



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA  
DIPARTIMENTO DI FISICA E ASTRONOMIA "ETTORE  
MAJORANA"

DOTTORATO DI RICERCA IN SISTEMI COMPLESSI  
PER LE SCIENZE FISICHE, SOCIO-ECONOMICHE E  
DELLA VITA  
XXXII Ciclo

COORDINATORE: PROF. ANDREA RAPISARDA

---

**DOTT.SSA ALESSANDRA SCAMPORRINO**

***CODING E NON-CODING* RNA COME  
BIOMARCATORI DI SEVERITA' DI NAFLD E DI  
FIBROSI**

---

\_\_\_\_\_  
**TESI DI DOTTORATO**  
\_\_\_\_\_

Tutor principale: Prof.ssa Agata Maria Rabuazzo  
Tutor secondario: Prof. Giovanni Giuffrida

---

ANNO ACCADEMICO 2018– 2019

# INDICE

RIASSUNTO .....	1
1. INTRODUZIONE .....	3
1.1 DAL “ <i>JUNK DNA</i> ” AGLI RNA NON CODIFICANTI.....	3
1.2 <i>LONG NON-CODING RNA</i> .....	7
1.3 BIOGENESI E FUNZIONE DEI LNCRNA .....	9
1.4 NAFLD .....	12
1.4.1 DEFINIZIONE E PREVALENZA .....	12
1.4.2 STADI DELLA NAFLD .....	13
1.4.3 DIAGNOSI .....	14
1.4.4 DIAGNOSI NON INVASIVA NEI PAZIENTI AFFETTI DA NAFLD.....	16
1.4.4.1 BIOMARCATORI DI APOPTOSI DEGLI EPATOCITI .....	16
1.4.4.2 BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO E DI INFIAMMAZIONE.....	17
1.4.4.3 BIOMARCATORI DERIVANTI DA MODELLI PREDITTIVI DI NASH.....	18
1.4.2 DIAGNOSI NON INVASIVA DI FIBROSI.....	19
1.4.2.1 MODELLI PREDITTIVI SEMPLICI PER LA FIBROSI .....	20
1.4.2.2 MODELLI PREDITTIVI COMPLESSI PER LA FIBROSI ...	22
1.4.2.3 STUDI DI <i>IMAGING</i> PER FIBROSI .....	23

1.5 PATOGENESI DELLA NAFLD .....	25
1.6 PROCESSI BIOLOGICI COINVOLTI DELLA NAFLD.....	26
1.6.1 <i>UPTAKE</i> DEGLI ACIDI GRASSI LIBERI E BIOSINTESI DE NOVO .....	26
1.6.2 STRESS OSSIDATIVO .....	30
1.6.3 INFIAMMAZIONE .....	31
1.7 FIBROSI EPATICA .....	34
1.8 LNCRNA E NAFLD .....	39
1.9 LNCRNA E FIBROSI EPATICA .....	40
1.10 LNCRNA NEI FLUIDI BIOLOGICI.....	43
1.11 LNCRNA CIRCOLANTI NELLE PATOLOGIE EPATICHE .....	43
2. OBIETTIVI.....	46
3. MATERIALI E METODI .....	48
3.1 SOGGETTI DELLO STUDIO.....	48
3.2 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA.....	49
3.3 RACCOLTA DEL CAMPIONE .....	50
3.4 ESPERIMENTI IN VITRO SU CULTURE CELLULARI.....	50
3.5 ESTRAZIONE DELL'RNA .....	51
3.6 ANALISI DEI MICROARRAY.....	51
3.7 ANALISI COMPUTAZIONALE.....	53
3.8 SAGGI SINGOLI IN qPCR.....	53
3.9 ANALISI STATISTICA.....	54

4. RISULTATI.....	55
4.2 ANALISI DELLE PATHWAY DEI TRASCRIPTI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI.....	60
4.3 VALIDAZIONE MEDIANTE REAL TIME PCR .....	60
4.4 ASSOCIAZIONE DEI TRASCRIPTI VALIDATI CON I DATI CLINICI E I PARAMETRI ISTOLOGICI.....	69
4.5 ANALISI DEI TRASCRIPTI VALIDATI NELLE BIOPSIE EPATICHE E NEL MODELLO <i>IN VITRO</i> .....	76
4.6 ANALISI DELLE CURVE ROC .....	79
5. DISCUSSIONE.....	83
6. PROSPETTIVE FUTURE.....	92
7. BIBLIOGRAFIA.....	94

## RIASSUNTO

La steatosi epatica non alcolica (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) è l'epatopatia cronica più comune nei paesi industrializzati con una prevalenza del 20-30% nella popolazione generale. La NAFLD comprende un vasto spettro di patologie epatiche e sebbene sia generalmente considerata una condizione benigna, essa può progredire verso la steatoepatite (*Non Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH) che rappresenta il punto critico di evoluzione verso ulteriori stadi della NAFLD, tra cui la fibrosi, la cirrosi ed infine l'epatocarcinoma. Attualmente non esiste alcun sistema non invasivo che permetta di ottenere una diagnosi chiara ed univoca di NASH e di stadare il livello di fibrosi. La biopsia epatica rimane dunque il *gold standard* per la diagnosi definitiva di NAFLD e per la stadiazione della fibrosi. A causa dei rischi connessi alla biopsia epatica ed all'impossibilità di applicarla su larga scala, è di estrema importanza l'identificazione di nuovi biomarcatori non invasivi che possano discriminare i pazienti ad alto rischio di progressione.

Ad oggi non sono presenti in letteratura dati riguardanti l'alterazione del profilo di espressione dei *coding* e dei *non-coding* RNA nel siero di pazienti con NAFLD rispetto a soggetti di controllo. A tale scopo abbiamo eseguito un'analisi dell'intero trascrittoma espresso nel siero di pazienti *mild* NAFLD (NAS score  $\leq 4$ ; F=0), *severe* NAFLD (NAS score  $\geq 5$ ; F=3) e soggetti di controllo. Attraverso analisi computazionali abbiamo verificato il coinvolgimento dei *coding* e dei *non-coding* RNA differenzialmente espressi identificati in *pathway* associate alla fisiopatogenesi della NASH e della

fibrosi. Abbiamo analizzato e confermato l'espressione di un set di *coding* e di *non-coding* RNA (UBE2V1, BNIP3L, RP11-128N14.5, TGFB2/TGFB2-OT1 e sherveebu) differenzialmente espressi tramite *Single Real Time* PCR in una coorte interna indipendente ed in una coorte esterna di pazienti con NAFLD. I dati d'espressione di tali trascritti sono stati analizzati anche nelle biopsie epatiche (n=12: 4 CTRL, 4 *mild* NAFLD, 4 *severe* NAFLD) e nelle cellule HepG2 esposte ad una miscela di oleato e palmitato o solo palmitato (modello cellulare di NAFL/NASH) sia a livello intracellulare che extracellulare. Abbiamo, inoltre, osservato che i valori relativi ai dati d'espressione dei trascritti validati erano associati attraverso una relazione di regressione lineare sia con i *marker* biochimici di *routine*, sia con i *marker* istologici utilizzati nella pratica clinica per diagnosticare e stadiare la NAFLD e la fibrosi. Infine, abbiamo valutato il potere diagnostico dei trascritti validati attraverso l'analisi delle curve ROC ed in particolare abbiamo osservato che la combinazione di TGFB2/TGFB2-OT1 con il *Fibrosis-4 Index* o con la *Liver Stiffness Measurement* era in grado di migliorare l'identificazione dei pazienti con fibrosi F 3-4 rispetto a quelli con fibrosi F 0-2.

Il nostro studio fornisce nuovi dati *high-throughput* sull'espressione dei *coding* e dei *non-coding* RNA nel siero di pazienti con NAFLD e pone le basi per l'identificazione di nuovi biomarcatori come alternative future alla biopsia epatica.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 DAL “*JUNK DNA*” AGLI RNA NON CODIFICANTI

Il Progetto Genoma Umano (HGP) fu lanciato nell'autunno del 1990 da un consorzio internazionale costituito da Stati Uniti d'America, Regno Unito, Francia, Australia e Cina, sotto il coordinamento dall'*U.S. Department of Energy* (DOE) e dal *National Institute of Health*. Lo scopo del HGP era quello di identificare la sequenza nucleotidica dei geni umani e la loro posizione sui vari cromosomi. Inizialmente, i ricercatori ipotizzarono che il nostro genoma comprendesse circa 100.000 geni codificanti per proteine (1); nel 2001 il consorzio internazionale pubblicò una prima bozza della sequenza del genoma umano comprendente circa 30.000-35.000 geni codificanti per proteine (2), seguita da una seconda versione finale del HGP in cui questa stima era stata ulteriormente ridotta a 24.500 (3). Nel 2007, dopo successive analisi, è stato osservato che nel genoma umano erano presenti circa 20.500 geni codificanti per proteine e negli ultimi anni, grazie ad ulteriori studi, il numero di geni codificanti proteine è sceso a 19.000 (4). Dopo anni di incessanti ricerche è emerso che meno del 2% dell'intero genoma umano codificava per proteine mentre il rimanente 98% fu erroneamente denominato “*junk DNA*”, ovvero DNA privo di funzione (Figura 1).

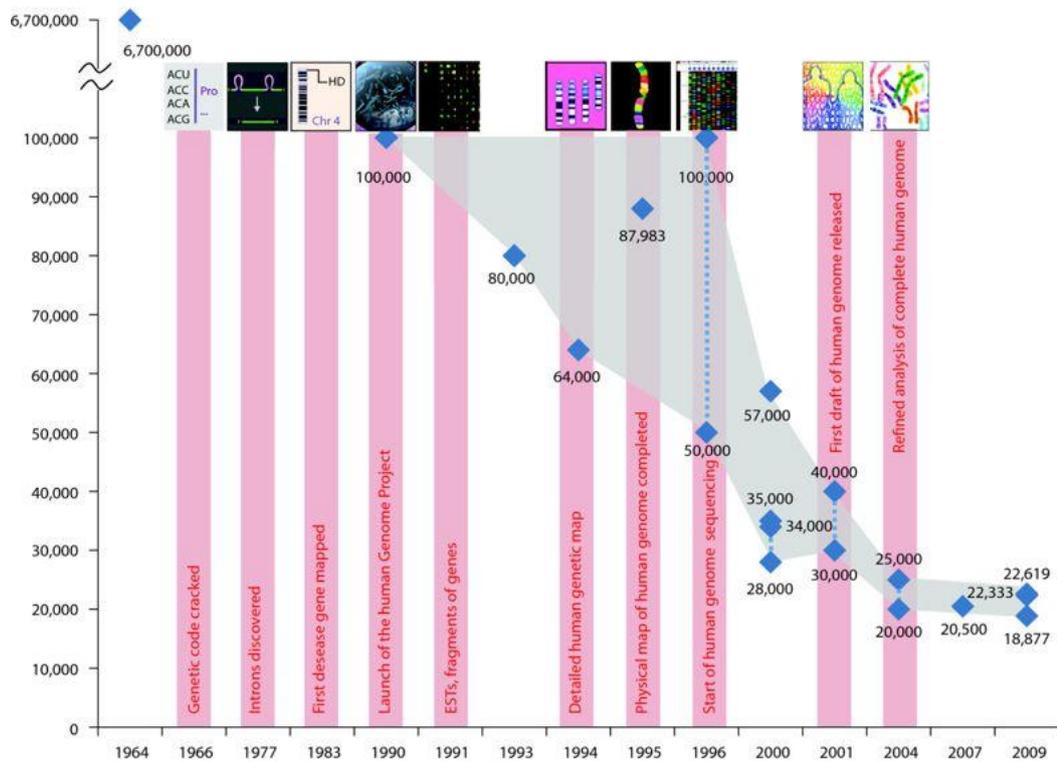


Figura 1. Trend del numero di geni codificanti per proteine nell'uomo dall'avvio del progetto genoma umano a qualche anno dopo la sua conclusione (5).

Al fine di comprendere il reale significato di queste scoperte e di identificare il ruolo del “*junk DNA*”, furono avviati i progetti ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) e *Roadmap Epigenomics* (6, 7). I risultati di questi studi mostrarono che circa l'80% del genoma umano era pervasivamente trascritto ma non tradotto in proteine e questi trascritti furono denominati *non-coding RNA* (8).

Da studi di genomica comparata inoltre è stato stimato che il numero di geni che non codificano per proteine tende ad aumentare in maniera esponenziale lungo la scala evolutiva, mentre il numero di geni codificanti proteine sembra aver raggiunto una fase di *plateau*; questa potrebbe quindi essere la ragione

della maggiore complessità osservata negli organismi superiori rispetto agli organismi inferiori a parità di numero di geni codificanti per proteine (9) (Figura 2).

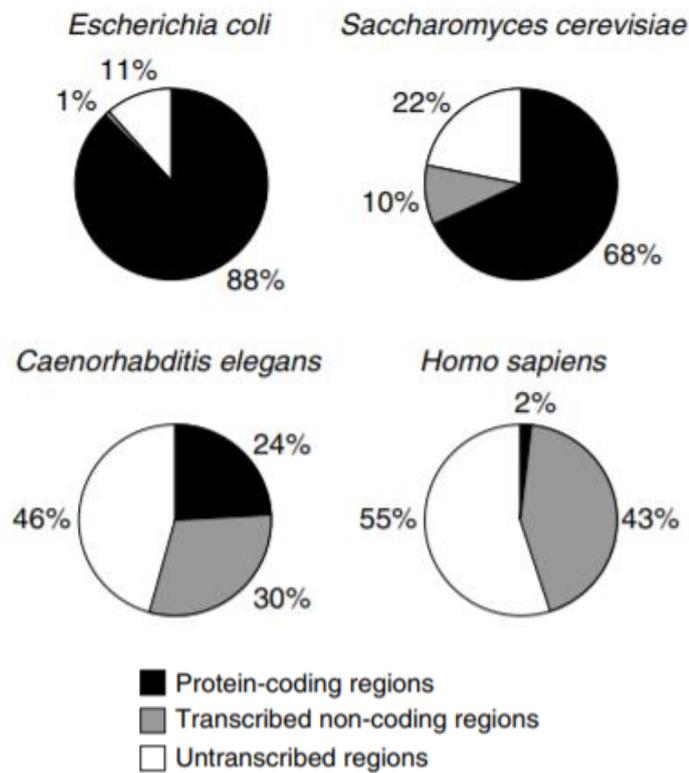


Figura 2. Rappresentazione schematica dei *coding* e dei *non-coding* RNA all'aumentare della complessità degli organismi (10).

Negli organismi complessi, l'aumento di trascritti non codificanti per proteine ha portato a considerare l'ipotesi che i *non-coding RNA* (ncRNA) rappresentino i componenti di un sistema di regolazione parallelo a quello mediato dalle proteine, ma molto più sofisticato.

Per comprendere l'importanza di queste molecole di RNA non codificanti è necessario ricordare che l'RNA è una molecola estremamente versatile, in grado di svolgere innumerevoli funzioni regolatorie e la sua multifunzionalità deriva da diverse proprietà fisico-chimiche della molecola stessa. L'RNA,

mediante un semplice appaiamento di basi, può riconoscere e legare molecole *target* sia di DNA che di RNA in modo molto specifico e regolarne la trascrizione, il processamento, *l'editing*, la traduzione o la degradazione. Le molecole di RNA possono ripiegarsi in complesse strutture tridimensionali incrementando il riconoscimento dei target molecolari a cui l'RNA può legarsi con elevata specificità ed affinità; il legame di specifici ligandi può, inoltre, innescare modifiche dinamiche conformazionali nella struttura terziaria dell'RNA. Una caratteristica importante delle molecole di RNA è data dalla loro elevata dinamicità: a differenza delle proteine, l'RNA può essere rapidamente trascritto e degradato, di conseguenza l'RNA è una molecola molto dinamica che va incontro a rapida attivazione o inattivazione (11).

Nel corso degli anni sono state identificate diverse classi di *non-coding* RNA, che differiscono l'una dall'altra per lunghezza e funzione della sequenza nucleotidica.

La classificazione più comune dei *non-coding* RNA è basata sulla loro dimensione:

- 1) i *long non-coding RNA* (lncRNA), che presentano una lunghezza superiore ai 200 nucleotidi;
- 2) gli *small non-coding RNA*, che hanno dimensioni uguali o inferiori ai 200 nucleotidi; quest'ultima classe comprende gli *small nuclear RNA* (snRNA o U-RNA), gli *small nucleolar RNA* (snoRNA), i *PIWI-interacting RNA* (piRNA), i *transfer RNA* (tRNA) ed i *microRNA* (miRNA) (6).

Un altro metodo di classificazione si basa sull'attività funzionale dei *non-coding* RNA e permette di distinguere:

- 1) *housekeeping* espressi costitutivamente, sono necessari per le normali funzioni e per la sopravvivenza della cellula ( tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, *telomerase* RNA);
- 2) ncRNA regolatori sono espressi solo in specifici stadi dello sviluppo, del differenziamento cellulare o in risposta a stimoli esterni (miRNA, siRNA, lncRNA, piRNA) (12).

