



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA
TRASLAZIONALE:

XXIX Ciclo

COORDINATORE: PROF. LORENZO MALATINO

DOTT.SSA STEFANIA DI MAURO

**ALTERAZIONE DEL miRNoma
INTRACELLULARE ED EXTRACELLULARE ED
ANALISI BIOINFORMATICA IN MODELLI *in vitro*
DI NAFLD E DI NASH.**

TESI DI DOTTORATO

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Purrello

ANNO ACCADEMICO 2015– 2016

INDICE

INDICE	I
RIASSUNTO.....	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 NAFLD DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA.....	3
1.2 PROGRESSIONE DELLO SPETTRO NAFLD.....	4
1.3 DIAGNOSI.....	4
1.4 INDICATORI BIOCHIMICI DI NASH	5
1.5 EVOLUZIONE DELLE IPOTESI SULLA PATOGENESI DELLA NAFLD	8
1.6 ALTERAZIONE DEL METABOLISMO LIPIDICO NELLA NAFLD	10
1.7 PROGRESSIONE DA NAFLD A NASH.....	13
1.7.1 STRESS OSSIDATIVO	13
1.7.2 INFIAMMAZIONE.....	14
1.8 microRNA.....	19
1.8.1 BIOGENESI DEI microRNA.....	20
1.8.2 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI microRNA.....	24
1.11 microRNA CIRCOLANTI	26
1.12 microRNA INTRACELLULARI COINVOLTI NELLA NAFLD.....	32
1.12 microRNA CIRCOLANTI E NAFLD.....	38

2. OBIETTIVI	42
3. MATERIALI E METODI	43
3.1 LINEA CELLULARE	43
3.2 INDUZIONE DELL'ACCUMULO LIPIDICO NELLE CELLULE HEPG2	44
3.3 NILE RED STAINING	46
3.4 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE	46
3.5 WESTERN BLOT	47
3.6 RILEVAMENTO DELLE CERAMIDI MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA	48
3.7 QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO INTRACELLULARE DI DIACILGLICEROLO (DAG) MEDIANTE ELISA	49
3.8 ESTRAZIONE DELL'RNA	50
3.9 TAQMAN HUMAN MICRORNA ARRAY	50
3.10 REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE MEGAPLEX	53
3.11 REAZIONE DI PREAMPLIFICAZIONE	54
3.12 REAZIONE DI REAL TIME PCR	55
3.13 SAGGI SINGOLI TAQMAN	56
3.14 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE	57
3.15 ANALISI STATISTICA	58
3.16 ANALISI DEI TARGET DEI microRNA	59

3.17 COSTRUZIONE DELLE NETWORK.....	59
3.18 ANALISI DELLE PATHWAY.....	60
3.19 ANALISI DI ESPRESSIONE DEI TARGET DEI microRNA.	60
4. RISULTATI	61
4.1 ACCUMULO LIPIDICO DELLE HEPG2 TRATTATE CON DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI FFA.....	61
4.2 CITOTOSSICITÀ DEGLI FFA	62
4.3 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON FFA SULLA FOSFORILAZIONE DI IRS-1 ED AKT INSULINO-INDOTTA.	64
4.4 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON FFA SULL'ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA DI FAT/CD36, FATP-2 E PPARR γ	65
4.5 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON FFA SUI LIVELLI INTRACELLULARI DI DAG E CERAMIDI.....	68
4.6 RISULTATI DELLE TLDA	69
4.7 DISTRIBUZIONE INTRACELLULARE ED EXTRACELLULARE DEI microRNA.....	72
4.8 DEREGLAZIONE DEL miRNoma INTRACELLULARE.....	74
4.9 DEREGLAZIONE DEL miRNoma EXTRACELLULARE.....	76
4.10 CONFRONTO TRA miRNoma INTRACELLULARE ED EXTRACELLULARE.....	78
4.11 VALIDAZIONE MEDIANTE SINGLE TAQMAN ASSAY	80
4.12 ANALISI COMPUTAZIONALE DEI TARGET DEI microRNA.....	83

4.13 NETWORK	85
4.14 ANALISI DELLE PATHWAY	88
4.15 ESPRESSIONE DEI TARGET DEI microRNA NELLE HepG2 ESPOSTE AD FFA.	91
5. DISCUSSIONE	93
6. PROSPETTIVE FUTURE	104
7. BIBLIOGRAFIA	106

RIASSUNTO

La steatosi epatica non alcolica (*Non-alcoholic fatty liver disease* NAFLD) interessa circa il 20-30% della popolazione generale e rappresenta la malattia epatica cronica più comune nei paesi industrializzati. La NAFLD presenta un potenziale evolutivo, attraverso la fase infiammatoria denominata NASH (*Non-alcoholic Steato-Hepatitis*), verso la fibrosi, la cirrosi ed in alcuni casi l'epatocarcinoma. L'identificazione dei pazienti a rischio evolutivo da NAFLD a NASH è una delle più importanti sfide in epatologia. La complessità molecolare delle due condizioni patologiche *in vivo* rende necessario lo sviluppo di modelli *in vitro* per lo studio delle vie di segnalazione e dei meccanismi molecolari compromessi o alterati nella NAFLD e nella NASH. In letteratura non sono ancora presenti dati *High-throughput* sull'espressione dei microRNA in modelli *in vitro* di NAFLD e di NASH. A tale scopo abbiamo analizzato l'espressione di 754 microRNA nelle HepG2 a seguito di trattamento con stimoli non lipotossici (Oleato:Palmitato, OA:PA) (modello di NAFLD) e a seguito di trattamento lipotossico (Palmitato, PA) (modello di NASH). Queste analisi sono state effettuate sia a livello intracellulare sia a livello extracellulare per i microRNA secreti nel mezzo di coltura. In questo modo abbiamo osservato che il trattamento con OA:PA determinava rispettivamente una variazione del 2.8% e del 10% dei microRNA totali rilevati nelle cellule e nel mezzo di coltura, mentre il trattamento con palmitato causava una deregolazione rispettivamente del 10% e del 19% dei microRNA intracellulari ed extracellulari. Mediante *Single TaqMan Assay* abbiamo validato la

deregolazione dei seguenti microRNA: miR-126, miR-150, miR-223, miR-483-3p, miR-1226*, miR-1290. Utilizzando un nuovo approccio computazionale per l'analisi della perturbazione delle *pathway*, abbiamo riscontrato che i target dei microRNA intracellulari ed extracellulari erano coinvolti in processi cellulari e molecolari associati all'insorgenza ed alla progressione da NAFLD a NASH, come ad esempio il metabolismo degli acidi grassi, la regolazione di fattori di trascrizione lipogenici (ad esempio PPAR, SREbP), il metabolismo del glucosio, il metabolismo del recettore delle LDL, la risposta all'insulina, l'apoptosi e l'infiammazione. Il trattamento con PA, rispetto al trattamento con OA:PA, presentava un maggior arricchimento statisticamente significativo di funzioni associate alla NASH sia per i microRNA intracellulari che per i microRNA extracellulari DE. È stata analizzata l'espressione genica, mediante Real-Time PCR, di alcuni dei target dei microRNA differenzialmente espressi identificati.

Questi dati potrebbero essere utili per identificare il ruolo dei microRNA nel metabolismo lipidico epatico e nella patogenesi e progressione dello spettro NAFLD; inoltre, se validati *in vivo*, potrebbero portare all'identificazione di nuovi microRNA epato-specifici come biomarcatori di diagnosi differenziale.

1. INTRODUZIONE

1.1 NAFLD DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

La steatosi epatica non alcolica (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) è definita come la presenza di un accumulo di lipidi a livello del fegato superiore al 5-10% in peso, ovvero come percentuale di epatociti che contengono goccioline lipidiche al microscopio ottico maggiore del 5%. Le alterazioni istopatologiche della NAFLD sono simili a quelle indotte dall'abuso cronico di alcol, tuttavia questa patologia si sviluppa in soggetti che non assumono o assumono quantità modeste di alcol, in particolare 30 grammi al giorno per l'uomo e 20 grammi al giorno per la donna [1].

La reale prevalenza della NAFLD non è nota a causa della mancanza di *test* diagnostici specifici e sensibili. Stime di prevalenza basate su criteri indiretti, come l'incremento delle transaminasi sieriche o la presenza di steatosi all'ecografia epatica, indicano che il 20-30% della popolazione generale nei paesi occidentali è affetta da NAFLD. La NASH, lo stadio più avanzato e maggiormente rilevante dal punto di vista clinico, presenta una prevalenza del 2-3% nella popolazione generale e del 37 % nei soggetti obesi.

Ad oggi la NAFLD viene considerata come la manifestazione epatica della sindrome metabolica. La NAFLD presenta infatti un'associazione con tutte le componenti della sindrome metabolica, quali l'obesità addominale, l'insulino-resistenza, il diabete mellito di tipo 2, l'ipertensione arteriosa e la dislipidemia.

La prevalenza della NAFLD infatti incrementa raggiungendo valori del 70-90% nei soggetti obesi o diabetici.

La NAFLD colpisce tutti i gruppi etnici anche se la prevalenza sembra essere più elevata negli spagnoli e negli americani di origine europea rispetto agli afroamericani [2].

1.2 PROGRESSIONE DELLO SPETTRO NAFLD

La NAFLD comprende un ampio spettro di condizioni epatiche. Nonostante la NAFLD, caratterizzata dall'accumulo di trigliceridi a livello epatico, sia una condizione benigna, essa può progredire in steatoepatite (*Non Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH), caratterizzata da degenerazione degli epatociti (apoptosi e/o necrosi focale, *ballooning*, corpi di Mallory), infiammazione lobulare e fibrosi. La NASH a sua volta può progredire in condizioni patologiche più gravi, quali la cirrosi epatica, l'epatocarcinoma e l'insufficienza epatica. Le tipiche caratteristiche istologiche di steatosi e di infiammazione spesso scompaiono nella malattia avanzata, in tal modo molti casi di cirrosi "criptogenetica" sono probabilmente causati da NASH [1-3].

1.3 DIAGNOSI

Ad oggi, non esiste alcun sistema non invasivo per ottenere una diagnosi chiara ed univoca per la NAFLD e per poterla distinguere dalla NASH. La diagnosi di NAFLD è una diagnosi di esclusione, nasce dal riscontro di alterazioni degli indici di funzionalità epatica (transaminasi, in particolare rapporto AST/ALT,

incremento gamma-GT,) in assenza di abuso cronico di alcol e di cause secondarie di epatopatia cronica (quali epatiti virali, patologie epatiche autoimmuni, patologia di Wilson, disfunzione epatica indotta da farmaci). Per giungere alla diagnosi, inoltre, vengono utilizzate metodiche di *imaging*, quali l'ecografia addominale, la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica nucleare. Queste tecniche, sebbene riescono a rivelare la presenza dell'accumulo di grasso, non permettono di distinguere la steatosi semplice dalla steatoepatite più o meno complicata da fibrosi.

La biopsia epatica rimane dunque il *gold standard* per la diagnosi definitiva di NAFLD e per la diagnosi differenziale delle due condizioni patologiche [1-3].

1.4 INDICATORI BIOCHIMICI DI NASH

La rilevanza clinica della NAFLD è data sia dal progressivo aumento della prevalenza di questa patologia, che va di pari passo con l'incremento della prevalenza dell'obesità e del diabete nella popolazione generale, sia dalla possibilità di progressione verso condizioni patologiche più gravi.

La rilevanza clinica della NAFLD ha stimolato l'interesse allo sviluppo di *test* non-invasivi di diagnosi differenziale tra NAFLD e NASH mediante l'identificazione di nuovi marcatori biochimici coinvolti in specifiche *pathway* coinvolte nella progressione da NAFLD a NASH quali l'apoptosi, lo stress ossidativo, l'infiammazione e la fibrosi (**figura 1**).

Alcuni studi hanno proposto il dosaggio di indicatori di infiammazione quali la proteina C reattiva (PCR) o citochine ed adipochine pro-infiammatorie (ad esempio TNF- α , adiponectina, leptina). Tuttavia tali studi hanno portato a

risultati discordanti ed inconsistenti ed a mancanza di specificità per la condizione di NASH [4].

Oltre all'infiammazione, l'apoptosi gioca un ruolo fondamentale nel danno epatico che si osserva nella NASH, e la citocheratina 18 (CK-18), rappresenta un biomarcatore di tale processo. LA CK-18 è infatti una proteina caratteristica dei filamenti intermedi degli epatociti, e nelle cellule che vanno incontro ad apoptosi viene clivata ad opera della caspasi 3. Feldstein *et al.* in uno studio condotto su 139 pazienti NAFLD e 150 controlli hanno dimostrato che i livelli plasmatici di CK-18 misurati mediante ELISA erano significativamente più alti in pazienti con diagnosi di NASH accertata mediante biopsia rispetto ai pazienti con diagnosi incerta rispetto ai controlli sani [5]. Altri studi hanno supportato la rilevazione dei frammenti CK-18 come biomarcatore di NASH [6-8]. Tuttavia uno studio più recente condotto da Cusi K. *et al.* ha dimostrato che la rilevazione dei frammenti CK-18 rispettivamente in caso di NAFLD, NASH o fibrosi presentava una sensibilità del 63%, del 58% e del 54% ed una specificità dell'83%, del 68% e dell'85%; per cui la limitata sensibilità di questo biomarcatore lo rende inadeguato per lo *screening* e la stadiazione di NASH [9].

Altri studi in cui sono stati misurati *marker* biologici dello stress ossidativo come indicatori di NASH quali la malondialdeide, le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico, le LDL ossidate, la vitamina E; hanno portato a risultati contrastanti [4].

La rilevazione della fibrosi associata alla NAFLD e ad altre epatopatie croniche si basa su due approcci principali:

I) l'uso combinato di *test* clinici di *routine* che presentano associazioni statisticamente significative con il rischio di fibrosi, ma non sono associati direttamente ai meccanismi di fibrogenesi, ne rappresentano degli esempi il *BAAT score* (che si basa sui seguenti parametri: BMI, ALT, età e livello di trigliceridi); il *BARD score* (BMI, rapporto AST/ALT, diabete) il *NAFLD fibrosis score* (presenza di diabete, AST, ALT, BMI, piastrine ed albumina), il *Fibrometer* (età, peso, glicemia a digiuno, AST, ALT, ferritina e piastrine) ;

II) l'uso di marcatori biochimici direttamente connessi con il *turnover* dei componenti della matrice extracellulare (acido ialuronico, collagene IV, peptide aminotermine del collagene di tipo III, inibitore tissutale 1 delle metalloproteasi (TIMP-1), fibronectina, laminina) e quindi più direttamente riconducibili agli eventi associati alla fibrosi. Un esempio è rappresentato dal *European Liver Fibrosis test* (ELF) (acido ialuronico, peptide N terminale del procollagene TIMP1 1) [4].

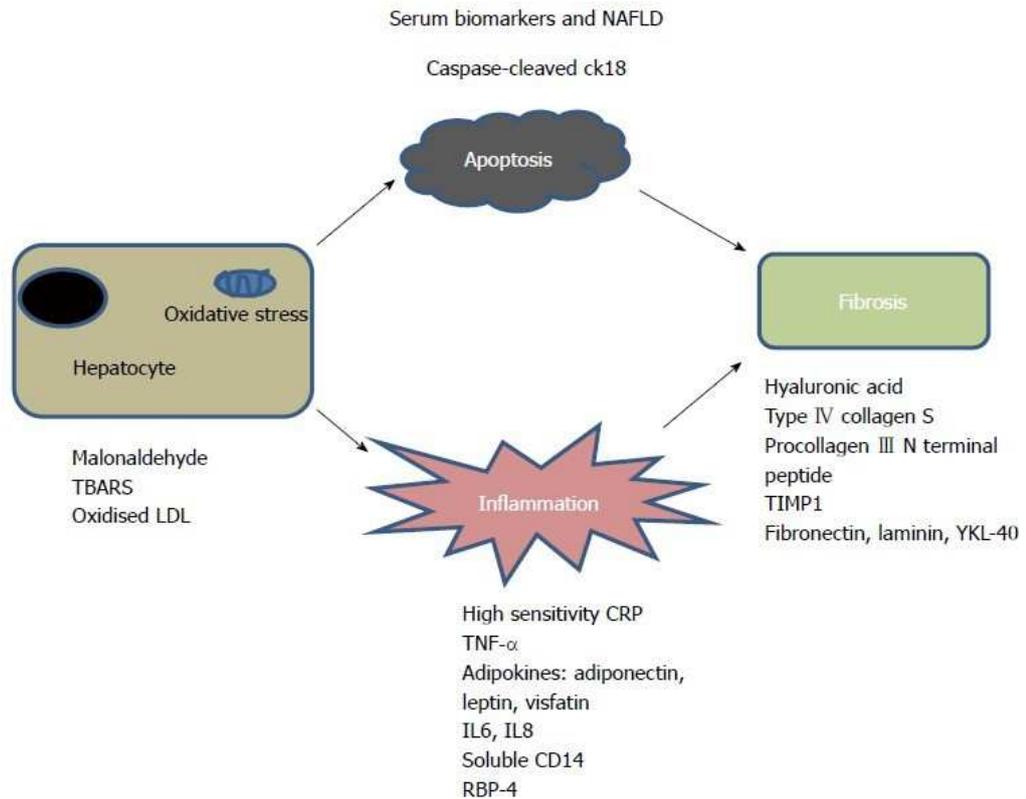


Figura 1: Potenziali indicatori sierici di progressione da NAFLD a NASH associati a pathway quali lo stress ossidativo, l'infiammazione, la fibrosi e l'apoptosi. LDL: Low density lipoprotein; IL: Interleuchina; TBARS: sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico; TIMP1: inibitore tissutale di MMP 1 [4].

1.5 EVOLUZIONE DELLE IPOTESI SULLA PATOGENESI DELLA NAFLD

I primi tentativi per spiegare i meccanismi della patogenesi dello spettro NAFLD erano basati sull'ipotesi dei "two-hits" formulata da Day e James nel 1998 [10] : Il "first-hit", causato dall'insulino-resistenza e dall'accumulo dei trigliceridi a livello epatico, determina un'aumentata suscettibilità del fegato agli insulti determinati dal "second-hit", quali l'attivazione di pathway infiammatorie, la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo, che portano alla progressione da NAFLD a NASH e fibrosi. Questa ipotesi "storica" sulla

patogenesi della NAFLD è andata incontro ad evoluzioni nel corso del tempo. In particolare è stato successivamente dimostrato che gli acidi grassi liberi (FFAs: *Free Fatty Acids*) sono in grado di determinare essi stessi in maniera diretta danno epatico mediante incremento dello stress ossidativo, attivazione di *pathway* infiammatorie ed insulino-resistenza per cui la loro esterificazione a trigliceridi ed il loro accumulo all'interno degli epatociti, rappresenta un meccanismo di difesa dalla tossicità degli FFA non esterificati piuttosto che l'evento aggravante la sensibilità agli insulti determinati dal "second-hit". Successivamente è stata proposta l'ipotesi dei "3-hits": Secondo questa ipotesi, oltre ai primi due *hit* è coinvolto un terzo hit: lo stress ossidativo riduce la capacità proliferativa degli epatociti maturi e si ha l'attivazione delle *hepatocyte progenitor cells* HPCs, l'alterata proliferazione delle HPC rappresenta il terzo *hit*. Infine a causa della moltitudine, della complessità e delle interazioni dei fattori e delle *pathway* che portano alla progressione dalla NAFLD alla NASH oggi la patogenesi della NAFLD viene definita a "multiple hits" [11-13] (figura 2).

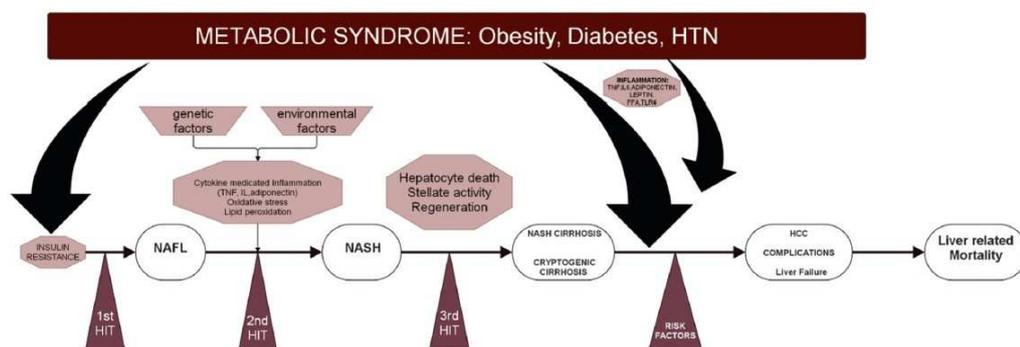


Figura 2: Patogenesi della NAFLD [12].

1.6 ALTERAZIONE DEL METABOLISMO LIPIDICO NELLA NAFLD

Gli acidi grassi liberi a livello degli epatociti derivano dall'*uptake* degli FFA plasmatici e dalla biosintesi *de novo*.

All'interno degli epatociti gli FFA possono andare incontro a due destini differenti: possono essere ossidati per produrre ATP o possono essere esterificati a trigliceridi che rappresentano la forma di riserva energetica. A loro volta i trigliceridi possono essere incorporati nelle VLDL e secreti nella circolazione o in alternativa possono essere immagazzinati sotto forma di vescicole lipidiche che portano alla steatosi epatica [11].

Negli adipociti, l'insulino-resistenza aumenta l'attività della lipasi ormone-sensibile in quanto viene meno l'azione inibitoria dell'insulina su tale enzima, di conseguenza si ha un incremento della lipolisi dei trigliceridi a livello del tessuto adiposo ed un aumento dei livelli plasmatici degli acidi grassi liberi. Dal momento che la velocità di *uptake* degli FFA negli epatociti è direttamente proporzionale alla loro concentrazione plasmatica e dal momento che il fegato presenta una limitata capacità di immagazzinare lipidi, un accumulo periferico insufficiente a livello del tessuto adiposo indotto dall'insulino-resistenza si traduce in steatosi epatica. Oltre ad un incremento dell'*uptake* di FFA circolanti a livello epatico, nella NAFLD si osserva uno *shift* tra la β -ossidazione mitocondriale degli acidi grassi e la sintesi *de novo* degli FFA. Questo *shift* è in primo luogo mediato dalla deregolazione di due fattori di trascrizione coinvolti nell'attivazione di *pathway* lipogeniche: SREBP-1c e ChREBP (**figura 3**) [14, 15].

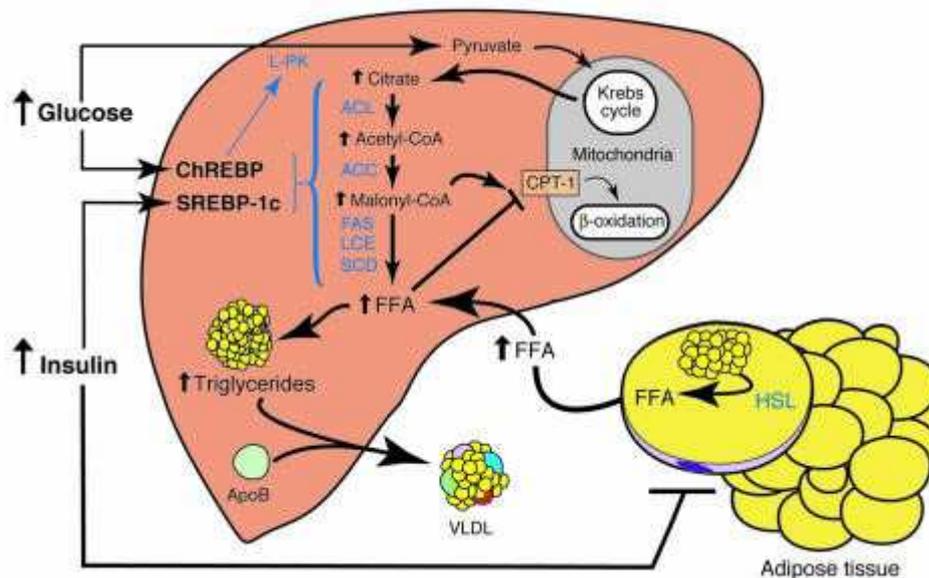


Figura 3: Alterazione del metabolismo lipidico nella NAFLD [14].

Le *Sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) sono una famiglia di fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo, dei fosfolipidi e dei trigliceridi, pertanto presentano un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi lipidica. Tale famiglia comprende tre isoforme: SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2.

L'isoforma SREBP-2 è coinvolta nella regolazione della biosintesi del colesterolo ed è regolata dai livelli intracellulari stessi di colesterolo, l'isoforma SREBP-1c, associata alla fisiopatogenesi della NAFLD, è coinvolta nella regolazione della biosintesi degli acidi grassi e nel metabolismo glucidico ed è regolata a livello trascrizionale dall'insulina, l'isoforma SREBP-1a presenta entrambe le funzioni [16].

Nella NAFLD l'iperinsulenemia indotta dallo stato di insulino-resistenza determina la sovraespressione di SREBP-1c a livello epatico con conseguente aumento della biosintesi *de novo* degli acidi grassi. Inoltre l'attivazione di SREBP-1c determina l'attivazione di ACC2 una isoforma di ACC che produce

malonil-CoA a livello della membrana mitocondriale che inibisce la *carnitina palmitoil transferasi-1* (CPT-1), preposta al trasporto degli acidi grassi nei mitocondri determinando di conseguenza una diminuzione della β ossidazione degli acidi grassi [14]. Inoltre la riduzione della β -ossidazione degli acidi grassi che si verifica nella NAFLD è dovuta anche alla disfunzione mitocondriale associata a tale patologia.

È noto che l'insulina-resistenza è associata ad una condizione di iperglicemia, nella NAFLD, l'iperglicemia induce a livello epatico l'attivazione del fattore di trascrizione ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*).

Più in dettaglio, in condizioni di iperglicemia si ha un incremento del flusso di glucosio all'interno dell'epatocita ed un incremento dei livelli di xilulosio-5-fosfato (Xu-5-P), mediante la via dello *shunt dell'esosomonofosfato* che determina l'attivazione della fosfatasi PP2A la quale defosforila ChREBP attivandolo, la defosforilazione infatti ne promuove la traslocazione nucleare e il legame al promotore della *liver type piruvato chinasi L-PK*, un enzima chiave nella regolazione della glicolisi. L-PK catalizza la conversione del fosfoenolpiruvato in piruvato, che entra nel ciclo di Krebs per generare citrato, la fonte principale di acetil-CoA utilizzato per la sintesi degli acidi grassi [17](**figura 4**).

In definitiva, nella NAFLD l'attivazione di SREBP-1c mediata dall'iperinsulinemia e l'attivazione di ChREBP indotta dall'iperglicemia innescano in maniera sinergica la conversione dell'eccesso di glucosio in acidi grassi.

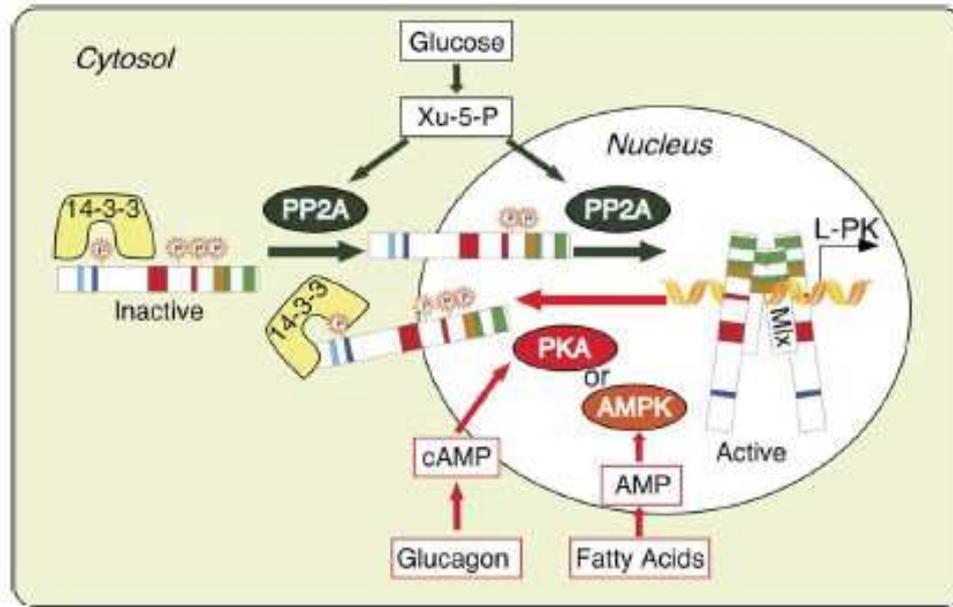


Figura 4: Attivazione di ChREBP mediata dall'iperglicemia. L'esposizione degli epatociti al glucosio determina l'incremento di xilulosio 5-fosfato (Xu-5-P) che induce l'attivazione della protein fosfatasi 2A(PP2A) che determina la traslocazione nucleare di ChREBP che dimerizza con Mlx e lega i *carbohydrate responsive elements* nel promotore di geni target tra cui *Liver Pyruvate Kinase* (L-PK) [17].

