma che nel tessuto non neoplastico.

In pratica sono diversi i segnali molecolari che intervengono nel processo di cancerogenesi e che sono coinvolti nel delicato equilibrio che intercorre tra la sopravvivenza e la morte delle cellule. Un'alterazione di questo equilibrio dà origine alla trasformazione neoplastica (figura 1).

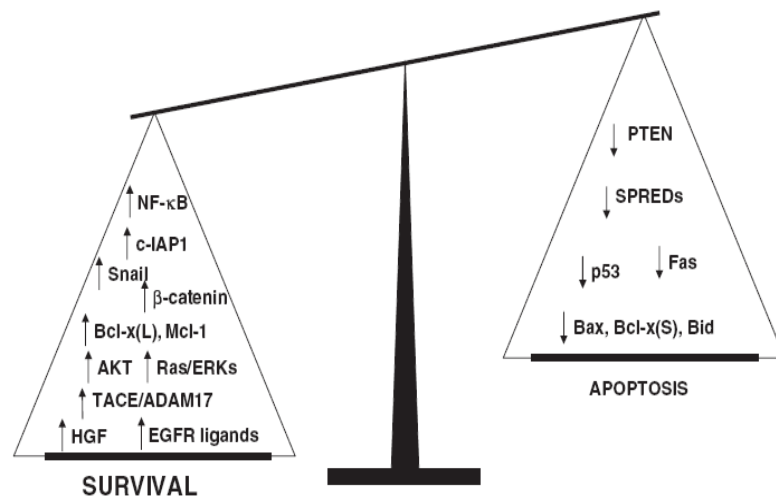


Fig.1 Sregolazione del bilancio in favore di segnali antiapoptotici nel carcinoma epatocellulare.

Tratto da Fabregat I., Roncero C., Fernandez M., Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer, Liver International ISSN 1478-3223, 2007

La cirrosi è un'altra forma di danno che può essere conseguente a diverse cause (infezione virale, alcolismo, morbo di wilson, malattie autoimmuni, forme criptogenetiche, sindrome di budd-chiari, forme iatrogene, emocromatosi, etc..): essa è data da un aumento del tessuto connettivo e dalla formazione di aree nodulari prodottesi in seguito a fenomeni di rigenerazione epatocitaria.

I fattori cirrogeneri agiscono provocando dapprima degenerazione e poi

necrosi dell'epatocita. La necrosi attiva la proliferazione dei fibroblasti del fegato con conseguente produzione di collagene. Esso, circondando i lobuli epatici, li comprime e finisce per causare ulteriore morte epatocitaria. Gli epatociti a questo punto iniziano a proliferare dando avvio al processo di rigenerazione che, però, è caratterizzato dalla formazione di strutture lobulari anomale (pseudolobuli).

Le cause più frequenti di epatotossicità sono la somministrazione di farmaci, le infezioni virali e l'abuso di alcool .

Danno epatico da farmaci

Per quanto riguarda il danno epatico da farmaci il fegato è facilmente interessato dalla loro azione tossica sia perché è il primo organo cui afferiscono le varie sostanze ingerite, sia in quanto ricco di enzimi di varia natura che metabolizzano tali sostanze. L'epatotossicità da farmaci, che può manifestarsi in forma lieve come pure sottoforma di necrosi tissutale massiva, vede coinvolto il sistema del citocromo P 450 che trasforma molte sostanze lipofile in idrofile, cioè in sostanze capaci di provocare tossicità nel tessuto epatico.

Il danno da farmaci coinvolge non solo gli epatociti ma anche le

cellule di Kupffer, le cellule endoteliali dei sinusoidi epatici e i colangiociti (per esempio alcune sostanze farmacologiche determinano ostruzione dei dotti biliari con conseguente colestasi). Poiché il danno epatico è causato non tanto dai farmaci in sé quanto dai loro metaboliti, gli studi sono stati incentrati sui meccanismi di azione delle vie metaboliche coinvolte e sui fattori che ne influenzano l'attività. In ogni modo perché il danno abbia luogo è necessario che intervengano diversi fattori, dipendenti o indipendenti dal soggetto. Fattori di rischio per l'insorgenza di un danno epatico da farmaci sono rappresentati da:

- preesistente patologia epatica: le infezioni virali possono influire sulla capacità di alcuni farmaci di provocare danno al fegato: un esempio è la tossicità epatica causata dalla isoniazide, che colpisce più frequentemente i soggetti affetti da infezione da HIV o da epatite virale.
- Sesso: in generale le donne sono più suscettibili dell'uomo (es. epatiti da alcol, epatotossicità da isoniazide); ciò fa ritenere che gli ormoni giochino un ruolo importante nella genesi del danno epatico.
- età: nei soggetti anziani il danno epatico da farmaci si presenta più frequentemente e le reazioni sono più gravi; nei bambini il danno è più raro, tranne in quelli che sono in terapia con acido valproico; di

particolare interesse la possibilità di comparsa nel bambino della sindrome di Reye da aspirina, caratterizzata da convulsioni, coma, iperglicemia e steatosi epatica che culmina in insufficienza epatica fulminante;

- fattori genetici: in particolare quelli correlati al citocromo P450 nelle sue diverse isoforme;
- interazioni tra farmaci: soprattutto a livello del metabolismo (ad esempio acido valproico e fenobarbitale o isoniazide e rifampicina);
- patologie concomitanti: ad esempio la presenza di insufficienza renale aumenta il rischio di epatotossicità da tetracicline, oppure il diabete aumenta il rischio di fibrosi epatica da metotrexate;
- alcool: i soggetti che fanno abuso cronico di alcool hanno un maggior rischio di incorrere in un danno epatico da isoniazide, paracetamolo o metotrexate;
- stato nutrizionale: maggior rischio di danno epatico si ha negli obesi (metotrexate, alotano);

A livello cellulare, i meccanismi principali che stanno alla base del danno epatico da farmaci sono la necrosi e l'apoptosi, che a volte possono coesistere, per cui spesso è difficile differenziare questi due

processi. Più raramente il danno tissutale consegue al danno vascolare: questo ad esempio è il caso delle azatiopine o del progesterone che provocano l'occlusione della vena centro lobulare e quindi conseguentemente danno del tessuto epatocitario.

Per quanto riguarda l'apoptosi, essa è la morte cellulare programmata ATP dipendente. I farmaci possono indurre il processo apoptotico secondo due modelli: una via intrinseca e una via estrinseca.

La via intrinseca è innescata da un segnale intracellulare a sua volta attivato direttamente dai metaboliti del farmaco o dal farmaco stesso. Tale processo porta direttamente a un danno a livello dei mitocondri o del nucleo delle cellule e alla induzione dell'espressione della p53.

La via estrinseca vede coinvolti degli antigeni sulla superficie delle cellule epatiche i quali interagiscono con alcune molecole quali TNF α e FAS determinando l'attivazione delle cellule T citotossiche e delle cellule non parenchimali epatiche con rilascio di citochine responsabili dell'espressione di recettori di membrana sugli epatociti. Nel soggetto sano le cellule epatiche sono resistenti alla tossicità mediata dal TNF α poiché vengono prodotte molecole ad attività anti-apoptotica che impediscono che ciò si verifichi.

Entrambe le vie portano, infine, all'attivazione di caspasi e nucleasi.

Il processo di necrosi indotto dai farmaci, invece, è caratterizzato da

una deplezione di ATP e da alterazioni del citoscheletro delle cellule con rigonfiamento di queste ultime e che porterà ad un'alterazione del gradiente elettrico cellulare. In pratica, quando il farmaco raggiunge il fegato viene ossidato dagli enzimi del citocromo P450 e vengono rilasciati diversi metaboliti che causano l'ossidazione di lipidi e proteine. Si ha così un'attivazione dei polimorfonucleati e delle cellule di Kupffer con il rilascio di ROS (radicali dell'ossigeno) . Da qui si avrà tutta una serie di alterazioni della cellula che causerà infine la sua morte.

Per quanto riguarda, più in particolare, il ruolo delle cellule epatiche non parenchimali nei processi di danno epatico indotto da farmaci, la loro partecipazione dipende dalla dose del farmaco stesso ma anche dai suoi metaboliti e dalla tensione parziale di O₂ a livello locale.

Tra le cellule non parenchimali coinvolte nel danno epatico, vi sono le cellule di Kupffer e quelle dei sinusoidi che possono essere attivate da fattori chemiotattici (come il leucotriene B₄) rilasciati dalle cellule epatocitarie lese dal farmaco.

Strutture cellulari particolarmente coinvolte dal danno epatico indotto da farmaci sono i microsomi. Il sistema microsomiale contiene il sistema del CYP 450 che determina la biotrasformazione dei farmaci e questa tappa è fondamentale perchè si eviti l'accumulo di sostanze

tossiche all'interno delle cellule. In pratica, il CYP 450 è il maggiore protagonista della detossificazione dell'organismo in quanto agisce su molti substrati, oltre che farmacologici anche endogeni. Gli enzimi di tale sistema possono essere disattivati da ROS a loro volta prodotti in seguito a insulto farmacologico. L'efficienza del sistema microsomiale dipende dall'età del soggetto, da concomitanti patologie epatiche, da varianti genetiche (acetilatori lenti e veloci) e dalla presenza di O₂.

Altri elementi interessati dal danno da farmaci, sia che si tratti di necrosi che di apoptosi, sono i mitocondri che hanno un ruolo molto importante in diversi processi metabolici. Le alterazioni causate dai farmaci a livello mitocondriale consistono nella riduzione di GSH, nell'alchilazione delle proteine e in altre alterazioni che costituiscono le tappe iniziali del processo di epatotossicità.

Attraverso la membrana mitocondriale alterata si avrà un rilascio di molecole proteiche e di citocromo c con un'alterazione dell'omeostasi del calcio e un accumulo intracellulare di sodio, eventi che porteranno in definitiva alla morte dell'epatocita. Livelli fisiologici di GSH all'interno dei mitocondri sono fondamentali per proteggere la cellula da ROS e mantenere inalterata la struttura e la funzionalità di membrana.

Da studi fatti sui fegati steatosici si è inoltre evidenziato che

l'attivazione o disattivazione del recettore PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) gioca un ruolo importante sia per il passaggio da una steatosi a una condizione di steatoepatite sia per il funzionamento di particolari vie coinvolte nel metabolismo dei farmaci e può venire attivato da molecole secrete dai macrofagi.

Il coinvolgimento del sistema immunitario nei meccanismi di epatotossicità da farmaci è ben noto: il rilascio di citochine ad opera dei macrofagi e il coinvolgimento delle cellule di Kupffer sono il primo step del processo flogistico che colpisce il fegato.

Le cellule presentanti l'antigene nel tessuto epatico possono processare le molecole del farmaco e i loro metaboliti, contribuendo così alla risposta immune.

Anche la presenza di O₂ a livello tissutale influisce sulla tossicità epatica farmaco indotta: si è visto, ad esempio, che l'altotano, in condizioni di bassa tensione di O₂ dà origine a un danno epatico lieve, al contrario in condizione di alta tensione di O₂ può provocare una necrosi epatica massiva.

Questo è spiegato dal fatto che i metaboliti del farmaco subendo un processo di ossidazione in presenza di O₂ acquistano un più alto potere immunogeno.

Alcuni farmaci tuttavia agiscono determinando un danno epatico con

meccanismo diretto, senza il coinvolgimento del sistema immunitario. Questo è l'esempio del paracetamolo che, se somministrato ad alti dosaggi, dà origine a un danno diretto acuto e grave. Questa molecola è prevalentemente metabolizzata mediante coniugazione con sulfato e glucuronide e solo in minima parte subisce la degradazione ad opera del CYP2E1 che lo trasforma nel suo metabolita NAPQI il quale si lega al GSH perdendo, così la sua tossicità.

Ma se le concentrazioni di farmaco sono elevate o se c'è meno GSH disponibile oppure se aumenta la funzionalità del CYP 2 E1, il NAPQI si lega alle molecole proteiche della cellula portando a tutta una serie di eventi (alterazione della distribuzione intracellulare di calcio, alterazioni nella permeabilità di membrana, riduzione della sintesi di ATP etc...) che determineranno in definitiva la morte cellulare .

Danno epatico da virus

Diversi virus possono agire sul fegato determinando epatotossicità sottoforma di un processo infiammatorio (epatite) o degenerativo (cirrosi) oppure neoplastico (epatocarcinoma).