## **1.2 LONG NON-CODING RNA**

I *long non-coding* RNA (lncRNA) costituiscono una classe molto eterogenea di RNA non codificanti accomunati dalla lunghezza superiore ai 200 nucleotidi. Tali trascritti sono considerati non codificanti per l'assenza di lunghe ORF (*Open Reading Frame*); tuttavia è stato recentemente dimostrato che alcuni lncRNA possono codificare per piccoli peptidi ed agire in maniera bifunzionale sia da trascritti codificanti che non codificanti (13, 14). Ad oggi, il progetto ENCODE (GENCODE v26) ha annotato nell'uomo circa 16.000 lncRNA che danno origine a oltre 28.000 distinti trascritti. Studi recenti hanno dimostrato che anche i geni codificanti proteine possono produrre varianti trascrizionali prive della capacità di codificare, aggiungendo così altri lncRNA al vasto numero di *non-coding* RNA già presenti nelle cellule (15).

Generalmente, i lncRNA sono raggruppati in base alla loro struttura, funzione, localizzazione e interazione con altre molecole (16).

Attualmente è possibile distinguere, in base alle diverse posizioni sul genoma e all'orientamento dei geni codificanti per le proteine, cinque classi principali di lncRNA (17) (Figura 3):

- 1) lncRNA senso, che si estendono su più introni o esoni di un gene codificante;
- 2) lncRNA intronici, che si trovano all'interno di un introne del gene codificante;
- 3) lncRNA antisenso, che sono trascritti dal filamento opposto di un gene codificante proteine;
- 4) lncRNA bidirezionali, che sono localizzati sul filamento opposto a quello codificante per proteine ma entro una kilobase (kb) dal promotore e sono trascritti in direzione opposta al gene codificante;
- 5) lncRNA intergenici, che sono localizzati tra due geni codificanti.

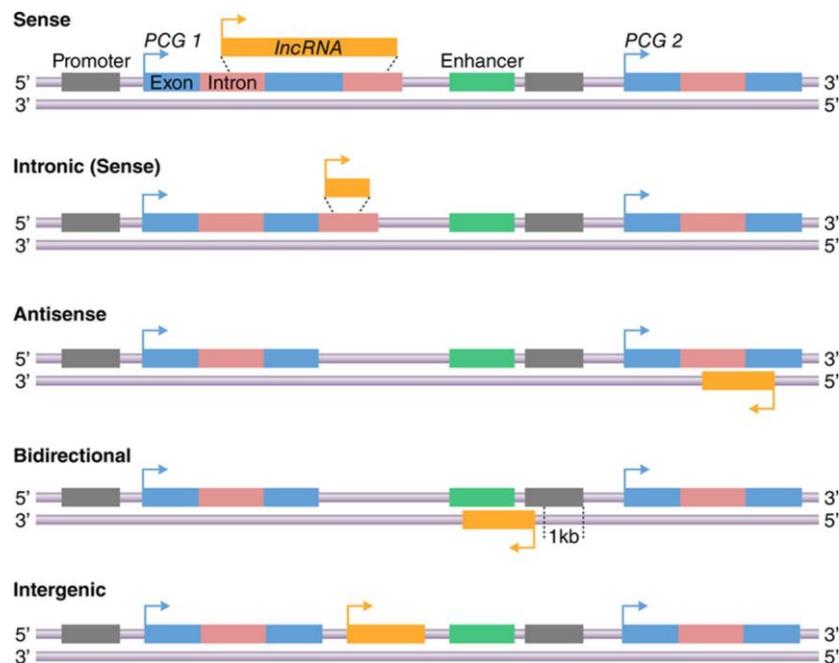


Figura 3. Classificazione lncRNA in base alla posizione genomica e all'orientamento dei geni codificanti le proteine (PCG) (17).

Numerosi studi hanno evidenziato che i lncRNA presentano livelli d'espressione più bassi rispetto al gene codificante, ma la loro espressione è specifica di un determinato stadio di sviluppo e tipo cellulare (18, 19). Ciò ha suscitato un notevole interesse nei ricercatori, infatti negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi studi che hanno mostrato il coinvolgimento di questa classe di *non-coding* RNA nella regolazione di diversi processi sia fisiologici (20, 21) che patologici (22, 23). Alcune evidenze sperimentali, inoltre, suggeriscono il ruolo fondamentale dei lncRNA nella regolazione di funzioni metaboliche (24), in particolare nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico (25).

### **1.3 BIOGENESI E FUNZIONE DEI LNCRNA**

I *long non-coding* RNA condividono numerose caratteristiche con gli RNA messaggeri (mRNA): sono trascritti solitamente dall'RNA Polimerasi II a partire da regioni intergeniche, esoniche o introniche, presentano un *cap* all'estremità 5', possiedono siti canonici di *splicing* e molti di questi sono poliadenilati al 3'; tuttavia, a differenza dei geni codificanti per proteine, i lncRNA sono meno conservati dal punto di vista evolutivo, sono di dimensioni inferiori e solitamente sono costituiti da 1-2 esoni (26).

La maggior parte dei lncRNA presenta meccanismi di azione sconosciuti. Infatti, solo per poche molecole è noto il preciso meccanismo d'azione e la lista dei lncRNA caratterizzati dal punto di vista funzionale è in continua crescita. Come mostrato in figura 4, i lncRNA sono molecole funzionali in grado di

regolare l'espressione genica a diversi livelli: epigenetico, trascrizionale, post-trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale.

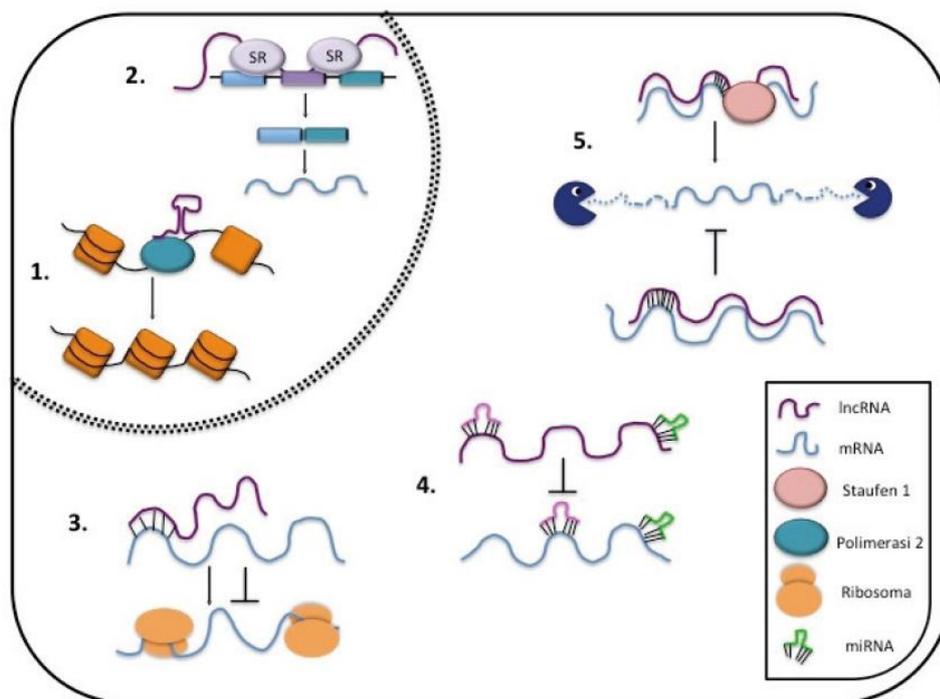


Figura 4. Principali meccanismi d'azione dei lncRNA (27).

A livello epigenetico, i lncRNA possono regolare gli stati di compattamento della cromatina mediante il reclutamento di complessi di rimodellamento della cromatina sia in *loci* genomici che si trovano in prossimità del loro sito di trascrizione (regolazione in *cis*) sia in *loci* genomici distanti (regolazione in *trans*). Il lncRNA ANRIL (*lncRNA Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*) e il lncRNA HOTAIR (*HOX Transcript Antisense RNA*) sono due *long non-coding RNA* che agiscono a livello epigenetico. In particolare, ANRIL è il lncRNA antisense del gene che codifica per INK4A. Questo lncRNA viene trascritto in prossimità del *locus* genomico che codifica per INK4A e interagisce con i componenti del *Polycomb Repressive Complex 1* (PRC1) determinando il silenziamento del gene INK4A (28). Il lncRNA HOTAIR,

trascritto a livello del locus HOXC, reprime l'espressione genica del locus HOXD che si trova a 40 kb di distanza mediante l'interazione con il *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) (29).

A livello trascrizionale, i lncRNA mediante il legame con il proprio promotore, possono impedire l'accesso a fattori di trascrizione inibendo la trascrizione di specifici geni (ad esempio il lncRNA DHFR *DiHydroFolate Reductase*) (30).

A livello post-trascrizionale, i lncRNA possono regolare il processamento dei pre-mRNA e la stabilità e/o la degradazione degli mRNA. I lncRNA antisenso possono formare, grazie alla loro complementarietà di sequenza, *duplex* RNA-RNA con l'RNA senso corrispondente interferendo con il riconoscimento dei siti di *splicing* e con il reclutamento dei componenti dello *spliceosoma* (es. trascritto antisenso di N-myc) (31, 32).

I lncRNA sono in grado di regolare positivamente o negativamente la stabilità degli mRNA. Un esempio di regolazione positiva della stabilità dell'mRNA è dato dal lncRNA BACE1AS (*B-site APP Cleaving Enzyme 1 Antisense Strand*): la formazione del *duplex* RNA-RNA aumenta la stabilità dell'mRNA mediante il mascheramento dei siti di riconoscimento del miR-485-5p inibendo la repressione trascrizionale indotta dal miRNA. Per quanto riguarda la regolazione negativa della stabilità degli mRNA, alcuni lncRNA contenenti ripetizioni Alu, denominati *1/2-STAU1-binding site* RNA, sono in grado di legare mRNA contenenti elementi Alu complementari al 3' e di attivare la *Stau1 Mediated Decay* (SMD) (33).

Inoltre l'interazione tra lncRNA antisenso e mRNA senso può avere effetto anche a livello traduzionale. Un esempio è dato dal lncRNA antisenso del gene

Uchl1 (*Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase isozyme L1*); l'interazione tra il lncRNA e l'RNA senso corrispondente può attivare i polisomi determinando un incremento della traduzione dell'mRNA (34).

I lncRNA sono anche in grado di agire da *scaffold* molecolari per collegare due o più proteine in complessi funzionali, possono regolare la localizzazione di complessi proteici in determinati compartimenti cellulari e possono regolare l'attività funzionale di alcune proteine (35).

È stato riportato che i lncRNA sono in grado di interagire con i microRNA riducendo la loro attività regolatoria sugli mRNA target (36).

Infine, i *long non-coding* RNA possono formare strutture secondarie e terziarie ed interagire con altre molecole (16), aumentando ancor di più l'eterogeneità e la diversità che li caratterizza.

Ciò che è emerso da tutti questi studi è che i lncRNA sono altamente eterogenei e hanno una sostanziale versatilità funzionale che risiede nella loro capacità, in quanto lunghe molecole di RNA, di instaurare molteplici interazioni molecolari e ripiegarsi in differenti strutture.

## **1.4 NAFLD**

### **1.4.1 DEFINIZIONE E PREVALENZA**

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD, *Nonalcoholic fatty liver disease*) è definita come un accumulo di trigliceridi a livello epatico superiore al 5-10% in peso del fegato (37) ed è generalmente stimata come la percentuale di epatociti contenenti goccioline lipidiche visibili al microscopio ottico (38). 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 massimo 30 grammi al giorno per l'uomo e 20 grammi al giorno per la donna (39).

La steatosi epatica non alcolica comprende un ampio spettro di condizioni patologiche che vanno dalla semplice steatosi a vari gradi di infiammazione, fibrosi, cirrosi fino al carcinoma epatocellulare (HCC) (40, 41). La NAFLD è una delle principali cause di malattia cronica del fegato ed è associata nei paesi sviluppati ad un incremento della morbilità e mortalità (42). La reale prevalenza della NAFLD non è nota a causa della mancanza di *test* diagnostici specifici e sensibili. Sulla base della diagnosi ecografica, si stima che la NAFLD colpisca circa il 25% della popolazione generale (43), sebbene altri studi suggeriscano che questa prevalenza potrebbe essere persino più elevata (44). Nonostante le differenze nelle stime di prevalenza, il numero di individui con NAFLD è in progressivo aumento in tutto il mondo, in linea con l'incremento di soggetti obesi e con diabete di tipo 2 (45).

#### **1.4.2 STADI DELLA NAFLD**

La NAFLD, nella maggior parte dei soggetti affetti, è asintomatica ed associata a tutte le componenti della sindrome metabolica, cioè ipertensione, dislipidemia, obesità, insulino-resistenza o diabete (46).

Sebbene generalmente considerata una condizione benigna, è stato dimostrato che la steatosi epatica non alcolica può progredire verso la steatoepatite non alcolica (NASH, *Non Alcoholic SteatoHepatitis*), che rappresenta il punto

critico di evoluzione verso ulteriori stadi della NAFLD, tra cui la fibrosi, la cirrosi e infine l'epatocarcinoma (47) (Figura 5).

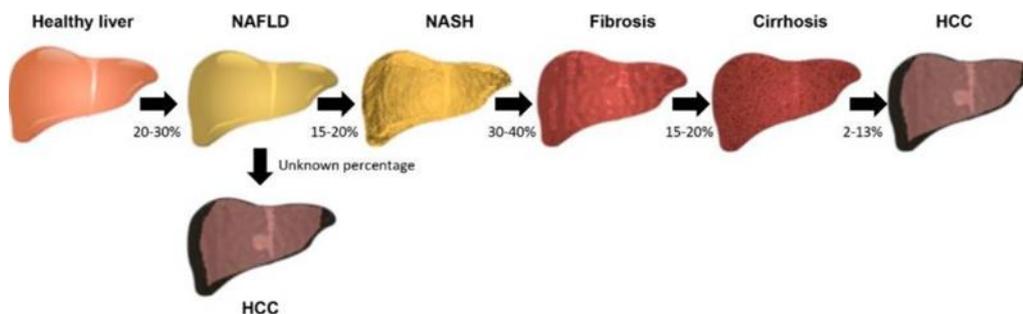


Figura 5. Stadi della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) (48).

Approssimativamente il 15-20% dei pazienti con NAFLD sviluppa la NASH (steatosi con degenerazione degli epatociti, infiammazione lobulare in presenza o in assenza di fibrosi) (49) e il 30-40% dei pazienti NASH sviluppa fibrosi (44). Nel 15-20% dei casi, in questi pazienti, la fibrosi può progredire fino a fibrosi avanzata o cirrosi (50) ed i pazienti NASH con cirrosi spesso sviluppano HCC (51) (Figura 5).

### 1.4.3 DIAGNOSI

La diagnosi di NAFLD è una diagnosi di esclusione e la biopsia epatica è ancora oggi il *gold standard* per differenziare la steatosi semplice dalla NASH e per stadiare il grado di fibrosi.

Le alterazioni più frequenti sono rappresentate dall'incremento costante dei livelli ematici degli enzimi di funzionalità epatica, alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST), accompagnati in molti pazienti anche da valori alterati di gamma-glutamilttransferasi (GGT). Tuttavia, l'ipertransaminasemia non può costituire da sola un *marker* surrogato di NAFLD poiché non si riscontra in tutti i soggetti affetti. La presenza di steatosi

può essere rilevata mediante differenti tecniche di *imaging* come l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) (52). L'indagine di prima linea per la diagnosi di steatosi epatica è rappresentata dall'ecografia in quanto presenta numerosi vantaggi: è disponibile su larga scala, è meno costosa rispetto ad altre procedure ed è abbastanza accurata nel rilevare gradi di steatosi da moderata a severa. Tuttavia, l'ecografia epatica è una metodica operatore-dipendente ed è poco sensibile nel rilevare gradi lievi di steatosi (53); motivo per cui, si ricorre alla biopsia epatica nonostante i rischi ad essa correlati.

Dal punto di vista anatomico-patologico le caratteristiche della NAFLD includono: steatosi, fibrosi, infiltrato infiammatorio, rigonfiamento ("*ballooning*") e necrosi degli epatociti, presenza corpi di Mallory. Per la diagnosi di NAFLD possono essere utilizzati diversi *score* istologici. Il più comune è il "*NAFLD Activity Score*" (NAS) proposto da Kleiner *et al* (38). Il sistema di Kleiner è basato su uno *score* dato dalla somma di differenti parametri: grado di steatosi (da 0 a 3), grado di infiammazione lobulare (da 0 a 3) e livello di *ballooning* epatocitario (da 0 a 2). Il sistema di Kleiner prevede inoltre, un punteggio separato per la stadiazione della fibrosi (da 0 a 4). Sulla base della classificazione di Kleiner i pazienti con NAS score <3 presentano steatosi semplice, mentre i pazienti con NAS score  $\geq 5$  presentano NASH definita (38). Più recentemente è stato proposto il "*SAF score*" che prende in esame il grado steatosi, l'attività della malattia (basata sulla valutazione del *ballooning* degli epatociti e dell'infiammazione lobulare) ed il grado di fibrosi (54). La contemporanea presenza di steatosi, *ballooning* e di infiammazione

lobulare, ciascuno dei quali almeno di grado 1 (SAF Score  $\geq 3$ ), permette la distinzione dei pazienti affetti da NASH (55, 56).

#### **1.4.4 DIAGNOSI NON INVASIVA NEI PAZIENTI AFFETTI DA NAFLD**

Data l'elevata prevalenza nella popolazione generale e data la possibilità di progressione verso condizioni patologiche più gravi, negli ultimi anni uno degli obiettivi principali della ricerca è stato quello di identificare e validare dei potenziali nuovi biomarcatori non invasivi di NASH.