1.7 PROGRESSIONE DA NAFLD A NASH

Diversi fattori sono coinvolti nella progressione da NAFLD a NASH quali lo stress ossidativo, l'infiammazione, lo stress del reticolo endoplasmatico, l'incremento dell'esposizione epatica al microbioma intestinale, la deregolazione delle adipochine, l'attivazione delle cellule epatiche stellate.

1.7.1 STRESS OSSIDATIVO

E' stato riportato che in pazienti affetti da NASH sono presenti alterazioni ultrastrutturali a carico dei mitocondri [18] e che nell'uomo e in modelli animali di NAFLD si ha una riduzione dell'attività funzionale dei complessi

della catena di trasporto mitocondriale ed una riduzione della produzione di ATP [19, 20].

I mitocondri sono la più importante fonte cellulare di ROS, e la disfunzione mitocondriale potrebbe quindi avere un ruolo centrale nella patogenesi della NASH.

L'iper-impegno della catena di trasporto mitocondriale dovuto al metabolismo degli acidi grassi e la disfunzione della catena di trasporto mitocondriale determinano l'incremento della produzione di ROS.

I mitocondri non sono l'unica fonte di ROS nella patogenesi NAFLD. L'inibizione della β -ossidazione mitocondriale determina l'attivazione di vie alternative di degradazione degli acidi grassi, ed in particolare la β -ossidazione perossisomiale e la ω -ossidazione microsomiale, entrambe fonti di ROS.

Infine la perossidazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) effettuata dai ROS determina la produzione di aldeidi reattive come sottoprodotto di reazione come ad esempio trans-4-idrossi-2 noneale (4-HNE) e malondialdeide (MDA) che amplificano l'effetto dello stress ossidativo in quanto più stabili dei ROS e capaci di diffondere verso target extracellulari distanti [21].

1.7.2 INFIAMMAZIONE

La steatoepatite è associata ad uno stato di infiammazione cronica.

L'infiammazione tipica della NASH origina sia a livello del tessuto epatico (epatociti e cellule di Kupffer), mediante l'attivazione di *pathway* pro-infiammatorie quali l'attivazione del Nuclear Factor kappa B (NF- κ B), di c-Jun

N-terminal Kinase (JNK) e dell'inflammasoma; sia a livello di altri tessuti come il tessuto adiposo o le cellule del sistema immunitario. L'infiammazione di questi distretti estranei al fegato aggrava ulteriormente l'infiammazione epatica.

Diversi studi hanno riportato l'attivazione di NF- κ B e di JNK a livello di biopsie epatiche di pazienti affetti da NASH e nel fegato di modelli murini di NASH.

Gli FFA extracellulari a livello delle cellule epatiche sono in grado di attivare mediante l'interazione con i TLR (*Toll Like Receptor*) JNK ed il complesso I κ B Kinasi (IKK). All'attivazione di queste vie contribuiscono anche lo stress ossidativo, lo stress del reticolo endoplasmatico indotti dalla lipotossicità e le vie di segnalazione attivate dalle citochine come il TNF α o l'interleuchina-1 β .

Il complesso I κ B Kinasi (IKK) una volta attivato, attiva NF- κ B, determinando la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione pro-infiammatorio p65 che induce l'espressione genica di diverse chemochine pro-infiammatorie, citochine e molecole di adesione.

JNK una volta attivato, attiva c-Jun coinvolto nell'induzione dell'apoptosi degli epatociti, e mediante la formazione dell'eterodimero c-Jun:c-Fos si ha la formazione del fattore di trascrizione proinfiammatorio *Activator Protein 1* (AP-1). Inoltre l'attivazione di JNK aggrava l'insulino-resistenza epatica mediante fosforilazione di IRS1 e IRS2 (**figura 5**) [22, 23].

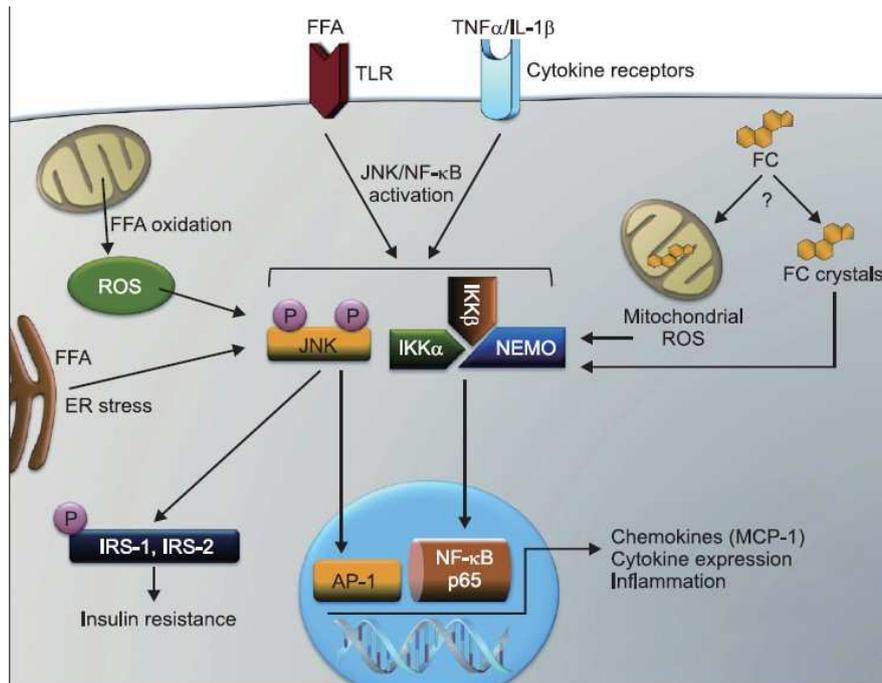


Figura 5: Attivazione di c-Jun N-terminal kinase (JNK) e del complesso IκB kinase (IKK) nella NASH [22].

Come riportato precedentemente a livello epatico, sia nelle cellule di Kupffer che negli epatociti, nella NASH si ha l'attivazione della *pathway* dell'inflammasoma.

Gli inflammasomi sono dei complessi proteici multimerici che rilevano i segnali di pericolo attraverso i *Nucleotide-binding Oligomerization Domain receptors* (NOD-like receptors).

Dopo la sua attivazione NLRP3 forma un complesso con la molecola effettrice, pro-CASP-1 mediante il contributo di una molecola adattatore *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD* (ASC). All'interno dell'inflammasoma avviene il clivaggio e quindi l'attivazione della procaspasi 1 in caspasi 1 che, a sua volta, avvia la maturazione delle citochine pro-infiammatorie IL-1β ed IL-18 che amplificano l'infiammazione [22, 23].

L'attivazione dell'inflammasoma è dipendente da 2 segnali successivi. Il segnale 1 è innescato dalle vie di segnalazione dei recettori TLR e IL-1R e porta all'attivazione dell'espressione di diverse componenti proteiche quali NLRP3, ASC, pro-caspase-1, pro-IL-1 β e pro-IL-18; il segnale 2 è determinato dai PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e dai DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) e porta all'oligomerizzazione dei componenti dell'inflammasoma ed al clivaggio della caspasi 1, la quale determina il rilascio delle citochine pro-infiammatorie attive (**figura 6**) [24].

Nella NASH un altro compartimento tissutale che contribuisce all'infiammazione epatica è il tratto gastrointestinale, che diventa maggiormente permeabile alla flora batterica.

L'incremento della permeabilità della mucosa gastrointestinale determina l'esposizione del fegato ai batteri e ai prodotti batterici della flora batterica, in primo luogo l'LPS, che innescano l'attivazione dell'inflammasoma [25].

Csalk *et al.* hanno recentemente dimostrato che in modelli murini di steatoepatite a livello epatico (topi sottoposti a *Methionine Choline-deficient Diet* MCD) si ha l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 mentre quest'attivazione non si osserva in modelli murini di steatosi semplice (topi sottoposti a dieta *High Fat Diet* HFD). Risultati simili sono stati ottenuti in modelli in vitro di NAFLD e di NASH: la pre-esposizione al palmitato ma non all'oleato induce a livello di colture primarie di epatociti (ottenute da topi C57Bl/6 sottoposti a dieta normale) un incremento della secrezione di IL-1 beta inflammasoma-mediata a seguito di esposizione all'LPS, Quindi il palmitato ma non l'oleato sensibilizza gli epatociti all'LPS [26].

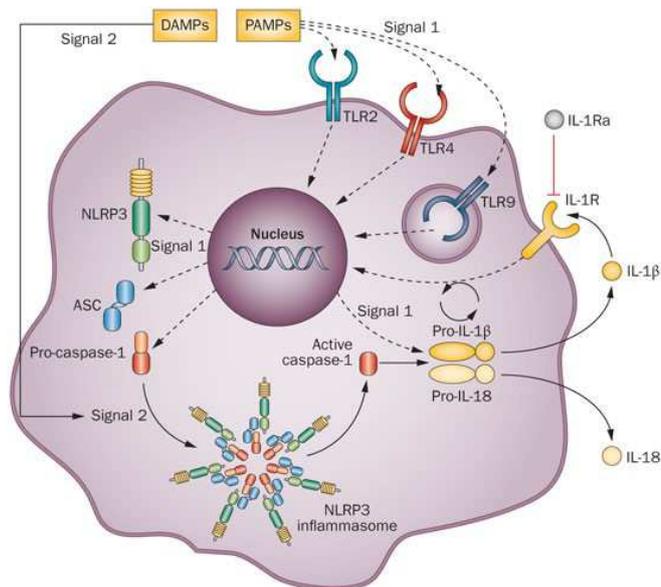


Figura 6: Attivazione dell'inflammasoma NLRP3 [24].

Un altro tessuto che contribuisce allo stato di infiammazione cronica tipico della NASH è il tessuto adiposo.

L'obesità determina espansione del tessuto adiposo, reclutamento di macrofagi ed uno *switch* fenotipico a livello del tessuto adiposo dai macrofagi anti-infiammatori (M2-polarizzati) ai macrofagi pro-infiammatori (M1-polarizzati) che producono citochine/chemochine pro-infiammatorie, quali TNF- α , IL-6, MCP-12. Inoltre l'infiammazione del tessuto adiposo altera la secrezione delle adipochine, incrementando la produzione di adipochine quali la leptina e la resistina, diminuendo invece quella di adipochine con attività insulino-sensibilizzante ad antinfiammatorie quali l'adiponectina [27].

1.8 microRNA

I microRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento (ss), di una lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi, il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale (*Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS*) negli animali e nelle piante. In particolare, i microRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA *target* al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione.

Da un punto di vista funzionale, è stato dimostrato che esistono numerosi microRNA capaci di riconoscere più *target*, e che molti di questi possono essere regolati da diversi microRNA. Tali affermazioni consentono pertanto di considerare i singoli miRNA come piccoli elementi di controllo di più complesse *pathway* regolatrici, che nei fatti stanno alla base di numerose e fondamentali funzioni, che spaziano da quelle prettamente cellulari, tra cui la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi, per poi coinvolgere alcuni processi che riguardano l'intero organismo, comprendenti lo sviluppo embrionale e la risposta immunitaria, e numerose altre. Inoltre alcuni studi hanno dimostrato il ruolo fondamentale dei microRNA nel *self-renewal* e nel differenziamento delle cellule staminali. I microRNA svolgono le loro funzioni in modo fisiologico, poiché presentano degli specifici e dinamici *pattern* di espressione temporale e spaziale. Tuttavia, è stato dimostrato che nel caso in cui la loro espressione risulti essere alterata, i microRNA possono essere coinvolti in diverse malattie complesse. Pertanto, l'azione ad ampio spettro dei microRNA costituisce un nuovo ed altamente

regolato livello di controllo dell'espressione genica, essenziale nella normale fisiologia delle cellule animali e vegetali.

1.8.1 BIOGENESI DEI *microRNA*

Il processo mediante il quale si giunge alla formazione dei *microRNA* maturi è piuttosto complesso e si compone di numerose tappe: esso ha origine nel nucleo e giunge a completamento a livello del citoplasma (**Figura 7**).

La trascrizione dei geni per i *microRNA* è mediata prevalentemente dalla RNA Polimerasi II (Pol II) [28, 29] sebbene esistano casi di trascrizione da parte della RNA polimerasi III (Pol III) [30]: il risultato è una molecola precursore il *pri-miR*, della lunghezza di diverse centinaia di nucleotidi, che nel nucleo si ripiega a formare una struttura a forcina a doppio filamento, spesso contenente la sequenza per *miRNA* maturi differenti.

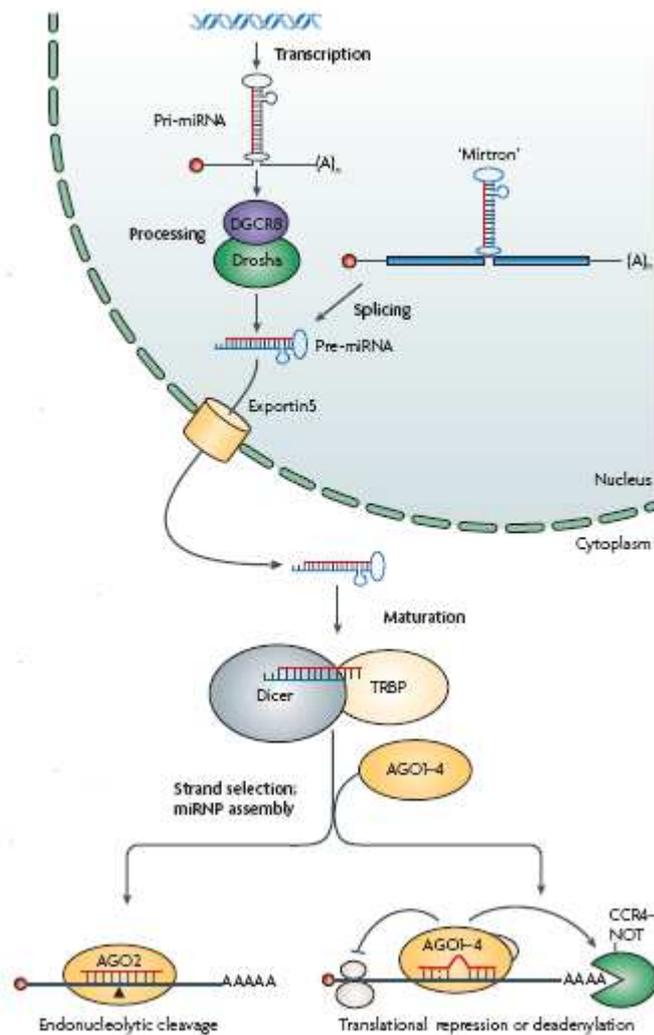


Figura 7: Modello per la biogenesi e per l'attività di soppressione trascrizionale dei microRNA [31].

Questa molecola subisce dei clivaggi sequenziali catalizzati da due endonucleasi, *Drosha* e *Dicer*, entrambi le quali agiscono all'interno di complessi insieme a proteine contenenti domini in grado di legare molecole di RNA a doppio filamento (*dsRNA Binding Domains -dsRBDs*) (**Figura 8**). Le proteine *Drosha* e *Dicer* possiedono degli specifici domini catalitici RNasi di

tipo III (RIIIda, RRIIDb) conservati, che agiscono generando delle estremità 3' sporgenti di 2 nucleotidi (**Figura 8**).

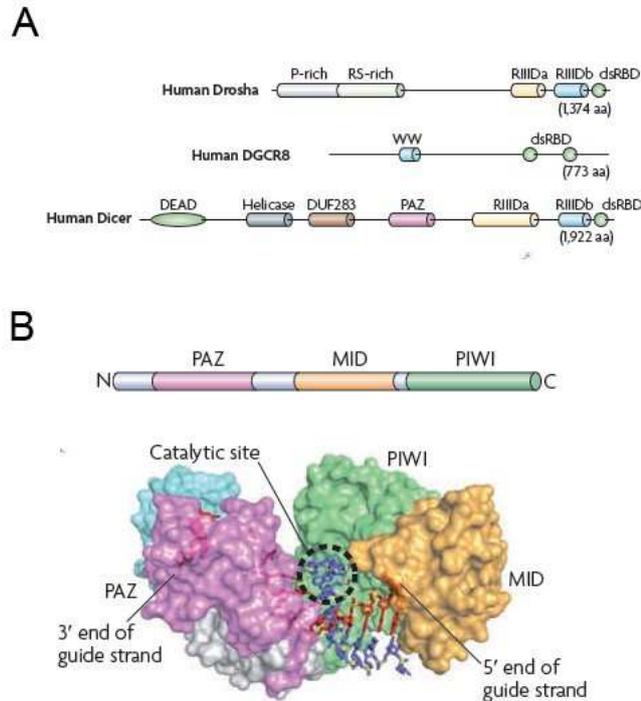


Figura 8: Domini conservati e struttura delle proteine della famiglia RNasi di tipo III (A) e Argonaute (B) [32].

La prima reazione di clivaggio avviene nel nucleo ad opera di *Drosha*, che forma un complesso con la proteina *Pasha* (DGCR8), facente parte della stessa famiglia. Il complesso *Drosha/Pasha* scinde il pri-miR generando una molecola con struttura a forcina di circa 70 nucleotidi, il pre-miR. Dopo l'iniziale clivaggio da parte di *Drosha* il pre-miR viene esportato dal nucleo al citoplasma ad opera dell'Esportina 5 (Exp5), un trasportatore nucleo/citoplasmatico GTP-dipendente [33]. Una volta all'interno del citoplasma, il precursore a forcina viene clivato da *Dicer* (all'interno di un complesso con TRBP –TAR RNA binding protein) con formazione di una

piccola molecola di RNA duplex con appaiamenti imperfetti di dimensioni variabili tra 21 e 25 nucleotidi, contenente sia il filamento maturo del miRNA che il suo filamento complementare [34, 35]. Nei mammiferi il *Dicer* interagisce con le proteine Ago1-Ago4, le quali assemblandosi con il miRNA maturo formano il complesso miRISC (*microRna Induced Silencing Complex*) che guiderà il miRNA nel riconoscimento del messaggero target. Le proteine Ago fanno parte di una antica famiglia, le Argonaute, presenti in tutti gli eucarioti e dotate anch'esse di motivi specifici: i domini PAZ e MID per l'ancoraggio dell'RNA target al 3' e 5' e il dominio PIWI per il taglio (**figura 8**). Nel complesso del miRISC, oltre alle proteine Ago, sono state trovate proteine della famiglia GW182 (TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C nei mammiferi), contenenti glicina e triptofano e del peso di 182 kDa, che sembrerebbero avere un ruolo importante nella repressione trascrizionale mediata dai miRNA [31] e agirebbero come cofattori delle Ago. Al momento in cui il *duplex* è stato formato in seguito all'azione di *Dicer*, i due filamenti portano alla formazione di due microRNA. Un meccanismo a parte è rappresentato da quello che permette la maturazione di una sottofamiglia, i *mirtrons*. Essi si trovano all'interno di introni di trascritti di seconda classe e vengono maturati dopo lo *splicing*, senza l'intervento del *Drosha* [36]. L'RNA che si genera forma una struttura a forcina che viene esportata nel citoplasma dall'Esportina 5 e tagliata direttamente dal *Dicer*.

1.8.2 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI *microRNA*

Una volta avvenuta la formazione del *miRISC*, contenente il miR-maturo, può avvenire l'appaiamento di questo con il messaggero target. Nei metazoi i siti di legame per i microRNA risiedono a livello della regione 3'UTR delle molecole di mRNA e sono spesso presenti in copie multiple, condizione necessaria affinché si abbia un'efficiente repressione della traduzione [37]. E' stato tuttavia osservato *in vitro* che il riconoscimento miRNA-mRNA avverrebbe anche nelle regioni codificanti o nel 5'UTR dell'mRNA anche se questi siti di appaiamento non avrebbero sufficiente capacità di silenziamento e svolgerebbero solo un ruolo marginale [38]. Negli animali, a differenza delle piante, l'appaiamento con il target avviene di solito in maniera imperfetta, per la presenza di *bulge* o appaiamenti non canonici GU, ma la condizione più importante affinché il silenziamento avvenga in maniera efficace, è che ci sia complementarità perfetta in una regione in 5' del miRNA detta *seed* (che va dal secondo all'ottavo nucleotide del miRNA maturo).

Una volta associato all'mRNA bersaglio, la funzione inibitoria del complesso RISC si esplica mediante diversi possibili meccanismi illustrati nella **Figura 9** che ricadono in due grandi categorie già citate:

- Inibizione della sintesi proteica
- Deadenilazione dell'mRNA cui consegue la degradazione della stessa molecola a causa di un'aumentata instabilità dell'mRNA .

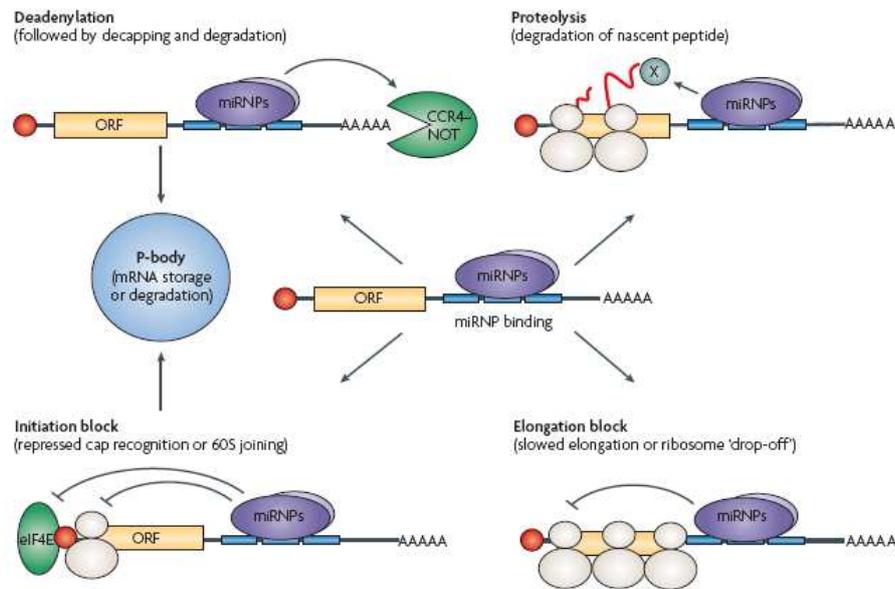


Figura 9: Rappresentazione grafica, di alcuni dei possibili meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai microRNA. Il messaggero target può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione, in diversi modi qui rappresentati [31].

La repressione tradizionale avviene nella fase di inizio della traduzione. Negli eucarioti in questa fase viene riconosciuto il cap in 5' (m7GpppN) da parte delle proteine eIF4E, eIF4F, eIF4G; quest'ultimo, legandosi alla proteina PABP1 legata alla coda di polyA favorisce l'avvicinamento delle due estremità del trascritto favorendo così il posizionamento della subunità 40S del ribosoma sul messaggero. Esperimenti con messaggeri reporter aventi cap modificati (cioè ApppN), oppure siti di riconoscimento del ribosoma (IRES) interni, hanno permesso di dimostrare che il complesso del miRISC, ed in particolare le AGO, pur avendo minor affinità per il cap di eIF4E, competono con quest'ultimo e impediscono così l'inizio della traduzione [31]. Sembra invece meno rilevante l'effetto dei miRISC sul legame della coda di polyA, poiché i dati ottenuti finora dipendono dal modello analizzato *in vitro*, così come è controverso l'effetto nelle fasi di *elongation* della traduzione. Nonostante

inizialmente si pensasse che il ruolo dei miRNA si esplicasse solo a livello di repressione traduzionale, oggi si sa che anche essi agiscono anche determinando la degradazione (*decay*) del *target*. Questa avverrebbe secondo un meccanismo ancora poco chiaro, in cui il miRISC recluterebbe i componenti di degradazione dell'RNA (esonucleasi) sul *target*: ciò inizierebbe a livello citoplasmatico e poi seguirebbe in organuli specializzati, i *P-bodies*. Queste strutture subcellulari rappresenterebbero i siti di deposito e smaltimento dei trascritti e al loro interno sono state trovate, oltre alle proteine del macchinario di degradazione, incluse le proteine Ago e GW182 [31]. È stato anche visto che in alcuni casi il processo di repressione traduzionale miRNA-mediato è reversibile e ciò potrebbe essere molto importante nei processi di tipo *switch on-off* durante lo sviluppo. In questi casi è stato osservato che la traduzione del messaggero *target* viene bloccata e riattivata a seconda delle condizioni nutrizionali, come per il miR-122 e il suo target CAT1 [39] (nelle cellule di epatoma, o a seconda della localizzazione, come per il miR-134 e LIMK1 nei neuroni [40]).

1.11 microRNA CIRCOLANTI

La scoperta dei microRNA circolanti ha aperto la possibilità di sfruttare queste molecole come biomarcatori non invasivi di varie patologie, come ad esempio le malattie oncologiche, cardiovascolari o metaboliche [41].

Il primo studio che ha portato all'identificazione dei microRNA circolanti risale al 2008, quando Chim *et al.* quantificarono i livelli di espressione dei microRNA di probabile origine placentare nel plasma di donne in gravidanza.

Poco dopo, Lawriel *et al.* riscontrarono la presenza di livelli di espressione più elevati dei miR-155, -210 e -21 nel siero di pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B, rispetto ai controlli sani. Inoltre alti livelli del miR-21 erano correlati alla sopravvivenza libera da recidiva [41].

I microRNA circolanti presentano diverse caratteristiche che li rendono dei buoni biomarcatori: sono notevolmente stabili nei campioni di siero e di plasma, in quanto protetti dall'attività delle RNasi e sono resistenti a diversi insulti esterni, quali cicli multipli di congelamento-scongelo, bollitura, condizioni di pH estreme, e conservazione prolungata [41, 42]; sono facilmente accessibili quindi possono essere ottenuti mediante metodi non invasivi [43], i loro livelli di espressione sono facilmente determinabili attraverso vari metodi, ed infine in diversi studi è stato riscontrato che cambiamenti dei livelli di espressione dei microRNA circolanti sono correlati a differenti condizioni fisiologiche e patologiche [41].

Da un punto di vista funzionale, è stato proposto che i microRNA agiscano da ormoni, essi infatti vengono secreti da parte di cellule donatrici e vengono rilasciati nel microambiente circostante e/o nel torrente circolatorio, attraverso il quale vengono trasportati a livello di cellule target distanti; agendo rispettivamente in maniera paracrina e/o endocrina. Una volta all'interno delle cellule bersaglio i microRNA regolano negativamente l'espressione genica di geni target mediante gli stessi meccanismi dei microRNA cellulari (**Figura 10**) [44].

Diversi modelli sono stati proposti al fine di chiarire l'origine, la funzione e la causa della stabilità dei miRNA circolanti.

Si ritiene che i microRNA circolanti siano rilasciati da cellule appartenenti a tessuti colpiti da diverse patologie, da cellule ematiche e da cellule tumorali [42].

Numerosi studi hanno dimostrato che una frazione dei microRNA circolanti viene secreta all'interno di diversi tipi di vescicole membranose che comprendono gli esosomi (50-100 nm), le microparticelle (>100 nm) ed i corpi apoptotici (**Figura 10**) [45].