Per quanto riguarda il carcinoma epatocellulare, il virus dell'epatite B (HBV) gioca un ruolo molto importante nel suo sviluppo. Tale virus

appartiene alla famiglia degli Hepadnaviridae, ed è caratterizzato da un piccolo genoma circolare a doppio filamento di DNA. La particella virale è costituita da una parte interna detta core, che contiene il DNA del virus e gli antigeni HBc ed HBe, ed un rivestimento esterno, l'envelope, in cui si trova l'antigene di superficie HBs. La neoplasia compare dopo un periodo di 15-30 anni di infezione cronica da HBV, generalmente (ma non sempre) su tessuto cirrotico. Il virus ha un ruolo indiretto, in quanto agisce come promotore di flogosi cronica immuno-mediata, ma lo sviluppo del cancro è la conseguenza anche di meccanismi diretti, come dimostra il ruolo di proteine del virus e l'integrazione del materiale genetico virale nel genoma della cellula infetta.

Il virus dell'epatite C (HCV) è il virus più fortemente correlato allo sviluppo del carcinoma epatocellulare. Esso appartiene alla famiglia dei flavivirus ed è costituito da un singolo filamento a RNA e da un pericapside. I geni del filamento di RNA codificano per una sola lunga molecola proteica che in seguito si frammenta in diverse molecole con varie funzioni. Il virus, una volta penetrato nell'organismo ospite, riconosce l'epatocita grazie a delle strutture glicoproteiche che gli permettono di legarsi alla superficie cellulare e quindi di penetrarvi. Per quanto riguarda i possibili meccanismi di

induzione di HCC da parte del virus HCV si pensa che esso possa agire stimolando costantemente il sistema immunitario.

Inoltre sembrano implicate nei meccanismi di cancerogenesi, due proteine virali: la proteina core e la proteina non strutturale NS5. La prima è connessa a diversi segnali di trasduzione come per esempio: kinasi MAPK e JNK/SAPK e riduce la risposta delle cellule epatiche alla stimolazione da parte del TNF α . La proteina NS5 invece favorisce il perdurare dell'infezione in quanto rende le cellule epatiche insensibili all'azione dell'interferone.

Da alcuni studi effettuati utilizzando la metodica microarray applicata alle cellule tumorali dell'HCC si è visto che alcuni geni implicati nei meccanismi di crescita cellulare sono sovra-espresi (PCNA, alcuni membri della famiglia delle cicline: CDC20, CDK4; Myb) mentre altri subiscono solo un processo di modulazione della loro espressione (per esempio la famiglia delle metallo proteinasi).

Danno epatico da etanolo

L'etanolo agisce sul fegato provocando danno sottoforma di steatosi, di epatite, di cirrosi o di epatocarcinoma. Le alterazioni anatomopatologiche corrispondenti a queste tipologie di danno spesso tendono a sovrapporsi. L'entità e il tipo di danno dipendono da diversi

fattori come la durata dell'abuso, la quantità ingerita, le caratteristiche genetiche del soggetto. La steatosi generalmente è la forma più precoce di danno ed è caratterizzata da un aumento di volume del fegato per aumento di grasso. Gli epatociti appaiono rigonfi e tendono a subire un processo degenerativo. L'epatite alcolica, condizione caratterizzata da diffusa necrosi tissutale, viene spesso considerata una fase intermedia tra la steatosi e la cirrosi alcolica (sebbene quest'ultima possa manifestarsi come tale). Dal punto di vista cellulare e molecolare, diversi studi effettuati in vitro su modelli sperimentali di cellule epatiche normali e di cellule di epatocarcinoma umano (HepG2), hanno evidenziato come l'esposizione acuta da etanolo, sia negli epatociti che a livello delle cellule tumorali epatiche, provochi morte delle cellule, agendo con meccanismi diversi a seconda delle concentrazioni. L'etanolo ad alte concentrazioni, infatti, agisce con meccanismi diretti e indiretti aventi come effetto prevalente quello della necrosi cellulare. Esso altera direttamente la permeabilità delle membrane delle cellule determinando una denaturazione delle proteine di membrana. La sua azione vede il coinvolgimento di proteine quali il citocromo P4502E1 e la produzione di radicali dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido e il perossido d'idrogeno. Le sue azioni indirette sono

conseguenza del fatto che, una volta all'interno delle cellule esso viene convertito ad acetaldeide grazie al sistema MEOS e alla presenza di ADH (alcol deidrogenasi) con un conseguente aumento di NADH. La molecola dell'acetaldeide è più tossica dell'etanolo in quanto determina alterazioni mitocondriali, accumulo di proteine all'interno delle cellule epatiche e rigonfiamento di queste ultime; Inoltre riduce la concentrazione di glutatione rendendo le membrane cellulari più sensibili alla perossidazione lipidica. D'altra parte, nelle cellule HepG2, così come nei normali epatociti, è stato dimostrato che l'EtOH, a basse concentrazioni attiva la via apoptotica FAS: l'attivazione del recettore FAS determina, a sua volta, l'attivazione della proteina intracellulare FADD (FAS associated death domain) e della caspase 8, molecola fondamentale per il processo apoptotico. Si deduce, quindi, che a livello epatico, l'etanolo, sia a basse che ad alte concentrazioni, causa in definitiva la morte cellulare.

Rigenerazione epatica

La rigenerazione del tessuto epatico è caratterizzata principalmente da una iperplasia attuata dal fegato per compensare la perdita della massa originaria. A differenza degli altri organi, il fegato ha un'ottima capacità rigenerativa, infatti gli epatociti vanno incontro a pronta proliferazione in risposta a vari fattori di crescita presenti in circolo o rilasciati dallo stesso fegato, se sottoposto ad insulti di diverso tipo come quelli appena descritti ma anche di natura traumatica o chirurgica. Tuttavia la capacità rigenerativa epatica dipende anche dallo stato del tessuto rimanente in quanto patologie croniche possono comprometterne il processo.

I meccanismi non sono del tutto noti, però diverse molecole intervengono nel processo rigenerativo. Per esempio si è visto che l'ATP extracellulare (rilasciato, in seguito a epatectomia, dai lisosomi degli epatociti e dalle cellule di kupffer) svolge un ruolo molto importante nelle fasi iniziali di rigenerazione. Altri fattori, aventi un ruolo comitogeno nel processo rigenerativo sono per esempio alcuni ormoni, quali il glucagone, l'insulina e gli estrogeni.

È stato evidenziato in modelli sperimentali animali che dopo il 70% di epatectomia parziale il fegato risponde con la proliferazione di epatociti quiescenti e con l'attivazione di alcune molecole ad attività

mitogena; alcune di queste, come il VEGF, hanno attività angiogenica. Il VEGF si reputa che sia il principale fattore ad intervenire nel processo di ripristino della struttura sinusoidale durante il processo di rigenerazione. Alla proliferazione epatocitaria si affianca infatti la differenziazione e proliferazione di altri tipi di cellule epatiche e cioè delle LSECs (cellule endoteliali dei sinusoidi epatici), delle HSCs (cellule stellate del fegato) e di altri tipi cellulari richiamati dal midollo. Queste cellule migrano verso le zone di rigenerazione e interagiscono con gli epatociti neoformati contribuendo così al ripristino della massa epatocitaria persa e costituendo la struttura di supporto del parenchima epatico. Dopo circa 6-8 giorni dalla resezione del tessuto epatico, si avrà la neoformazione di sinusoidi funzionanti.

Scopo del Lavoro

La capacità da parte di diversi agenti di provocare epatotossicità con i meccanismi su descritti e la possibilità che ha il tessuto epatico di rispondere a questi insulti innescando un meccanismo di rigenerazione grazie alla proliferazione epatocitaria e alla neovascolarizzazione, ci ha suggerito di approfondire alcuni aspetti molecolari che stanno alla base del danno e della rigenerazione, in modo da poter contribuire ad implementare le conoscenze sul processo di riparazione epatica. Già diversi studi si stanno portando avanti per bloccare l'azione di fattori che stanno alla base del danno epatico, agendo ad esempio a livello mitocondriale o microsomiale. Altre strategie sono invece dirette a sfruttare la capacità dei fattori di crescita di stimolare il processo rigenerativo del fegato. Nella rigenerazione la neovascolarizzazione è un processo fondamentale che si affianca a quello della proliferazione epatocitaria. La possibilità di agire sulle basi molecolari che permettono la rigenerazione del tessuto epatico può essere d'aiuto nella terapia di alcune patologie e può aprire un nuovo capitolo per la cura di quelle epatopatie, talvolta reversibili, altre volte irreversibili, che si presentano frequentemente al cospetto del medico.

Poiché dai modelli sperimentali in vivo si è evidenziato che il VEGF,

oltre a giocare un ruolo di fondamentale importanza nella formazione dei sinusoidi epatici, interviene nella proliferazione degli epatociti, con un meccanismo mediato dalle cellule di natura endoteliale, abbiamo scelto quale oggetto di studio questo fattore di crescita e abbiamo visto se la sua capacità di agire su cellule di natura epatica può avvenire anche indipendentemente dalla presenza delle cellule endoteliali. Lavorando in vitro su cellule da epatocarcinoma umano (HepG2), quale modello sperimentale di cellule epatiche, abbiamo valutato se il VEGF potesse svolgere un'azione diretta nei confronti di tali cellule se queste vengono esposte a un agente lesivo, intervenendo nel processo di proliferazione cellulare o agendo come fattore di protezione dagli effetti dell'agente lesivo. Abbiamo, quindi, esteso il nostro lavoro valutando il comportamento delle HepG2 in vitro, in presenza di cellule endoteliali. Abbiamo anche studiato l'espressione di alcune famiglie di geni implicate nei principali processi cellulari, utilizzando quale modello sperimentale cellule di natura epiteliale quali le HUVEC trattate con VEGF e le HepG2 trattate con diverse sostanze epatotossiche. Ci siamo, infine, soffermati sullo studio delle variazioni dell'espressione di geni che a nostro avviso possono rivelarsi dei punti chiave nei processi di rigenerazione epatica. Nella fattispecie il gene che ha attirato più la nostra attenzione è quello che

codifica per la molecola smp30, che potrebbe svolgere, a nostro avviso, un ruolo importante nella riparazione del danno epatico. La serie di informazioni che questi tipo di esperimenti ci fornisce, può rivelarsi utile per potere agire a livello molecolare e intervenire stimolando e potenziando i processi rigenerativi del fegato.

VEGF

Col termine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) si indica una famiglia di fattori di crescita degli endoteli vascolari. A questa famiglia appartengono diverse proteine note come: PIGF (placental growth factor), VEGF-A (o VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. Sono stati identificati tre tipi di recettori per il VEGF: il VEGFR-1 (Flt-1) che lega il VEGF-B, il PIGF ed il VEGF-A ; il VEGFR-2 (Flk-1) che lega il VEGF-A il VEGF- E ed anche, ma in maniera più blanda, il VEGF-C; ed il VEGFR3 (Flt-4) che lega i VEGF-C e -D . Il legame del VEGF ai suoi recettori ne induce la dimerizzazione e la fosforilazione della regione intracellulare. In figura 2 e 3 e 4 è riassunto il ruolo fisiologico dei VEGF finora noti e i recettori con i quali interagiscono nonché la loro struttura.