##### **1.4.4.1 BIOMARCATORI DI APOPTOSI DEGLI EPATOCITI**

L'aumento dell'apoptosi epatocitaria è un meccanismo centrale che contribuisce alla progressione della NAFLD verso la NASH ed allo sviluppo della fibrosi (57). L'apoptosi avviene attraverso due vie: la via estrinseca, mediata da recettori di morte come Fas, e la via intrinseca, mediata da danno mitocondriale. Entrambe le vie possono portare all'attivazione della caspasi 3, che determina il clivaggio di diversi substrati intracellulari tra cui una proteina caratteristica dei filamenti intermedi degli epatociti, la citocheratina 18 (CK-18). In uno studio condotto su 139 pazienti NAFLD di Feldstein *et al.*, è stato dimostrato che i livelli plasmatici di CK-18, misurati mediante ELISA, erano significativamente più alti in pazienti con diagnosi di NASH accertata mediante biopsia epatica rispetto ai pazienti con diagnosi incerta (58). Diversi sono gli studi che hanno supportato la rilevazione dei frammenti CK-18 come biomarcatore di NASH (59-61). Tuttavia, dallo studio condotto da Cusi K. *et*

*al.* (62) è emerso che la rilevazione dei frammenti CK-18 in casi di NAFLD, NASH o fibrosi presentava rispettivamente una sensibilità del 63%, del 58% e del 54% ed una specificità dell'83%, del 68% e dell'85%; data la limitata sensibilità di questo biomarcatore, dunque, il dosaggio dei frammenti CK-18 non si è rilevato utile per lo *screening* e la stadiazione della NASH (63).

#### **1.4.4.2 BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO E DI INFIAMMAZIONE**

Lo stress ossidativo svolge un ruolo chiave nel danno degli epatociti e nella progressione della malattia verso la NASH (64, 65). Numerose *pathway* di ossidazione contribuiscono alla perossidazione lipidica nella NASH, inclusi i processi enzimatici e non enzimatici mediati dai radicali liberi. Ognuna di queste *pathway* genera diversi prodotti di ossidazione che possono essere quantificati. Chalasani *et al.* hanno misurato i livelli sierici di perossidazione lipidica in pazienti con NASH comprovata dalla biopsia ed in controlli accoppiati per età, sesso e BMI; in questo modo, hanno dimostrato che sia le LDL ossidate che le sostanze che reagiscono con l'acido tiobarbiturico erano significativamente più elevate nel gruppo dei pazienti con NASH (66). Risultati contrastanti sono stati ottenuti utilizzando la malonaldeide, le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico e la vitamina E come possibili biomarcatori di stress ossidativo in pazienti con NASH (66, 67).

Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di citochine pro-infiammatorie, come TNF $\alpha$  e l'interleuchina 6, sono più elevati in pazienti con NASH rispetto ai pazienti affetti da NAFLD, tuttavia le differenze osservate non sono risultate

essere abbastanza forti dal punto di vista statistico per giustificarne l'utilizzo come marcatori non invasivi (68, 69). Molte altre citochine (IL-1B, proteine infiammatorie dei macrofagi) ed adipochine (resistina, visfatina, proteina legante il retinolo-4) sono state studiate come potenziali biomarcatori con risultati contrastanti (70).

#### **1.4.4.3 BIOMARCATORI DERIVANTI DA MODELLI PREDITTIVI DI NASH**

Sono stati sviluppati numerosi modelli predittivi che combinano variabili cliniche e biochimiche utilizzate di *routine* con diversi biomarcatori predittivi di NASH. Esempi di modelli predittivi che includono la combinazione di dati clinici e di laboratorio sono:

- lo *score* HAIR che si ottiene dalla combinazione di ipertensione, ALT ed insulino-resistenza (71).
- l'indice predittivo della NASH (NPI) che include età, sesso femminile, indice di massa corporea, HOMA-IR e il logaritmo di AST×ALT (72).
- Il NASH test è stato sviluppato in un *set* di 160 pazienti utilizzando la combinazione di 13 variabili cliniche e biochimiche tra cui età, sesso, peso, altezza, livelli sierici di colesterolo, trigliceridi, macroglobulina  $\alpha_2$ , apolipoproteina A1, aptoglobina, GGT, ALT, AST e bilirubina (73).

In uno studio *genome-wide* condotto da Dongiovanni *et al.*, sono stati identificati i principali determinanti genetici della NAFLD e della sua gravità, in particolare il genotipo PNPLA3 era un forte biomarcatore non invasivo in grado di prevedere la diagnosi istologica di NASH (74). Il genotipo PNPLA3 è

stato utilizzato per sviluppare il “NASH *score*” che include anche i livelli di insulina e di AST; tale *score* ha mostrato una buona precisione in due coorti europee indipendenti (75). Affinché tali modelli predittivi possano in futuro sostituire la biopsia epatica come standard di riferimento per la diagnosi della NASH, saranno necessari ulteriori studi per valutare questi modelli in diverse popolazioni e per stabilire la loro utilità nel predire gli esiti clinici.

#### **1.4.2 DIAGNOSI NON INVASIVA DI FIBROSI**

La fibrosi associata alla NASH ha diversi stadi che vanno dall'assenza di fibrosi (F0) alla cirrosi (F4); dal punto di vista clinico viene distinta la fibrosi clinicamente significativa (F2-F4) dalla fibrosi avanzata (F3-F4). Tale distinzione è stata utilizzata per interpretare gli studi che hanno utilizzato *test* non invasivi per la diagnosi di fibrosi epatica. È noto, da dati presenti in letteratura, che esistono differenti fattori di rischio in grado di predire lo sviluppo della fibrosi, quali l'età avanzata, l'obesità grave, il diabete di tipo 2, l'elevato rapporto AST-ALT, l'ipertensione, la dislipidemia e la presenza della sindrome metabolica (71, 76, 77).

Secondo uno studio pubblicato su *Hepatology*, lo stadio della fibrosi epatica potrebbe essere il fattore più importante nel determinare la prognosi della NAFLD e nel prevedere il rischio di progressione verso la cirrosi e le complicanze ad essa associate (78).

Pertanto, sono state sviluppate numerose strategie non invasive per cercare di stadiare la fibrosi epatica in questa popolazione di pazienti.

### 1.4.2.1 MODELLI PREDITTIVI SEMPLICI PER LA FIBROSI

- Il rapporto AST-ALT (*AST/ALT Ratio*, AAR) è il modello predittivo più semplice per la fibrosi. I livelli di ALT sono generalmente più elevati rispetto ai livelli di AST nei pazienti con la NAFLD; tuttavia, avere un  $AAR > 1$  è indicativo della presenza di fibrosi avanzata. L'AAR ha un buon valore predittivo negativo (93%) per escludere la fibrosi avanzata (79).
- *BARD score* deriva dalla somma di 3 variabili ( $BMI \geq 28 = 1$  punto, rapporto AST-ALT  $\geq 0,8 = 2$  punti, presenza di diabete = 1 punto); un *BARD score*  $> 2$  è associato alla fibrosi avanzata (AUROC compreso tra 0,70 e 0,81) (79, 80).
- *FIB-4 index (Fibrosis Index Based on four factors)* comprende l'età, la conta piastrinica, ALT ed AST (81), può essere calcolato utilizzando il seguente calcolatore online:  
<http://gihep.com/calculators/hepatology/fibrosis-4-score/>.
- Sebbene FIB-4 sia stato originariamente sviluppato per identificare la fibrosi epatica in pazienti con infezione da epatite C, ha mostrato risultati promettenti nell'escludere uno stato avanzato di fibrosi anche in pazienti affetti da NAFLD con un valore di cut-off  $< 1,3$  ed un valore predittivo negativo del 90-95% (79, 80).
- *APRI (AST to Platelet Ratio Index)* prende in considerazione la conta piastrinica, ALT e AST, può essere calcolato utilizzando il seguente

calcolatore online: <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/clinical-calculators/apri>. Da una meta-analisi condotta su 40 studi, è emerso che valori di APRI maggiori di 1 presentavano una sensibilità del 76% ed una specificità del 72% nel prevedere la cirrosi. Inoltre, valori APRI maggiori di 0,7 mostravano una sensibilità del 77% ed una specificità del 72% nel prevedere una fibrosi epatica significativa (82). APRI da solo non è sufficientemente sensibile per escludere una fibrosi epatica significativa. Alcune prove suggeriscono che l'uso di più indici in combinazione (come APRI più FibroTest) o un approccio algoritmico permetterebbero una maggiore precisione diagnostica rispetto all'utilizzo di APRI da solo (83).

- Il NAFLD *fibrosis score* (NFS) (84) si ottiene dalla combinazione di età, presenza di diabete, indice di massa corporea, piastrine, albumina e ARR. Questo *score* presenta due valori di cut-off:  $< -1.455$  per prevedere l'assenza di fibrosi avanzata (F0–F2) e  $> 0.675$  per prevedere la presenza di fibrosi avanzata (F3–F4). Questo *score* è stato validato in più studi con un AUROC stimato di 0,85 (IC 95% 0,81-0,90) (85). Un grande limite di questo *score* è che una percentuale significativa (20-58%) dei pazienti non rientra tra i due valori di *cut-off* proposti e avrà pertanto uno *score* indeterminato.

### 1.4.2.2 MODELLI PREDITTIVI COMPLESSI PER LA FIBROSI

- *Enhanced Liver Fibrosis test* (ELF) è stato sviluppato in base al concetto secondo cui la fibrosi epatica è un processo dinamico che determina un aumento dei livelli sierici dei *marker* del *turnover* della matrice extracellulare. L'ELF comprende tre biomarcatori della fibrosi: l'acido ialuronico, l'inibitore tissutale della metalloproteinasi 1 ed il peptide aminoterminale del procollagene III (86). L'ELF è un buon predittore di morbilità e mortalità epato-correlata in pazienti con malattia epatica cronica, compresi quelli con NAFLD (87).
- Il FibroTest è un altro strumento che prevede la presenza di fibrosi utilizzando cinque biomarcatori (aptoglobina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, apolipoproteina A1, bilirubina totale e GGT). Il valore diagnostico del FibroTest è stato valutato in un'ampia coorte di pazienti NAFLD e ha dimostrato che può prevedere la fibrosi avanzata con un AUROC di 0,8 (88). Tuttavia, occorre prestare attenzione nell'interpretazione dei risultati di questo *test* in pazienti con sindrome di Gilbert, colestasi ed infiammazione acuta poiché queste condizioni aumentano i livelli di bilirubina e di aptoglobina. Il Fibrotest è disponibile in commercio negli Stati Uniti come parte del NASH-FibroSURE® (LabCorp, NC, USA).

### 1.4.2.3 STUDI DI *IMAGING* PER FIBROSI

Negli ultimi dieci anni, i progressi negli studi di *imaging* hanno rivoluzionato la gestione delle malattie del fegato migliorando la capacità di quantificare in modo non invasivo la fibrosi epatica.

- L'elastosografia epatica o LSM (*Liver Stiffness Measurement*) è in grado di misurare in modo non invasivo il grado di fibrosi (*stiffness*) del tessuto epatico. Il Fibroscan o VTCE (*Vibration Controlled Transient Elastography*) prevede l'utilizzo di una sonda ecografica che trasmette un'onda di vibrazione di media ampiezza e bassa frequenza (50 Hz), la quale si propaga attraverso il fegato consentendo di valutarne l'elasticità; la velocità di propagazione dell'onda di vibrazione è direttamente proporzionale alla rigidità del tessuto. La LSM è espressa in kilopascal (kPa), solitamente il valore medio di 10 misurazioni in individui sani è compreso tra 3 e 6 kPa mentre valori > 10,5 kPa sono indice di presenza di fibrosi e cirrosi avanzata (89). Sfortunatamente, la sonda VCTE o la sonda M sono meno affidabili nei pazienti gravemente obesi con NAFLD, perché il tessuto adiposo attenua sia l'onda elastica sia gli ultrasuoni (90). Pertanto, per superare questo problema in pazienti con BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> è stata sviluppata una nuova sonda chiamata sonda XL. È importante sottolineare che i valori di *cut-off* per diagnosticare la fibrosi avanzata con la sonda XL possono essere inferiori a quelli della sonda M; un altro aspetto importante da tenere presente è il rischio di sovrastimare la rigidità epatica con la VCTE a causa di altri fattori confondenti come l'insufficienza cardiaca

congestizia, la colestasi extraepatica e la recente assunzione di cibo (91).

- L'elastosografia con tecnica ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse*) è una metodica alternativa per stimare la rigidità del tessuto epatico che può essere integrata ad una sonda ad ultrasuoni convenzionale, fornendo così la *stiffness* durante l'ecografia di *routine*. Durante l'esecuzione *dell'imaging*, una regione di interesse del fegato viene eccitata meccanicamente usando impulsi acustici. La rigidità epatica è espressa in m/s dopo aver calcolato la mediana per 10 acquisizioni. Diversi studi hanno dimostrato prestazioni diagnostiche simili per l'elastosografia effettuata con tecnica ARFI o VCTE (92, 93).

- L'elastografia a risonanza magnetica (MRE) è un'altra tecnica non invasiva per diagnosticare la fibrosi nei pazienti con NAFLD. Funziona combinando la risonanza magnetica con onde sonore per creare una mappa visiva (elastogramma), che mostra la rigidità del tessuto epatico. In differenti studi è stato osservato che i valori di *stiffness* del tessuto epatico, ottenuti mediante MRE, sono abbastanza riproducibili (94, 95). In particolare, una meta-analisi condotta da Serai *et al.* (96) ha valutato la riproducibilità della MRE epatica dimostrando che i cambiamenti della rigidità epatica uguali o superiori al 22% misurati nello stesso sito, con l'uso dello stesso dispositivo e con gli stessi parametri di acquisizione sono indicativi di un effettivo cambiamento nella rigidità con un intervallo di confidenza del 95%.

## 1.5 PATOGENESI DELLA NAFLD

Ad oggi, la patogenesi della NAFLD non è ancora del tutto nota ma negli ultimi anni sono stati fatti diversi progressi per comprendere i meccanismi che determinano la progressione della NAFLD verso la NASH e la fibrosi epatica (97).

Nel 1998 Day *et al.* hanno proposto un modello patogenetico per spiegare la progressione della NAFLD, il cosiddetto modello a “two-hit”. Il primo “hit”, indotto dall’insulino-resistenza e dalla deposizione dei trigliceridi nel citoplasma degli epatociti, genera un'aumentata suscettibilità del fegato agli insulti causati dal secondo “hit” che comprendono lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale e l’attivazione di *pathway* di infiammazione, tutti processi alla base della progressione da NAFLD a NASH e fibrosi (98). Successivamente è stata proposta l'ipotesi dei “3-hits”, secondo la quale oltre ai primi due *hit* è coinvolto anche un terzo *hit*: lo stress ossidativo riduce la capacità proliferativa degli epatociti maturi portando all'attivazione delle HPC (*hepatocyte progenitor cells*); ed è proprio l'alterata proliferazione delle HPC che rappresenta il terzo *hit*. Ad oggi, queste ipotesi, seppur ancora valide, sono state sostituite da un'ipotesi di “multiple hit” che tiene conto della moltitudine, della complessità e delle interazioni dei numerosi fattori e delle differenti *pathway* che portano alla progressione dalla NAFLD alla NASH, fornendo una spiegazione più accurata della patogenesi della NAFLD (99). I meccanismi più importanti coinvolti nella NAFLD sono riassunti in figura 6.

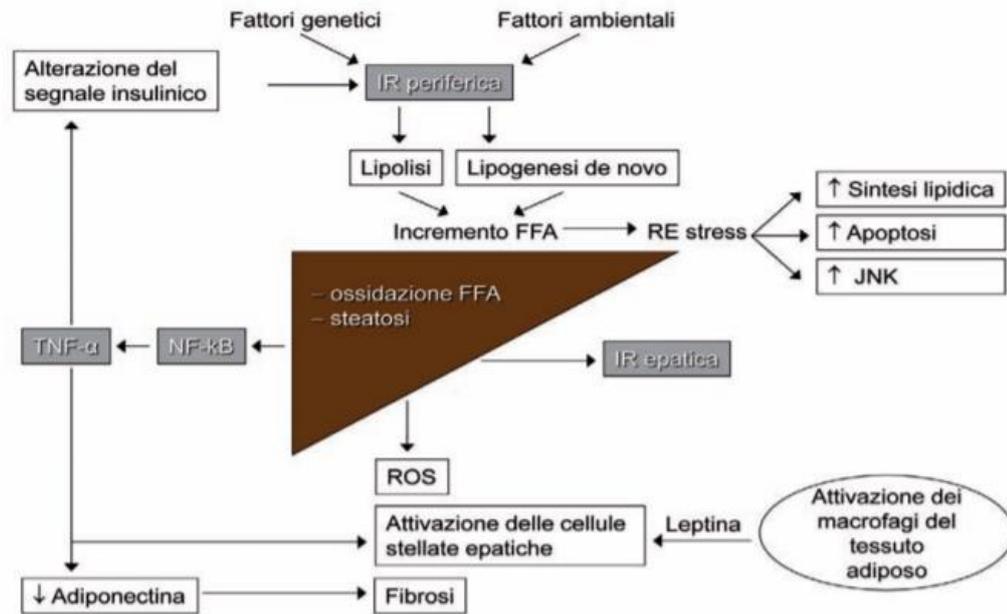


Figura 6. Schema riassuntivo della patogenesi della NAFLD. Immagine modificata da <https://iris.unife.it/handle/>.