Gli esosomi sono vescicole membranose-lipoproteiche di origine endocitica, che mediano la comunicazione intercellulare grazie all'espressione di specifici recettori di superficie ed al contenuto di miRNA. I miRNA inglobati all'interno degli esosomi, vengono trasportati a livello di cellule riceventi dove possono regolare negativamente l'espressione genica mediante gli stessi meccanismi dei microRNA cellulari [41, 42].

Secondo alcune evidenze sperimentali anche i microRNA associati alle microvescicole ed ai corpi apoptotici sono funzionalmente attivi [46].

Altri studi hanno dimostrato che un'altra porzione significativa dei microRNA circolanti sono liberi da vescicole membranose e complessati ad *RNA binding protein*, che potrebbero avere un ruolo protettivo nei confronti della degradazione, come ad esempio la proteina NPM1 o la proteina effettrice del complesso miRISC, Argonata 2 (**Figura 10**).

Turcinovich *et al.* hanno dimostrato un'associazione tra microRNA e proteina Argonata2 ed hanno inoltre ipotizzato che la maggior parte di tali complessi stabili venga semplicemente rilasciata come sottoprodotto a seguito di morte cellulare, mentre alcuni di questi complessi potrebbero essere rilasciati

attivamente dalle cellule ed agire di conseguenza in maniera paracrina, regolando negativamente l'espressione genica livello di cellule riceventi [41]allo stesso modo dei microRNA contenuti all'interno degli esosomi.

A differenza dei microRNA contenuti all'interno degli esosomi, il ruolo dei microRNA associati alle RNA *binding protein* è tuttora controverso, non è stato ancora accertato se questi siano funzionalmente attivi.

Non è stato chiarito se il contributo principale dei microRNA circolanti nei fluidi biologici sia dovuto alla frazione associata alle vescicole lipidiche o alla frazione associata alle RNA *binding protein*. Secondo alcune evidenze sperimentali, la maggior parte dei microRNA circolanti sono liberi da vescicole membranose ed associati ad AGO2 [47]; al contrario, Alessia Gallo *et al.* hanno dimostrato che la maggior parte dei microRNA circolanti nel siero e nella saliva sono contenuti all'interno degli esosomi, che la frazione esosomiale è altamente arricchita in microRNA e che l'utilizzo di tale frazione incrementa la sensibilità della rilevazione dei microRNA circolanti [48].

Vickers *et al.* hanno dimostrato che i microRNA circolanti vengono veicolati anche dalle lipoproteine. Essi hanno effettuato il *profiling* dei microRNA associati alle HDL, alle LDL ed agli esosomi nel plasma di soggetti sani o affetti da ipercolesterolemia familiare (HF). In questo modo hanno osservato che, all'interno dello stesso soggetto, il profilo d'espressione dei microRNA associati alle HDL differisce dal *pattern* dei microRNA associati agli esosomi; a differenza delle LDL, che presentano invece un miRNoma sovrapponibile a quello degli esosomi. Inoltre essi hanno riscontrato che il profilo d'espressione dei microRNA associati alle HDL dei soggetti con HF differisce rispetto a

quello associato alle HDL di soggetti sani. Risultati simili sono stati ottenuti anche in due modelli murini di aterosclerosi (topi *Ldlr* *-/-* ; *ApoE1* *-/-*) sottoposti a *High Fat Diet* rispetto ai controlli. Il contributo principale del lavoro di Vickers sta nell'aver dimostrato che i microRNA associati alle HDL sono funzionalmente attivi: Essi vengono incorporati nelle HDL con un meccanismo dipendente dalla sfingomielinasi 2 ed entrano a livello della cellula ricevente con un meccanismo mediato dal recettore *scavenger* di tipo B classe I (SRBI). Una volta all'interno della cellula bersaglio regolano negativamente i loro geni target. Per dimostrare l'attività funzionale dei microRNA associati alle HDL Vickers *et al.* hanno trattato le cellule HuH7 con le HDL isolate dal plasma dei pazienti con HF. In questo modo hanno osservato che il trattamento determinava una deregolazione di diversi mRNA, molti dei quali costituivano gli mRNA bersaglio dei 22 microRNA differenzialmente espressi nelle HDL dei pazienti con HF rispetto ai soggetti sani, ed in particolare del mir-105 [49].

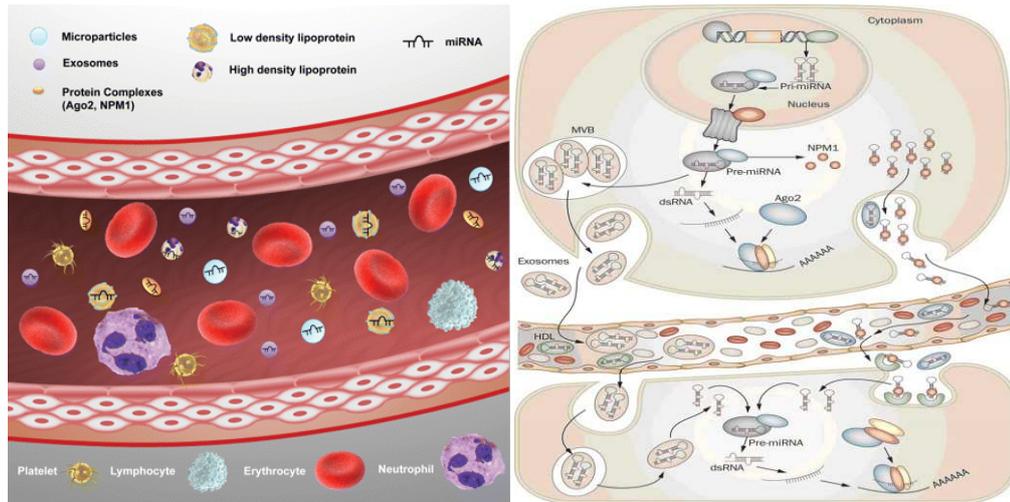


Figura 10: microRNA circolanti associati a microparticelle, esosomi, proteine e lipoproteine a sinistra [45]; attività endocrina dei microRNA circolanti a destra [50].

Diverse ipotesi sono state proposte per spiegare l'*uptake* dei microRNA circolanti da parte delle cellule bersaglio: per quanto riguarda i microRNA-associati a vescicole l'interazione potrebbe avvenire per I) endocitosi, II) fagocitosi, III) fusione diretta con la membrana plasmatica della cellula *target*; per quanto riguarda invece i microRNA associati ad RNA *binding protein* l'internalizzazione potrebbe avvenire a seguito dell'interazione con recettori specifici (**Figura 11**) [44].

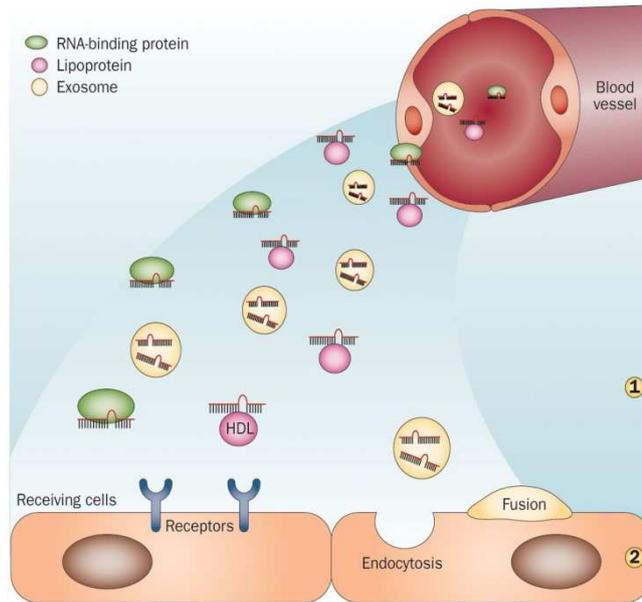


Figura 11:possibili meccanismi di *uptake* dei microRNA circolanti da parte delle cellule riceventi [51].

1.12 microRNA INTRACELLULARI COINVOLTI NELLA NAFLD

Diversi studi condotti in modelli *in vivo* e nell'uomo hanno riportato un'alterazione dell' espressione dei microRNA a livello del tessuto epatico in condizioni di NAFLD/NASH.

Questi studi hanno portato ad ipotizzare che l'alterata espressione dei microRNA possa giocare un ruolo importante nei meccanismi molecolari e cellulari associati all'insorgenza della NAFLD e alla progressione dello spettro NAFLD quali l'alterazione del metabolismo lipidico, l'infiammazione e l'apoptosi, la fibrosi (**tabella 1**).

Disease	Modulation	
	Upregulated	Downregulated
Steatosis/NASH	Pri-miR-26a-1 (in NASH), miR-122, miR-370, miR-34a, miR-16, miR-33a/b, miR-200a/b, miR-429, miR-221, miR-155, miR-181a, miR-10b, let-7b (in NASH), miR-199a (in NASH)	miR-99a/b, miR-21, miR-29c, miR-451, let-7d (in NASH), miR-199a (in steatosis), miR-128-2
Fibrosis	miR-122, miR-34a, miR-199a/a*, miR-200a/b, miR-21, miR-221/222, miR-155, let-7e	miR-16, miR-15b, miR-99b, miR-197, miR-29
Cirrhosis	miR-34a, miR-21, miR-31, miR-122, miR-221, miR-155, miR-181b	miR-29
HCC	miR-122 (serum), miR-16, miR-33, miR-21, miR-31, miR-221/222, miR-155, miR-181a/b, let-7a/b, miR-10b	miR-122 (tissue), miR-34a, miR-200a/b, miR-99a, let-7c/g, miR-199a/b-3p

NASH: nonalcoholic steatohepatitis; HCC: hepatocellular carcinoma.

Tabella 1: microRNA deregolati nello spettro NAFLD [52].

Tra i microRNA associati alla NAFLD e che hanno un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo degli acidi grassi e del colesterolo vi sono il miR-122, il miR-370, il miR-33a / miR-33b.

Il miR-122 è stato il primo microRNA ad essere associato alla regolazione del metabolismo lipidico epatico, esso è un microRNA epato-specifico dal momento che rappresenta il 70% microRNA totali espressi nel fegato [52].

Cheung *et al.* hanno identificato 46 microRNA differenzialmente espressi in biopsie di pazienti con sindrome metabolica e NASH rispetto a biopsie di soggetti sani. Tra questi microRNA differenzialmente espressi il miR-122 era significativamente sottoespresso del 63 % nei pazienti affetti da NASH rispetto ai controlli. Mediante esperimenti funzionali di silenziamento e sovraespressione *in vitro* in cellule HepG2 e HuH7 Cheung *et al.* hanno dimostrato che il miR-122 è in grado di regolare direttamente geni coinvolti nella lipogenesi e nella biosintesi del colesterolo, in particolare SREBP-1c, SREBP-2 ed i loro target a valle FAS e HMGCR rispettivamente [53].

Studi precedenti sul silenziamento transiente o permanente del miR-122 *in vivo* nei topi avevano portato a risultati contrastanti tra loro. Esau *et al.* hanno dimostrato che il silenziamento transiente del miR-122 condotto *in vivo* in topi sani e/o obesi determinava un incremento dell'ossidazione degli acidi grassi, un decremento della lipogenesi e della biosintesi di colesterolo ed un decremento dei livelli circolanti di colesterolo associato alle LDL [54, 55].

Contrariamente a tali risultati, studi successivi avevano dimostrato che l'inibizione permanente del mir-122 in modelli murini *knock-out* per il gene miR-122 determinava un incremento della lipogenesi ed un conseguente incremento dell'accumulo di lipidi a livello epatico, inoltre il decremento dei livelli di colesterolo era associato sia alle LDL che alle HDL [56].

Un altro microRNA coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico è il miR-370. È stato infatti dimostrato che l'inibizione transiente del miR-370 nelle HepG2 determina un incremento dell'espressione genica di geni coinvolti nella lipogenesi come ad esempio *SREBP1c*. Il miR-370 presenta come target anche la *carnitine palmitoyl transferase 1a* (*Cpt1a*), coinvolta nel trasferimento degli acidi grassi all'interno del mitocondrio. Infine il miR-370 è in grado di modulare l'espressione del miR-122 [57].

Il miR 33a e il miR-33b sono due miR intronici che si trovano all'interno dei geni ospiti hSREBF2 ed hSREBF1 rispettivamente. Come descritto precedentemente, il gene hSREBF2 codifica per l'isoforma SREBP-2 che regola l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi e nell'*uptake* del colesterolo, mentre hSREBF1 codifica per le isoforme SREBP-1a e SREBP-1c che regolano l'espressione di geni coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi.

Il miR-33a e il miR-33b vengono co-espressi insieme ai loro geni ospiti e agiscono in maniera funzionalmente correlata ad essi: il miR-33a infatti regola negativamente geni coinvolti nella β -ossidazione degli acidi grassi quali CROT, HADHB, e CPT1A; ed il miR-33b regola negativamente geni coinvolti nell'efflusso del colesterolo quali: ABC-A1, ABC-G1, NP-C1 (Figura 12) [58, 59].

E' inoltre interessante riportare che il miR33* che si forma a partire dal filamento opposto al miR-33 nel pre-miR è coinvolto nella regolazione delle stesse *pathway* metaboliche, Goedeke *et al.* hanno infatti dimostrato che anche i miR-33a* e -33b* agendo a livello degli stessi geni target dei miR-33a e -33b tra cui NPC1 e CROT regolano negativamente l'efflusso di colesterolo e la lipolisi (Figura 13) [60, 61].

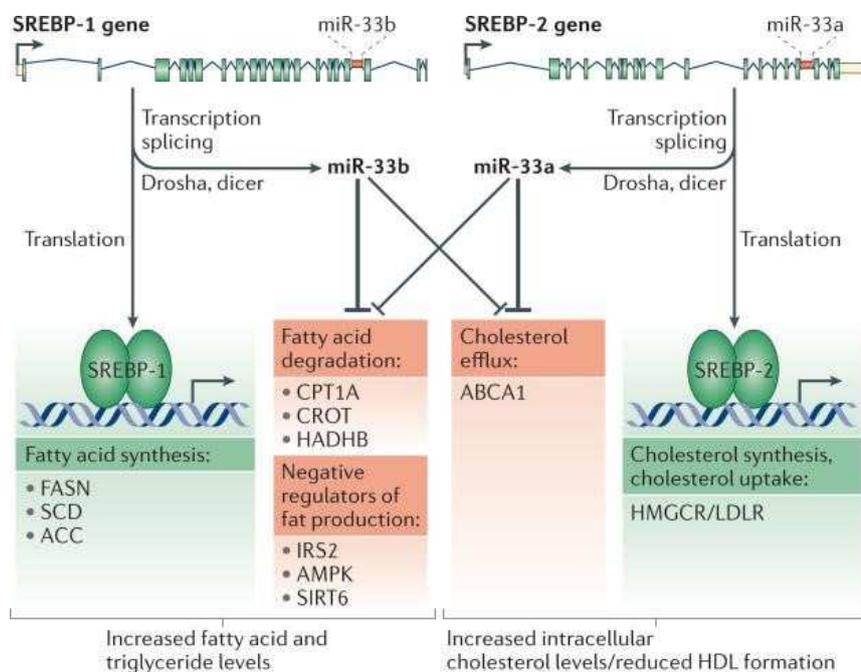


Figura 12: Attività coordinata dei microRNA intronici miR-33a /b con i loro geni ospiti SREBF1 e SREBF 2 [59].

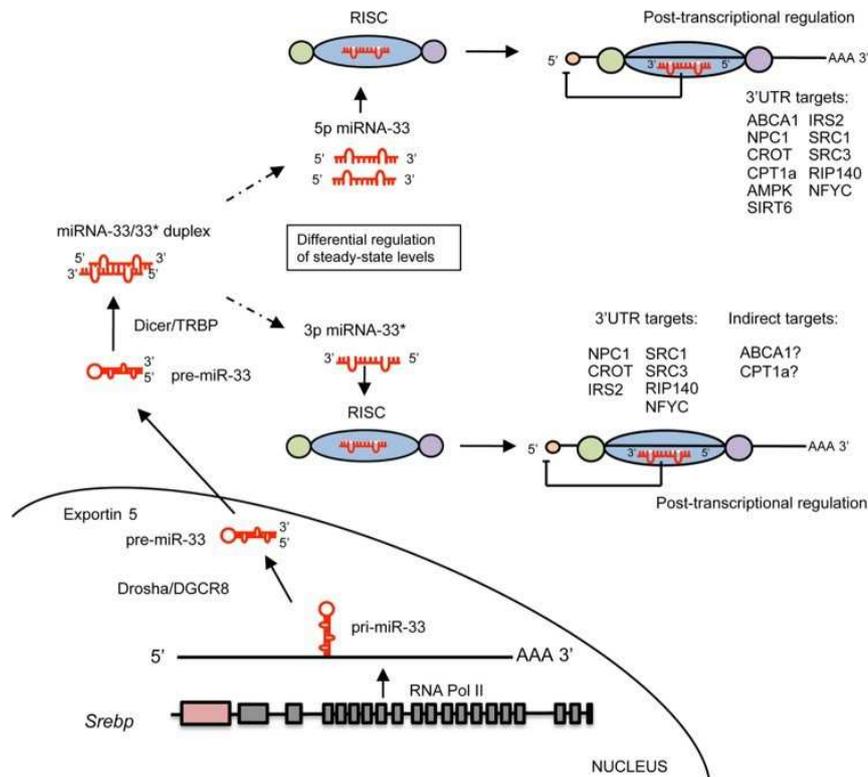


Figura 13: Attività coordinata dei microRNA miR-33a* e -33b* rispetto ai microRNA fratelli miR-33a e -33b [60].

Alcuni microRNA sono stati associati ad altri aspetti della fisiopatogenesi della NAFLD/NASH quali ad esempio l'apoptosi, l'infiammazione e la fibrosi come ad esempio il miR-34a ed il miR-21.

Il miR-34a, ha un ruolo importante nella regolazione dell'apoptosi mediante la via miR-34a/SIRT1/p53. Rui E. Castro *et al.* hanno riscontrato a livello epatico un incremento del miR-34a ed un decremento di SIRT1 associati alla progressione da NAFLD a NASH sia nell'uomo che in modelli *in vivo* di ratto.

Il miR-34a è un inibitore della deacetilasi NAD-dipendente SIRT1 e a sua volta SIRT1 è un inibitore dell'espressione del miR-34a.

SIRT1 inibisce l'espressione del mir-34a attraverso tre diversi meccanismi: I) mediante deacetilazione diretta del suo promotore; II) mediante deacetilazione

ed inattivazione di p53 che è un attivatore trascrizionale dell'espressione del miR-34a; III) mediante attivazione di HSP che sequestra p53 dal promotore che regola l'espressione del miR-34a. La sovraespressione del miR-34a che avviene nella NASH quindi determina l'inibizione di SIRT1 che a sua volta aumenta la trascrizione e l'acetilazione di p53 determinando l'incremento dell'espressione di geni proapoptotici (**Figura 14**) [58, 62].

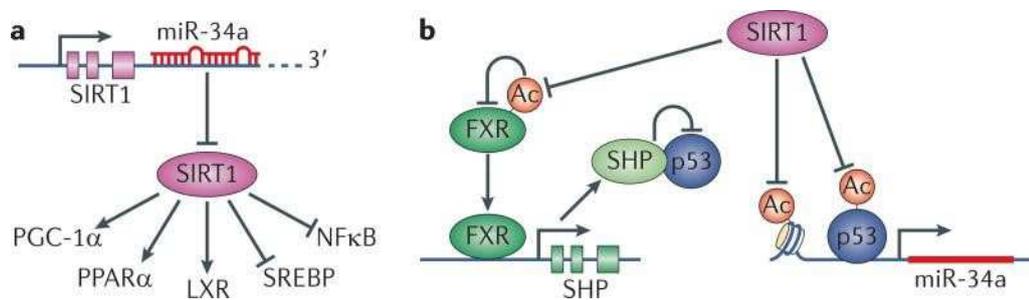


Figura 14: pathway miR-34a/SIRT1/p53 [58].

È stato recentemente dimostrato che il miR-34a oltre ad essere coinvolto nella lipo-apoptosi è coinvolto anche nella regolazione dell'accumulo lipidico mediante un meccanismo PPAR- alpha mediato.

Ding *et al.* hanno infatti dimostrato che l'inibizione del miR-34a mediante miRNA-*inhibitor* (sovraespresso in condizioni di NAFLD) sia *in vitro* in cellule L02 rese steatosiche, mediante trattamento con oleato:palmitato, sia *in vivo* in topi c57bl/6 sottoposti a *High Fat Diet* determina I) incremento dei livelli di espressione e proteici di PPAR α; II) incremento dell'espressione dei geni regolati da PPAR α coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi III) incremento della fosforilazione di AMPK. Questi eventi si traducono in un

decremento dell'accumulo lipidico e di conseguenza un miglioramento della steatosi [63].

Un esempio di microRNA coinvolto nell'infiammazione e nella fibrosi e che agisce anch'esso con un meccanismo PPAR α mediato è il miR-21.

Loyer *et al.* hanno infatti dimostrato che l'inibizione del miR-21 mediante miRNA-*inhibitor* (sovraespresso in condizioni di NASH) in vivo in topi Ldlr-/- sottoposti a *High Fat Diet* HFD ed in topi *wilde type* sottoposti a *Methionine Choline-deficient Diet* (MCD) determina una riduzione dei *marker* di danno cellulare di fibrosi e di infiammazione in assenza di un'alterazione dell'accumulo lipidico. Tali risultati invece non venivano riprodotti in topi con delezione del gene PPAR α [64].

1.12 microRNA CIRCOLANTI E NAFLD

Negli ultimi due anni si è sviluppata una nuova linea di ricerca volta a valutare l'alterazione dell'espressione dei microRNA circolanti nel siero dal momento che questi potrebbero rappresentare dei biomarcatori utili ai fini della diagnosi della NAFLD e della diagnosi differenziale tra NAFLD e NASH .

Youwen Tan *et al* hanno effettuato il *profiling* dei microRNA mediante *Next Generation Sequencing* su 20 pazienti affetti da NAFLD e 20 controlli sani, successivamente hanno validato la sovraespressione dei miR: miR-122-5p , -1290,-27b-3p, -192-5p, -148a-3p, -miR-99a-5p mediante saggi singoli in *Real-Time* PCR in una coorte complessiva di 275 pazienti NAFLD e 190 controlli sani [65].

Mehmet Celikbilek *et al.* hanno analizzato l'espressione di un *set* ristretto di 8 microRNA in 20 pazienti NAFLD con diagnosi accertata mediante biopsia, rispetto a 20 soggetti sani. Tra i microRNA analizzati hanno riscontrato una sottoespressione dei miR-181d, -99a, -197 e -146b nei pazienti NAFLD rispetto ai controlli [66].

In uno studio molto recente [67] Norio Akuta *et al.* hanno analizzato i livelli di espressione sierici del miR-122 in pazienti NAFLD che sono andati incontro a due prelievi biopsici seriali. In questo modo hanno riscontrato che i pazienti che andavano incontro ad un miglioramento degli *score* istopatologici presentavano un decremento dei livelli di espressione del miR-122 alla seconda biopsia rispetto alla prima biopsia. Inoltre vi era un'associazione significativa tra il rapporto dei livelli di espressione del miR-122 (alla seconda biopsia rispetto alla prima) ed i cambiamenti degli *score* istopatologici. Gli autori hanno infine riscontrato un'associazione anche tra il rapporto dei livelli di espressione del miR-122 ed i parametri clinici di *routine* quali i livelli di aspartato aminotransferasi ed alanina aminotransferasi.

Il primo tentativo dell'utilizzo dei microRNA circolanti come biomarcatori di diagnosi differenziale e di progressione da NAFLD e NASH è stato effettuato da Pirola *et al.* nel 2015 [68].

Essi hanno effettuato il *profiling* di un set di 84 microRNA in pazienti affetti da NAFLD e da NASH rispetto ai controlli sani (n=48), successivamente hanno confermato la deregolazione dei seguenti microRNA su una coorte di pazienti indipendente (n=96): miR-122, -192, -19a, -19b, -125 e -375. Tra questi microRNA solamente tre, ovvero il miR-122, -192 e miR-375 erano associati

in maniera statisticamente significativa alla severità istologica della patologia e significativamente sovraespressi nei pazienti affetti da NASH rispetto ai pazienti con NAFLD.

Successivamente Becker *et al* hanno fornito un'ulteriore validazione dei microRNA miR-122 e -192 come indicatori della severità istologica della patologia [69].

In particolare essi hanno analizzato l'alterazione dell'espressione genica di 4 microRNA: miR-122, -192, -21, -223 in 137 pazienti NAFLD con obesità moderata o con obesità severa (di cui 87 NASH e 50 *Simple Steatosis SS*) rispetto a 61 controlli, ed hanno analizzato la correlazione tra i loro livelli di espressione ed i livelli di biomarcatori di *routine* quali AST, ALT ed i frammenti CK18-Asp396, rilasciati dagli epatociti durante l'apoptosi. Tra i microRNA analizzati, i microRNA 122 e 192 erano sovraespressi nei pazienti NASH con obesità severa rispetto ai pazienti SS con obesità severa. Questa deregolazione invece non veniva confermata nel confronto NASH/SS nei pazienti con obesità moderata. Il miR-21 era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai pazienti SS con obesità sia moderata che severa. Il miR-223 era sovraespresso nei pazienti NASH rispetto ai controlli, ma non era in grado di discriminare tra i due fenotipi patologici.

Inoltre i livelli di espressione dei miR -122 e -192 presentavano una correlazione positiva con i livelli di ALT, CK18-Asp396 e con il NAS *score* ed i livelli del miR-21 presentavano una correlazione positiva con ALT ed il NAS *score*.

La combinazione di entrambi i due tipi di biomarcatori (microRNA e biomarcatori di *routine*) portava ad una sensibilità del 93% ed una specificità dell'83 % [69].

In uno studio molto recente [70], Xiao-Lin Liu *et al.* hanno riscontrato un incremento di espressione dei microRNA miR-122, -192, -34a e -16 in pazienti affetti da NAFLD (con diagnosi accertata mediante biopsia epatica n=48) rispetto ai soggetti di controllo sani (n=37); tra questi microRNA inoltre i microRNA miR-122,-16 e -34a erano in grado di discriminare tra i pazienti affetti da NAFLD (n=17) ed i pazienti affetti da NASH (n=31). Gli autori hanno inoltre riscontrato che il miR-34a presentava un'efficienza diagnostica per la condizione di NASH superiore rispetto a quella di altri biomarcatori clinici già noti, in particolare l'alanina aminotransferasi e la citocheratina-18.

2. OBIETTIVI

Gli obiettivi principali di questo progetto di ricerca sono stati i seguenti:

-Validare due modelli *in vitro* differenziali per la condizione di NAFLD (HepG2 trattate con una miscela di Oleato:Palmitato in rapporto 2:1) e per la condizione di NASH (HepG2 trattate con Palmitato).

-Analizzare l'alterazione del miRNoma intracellulare ed extracellulare in entrambi i modelli *in vitro* allo scopo di identificare microRNA intracellulari differenzialmente espressi associati ai meccanismi di insorgenza e di progressione da NAFLD a NASH e allo scopo di identificare microRNA extracellulari (secreti nel mezzo di coltura) epato-specifici differenzialmente espressi che possano rappresentare, se validati *in vivo* in campioni di siero umani, dei biomarcatori di diagnosi differenziale tra NAFLD e NASH.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LINEA CELLULARE

La linea cellulare di epatocarcinoma HepG2 è stata acquistata dall' ATCC (*American Type Culture Collection*). La caratterizzazione e la validazione della linea cellulare sono state eseguite dalla banca di cellule. E' stata verificata l'assenza di contaminazione da micoplasma mediante *Hoechst staining* e PCR. Le cellule sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO₂ in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), supplementato con il 7% di FBS (*Fetal Bovine Serum*), 100 U penicillina/mL , 100 µg streptomycin/mL e 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich). L'FBS è stato privato da esosomi mediante ultracentrifugazione. Più in dettaglio l'FBS è stato centrifugato a 3500 rpm per 15 minuti allo scopo di rimuovere detriti ed impurità . Successivamente il surnatante è stato sottoposto a due cicli di ultracentrifuga (*Beckman L8-70M*), al fine di eliminare ulteriori impurità e di permettere la sedimentazione di un *pellet* esosomiale. La prima ultracentrifugazione è stata effettuata a 14400 rpm, a 4°C per 35 minuti. Successivamente, il surnatante è stato filtrato con filtri da 0.22 µM ed il filtrato ottenuto è stato poi sottoposto alla seconda ultracentrifugazione a 28000 rpm, a 4°C per 1 ora e 10 minuti [71].