TIPO	FUNZIONE	RECETTORE
VEGF-A Isoforme: VEGF121, VEGF165	Vasculogenesi, neo-angiogenesi, chemiotassi, vasodilatazione	VEGFR-1 VEGFR-2
VEGF-B	Vasculogenesi embrionale	VEGFR-1
VEGF-C	Linfangiogenesi	VEGFR-2 VEGFR-3
VEGF-D	Vasculogenesi e linfangiogenesi	VEGFR-2 VEGFR-3

figura 2

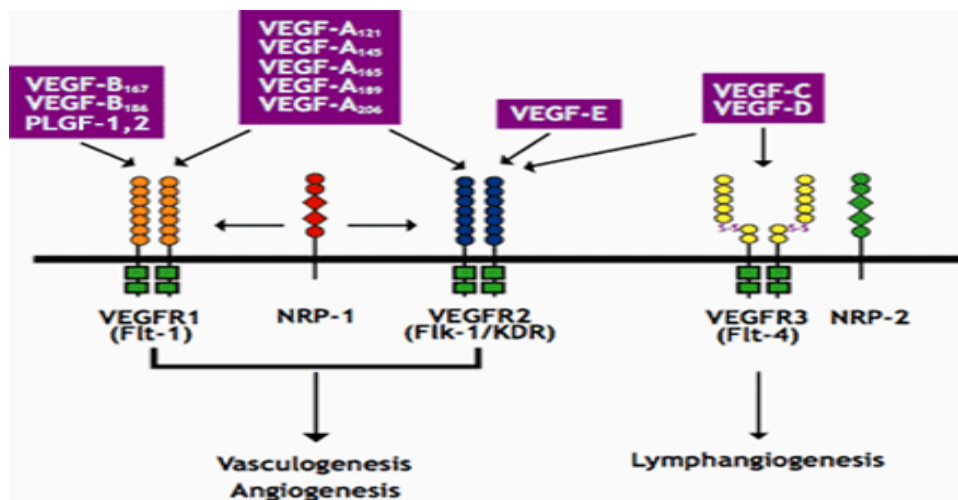
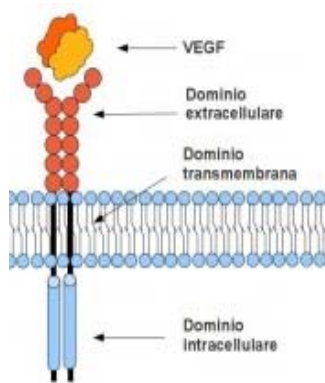


figura 3



(figura 4: struttura del recettore del VEGF)

La sintesi del VEGF nel soggetto adulto sano è molto ridotta, mentre essa è elevata durante le fasi di crescita embrionale, durante i processi di guarigione delle ferite, nell'accrescimento dei tumori e in tutte quelle condizioni in cui si instaura a livello tissutale uno stato di ipossia. Infatti tra i fattori che intervengono nel processo di attivazione genica del VEGF, l'ipossia ha un ruolo molto rilevante, avendo la capacità, in vitro come in vivo, di determinare un incremento dell'RNA messaggero del VEGF. Tale processo si verifica grazie all'adenosina, che determina un aumento di cAMP intracellulare e grazie al fattore di trascrizione eterodimerico HIF-1 (hypoxia inducible factor) che si lega alla regione promotrice del gene del VEGF. Il fattore HIF-1 attiva anche il TGF α e l'IGF2 e il legame di queste 2

molecole coi loro rispettivi recettori determina una serie di eventi che portano ad una sovra espressione dell'HIF1 con conseguente proliferazione delle cellule esposte a ipossia. Quest'ultima, se da una parte avvia quei processi di adattamento delle cellule alla situazione di carenza di ossigeno, dall'altra può provocare la genesi di fenomeni neoplastici, se interviene una disregolazione nei meccanismi coinvolti. Un altro fattore che causa un aumento dell'mRNA del VEGF è il calo di glucosio, e ciò fa ritenere che, in generale, le condizioni di stress possano avere un ruolo nel suo incremento.

Anche alcune citochine hanno la capacità di aumentare la sintesi di mRNA del VEGF, ad esempio l'IL1, il TGF-a e TGF-b e la prostaglandina E2 , così come l'attivazione delle proteine kinasi C ed A, dell'oncogene ras e di v-raf o v-sc, e le proteine che regolano il ciclo cellulare quali la p53.

Anche per i recettori del VEGF è oggetto di studio la possibilità che la loro espressione sia stimolata da una condizione di ipossia, probabilmente con meccanismo indiretto, cioè mediato da una molecola rilasciata dal tessuto ipossico, ma ancora non nota.

Ruolo del VEGF nell' angiogenesi

Il VEGF è riconosciuto quale regolatore fondamentale dell'angiogenesi fisiologica e patologica nei diversi organi, come il fegato, il sistema nervoso, la milza, il rene e l'ovaio. L'angiogenesi è il principale meccanismo grazie al quale si ha la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti ed è essenziale per l'equilibrio omeostatico che favorisce gli scambi gassosi a livello tissutale. Il processo di angiogenesi è regolato da diverse famiglie di molecole: dalla famiglia del VEGF e dalle integrine, dalla famiglia delle angiopoietine e delle efrine, da fattori di crescita pleiotropici (PDGF, interleuchine etc...), da recettori cellulari per le integrine, da metallo proteinasi e da molecole proteiche di adesione cellulare della matrice extracellulare. L'angiogenesi si divide in alcune fasi caratterizzate da programmi genetici diversi:

- reclutamento e differenziazione delle cellule progenitrici di quelle endoteliali da parte di alcuni fattori quali il VEGF,citochine etc...
- coinvolgimento dei componenti della matrice extracellulare quali la fibronectina, il collagene etc...;
- proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali

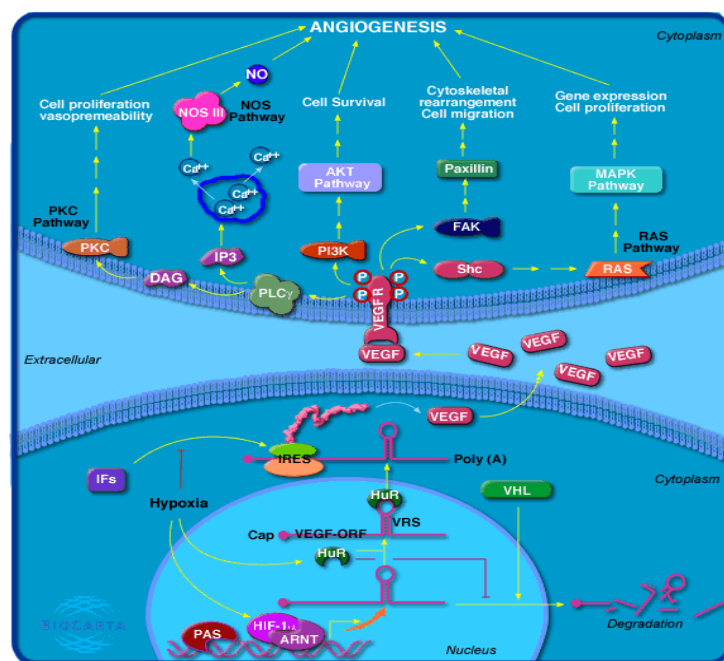
-differenziazione delle cellule endoteliali con formazione delle nuove strutture capillari;

-reclutamento dei periciti e delle cellule della muscolatura liscia verso i vasi in formazione;

-stabilizzazione dei vasi neoformati;

Grazie ai fattori angiogenici come, appunto, il VEGF, le cellule endoteliali rilasciano degli enzimi proteolitici che hanno la funzione di degradare la membrana basale dei capillari esistenti e, grazie a particolari integrine, si ha la migrazione delle cellule endoteliali attraverso lo stroma fino a giungere nel luogo in cui si deve verificare la neoangiogenesi. Inoltre il VEGF induce un aumento della permeabilità vascolare permettendo così gli scambi di metaboliti tra il tessuto e il sangue. Infatti i segnali molecolari mediati dal recettore del VEGF, il FLK1, promuovono la fosforilazione del VE-Cadh (vascular endothelial cadherin) che, legandosi all'actina del citoscheletro delle cellule endoteliali, amplia le giunzioni intercellulari, passo fondamentale per la comunicazione tra il sangue e i tessuti.

Un ruolo importante nei meccanismi di angiogenesi è anche quello dell'Ang-1(angiotensina 1) che ha la funzione di potenziare gli effetti degli altri fattori ad attività angiogenica, in special modo del VEGF. L'Ang-1 da sola non è in grado di promuovere la proliferazione delle cellule degli endoteli ma agisce dopo che il processo è iniziato.



(Angiogenesi)

Ruolo del VEGF nell'angiogenesi Tumorale

La neovascolarizzazione che si viene ad instaurare nelle neoplasie, è una condizione indispensabile affinché il tumore si accresca. Nel caso dell'epatocarcinoma, il processo neoangiogenetico è molto marcato, infatti tale tumore è riccamente vascolarizzato.

La neovascolarizzazione nell'HCC ha le stesse caratteristiche di quella che si evidenzia in altri tumori: essa vede il coinvolgimento di fattori di crescita prodotti dalle stesse cellule neoplastiche che stimolano la proliferazione delle cellule stromali endoteliali e dei macrofagi. Questi ultimi tipi cellulari possono, comunque, intervenire sulla crescita del tessuto tumorale, producendo essi stessi citochine e altri fattori. Il VEGF ha una importanza fondamentale nel processo della neovascolarizzazione nei tumori: si ritiene che in un primo momento, nel tessuto tumorale vi sia una regressione vascolare seguita da un potente meccanismo di neovascolarizzazione a livello della periferia del tumore. Questa seconda fase sarebbe, appunto, mediata dall'azione del VEGF, che, però, agisce insieme ad altre molecole.

Quindi il VEGF ha un ruolo fondamentale sia nell'angiogenesi associata a neoplasie che in quella fisiologica, le quali vedono anche l'impegno di altre molecole: nell'angiogenesi fisiologica giocano un ruolo importante le angiopoietine 1 e 2 (l'Ang 2 ha un'azione antagonista rispetto all'Ang 1) e il recettore Tie 2 (recettore dell'Ang 2 ad attività tirosin chinastica), invece nell'angiogenesi patologica il punto chiave è l'alterato rapporto tra la angiopoietina 2 e la 1 e ciò costituisce un fatto fondamentale affinché il tessuto epatico non cancerogeno vada incontro a trasformazione neoplastica.

Dato il ruolo fondamentale della neoangiogenesi nei tumori, la scienza si è sempre più interessata allo studio di molecole che agiscono inibendo tale processo e quindi che possono avere un'azione antineoplastica, arrestando la crescita della neoplasia. Tra le varie sostanze con questa funzione, vi sono molecole che come meccanismo d'azione hanno quello di inibire la produzione del VEGF, gli anticorpi anti VEGF, etc...(figura 5)

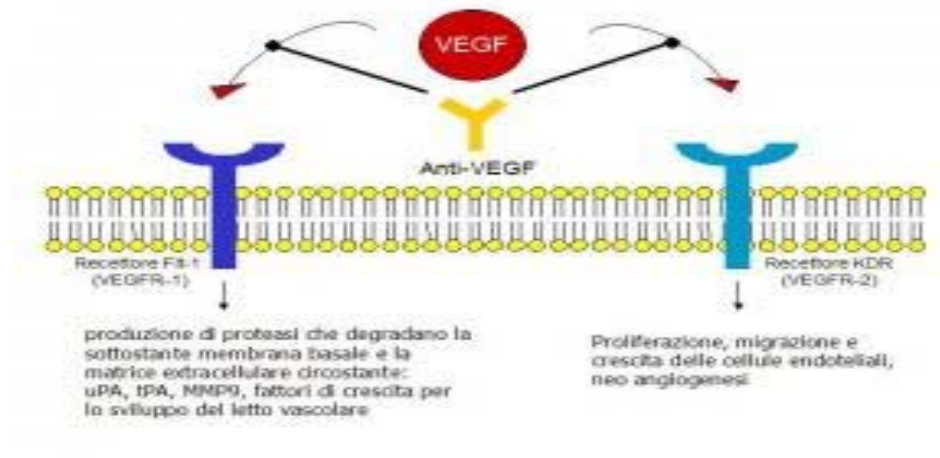


Figura 5

Altri farmaci capaci di inibire il processo di neovascolarizzazione neoplastica sono quelli che agiscono a livello del meccanismo di trasduzione del segnale recettoriale, come ad esempio il SU5416 che, determinando la fosforilazione del recettore FLK1 del VEGF, ne inibisce la funzione. Tale farmaco è in fase di sperimentazione nella cura di alcuni tumori quali il carcinoma del colon-retto e il sarcoma di Kaposi. Così si cerca di introdurre la terapia antiangiogenica nella cura dei tumori, affiancandola alle terapie tradizionali, in modo da aumentarne l'efficacia e ridurre al contempo la tossicità.

Ruolo del VEGF nella neoangiogenesi in patologie non neoplastiche

Date le funzioni del VEGF, negli ultimi anni sono state portate avanti delle ricerche che mirano a bloccarne l'attività anche in quelle malattie non di origine neoplastica, ma in cui la neovascolarizzazione assume un ruolo di prim'ordine come, ad esempio, nella degenerazione maculare senile (MAD). Questa patologia colpisce circa il 10% della popolazione anziana e, in occidente, ne è la principale causa di cecità. Essa consiste essenzialmente nell'invecchiamento della macula retinica e colpisce in prevalenza soggetti di sesso femminile. Esistono due tipi di MAD: secca (più frequente) e umida. Questa seconda forma di MAD è causata da un processo di neovascolarizzazione nella regione sottostante la retina. Purtroppo questa forma è molto grave e porta invariabilmente a cecità anche in tempi rapidi.