Secondo l'ipotesi di "*multiple hit*", più insulti agiscono insieme su soggetti geneticamente predisposti per indurre la NAFLD. Tali "*hit*" includono l'insulino-resistenza, gli ormoni secreti dal tessuto adiposo, i fattori nutrizionali, il microbiota intestinale, fattori genetici ed epigenetici (100).

## 1.6 PROCESSI BIOLOGICI COINVOLTI DELLA NAFLD

### 1.6.1 UPTAKE DEGLI ACIDI GRASSI LIBERI E BIOSINTESI DE NOVO

Gli acidi grassi liberi presenti all'interno degli epatociti derivano *dall'uptake* degli acidi grassi liberi (FFA) plasmatici e dalla biosintesi *de novo*.

All'interno degli epatociti gli FFA possono essere ossidati per produrre ATP oppure possono essere esterificati a trigliceridi, i quali a loro volta possono essere incorporati nelle VLDL e secreti nella circolazione o in alternativa

possono essere immagazzinati sotto forma di vescicole lipidiche che, accumulandosi, possono causare la steatosi epatica (97) (Figura 7).

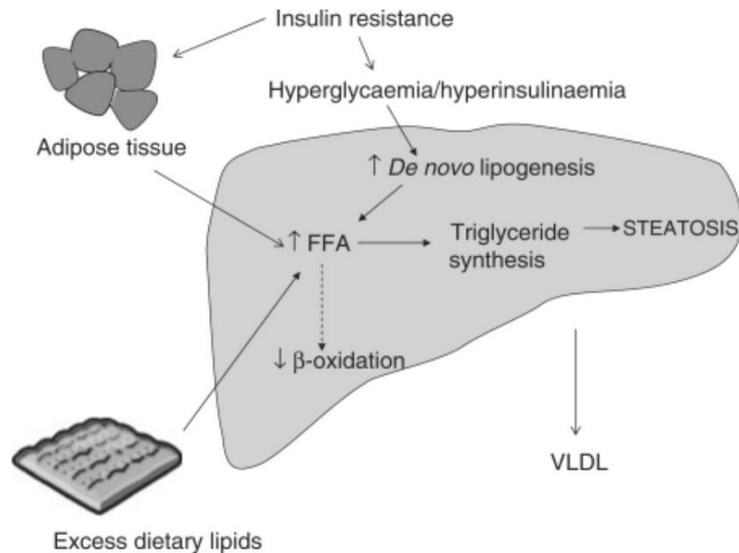


Figura 7. Accumulo lipidico (97).

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 visto che il fegato presenta una limitata capacità di immagazzinare i 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  $\beta$ -ossidazione mitocondriale degli acidi grassi e la sintesi *de novo* degli FFA. Questo *shift* è mediato dalla deregolazione di due fattori di trascrizione coinvolti

nell'attivazione di *pathway* lipogeniche: SREBP-1c e ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*) (101, 102) (Figura 8).

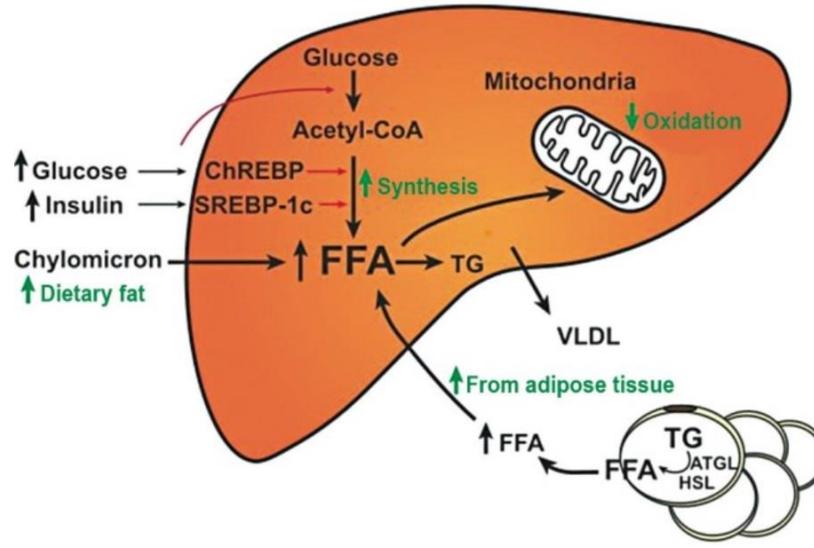


Figura 8. Attivazione di SREBP-1c e ChREBP (103).

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 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 (104).

Nella NAFLD, l'iperinsulinemia 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 induce l'attivazione di ACC2, una isoforma dell'acetil-CoA carbossilasi (ACC), che produce malonil-CoA a livello della membrana mitocondriale; quest'ultima a sua volta inibisce la carnitina palmitoil transferasi-1 (CPT-1) preposta al trasporto degli acidi grassi nei mitocondri determinando di conseguenza una diminuzione della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi (101). La riduzione della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, presente nella NAFLD, è determinata anche dalla disfunzione mitocondriale correlata a tale patologia.

Nella NAFLD, l'insulino-resistenza associata all'iperglicemia induce a livello epatico l'attivazione del fattore di trascrizione ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*).

In condizioni d'iperglicemia, si osserva 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'esoso-monofosfato che determina l'attivazione della fosfatasi PP2A la quale defosforila ChREBP attivandolo, la defosforilazione infatti ne promuove la traslocazione nucleare ed il legame al promotore della *liver type* piruvato chinasi (L-PK), un enzima chiave nella regolazione della glicolisi. L-PK catalizza la conversione del fosfoenol-piruvato in piruvato, che entra nel ciclo di Krebs per generare citrato, la fonte principale di acetil-CoA utilizzato per la sintesi degli acidi grassi (101) (Figura 9).

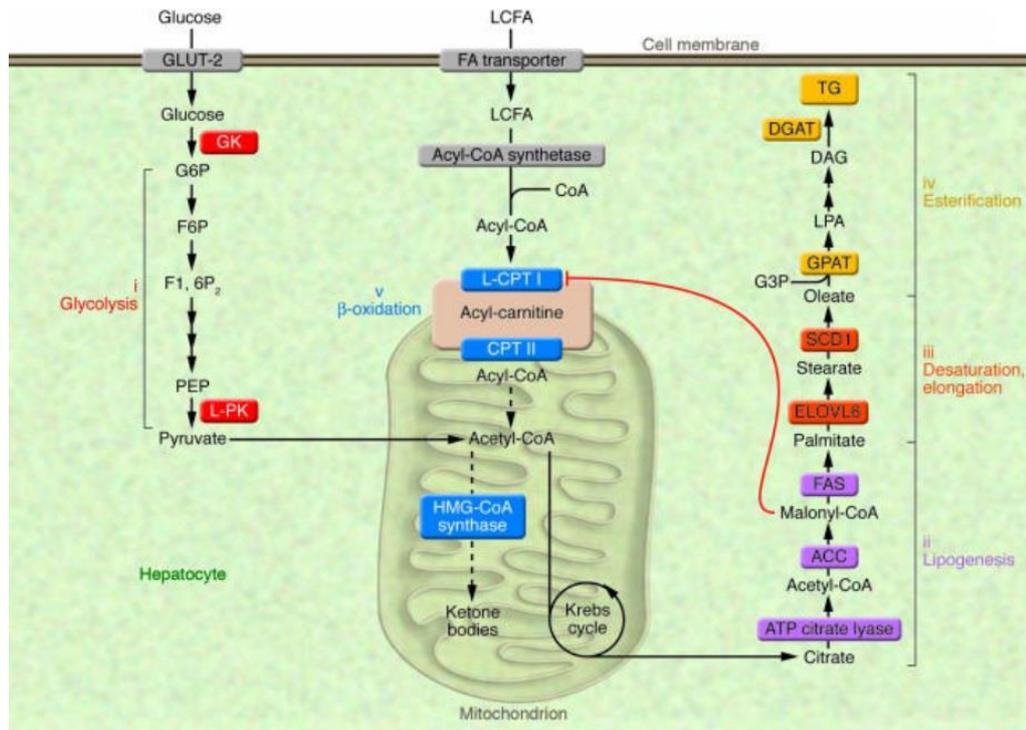


Figura 9. Attivazione della L-PK per la sintesi degli acidi grassi (101).

Riassumendo, 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.

## 1.6.2 STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è determinato da un'alterazione del normale equilibrio tra i fattori ossidanti ed i fattori antiossidanti intracellulari. I più importanti fattori ossidanti sono i ROS (*Reactive Oxygen Species*) ed i mitocondri sono tra i più noti produttori. 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; quindi

disfunzioni a livello mitocondriale potrebbero giocare un ruolo chiave nella patogenesi della NAFLD. Dati presenti in letteratura, condotti in pazienti NAFLD, mostrano alterazioni ultrastrutturali a livello mitocondriale (105); inoltre sia nell'uomo che in modelli animali di NAFLD è stata riportata una riduzione dell'attività funzionale dei complessi della catena di trasporto mitocondriale ed una riduzione della produzione di ATP (106, 107).

I mitocondri non sono l'unica fonte di ROS nella patogenesi della NAFLD, infatti l'inibizione della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale determina l'attivazione di vie alternative di degradazione degli acidi grassi come la  $\beta$ -ossidazione perossisomiale e la  $\omega$ -ossidazione microsomiale, entrambe fonti di ROS.

Infine la perossidazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) innescata dai ROS determina la produzione di aldeidi reattive come sottoprodotto di reazione, ad esempio il trans-4-idrossi-2 noneale (4-HNE) e la malondialdeide (MDA). Il 4-HNE e la MDA, essendo più stabili dei ROS, amplificano l'effetto dello stress ossidativo e sono capaci di diffondere verso target extracellulari distanti (108).

### **1.6.3 INFIAMMAZIONE**

Un altro aspetto cruciale nella patogenesi della NASH è rappresentato dall'infiammazione. Diversi tipi di cellule immunitarie vengono reclutati e/o attivati nel sito della lesione, contribuendo allo sviluppo ed alla progressione della NASH. In particolare, l'attivazione delle cellule di Kupffer (KC) è fondamentale nella NASH e precede il reclutamento di altre cellule (109). È stato dimostrato da Lanthier *et al.* (110) che la deplezione delle KC aumenta la

sensibilità all'insulina, migliora l'infiammazione e la fibrosi. Le KC presentano un'elevata plasticità ed in base alle condizioni ambientali e metaboliche possono essere distinti due fenotipi differenti: M1 con effetto pro-infiammatorio e M2 con effetto immunoregolatorio (111). La differenziazione delle KC verso il fenotipo M1 è principalmente guidata dai PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) che interagendo con i TLR (*Toll Like Receptor*) inducono la secrezione di varie citochine, come IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , CCL2 e CCL5, che determinano un ulteriore danno agli epatociti ed il rilascio di DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*). I DAMP, a loro volta, agiscono sui TLR amplificando l'attivazione delle KC e l'infiammazione. Inoltre, alcune citochine (CCL2 e CCL5) inducono l'attivazione delle HSC (*Hepatic Stellate Cells*), dando inizio ad una risposta fibrogenica (112). Le KC che mostrano il fenotipo M2 producono diversi mediatori con proprietà antinfiammatorie, come IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\alpha$  PMID: 23720329 (113). Diversi studi mostrano che nella NASH l'alterato reclutamento dei neutrofilii contribuisce in modo determinante al danno epatico, all'infiammazione ed alla fibrosi attraverso il rilascio di diversi fattori, inclusi gli enzimi citotossici come la mieloperossidasi e l'elastasi (114, 115) (Figura 10).

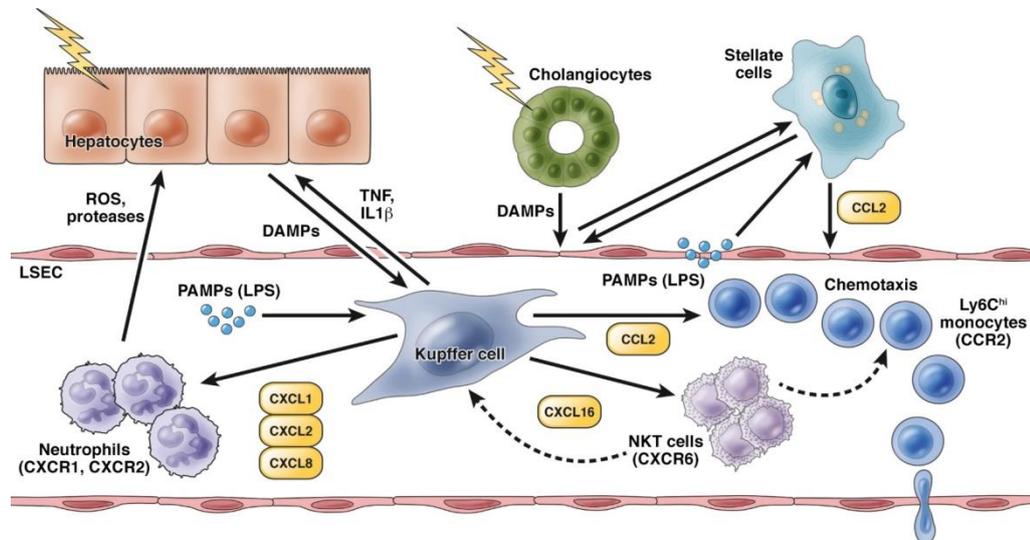


Figura 10. Schema rappresentativo dei mediatori infiammatori rilasciati durante la NASH (112).

Nella NASH, l'attivazione delle cellule *Natural Killer* può essere determinata da un ampio numero di ligandi e citochine; tuttavia il ruolo di queste cellule nella patogenesi della NASH rimane ancora controverso (116).

Le vie di trasduzione del segnale indotte dai recettori di morte come TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), Fas e TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) sono up-regolate nella NASH, questo potrebbe indicare un loro coinvolgimento nel promuovere l'infiammazione e la secrezione di chemochine. Sebbene nei pazienti affetti da NASH il ruolo di Fas e TNFR non sia ancora del tutto chiaro, *in vivo* è stato dimostrato che l'assenza di TRAIL-R è protettiva, infatti topi con deficit di TRAIL-R mostrano una riduzione nel grado di steatosi, d'infiammazione e di fibrosi in associazione ad un più basso livello di apoptosi epatocitaria (117). Inoltre, è stato riportato che eventi critici nella NAFLD, come lo stress del reticolo endoplasmatico e la disfunzione mitocondriale, inducono l'apoptosi attraverso TRAIL-R/caspasi 8 (118).

## **1.7 FIBROSI EPATICA**

La fibrosi epatica è il risultato finale di un danno indotto da differenti stimoli cronici in combinazione con un accumulo progressivo di matrice extracellulare (ECM) (119) (Figura 11). Le principali cause di fibrosi epatica nei paesi industrializzati comprendono l'infezione cronica da HCV, l'abuso di alcol e la NASH (120). L'accumulo progressivo di ECM altera la normale architettura del fegato portando alla formazione inizialmente di setti fibrotici e successivamente di noduli di rigenerazione, concludendosi con lo sviluppo della cirrosi (121). La cirrosi è caratterizzata da disfunzione epatocellulare e determina un aumento della resistenza intraepatica al flusso sanguigno che si traducono rispettivamente in insufficienza epatica ed ipertensione portale (122).

Negli ultimi anni sono stati fatti innumerevoli progressi nel comprendere i meccanismi che regolano la fibrogenesi. In passato si riteneva che la fibrosi epatica fosse un processo passivo ed irreversibile dovuto al collasso del parenchima epatico ed alla sua sostituzione con tessuto ricco di collagene (123). Attualmente la fibrosi epatica viene considerata un processo dinamico derivante da un lato dall'attivazione cronica di meccanismi di riparo tissutale e dall'altro dalla sintesi e dalla rimozione dell'ECM (124).