Le cellule in coltura sono state tripsinizzate due volte a settimana ed il terreno è stato cambiato ogni due giorni. Per gli esperimenti le cellule sono state utilizzate al 75% di confluenza.

3.2 INDUZIONE DELL'ACCUMULO LIPIDICO NELLE CELLULE HEPG2

Sono state preparate delle soluzioni stock di Oleato (OA) e di Palmitato (PA) (Sigma-Aldrich) alla concentrazione finale di 50 mM e sono state conservate a -20°C fino al momento dell'uso.

Al momento del trattamento cellulare le soluzioni *stock* sono state opportunamente diluite nel terreno di coltura contenente l'1% di FFAs BSA (*Free Fatty Acids Bovine serum Albumin*) in modo tale da ottenere le concentrazioni finali desiderate [72].

In accordo a precedenti studi [72-76], abbiamo deciso di trattare le HepG2 con OA:PA (*ratio* 2:1) in modo tale da indurre l'accumulo lipidico in assenza di lipotossicità simulando la *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD); o solamente con palmitato in modo da indurre accumulo lipidico in presenza di lipotossicità simulando quindi il danno epatico della *Non Alcoholic Steato Hepatitis* (NASH).

Le HepG2 al 75% di confluenza sono state esposte rispettivamente ad una miscela di Oleato:Palmitato o solamente al Palmitato alla concentrazione finale di 0.5 mM per 48 ore.

Gli acidi grassi sono stati aggiunti alle HepG2 24 ore dopo l'impianto. Dopo le prime 24 ore di trattamento, il mezzo di coltura condizionato è stato raccolto, centrifugato a 3500 rpm per rimuovere eventuali cellule e detriti cellulari e conservato a -80°C. Il terreno di coltura delle prime 24 ore è stato quindi sostituito con mezzo di coltura supplementato con PA o OA:PA preparato fresco al momento dell'uso (**Figura 15**). Le cellule di controllo sono state incubate con il mezzo di coltura contenente volumi equivalenti dei solventi in

cui sono stati disciolti gli acidi grassi. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato biologico.

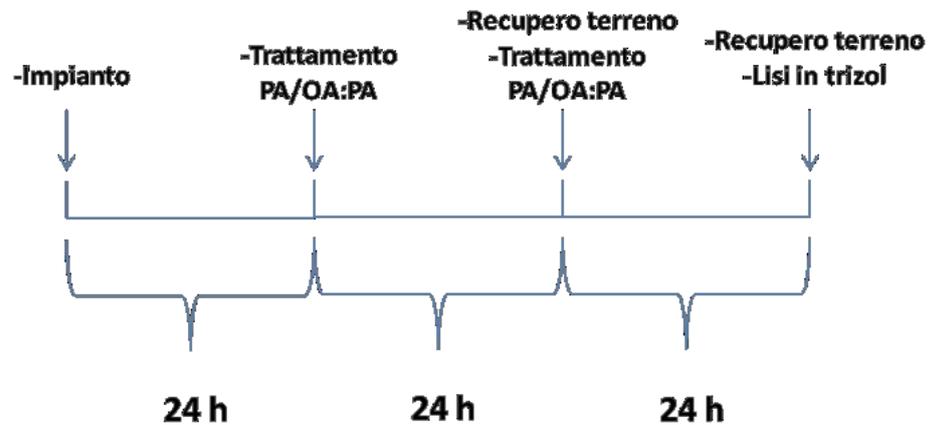


Figura 15: Workflow del trattamento cellulare per l'analisi del miRNoma.

Allo scopo di identificare le migliori risposte biologiche ai diversi trattamenti da utilizzare negli esperimenti di *profiling*, sono stati effettuati degli esperimenti preliminari in cui le cellule sono state trattate a concentrazioni crescenti (0.5 mM, 0.75 mM 1 mM) di PA o OA:PA per intervalli temporali differenti (24 e 48 ore). La vitalità cellulare e l'accumulo lipidico in risposta ai differenti trattamenti sono stati saggiati rispettivamente mediante MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid e mediante Nile Red staining. In questo modo, sono state scelte le condizioni sperimentali in cui si aveva I) un incremento significativo dell'accumulo lipidico con una lipotossicità significativa non troppo elevata nelle cellule esposte al palmitato (modello *in vitro* di NASH), II) un incremento significativo dell'accumulo lipidico senza alcuna alterazione della vitalità cellulare ed induzione di apoptosi nelle cellule trattate con la miscela OA:PA (modello *in vitro* di NAFLD). Una volta scelte le condizioni sperimentali da utilizzare per gli

esperimenti di *profiling* (OA:PA oppure PA 0.5 mM per 48 ore); il modello *in vitro* è stato ulteriormente validato analizzando la presenza di insulino-resistenza, l'incremento di intermedi lipidici associati ad insulino-resistenza (diacilglicerolo, ceramidi), l'aumento di trasportatori di membrana di acidi grassi coinvolti nell'*uptake* lipidico epatico (FAT/CD36, FATP-2) e l'aumento del loro regolatore trascrizionale PPAR γ .

3.3 NILE RED STAINING

Il contenuto lipidico intracellulare totale è stato valutato fluorimetricamente mediante il *Nile Red staining* (Sigma-Aldrich), il *Nile Red* è una sonda lipofila in grado di penetrare all'interno delle cellule vitali e di marcare gli acidi grassi nel citoplasma [77].

In particolare, le cellule sono state impiantate in piastre da 96 pozzetti nere a fondo chiaro e trattate con gli FFA. Alla fine del trattamento i *monolayer* cellulari sono state lavati due volte con PBS, ed incubati per 15 minuti a 37°C con una soluzione di *Nile Red* alla concentrazione di 1 μ g/mL in PBS. Successivamente i *monolayer* sono stati lavati con PBS e la fluorescenza è stata determinate mediante microfluorimetro *Victor X3 Multilabel Plate Reader PerkinElmer* (eccitazione 488 ed emissione 535 nm) [72]. Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato biologico.

3.4 SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE

La citotossicità degli FFA è stata valutata mediante saggio MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (Sigma-Aldrich). Un uguale numero di cellule sono state impiantate nelle *multiwell* da 96 pozzetti.

24 ore dopo l'impianto, le cellule al 75% di confluenza sono state trattate con gli FFA. Il mezzo di coltura supplementato con gli FFA è stato cambiato ogni 24 ore. Dopo le 48 ore di incubazione, 11 μ l di MTT *solution* (5 mg/mL in PBS) sono stati aggiunti ai 100 μ l di mezzo di coltura presente in ogni pozzetto. Le piastre sono state successivamente incubate a 37 °C per 4 ore, alla fine del periodo di incubazione il terreno di coltura contenente l'MTT *solution* è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 μ l di DMSO in ogni pozzetto al fine di solubilizzare i cristalli di formazano. L'assorbanza ottica è stata determinata a 570 nm mediante lo spettrofotometro per piastre *Victor X3 Multilabel Plate Reader PerkinElmer*. Le cellule di controllo sono state incubate con il mezzo a cui sono stati aggiunti volumi equivalenti dei solventi in cui sono stati disciolti gli FFA. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato biologico.

3.5 WESTERN BLOT

In uno specifico *set* di esperimenti, allo scopo di accertare lo stato di insulino-resistenza associato alle condizioni di NAFLD e di NASH, le ultime 24 ore delle 48 di trattamento con OA:PA 0.5 mM oppure solamente PA 0.5 mM sono state condotte in condizioni di *serum starvation* (deprivazione di siero) e successivamente le cellule sono state stimolate con insulina 10^{-8} M per 10 minuti.

L'estrazione proteica e l'analisi western blot sono state effettuate come precedentemente descritto [78, 79].

Brevemente, alla fine del periodo di coltura, le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo e lisate con RIPA buffer (*Radio-Immunoprecipitation Assay*). Le cellule aderenti sono state staccate dal disco e la sospensione è stata

trasferita in un tubo da centrifuga. I campioni sono stati omogeneizzati tramite sonicazione ed i lisati ottenuti sono stati centrifugati a 10000 x g a 4°C per 10 minuti. Il surnatante recuperato è stato conservato a -20°C fino alla quantificazione proteica determinata tramite *BCA assay* (Thermo Scientific, Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL U.S.A.) secondo le istruzioni del produttore. Dopo normalizzazione proteica, le proteine sono state sottoposte a SDS-PAGE, trasferite su membrane di nitrocellulosa ed incubate con specifici anticorpi: anti-p-AKT (Ser473) , anti-AKT totale (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-p-IRS1 (Tyr 612), anti-IRS1 totale ,

L'analisi western blot è stata effettuata anche per analizzare l'espressione proteica di trasportatori di membrana di acidi grassi (FAT/CD36, FATP-2) e del loro regolatore trascrizionale (PPAR γ). In questo *set* di esperimenti le cellule non sono state sottoposte a *serum starvation* e sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD36 ed anti-PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); anti-FATP-2 (Abcam, Cambridge, MA, USA); anti- β -Actina (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, USA).

Tutti i segnali di *immunoblot* sono stati visualizzati utilizzando il sistema *Odyssey Fc infra-red scanner* (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) e sono stati sottoposti ad analisi densitometrica utilizzando il software *Odyssey Image studio Lite Ver 5.2*.

3.6 RILEVAMENTO DELLE CERAMIDI MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

I segnali di immunofluorescenza delle ceramidi sono stati rilevati come precedentemente descritto [80].

A seguito del trattamento con acidi grassi (0.5mMPA, OA:PA in rapporto 2:1 per 48 ore), le cellule sono state fissate in PBS contenente paraformaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente, e successivamente sono state incubate con la *blocking solution* (*normal goat serum* 10%, *Triton X-100* 0.3% in *PBS*) per un'ora a temperatura ambiente. Successivamente le cellule fissate sono state incubate *overnight* at 4°C con l'anticorpo primario monoclonale anti-ceramide (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, USA) in PBS supplementato con *normal goat serum* 2% e 0.3% *Triton X-100*. Dopo i lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario *Alexa Fluor-549 Goat-anti-Mouse IgG* (Abcam, Cambridge, MA, USA) in PBS supplementato con *normal goat serum* 2% e 0.3% *Triton X-100* per un'ora a temperatura ambiente. Infine le cellule sono state marcate con *Hoechst 33258* per evidenziare i nuclei. Le immagini sono state acquisite digitalmente mediante l'utilizzo del microscopio a fluorescenza invertito *TI-E (Nikon)* e della *Mc DS-Qi2 Mono Dygital Camera (Nikon)*. Le immagini sono stata processate mediante il Software *Nis Element AR*.

3.7 QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO INTRACELLULARE DI DIACILGLICEROLO (DAG) MEDIANTE ELISA.

24 ore dopo l'impianto, le HepG2 sono state trattate per 48 ore con la miscela OA:PA o solamente con PA 0.5 mM. Alla fine del periodo d'incubazione, i *pellet* cellulari sono stati sonicati in PBS ed il contenuto di DAG è stato determinato utilizzando un kit ELISA specifico (*Cloude-Clone Corp, Houston, TX , USA*) secondo le istruzioni fornite dal produttore .I dati sono stati normalizzati rispetto al contenuto proteico determinato tramite *BCA assay*.

3.8 ESTRAZIONE DELL'RNA

I campioni di terreno condizionato sono stati centrifugati a 3500 rpm per 15 minuti a 4°C in modo tale da pellettare e rimuovere eventuali residui di cellule o di detriti cellulari. 1 mL di mezzo condizionato delle prime 24 ore ed 1 mL di mezzo condizionato delle successive 24 ore sono stati miscelati ed utilizzati per l'estrazione dell'RNA, effettuata mediante l'utilizzo del *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) secondo le istruzioni provviste dal fornitore.

L'RNA cellulare è stato estratto utilizzando il *Trizol* (Invitrogen) secondo le istruzioni provviste dal fornitore.

L'RNA è stato quantificato sia mediante spettrofluorimetro *Qubit* che mediante spettrofotometro [81].

3.9 TAQMAN HUMAN MICRORNA ARRAY

Per l'analisi del miRNoma sia nel terreno che nelle cellule abbiamo sfruttato la tecnologia delle *TaqMan Low Density Array* (TLDA) (Thermo Fisher Scientific) (**Figura 16**), delle *micro-fluidic cards* da 384 pozzetti che permettono di effettuare fino a 384 reazioni simultanee di *Real-Time PCR* sfruttando la tecnologia delle sonde *TaqMan*.

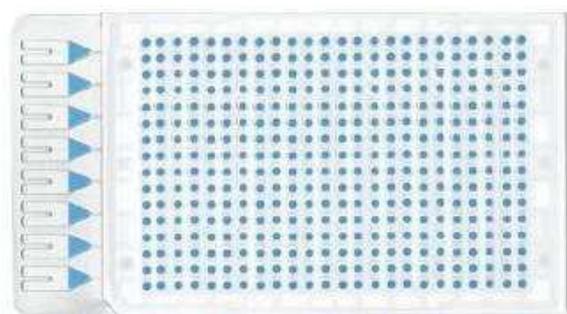


Figura 16: Thermo Fisher Scientific 7900HT Micro Fluidic Card.

Nel nostro esperimento, abbiamo utilizzato il sistema *TaqMan Human MicroRNA Array v3.0* (Thermo Fisher Scientific), che consente la quantificazione simultanea di 754 miRNA umani tramite la metodica *TaqMan MicroRNA Assays*. I microRNA sono distribuiti in 2 tipi di *card*: le *card* del pannello A contengono 377 microRNA a ampio interesse scientifico perché aventi funzione nota e/o ampiamente espressi; le *card* del pannello B contengono 288 microRNA rari e meno studiati perché hanno funzione sconosciuta o sono poco espressi (**figura 17**).

caricamento, ognuno dei quali è connesso a 48 pozzetti contenenti altrettante sonde (**Figura 18**).

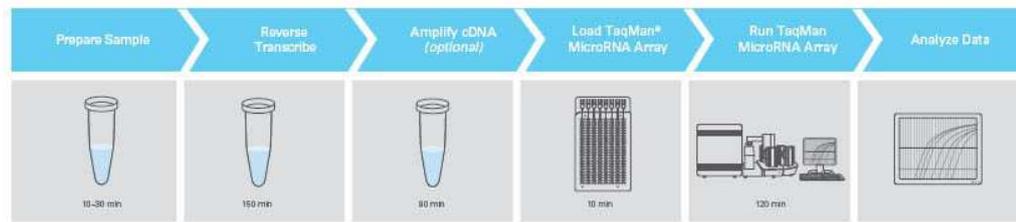


Figura 18: *Workflow* dell'esperimento per l'analisi del trascrittoma dei miRNA con *TaqMan Human MicroRNA Array v.3*.

3.10 REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE MEGAPLEX

Nella prima fase dell'analisi molecolare è stata effettuata la retrotrascrizione dei microRNA extracellulari e cellulari utilizzando il *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* ed i *primers* per l'RT *Megaplex RT Primers, Human Pool A* e *Pool B* (Thermo Fisher Scientific), un pool *primers forward* e *reverse* gene-specifici in grado di effettuare nel complesso l'RT dei microRNA contenuti in ogni pannello (**figura 19**).[81].

La reazione è stata condotta alle seguenti condizioni:

Stage	Temp	Time
Cycle (40 Cycles)	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 sec
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

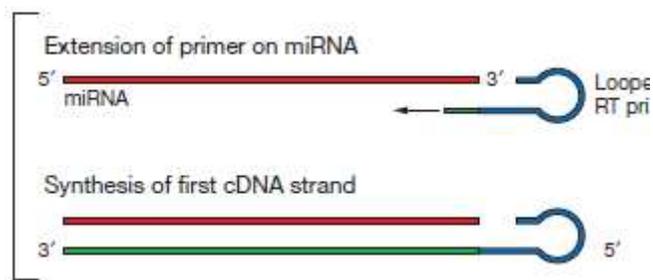


Figura 19: Reazione di retrotrascrizione.

3.11 REAZIONE DI PREAMPLIFICAZIONE

Il prodotto di RT è stato pre-amplificato utilizzando la *TaqMan PreAmpMaster Mix, 2X* ed i *Megaplex PreAmp Primers*. La reazione di pre-amplificazione consente di incrementare la quantità di cDNA disponibile per l'ultima tappa di analisi dell'espressione genica (**figura 20**) [81]. La reazione è stata condotta alle seguenti condizioni:

Stage	Temp	Time
Hold	95 °C	10 min
Hold	55 °C	2 min
Hold	72 °C	2 min
Cycle (12 Cycles)	95 °C	15 sec
	60 °C	4 min
Hold [†]	99.9 °C	10 min
Hold	4 °C	∞

A seguito della reazione i campioni sono stati diluiti mediante aggiunta di 75µl di acqua.

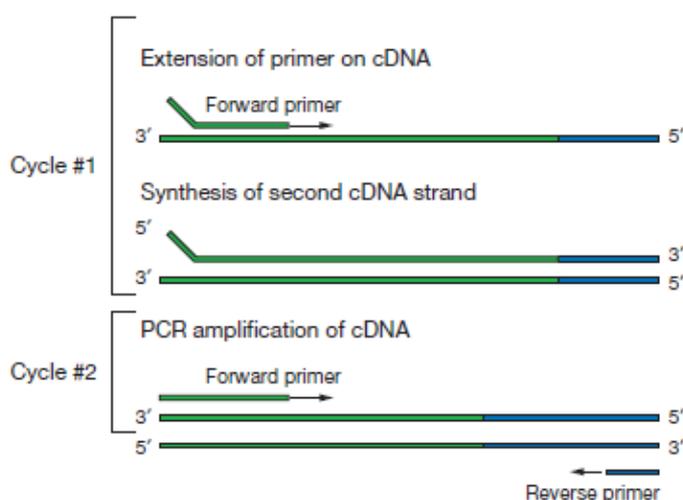


Figura 20: reazione di preamplificazione.

3.12 REAZIONE DI REAL TIME PCR

I campioni di cDNA ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi del trascrittoma dei miRNA in *Real Time PCR* utilizzando la *TaqMan Universal Master Mix II X* e le *TaqMan Low density Array (TLDA) v3.0 A and B* (Thermo Fisher Scientific).

Durante questo *step*, la DNA polimerasi presente nella *TaqMan Universal PCR Master Mix* amplifica i cDNA *target* preamplificati utilizzando *primers* sequenza-specifici e *probe* che si trovano a livello della *TaqMan microRNA Array*. La presenza del *target* in *Real Time* è rilevata attraverso il clivaggio della sonda *TaqMan* ad opera dell'attività esonucleasica 5'-3' della polimerasi. Durante questo *step*, per l'RNA cellulare, 9 μ l di campione sono stati diluiti in 444 μ l di H₂O, quindi miscelati con 450 μ l di *TaqMan Universal PCR Master Mix* e caricati negli otto canali di una *TaqMan Human MicroRNA Array v3.0*.

per l'RNA extracellulare 18 µl di campione sono stati diluiti in 435 µl di H₂O, quindi miscelati con 450 µl di *Master Mix*.

La reazione è stata condotta in una *7900HT Fast Real-Time PCR System* alle seguenti condizioni:

Step	AmpliTaq Gold Activation	PCR	
	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
		Denature	Anneal/Extend
Temperature	95 °C	95 °C	60 °C
Time	10 min	15 sec	1 min

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato biologico.

3.13 SAGGI SINGOLI TAQMAN

I risultati ottenuti a seguito della reazione di *Real Time* PCR mediante *TaqMan Low Density Array* sono stati validati mediante *single TaqMan Assay* (Thermo Fisher Scientific) utilizzando 4.58 µl di campione per l'RNA extracellulare e 50 ng di campione per l'RNA cellulare. I saggi singoli prevedono due *step*: la retrotrascrizione di un determinato microRNA mediante l'utilizzo dei *primer a stem-loop* microRNA specifici, e l'amplificazione del cDNA ottenuto mediante *real time* PCR. La struttura a *stem-loop* rende il *primer* specifico soltanto per la forma matura del microRNA target e determina la formazione di una struttura chimerica RT primer/microRNA maturo che estende l'estremità 3' del microRNA; in questo modo viene risolto il problema fondamentale nella quantificazione dei microRNA dato dalla lunghezza limitata dei microRNA

maturi, il prodotto di RT più lungo costituisce infatti un *template* adatto alla *Real Time TaqMan Assay*

Per effettuare la retrotrascrizione microRNA specifica abbiamo utilizzato il *TaqMan MicroRNA Reverse TranscriptionKit*. La reazione è stata condotta alle seguenti condizioni:

Step	Time	Temperature
Hold	30 minutes	16 °C
Hold	30 minutes	42 °C
Hold	5 minutes	85 °C
Hold	∞	4

Per quanto riguarda la reazione di qPCR in ogni pozzetto della piastra sono stati caricati 5 µl del prodotto di RT a cui sono stati aggiunti 15 µl di una mix di reazione composta da 10 µl di *TaqMan Gene Expression Master Mix II (2X)* 1 µl di *TaqMan Small RNA Assay (20X)* e 4 µl di acqua per un volume finale di 20 µl [81].

La reazione è stata condotta in una *7900HT Fast Real-Time PCR System* alle seguenti condizioni:

Step	OptionalAmpErase® UNG activity*	Enzyme Activation	PCR	
	HOLD	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
			Denature	Anneal/extend
Temperature	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Time	2 minutes	10 minutes	15 seconds	60 seconds

3.14 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE

Allo scopo di identificare i geni da utilizzare come normalizzatori affidabili per le cellule e per i mezzi di coltura ed in entrambi i trattamenti, abbiamo

utilizzato il metodo della *global median normalization*: similmente all'analisi per i *microarray*, ciascuno dei valori di Ct di ogni campione sono stati normalizzati rispetto alla mediana dei Ct della matrice. Inoltre calcolando il coefficiente di correlazione di *Pearson* tra le medie e le mediane dei Ct degli *array* e i Ct di ogni microRNA, abbiamo identificato i microRNA che presentavano un profilo di espressione più simile alle mediane e alle medie delle TLDA mediante questo approccio abbiamo identificato i seguenti normalizzatori: miR-501, miR-597, miR-345 (per le cellule nell'*Array A*) miR-1180, miR-200a*, miR-22*(per le cellule nell'*Array B*) miR-146a, miR-183, miR-452 (per i mezzi di coltura nell'*Array A*); miR-93*, miR-7*, U6, (per i mezzi di coltura nell'*Array B*). Le variazioni di espressione dei microRNA sono state calcolate applicando il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ e utilizzando i microRNA menzionati sopra come controlli [81, 82].

3.15 ANALISI STATISTICA

Per identificare i microRNA DE, abbiamo applicato il *paired test* tra ΔCt , mediante l'uso del *Significance of Microarrays Analysis (SAM)* (<http://www.tm4.org>), utilizzando i seguenti parametri: *p-value* basato su 100 permutazioni; *imputation engine: K-nearest neighbours 10 neighbours*; *false discovery rate* <0.15. Abbiamo effettuato diversi confronti sia per i microRNA extracellulari che per i microRNA cellulari: (1) PA e OA:PA rispetto ai controlli corrispondenti non trattati; (2) PA rispetto ad OA:PA. Abbiamo accettato come attendibili solo i microRNA differenzialmente espressi concordanti per tutti i controlli endogeni.

I dati di espressione nella sezione risultati sono mostrati come media della quantità relativa (RQ) di tutti i valori di RQ, calcolati per ogni controllo endogeno rispetto ai controlli normali. I valori di RQ inferiori ad uno sono stati convertiti in valori negativi di *fold change* attraverso la seguente formula: $-1/RQ$. Il *t-test* (*p value* <0.05) è stato utilizzato per valutare statisticamente le differenze di espressione dei microRNA nei saggi singoli *TaqMan* di validazione [81, 82].

3.16 ANALISI DEI TARGET DEI microRNA

I *target* validati sperimentalmente dei microRNA DE sono stati estratti da *Tarbase v7.0*. [83]. L'identificazione delle *Gene Ontologies* statisticamente significative e delle *pathway* molecolari, in cui sono coinvolti i *target* dei miRNA DE, sono state ottenute mediante l'utilizzo di *FatiGo* (*GO Biological Process, GO Molecular Function, Biocarta, KEGG e Reactome*) dal server *Babelomics 4.3* [84].

3.17 COSTRUZIONE DELLE NETWORK

Le *network* molecolari sono state costruite a partire dai *target* validati dei microRNA DE mediante l'utilizzo di *Cytoscape 3.2*. [85]. Le interazioni fisiche tra le proteine sono state ottenute mediante l'utilizzo del *plug-in Genemania* [86]. L'analisi di centralità è stata effettuata mediante il *Plugin CentiScaPe v.1.21*, dove i parametri di *Betweenness, Closeness, e Degree* sono stati utilizzati per identificare i nodi più centrali.

3.18 ANALISI DELLE PATHWAY

Abbiamo utilizzato una nuova metodologia denominata MITHrIL (*Mirna enrIched paTHway Impact anaLysis*) per l'analisi di perturbazione delle *pathway*. MITHrIL estende le *pathway* di KEGG aggiungendo elementi regolatori mancanti come i microRNA, e le loro interazioni con i geni. Questo metodo, prendendo come *input* i valori di espressione dei geni target e/o dei microRNA, raggruppa le *pathway* a seconda del loro livello di deregolazione e fornisce la significatività statistica corrispondente (*p-values*) [87].

3.19 ANALISI DI ESPRESSIONE DEI TARGET DEI microRNA.

L'analisi di espressione di un *set* di target dei microRNA differenzialmente espressi precedentemente identificati, è stata effettuata tramite *Power Sybr Green One-Step Real Time PCR* (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI, Italy). I target dei microRNA sono stati identificati attraverso differenti analisi computazionali (MITHrIL, Tarbase, miRTarbase). Il gene codificante per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stato utilizzato come normalizzatore.

4. RISULTATI

4.1 ACCUMULO LIPIDICO DELLE HEPG2 TRATTATE CON DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI FFA

Abbiamo analizzato lo sviluppo dell'accumulo lipidico in modelli *in vitro* di NAFLD e di NASH.

Le HepG2 sono state esposte a concentrazioni crescenti di palmitato o ad una miscela di oleato:palmitato (0.5 mM, 0.75mM, 1 mM) in rapporto 2:1 per 24 e per 48 ore.

Come mostrato nella **Figura 21**, l'accumulo lipidico era evidente nelle cellule esposte agli FFA sia dopo 24 che dopo 48 ore di trattamento come indicato dal *Nile red staining*. L'incremento della fluorescenza del *Nile Red* era proporzionale al tempo di incubazione ed alla concentrazione degli FFA.

Le HepG2 esposte a concentrazioni crescenti sviluppavano un incremento dell'accumulo lipidico tempo- e dose-dipendente, ad eccezione della condizione Palmitato 1mM a 48 ore che mostrava un accumulo lipidico inferiore rispetto a 0.75 mM PA a 48 ore, probabilmente a causa dell' elevata citotossicità del Palmitato a questa concentrazione e a questo intervallo di tempo.

4.2 CITOTOSSICITÀ DEGLI FFA

La citotossicità in risposta a concentrazioni crescenti della miscela OA:PA o solamente PA (0.5mM, 0.75mM, 1mM) è stata analizzata dopo 24 o 48 ore di trattamento.

I risultati mostrano che questi due tipi di trattamento determinano effetti citotossici differenti. Come mostrato nella **Figura 21**, La co-incubazione con entrambi gli FFA (OA:PA) non determinava alcun effetto citotossico rispetto ai controlli corrispondenti sia a 24 che a 48 ore; al contrario il PA determinava un lieve decremento della vitalità cellulare già dopo trattamento per 24 ore a 0.5 mM (vitalità cellulare 84%); il decremento della vitalità cellulare indotto dal palmitato era dose-dipendente sia a 24 che a 48 ore. Ad eccezione della condizione 0.5 mM per 48 ore, la citotossicità era tempo dipendente, maggiore quindi a 48 ore rispetto che a 24 ore (**Figura 21**). A causa dell'elevata citotossicità del Palmitato dose-dipendente, per effettuare gli esperimenti di *profiling*, abbiamo scelto la concentrazione più bassa di Palmitato (0.5 mM) per 48 ore in modo tale da ottenere un accumulo lipidico significativo ed i più bassi livelli di citotossicità. Allo stesso modo abbiamo scelto la condizione OA:PA 0.5 mM per 48 ore.