Per questo tipo di MAD si stanno portando avanti studi che mettono in primo piano i fattori di crescita, come appunto il VEGF, che ha un ruolo fondamentale nel processo di neoformazione di vasi sanguigni a livello sotto retinico. L'inibizione di tale fattore di crescita permetterebbe l'arresto del processo di neovascolarizzazione e quindi

della MAD. D'altra parte nel trattamento di malattie di natura cardiovascolare che, al contrario traggono beneficio dai processi di neovascolarizzazione, si stanno studiando molecole che mimano in qualche modo l'azione del VEGF. Un esempio è la sintesi di una proteina che riproduce fedelmente la struttura della regione elicoidale 17-25 dell'estremità N-terminale del VEGF. Questa molecola di sintesi ha la capacità di legarsi e di attivare i recettori del VEGF presenti sulle cellule degli endoteli e di intervenire nel processo dell'angiogenesi allo stesso modo del VEGF. Un campo di azione attualmente riconosciuto, di questi analoghi del VEGF, è quello che riguarda il trattamento delle ulcere del piede diabetico.

Ruolo del VEGF nei meccanismi di rigenerazione epatica

Come abbiamo detto è stato dimostrato che, a livello epatico, in modelli sperimentali in vivo, il VEGF gioca un ruolo di primaria importanza nel processo di rigenerazione del fegato, qualora questo subisca un insulto che ne causi la necrosi. Il membro della famiglia di VEGF che è stato più approfonditamente studiato è il VEGF-A. Esso è una glicoproteina omodimerica, in cui gli omodimeri sono legati

covalentemente da due legami disulfide intermolecolare tra C51 e C60. La molecola del VEGFA è codificata da un singolo gene di otto esoni separati da sette introni. Questo gene è localizzato nel braccio corto del cromosoma 6 e subisce degli splicing che danno origine alle diverse isoforme del VEGFA. Quest'ultimo ha una certa omologia col PDGF e, come questo fattore, contiene delle molecole di cisteina che formano legami intra e inter-catena.

Nel fegato il VEGFA si lega a 2 diversi tipi di recettori ad attività tirosin chinasi: l'FLK1(VEGFR2) e l'FLT1(VEGFR1). Ambedue i recettori del VEGF cioè l'FLK1 e FLT1 appartengono alla famiglia delle tirosin chinasi di tipo III, contengono diversi siti di glicosilazione e sono formati da 3 porzioni: una extracellulare, una trans membrana e una intracellulare cui è deputata l'attività tirosin-chinasi.

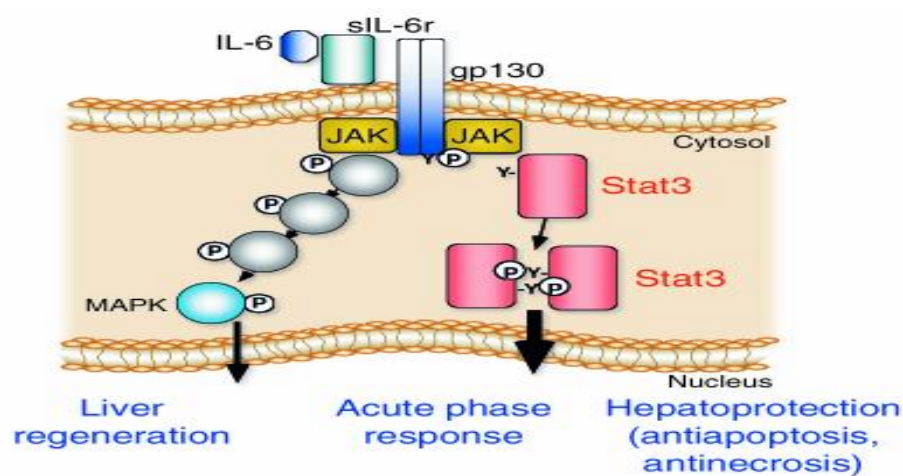
La porzione extracellulare è, a sua volta, formata da sette domini; Studi sull'FLT1 hanno mostrato come la funzione di legarsi al VEGF sia a livello dei primi 3 domini. L'FLK1 e l'FLT1 pur avendo come meccanismo d'azione l'attivazione di 2 distinte vie di trasduzione, hanno un alto grado di omologia.

Il VEGFA favorisce la rigenerazione epatica in vivo determinando direttamente la proliferazione delle cellule dei sinusoidi epatici

(tramite il legame con l' VEGFR2), e promuovendo (tramite il legame con l' VEGFR1), da parte di questi ultimi, la produzione di HGF (fattore di crescita degli epatociti) e IL6 (interleuchina 6), agendo indirettamente sulla proliferazione degli epatociti. In pratica c'è una stretta interazione tra le cellule endoteliali dei sinusoidi e gli epatociti durante il processo di rigenerazione epatica. Questi due tipi di cellule sono intimamente connessi e, quando un insulto patogeno crea un danno epatico, si ha una produzione di VEGFA sia da parte degli epatociti che da parte delle cellule non parenchimali del fegato.

Questa molecola si lega così ai suoi due recettori VEGFR1 e VEGFR2 espressi dalle cellule endoteliali stimolandone la proliferazione e la produzione di HGF e IL6 che poi agiranno sugli epatociti favorendo la rigenerazione del tessuto con un meccanismo indiretto. Per quanto riguarda l'IL 6 questa citochina è prodotta da diversi tipi cellulari, tra cui anche gli epatociti stessi. Esperimenti condotti su topo knock-out sottoposti a resezione parziale di fegato, hanno sottolineato l'importanza dell'IL 6 nel processo di rigenerazione epatica. Questa interleuchina comunque non è sufficiente a gestire l'intero processo in quanto, in sua assenza, la rigenerazione epatica avviene, seppur lentamente. A livello

epatocitario il meccanismo d'azione dell'IL 6 consiste nel suo legame col recettore IL-6R, grazie al quale l'IL6 stimola l'attività tirosin-chinasica della proteina Janus-Chinasi-tipo 1(JAK1).Quest'ultima determina la fosforilazione della proteina gp130 e del fattore di trascrizione STAT3 determinandone la dimerizzazione. Lo STAT3 dimerizzato viene traslocato a livello del nucleo dove attiva dei geni bersaglio, mentre la proteina gp130 attiva le MAP-chinasi(MAPK) che sono tra gli enzimi più rilevanti nel processo di proliferazione cellulare.



Modello di trasduzione del segnale della cascata intracellulare IL-6/Stat3

I processi rigenerativi epatici vedono, accanto al VEGF, l'intervento di un'altra molecola, l'HGF (Hepatocytes Growth Factor) che lavora in sinergia col VEGF. L'HGF è un mitogeno che come abbiamo visto è prodotto dalle cellule endoteliali per azione del VEGF ed è capace di stimolare la proliferazione epatocitaria oltre ad agire assieme al VEGF nella neovascolarizzazione. L'azione sinergica delle 2 molecole a livello degli endoteli provoca un aumento di espressione del gene antiapoptotico Bcl-2.

Esperimenti in vivo hanno dimostrato che l'associazione di questi 2 fattori di crescita aumenta la neoangiogenesi nella cornea dei ratti molto di più di quanto non faccia da sola una delle due molecole. Quindi si può asserire che l'associazione di questi due fattori potrebbe essere un efficace metodo terapeutico nei processi di neoangiogenesi che accompagnano la rigenerazione tissutale.

Per quanto riguarda la relazione che intercorre tra il VEGF e il TNF (tumor necrosis factor) alcuni studi effettuati su cellule di natura endoteliale hanno evidenziato come il TNF inibisca la fosforilazione e l'attivazione del recettore del VEGF, il recettore FLK1, inibendo di fatto la proliferazione delle cellule endoteliali, mediata dall'attivazione di MAPK. Il VEGF è anche un potente attivatore delle

chinasi ERK (extracellular-signal-regulated protein kinases) 1 e 2 tramite il recettore KDR. Queste chinasi giocano un ruolo importante nei processi di angiogenesi e agiscono sulla proliferazione epatocitaria come molecole ad attività antiapoptotica.

Infine un'altra molecola ancora oggetto di studio, e per noi di grande interesse, è la smp 30 (senescence marker protein 30). Il suo meccanismo d'azione è ancora tutt'altro che chiaro, ma si sa che è una proteina implicata nella proliferazione cellulare ed ha diverse funzioni tra cui quella di essere un fattore ad attività antiapoptotica. Alcune ricerche hanno dimostrato che una sua importante funzione è legata alla senescenza delle cellule (non solo a quelle epatiche visto che essa è prodotta anche da molte altre cellule), infatti la sua produzione decresce con l'età. Nell'uomo il gene che la codifica è sul segmento p11.3-q1.2 del cromosoma X. In letteratura è stato riportato che modelli sperimentali di topi smp30 knockout hanno una vita più breve rispetto ai wild type.

Così si è ipotizzato che questi topi mancanti di questa proteina possano essere in qualche modo più suscettibili all'azione dello stress ossidativo che si accumula nel corso della vita e che la proteina in questione abbia il ruolo di proteggere dai fattori che scatenano lo

stress ossidativo nelle cellule.

Inoltre altri esperimenti hanno dimostrato che il fegato di questi topi knockout è più suscettibile all'apoptosi mediata dal TNF rispetto ai topi normali e che vi è a livello epatico un maggiore accumulo di lipidi con una maggiore predisposizione a un danno steatosico.

Di seguito saranno esposti i diversi esperimenti da noi effettuati:

Trattamento delle HepG2 con EtOH

Materiali e metodi

Sono stati allestiti modelli di danno epatico trattando le HepG2 con etanolo (EtOH), quale agente di danno. Come abbiamo precedentemente detto l'etanolo sia negli epatociti che a livello delle cellule tumorali epatiche HepG2, provoca morte delle cellule, agendo con meccanismi diversi a seconda delle concentrazioni.

Per il trattamento delle cellule HepG2 abbiamo utilizzato l'EtOH a tre diverse concentrazioni.

-Colture cellulari: per gli esperimenti descritti, la linea cellulare di epatocarcinoma, HepG2, è stata mantenuta in coltura, con terreno RPMI 1640 (Biochron) contenente il 10% di siero fetale bovino, 2mM

di L-glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 ug/ml di streptomina a 37° C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

-Trattamento con etanolo(EtOH): è stato effettuato un trattamento delle HepG2 a 24 ore con EtOH a tre concentrazioni diverse :100 mM (0.1M) ,0.75 M e 1M

-Valutazione di sopravvivenza cellulare:la valutazione della sopravvivenza delle HepG2 e' stata effettuata tramite saggio colorimetrico con MTT

Dopo essere state risospese nel medium RPMI (Biochrom) le cellule sono state poste in coltura in una piastra da 96 pozzetti (10⁴cellule per pozzetto) e sono state mantenute a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂.

Dopo 24 ore è stato effettuato il trattamento delle cellule con EtOH a concentrazioni pari a 0.1M a 0.75M e a 1M solubilizzato in RPMI .

Quindi, è stata valutata, a 24 ore, la sopravvivenza cellulare usando l'analisi colorimetrica con l' (3-(4,5-dimethylthiazol-2) 2,5 difeniltetrazolium bromide) (MTT) (CHEMICON). Questo metodo è basato sulla capacità cellule vive di ridurre a livello mitocondriale

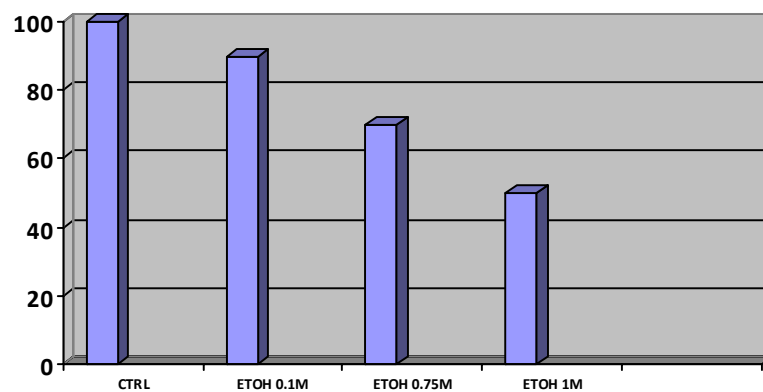
l'MTT in un sale di formazano insolubile. Per liberare e solubilizzare il formazano le cellule, dopo 2 ore di incubazione a 37°C, sono lisate con l'aggiunta della soluzione C (isopropanolo / HCL) facendo virare la soluzione dal giallo al violetto. L'intensità della colorazione della soluzione cellulare è proporzionale alla quantità di formazano prodotto ed è un indice della vitalità cellulare che viene valutata misurando, con un lettore ELISA, la densità ottica (OD) dei campioni alle lunghezze d'onda di 550nm e 630 nm.