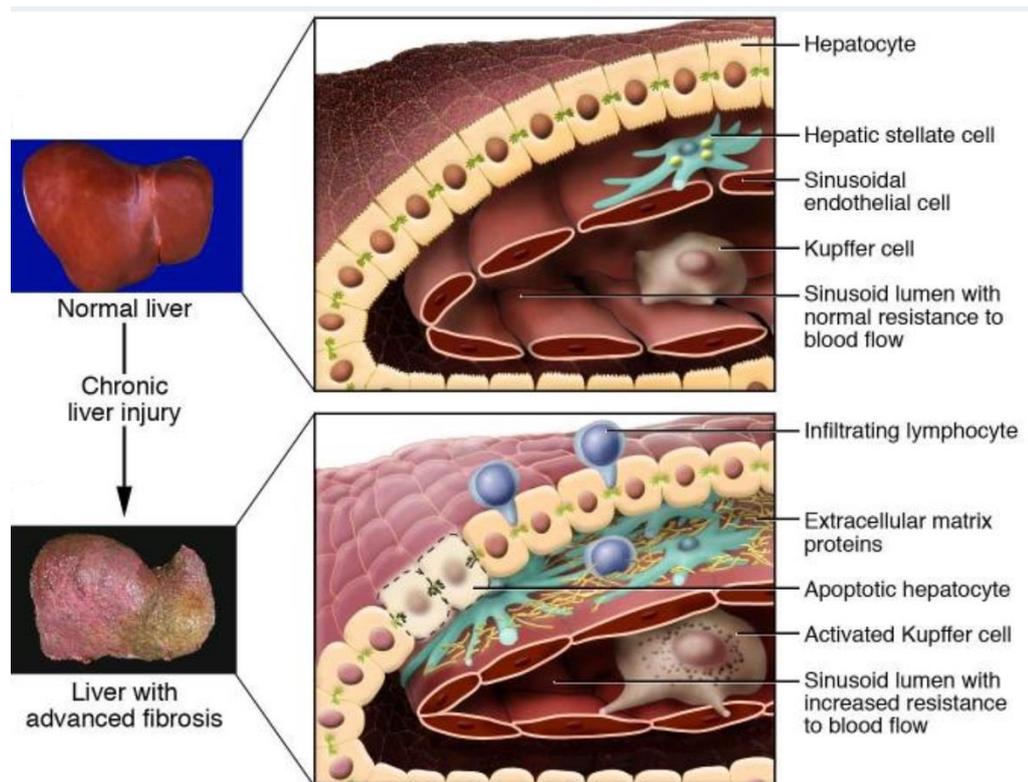


Figura 11. Alterazione dell'architettura del fegato in seguito a stimoli cronici (120).

Inoltre, nella fibrosi epatica è possibile osservare alterazioni sia della quantità che della composizione dell'ECM. Negli stadi avanzati della fibrosi, il fegato presenta un quantitativo di ECM circa sei volte superiore rispetto al normale, costituito prevalentemente da collagene (I, III e IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, acido ialuronico e proteoglicani. L'accumulo di ECM è causato da un aumento della sua sintesi e da una riduzione della sua degradazione. La ridotta attività delle metallo-proteinasi (MMP), enzimi deputati alla degradazione dell'ECM, dipende principalmente dall'incremento dei loro specifici inibitori (TIMPs) (124).

In seguito a danno epatico, le principali cellule deputate alla produzione di ECM sono le cellule stellate epatiche (HSC) (125). Normalmente le HSC sono

localizzate al livello degli spazi di Disse e svolgono la funzione di depositi di vitamina A. Le HSC, in presenza di danno epatico, si attivano differenziandosi in miofibroblasti con proprietà contrattili, pro-infiammatorie e fibrogeniche (126). Le HSC attivate, migrano e si accumulano a livello del tessuto danneggiato, producendo una gran quantità di ECM e regolandone la degradazione.

Durante la fibrogenesi epatica si verifica una complessa interazione tra differenti linee cellulari (Figura 12). Gli epatociti rappresentano il principale bersaglio di agenti epatotossici come i virus delle epatiti, i metaboliti dell'alcool e gli acidi biliari (127).

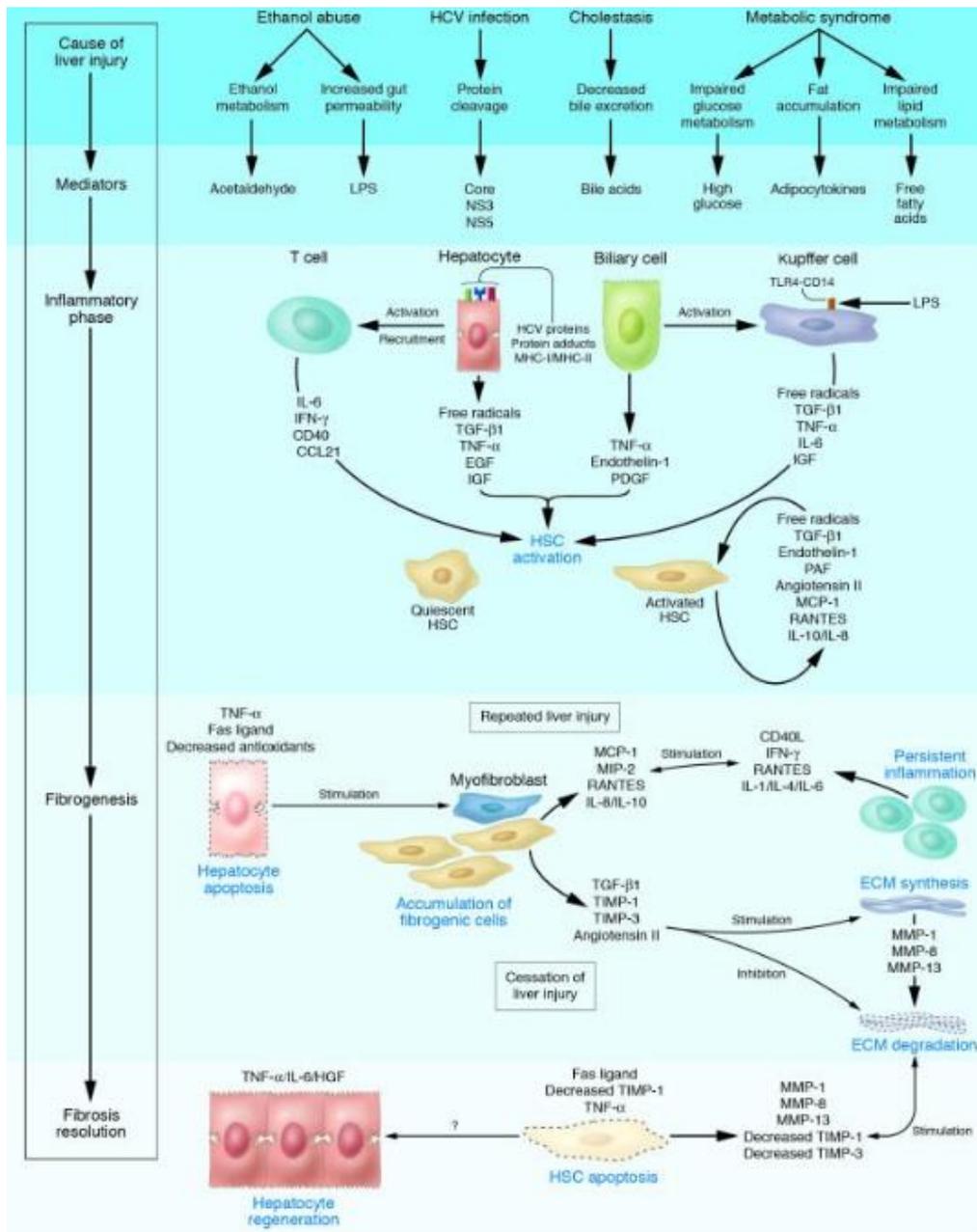


Figura 12. Meccanismi cellulari della fibrosi epatica (120).

Gli epatociti danneggiati producono ROS e mediatori fibrogenici con conseguente richiamo di cellule infiammatorie (128), attivazione delle HSC ed aumento della sintesi di collagene (129). Inoltre, le stesse HSC in corso di fibrosi epatica sono in grado di produrre specie reattive, contribuendo in maniera autocrina alla fibrogenesi epatica (130).

Sono diversi i fattori di crescita e le citochine coinvolte nell'attivazione delle cellule epatiche stellate e nel meccanismo di fibrogenesi (Figura 12):

- Il PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), prodotto principalmente dalle cellule di Kupffer, è il più importante agente mitogeno per le HSC. Il legame del PDGF ai suoi recettori determina la dimerizzazione del recettore con conseguente fosforilazione dei residui di tirosina nel dominio intracellulare. Ciò porta all'attivazione della *pathway* di Ras-MAPK, attraverso la via di trasduzione del segnale di PI3K-AKT/PKB ed alla mobilizzazione degli ioni calcio intracellulari che attivano i membri della famiglia PKC (131).
- Il TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$* ) e l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) sono due potenti fattori di crescita epiteliale che vengono secreti in corso di danno epatico e stimolano la proliferazione delle HSC (132, 133).
- Il TGF $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*), è un mediatore chiave della fibrogenesi epatica e una volta attivato, si lega alle proteine Smad, stimolando la produzione di collagene (134). Le HSC quiescenti sono indotte dal TGF $\beta$ 1 a differenziarsi in miofibroblasti che secernono ECM (135).
- Le adipochine, citochine prodotte dal tessuto adiposo, regolano la fibrogenesi epatica; in particolare, la leptina è indispensabile per l'attivazione delle cellule stellate epatiche e lo sviluppo di fibrosi (136).

- L'angiotensina II causa flogosi epatica e stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule epatiche stellate, nonché la produzione di citochine pro-infiammatorie e la sintesi di collagene (137).

## 1.8 LNCRNA E NAFLD

Nell'ultimo decennio, numerosi studi hanno dimostrato che i *long non-coding* RNA hanno un ruolo chiave, nell'insorgenza e nella progressione della NAFLD e di altre patologie epatiche.

Tra i lncRNA noti, H19 è stato il primo ad essere stato associato a malattie epatiche (138); nel corso degli anni sono stati identificati molti altri lncRNA associati a malattie epatiche, in particolare nella progressione verso l'HCC, tra cui MEG3 (139), HULC (140), MALAT-1 (141), HOTAIR (142), TUC338 (143).

Nonostante i differenti studi sopra citati, sono ancora pochi i lavori che hanno analizzato il ruolo dei lncRNA nella patogenesi della NAFLD.

In uno studio condotto da Sun *et al*, è stato effettuato il *profiling* dei lncRNA nel tessuto epatico di pazienti con NAFLD che ha portato all'identificazione di 535 lncRNA sovraespressi e di 1200 lncRNA sottoespressi; inoltre mediante analisi condotte *in silico* è emerso che molti di questi lncRNA sono coinvolti in processi metabolici e nella regolazione di elementi chiave del reticolo endoplasmatico (144). Un altro lncRNA identificato è FLRL2, la cui espressione era ridotta nei topi NAFLD rispetto ai controlli, come quella del suo gene codificante (ARNT1) (145). La *down*-regolazione di ARNT1 è stata osservata in topi obesi (146), che avevano alti livelli di acidi grassi circolanti e

formazione di grasso ectopico nel fegato (147) suggerendo che esiste un possibile ruolo di FLRL2 nell'accumulo dei lipidi epatici.

Oltre a questi lncRNA, sono stati identificati anche altri due lncRNA coinvolti nella NAFLD: il lncLSTR che regola il metabolismo lipidico sistemico (148) ed il lncARSR che regola la sintesi e l'ossidazione degli acidi grassi tramite la via di Akt /SREBP-1c (149).

L'identificazione di questi lncRNA deregolati nel metabolismo dei lipidi epatici suggerisce che l'analisi dell'espressione di questi lncRNA potrebbe essere utilizzata per identificare le fasi iniziali della NAFLD.

Uno studio effettuato in modelli murini di NAFLD ha mostrato la sovraespressione di 111 lncRNA e la sottoespressione di 180 lncRNA rispetto ai controlli. In questo studio, sono stati identificati sette lncRNA coinvolti nella regolazione del ritmo circadiano; in particolare gli autori hanno dimostrato che l'*up*-regolazione del lncRNA FLRL6 era in grado di regolare positivamente l'espressione di PER2, un regolatore del ritmo circadiano (145). Il coinvolgimento del lncRNA FLRL6 nella regolazione dell'espressione di PER2 potrebbe essere importante nella progressione della NAFLD, poiché PER2 è in grado di regolare, a sua volta, il metabolismo lipidico nelle cellule epatiche tramite la via PPAR $\gamma$  (150).

## **1.9 LNCRNA E FIBROSI EPATICA**

In un recente studio, mediante l'analisi dell'intero trascrittoma effettuato su biopsie epatiche di pazienti con NASH (n = 48), è stato identificato un lncRNA fegato-specifico pro-fibrotico (lnc18q22.2); il lnc18q22.2 era sovraespresso nei

pazienti con NASH e la sua l'espressione era associata sia ad un più alto NASH/NAFLD *score* sia ad un più alto indice di fibrosi epatica (151). Allo stesso modo un altro studio, in cui venivano effettuati esperimenti di *profiling* in biopsie epatiche di pazienti con NAFLD (n = 24), identificava MALAT-1 come un potenziale regolatore di infiammazione e di fibrosi (152).

L'analisi dei lncRNA nel tessuto epatico di pazienti con fibrosi, ha portato all'identificazione di differenti lncRNA associati alla fibrosi ad esempio il lncRNA HOTTIP (*HOXA distal transcript antisense RNA*). Li *et al.* hanno riscontrato una sovraespressione di HOTTIP in pazienti con fibrosi rispetto ai controlli ed ancor di più in pazienti con cirrosi (153), ciò ha fatto supporre che la sua espressione incrementi all'aumentare della gravità del danno epatico.

Un altro lncRNA associato alla fibrosi è il lncRNA linc-SCRG1. Wu *et al.* hanno dimostrato che linc-SCRG1 era sovra-espresso in biopsie di pazienti con cirrosi e che la sua inibizione era associata ad una riduzione dei geni correlati alla fibrosi ed all'apoptosi (154). Il meccanismo attraverso il quale linc-SCRG1 promuove la fibrosi è stato dimostrato attraverso l'inibizione dell'espressione della tristetraprolina (TTP), una *RNA-binding protein* (RBP) coinvolta nella degradazione delle proteine (154).

Oltre ai lavori condotti sull'uomo, anche gli studi eseguiti su modelli animali con fibrosi o con lesioni epatiche hanno portato all'identificazione di numerosi lncRNA pro-fibrotici.

Lo studio di Zhang *et al.* effettuato in modelli animali di fibrosi epatica, ha dimostrato che il lnc-LFAR1 (*liver fibrosis-associated lncRNA1*) era sovraespresso nelle HSC e che il suo legame diretto con le proteine Smad2/3

promuoveva l'attivazione delle *pathway* di TGF $\beta$ , Notch e l'apoptosi degli epatociti (155).

Inoltre, sono stati identificati altri lncRNA *up*-regolati nei tessuti fibrotici e nelle HSC attivate, tra cui APTR (*Alu-Mediated p21 Transcriptional Regulator*) (156), PVT1 (*Plasmacytoma Variant Translocation 1*) (157), HOTAIR (*Homeobox Transcript Antisense RNA*) (158), LncRNA H19 (159) e NEAT1 (*Nuclear Enriched Abundant Transcript 1*) (160). La maggior parte di questi lncRNA esercita i propri effetti attraverso la proteina ACTA2 ed il collagene (COL1A1). Questi lncRNA pro-fibrotici, potrebbero essere utilizzati come biomarcatori di progressione della fibrosi e l'inibizione della loro espressione può essere utilizzata come strategia di trattamento.

Per quanto riguarda i lncRNA con un ruolo anti-fibrotico nel fegato, uno studio condotto da Gong *et al.*, in un cui sono state effettuate analisi *high-throughput* su tessuto epatico di ratti ha permesso di identificare 231 lncRNA differenzialmente espressi e di caratterizzare il ruolo di uno specifico lncRNA (NR\_002155.1), che era in grado di inibire l'attivazione delle HSC sia *in vitro* che *in vivo* (161).

Altri esempi di lncRNA con un ruolo anti-fibrotico sono rappresentati da MEG3 (162), GM5091 (163) e lincRNA-p21 (164). E' stato dimostrato che questi tre lncRNA presentano livelli d'espressione ridotti in animali fibrotici rispetto ai controlli; il ripristino dell'espressione di MEG3 e GM5091 è in grado di determinare la *down*-regolazione di  $\alpha$ -SMA e COL1A1 (162, 163).

## **1.10 LNCRNA NEI FLUIDI BIOLOGICI**

Nell'ultimo decennio, diversi studi si sono concentrati sugli RNA circolanti come potenziali biomarcatori diagnostici e prognostici di differenti patologie (165, 166). In particolare, gli RNA non codificanti hanno ricevuto una grande attenzione grazie al loro ruolo di regolatori intracellulari dell'espressione genica. Gli RNA presenti nei fluidi corporei, inclusi lncRNA e mRNA, hanno delle caratteristiche essenziali che li rendono dei buoni candidati come biomarcatori: 1) il prelievo del campione non richiede l'intervento diretto sui tessuti 2) i loro livelli d'espressione possono essere facilmente determinati con tecniche di biologia molecolare di base 3) sono notevolmente stabili (167-169). Ciò che rende stabili queste molecole nei fluidi corporei sembra essere il loro inglobamento all'interno di vescicole membranose o l'associazione a RBP (168, 170). Inoltre, è stato riportato che la stabilità dei lncRNA e degli mRNA deriva dalla loro capacità di formare strutture secondarie altamente stabili (168).

## **1.11 LNCRNA CIRCOLANTI NELLE PATOLOGIE EPATICHE**

Come affermato in precedenza, l'esame istologico del tessuto biotico è considerato il *gold standard* per la diagnosi di NAFLD e la stadiazione della fibrosi epatica; ma il rischio di complicanze connesse alla procedura, gli errori di campionamento, la variabilità nell'interpretazione istopatologica ed i costi hanno portato a un crescente interesse per strategie alternative non invasive di

diagnosi (171). Poiché i lncRNA vengono rilasciati in circolo e sono estremamente stabili nei fluidi biologici, l'uso di queste molecole come nuovi biomarcatori di patologie umane, comprese quelle epatiche (172), sta suscitando un notevole interesse nella comunità scientifica.