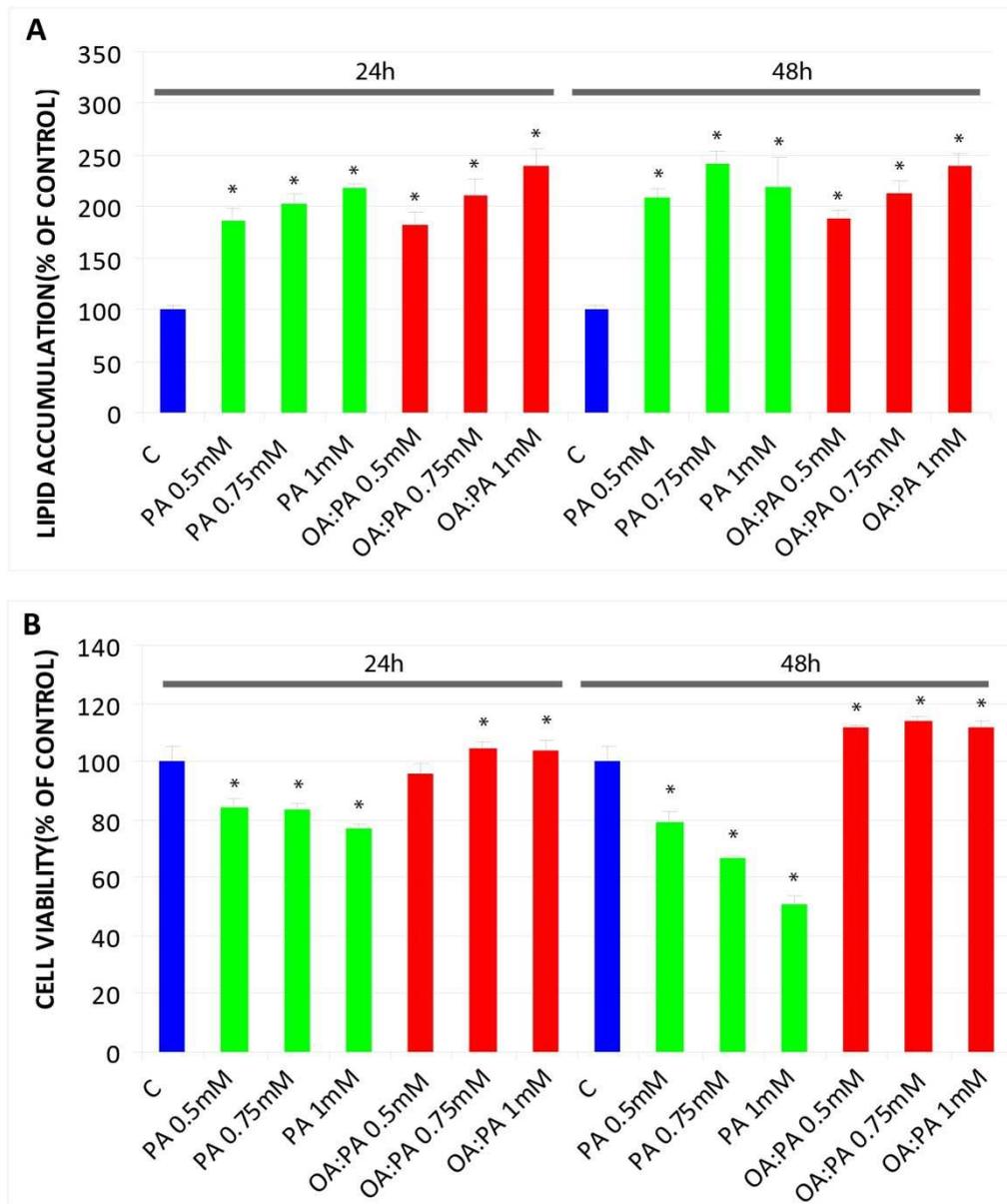


Figura 21: (A) Accumulo lipidico nelle HepG2 dose- e tempo-dipendente indotto dai trattamenti con FFA. Mediante *Nile Red staining* è stato saggiato l'accumulo lipidico delle HepG2 determinato dal trattamento con la miscela OA:PA o solo con PA a concentrazioni crescenti (0.5mM, 0.75 mM, 1mM) a 24 e a 48 ore. I dati sono espressi come medie \pm deviazione standard della fluorescenza (Ex/Em=485/535 nm) in % rispetto al controllo. Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato biologico. *: t-test $p < 0.001$ rispetto ai controlli. C=controllo; PA=Palmitato; OA:PA=Oleato:Palmitato *ratio* 2:1. **(B) Vitalità cellulare delle HepG2 in risposta ai trattamenti con FFA.** Mediante MTT è stata valutata la citotossicità nelle HepG2 della miscela a 24 e a 48 ore di trattamento. I dati sono espressi come medie \pm deviazione standard della assorbanza a 570 nm in % rispetto al controllo. Gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato biologico. *: t-test: $p < 0.05$ rispetto ai controlli. C=controllo; PA=Palmitato; OA:PA=Oleato:Palmitato *ratio* 2:1.

4.3 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON FFA SULLA FOSFORILAZIONE DI IRS-1 ED AKT INSULINO-INDOTTA.

Allo scopo di verificare se l'incubazione con *Free Fatty Acid* (OA:PA; PA) fosse in grado di indurre uno stato di insulino-resistenza e al fine di validare i nostri modelli *in vitro*, abbiamo analizzato mediante western blot i livelli di fosforilazione delle proteine coinvolte nella via del segnale insulinico intracellulare. Le HepG2 a seguito del trattamento per 48 ore con Palmitato 0.5 mM o OA:PA (rapporto 2:1) sono state stimolate con insulina 10^{-8} M per 10 minuti. Le ultime 24 ore delle 48 complessive di trattamento sono state condotte in condizioni di *serum starvation*. Come mostrato nella **figura 22**, il trattamento con acidi grassi, decrementa la fosforilazione di IRS-1 (Tyr 612) e di AKT (Ser 473). L'effetto inibitorio del Palmitato sul segnale insulinico è molto più evidente rispetto a quello indotto dalla miscela Oleato:Palmitato a supporto della maggiore gravità del fenotipo patologico.

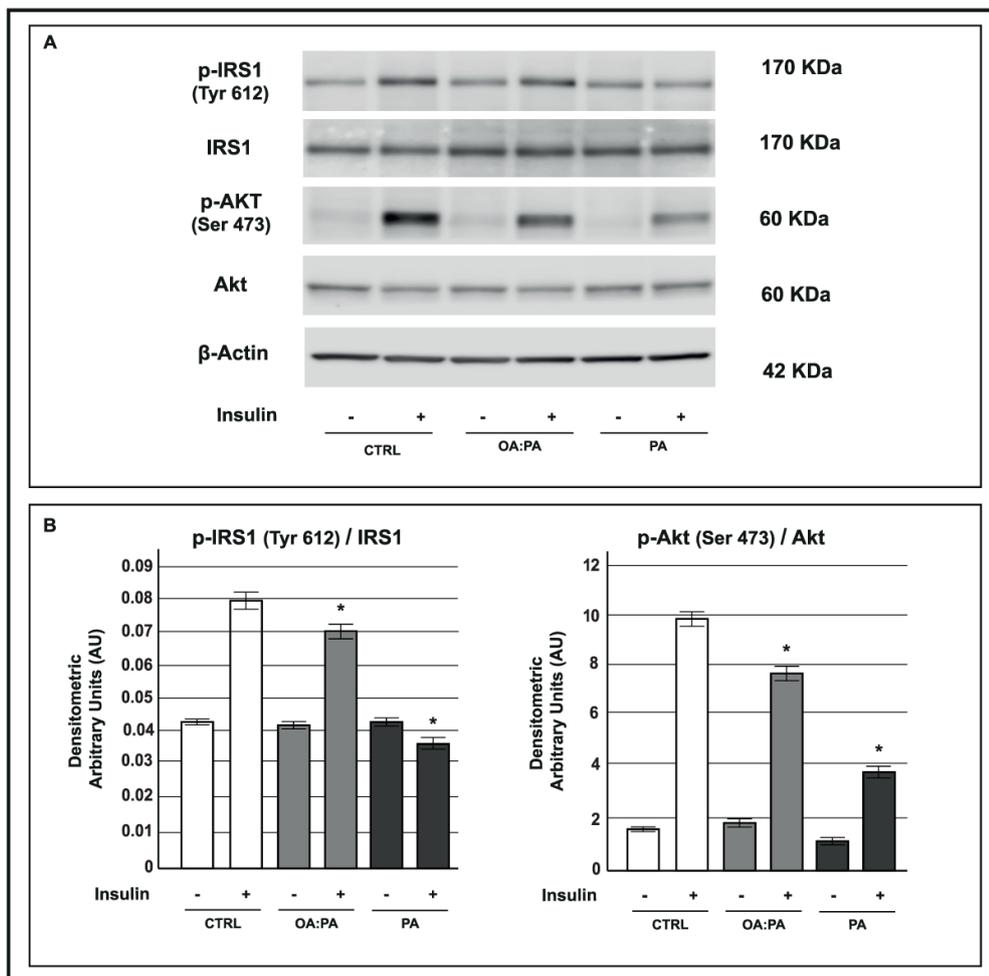


Figura 22: Analisi di IRS1-p (Tyr 612), IRS1 totale, AKT-p (Ser473), AKT totale, e β-actina tramite western blot: le HepG2 sono state esposte ad Oleato:Palmitato 2:1 o palmitato 0.5 mM per 48 ore, le ultime 24 ore di trattamento sono state condotte in condizioni di *FBS starvation*. Al termine del periodo d'incubazione, le cellule sono state sottoposte a stimolazione acuta con insulina 10^{-8} M per 10 minuti. Il **Pannello A** mostra un esperimento rappresentativo; il **pannello B** mostra le medie \pm SE (*Standard Error*) dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica di tre repliche biologiche. *, t-test $P < 0.05$ vs. gruppo di controllo. CTRL=controllo; OA:PA= Oleato:Palmitato; PA=Palmitato.

4.4 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON FFA SULL'ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA DI FAT/CD36, FATP-2 E PPARY.

Allo scopo di validare ulteriormente i nostri modelli *in vitro* abbiamo analizzato l'espressione genica e proteica di due trasportatori di acidi grassi

FAT/CD36, FATP2 e del loro regolatore trascrizionale PPAR γ [88]. Questi trasportatori in condizioni di insulino-resistenza e di steatosi contribuiscono all'*uptake* epatico di FFA aggravando ulteriormente la condizione di steatosi. Entrambi i trattamenti (OA:PA 2:1, PA 0.5 mM per 48 ore) inducevano un incremento statisticamente significativo dell'espressione proteica di FAT/CD36, FATP2 e PPAR γ rispetto ai controlli non trattati (**Fig.23 A, B**). Abbiamo inoltre riscontrato un incremento statisticamente significativo dell'espressione genica di CD36 nelle cellule trattate con PA rispetto ai controlli, e di PPARG sia nelle cellule trattate con OA:PA e/o con PA rispetto ai controlli (**Figure 23 C**).

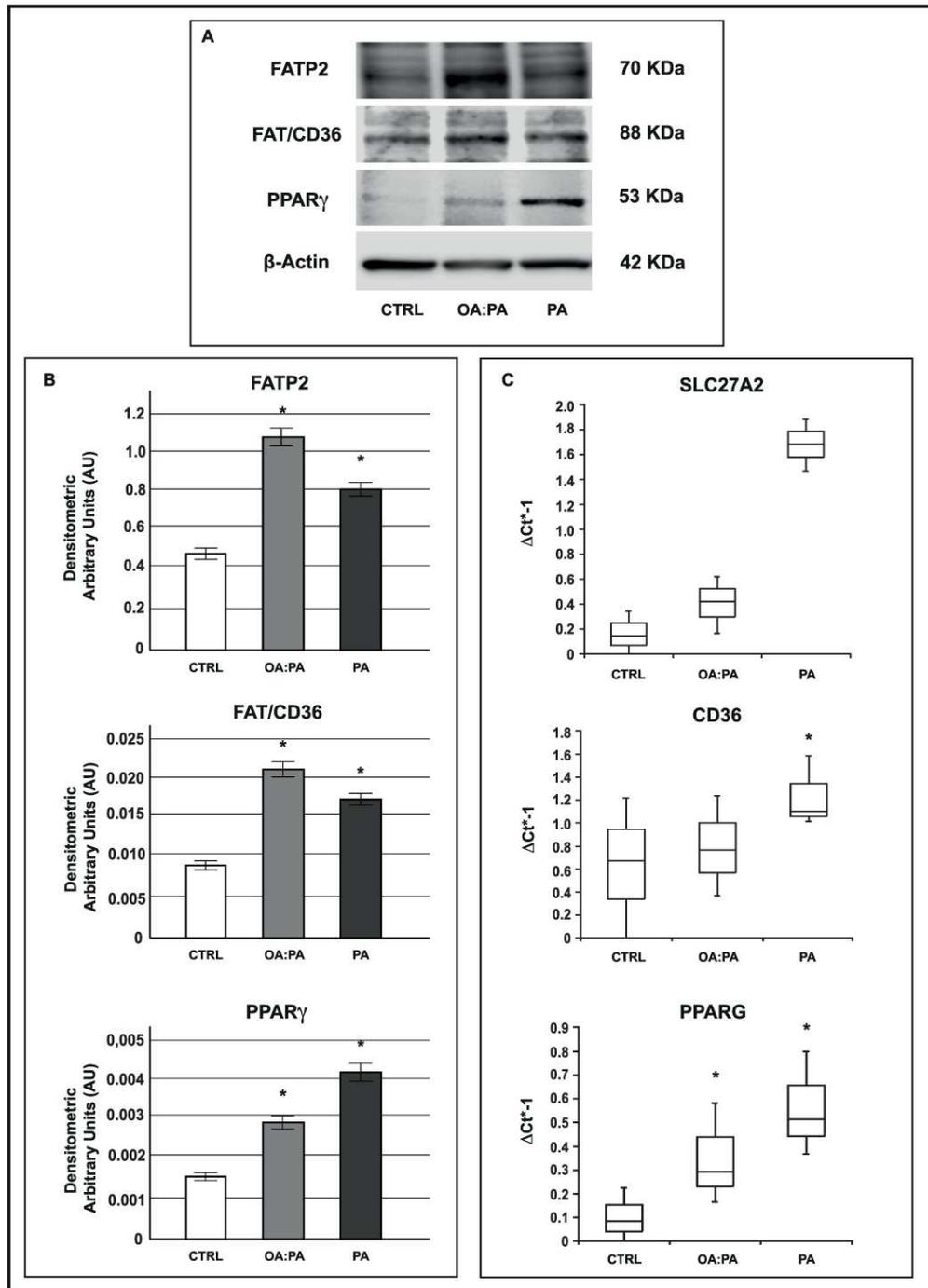


Figura 23: Espressione genica e proteica di FAT/CD36, FATP2 e PPAR γ nelle HepG2 esposte ad Oleato:Palmitato (rapporto 2:1) o solamente al Palmitato (0.5 mM) per 48 ore. Il **pannello A** mostra il western blot di un esperimento rappresentativo; il **pannello B** mostra le medie \pm SE (*Standard Error*) dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica di tre repliche biologiche. *, t-test $P < 0.05$ vs gruppo di controllo. *Box plot* e *Wisker plot* dei valori di espressione genica di CD36, SCL27A2 e PPARG nelle cellule esposte ad OA:PA e/o PA per 48 ore rispetto ai controlli (**pannello C**). I valori sugli assi delle y sono riportati come Δ Ct moltiplicati per -1 . Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato biologico. La significatività statistica dei geni differenzialmente espressi è stata valutata mediante t-test (*, $p < 0.05$). CTRL=controllo; OA:PA= Oleato:Palmitato; PA=Palmitato;.

4.5 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON FFA SUI LIVELLI INTRACELLULARI DI DAG E CERAMIDI.

Diversi studi hanno dimostrato che alcune classi di intermedi lipidici come ad esempio le ceramidi ed il diacilglicerolo (DAG) sono in grado di modulare negativamente la sensibilità insulinica agendo principalmente sulla fosforilazione di AKT e di IRS-1 rispettivamente [89]. L'incremento di queste specie lipidiche è potenzialmente correlato all'incremento di espressione dei trasportatori degli FFA presenti sulla membrana plasmatica che contribuiscono all'aumento dell'*uptake* degli FFA ed al conseguente incremento dell'accumulo lipidico [90, 91].

Sulla base di questi dati, abbiamo valutato se il trattamento con OA:PA o PA fosse in grado di indurre un aumento di tali metaboliti lipidici. Abbiamo rilevato le ceramidi mediante immunofluorescenza ed abbiamo quantificato il contenuto intracellulare di DAG mediante saggio ELISA. Entrambi i trattamenti determinavano un incremento statisticamente significativo delle ceramidi mentre solo il trattamento con palmitato induceva un incremento statisticamente significativo di DAG (**figura 24**).

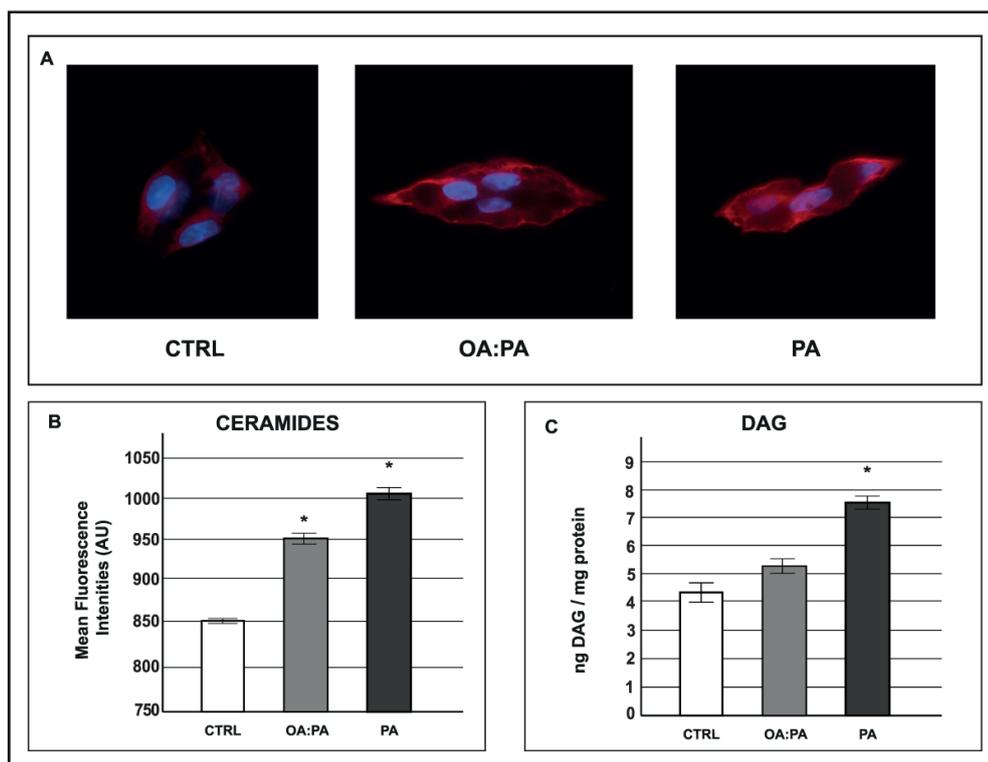


Figura 24: Rilevamento delle ceramidi tramite immunofluorescenza nelle HepG2 esposte ad oleato:palmitato o palmitato 0.5 mM per 48 ore Il pannello A mostra un esperimento rappresentativo: ceramidi in rosso. L'Hoechst 33258 è stato utilizzato per visualizzare i nuclei (blu); il pannello B mostra le medie dei valori di intensità di fluorescenza \pm SE ($n = 3$). *, t-test $P < 0.05$ vs. controllo. **Contenuto intracellulare di DAG nelle HepG2 esposte ad Oleato:Palmitato o Palmitato 0.5 mM per 48 ore (pannello C).** Le HepG2 sono state impiantate in multiwell da 6 e trattate per 48 ore con OA:PA o PA 0.5mM. Il contenuto intracellulare di DAG è stato quantificato tramite saggio ELISA. I dati rappresentati graficamente rappresentano le medie \pm SE (*Standard Error*) di tre repliche biologiche ciascuna eseguita in duplice copia; t-test (* $p < 0,05$);

4.6 RISULTATI DELLE TLDA

Mediante l'utilizzo delle TLDA abbiamo analizzato il profilo di espressione di 754 microRNA delle HepG2 e del loro mezzo di coltura allo scopo di valutare l'alterazione del miRNoma intracellulare ed extracellulare dopo 48 ore di trattamento con la miscela OA:PA o solamente PA alla concentrazione 0.5 mM (figura 25). Allo scopo di verificare la riproducibilità dei dati delle TLDA,

abbiamo calcolato il coefficiente di correlazione di *Pearson* tra i ΔCt dei triplicati biologici delle cellule e dei mezzi di coltura trattati e non trattati.

In questo modo abbiamo riscontrato un'elevata concordanza tra le tre repliche biologiche per ogni campione (media di $r = 0.83$, $p\text{-value} < 0.00001$ per i dati del miRNoma intracellulare; media di $r = 0.78$ $p\text{-value} < 0.00001$ per i dati del miRNoma extracellulare). I valori di r sono stati ottenuti utilizzando i ΔCt di tutti i microRNA analizzati mediante le *card*. Rimuovendo i valori di Ct maggiori di 35 da quest'analisi, la media di r era di 0.89 ($p\text{-value} < 0.00001$) per i dati del miRNoma intracellulare ed extracellulare. Abbiamo effettuato diversi confronti mediante il SAM allo scopo di identificare i microRNA differenzialmente espressi sia a livello intracellulare che extracellulare: (1) PA e OA:PA rispetto ai controlli corrispondenti non trattati; (2) PA rispetto ad OA:PA. Questo ultimo confronto è stato effettuato allo scopo di evidenziare i microRNA deregolati potenzialmente discriminanti tra i due modelli *in vitro* e verosimilmente tra le due condizioni patologiche.

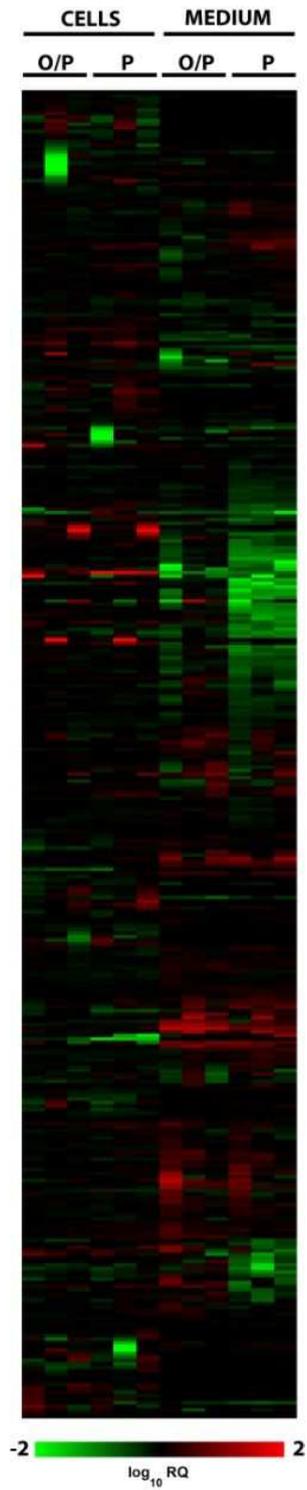


Figura 25: Matrice di espressione dei 754 microRNA intracellulari e secreti nel mezzo di coltura delle HepG2 trattate con oleato:palmitato (0.33 mM:0.165 mM) e palmitato 0.5 mM; come mostrato dalla barra verde/rossa presente al di sotto della matrice; i dati sono mostrati come \log_{10} dell'RQ normalizzato rispetto alla mediana degli *array* per ogni campione.

4.7 DISTRIBUZIONE INTRACELLULARE ED EXTRACELLULARE DEI *microRNA*.

Abbiamo analizzato la distribuzione qualitativa e quantitativa dei *microRNA* nelle cellule e nel mezzo di coltura sia allo *steady-state* che dopo i trattamenti con OA:PA o PA.

Come mostrato dal diagramma di *Venn* (**Figure 26A**), allo *steady-state* 104 *microRNA* erano presenti preferenzialmente nelle cellule; 20 *microRNA* erano presenti preferenzialmente nel mezzo di coltura (miR-1183, miR-1300, miR-136*, miR-144*, miR-214, miR-31*, miR-379, miR-380-5p, miR-381, miR-410, miR-433, miR-451, miR-485-3p, miR-492, miR-518e, miR-603, miR-605, miR-650, miR-663B miR-874); mentre 284 *miRNA* erano co-espressi nelle cellule e nel mezzo di coltura. I due differenti trattamenti non alteravano la distribuzione qualitativa intracellulare ed extracellulare rispetto ai controlli non trattati.

Abbiamo inoltre analizzato la distribuzione quantitativa intracellulare ed extracellulare allo *steady state* per entrambi i trattamenti. In questo modo abbiamo osservato che era presente una distribuzione asimmetrica tra i *microRNA* secreti e i *microRNA* cellulari sia allo *steady-state* che dopo i trattamenti. Inoltre, computando il coefficiente di correlazione di *Pearson* tra la mediana degli RQ e tutti i *microRNA* per le differenti condizioni, abbiamo riscontrato che la distribuzione quantitativa intracellulare ed extracellulare dei *microRNA* allo *steady-state* era più simile e si sovrapponeva maggiormente alla distribuzione intracellulare ed extracellulare dei *microRNA* nella

condizione OA:PA ($r = 0.7$; $p\text{-value} < 0.00001$) piuttosto che nella condizione PA ($r = 0.5$; $p\text{-value} < 0.00001$). Questi dati suggeriscono che il trattamento con il PA era in grado di perturbare in maniera più accentuata rispetto al trattamento con OA:PA la distribuzione intracellulare ed extracellulare dei microRNA rispetto allo *steady-state* (Fig.26 B,C,D).