Risultati

Usando il test T di Student (significatività del test : $P \leq 0.05$) per calcolare se vi è una necrosi significativa delle HepG2 trattate con EtOH rispetto ai controlli, si è visto che:

- il trattamento con EtOH 0.1M non ha dato una necrosi significativa rispetto ai controlli e la sopravvivenza delle cellule trattate rispetto a questi ultimi è pari al 90%,
- il trattamento con EtOH 0.75 M ha dato una necrosi significativa rispetto ai controlli e la sopravvivenza delle cellule trattate rispetto a questi ultimi è pari a circa il 70 %

- il trattamento con EtOH 1 M ha dato una necrosi significativa rispetto ai controlli, e la sopravvivenza delle cellule trattate rispetto a questi ultimi è pari a circa il 50 % **(grafico 1)**



(Grafico 1)

Trattamento delle HepG2 con EtOH e VEGF:

Si è scelto di proseguire i nostri studi trattando le HepG2 a 24 ore, con EtOH a concentrazione 0.75M e con VEGF (Recombinant Human

Vascular Growth Factor, Invitrogen) a concentrazione pari a :

15ng/100 μ l

30ng/100 μ l

45ng/100 μ l

Materiali e metodi

Dopo essere state risospese in RPMI le cellule sono state piastrate in multiwells da 96 pozzetti (10^4 cellule per pozzetto) e incubate a 37°C , ad una percentuale di saturazione di CO_2 del 5%

Dopo 24 ore è stato effettuato il trattamento di un gruppo di cellule (gruppo A) con EtOH a concentrazioni pari a 0,75M (solubilizzato in RPMI).

Un secondo gruppo di cellule (gruppo B) è stato suddiviso a sua volta in 3 gruppi, ciascuno dei quali ha subito un trattamento con VEGF in RPMI, alle concentrazioni su indicate, per poi venire trattato dopo 3 ore con VEGF ed EtOH.

Un terzo gruppo di cellule (gruppo C) è stato suddiviso in 3 gruppi, ciascuno trattato col solo VEGF alle 3 diverse concentrazioni.

Un quarto gruppo di cellule (gruppo D) non è stato trattato (CTRL).

La piastra è stata incubata a 37 gradi, ad una percentuale di saturazione di CO_2 del 5% per 3 ore.

Dopo 3 ore, il medium con solo VEGF è stato sostituito in ciascun

sottogruppo del gruppo B con medium con VEGF alle tre diverse concentrazioni su indicate e EtOH 0,75M (in RPMI).

Risultati

È stata valutata, a 24 ore, la sopravvivenza cellulare con il saggio MTT, precedentemente descritto.

È stato usato il test T di Student (significatività del test : $P < 0.05$) per analizzare se il VEGF alle diverse concentrazioni potesse avere un effetto protettivo sulle cellule HepG2 trattate con EtOH 0.75 M

-Il trattamento delle cellule HepG2 con il solo EtOH 0.75 M ha dato morte statisticamente significativa rispetto ai CTRL, con una percentuale di sopravvivenza, rispetto agli stessi controlli del 72%

-Il trattamento delle cellule HepG2 con l'EtOH 0.75M e VEGF a concentrazione pari a 25ng/100 μ l, 50ng/100 μ l, 75ng/100 μ l ha dato morte statisticamente significativa rispetto ai controlli.

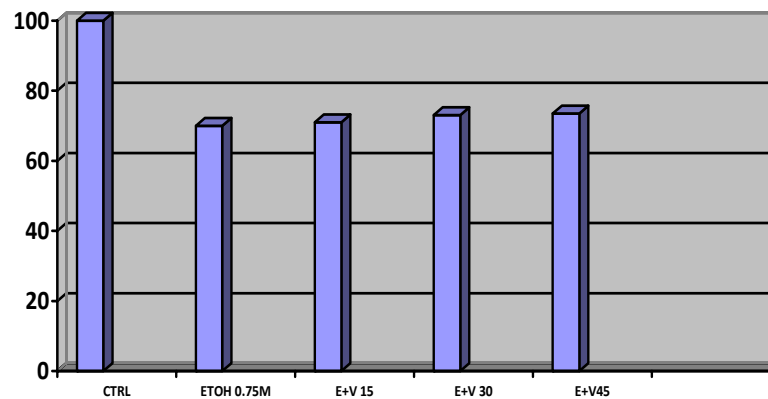
-I risultati ottenuti dalle cellule HepG2 in trattamento con il solo VEGF non sono stati significativi se confrontati coi CTRL in nessuna delle 3 concentrazioni di VEGF usate.

-la percentuale di sopravvivenza delle cellule trattate con EtOH 0.75M e VEGF rispetto ai CTRL è questa (grafico 2):

71% per cellule trattate con VEGF 15 ng/100 μ l ed EtOH 0.75M

73% per cellule trattate con VEGF 30 ng/100 μ l ed EtOH 0.75M

73.5% per cellule trattate con VEGF 45 ng/100 μ l ed EtOH 0.75M



(grafico 2)

È stato osservato, in questo lavoro, che applicando il test T di Student alle cellule trattate solo con EtOH 0,75M rispetto a quelle trattate con VEGF alle 3 diverse concentrazioni in EtOH 0,75M si ottiene un risultato statisticamente non significativo, da cui si deduce che la presenza del VEGF non ha una funzione protettiva sulle cellule.

Trattamento delle HepG2 con surnatante del mezzo di coltura delle cellule HUVEC trattate con VEGF:

Si è proceduto, quindi, all'allestimento di una coltura cellulare in cui le HepG2 sono state trattate col surnatante ottenuto dal mezzo di coltura di particolari cellule di natura endoteliale, le cellule HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) per vedere se tali cellule in qualche modo venissero stimulate dal VEGF a produrre molecole in grado poi di agire sulle HepG2.

Materiali e metodi

Dopo aver sottoposto le cellule HUVEC, disposte in due piastre di coltura, a due diverse concentrazioni di VEGF (15 ng/100 μ l e 45 ng/100 μ l) in RPMI, ne è stato prelevato il surnatante dopo 24 h. Il medium contenente VEGF 15 ng/100 μ l è stato indicato con medium 15 ,quello contenente VEGF 45 ng/100 μ l come medium 45.

Dopo essere state risospese nel medium RPMI le cellule HepG2 sono state piastrate in una piastra da 96 pozzetti (10^4 cellule per pozzetto) e incubate a 37 gradi, ad una percentuale di saturazione di CO₂ del 5%.

Dopo 24 ore un gruppo di HepG2 è stato trattato solo con EtOH 0.75M, un secondo gruppo di cellule solo col medium 15, un terzo

gruppo di HePG2 solo col medium 45, un quarto gruppo di cellule è stato il nostro controllo.

Un quinto gruppo di cellule ha subito un trattamento con EtOH 0.75 M e a 6 h, con medium 15.

Infine un ultimo gruppo cellulare ha subito un trattamento con EtOH 0.75 M e, a 6 h, con medium 45.

Risultati

Per gli esperimenti è stata valutata la sopravvivenza cellulare usando l'MTT dopo 24 ore.

Anche in questo caso il trattamento solo con ETOH 0.75 M ha dato una necrosi significativa rispetto ai controlli confermando i precedenti risultati.

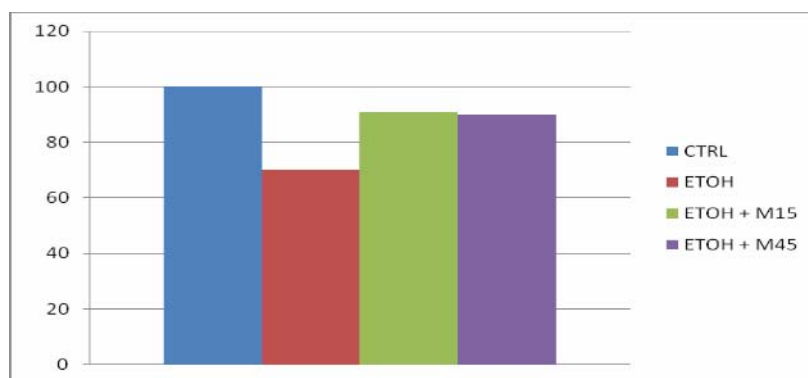
Inoltre, le cellule HepG2 trattate solo con i medium 15 e 45, mostrano un incremento della proliferazione rispetto ai controlli.

Per i gruppi di cellule HepG2 trattate con EtOH 0.75M e successivamente con medium 15 e 45 si è visto che la percentuale di sopravvivenza è in media del 90.5% delle cellule trattate rispetto ai controlli stessi (test non significativo):

-91% medium 15

-90% medium 45

Si rileva una significativa riduzione di sopravvivenza delle HepG2 trattate solo con EtOH rispetto a quelle trattate con EtOH e successivamente con il medium 15 e 45 (Grafico 3).



(grafico 3)

Da questi studi si deduce che il VEGF, in vitro, in assenza di cellule di natura endoteliale, non agisce direttamente sulle HepG2 e quindi che non ha effetti sulla loro proliferazione se esse subiscono l'insulto di sostanze tossiche. Invece il trattamento delle cellule HUVEC con VEGF porta queste cellule a produrre molecole che in qualche modo vanno a stimolare i processi proliferativi delle HepG2 o ne aumentano la resistenza nei confronti dell'azione di sostanze tossiche.

Per approfondire lo studio sulla risposta del fegato ad agenti in grado di provocarne danno si è ritenuto, quindi, opportuno ed interessante

procedere con la valutazione, in modelli sperimentali di cellule HepG2, dell'espressione genica dopo trattamento con sostanze epatotossiche, per vedere se tali sostanze possano modificare l'espressione di famiglie di geni in qualche modo coinvolte nei meccanismi di rigenerazione epatica. In parallelo si è valutata anche l'espressione genica delle cellule HUVEC in trattamento con VEGF; un campione di HepG2 non trattate e uno di HUVEC non trattate sono stati i nostri controlli.

Lo studio in vitro dell'espressione genica di questi due tipi cellulari è stato effettuato tramite microarray. La tecnica del DNA-microarray si basa sullo stesso principio dei protocolli di Southern e Northern blot, per l'analisi di sequenze di DNA e RNA, però, a differenza dei protocolli di blotting, ci permette di analizzare l'espressione contemporanea di migliaia di trascritti in un singolo esperimento. In pratica, con questa tecnica si ha la capacità di sintetizzare brevi sequenze nucleotidiche (sonde) secondo due modalità diverse. Col metodo "*spotting*" le sonde sono sintetizzate a parte e poi depositate su supporto, invece col metodo "*in situ*" la sintesi delle sonde avviene direttamente su una matrice solida. Con queste modalità si ha la produzione dei Chip Array.

Nel caso del metodo in situ, i chip vengono costruiti utilizzando

maschere che controllano il processo di deposizione e sintesi degli oligonucleotidi sul microarray. Tramite l'array abbiamo la possibilità di produrre centinaia di migliaia di oligonucleotidi differenti, ciascuno dei quali presente in milioni di copie sul supporto. I target, ovvero gli acidi nucleici da ibridizzare alle sonde ancorate al supporto solido, sono marcati con fluorofori che permettono di seguire i campioni nelle fasi successive al processo di ibridazione sul vetrino di microarray.

Sonde e target vengono poi messi in contatto per far avvenire la reazione di ibridazione e dopo alcuni lavaggi (in modo da eliminare tutto ciò che si è legato in maniera aspecifica al vetrino microarray) l'array viene scannerizzato per la misurazione della fluorescenza emessa. L'intensità dei pixel delle immagini che si formano è direttamente proporzionale al numero di molecole di acido nucleico che hanno ibridizzato con le sonde ancorate all'array.

I microarray da noi utilizzati sono quelli sviluppati dalla Affymetrix .

Tecnologia Affymetrix GeneChip

Affymetrix sfrutta i principi di fotolitografia per sintetizzare in situ brevi sequenze nucleotidiche (probe) su una matrice solida, per la produzione di gene Chip Array. I chip vengono costruiti utilizzando

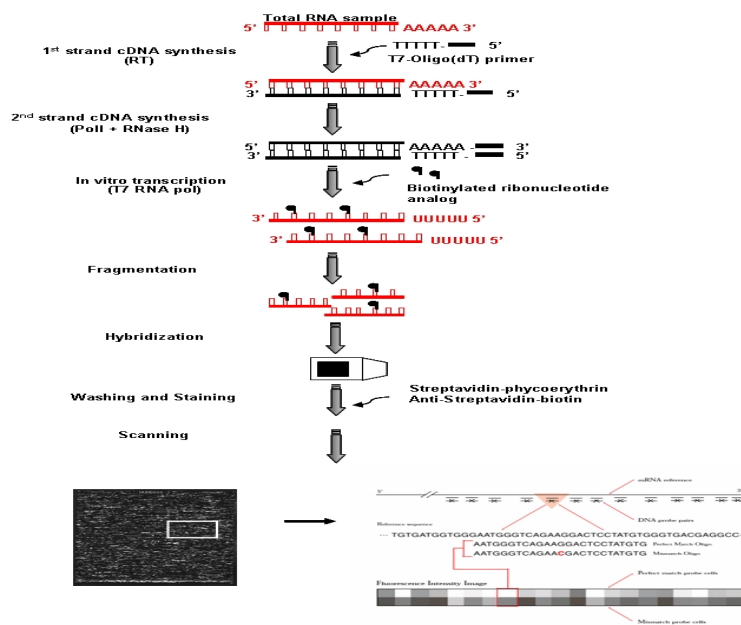
maschere che controllano il processo di deposizione e sintesi degli oligonucleotidi sul microarray.