Yang *et al.* hanno osservato che i livelli plasmatici di AK128652 e di AK054921 in soggetti affetti da cirrosi alcolica erano inversamente associati alla sopravvivenza, suggerendone l'utilizzo come biomarcatori predittivi della sopravvivenza nel paziente cirrotico (173).

Toraih *et al.* hanno dimostrato che i livelli sierici di MALAT1 erano più alti nei pazienti affetti da carcinoma epatico rispetto ai pazienti con cirrosi epatica indotta da HCV e rispetto ai controlli, per questo motivo l'analisi dell'espressione di MALAT1 potrebbe permettere la diagnosi differenziale tra questi gruppi di soggetti (174).

In un altro studio, è stato osservato che i livelli plasmatici di RP11-160H22.5, XLOC\_014172 e LOC149086 erano correlati con la tumorigenesi nell'HCC inoltre l'espressione di XLOC\_014172 e LOC149086 risultava più elevata nei pazienti con carcinoma epatico metastatico, suggerendo un possibile ruolo di questi due lncRNA come biomarcatori di metastasi nell'HCC (175).

Un recente studio ha esaminato lncRNA-ATB, un lncRNA coinvolto nella fibrosi epatica, mostrando che nei pazienti con HCV i livelli plasmatici di questo lncRNA erano significativamente associati allo stadio della fibrosi epatica (176). I livelli sierici di un altro lncRNA, lincRNA-p21, erano negativamente correlati allo stadio della fibrosi epatica nei pazienti con HBV (177).

Tuttavia, l'utilizzo dei lncRNA come biomarcatori non invasivi per la diagnosi di NAFLD e per la stadiazione della fibrosi rimane ancora un campo per lo più inesplorato che necessita di ulteriori approfondimenti.

## 2. OBIETTIVI

Gli obiettivi principali di questa tesi sono stati i seguenti:

- Effettuare uno *screening* iniziale dei *coding* e *non-coding* RNA analizzando l'intero trascrittoma espresso nel siero di pazienti *mild* NAFLD (NAS score  $\leq 4$ ; F=0), *severe* NAFLD (NAS score  $\geq 5$ ; F=3) e soggetti di controllo.
- Verificare il coinvolgimento, attraverso metodi computazionali, dei *coding* e dei *non-coding* RNA differenzialmente espressi identificati in *pathway* associate alla fisiopatogenesi della NASH e della fibrosi.
- Validare la deregolazione dei *coding* e dei *non-coding* RNA differenzialmente espressi precedentemente identificati, mediante *single Real time PCR*, in una coorte interna indipendente più ampia ed in una coorte esterna di pazienti con NAFLD.
- Analizzare l'espressione dei trascritti differenzialmente espressi nelle biopsie epatiche di 12 soggetti: 4 CTRL, 4 *mild* NAFLD, 4 *severe* NAFLD e nelle cellule HepG2 esposte ad una miscela di oleato e palmitato o solo palmitato (modello cellulare di NAFL/NASH) sia a livello intracellulare che extracellulare.
- Analizzare la correlazione dei livelli di espressione dei *coding* e dei *non-coding* RNA differenzialmente espressi precedentemente identificati, con i parametri clinici e biochimici di *routine* e con gli indici biotici.

- Testare il potere diagnostico dei *coding* e dei *non-coding* RNA identificati (sia singolarmente che in associazione tra loro e/o con i parametri clinici correlati) al fine di migliorare l'identificazione dei pazienti con NAS score  $\geq 5$  rispetto a NAS score  $\leq 4$ , dei pazienti NASH rispetto a NOT NASH ed infine dei pazienti con fibrosi F 3-4 rispetto a quelli con fibrosi F 0-2.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 SOGGETTI DELLO STUDIO

Questo studio ha coinvolto due coorti di soggetti: 1) una prima coorte di studio costituita da 100 soggetti (71 pazienti con NAFLD e 29 controlli) arruolati nella Sezione di Gastroenterologia ed Epatologia dell'Ospedale Universitario di Palermo; 2) una seconda coorte esterna (50 pazienti con NAFLD) arruolata presso la Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

La diagnosi di NAFLD è stata confermata mediante biopsia epatica in pazienti che presentavano steatosi epatica rilevata ecograficamente e/o aumentati livelli di AST e ALT (> 6 mesi).

La coorte NAFLD è stata stratificata in base ai seguenti criteri:

- presenza o assenza di NASH (definita come presenza simultanea di steatosi, *ballooning* e infiammazione lobulare): NASH o NOT NASH;
- Kleiner NAS score  $\leq 4$  e  $\geq 5$ , (NAS score  $\geq 5$  associato alla diagnosi definitiva di NASH).

Abbiamo inoltre stratificato la coorte di pazienti con NAFLD in base alla gravità della fibrosi:

- i pazienti con fibrosi assente o da lieve a moderata (F=0-2)
- i pazienti con fibrosi avanzata e cirrosi (F=3-4).

Sono stati esclusi dallo studio i soggetti con epatite alcolica o indotta da farmaci, epatite autoimmune o virale, malattia epatica colestatica o genetica. Sono stati inoltre esclusi dallo studio i soggetti con consumo alcolico superiore a 30 g/die per gli uomini e 20 g/die per le donne (178). Per tutti i partecipanti allo studio sono stati raccolti gli indici antropometrici (altezza, peso, circonferenza della vita) e dati biochimici (ALT, AST, GGT, colesterolo totale, colesterolo HDL e trigliceridi).

Lo studio è stato condotto in conformità alle linee guida della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Universitario di Palermo e di Milano. Prima delle procedure è stato ottenuto un consenso informato scritto da tutti i pazienti partecipanti allo studio.

### **3.2 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA**

Le biopsie epatiche sono state analizzate in cieco da un anatomopatologo esperto, che ha assegnato ad ogni campione uno *score* (NAS, *NAFLD Activity Score*) secondo la classificazione di Kleiner (38) ed ha valutato il grado di fibrosi.

La dimensione media delle biopsie epatiche era di 25 mm (*range* 15-45) con almeno 11 tratti portalari. Le biopsie epatiche sono state colorate con ematossilina ed eosina e tricromica di Masson. L'elastografia epatica è stata eseguita con il dispositivo medico FibroScan utilizzando la sonda M (sonda standard) (179).

Una piccola porzione di tessuto epatico, ottenuta da 12 soggetti sottoposti a biopsia epatica a scopo diagnostico, è stata congelata in azoto liquido e immediatamente conservata a -80 °C.

### **3.3 RACCOLTA DEL CAMPIONE**

I campioni di sangue sono stati ottenuti tramite prelievo in apposite provette sottovuoto e successivamente centrifugati a 3500 rpm per 15 minuti a 4 °C per favorire la separazione del siero dal sangue intero. Il siero è stato ulteriormente centrifugato a 3500 rpm per 15 minuti in modo tale da rimuovere eventuali residui cellulari. Il surnatante è stato quindi aliquotato e congelato a - 80°C.

### **3.4 ESPERIMENTI IN VITRO SU CULTURE CELLULARI**

La linea cellulare di epatocarcinoma HepG2 è stata acquistata all'ATCC (*American Type Culture Collection*). 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 CO<sub>2</sub> in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich*), supplementato con il 7% di FBS (*Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific*), 100 U penicillina/mL, 100 µg streptomycina/mL e 2mM L-glutammina (*Sigma-Aldrich*).

Per indurre l'accumulo di grasso nelle cellule e simulare la steatosi epatica non-alcolica (NAFL) o la steatoepatite non-alcolica (NASH), le HepG2 sono state esposte a una miscela di oleato:palmitato (OA:PA) in rapporto 2:1 o solo palmitato (PA) ad una concentrazione finale di 0,5 mM per 48 ore (180).

### 3.5 ESTRAZIONE DELL’RNA

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di siero, dalle HepG2, dai terreni di coltura cellulare e dalle biopsie epatiche utilizzando il *miRNeasy mini kit* (Qiagen) secondo alle istruzioni del produttore (181). L'RNA è stato eluito con 200 µl di RNase/DNase *free water*. Successivamente, l'RNA eluito è stato precipitato con 500 µl di etanolo assoluto e 20 µl di acetato di sodio 3 M overnight a -80°C. I *pellet* di RNA sono stati lavati due volte con etanolo al 75% e infine risospesi in acqua distillata RNase/DNase *free water*. L'RNA totale della linea cellulare HepG2 è stato estratto utilizzando TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*) secondo le istruzioni del produttore. La quantità e la qualità dell'RNA totale sono state misurate mediante spettrofotometro NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*).

### 3.6 ANALISI DEI MICROARRAY

Le analisi dell'intero trascrittoma di quattro campioni di siero *mild* NAFLD (NAS score  $\leq 4$  F=0), quattro *severe* NAFLD (NAS score  $\geq 5$ , F=3) e quattro controlli sani sono state eseguite utilizzando la tecnologia dei microarray Clariom D Pico Assay (*Thermo Fisher Scientific*) che è in grado di rilevare oltre 542.500 trascritti, inclusi mRNA e diverse classi di ncRNA (circRNAs, lncRNA, miRNA, i rispettivi precursori e altri piccoli RNA). 10 ng di RNA totale sono stati utilizzati per sintetizzare il cDNA a singolo filamento contenente la sequenza del promotore T7 all'estremità 5'. L'adattatore al 3' è stato aggiunto al cDNA a filamento singolo come modello per la sintesi del cDNA a doppio filamento, mediante reazione di amplificazione pre-IVT

ottimizzata utilizzando i seguenti parametri: 12 cicli di amplificazione a 94°C per 30 secondi, 70°C per 5 minuti e 4°C per 2 minuti. La sintesi dell'RNA antisenso (cRNA) e l'amplificazione *overnight* (14h) mediante trascrizione *in vitro* (IVT) della matrice di cDNA a doppio filamento, sono state eseguite utilizzando la polimerasi dell'RNA T7 in un termociclatore con coperchio riscaldato. Il cRNA è stato purificato utilizzando delle sfere magnetiche e la resa è stata valutata utilizzando un calcolo di 40 µg/mL/A260 con lo spettrofotometro UV-Vis NanoDrop™ ND-1000. Sono stati ottenuti circa 20 µg di cRNA che sono stati utilizzati per sintetizzare il cDNA a singolo filamento senso (ss-cDNA). Qualsiasi *template* di cRNA rimanente è stato rimosso mediante digestione con *RNase H* ed attraverso la purificazione del ss-cDNA utilizzando un protocollo di microsfele magnetiche. La resa del ss-cDNA è stata valutata utilizzando un calcolo di 33 µg/mL/A260 con lo spettrofotometro UV-Vis Nanodrop™ ND-1000. Sono stati ottenuti circa 5,5 µg di ss-cDNA che sono stati frammentati usando l'enzima uracil DNA-glicosilasi (10 U/µL) e l'endonucleasi 1 (1.000 U/µL). I campioni sono stati quindi marcati con biotina usando la deossinucleotidil transferasi terminale (30 U/µL). Ogni campione è stato combinato con una mix di ibridazione, 200 µL della miscela sono stati caricati nell'array human Clariom D. L'array è stato posto in una stufa (GeneChip Affymetrix 645) a 45°C che presenta al suo interno un sistema di rotazione (60 giri/minuto per 16 ore). Gli array sono stati colorati usando "Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450" seguendo il protocollo specifico della fluidica (FS450\_0001) e scansionati con "Affymetrix GeneChip Scanner 3000". I file CEL generati da GeneChip™ Command

Console™ sono stati importati in Transcriptome Analysis Suite (TAC) 4.0 (Applied Biosystems) e i file CHP sono stati generati per l'analisi *gene-level*.

### 3.7 ANALISI COMPUTAZIONALE

Per comprendere la funzione dei trascritti deregolati in maniera statisticamente significativa per ciascun confronto (*mild* NAFLD *versus* CTRL, *severe* NAFLD *versus* CTRL, *severe* NAFLD *versus mild* NAFLD) abbiamo analizzato le *pathway* molecolari in cui sono coinvolti attraverso il *software* Transcriptome Analysis Console v. 4 che recupera le informazioni relative alle singole *pathway* dal database *WikiPathways* e stabilisce il p-value utilizzando il test esatto di Fisher a due code (valore  $p < 0,05$ ).

### 3.8 SAGGI SINGOLI IN qPCR

L'espressione degli RNA codificanti e dei non codificanti nei campioni di siero (coorte indipendente di 88 soggetti di studio: 63 NAFLD, 25 CTRL, coorte esterna di 50 pazienti NAFLD) nelle biopsie epatiche (12 soggetti: 4 CTRL, 4 *mild* NAFLD, 4 *severe* NAFLD) e nei campioni della linea cellulare HepG2 (CTRL, OA:PA, PA in triplicato biologico) sono stati analizzati mediante saggi singoli di real time PCR utilizzando il kit Power SYBR Green RNA-to-CT1-Step (*Thermo Fisher Scientific*) in base al protocollo del produttore.

I trascritti sono stati selezionati in base a tre criteri:

- (a) alti livelli di fluorescenza nel microarray;
- (b) basso valore del p-value in pazienti con *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD (valore  $p \leq 0,02$ );

(c) coinvolgimento dei trascritti, secondo i dati presenti in letteratura, in *pathway* associate allo stress ossidativo, infiammazione, apoptosi, autofagia o fibrosi (182-187).

L'espressione dei trascritti differenzialmente espressi, validati mediante saggi singoli in real time PCR, è stata analizzata anche nelle biopsie epatiche e in modelli *in vitro* NAFL/NASH a livello intracellulare ed extracellulare.

Le variazioni di espressione genica sono state calcolate applicando il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ed utilizzando il gene GAPDH come controllo endogeno. I primer specifici per i geni di interesse sono stati progettati utilizzando *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

### 3.9 ANALISI STATISTICA

La normalizzazione dei dati del microarray e l'identificazione dei *coding* e dei *non-coding* RNA DE (*Differentially Expressed*) sono state eseguite utilizzando il software della *Transcriptome Analysis Console* (TAC) v.4, in base ai seguenti parametri:

- Tipo di analisi: *Expression Gene*; *Summarization Method: Gene Level - RMA*.
- *Gene-Level P-Value* <0.05, Metodo ANOVA: *ebayes*.

*GraphPad Prism* (versione 6.02) è stato utilizzato per eseguire:

(a) il t-test non appaiato tra i valori di  $-\Delta Ct$  ottenuti dopo saggi singoli in real time PCR;

(b) l'analisi di regressione lineare tra i dati clinici/istologici ed i valori dei  $-\Delta Ct$  degli RNA codificanti/non codificanti selezionati. Le curve ROC e le analisi logistiche multivariate sono state eseguite tramite SPSS PASW Statistics.

## 4. RISULTATI

### 4.1 ANALISI DEL TRASCRITTOMA

Al fine di identificare nuovi potenziali biomarcatori associati allo spettro della NAFLD, abbiamo eseguito l'analisi dell'intero trascrittoma nei sieri di quattro pazienti *mild* NAFLD (NAS score  $\leq 4$ ; F=0), quattro pazienti *severe* NAFLD (NAS score  $\geq 5$ ; F=3) e quattro controlli sani. I trascritti differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa in ciascun confronto sono rappresentati come *scatter plot* nella Figura 13A.

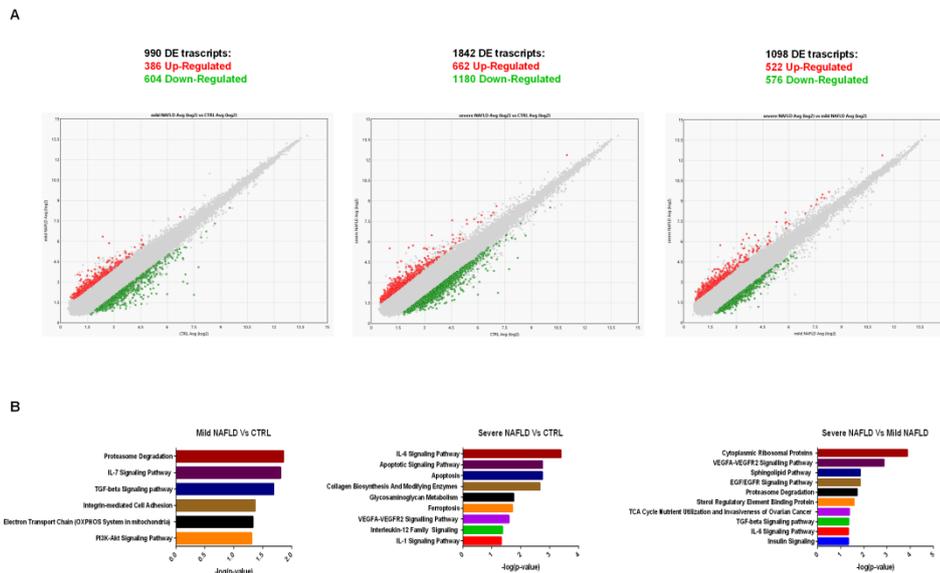


Figura 13: **A.** Gli *Scatter plot* sono stati utilizzati per valutare le variazioni del trascrittoma tra *mild* NAFLD rispetto ai controlli (pannello di sinistra); *severe* NAFLD rispetto ai controlli (pannello centrale); *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD (pannello di destra). I valori indicati negli *scatter plot* rappresentano le medie dei valori del segnale normalizzati in ciascun

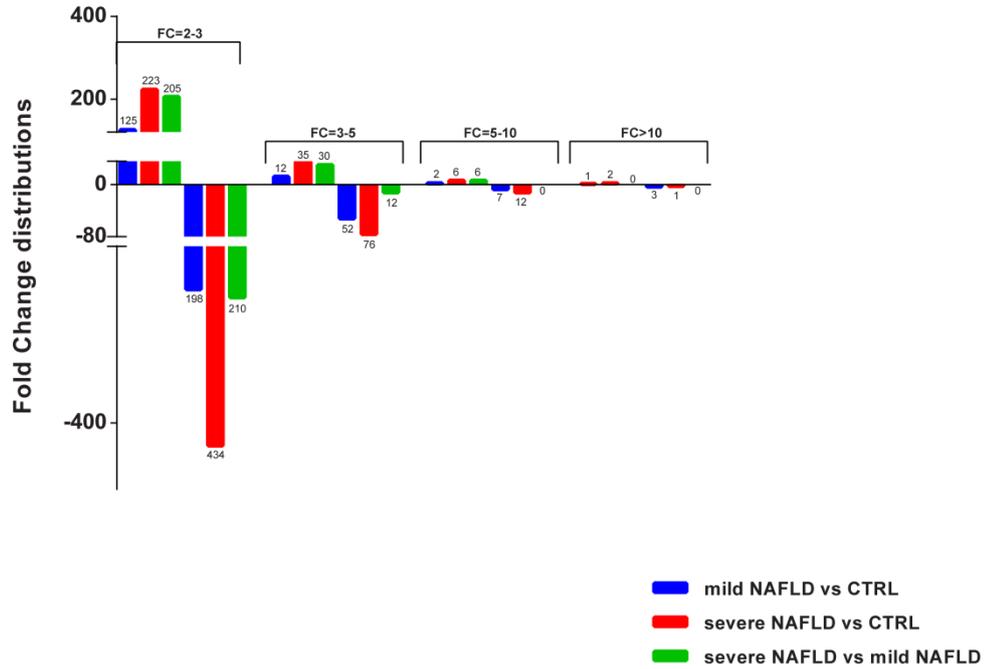
gruppo. **B.** *Pathway* deregolate in maniera statisticamente significativa modulate dai trascritti Differenzialmente Espresi nel confronto *mild* NAFLD rispetto a controllo (pannello di sinistra); *severe* NAFLD rispetto a controllo (pannello centrale); *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD (pannello di destra).