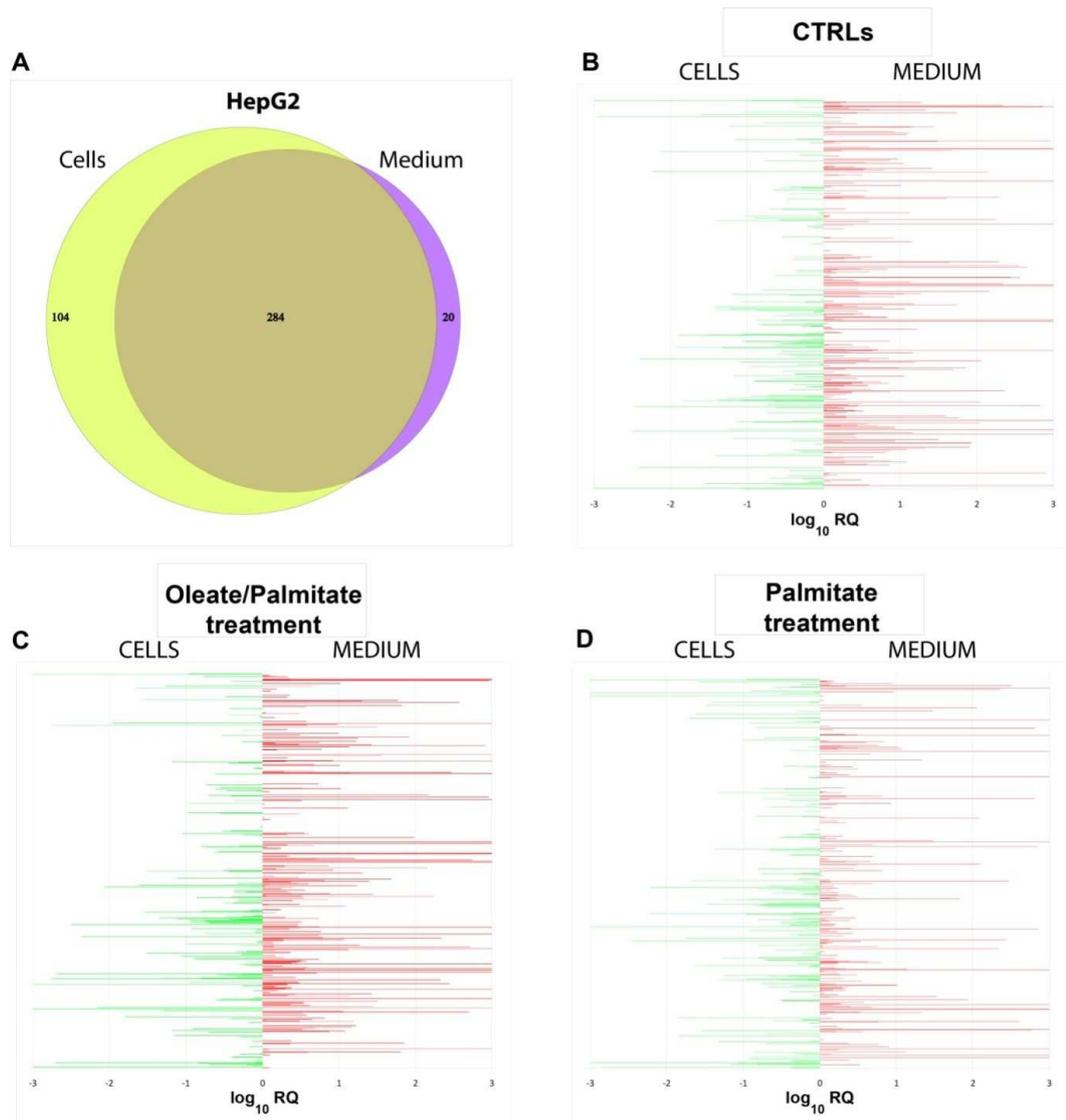


Figura 26: Rappresentazione della distribuzione qualitativa e quantitativa dei microRNA intracellulari e secreti. I diagrammi di Venn mostrano l'*overlap* tra i microRNA presenti nel mezzo condizionato e le loro cellule secernenti allo *steady state* (A). Rappresentazione quantitativa della distribuzione dei microRNA intracellulari ed extracellulari nelle cellule di controllo (B), nelle cellule trattate con Oleato:Palmitato (C), nelle cellule trattate con palmitato (D). L'asse delle x rappresenta il log₁₀ degli RQ dei microRNA secreti rispetto ai valori intracellulari.

4.8 DEREGLAZIONE DEL miRNoma INTRACELLULARE

Abbiamo identificato 7 microRNA DE in maniera statisticamente significativa nelle HepG2 esposte ad OA:PA rispetto al controllo (5 sovraespressi e 2 sottoespressi) e 39 microRNA DE nelle cellule trattate con PA rispetto al controllo (18 sovraespressi e 21 sottoespressi) (**Tabella 2**). Il secondo tipo di confronto ha portato all'identificazione di 28 microRNA DE (11 sovraespressi e 17 sottoespressi) (**Tabella 2**). Il trattamento con OA:PA induceva una variazione del 2.8% dei microRNA totali rivelati nelle cellule (388) mentre il trattamento con PA causava il 10.1% della variazione del miRNoma intracellulare.

Il 42.9% dei microRNA deregolati dal trattamento con OA:PA erano deregolati anche nel trattamento con Palmitato (microRNA: -1255B, -1226* -1274B) mentre il 7.69% dei microRNA intracellulari deregolati dal PA erano deregolati anche nel trattamento OA:PA, di conseguenza i risultati sulla deregolazione del miRNoma erano in parte sovrapponibili.

I microRNA comunemente deregolati in entrambi i trattamenti, presentavano una variazione del *Fold Change* più elevata nel trattamento con PA piuttosto che nel trattamento con OA:PA; quindi l'incremento della concentrazione di Palmitato induce una deregolazione più accentuata dei microRNA comunemente deregolati in entrambi i trattamenti.

Tabella 2: *Fold change* dei microRNA cellulari DE nelle HepG2 dopo trattamento con oleato:palmitato (ratio 2:1) o solo con palmitato. OA:PA=Oleato Palmitato, C=Controllo, PA=Palmitato, FC=Fold Change. La tabella mostra le variazioni dei microRNA maggiori o minori a 1.6 *Fold change*.

OA:PA/C	FC	PA/C	FC	PA/OP	FC
hsa-miR-1255B	2.28	hsa-miR-1290	20	hsa-miR-1290	5
hsa-miR-1226*	2.15	hsa-miR-213	5.22	hsa-miR-9*	4.24
hsa-miR-208	1.62	hsa-miR-1226*	4.71	hsa-miR-1291	3.16
hsa-miR-1274B	1.62	hsa-let-7e*	4.26	hsa-miR-213	2.83
hsa-miR-483-3p	1.62	hsa-miR-1291	3.54	hsa-miR-27a	2.63
hsa-miR-204	-1.9	hsa-miR-1274B	3.3	hsa-miR-191*	2.43
hsa-miR-146b-3p	-1.7	hsa-miR-27a	3	hsa-miR-1226*	2.25
		hsa-miR-1255B	2.7	hsa-miR-1274B	2.05
		hsa-miR-191*	2.65	hsa-miR-33a*	1.72
		hsa-miR-1274A	2.16	hsa-miR-183*	1.62
		hsa-miR-190b	2.15	hsa-miR-616	1.62
		hsa-miR-1282	1.95	hsa-miR-27a*	-6.2
		hsa-miR-33a*	1.82	hsa-miR-206	-3.1
		hsa-miR-148b*	1.79	hsa-miR-139-5p	-2.7
		hsa-miR-1303	1.78	hsa-miR-629	-2.3
		hsa-miR-30a-5p	1.66	hsa-miR-126*	-2.2
		hsa-miR-1285	1.6	hsa-miR-138	-2.1
		hsa-miR-505*	1.6	hsa-miR-586	-2.1
		hsa-miR-27a*	-7.63	hsa-miR-26a-1*	-1.9
		hsa-miR-122	-2.99	hsa-miR-199a-3p	-1.8
		hsa-miR-139-5p	-2.69	hsa-miR-483-3p	-1.8
		hsa-miR-138	-2.62	hsa-miR-885-5p	-1.8
		hsa-miR-586	-2.08	hsa-miR-500	-1.7
		hsa-miR-92a-1*	-2.06	hsa-miR-21*	-1.7
		hsa-miR-199a-3p	-1.97	hsa-miR-222	-1.7
		hsa-miR-21*	-1.93	hsa-miR-483-5p	-1.6
		hsa-miR-143	-1.92	hsa-miR-18a	-1.6
		hsa-miR-26a-1*	-1.89	hsa-miR-193b*	-1.6
		hsa-miR-193b*	-1.86		
		hsa-miR-29c	-1.8		
		dme-miR-7	-1.76		
		hsa-miR-221	-1.76		
		hsa-miR-29a	-1.74		
		hsa-miR-92a	-1.68		
		hsa-miR-362	-1.68		
		hsa-miR-199a-3p	-1.66		
		hsa-miR-210	-1.65		
		hsa-miR-429	-1.62		
		hsa-miR-25	-1.6		

4.9 DEREGLIAZIONE DEL miRNoma EXTRACELLULARE

Abbiamo identificato 31 microRNA DE nel mezzo condizionato delle cellule esposte ad OA:PA rispetto ai controlli (14 sovraespressi e 17 sottoespressi) e 59 microRNA DE nel mezzo condizionato delle cellule esposte al PA rispetto ai controlli (18 sovraespressi e 42 sottoespressi) (**tabella 3**). Il confronto tra PA rispetto ad OA:PA ha portato all'identificazione di 51 microRNA DE extracellulari (19 sovraespressi e 32 sottoespressi).

Il trattamento con OA:PA induceva una variazione del 10.20% dei microRNA totali espressi nel mezzo di coltura (304); mentre il trattamento con PA determinava una variazione del 19.41% del miRNoma extracellulare rispetto ai controlli.

Analogamente ai dati del miRNoma intracellulare, il 61.29% dei microRNA extracellulari deregolati rispetto ai controlli dal trattamento con OA:PA erano deregolati anche nel trattamento con PA; mentre il 32.20% dei microRNA secreti deregolati, rispetto ai controlli, dal trattamento con il PA erano deregolati anche nella condizione OA:PA, suggerendo *pathway* molecolari comuni attivate in risposta ai due differenti trattamenti.

In maniera simile ai dati del miRNoma intracellulare, i microRNA comunemente deregolati nei due trattamenti mostravano una deregolazione più marcata in termini di *Fold Change* nel trattamento con PA rispetto al trattamento con OA:PA (ad eccezione dei seguenti microRNA: miR-125a-5p, -99b*, -92-a-1*), di conseguenza possiamo affermare che l'incremento della

concentrazione del palmitato, anche in questo caso, induce un incremento più marcato dei microRNA comunemente deregolati da entrambi i trattamenti.

Tabella 3: *Fold Change* dei microRNA extracellulari nelle HepG2 dopo trattamento con oleato:palmitato (ratio 2:1) o solamente con palmitato. OA:PA= Oleato:Palmitato, C= Controllo, PA= Palmitato, FC= *Fold Change*. La tabella mostra i microRNA che presentano una variazione superiore o inferiore a 2 *Fold change*.

OA:PA/C	FC	PA/C	FC	PA/OA:PA	FC
hsa-miR-592	6.73	hsa-miR-1180	4.80	hsa-miR-15b	8.18
hsa-miR-320B	6.34	hsa-miR-744*	4.49	hsa-miR-324-5p	5.89
hsa-miR-1303	5.02	hsa-miR-106b*	4.48	hsa-miR-26a	5.11
hsa-miR-148b*	4.80	hsa-miR-27a*	4.04	hsa-miR-194	4.66
hsa-miR-769-5p	4.27	rno-miR-29c*	3.77	hsa-miR-455-3p	3.88
hsa-miR-106b*	3.73	hsa-miR-500	3.16	hsa-miR-1290	3.86
hsa-miR-744*	3.69	hsa-miR-26a	3.13	hsa-miR-151-5P	3.77
hsa-miR-192*	3.53	hsa-miR-192*	3.05	hsa-miR-26b	3.74
hsa-miR-1180	3.18	hsa-miR-15b	3.04	hsa-miR-28	3.69
hsa-miR-30a-5p	3.07	hsa-miR-324-5p	2.99	hsa-miR-29c	3.21
hsa-miR-1255B	3.06	hsa-miR-361	2.95	hsa-miR-27a*	3.15
hsa-miR-1291	2.70	hsa-miR-33a*	2.78	hsa-miR-361	2.97
hsa-miR-30d	2.67	hsa-miR-26b	2.68	hsa-miR-27a	2.89
hsa-miR-92a-1*	2.54	hsa-miR-148b*	2.55	hsa-miR-532-3p	2.82
hsa-miR-455-3p	-2.22	hsa-miR-663B	2.53	hsa-miR-99b*	2.61
hsa-miR-223	-2.28	hsa-miR-27b	2.45	rno-miR-29c*	2.59
hsa-miR-410	-2.30	hsa-miR-27a	2.04	hsa-miR-500	2.58
hsa-miR-126	-2.37	hsa-miR-99b*	-2.24	hsa-let-7g	2.55
hsa-miR-30c	-2.42	hsa-miR-9*	-2.37	hsa-miR-454	2.53
hsa-miR-629	-2.51	hsa-miR-362	-2.42	hsa-miR-1274A	-2.03
hsa-miR-34a	-2.52	hsa-miR-125a-5p	-2.44	hsa-miR-1227	-2.07
hsa-miR-628-3p	-2.71	hsa-miR-1274A	-2.52	hsa-miR-30a-3p	-2.30
hsa-miR-208	-2.72	hsa-miR-30c	-2.61	hsa-miR-34a	-2.33
hsa-miR-150	-2.85	hsa-miR-30b	-2.65	hsa-miR-494	-2.63
hsa-miR-885-5p	-2.85	hsa-miR-212	-2.70	hsa-miR-320B	-2.70
hsa-miR-125a-5p	-2.88	hsa-miR-484	-2.87	hsa-miR-9*	-2.93
hsa-miR-139-5p	-2.99	hsa-let-7d	-2.96	hsa-miR-375	-2.98
hsa-miR-204	-3.06	hsa-miR-92a	-3.04	hsa-miR-1274B	-3.42
hsa-miR-133a	-3.11	hsa-miR-149	-3.08	hsa-miR-328	-3.60
hsa-miR-99b*	-4.96	hsa-miR-1274B	-3.53	hsa-miR-133a	-4.16
hsa-miR-1290	-23.96	hsa-miR-328	-4.35	hsa-miR-1303	-4.25
		hsa-miR-1227	-4.85	hsa-miR-885-5p	-4.54
		hsa-miR-30a-3p	-4.89	hsa-miR-10b*	-5.11
		hsa-miR-92a-1*	-4.98	hsa-miR-592	-5.17
		hsa-miR-622	-5.47	hsa-miR-126	-5.90

	hsa-miR-375	-5.69	hsa-miR-142-3p	-6.06
	hsa-miR-34a	-6.77	hsa-miR-197	-6.33
	hsa-miR-208	-6.77	hsa-miR-410	-6.80
	hsa-miR-494	-6.79	hsa-miR-376c	-7.60
	hsa-miR-34b	-6.90	hsa-miR-139-5p	-8.31
	hsa-miR-10b*	-11.55	hsa-miR-223	-8.68
	hsa-miR-197	-12.41	hsa-miR-486	-8.81
	hsa-miR-1290	-13.95	hsa-miR-155	-9.78
	hsa-miR-885-5p	-15.28	hsa-miR-34b	-10.14
	hsa-miR-133a	-15.93	hsa-miR-92a-1*	-11.01
	hsa-miR-376c	-16.85	hsa-miR-150	-13.08
	hsa-miR-126*	-19.68	hsa-miR-126*	-19.49
	hsa-miR-155	-20.17	hsa-miR-483-3p	-19.74
	hsa-miR-136*	-21.53	hsa-miR-136*	-29.03
	hsa-miR-142-3p	-22.10	hsa-miR-409-3p	-47.72
	hsa-miR-126	-24.05	mmu-miR-495	-96.97
	hsa-miR-410	-29.41		
	hsa-miR-483-3p	-29.65		
	hsa-miR-223	-33.15		
	hsa-miR-139-5p	-35.88		
	hsa-miR-486	-56.67		
	hsa-miR-150	-58.37		
	hsa-miR-409-3p	-90.78		
	mmu-miR-495	-153.19		

4.10 CONFRONTO TRA miRNoma INTRACELLULARE ED EXTRACELLULARE

Abbiamo identificato 4 microRNA deregolati sia a livello intracellulare che a livello extracellulare a seguito del trattamento con OA:PA rispetto ai controlli e 19 microRNA deregolati sia a livello intracellulare che a livello extracellulare a seguito del trattamento con PA rispetto ai controlli (**Tabella 4**).

Tra questi microRNA DE, alcuni mostravano lo stesso *trend* di espressione all'interno e all'esterno della cellula, come ad esempio il miR-1255B* sovraespresso nelle cellule e nel mezzo di coltura a seguito di entrambi i

trattamenti, o il miR-139-5p sottoespresso sia nelle cellule che nel mezzo di coltura a seguito del trattamento con Palmitato. Altri microRNA mostravano un *trend* di espressione opposto tra l'ambiente intracellulare e l'ambiente extracellulare, come ad esempio il miR-27a*, sovraespresso nel terreno e sottoespresso nelle cellule dopo trattamento con Palmitato; o il miR-1290 sottoespresso nel mezzo di coltura e sovraespresso a livello intracellulare a seguito di trattamento con PA.

Tabella 4: *Fold change* dei microRNA comunemente deregolati a livello extracellulare ed intracellulare nelle HepG2 dopo trattamento con oleato:palmitato (ratio 2:1) o palmitato. OA:PA=Oleato Palmitato, C= Controllo, PA=Palmitato, FC M=*Fold Change* Mezzo FC C= *Fold Change* Cellule.

OA:PA/C	FC M	FC C	PA/C	FC M	FC C	PA/OA:PA	FC M	FC C
hsa-miR-1255B	3.06	2.28	hsa-miR-27a*	4.04	-7.63	hsa-miR-1290	3.86	5.00
hsa-miR-505*	-1.92	1.50	hsa-miR-15b	3.04	-1.58	hsa-miR-27a*	3.15	-6.21
hsa-miR-208	-2.72	1.62	hsa-miR-33a*	2.78	1.82	hsa-miR-27a	2.89	2.63
hsa-miR-204	-3.06	-1.93	hsa-miR-148b*	2.55	1.79	hsa-miR-183*	2.47	1.62
			hsa-miR-1291	2.43	3.54	hsa-miR-33a*	2.31	1.72
			hsa-miR-29c	2.38	-1.80	hsa-miR-629	1.89	-2.25
			hsa-miR-27a	2.04	3.00	hsa-miR-138	1.73	-2.10
			hsa-miR-1255B	2.01	2.70	hsa-miR-18a	1.53	-1.62
			hsa-miR-191*	1.96	2.65	hsa-miR-9*	-2.93	4.24
			hsa-miR-29a	1.83	-1.74	hsa-miR-1274B	-3.42	2.05
			hsa-miR-1226*	-1.59	4.71	hsa-miR-885-5p	-4.54	-1.80
			hsa-miR-362	-2.42	-1.68	hsa-miR-139-5p	-8.31	-2.68
			hsa-miR-1274A	-2.52	2.16	hsa-miR-126*	-19.49	-2.22
			hsa-miR-30b	-2.65	-1.50	hsa-miR-483-3p	-19.74	-1.83
			hsa-miR-92a	-3.04	-1.68			
			hsa-miR-1274B	-3.53	3.30			
			hsa-miR-92a-1*	-4.98	-2.06			
			hsa-miR-1290	-13.95	20.00			
			hsa-miR-139-5p	-35.88	-2.69			

4.11 VALIDAZIONE MEDIANTE SINGLE TAQMAN ASSAY

I dati del *profiling* effettuato mediante le TLDA sono stati validati mediante *Single Taqman Assay* (STA) per specifici microRNA. In questo modo abbiamo confermato la variazione dell'espressione dei seguenti microRNA: miR-126, miR-150, miR-223, miR-483-3p, and miR-1290, miR-1226* (**figure 27, 28**). I *trend* di espressione nei STA erano coerenti con i dati di *profiling*, tuttavia i valori numerici dei *Fold Change* differivano a causa delle differenze di protocollo e stechiometriche (ad esempio, sonde, preamplificazione dei campioni caricati nelle TLDA).

Allo stesso modo dei dati delle TLDA, tutti i microRNA validati mediante STA presentavano una deregolazione maggiore in termini di *Fold change* nel trattamento con palmitato rispetto al trattamento con oleato:palmitato.

Come precedentemente riportato nella sezione "materiali e metodi", per effettuare il *profiling* del miRNoma, 1 mL di mezzo condizionato delle prime 24 ore di trattamento ed 1 mL delle successive 24 ore di trattamento sono stati miscelati ed utilizzati per effettuare l'estrazione dell'RNA. Tuttavia, per valutare se la deregolazione dei microRNA fosse tempo-dipendente, abbiamo selezionato due dei microRNA maggiormente deregolati (miR-126, miR-223) e abbiamo effettuato i STA a partire dall'RNA estratto separatamente dalle 24 e dalle 48 ore dal mezzo di coltura. In questo modo abbiamo riscontrato che la deregolazione di entrambi i microRNA era tempo-dipendente sia nel trattamento con PA che nel trattamento con OA:PA (**figure 29,30**).

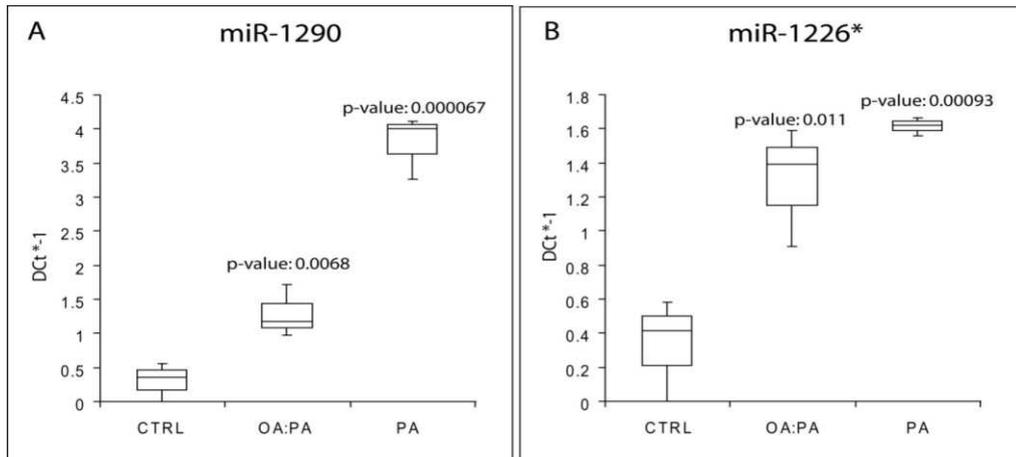


Figura 27: *Box plot e Wisker plot del miR-1290 e del miR-1226* validati mediante Single TaqMan Assay nelle cellule trattate con OA:PA e con PA rispetto ai controlli corrispondenti.* I valori sugli assi delle y sono riportati come ΔCt moltiplicati per -1 : OA:PA= Oleato:Palmitato; PA= Palmitato; CTRL=controllo. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato biologico, la significatività statistica dei microRNA DE è stata valutata mediante t-test ($p < 0.05$).

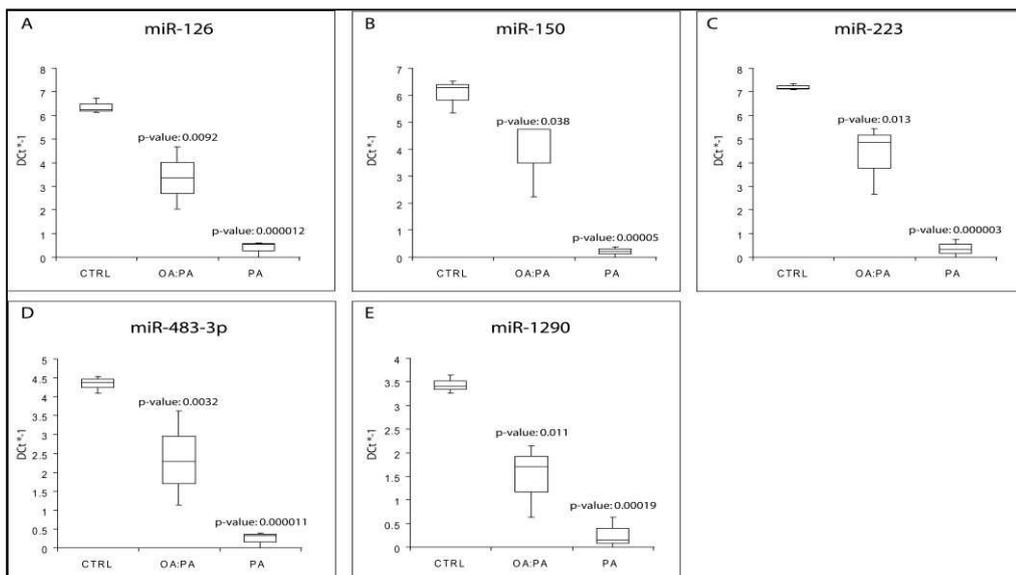


Figura 28: *Box plot e Wisker plot dei microRNA: miR-1290, miR-483-3p, miR-150 e miR-126 validati mediante Single TaqMan Assay nel mezzo di coltura condizionato delle HepG2 trattate con OA:PA o PA rispetto ai controlli corrispondenti.* I valori sugli assi delle y sono riportati come ΔCt moltiplicati per -1 : OA:PA= Oleato Palmitato; PA=Palmitato; CTRL=controllo. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato biologico. La significatività statistica dei microRNA DE è stata valutata mediante t-test ($p < 0.05$).

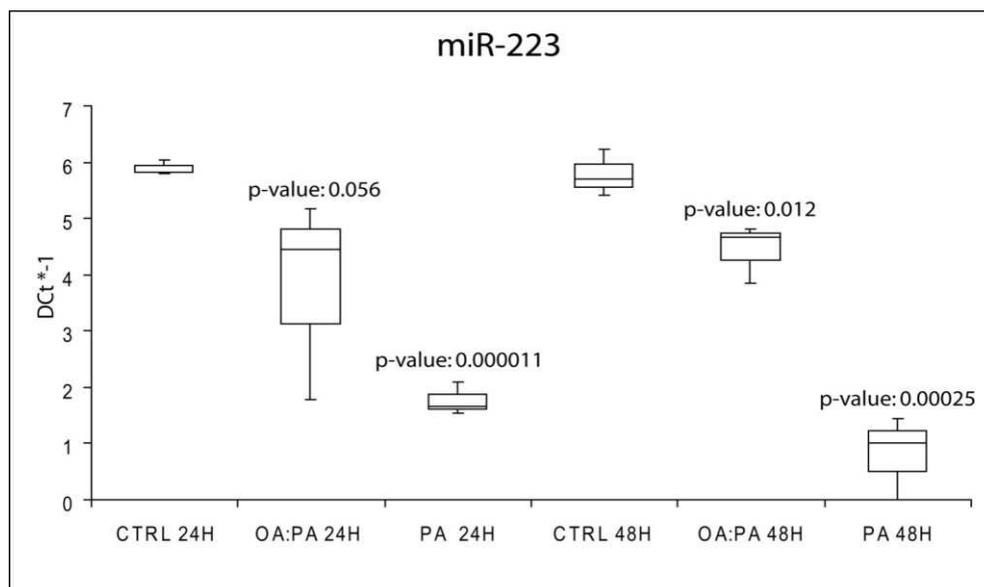


Figura 29: *Box plot e Wisker plot* del miR-223 validato mediante *Single TaqMan Assay* nel mezzo condizionato derivante dalle cellule trattate con OA:PA e con PA rispetto ai controlli corrispondenti, a 24 e 48 ore separatamente. I valori sull'asse delle y sono riportati come ΔCt moltiplicati per -1 : OA:PA= Oleato:Palmitato; PA=Palmitato; CTRL=controllo. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato biologico. La significatività statistica dei miRNA DE è stata valutata mediante t-test ($p < 0.05$).

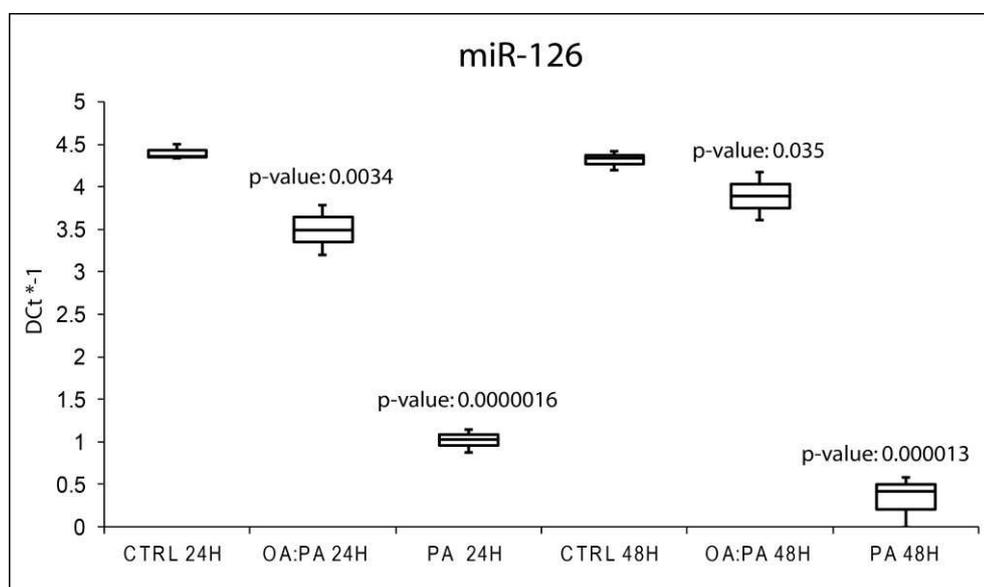


Figura 30: *Box plot e Wisker plot* del miR-126 validato mediante *Single TaqMan Assay* nel mezzo di coltura condizionato a seguito del trattamento con OA:PA o con PA rispetto ai controlli corrispondenti, a 24 ed a 48 ore separatamente. I valori sull'asse delle y sono riportati come ΔCt moltiplicati per -1 : OA:PA= Oleato:Palmitato; PA=Palmitato; CTRL=controllo. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato biologico. La significatività statistica della deregolazione del microRNA è stata valutata mediante t-test ($p < 0.05$).