Con questa tecnica si ottengono degli array ad altissima densità ed è possibile analizzare e confrontare l'espressione di migliaia di sequenze diverse di trascritti umani.

Per ogni gene le sequenze vengono selezionate sugli mRNA a partire dal 3', in regioni che hanno minore omologia con le sequenze degli altri geni. Il microarray è formato da sonde di 25-mer che si appaiono perfettamente con l'mRNA bersaglio (PM) e da sonde identiche alle precedenti, eccetto che per la presenza di un mismatch, in posizione centrale nella sequenza (MM). Quindi, per misurare il cambiamento di espressione di un gene è necessario ottenere un dato cumulativo da tutte le sonde che identificano quel gene. Questo dato cumulativo viene calcolato facendo una media della differenza fra sonde PM e MM. Gli oligonucleotidi nella forma MM servono a mettere in evidenza la presenza di segnali aspecifici e soprattutto per quantificare l'mRNA espresso in maniera debole. Infatti, se questo risultato è negativo o molto piccolo significa che il cDNA bersaglio è assente o che è avvenuta un'ibridazione aspecifica.

Le fasi fondamentali di un esperimento di array sono pertanto:

- Estrazione dell'RNA dal campione;
- Preparazione del target (sintesi del 1° e 2° filamento di cDNA);
- Ibridazione del target al microarray;
- Lavaggi del Probe array e colorazione;
- Scansione del microarray ;
- Analisi dei dati



Descrizione schematica dei passaggi di un esperimento con microarray

Analisi genica in microarray dopo trattamento di HUVEC e HepG2:

Materiali e metodi

-Colture cellulari: Sono stati utilizzati per il nostro studio due tipi cellulari: HepG2 e HUVEC. Sono state allestite 6 piastre di HepG2 e 2 piastre di HUVEC e disposte le cellule in coltura, a una densità cellulare di 10^5 cellule per cm^2 . Le piastre sono state poste in termostato a 37 gradi in atmosfera al 5% di CO_2 , in atmosfera umidificata al 95% per 24 ore prima di essere trattate. Il medium usato è stato l'RPMI. A 24 ore le piastre con HepG2 sono state trattate ciascuna con una specifica sostanza epatotossica, per cui il medium è stato sostituito con l'RPMI contenente la molecola tossica in questione; una piastra di HepG2 è stata il nostro controllo. Invece per quanto riguarda le piastre con le cellule HUVEC, una è stata trattata con VEGF in RPMI, l'altra come piastra di controllo. Qui di seguito sono elencati i composti tossici e le concentrazioni usate per il trattamento delle HepG2:

Etanolo (EtOH)	0.75 M
Allopurinolo	1 mM
Trazodone	1mM
Enapramil	1mM
Flutamide	1mM

Per quanto riguarda le HUVEC, per il trattamento con VEGF abbiamo usato una concentrazione di VEGF pari a 45 ng/100 μ l

Le piastre trattate e quelle di controllo sono state incubate per ulteriori 24 ore. Quindi si è proceduto per ciascuna piastra con il microarray:

-ESTRAZIONE DELL'RNA

L'estrazione dell'RNA totale dalle colture cellulari è stata effettuata usando il Kit PureLink Total RNA (Invitrogen); in seguito l' RNA è stato dosato allo spettrofotometro NanoDrop1000 e la sua integrità verificata usando il bioanalizzatore Agilent 2100.

-PREPARAZIONE DEL TARGET

Per la preparazione del target abbiamo usato 5 ug di RNA per la sintesi one-Cycle del cDNA, in presenza di controlli esogeni positivi (si tratta di Poly-A RNA controllo relativi a geni assenti nelle cellule eucariote e per il monitoraggio del processo di marcatura), dei primer T-Oligo(dT) e H₂O. La reazione così allestita è stata incubata a 70°C per 10', per denaturare le strutture secondarie dell'RNA, e quindi portata a 4°C per 2'.

A questo punto ai campioni è stata aggiunta la Master mix contenente:

-4 μ l di 1° Strand Reaction 5X buffer

-2 μ l DTT 0,1M

-1 μ l di dNTPs, 10mM

la reazione è quindi stata incubata a 42°C per 2' prima dell'aggiunta di 2 μ l dell'enzima SuperScriptII e posta a 42°C per 1 ora.

Per la sintesi del secondo filamento di cDNA al campione precedentemente preparato abbiamo:

- 30 μ l di 5X 2° Strand Buffer,
- 3 μ l dNTPs 10 mM,
- 1 μ l E. coli DNA-ligasi,
- 4 μ l E. coli DNA polimerasi I,
- 1 μ l RNase H
- 91 μ l H₂O

Si è incubato a 16°C per 2 h e a 4°C per 2', quindi si sono aggiunti 2 μ l di DNA polimerasi T4 e si è lasciato a 16°C per 5' per poi procedere con il clean-up dei campioni con lo specifico kit fornito dall'Affymetrix.

-SINTESI DEL cRNA BIOTINILATO, PURIFICAZIONE E FRAMMENTAZIONE

A questo punto si è proceduto alla sintesi del cRNA biotinilato dal cDNA utilizzando l'enzima T7 RNA polimerasi in presenza di biotina-UTP e biotina-CTP in modo da ottenere copie di cRNA marcato. I campioni si son tenuti a 16°C per 4 ore e poi si è proceduto alla loro purificazione tramite apposito kit Affymetrix.

Per una migliore ibridazione dei campioni sull' array si è operato con una frammentazione del cRNA purificato, per produrre frammenti di lunghezza tra 35 e 200 nucleotidi. A tal fine a 20 ug di cRNA biotinilato abbiamo aggiunto il buffer di frammentazione 5X e H₂O fino a 40 µl, e incubato a 94°C per 35'. I campioni sono stati quantizzati allo spettrofotometro e per verificare l'avvenuta frammentazione. un'aliquota del prodotto si è fatta correre su gel di agarosio all'1% in presenza di un'intercalante come il SyberSafe (Invitrogen)

-IBRIDIZZAZIONE DEL TARGET SUL CHIP

Per la preparazione del cocktail di ibridazione a 15 µg di cRNA marcato e frammentato sono stati aggiunti dei controlli di ibridazione e per l'allineamento dell'array, una Hybridization Mix 2X, DMSO e H₂O fino ad un volume di 300 µl. La soluzione è stata riscaldata a 45°C per 5' e caricata sul microarray, che è stato posto nella "hybridization oven", settata a 45°C e messo in rotazione a 60 RPM per 16 ore.

-COLORAZIONE DEL TARGET IBRIDATO E SUCCESSIVI LAVAGGI

La fase di colorazione del CHIP con streptavidina-ficoeritrina (SAPE) e i lavaggi sono stati effettuati nella stazione fluidica 450 Affymetrix. Il processo è durato 1,5 ore.

-SCANSIONE DEI MICROARRAY

Abbiamo acquisito l'immagine del "probe array" con scanner Affymetrix

Gene Chip Scanner 3000; la scansione è avvenuta ad una risoluzione di pixel di 3 μm e ad una lunghezza d'onda del laser di 570 nm

-. ANALISI DEI DATI

L'analisi dell'immagine ha permesso di estrapolare i dati in formato .CEL, corrispondenti al profilo dei trascritti del singolo campione. I dati ottenuti sono stati successivamente analizzati tramite l'utilizzo di un software, il GeneSpring, programma standard per l'analisi di Array.

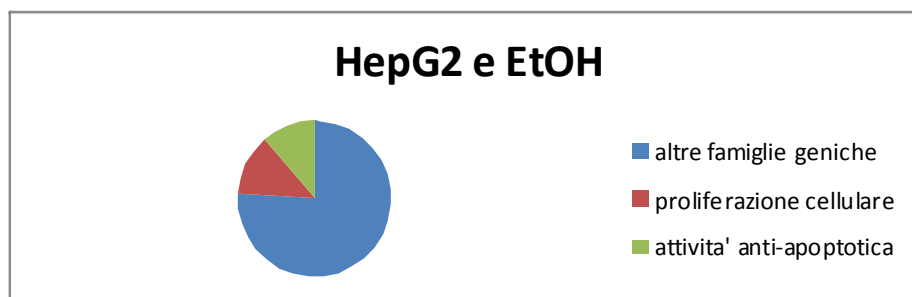
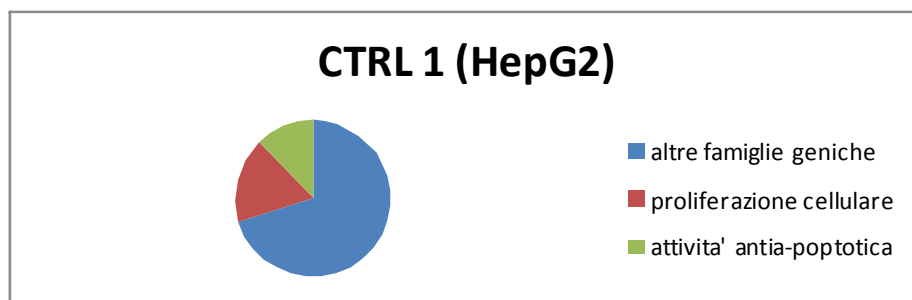
Risultati microarray

I dati attuali in nostro possesso, ottenuti da questi studi, ci fanno ritenere che, nelle HepG2, l'espressione di alcune famiglie di geni coinvolti in specifici processi cellulari possa essere regolata dall'azione di alcune sostanze epatotossiche.

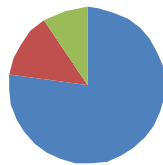
Anche l'espressione genica delle HUVEC subisce variazioni se queste vengono trattate col VEGF. Al momento abbiamo valutato il comportamento solo di alcune famiglie di geni aventi particolari funzioni, quali le famiglie coinvolte in meccanismi anti-apoptosi e quelle coinvolte nella proliferazione cellulare. In particolare abbiamo visto come varia la regolazione di queste famiglie dopo trattamento delle HepG2 con etanolo o con flutamide e delle cellule HUVEC trattate con

VEGF: in quest'ultimo caso abbiamo rilevato come l'espressione genica di queste famiglie subisca un incremento nelle HUVEC trattate con VEGF rispetto alle HUVEC non trattate. Ciò ci porta a ritenere che fattori direttamente implicati in processi rigenerativi e proliferativi cellulari, come il VEGF, possano regolare, aumentandola, l'espressione di quei geni che sono in qualche modo impegnati nella sopravvivenza cellulare.

L'analisi del comportamento delle altre famiglie di geni è ancora in corso, così come le variazioni dell'espressione genica conseguenti alla somministrazione degli altri farmaci su menzionati.

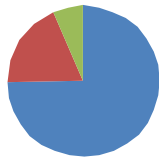


HepG2 e flutamide



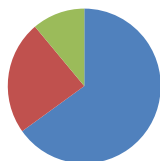
- altre famiglie geniche
- proliferazione cellulare
- attivita' anti-apoptica

CTRL 2 (HUVEC)



- altre famiglie geniche
- proliferazione cellulare
- attivita anti-apoptica

HUVEC e VEGF



- altre famiglie geniche
- proliferazione cellulare
- attivita' anti -apoptica

Se confrontiamo i risultati dell'espressione della famiglia genica coinvolta nella proliferazione cellulare e di quella ad attività anti-apoptotica, vediamo che le HUVEC trattate con VEGF hanno un aumento di espressione di queste famiglie rispetto alle HUVEC di controllo. Ciò sta a significare che vengono prodotti dei fattori di proliferazione delle HUVEC che forse sono gli stessi che determinano una maggiore sopravvivenza delle HepG2 trattate col surnatante delle HUVEC (come è stato visto nel precedente esperimento).

Per quanto riguarda le HepG2, non si vede differenza di espressione delle famiglie geniche che fino ad ora abbiamo potuto analizzare tra le HepG2 trattate con EtOH e quelle trattate con flutamide.