L'analisi del trascrittoma mediante microarray ha portato all'identificazione di 990 trascritti deregolati nel confronto *mild* NAFLD rispetto a CTRL; 1842 trascritti deregolati nel confronto *severe* NAFLD rispetto a CTRL e 1098 trascritti deregolati nel confronto *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD.

I valori di *Fold Change* (FC) degli RNA codificanti e non codificanti deregolati in maniera statisticamente significativa (metodo Anova: *ebayes*  $p < 0,05$ ) per ciascun confronto sono riportati in Figura 14.

Le variazioni, espresse in percentuale, delle diverse classi di RNA analizzate in ciascun confronto sono riportate in Figura 15. L'analisi gerarchica del *clustering* dei trascritti deregolati in maniera statisticamente significativa ha mostrato dei livelli di espressione specifici distinguibili in ciascun confronto: *mild* NAFLD rispetto a CTRL, *severe* NAFLD rispetto a CTRL, *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD (Figure 16, 17, 18). Ogni riga rappresenta il livello di espressione relativa di un singolo trascritto e ogni colonna rappresenta un singolo campione analizzato.

**A Coding RNA distributions**



**B Non - Coding RNA distributions**

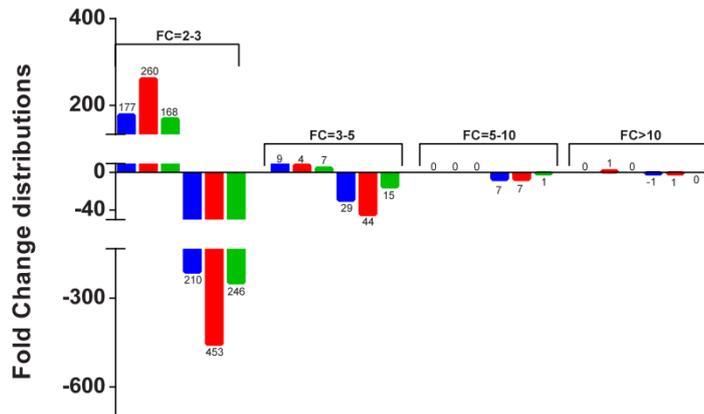


Figura 14: Distribuzione dei *fold change* degli RNA codificanti (A) e degli RNA non codificanti (B) differenzialmente espressi nel confronto *mild* NAFLD rispetto al controllo (barre blu), *severe* NAFLD rispetto al controllo (barre rosse), *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD (barre verdi).

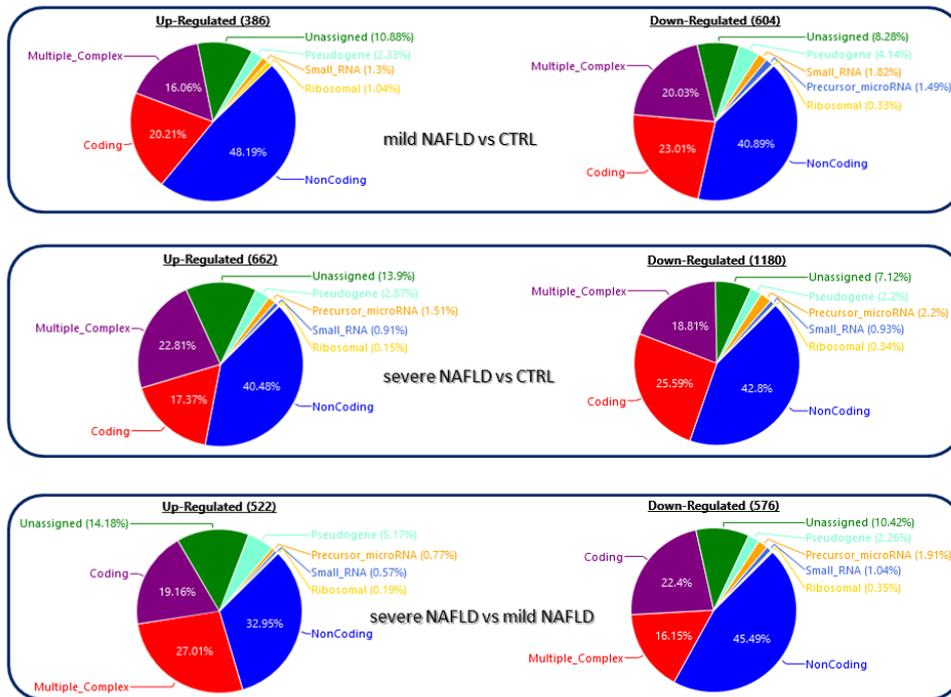


Figura 15: Variazioni espresse in percentuale delle diverse classi di RNA per ciascun confronto: *mild* NAFLD rispetto al controllo, *severe* NAFLD rispetto al controllo, *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD (come riportato nel software TAC v.4.0).

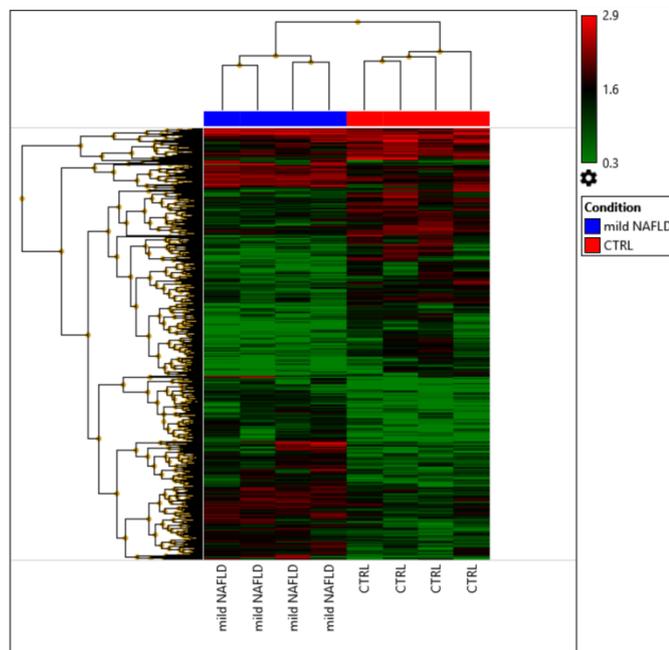


Figura 16: *Clustering* gerarchico del profilo di espressione tra *mild* NAFLD e controllo.

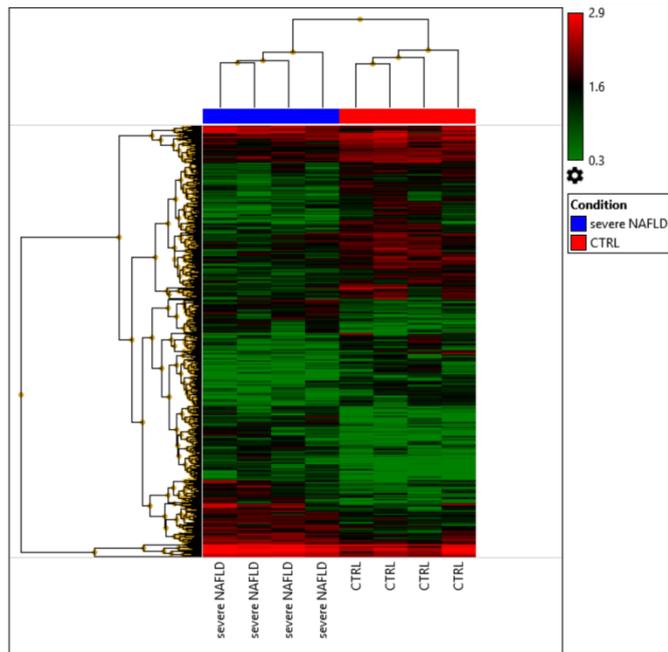


Figura 17: *Clustering* gerarchico del profilo di espressione tra *severe* NAFLD e controllo.

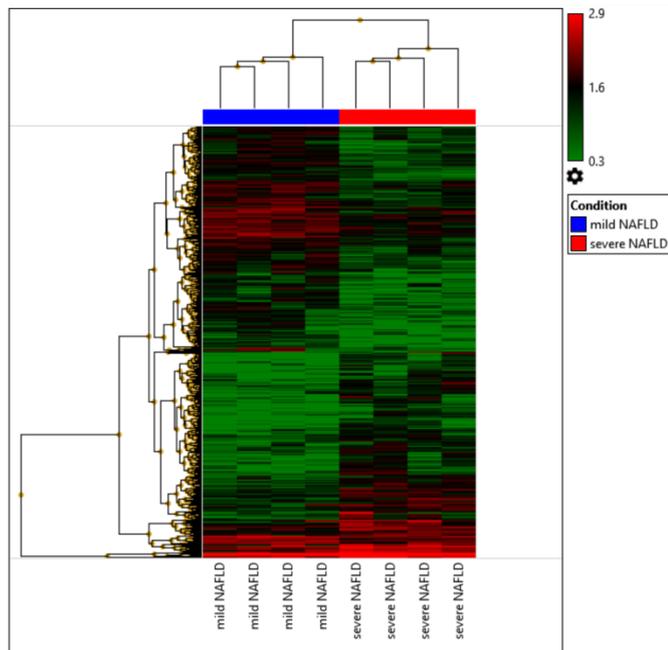


Figura 18: *Clustering* gerarchico del profilo di espressione tra *severe* NAFLD e *mild* NAFLD.

## **4.2 ANALISI DELLE PATHWAY DEI TRASCritti DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI**

Per individuare le potenziali funzioni dei trascritti deregolati abbiamo identificato le *pathway* biologiche attraverso il programma *Transcriptome Analysis Console*. Quest'analisi bioinformatica ha mostrato che i trascritti differenzialmente espressi erano associati, in maniera statisticamente significativa (p-value del test esatto di *Fisher* <0,05), a diverse vie di trasduzione del segnale, già note per essere coinvolte nella patogenesi della NASH e/o della fibrosi, tra cui le seguenti *pathway*: infiammatorie (es. *interleukins signalling pathways*), deregolazione del metabolismo (es. *electron transport chain*, *TCA cycle nutrient utilization*, *Sterol Responsive Element Binding Protein*, *insulin signalling*), morte cellulare (es. *apoptosis*, *ferroptosis*), stress UPR (es. *proteasome degradation*, *cytoplasmic ribosomal proteins*), biosintesi della matrice extracellulare/fibrosi (es. *collagen biosynthesis and modifying enzymes*, *VEGFA-VEGFR signalling pathway*, *EGF/EGFR signalling pathway*) (Figura 13 B).

## **4.3 VALIDAZIONE MEDIANTE REAL TIME PCR**

Al fine di confermare i dati ottenuti mediante l'analisi di microarray, abbiamo analizzato l'espressione di un *set* di trascritti mediante qPCR in una coorte indipendente interna più ampia di 88 soggetti (CTRL=25, NAFLD=63) e in una coorte esterna di 50 pazienti NAFLD. Le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti di ciascuna coorte sono riportate nella Tabella 1.

	Unaffected Controls (25)	NAFLD Patients (63)	External Cohort NAFLD (50)	P-value Ctrl vs NAFLD Patients	P-value NAFLD P. vs E. Cohort
<i>Clinical variables</i>					
Age (years)	48.00±10.01	50.65±12.35	52.76±10.00	0.252	0.358
Gender (% M)	32%	59%	70%	<b>0.043</b>	0.298
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.14±2.14	29.87±4.57	29.08±3.83	<b>&lt;0.001</b>	0.378
AST (IU/l)	20.63±5.81	46.50±27.77	41.10±29.03	<b>&lt;0.001</b>	0.348
ALT (IU/l)	20.71±7.21	78.03±67.09	57.44±46.45	<b>&lt;0.001</b>	0.091
Platelets(x10 <sup>9</sup> /l)	248.50±36.96	236.18±87.44	202±72.38	0.234	0.063
TotalCholesterol (mg/dL)	200.94±39.90	191.42±39.74	186.39±41.58	0.387	0.556
HDL cholesterol (mg/dL)	61.50±10.17	48.54±16.44	46.18±14.31	<b>0.035</b>	0.460
Triglycerides (mg/dL)	93.88±30.27	136.93±74.29	154.90±70.63	<b>0.023</b>	0.231
FIB-4 score		1.52±1.36	1.61±0.96		0.756
APRI score		0.38±0.35	0.59±0.58		<b>0.036</b>
LSM - KPa		12.27±11.90	---		
<i>Histology</i>					
<b>KSG (0-3)</b>					
0		---	1 (2%)		0.352
1		19 (30%)	11 (22%)		
2		24 (38%)	17 (34%)		
3		29 (46%)	21 (42%)		
<b>KLIS (0-3)</b>					
0		---	3 (6%)		0.550
1		37 (59%)	15 (30%)		
2		21(33%)	27 (54%)		
3		5 (8%)	5 (10%)		
<b>KBS (0-2)</b>					
0		18 (29%)	16 (32%)		0.510
1		33 (52%)	27 (54%)		
2		12 (19%)	7 (14%)		
<b>KNS (0-8)</b>					
≤ 4		38 (60%)	23 (46%)		0.598
≥ 5		25 (40%)	27 (54%)		
<b>KFS (0-4)</b>					
0-2		37 (59%)	26 (52%)		0.275
3-4		26 (41%)	24 (48%)		

Tabella 1. Dati clinici e demografici della coorti di validazione interna ed esterna. Il t-test o il Mann-Whitney U test sono stati utilizzati rispettivamente per le variabili che presentavano o non presentavano distribuzione normale. Il Chi-square test è stato applicato per le variabili categoriche. Le variabili con distribuzione normale sono indicate come media ± deviazione standard, mentre le variabili con distribuzione non normale sono indicate come mediana e percentuale. KSG: *Kleiner steatosis grade*; KLIS: *Kleiner Lobular Inflammation Score*; KBS: *Kleiner Ballooning score*; KNS: *Kleiner Nas Score*; KFS: *Kleiner Fibrosis Score*.

La coorte NAFLD di validazione è stata stratificata in base ai seguenti criteri:

- presenza o assenza di NASH (definita come presenza simultanea di steatosi, *ballooning* ed infiammazione lobulare);
- *Kleiner* NAS score  $\leq 4$  e  $\geq 5$ , (NAS score  $\geq 5$  associato alla diagnosi definitiva di NASH).

Abbiamo selezionato i seguenti trascritti: i *coding* RNA HBA2, UBE2V1, e BNIP3L, il lncRNA RP11-128N14.5 e il *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1. Abbiamo scelto questi trascritti in quanto:

- presentavano alti livelli di fluorescenza nel microarray;
- presentavano un basso p-value nel confronto *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD ( p-value  $\leq 0,02$ );
- erano potenzialmente associati a *pathway* di stress ossidativo, di autofagia, infiammatorie, apoptotiche o fibrogeniche (182, 183, 188).

Inoltre, è stato selezionato un ncRNA "*sherveebu*" (nome del gene nel database AceView, ID genBank: AC020558.4) come molecola di controllo *down-regolata*.