4.12 ANALISI COMPUTAZIONALE DEI TARGET DEI *microRNA*

Allo scopo di valutare la funzione dei *microRNA* extracellulari ed intracellulari, abbiamo recuperato i *target* validati dei *microRNA* DE mediante *TarBase* ed abbiamo identificato le funzioni molecolari ed i processi biologici in cui sono coinvolti i *target* mediante l'utilizzo del *tool* FatiGo. Da questa analisi è emerso che i *target* dei *microRNA* intracellulari ed extracellulari deregolati sono coinvolti in processi cellulari-molecolari associati all'insorgenza della NAFLD ed alla progressione da NAFLD a NASH, come ad esempio il metabolismo degli acidi grassi e la regolazione di fattori di trascrizione lipogenici (come ad esempio i recettori PPAR, o SREBP), il metabolismo del glucosio, il metabolismo e l'attività del recettore delle LDL, la risposta all'insulina, la modulazione dell'apoptosi, l'infiammazione (come ad esempio l'attivazione delle vie di NF-kB o mTOR) e lo stress del reticolo endoplasmatico. E' interessante notare che, la condizione PA rispetto alla condizione OA:PA mostrava dal punto di vista della significatività statistica un arricchimento di funzioni associate alla condizione di NASH sia per i *microRNA* a livello intracellulare che extracellulare. (**Figura 31**).

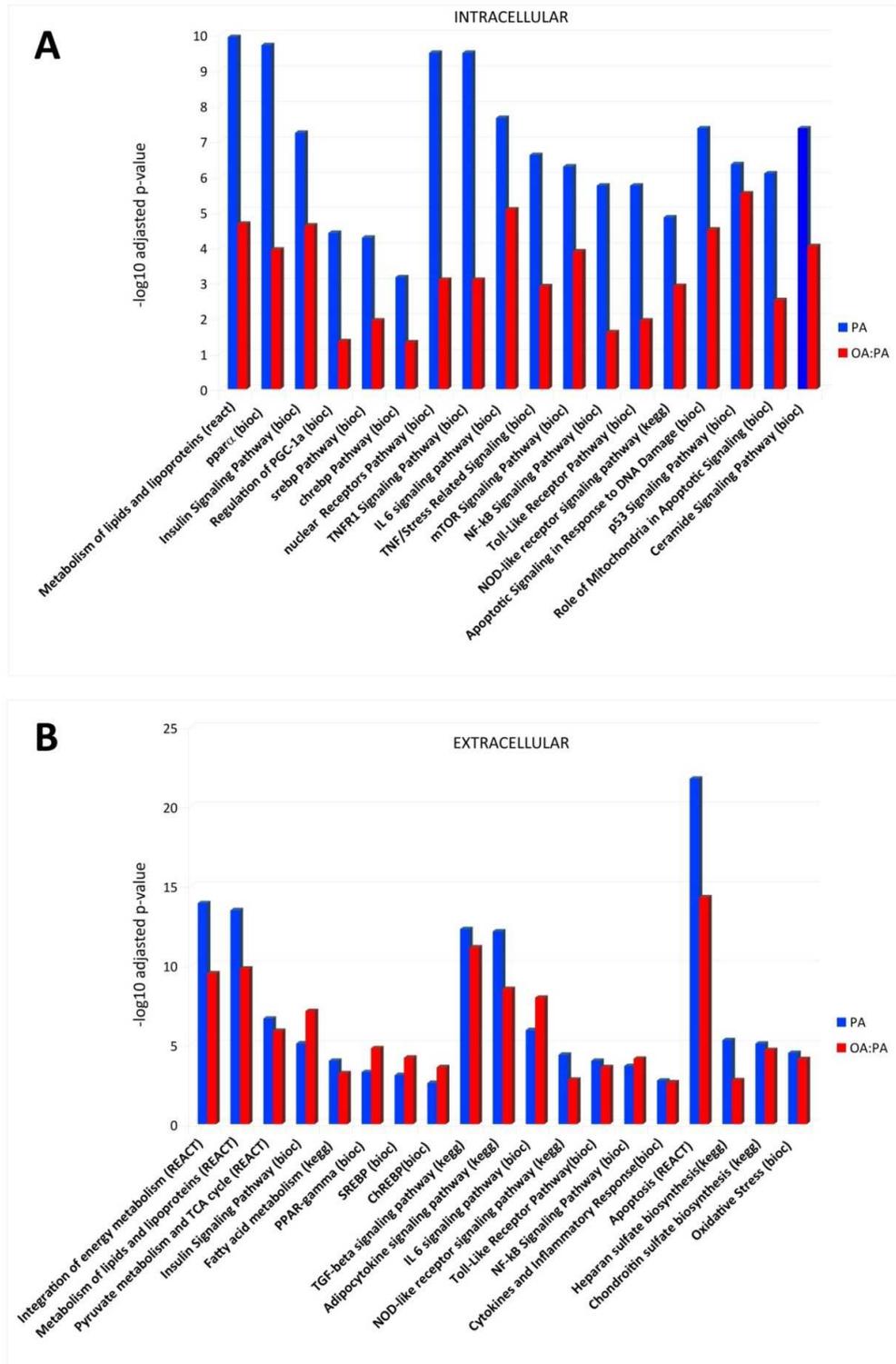


Figura 31: Funzioni Biologiche dei geni target dei microRNA differenzialmente espressi nelle cellule trattate con OA:PA e con PA. Funzioni biologiche statisticamente significative ottenute mediante Biocarta, KEGG e Reactome dei geni *target* dei microRNA DE nelle cellule A) e nel mezzo B) a seguito di trattamento con OA:PA e PA. I valori presenti nell'istogramma sono mostrati come $-\log_{10}$ dell'*adjusted p-value*. REACT: Reactome; bioc: Biocarta.

4.13 NETWORK

Per quanto riguarda le *network* biologiche abbiamo incentrato la nostra analisi su due delle *pathway* più rilevanti della patogenesi della NAFLD ovvero quelle di ChREBP/SREBP (C/S). Allo scopo di costruire una *network* incentrata su queste due *pathway* abbiamo recuperato le interazioni molecolari dei *target* dei microRNA DE funzionalmente associati a C/S (**Figura 32**). La *network* C/S derivante dai *target* dei microRNA DE nelle cellule trattate con PA era circa 3.5 volte più estesa rispetto alla *network* OA:PA. Queste *network* erano differenti dal punto di vista strutturale: la *network* derivante dalla condizione PA presentava una connettività media del 435 (*betweenness*) e dall'analisi di centralità della *network* abbiamo trovato che ACACA, AKT1, CREBBP, EP300, SP1 rappresentavano i nodi più centrali; mentre, la *network* derivante dalla condizione OA:PA presentava una connettività media del 177 ed i nodi più centrali erano rappresentati da ATP5B, DLD, DLAT, PDHB, PDX. Inoltre, dall'analisi computazionale del *merge* delle due *network* è emerso che esse presentavano il 21% di nodi che si sovrapponevano.

Inoltre nella *network* PA erano presenti *target* regolati da microRNA multipli quali ACACA (regolato dai microRNA: miR-122-5p, miR-151a-3p, miR-15b-5p, miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-7-5p, miR-92a-3p); SCD (regolato dai microRNA: miR-139-5p, miR-151a-3p, miR-199a-3p, miR-21-3p, miR-221-3p, miR-27a-5p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-30a-5p, miR-92a-3p); FASN (regolato dai microRNA: miR-1303, miR-143-3p, miR-15b-5p, miR-21-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-30a-5p, miR-7-5p, miR-92a-3p); IRS2 (regolato dai microRNA: miR-138-5p, miR-

30a-5p, miR-30b-5p, miR-33a-3p, miR-365a-3p, miR-532-5p, miR-7-5p, miR-92a-3p); SREBF1 (regolato dai microRNA: miR-25-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-33a-3p); SREBF2 (regolato dai microRNA: miR-122-5p, miR-221-3p, miR-29a-3p, miR-33a-3p, miR-92a-3p); CPT2 (regolato dai microRNA: miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-30b-5p). Questa caratteristica era meno evidente nella *network* OA:PA.

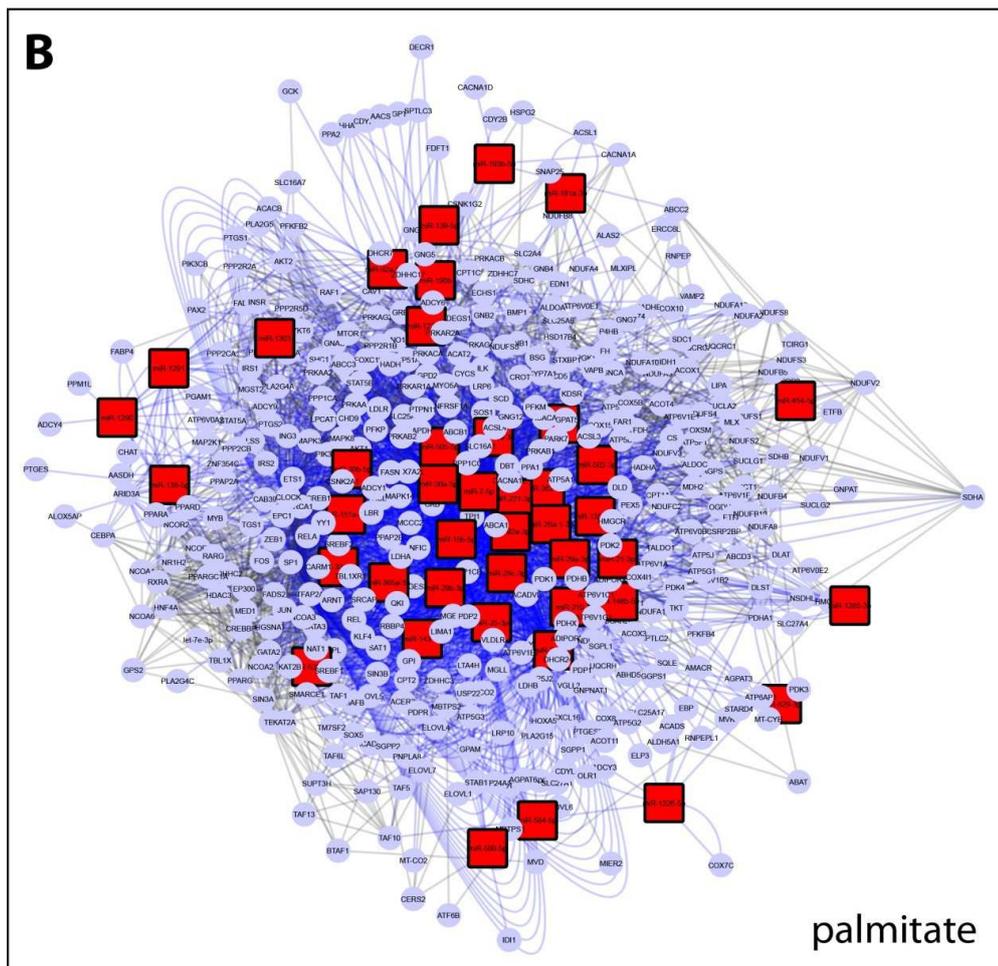
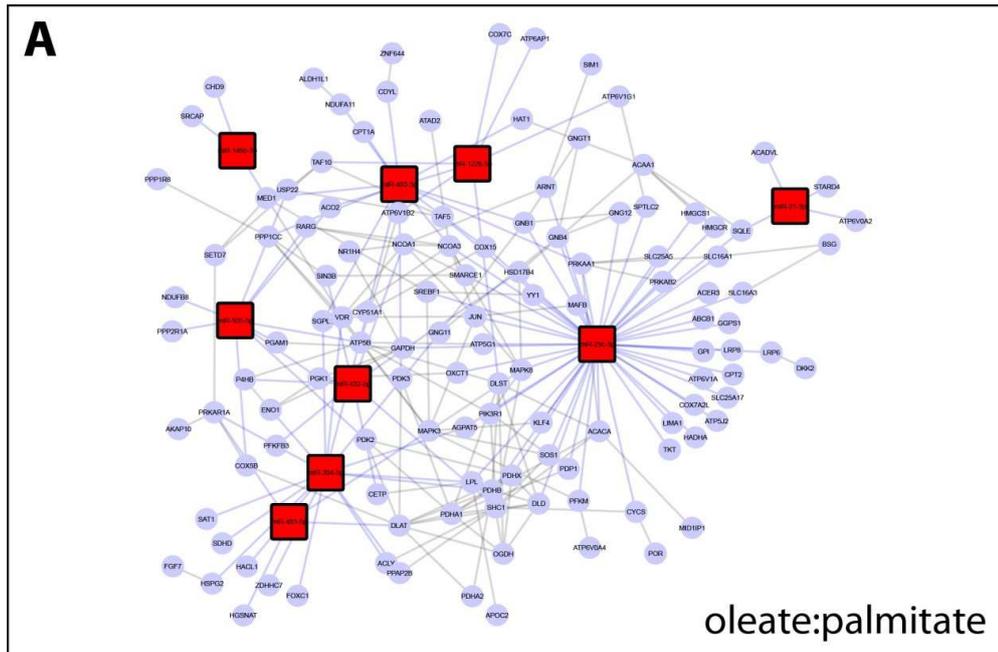


Figura 32: Network ChREBP/SREBP. Network costruita a partire dai target dei microRNA DE nella cellule trattate con OA:PA (A) e PA (B). Cerchi grigi: target dei microRNA e loro primi interattori. quadrati rossi: microRNA differenzialmente espressi.

4.14 ANALISI DELLE PATHWAY

Mediante l'utilizzo di MITHrIL (*Mirna enrIched paTHway Impact anaLysis*) abbiamo effettuato l'analisi della perturbazione delle *pathway* tenendo conto dei livelli di espressione dei microRNA e considerando solo i *target* validati sperimentalmente. Con questo metodo abbiamo identificato le *pathway* (all'interno di *KEGG*) alterate nel confronto OA:PA vs PA e le abbiamo classificate in base al livello di deregolazione dei microRNA coinvolti nella *pathway*, insieme alla corrispondente significatività statistica (*p-value* <0.01).

Tra le *pathway* perturbate in maniera statisticamente significativa abbiamo selezionato quelle biologicamente associate alla transizione da NAFLD a NASH. **Le tabelle 5 e 6** mostrano rispettivamente le *pathway* perturbate classificate in base *al False Discovery Rate* ed i microRNA validati a livello intracellulare ed extracellulare

Tabella 5: Pathway perturbate coinvolte nella progressione da NAFLD a NASH ottenute utilizzando i microRNA DE a livello intracellulare. FDR: False Discover Rate

Pathway	P-value	FDR	miRNA
Wnt signaling pathway	0	0	hsa-mir-138-5p, hsa-mir-885-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-186-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-483-3p, hsa-mir-206, hsa-mir-193b-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-1290, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-222-3p, hsa-mir-21-3p, hsa-mir-26a-1-3p, hsa-mir-9-3p
NOD-like receptor signaling pathway	0	0	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p
Chemokine signaling pathway	3,40E-08	2,12E-07	hsa-mir-126-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p
Cytokine-cytokine receptor interaction	4,33E-08	2,63E-07	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-193b-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-27a-3p
TGF-beta signaling pathway	2,72E-07	1,29E-06	hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-483-3p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-1290, hsa-mir-138-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p, hsa-mir-27a-3p, hsa-mir-26a-1-3p
p53 signaling pathway	9,04E-07	3,63E-06	hsa-mir-885-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-186-5p, hsa-mir-193b-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-483-5p
Apoptosis	4,21E-06	1,43E-05	hsa-mir-885-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-186-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-193b-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p
NF-kappa B signaling pathway	5,62E-06	1,83E-05	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-193b-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-186-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p
Jak-STAT signaling pathway	0,0001	0,0003	hsa-mir-126-5p, hsa-mir-193b-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-1290, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p, hsa-mir-26a-1-3p
Toll-like receptor signaling pathway	0,0001	0,0003	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p
mTOR signaling pathway	0,0049	0,0099	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-138-5p, hsa-mir-9-3p
Adipocytokine signaling pathway	0,0094	0,0175	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206, hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-146b-5p, hsa-mir-483-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-21-3p
PPAR signaling pathway	0,0267	0,0473	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-206

Tabella 6: Pathway perturbate coinvolte nella progressione da NAFLD a NASH ottenute utilizzando i microRNA DE a livello extracellulare. FDR: False Discover Rate

Pathway	p-val	FDR	miRNA
NF-kappa B signaling pathway	0	0	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-150-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-mir-26b-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-10b-3p
Apoptosis	0	0	hsa-mir-885-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-194-5p, hsa-mir-15b-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-150-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-10b-3p, hsa-mir-133a-3p, hsa-mir-34b-3p
Wnt signaling pathway	0	0	hsa-mir-885-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-194-5p, hsa-mir-15b-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-150-5p, hsa-mir-483-3p, hsa-mir-92a-1-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-26b-5p, hsa-mir-1290, hsa-let-7g-5p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-133a-3p, hsa-mir-34b-3p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-9-3p
TGF-beta signaling pathway	0	0	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-150-5p, hsa-mir-483-3p, hsa-mir-26b-5p, hsa-mir-30a-3p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-376c-3p, hsa-mir-1290, hsa-let-7g-5p, hsa-mir-197-3p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-27a-3p, hsa-mir-194-5p, hsa-mir-92a-1-5p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-29c-3p
NOD-like receptor signaling pathway	0	0	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-10b-3p
Chemokine signaling pathway	3,42E-11	9,33E-11	hsa-mir-155-5p, hsa-mir-142-3p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-92a-1-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-150-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-15b-5p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-10b-3p
Jak-STAT signaling pathway	1,87E-10	4,82E-10	hsa-mir-126-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-15b-5p, hsa-mir-150-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-142-3p, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-92a-1-5p, hsa-mir-26b-5p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-1290, hsa-let-7g-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-29c-3p
Cytokine-cytokine receptor interaction	4,53E-07	9,75E-07	hsa-mir-155-5p, hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-142-3p, hsa-mir-15b-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-139-5p, hsa-mir-197-3p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-133a-3p, hsa-mir-455-3p, hsa-mir-27a-3p, hsa-mir-194-5p
Toll-like receptor signaling pathway	2,22E-05	4,19E-05	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-150-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-10b-3p
mTOR signaling pathway	0,0002	0,0004	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-495-3p, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-150-5p, hsa-mir-9-3p
Adipocytokine signaling pathway	0,0003	0,0005	hsa-mir-27a-5p, hsa-mir-155-5p, hsa-mir-126-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-26a-5p, hsa-mir-375, hsa-mir-28-5p, hsa-mir-9-3p, hsa-mir-486-5p, hsa-mir-29c-5p, hsa-mir-29c-3p, hsa-mir-10b-3p

p53 signaling pathway	0,0003	0,0006	hsa-mir-885-5p, has-mir-34a-5p, has-mir-28-5p, has-mir-27a-5p, has-mir-194-5p, has-mir-15b-5p, has-mir-155-5p, has-mir-26a-5p, has-mir-150-5p, has-mir-486-5p, has-mir-30a-3p, has-mir-139-5p, has-mir-92a-1-5p, has-mir-126-5p, has-let-7g-5p, has-mir-410-3p, has-mir-34b-3p
PPAR signaling pathway	0,1072	0,1419	hsa-mir-155-5p, has-mir-34a-5p, has-mir-375, has-mir-27a-5p

4.15 ESPRESSIONE DEI TARGET DEI microRNA NELLE HepG2

ESPOSTE AD FFA.

Al fine di indagare la potenziale associazione tra microRNA differenzialmente espressi ed i meccanismi molecolari coinvolti nella progressione della NAFLD, abbiamo selezionato un *set* di target dei microRNA DE, ottenuti tramite analisi computazionale, e ne abbiamo analizzato l'espressione genica mediante *Real Time* PCR.

In questo modo, abbiamo riscontrato una deregolazione statisticamente significativa di mRNA target codificanti per I) recettori nucleari coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico epatico (es. PPAR γ , PPAR δ , SREBF1); II) enzimi/proteine coinvolti nel metabolismo lipidico (es. HADHA, ACAVDL, FADS1); III) sensori metabolici (es. PRKAG2); IV) proteine associate a *pathway* infiammatorie (es. TIRAP, MAP3K11) ed apoptotiche (es. CFLAR, BTG2). Come atteso, la maggior parte dei *target* dei microRNA analizzati presentava un *trend* di espressione opposto rispetto a quello dei microRNA regolatori. I geni target ed i microRNA regolatori sono riportati nella **tabella 7**, mentre le mediane dei *Fold Change* di espressione sono riportate nella **figura 33**.

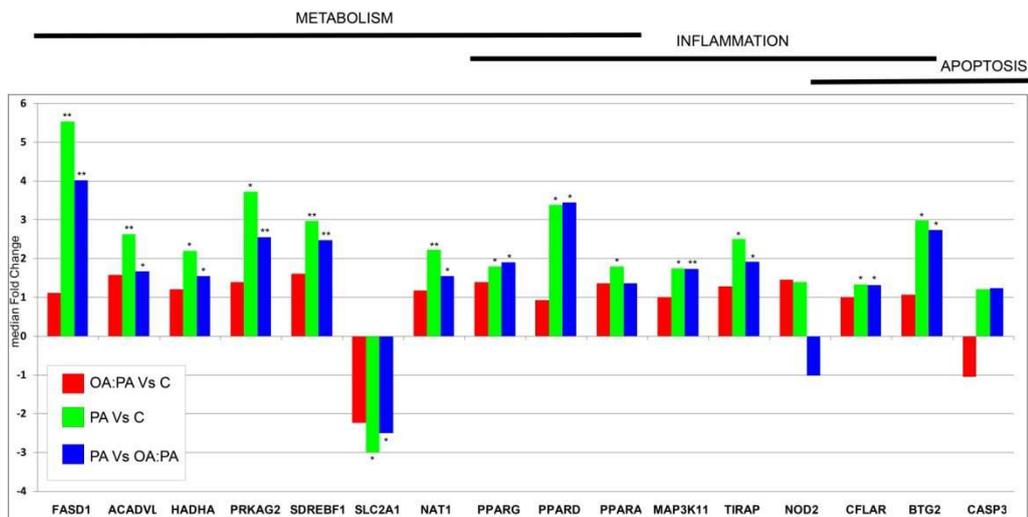


Figura 33: L'istogramma rappresenta le mediane dei Fold Change di espressione dei target dei microRNA ottenute da tre repliche biologiche in tre differenti confronti: oleato:palmitato vs controllo, palmitato vs controllo, oleato:palmitato vs palmitato. La quantificazione relativa è stata calcolata mediante il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizzando il gene GAPDH come normalizzatore. La significatività statistica è stata valutata mediante *t-test* (* $p < 0.05$; ** <0.005)($RQ < 1$ $FC = -1/RQ$).

Tabella 7 Geni target e microRNA regolatori corrispondenti.

target	miRNA regolatori
FADS1	hsa-miR-155-5p, hsa-miR-186-5p.
ACADVL	hsa-let-7d, hsa-miR-27a-5p.
HADHA	hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-29a, hsa-miR 29b -3p , hsa-miR-92a-3p.
PARKAG2	hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-122-5p.
SREBF1	hsa-miR- 18a, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-29a-3p,hsa-miR-29b-3p,hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-483-3p.
SLC2A1	hsa- miR-1291.
NAT1	hsa-miR-25-3p.
PPARG	hsa-miR-27a-5p.
PPARD	hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-mir 92a-3p.
PPARA	hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-204-5p, dme-miR-7.
MAP3K11	hsa-miR-138-5p.
NOD2	hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-122-5p.
TIRAP	hsa-miR-586.
CFLAR	hsa-miR-7-5p, hsa-mir 15b-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR362-5p, hsa-miR-629-5p.
BTG2	hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR miR-29a-3p, hsa-miR miR-29b-3p, hsa-miR miR-29c-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-210-5p.
CASP3	hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-885-5p.

5. DISCUSSIONE

I microRNA sono degli importanti regolatori negativi dell'espressione genica che agiscono alterando la stabilità e la funzione degli mRNA bersaglio. Essi sono coinvolti nella regolazione di numerose importanti funzioni cellulari come ad esempio l'infiammazione, l'apoptosi, la regolazione di *pathway* metaboliche.

I microRNA circolanti potrebbero avere una potenziale rilevanza clinica dal momento che presentano molte delle caratteristiche dei buoni biomarcatori; inoltre essi potrebbero avere una potenziale rilevanza terapeutica dal momento che sono coinvolti nella comunicazione inter-cellulare. In merito a ciò, diversi studi hanno dimostrato che i microRNA extracellulari vengono trasportati alle cellule *target* adiacenti o distanti dove possono regolare negativamente l'espressione genica agendo rispettivamente in maniera paracrina ed endocrina [44, 92].

Lo studio dei microRNA deregolati sia a livello intracellulare che extracellulare nella NAFLD dunque può portare ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base della transizione da NAFLD a NASH ed all'identificazione di nuovi potenziali biomarcatori di diagnosi differenziale e di stadiazione come già proposto dai lavori di Pirola *et al.* e di Becker *et al.* [68, 69]

In questo studio abbiamo dimostrato che l'esposizione cronica agli FFA altera in maniera significativa il miRNoma intracellulare ed extracellulare in modelli *in vitro* di NAFLD e di NASH. I modelli *in vitro* sono stati validati valutando

differenti aspetti associati all'insorgenza ed alla patogenesi della NAFLD, in particolare abbiamo analizzato nelle HepG2 in risposta ai trattamenti cellulari, l'accumulo lipidico, la vitalità cellulare, l'insulina resistenza, l'espressione genica e proteica dei trasportatori degli FFA (FAT/CD36, FATP-2), l'incremento di intermedi lipidici coinvolti nell'insulino-resistenza (DAG e ceramidi).

Ad oggi, il nostro lavoro rappresenta il primo studio che analizza contemporaneamente il *pattern* di espressione dei microRNA nelle HepG2 prima e dopo trattamento lipotossico (PA) e/o non lipotossico (OA:PA) sia a livello intracellulare che a livello extracellulare.

Mediante la nostra analisi abbiamo dimostrato che il trattamento con PA rispetto al trattamento con OA:PA porta ad una maggiore deregolazione del miRNoma sia dal punto di vista qualitativo (in termini di numero di geni deregolati) sia dal punto di vista quantitativo (in termini di *Fold Change*). Inoltre, la deregolazione extracellulare era più accentuata della deregolazione intracellulare in entrambe le condizioni.

La NAFLD e la NASH sono considerate la manifestazione epatica della sindrome metabolica, che accomuna diversi sintomi clinici legati all'obesità viscerale, quali, la resistenza all'insulina, la dislipidemia e l'ipertensione arteriosa e rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di diabete mellito di tipo 2 e di malattie cardiovascolari.

I nostri risultati espandono i risultati di studi precedenti che hanno analizzato i livelli dei microRNA in pazienti con NAFLD e NASH [65-70] o altre condizioni metaboliche associate allo spettro NAFLD, e suggeriscono l'utilizzo

di modelli di NAFLD e NASH *in vitro* per studi molecolari specifici, difficilmente realizzabili in modelli *ex-vivo* umani. Le fonti cellulari specifiche che secernono i microRNA nel sangue sono in gran parte sconosciute, ed i microRNA rilasciati nel terreno di coltura, riportati nel nostro modello, potrebbero rispecchiare più direttamente i cambiamenti indotti dagli FFA nelle cellule epatiche.