Nell'attesa che vengano effettuate ulteriori analisi dei dati ottenuti, in considerazione di questi primi risultati, abbiamo voluto soffermarci sull'analisi di singoli geni che, a nostro avviso, possono giocare un ruolo importante nei processi rigenerativi epatici, per quanto riguarda la proliferazione endoteliale e/o quella epatocitaria. Dato che dai nostri studi si evince che le famiglie di geni coinvolte nella proliferazione cellulare e nei processi anti-apoptotici, sono maggiormente espresse nelle HUVEC trattate con VEGF rispetto alle HUVEC controllo, abbiamo voluto analizzare più attentamente la proteina smp30 di cui abbiamo già

parlato perchè potrebbe essere un possibile tassello mancante che aggiungerebbe nuove informazioni sui processi rigenerativi del fegato e potrebbe essere un importante punto di partenza per lo studio dei molteplici meccanismi di proliferazione epatocitaria, dipendenti dal VEGF.

Perciò abbiamo allestito un esperimento in PCR real time per studiare la regolazione dell'espressione di questa proteina nelle HUVEC trattate con VEGF rispetto alle HUVEC controllo.

REAL-TIME RT-PCR

La real-time PCR, definita anche PCR quantitativa (QRT-PCR) in tempo reale, è un metodo di amplificazione e quantificazione del DNA. La fluorescenza rappresenta la chiave di tale tecnica, in quanto il suo accumulo è rappresentativo della produzione di ampliconi durante ciascun ciclo di amplificazione.

Registando la quantità di fluorescenza emessa ad ogni ciclo è possibile controllare la PCR durante la fase esponenziale quando il primo significativo aumento di prodotti della PCR è in relazione con la quantità di target iniziale. Ad un maggior numero di copie del gene target all'inizio della reazione corrisponderà un più rapido aumento significativo della fluorescenza. Il numero dei cicli necessari affinché

un campione raggiunga il suo ciclo soglia (Ct) è inversamente proporzionale al numero di copie del target presente inizialmente in ogni campione.

Il vantaggio di questo metodo, rispetto alla PCR tradizionale, è dato dalla possibilità di quantificare il DNA al Ct, che è calcolato nella fase esponenziale della reazione di amplificazione; in questa fase infatti, i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento, gli elementi di variabilità sono ridotti al minimo e la reazione è al massimo della sua efficienza.

I metodi comuni di quantificazione includono l'uso di:

- ~ coloranti intercalanti fluorescenti, come il Sybr-Green, che sono in grado di emettere fluorescenza se legati al DNA a doppia elica ma questo tipo di chimica per sua natura è di tipo aspecifico;
- ~ sonde ad ibridazione, di forma diversa, le quali sono opportunamente modificate per l'inserimento di molecole fluorescenti; questa tipologia di probe permette un'analisi sequenza-specifica.

La real-time PCR sostituisce la PCR tradizionale nella RT-PCR per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA. L'RT-PCR produce del DNA complementare a singolo filamento, detto cDNA,

mantenendo costanti i rapporti relativi di concentrazione tra gli RNA; questo permette di misurare l'espressione del gene di interesse.

Per il nostro esperimento è stato messo a punto un protocollo di Real-Time RT-PCR basato sulle sonde ad ibridazione di tipo Taqman.

La tecnologia TaqMan

La tecnologia TaqMan consente la rilevazione dell'amplificato simultaneamente alla sua amplificazione. È un saggio di amplificazione in cui, grazie al particolare disegno delle sonde marcate con i fluorocromi e allo sfruttamento dell'attività 5'-3' esonucleasica di alcune polimerasi, è possibile produrre durante la PCR un segnale fluorescente con intensità direttamente proporzionale al target di interesse. Più in dettaglio, il saggio TaqMan, oltre ai due primers, utilizza un terzo oligonucleotide complementare a uno dei due filamenti del prodotto da amplificare, il cui scopo è quello di generare un segnale fluorescente ogni volta che viene prodotto un nuovo frammento.

Nel saggio TaqMan una speciale sonda fluorogena complementare alla sequenza del DNA bersaglio compresa tra il "forward" e il "reverse" primer viene aggiunta alla miscela di PCR.

Durante l'amplificazione, alla fase di "annealing", sia i primer che la sonda si ibridano al template e la sonda, essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi. Durante l'estensione del primer, la Taq incontra la sonda ibridata e la idrolizza, ogni qual volta la sonda viene tagliata si libera in soluzione una molecola fluorescente che genera il segnale rivelabile dal detector.

Il saggio TaqMan prevede 4 fasi:

Fase 1 - Polymerization: Due coloranti fluorescenti, un colorante reporter (R) e un colorante quencher (Q), sono legati alle sonde TaqMan .

Fase 2 - Strand Displacement: Quando entrambi i coloranti sono coniugati alla sonda, l'emissione del colorante reporter è bloccata. Si parla di effetto di quenching.

Fase 3 - Cleavage: Durante ogni ciclo di estensione, la Taq polimerasi taglia via il colorante reporter dalla sonda;

Fase 4 - Polymerization completed: Una volta separato dal quencher, il colorante reporter emette la sua caratteristica fluorescenza (vedi figura A).

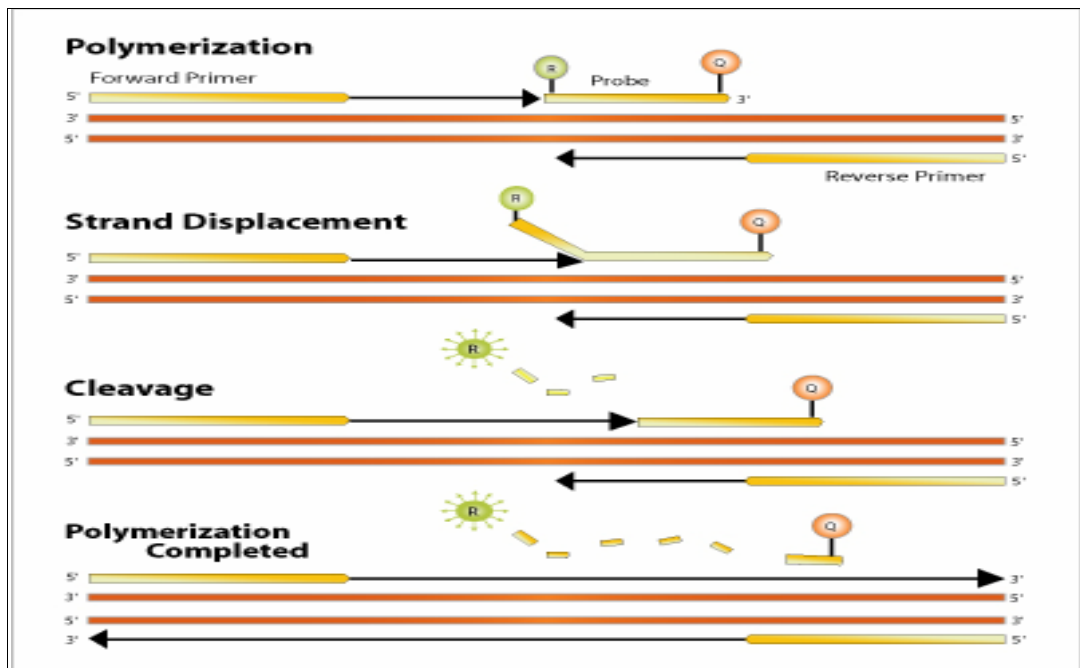


Figura A

La sonda TaqMan e i primers specifici per il gene *smg30* e per la *b-actina*, sono stati disegnati attraverso il programma Primer Express 3 (Applied Biosystems).

Analisi della proteina smp30 con PCR real time nelle HUVEC

Materiali e metodi

Per i nostri esperimenti l'RNA totale è stato estratto dalle colture cellulari di HUVEC trattate per 24 ore con VEGF (45 ng/100 μ l) e da HUVEC controllo, usando il Kit PureLink Total RNA (Invitrogen). In seguito l'RNA è stato dosato allo spettrofotometro NanoDrop1000 e la sua integrità verificata usando il bioanalizzatore Agilent 2100.

Ogni reazione di sintesi del cDNA è stata eseguita a partire da 1 μ g di RNA totale utilizzando il Kit M-MLV cDNA Synthesis (Invitrogen). La reazione è stata effettuata in un volume finale di 20 μ l in accordo con le istruzioni fornite dal kit. La PCR real-time è stata eseguita sullo strumento 7300 dell'Applied Biosystems.

La mix finale di reazione conteneva 5 μ l di cDNA, 900 nM di ciascun primer, 200 nM di probe, master mix buffer 2X, in un volume finale di 50 μ l.

Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato. Come controlli negativi (NTC) sono state eseguite reazioni in cui il cDNA è stato sostituito da un uguale volume di acqua sterile.

La reazione è stata eseguita secondo il seguente profilo termico:

- 2 min a 50°C;
- 2 min a 95°C fase in cui avviene l'attivazione della polimerasi;

- 40 cicli di 15 min a 95°C in cui si ha la denaturazione;
- 1 min a 60°C fase di annealing ed estensione.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA:

I livelli di espressione genica del nostro target sono stati calcolati tramite il metodo comparativo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizzando i livelli di espressione del gene di interesse rispetto al gene housekeeping β -actina, il cui trascritto non varia nelle nostre condizioni sperimentali.

I calcoli consistono nell'eseguire una differenza (ΔC_T) tra i valori del ciclo soglia del target e del normalizzatore:

$$\Delta C_T = C_T (\text{target}) - C_T (\text{normalizzatore})$$

Questa differenza è stata calcolata per ogni campione in esame. Inoltre uno dei campioni è stato scelto come riferimento per gli altri campioni (calibratore). Successivamente è stata calcolata la differenza tra il valore soglia del campione ed il valore soglia del calibratore

$$\Delta C_T = C_T (\text{target o calibratore}) - C_T (\text{normalizzatore})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{target}) - \Delta C_T (\text{calibratore})$$

Quantità relativa del trascritto genico si ottiene applicando la formula 2-

$$\Delta\Delta Ct$$

RISULTATI

I dati Real-Time PCR, ottenuti applicando il metodo comparativo relativo, hanno confermato i risultati dei microarray; infatti, come si può evincere dalle relative curve, i livelli di espressione del gene smp30 aumentano nelle cellule HUVEC dopo trattamento con VEGF (fig. A e B).

Campioni	Ct T	Ct E	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
Huvec	26	27	-1	0	1
Huvec + VEGF	25	27	-2	-1	2

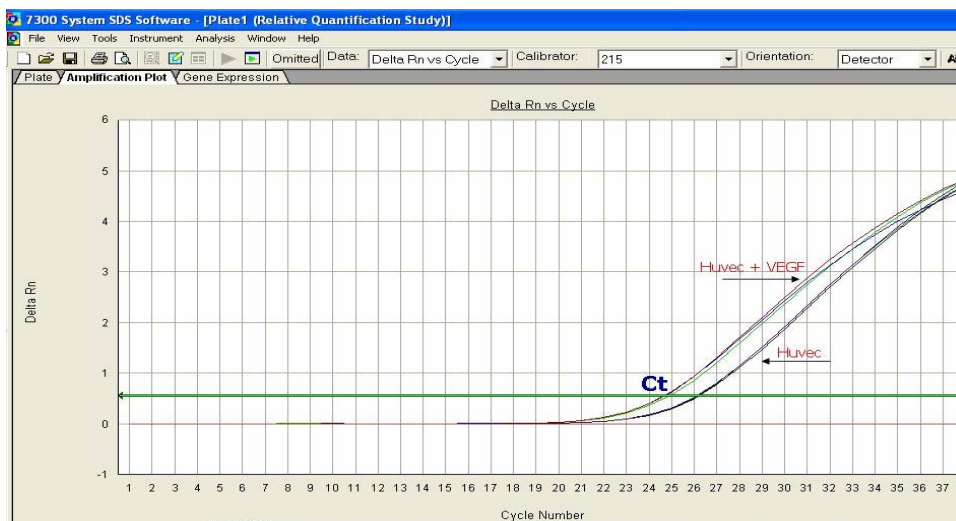


Fig. A: Curva di amplificazione del gene SMP30 nei campioni (Huvec e Huvec + VEGF)

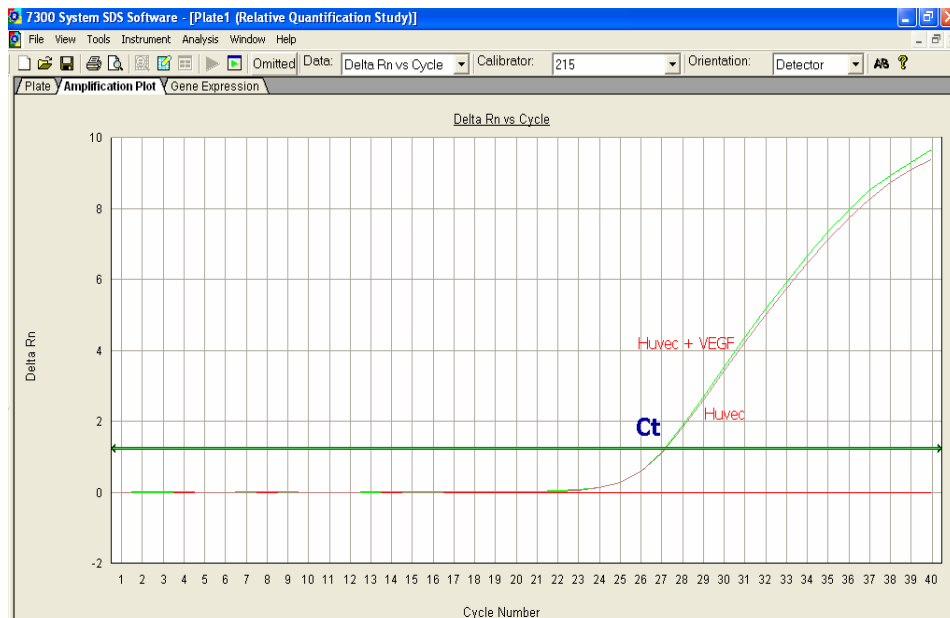


Figura B: Curva di amplificazione del gene housekeeping nei campioni Huvec e Huvec + VEGF

Da questo esperimento in real time si evince come la proteina smp30 subisca una up-regulation di 2 volte nelle HUVEC trattate con VEGF rispetto alle HUVEC controllo e ciò ci fa dedurre che è probabile che anche questa molecola sia coinvolta nella maggiore sopravvivenza delle HepG2 trattate con EtOH e col surnatante delle HUVEC (trattate con VEGF) rispetto alle HepG2 trattate con solo EtOH.