In accordo ai lavori precedenti riguardanti i microRNA sierici deregolati nella NAFLD abbiamo riscontrato a seguito del *profiling* la deregolazione extracellulare del microRNA: 27b-3p (sovraespresso nel confronto PA/C) [65] e del miR 197 (sottoespresso nel confronto PA/C e nel confronto PA/OA:PA) [66] (**tabella 3**) E' interessante notare che a seguito del *profiling* abbiamo riscontrato la sovraespressione del miR-192* nel confronto OA/C e PA/C (**tabella 3**) Pirola, Becker, Youwen e Xiao-Lin Liu hanno riportato la deregolazione del microRNA derivante dallo stesso pre-miR, miR-192 in pazienti NAFLD [65, 68-70]. Inoltre in accordo al lavoro di Pirola abbiamo riscontrato la sottoespressione del miR-34a (OA/C, PA/C, PA/OA:PA), la sottoespressione del miR-133a (OA/C; PA/C,PA/OA) e del miR-376c (PA/C; OA/PA) [68].

Wen *et al.* hanno mostrato che il miR-223 sierico (sottoespresso nel mezzo di coltura delle cellule trattate con OA:PA e con PA) era sottoespresso in soggetti sovrappeso e in soggetti obesi rispetto ai controlli normo-peso, inoltre i livelli di espressione del miR-223 incrementavano significativamente in entrambi i gruppi di pazienti a seguito di cambiamenti nello stile di vita [93].

Inoltre Vickers *et al.* hanno dimostrato che il miR-223 inibisce la biosintesi del colesterolo e l'*uptake* del colesterolo HDL-mediato, "targettando" rispettivamente l'enzima *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA* (HMG-CoA) *synthase 1* ed il recettore *scavenger receptor BI* (SRBI). Al contrario il miR-223 stimola l'efflusso del colesterolo HDL-mediato stimolando indirettamente l'espressione genica dell'*ATP-Binding Cassette transporter A1* ABCA1 [94].

E' interessante notare che Sun *et al.* hanno riportato che il miR-126 (sottoespresso nel mezzo di coltura delle cellule trattate con OA:PA e con PA) era significativamente sottoespresso nei sieri di pazienti con coronaropatia (*Coronary Artery Disease* CAD) e con elevati livelli di colesterolo associato alle LDL. Al contrario, i livelli di espressione del miR-126 incrementavano significativamente nei pazienti che presentavano elevati livelli di colesterolo associato alle LDL e fattori di rischio per CAD, in assenza di patologia evidente dal punto di vista angiografico [95]. Krause *et al.* hanno riscontrato una correlazione positiva tra i livelli plasmatici del miR-126 ed i tratti della sindrome metabolica (ad esempio la circonferenza della vita, il rapporto vita-fianchi, l'indice di massa corporea, i trigliceridi plasmatici ed il colesterolo associato alle VLD) [96]. Inoltre Zampetaki *et al.* hanno riscontrato la sottoespressione miR-126 e del miR-223 nei campioni di plasma di pazienti con diabete mellito di tipo 2. La deregolazione del miR-126 è stata riscontrata anche nei corpi apoptotici isolati dai campioni di plasma dei pazienti o dal mezzo di coltura di cellule endoteliali HUVECs in condizioni di alto glucosio [97].

Nel nostro lavoro abbiamo riscontrato una sottoespressione del miR-150 a livello extracellulare sia a seguito del trattamento con PA che con OA:PA, Setyowati *et al.* hanno osservato una sottoespressione del miR-150 in esosomi isolati dal siero di pazienti ipercolesterolemici ed ipertesi, ed una sovraespressione del miR-150 in pazienti con diabete mellito di tipo 2 e con sindrome metabolica [98].

E' importante sottolineare che per i microRNA: -223, -126, -92a e -150 (tutti sottoespressi nel mezzo di coltura) è stata riportata un'associazione con le HDL. Vickers *et al.* hanno dimostrato che i microRNA extracellulari possono essere veicolati dalle HDL. Il caricamento dei microRNA nelle HDL è mediato dal *cholesterol transporter ATP-binding cassette subfamily A member 1* (ABCA1), mentre il trasporto dei microRNA dalle HDL al fegato è mediato dal *scavenger receptor class B member 1* (SRB1). Una volta all'interno delle cellule bersaglio, i microRNA possono regolare negativamente i loro geni target [49, 99, 100].

Sulla base dei nostri risultati e degli studi precedenti, possiamo ipotizzare che la lipotossicità mediata dal PA potrebbe alterare o danneggiare il caricamento dei microRNA all'interno delle HDL o potrebbe determinare un decremento dei livelli extracellulari di HDL. In accordo a quest'ultima ipotesi, è stato riportato che la dislipidemia della NAFLD e della NASH, è caratterizzata da ipertrigliceridemia, elevate LDL, elevato colesterolo totale e bassi livelli di HDL. La risoluzione della NASH, ottenuta mediante trattamento con vitamina E e pioglitazone in pazienti non diabetici e con steatoepatite, è associata con un

miglioramento dei livelli di HDL e di trigliceridi ma non con un miglioramento dei livelli di LDL o colesterolo non-HDL [101].

Nel nostro studio abbiamo riscontrato una sovraespressione dei livelli intracellulari del miR-1290 ed una sua sottoespressione a livello extracellulare sia nelle cellule trattate con PA che nelle cellule trattate con OA:PA rispetto ai controlli corrispondenti. La sottoespressione del miR-1290 inoltre era proporzionale all'incremento della concentrazione di palmitato sia a livello intracellulare che extracellulare. Studi precedenti condotti da Tan *et al* hanno riportato una sottoespressione del miR-1290 nei campioni di siero di pazienti con NAFLD rispetto ai controlli sani [65]. Questo ed il nostro studio sono gli unici che riportano un'associazione del miR-1290 con la NAFLD, al contrario la maggior parte degli studi riguardanti il miR-1290 riportano un'associazione di questo microRNA con diversi tipi di cancro [102-104]. Un potenziale ruolo del miR-1290 nella regolazione di *pathway* associate alla NAFLD o alla NASH deve essere ancora esplorato.

Per diversi microRNA DE intracellulari che abbiamo identificato è stata riportata un'associazione con la regolazione del metabolismo lipidico o l'insulino-resistenza. La famiglia let-7 presenta un ruolo importante nelle malattie metaboliche, nel nostro studio abbiamo riscontrato una sovraespressione del let7-e* nelle cellule trattate con Palmitato rispetto ai controlli.

Zhu *et al.* hanno dimostrato che la sovraespressione di let-7 in topi sottoposti a dieta normale o *High Fat Diet* determina insulino-resistenza ed una compromissione della tolleranza al glucosio nel muscolo mediante regolazione

negativa della *pathway* insulina-PI3K-mTOR [105]. Inoltre, Murakami *et al.* hanno riportato una correlazione positiva tra la progressione della fibrosi epatica e l'espressione di let-7e in modelli murini di fibrosi [106]. Un altro microRNA associato ad insulino-resistenza è il miR-190b, è stato dimostrato che la sovraespressione del miR-190b (sovraespresso nel nostro modello *in vitro*) riduce l'espressione di IGF-1 nelle cellule HuH7, compromettendo il *signalling* insulinico [107].

Un meccanismo chiave nella fisiopatogenesi della NAFLD/NASH è lo *shift* tra la β -ossidazione degli FFA e la lipogenesi *de novo* a favore di quest'ultima. È stato dimostrato che il miR-33a*, sovra-espresso nel nostro modello *in vitro*, negli epatociti è in grado di inibire la β -ossidazione e di aumentare i livelli intracellulari di FFA e trigliceridi mediante l'inibizione di CROT e CPT1a. Di conseguenza il miR-33a* potrebbe avere un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo [60].

Nel nostro studio abbiamo riscontrato un decremento dei livelli intracellulari del miR-221 a seguito del trattamento con palmitato. Meerson *et al.* hanno dimostrato che la leptina ed il TNF- α mediano una sotto-espressione del miR-221 in colture primarie di pre-adipociti umani ed hanno anche dimostrato che la sovra-espressione di questo microRNA determina l'incremento dell'espressione di proteine coinvolte nel metabolismo lipidico con un effetto simile a quello indotto dall'attivazione dei PPAR *proliferator-activated receptor* (PPAR). Di conseguenza la sottoespressione del miR-221 (riscontrata nel nostro modello *in vitro*) al contrario potrebbe avere un ruolo potenziale nell'inibizione del metabolismo lipidico [108].

E' stato riportato che il miR-138 (sottoespresso nelle cellule trattate con PA) ed il miR-483-3p (sottoespresso nelle cellule trattate con OA:PA) sono rispettivamente regolatori positivi e negativi dell'accumulo lipidico e del differenziamento lipidico [109, 110].

E' stato ampiamente dimostrato in letteratura che la NAFLD è associata ad una sottoespressione del miR-122. In accordo con queste evidenze sperimentali, nel nostro lavoro abbiamo osservato una sottoespressione di 3 *Fold Change* del miR-122 nelle cellule trattate con PA rispetto ai controlli. Il miR-122 è un regolatore chiave di geni lipogenici, Cheung O. *et al.* hanno infatti dimostrato che il silenziamento transiente del miR-122 in colture cellulari (in particolare HepG2, HuH7) induce un incremento dell'espressione genica di FAS, HMGCR, SREBP-1c e SREBP 2; al contrario la sovraespressione del miR-122, determina un decremento dell'espressione di questi geni [53].

Mediante analisi computazionali abbiamo osservato che i target validati dei microRNA DE sono arricchiti in geni che potrebbero avere un ruolo importante nell'insorgenza della NAFLD e nella progressione da NAFLD a NASH.

Come riportato precedentemente, la patogenesi della NAFLD è basata sull'ipotesi dei "2-hits" definita da Day and James [10]. Il " *first-hit*", mediato dall'insulino-resistenza e dall'accumulo lipidico epatico, determina un incremento della suscettibilità del fegato al danno indotto dal " *second hit*", mediato da diversi fattori quali le citochine e le adipochine pro-infiammatorie, la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo, che conducono alla progressione da NAFLD a NASH e alla fibrosi. In breve, l'iperinsulinemia e l'iperglicemia nella NAFLD inducono rispettivamente SREBP-1c e ChREBP,

che portano all'attivazione di *pathway* lipogeniche determinando la conversione dell'eccesso di glucosio in acidi grassi. L'incremento della sintesi *de novo* degli acidi grassi determina un incremento dei livelli di *malonyl-CoA* che inibisce CPT-1, preposta al trasporto degli acidi grassi all'interno dei mitocondri. Questi eventi portano di conseguenza allo *shift* tra β -ossidazione degli FFA e lipogenesi *de novo* a favore di quest'ultima.

In accordo con questi aspetti molecolari della fisiopatogenesi della NAFLD, abbiamo identificato con metodi computazionali *target* dei microRNA intracellulari ed extracellulari DE associati alle *pathway* SREBP/CHREBP ed alla regolazione del metabolismo lipidico. Inoltre, è importante sottolineare che l'analisi delle *network* ha portato all'identificazione di geni *target*, regolati da microRNA multipli, associati a funzioni molecolari quali la lipogenesi (ACACA, SCD e FASN), l'attivazione di fattori di trascrizione lipogenici (SREBF1 e SREBF 2), il trasporto mitocondriale degli acidi grassi (CPT2), il *signalling* insulinico (PIK3R1, IRS2), la regolazione chinasi del metabolismo (PRKAA1).

Di conseguenza i nostri dati potrebbero porre le basi per l'identificazione di nuovi microRNA associati al metabolismo lipidico epatico .

Inoltre dalla nostra analisi computazionale è emerso che, la maggior parte dei *target* dei microRNA intracellulari ed extracellulari DE erano associati a *pathway* infiammatorie, come ad esempio la *pathway* di NF-kb , il *signalling* dei *Toll-Like Receptors* e dei *NOD-Like Receptors* che presentano un ruolo importante nell'infiammazione mediata dalla lipotossicità.

L'infiammazione cronica associata alla NASH non interessa soltanto il fegato, ma origina e si verifica anche in distretti diversi dal fegato, in particolare la flora batterica intestinale, il tessuto adiposo, le cellule del sistema immunitario [22]. I microRNA circolanti che regolano *pathway* infiammatorie potrebbero agire in maniera endocrina, determinando un *cross-talk* tra i tessuti associati all'infiammazione nello spettro NAFLD, o potrebbero agire in maniera paracrina, regolando l'infiammazione negli epatociti e nelle cellule dell'immunità innata del fegato (*Kupffer cells, natural killer cells*). Infine dall'analisi bioinformatica abbiamo riscontrato che diversi target dei microRNA DE erano associati all'apoptosi, un meccanismo chiave del danno epatico tipico della NASH. Successivi studi funzionali potrebbero portare all'identificazione di nuovi microRNA coinvolti nella lipo-apoptosi. Allo scopo di associare più concretamente le alterazioni d'espressione dei microRNA ai meccanismi molecolari coinvolti nella progressione dello spettro NAFLD, abbiamo analizzato l'espressione genica di un *set* di *target* dei microRNA differenzialmente espressi. Come atteso, i *target* dei microRNA analizzati presentavano un *trend* di espressione opposto rispetto a quello dei microRNA regolatori corrispondenti inoltre per alcuni di questi geni *target* differenzialmente espressi è stato già riportato in letteratura lo stesso *trend* di deregolazione in biopsie epatiche umane e/o nel fegato di modelli *in vivo* di NAFLD/NASH: es. FADS1 [111], HADHA [112, 113], SREBF1 [53, 112, 114, 115], SLC2A1 [116], PPARG [117, 118], PPARA [117]. La deregolazione corrispondente dei target dei microRNA supporta ulteriormente i nostri dati e l'associazione della deregolazione dei microRNA/target DE

identificati, ai meccanismi molecolari che hanno un ruolo chiave nella progressione della patologia, che comprendono *pathway* infiammatorie, metaboliche ed apoptotiche.

6. PROSPETTIVE FUTURE

Il nostro studio ha portato all'identificazione di un *set* di microRNA deregolati sia a livello intracellulare che extracellulare a seguito di trattamento di una linea di cellule epatiche (HepG2) prima e dopo trattamento con oleato:palmitato (2:1) o solo palmitato.

Per quanto riguarda i microRNA extracellulari, dal momento che non sono note le fonti cellulari specifiche dei microRNA circolanti presenti nel siero, questo studio potrebbe porre le basi per la successiva validazione mediante STA di microRNA epato-specifici nel siero *in toto* ed in specifici compartimenti vescicolari (quali esosomi ed HDL) in pazienti affetti da NAFLD e da NASH allo scopo di identificare biomarcatori di diagnosi differenziale delle due condizioni patologiche. Nel caso in cui venga validato uno specifico *set* di microRNA, sarebbe interessante valutare la correlazione dell'espressione di questi microRNA con biomarcatori sierici di *routine* associati ai vari aspetti della progressione da NAFLD a NASH quali l'infiammazione, lo stress ossidativo, la fibrosi e l'apoptosi.

Per quanto riguarda i microRNA cellulari, la nostra analisi computazionale ed in particolare l'analisi effettuata mediante il nuovo approccio MITHrIL ci ha portato all'individuazione di microRNA potenzialmente implicati nella regolazione di specifiche *pathway* associate alla progressione da NAFLD a NASH quali l'attivazione dei *NOD-like receptor* o dei *Toll-like receptor* e l'apoptosi.

Di conseguenza gli *step* successivi del nostro lavoro potrebbero essere in primo luogo la validazione di tali microRNA in biopsie epatiche di pazienti NAFLD e NASH, e qualora questi vengano validati, lo studio funzionale mediante esperimenti di trasfezione e quindi di silenziamento o sovraespressione di specifici microRNA, allo scopo di valutare l'effetto della modulazione dell'espressione di specifici microRNA in *pathway* della progressione NAFLD NASH come ad esempio l'attivazione dell'inflammasoma o l'apoptosi.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-1219.
- [2] Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:525-540.
- [3] Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology* 2007;46:582-589.
- [4] Fitzpatrick E, Dhawan A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future. *World J Gastroenterol* 2014;20:10851-10863.
- [5] Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009;50:1072-1078.
- [6] Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006;44:27-33.
- [7] Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, Hazen SL, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2008;6:1249-1254.
- [8] Shen J, Chan HL, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Chan HY, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol* 2012;56:1363-1370.
- [9] Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2014;60:167-174.
- [10] James OF, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998;29:495-501.
- [11] Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2010;103:71-83.
- [12] Pereira K, Salsamendi J, Casillas J. The Global Nonalcoholic Fatty Liver Disease Epidemic: What a Radiologist Needs to Know. *Journal of clinical imaging science* 2015;5:32.
- [13] Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52:1836-1846.
- [14] Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-152.
- [15] Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118:829-838.
- [16] Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004;86:839-848.
- [17] Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell metabolism* 2006;4:107-110.
- [18] Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespdenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:430-434.
- [19] Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:999-1007.
- [20] Cortez-Pinto H, Zhi Lin H, Qi Yang S, Odwin Da Costa S, Diehl AM. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1999;116:1184-1193.

- [21] Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International journal of molecular sciences* 2013;14:20704-20728.
- [22] Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* 2012;6:149-171.
- [23] Sergio Cerpa-Cruz¹ VG-D, Gloria Martínez-Bonilla¹, Sergio Gutiérrez-Ureña¹, Elsa Rodríguez-Cortés¹, Lizbeth A. Garcia- Espinosa¹, Miguel A Martínez-Valles¹, J Antonio Velarde-Ruiz-Velazco². Non-Alcoholic Fatty Steatohepatitis an Inflammatory Disorder Beyond the Liver. *J Clin Cell Immunol* 2013.
- [24] Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2013;10:627-636.
- [25] Meli R, Mattace Raso G, Calignano A. Role of innate immune response in non-alcoholic Fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. *Frontiers in immunology* 2014;5:177.
- [26] Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 2011;54:133-144.
- [27] Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences* 2014;15:6184-6223.
- [28] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 2004;23:4051-4060.
- [29] Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 2004;10:1957-1966.
- [30] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 2006;13:1097-1101.
- [31] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics* 2008;9:102-114.
- [32] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009;10:126-139.
- [33] Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303:95-98.
- [34] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834-838.
- [35] Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 2001;15:2654-2659.
- [36] Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;448:83-86.
- [37] Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *Rna* 2007;13:1894-1910.
- [38] Easow G, Telean AA, Cohen SM. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *Rna* 2007;13:1198-1204.
- [39] Huang J, Liang Z, Yang B, Tian H, Ma J, Zhang H. Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem* 2007;282:33632-33640.
- [40] Schrott GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006;439:283-289.
- [41] Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *Journal of Cancer* 2012;3:432-448.

- [42] Scholer N, Langer C, Dohner H, Buske C, Kuchenbauer F. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Experimental hematology* 2010;38:1126-1130.
- [43] Xu J, Zhao J, Evan G, Xiao C, Cheng Y, Xiao J. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *Journal of molecular medicine* 2012;90:865-875.
- [44] Shah MY, Calin GA. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. *Nucleic Acid Ther* 2013;23:2-8.
- [45] Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovascular research* 2012;93:555-562.
- [46] Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *American journal of cardiovascular disease* 2011;1:138-149.
- [47] Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;39:7223-7233.
- [48] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012;7:e30679.
- [49] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423-433.
- [50] Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology* 2011;8:467-477.
- [51] Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology* 2013;9:513-521.
- [52] Gori M, Arciello M, Balsano C. MicroRNAs in nonalcoholic fatty liver disease: novel biomarkers and prognostic tools during the transition from steatosis to hepatocarcinoma. *BioMed research international* 2014;2014:741465.
- [53] Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008;48:1810-1820.
- [54] Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism* 2006;3:87-98.
- [55] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-689.
- [56] Ceccarelli S, Panera N, Gnani D, Nobili V. Dual role of microRNAs in NAFLD. *International journal of molecular sciences* 2013;14:8437-8455.
- [57] Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *Journal of lipid research* 2010;51:1513-1523.
- [58] Rottiers V, Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Gurumurthy S, Zhong L, Li Y, et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011;76:225-233.
- [59] Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012;13:239-250.
- [60] Goedeke L, Vales-Lara FM, Fenstermaker M, Cirera-Salinas D, Chamorro-Jorganes A, Ramirez CM, et al. A regulatory role for microRNA 33* in controlling lipid metabolism gene expression. *Mol Cell Biol* 2013;33:2339-2352.
- [61] Novak J, Bienertova-Vasku J, Kara T, Novak M. MicroRNAs involved in the lipid metabolism and their possible implications for atherosclerosis development and treatment. *Mediators of inflammation* 2014;2014:275867.
- [62] Castro RE, Ferreira DM, Afonso MB, Borralho PM, Machado MV, Cortez-Pinto H, et al. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2013;58:119-125.

- [63] Ding J, Li M, Wan X, Jin X, Chen S, Yu C, et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARalpha expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Scientific reports* 2015;5:13729.
- [64] Loyer X, Paradis V, Henique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPARalpha expression. *Gut* 2015.
- [65] Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Gan J. A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2014;9:e105192.
- [66] Celikbilek M, Baskol M, Taheri S, Deniz K, Dogan S, Zararsiz G, et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology* 2014;6:613-620.
- [67] Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Fujiyama S, et al. Analysis of association between circulating miR-122 and histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease in patients free of hepatocellular carcinoma. *BMC gastroenterology* 2016;16:141.
- [68] Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 2015;64:800-812.
- [69] Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 2015;10:e0142661.
- [70] Liu XL, Pan Q, Zhang RN, Shen F, Yan SY, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World journal of gastroenterology* 2016;22:9844-9852.
- [71] Ragusa M, Statello L, Maugeri M, Barbagallo C, Passanisi R, Alhamdani MS, et al. Highly skewed distribution of miRNAs and proteins between colorectal cancer cells and their exosomes following Cetuximab treatment: biomolecular, genetic and translational implications. *Oncoscience* 2014;1:132-157.
- [72] Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007;165:106-116.
- [73] Chu JH, Wang H, Ye Y, Chan PK, Pan SY, Fong WF, et al. Inhibitory effect of schisandrin B on free fatty acid-induced steatosis in L-02 cells. *World J Gastroenterol* 2011;17:2379-2388.
- [74] Kwan HY, Fong WF, Yang Z, Yu ZL, Hsiao WL. Inhibition of DNA-dependent protein kinase reduced palmitate and oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells. *Eur J Nutr* 2013;52:1621-1630.
- [75] Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:830-840.
- [76] Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* 2010;52:586-593.
- [77] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 1985;100:965-973.
- [78] Urbano F, Filippello A, Di Pino A, Barbagallo D, Di Mauro S, Pappalardo A, et al. Altered expression of uncoupling protein 2 in GLP-1-producing cells after chronic high glucose exposure: implications for the pathogenesis of diabetes mellitus. *American journal of physiology Cell physiology* 2016;310:C558-567.
- [79] Piro S, Maniscalchi ET, Monello A, Pandini G, Mascali LG, Rabuazzo AM, et al. Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* 2010;151:4197-4206.

- [80] Piro S, Mascali LG, Urbano F, Filippello A, Malaguarnera R, Calanna S, et al. Chronic exposure to GLP-1 increases GLP-1 synthesis and release in a pancreatic alpha cell line (alpha-TC1): evidence of a direct effect of GLP-1 on pancreatic alpha cells. *PLoS one* 2014;9:e90093.
- [81] Valletunga A, Ragusa M, Di Mauro S, Iannitti T, Pilleri M, Biundo R, et al. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy. *Front Cell Neurosci* 2014;8:156.
- [82] Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, Caltabiano R, Russo A, Puzzo L, et al. miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications. *Cancer Biol Ther* 2015;16:1387-1396.
- [83] Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D153-159.
- [84] Al-Shahrour F, Minguez P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, et al. FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res* 2007;35:W91-96.
- [85] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13:2498-2504.
- [86] Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* 2010;26:2927-2928.
- [87] Alaimo S, Giugno, R., Acunzo, M., Veneziano, D., Ferro, A., & Pulvirenti, A. . Post-transcriptional knowledge in pathway analysis increases the accuracy of phenotypes classification. 2015.
- [88] Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008;134:556-567.
- [89] Chavez JA, Summers SA. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell metabolism* 2012;15:585-594.
- [90] Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology* 2016;157:570-585.
- [91] Mashek DG. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. *Advances in nutrition* 2013;4:697-710.
- [92] Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet* 2013;4:119.
- [93] Wen D, Qiao P, Wang L. Circulating microRNA-223 as a potential biomarker for obesity. *Obes Res Clin Pract* 2015;9:398-404.
- [94] Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, Shoucri BM, Toth CL, Taylor RC, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:14518-14523.
- [95] Sun X, Zhang M, Sanagawa A, Mori C, Ito S, Iwaki S, et al. Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thromb J* 2012;10:16.
- [96] Krause BJ, Carrasco-Wong I, Dominguez A, Arnaiz P, Farias M, Barja S, et al. MicroRNAs Let7e and 126 in Plasma as Markers of Metabolic Dysfunction in 10 to 12 Years Old Children. *PLoS One* 2015;10:e0128140.
- [97] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010;107:810-817.
- [98] Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E2271-2276.
- [99] Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function. *Circ Res* 2014;114:183-192.

- [100] Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Roxe T, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1392-1400.
- [101] Corey KE, Vuppalanchi R, Wilson LA, Cummings OW, Chalasani N, Nash CRN. NASH resolution is associated with improvements in HDL and triglyceride levels but not improvement in LDL or non-HDL-C levels. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:301-309.
- [102] Endo Y, Toyama T, Takahashi S, Yoshimoto N, Iwasa M, Asano T, et al. miR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor alpha-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2013;20:91-102.
- [103] Wu J, Ji X, Zhu L, Jiang Q, Wen Z, Xu S, et al. Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett* 2013;329:155-163.
- [104] Calvayrac O, Pradines A, Raymond-Letron I, Rouquette I, Bousquet E, Lauwers-Cances V, et al. RhoB determines tumor aggressiveness in a murine EGFR858R-induced adenocarcinoma model and is a potential prognostic biomarker for Lepidic lung cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:6541-6550.
- [105] Zhu H, Shyh-Chang N, Segre AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 2011;147:81-94.
- [106] Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One* 2011;6:e16081.
- [107] Hung TM, Ho CM, Liu YC, Lee JL, Liao YR, Wu YM, et al. Up-regulation of microRNA-190b plays a role for decreased IGF-1 that induces insulin resistance in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014;9:e89446.
- [108] Meerson A, Traurig M, Ossowski V, Fleming JM, Mullins M, Baier LJ. Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2013;56:1971-1979.
- [109] Yang Z, Bian C, Zhou H, Huang S, Wang S, Liao L, et al. MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1. *Stem Cells Dev* 2011;20:259-267.
- [110] Ferland-McCollough D, Fernandez-Twinn DS, Cannell IG, David H, Warner M, Vaag AA, et al. Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes. *Cell Death Differ* 2012;19:1003-1012.
- [111] Arendt BM, Comelli EM, Ma DW, Lou W, Teterina A, Kim T, et al. Altered hepatic gene expression in nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Hepatology* 2015;61:1565-1578.
- [112] Gupte AA, Liu JZ, Ren Y, Minze LJ, Wiles JR, Collins AR, et al. Rosiglitazone attenuates age- and diet-associated nonalcoholic steatohepatitis in male low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Hepatology* 2010;52:2001-2011.
- [113] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine* 2007;20:351-358.
- [114] Ai ZL, Zhu CH, Min M, Wang J, Lan CH, Fan LL, et al. The role of hepatic liver X receptor alpha- and sterol regulatory element binding protein-1c-mediated lipid disorder in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *The Journal of international medical research* 2011;39:1219-1229.
- [115] Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of clinical and experimental pathology* 2010;3:505-514.
- [116] Vazquez-Chantada M, Gonzalez-Lahera A, Martinez-Arranz I, Garcia-Monzon C, Regueiro MM, Garcia-Rodriguez JL, et al. Solute carrier family 2 member 1 is involved in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;57:505-514.
- [117] Nagaya T, Tanaka N, Kimura T, Kitabatake H, Fujimori N, Komatsu M, et al. Mechanism of the development of nonalcoholic steatohepatitis after pancreaticoduodenectomy. *BBA clinical* 2015;3:168-174.

[118] Maruyama H, Kiyono S, Kondo T, Sekimoto T, Yokosuka O. Palmitate-induced Regulation of PPARgamma via PGC1alpha: a Mechanism for Lipid Accumulation in the Liver in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of medical sciences* 2016;13:169-178.