Poiché il VEGF agisce con diversi meccanismi in modo indiretto sugli epatociti si apre una nuova prospettiva nello studio della terapia delle patologie epatiche, se si dovessero confermare i nostri studi. Riteniamo

opportuno sottolineare il fatto che a tutt'oggi stiamo procedendo con la valutazione dell'espressione ottenuta col microarray di altre famiglie di geni, lavorando in parallelo sull'espressione genica delle HepG2 trattate con i farmaci epatotossici usati e quella delle HUVEC trattate con VEGF.

Crediamo utile approfondire la tematica del possibile uso del VEGF nella rigenerazione epatica per i diversi e multiformi meccanismi molecolari che questa molecola scatena ma anche di un possibile uso diretto di quelle molecole la cui sintesi è provocata e aumentata dal VEGF stesso, le quali possono svolgere un ruolo non secondario nei meccanismi di riparazione del danno del fegato, come appunto la proteina che è stata oggetto del nostro ultimo esperimento cioè la smp3.

Conclusioni

I complessi meccanismi che stanno alla base del danno epatico operato da diversi fattori, si intersecano tra loro e vedono coinvolti diversi sistemi molecolari, in grado di provocare epatotossicità con diverse modalità. Le sostanze tossiche coinvolte determinano alterazioni nelle cellule epatiche anche a livello genico, modulando i processi di espressione genica che stanno alla base delle funzioni più o meno importanti della cellula. D'altra parte il fegato ha un'ottima capacità rigenerativa ed è in grado nella maggior parte dei casi di riparare il danno subito e ripristinare la massa epatica non funzionante o mancante. Questo processo vede protagoniste diverse molecole che agiscono secondo delle vie differenti ma a volte interdipendenti e spesso sinergiche tra loro. Tra queste molecole il VEGF assume un ruolo da protagonista, non solo per la sua capacità di ricreare una vascolarizzazione in un tessuto danneggiato ma anche per la sua azione indiretta sulla proliferazione delle cellule di natura epatocitaria. Il processo che porta alla rigenerazione del fegato vede coinvolte anche l'IL6 come mediatore del VEGF, o indipendentemente dal VEGF stesso, l'ERK 1 e 2 attivati dal VEGF e implicati nella proliferazione delle cellule endoteliali, il TNF che inibisce la fosforilazione e l'attivazione del recettore FLK1 del VEGF, inibendo la proliferazione delle cellule

endoteliali, l'HGF(Hepatocytes Growth Factor) che lavora in sinergia col VEGF stimolando la proliferazione epatocitaria e la neovascolarizzazione. Nuovo capitolo è quello rivolto allo studio di una molecola, la smp30, avente funzione anti-apoptotica e con un possibile ruolo chiave nei meccanismi rigenerativi del fegato. La complessità degli eventi legati alla rigenerazione epatica e la presenza attiva delle molecole che interagiscono tra loro ha portato la scienza ad occuparsi con sempre maggiore interesse dello studio di questo processo, analizzandolo da diverse prospettive. Il nostro percorso è stato quello di seguire l'attività del VEGF e di sottolinearne la multifunzionalità e il suo coinvolgimento in diverse vie di attivazione di segnali cellulari. Dai nostri esperimenti in vitro su cellule di natura epatica di tipo neoplastico trattate con sostanze epatotossiche (EtOH) si è evinto che il VEGF non ha un'azione diretta sulla proliferazione di tali cellule. La probabile assenza di recettori per questo fattore posti sulla superficie della cellula HepG2 non implica tuttavia che il VEGF non possa agire in sinergia con altre molecole e che si comporti diversamente in modelli sperimentali allestiti con epatociti. L'utilizzo nel nostro studio di colture cellulari e quindi l'assenza di elementi normalmente presenti nelle sperimentazioni in vivo (sangue, liquido interstiziale, cellule limitrofe) ha impedito di fare luce sull'eventuale ruolo giocato da tutti questi elementi. Il successivo studio

con cellule di natura endoteliale (HUVEC) ci ha permesso di verificare che l'uso del medium con VEGF in cui tali cellule sono state fatte crescere ha fatto sì che le cellule HepG2 poste in coltura resistessero all'esposizione tossica dell'EtOH. Questo ci ha portato a dedurre che il VEGF a livello delle HUVEC mette in atto dei meccanismi che portano in definitiva alla produzione di molecole ad attività mitogena o anti apoptotica nei confronti delle cellule epatocitarie. La sperimentazione in microarray sulle variazioni di espressione genica attuata contemporaneamente sulle HepG2 trattate con sostanze epatotossiche e sulle HUVEC trattate con VEGF ci ha permesso di avere una visione più chiara del comportamento di alcuni geni coinvolti nel processo di proliferazione e apoptosi cellulari. È stato valutato, quindi, in particolare il comportamento di una molecola che dai nostri studi appare correlata all'azione del VEGF, la smp 30. È stato interessante notare come il gene che codifica per questa proteina subisca nelle HUVEC trattate con VEGF una up-regulation di ben due volte rispetto alle HUVEC non trattate. Si potrebbe perciò sfruttare questa proprietà del VEGF e approfondire gli studi sulla smp30. Se tale molecola ha un effetto così potente la si potrebbe utilizzare da sola per favorire i processi rigenerativi del fegato oppure si potrebbe usare il VEGF quale agente promotore della sua produzione durante un danno epatico.

I nostri esperimenti ci portano alla conclusione che l'uso del VEGF potrebbe essere d'aiuto nei processi rigenerativi per lo meno per quanto riguarda il suo meccanismo di azione più strettamente legato alla stimolazione delle cellule endoteliali a produrre fattori che in qualche modo agiscono da mitogeni o che inibiscono l'apoptosi delle cellule di natura epatica. Ma questi fattori dovrebbero d'altra parte essere più attentamente studiati per la loro possibile capacità di agire anche indipendentemente dal VEGF. I nostri esperimenti, in definitiva, si sono focalizzati sui meccanismi, numerosi e complessi, che stanno alla base della rigenerazione epatica nei suoi due aspetti prevalenti: quello della proliferazione epatocitaria e quello altrettanto importante della neovascolarizzazione. Lo studio dei fattori che, a nostro avviso, hanno un ruolo rilevante in questi processi e l'osservazione di come questi fattori siano strettamente legati tra loro e agiscano in sinergia o dipendentemente l'uno dall'altro, ci apre una nuova prospettiva di approccio terapeutico, che va di volta in volta valutata, in correlazione all'entità del danno epatico e al tipo e dose di agente tossico cui è sottoposto il fegato. Data la complessità dei fenomeni legati alla tossicità epatica e alla riparazione del danno, diversi e numerosi altri studi devono essere portati avanti nella speranza di poter avere una panoramica più ampia dei fenomeni molecolari e genetici che stanno dietro alla

rigenerazione del fegato. Questi esperimenti sono la conseguenza del nuovo approccio che la scelta dei farmaci deve avere, per poter migliorare l'efficienza della terapia stessa e, al contempo, per ridurre la tossicità farmacologica. Comprendendo i meccanismi che stanno alla base del danno farmacologico si può lavorare in diversi modi affinché la molecola agisca senza o con minimi effetti collaterali. Gli studi di microarray si prestano bene allo scopo permettendo una chiara valutazione del coinvolgimento molecolare nei processi che stanno alla base del danno e della rigenerazione del fegato.

Molto altro resta ancora da chiarire riguardo ai segnali coinvolti nell'angiogenesi e nella rigenerazione del fegato e molte altre molecole vanno studiate attentamente e in associazione tra loro, poiché i meccanismi sono integrati tra loro e interdipendenti.

Bibliografia

-Francisco Castaneda¹, Sigrid Rosin-Steiner¹, Klaus Jung^{2 3}

Functional genomics analysis of low concentration of ethanol in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. Role of genes involved in transcriptional and translational processes **Int J Med Sci** 2007;

- Francisco Castaneda and Sigrid Rosin-Steiner

Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways
Int J Med Sci. 2006;

- M.Harries ,S.T.Fletcher,C.M. Duggan;V.A. Baker

The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells
Toxicology in Vitro 15 (2001)

- F. Castaneda,R.K.H. Kimme

Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the FAS-receptor pathway

J cancer Res Clin Oncol (2001)

- F.Castaneda,R.K.Kimme

Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids

J cancer Res Clin Oncol (2000)

- F.Castaneda,R.K.Kimme

Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 homan tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro

J cancer Res Clin Oncol (2000)

- F.Castaneda,R.K.Kimme

Ethanol treatment of hepatocellular Carcinoma: high potentials of low concentrations

Cancer Biology and Therapy 2004

-Robertson, G., Leclercq, I., and Farrell, G. C. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**,

- Gu JW, Elam J, Sartin A, Li W, Roach R, Adair TH.

Moderate levels of ethanol induce expression of vascular endothelial growth factor and stimulate angiogenesis.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 Jul;281

- Chambers G.,Lawrie L,Cash P.Murray G.I.,

Protromics: a new approach to the study of disease.

Pathol 2000 nov

- Kuehn H.,Lierzon A., Reich M.,Mesirov J.P.

Curr Protoc Bioinformatics 2008

Using Gene Pattern for gene expression analysis.

- Trevino V., Falciani ., Barrera Saldana HA Mol ;Med 2007

DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research.

- Beck, L., Jr and D'Amore,

P. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* **11**, 365-373 (1997).

- Brown, L. F. et al.,

Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* **79**, 233-269 (1997).

- Ferrara, N. et al.

Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr, Rev.* **13**, 18-32 (1992).

- Ferrara, N.

Role of Vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin. Oncol.* **29**, 10-14 (2002).

-Folkman, J. and D'Amore,

Blood vessel formation: what is its molecular basis?
Cell **87**, 1153-1155 (1996).

-Meyer, U. A., and Hoffmann, K. (1999).

Phenobarbital-mediated changes in gene expression in the liver. *Drug Metab. Rev.* **31**, 365-373.

-Folkman, J.

Angiogenesis in cancer, reumatoid and other diseases. *Nat. Med.* **1**, 27-31 (1995).

-Dvorak, H. F., Brown, L.F., Detmar, M. & Dvorak, A.M.

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039 (1995).

-Fuh, G. et al.

Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 11197-11204 (1998).

-Masubuchi Y, Horie T.

Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit Rev Toxicol* 2007;

-Fukumura, D. et al.

Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors *in vivo*. *Canc. Res.* **61**, 6020-6024 (2001).

-Grunstein, J. et al.

Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7282-7291(2000).

-Hanahan, D.

Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277**, 48-50 (1997).

-Kaplowitz N.

Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 2002;

-Burcham, P. C., and Harman, A. W. (1991).

Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes.

J. Biol. Chem. **266**,

-Baker, T. K., Carfagna, M. A., Gao, H., Dow, E. R., Li, Q., Searfoss, G. H., and Ryan, T. P. (2001). Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **14**,