In base ai risultati del microarray, abbiamo confermato *l'up-regolazione* di UBE2V1, RP11-128N14.5, BNIP3L e TGFB2 / TGFB2-OT1 nei campioni di siero di pazienti con NAS score  $\geq 5$  rispetto a quelli con NAS score  $\leq 4$  (Figura 19 A). Inoltre, tenendo conto della diagnosi di NASH (contemporanea presenza di steatosi, *ballooning*, ed infiammazione), solo RP11-128N14.5 ha raggiunto la significatività statistica (NASH n=45 rispetto a NOT NASH n=18, FC = 7,13, p-value =2,00E-02) (Figura 19 B).

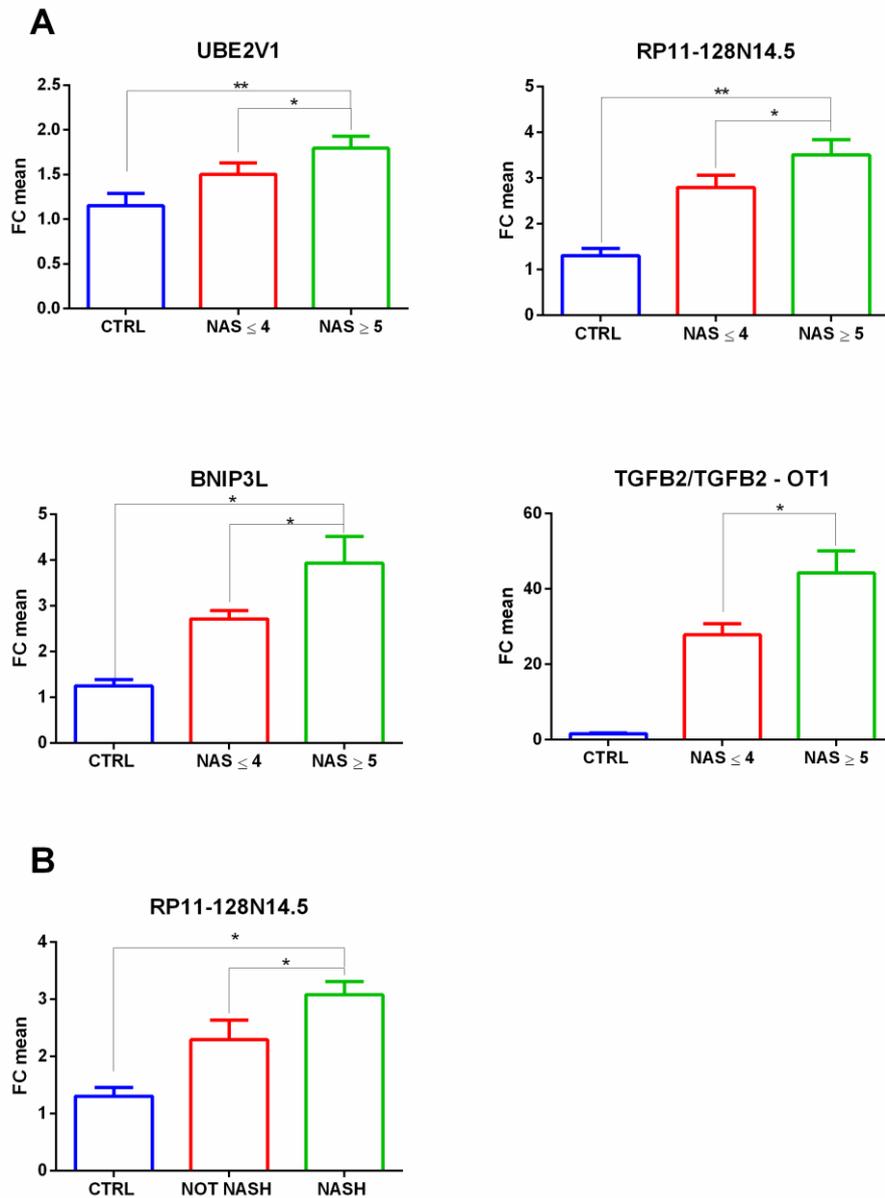


Figura 19: *Fold change* degli mRNA UBE2V1 e BNIP3L, del lncRNA RP11-128N14.5 e del coding/non-coding RNA TGFB2/TGFB2-OT1 validati mediante qPCR nel siero di pazienti con NAS  $\leq 4$  o NAS score  $\geq 5$  rispetto ai controlli sani,  $n=88$ : 25 CTRL, 38 NAS score  $\leq 4$ , 25 NAS score  $\geq 5$  (pannello **A**). *Fold change* del lncRNA RP11-128N14.5 validato mediante qPCR nel siero di pazienti con steatosi semplice (NOT NASH), NASH e soggetti di controllo,  $n=88$ : 25 CTRL, NOT NASH=18, NASH=45 (pannello **B**). t-test \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.02$ .

Abbiamo inoltre stratificato la coorte dei pazienti con NAFLD in base alla gravità della fibrosi. Abbiamo confrontato i pazienti con fibrosi assente o da lieve a moderata (F=0-2) rispetto a quelli con fibrosi avanzata e cirrosi (F=3-4). Secondo questa classificazione, abbiamo validato l'*up*-regolazione di HBA2, UBE2V1, BNIP3L e TGFB2/TGFB2-OT1 (Figura 20).

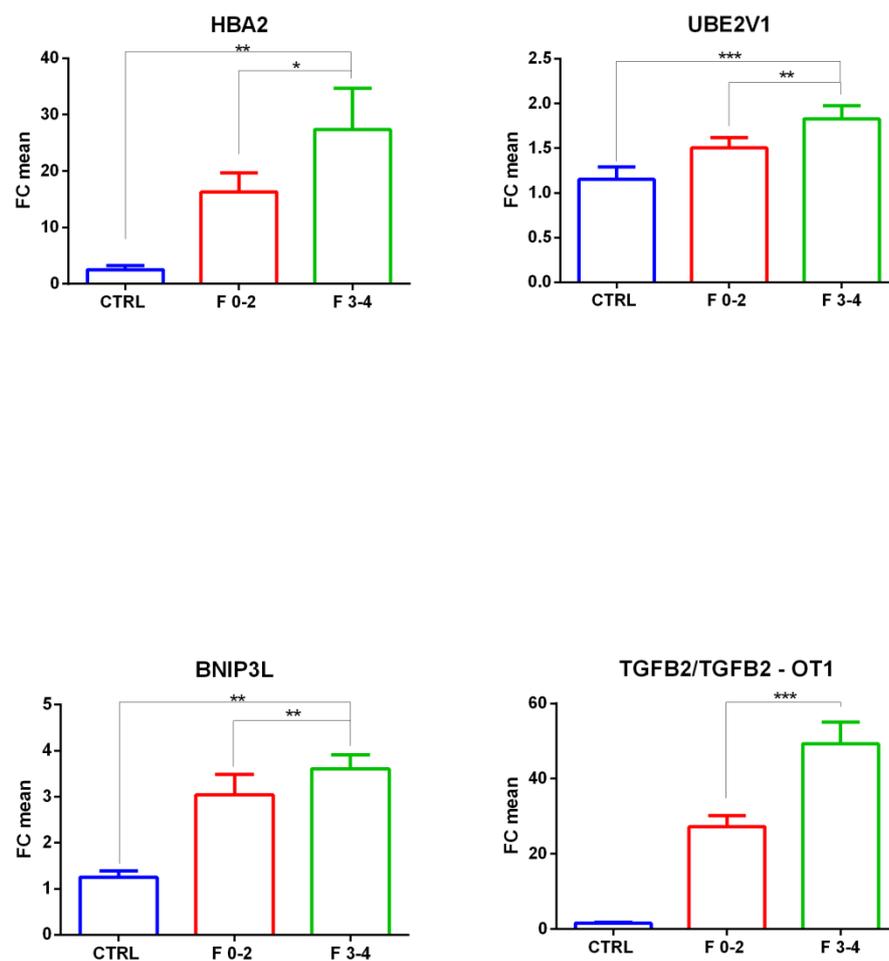


Figura 20: *Fold change* degli mRNA HBA2, UBE2V1, BNIP3L, e del *coding/non-coding* TGFB2/TGFB2-OT1 validati mediante qPCR nel siero di pazienti con grado di fibrosi F=0-2 o F=3-4 rispetto ai soggetti di controllo.  $n=88$ : 25 CTRL, 37 F=0-2, 26 F=3-4. t-test \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Come si può osservare nelle Figure 19 e 20, HBA2 raggiungeva la significatività statistica solo nel confronto F=3-4 rispetto a F=0-2 mentre RP11-128N14.5 raggiungeva la significatività statistica solo nei confronti NAS  $\geq 5$  rispetto a NAS  $\leq 4$  e NASH rispetto a NOT NASH.

È importante notare che, i trascritti analizzati erano *up*-regolati anche nel confronto F=3-4 o NAS  $\geq 5$  rispetto al gruppo di controllo come precedentemente mostrato nei dati del microarray. Inoltre, abbiamo anche validato la *down*-regolazione di *sherveebu* (AC020558.4) nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli. I valori di *fold change* e di *p-value* degli RNA codificanti e non codificanti selezionati, ottenuti mediante analisi *microarray* e *real time* PCR, sono riportati nella Tabella 2.

GENE NAME/ SYMBOL	MICROARRAY PROBE	MICROARRAY DATA						REAL TIME PCR ASSAY DATA												
		p-value		Fold Change		p-value		Fold Change		p-value		Fold Change								
		NAS ≤4 F0 vs CTRL	NAS ≤4 F0 vs CTRL	NAS ≤4 F0 vs CTRL	F-Test	NAS ≤4 F0 vs CTRL	NAS ≤4 F0 vs CTRL	F 3-4 vs CTRL	F 3-4 vs CTRL	NAS ≤5 vs CTRL	NAS ≤5 vs CTRL	NAS ≤5 vs CTRL	NAS ≤5 vs CTRL							
HBA2	TC160006445.hg.1	2.50E-01	8.12E-02	5.10E-03	1.67E-02	-1.5	1.94	2.92	2.04E-01	1.08E-02	4.93E-02	16.30	27.39	16.14	2.07E-01	1.43E-02	7.24E-02	16.47	26.00	16.10
UBE2V1	TC2000010025.hg.1	1.84E-01	1.40E-03	1.54E-02	4.00E-03	1.55	3.77	2.43	7.42E-02	2.10E-03	2.69E-02	1.50	1.83	1.46	9.08E-02	1.90E-03	3.08E-02	1.50	1.80	1.45
RP11-128N14.5	TC1300007781.hg.1	5.47E-01	2.50E-03	5.40E-03	4.10E-03	1.14	3.64	3.2	3.41E-01	2.14E-02	8.00E-02	3.18	3.46	4.69	4.19E-01	1.23E-02	3.88E-02	2.80	3.51	5.06
BNIP3L	TC0800007080.hg.1	2.29E-01	3.09E-02	1.40E-03	4.70E-03	-2.12	2.42	5.14	2.12E-01	1.71E-02	2.37E-02	3.04	3.61	1.72	2.08E-01	3.04E-02	2.94E-02	2.71	3.94	1.75
TGFβ2/TGFB2OT1	TC0100011621.hg.1	6.88E-01	6.39E-02	2.02E-02	4.69E-02	1.07	2.01	1.88	2.08E-01	6.78E-02	4.00E-04	27.21	49.26	9.20	3.15E-01	2.05E-01	2.87E-02	27.83	44.28	8.25
sherveebu	TC1700007071.hg.1	6.00E-04	2.00E-04	4.87E-01	4.00E-04	-3	-4.67	-1.56	5.30E-02	4.80E-02	5.00E-01	-1.3	-1.28	-1.18	5.40E-02	3.90E-02	5.00E-01	-1.3	-1.32	-1.19

Tabella 2. Valori di p-value e i valori di *Fold Change* dei geni codificanti/non codificanti ottenuti dopo l'analisi di *microarray* (pannello di sinistra); valori *p-value* e valori di *Fold Change* ottenuti dopo le singole reazioni PCR Real Time (pannello destro). La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

L'up-regolazione di HBA2 e TGFB2/TGFB2-OT1 in pazienti F=3-4 rispetto ai pazienti con F=0-2 e l'up-regolazione di UBE2V1, RP11-128N14.5, BNIP3L e TGFB2/TGFB2-OT1 nei pazienti con NAS score  $\geq 5$  rispetto ai pazienti con NAS score  $\leq 4$ , di RP11-128N14.5 nel confronto NASH rispetto a semplice steatosi sono stati confermati anche nella coorte di validazione esterna. I valori di *fold change* ed i relativi p-value ottenuti nella coorte di validazione esterna sono riportati in Figura 21 ed in Figura 22.

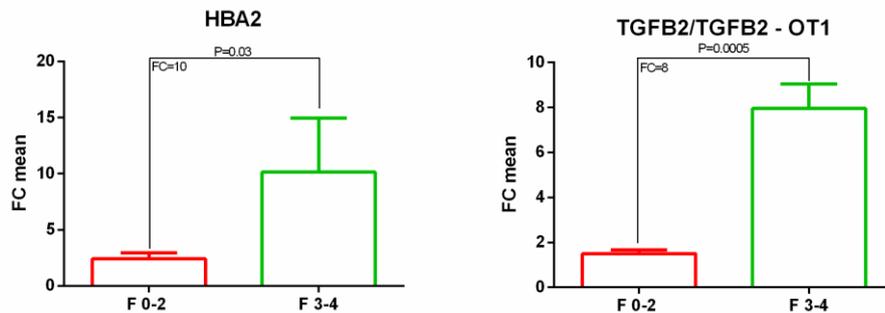


Figura 21: *Fold change* dell'mRNA HBA2 e del lncRNA TGFB2/TGFB2-OT1 validati tramite Real Time PCR nella coorte esterna di validazione nel confronto Fibrosi F=3-4 rispetto a F=0-2 ( $n=50$  26 F=0-2, 24 F=3-4).

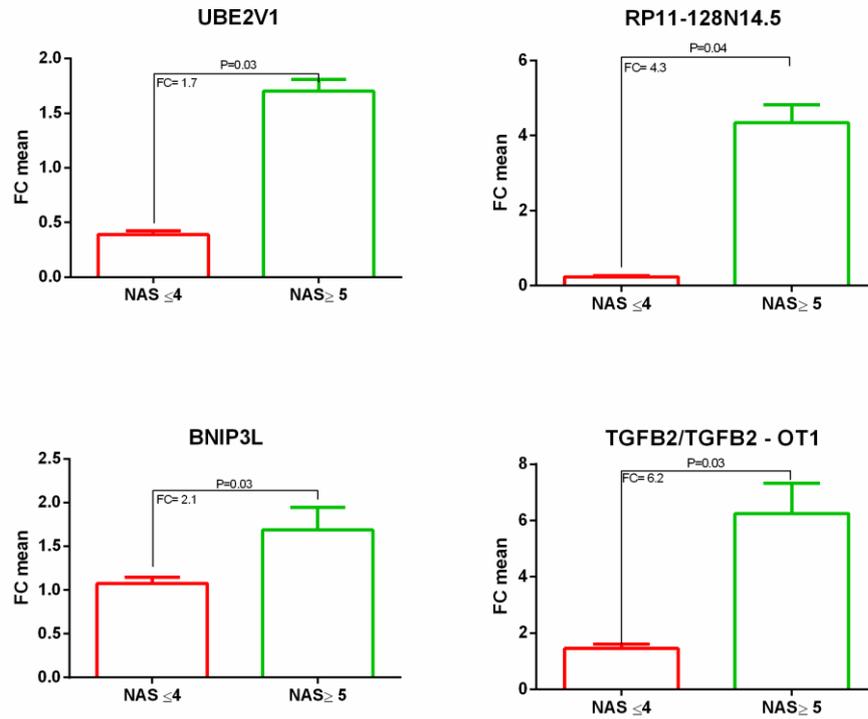
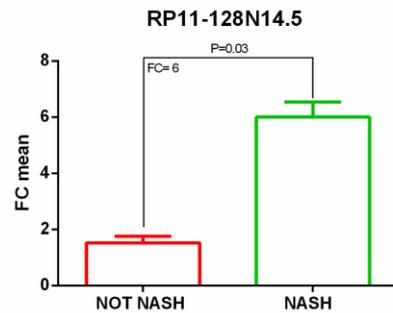
**A****B**

Figura 22: *Fold change* degli mRNA UBE2V1 e BNIP3L, del lncRNA RP11-128N14.5 e del *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 validati mediante Real Time PCR nella coorte esterna di validazione nel confronto NAS score  $\geq 5$  rispetto a NAS score  $\leq 4$  (pannello **A**).  $n=50$ : 23 NAS score  $\leq 4$ , 27 NAS score  $\geq 5$ . *Fold change* del lncRNA RP11-128N14.5 validato tramite Real Time PCR in campioni di siero di pazienti con NASH rispetto ai pazienti NOT NASH.  $n=50$ : NOT NASH: 15, NASH: 35.

#### 4.4 ASSOCIAZIONE DEI TRASCritti VALIDATI CON I DATI CLINICI E I PARAMETRI ISTOLOGICI

Abbiamo analizzato se i valori dei  $-\Delta Ct$  dei trascritti validati a livello sierico fossero correlati con gli indicatori clinici di danno epatico, sindrome metabolica e con gli *score* istologici di severità della patologia normalmente utilizzati per diagnosticare e stadiare la gravità della NAFLD e della fibrosi (Tabella 3).

I livelli di espressione di UBE2V1 erano correlati con AST, ALT, i trigliceridi, il *Kleiner Ballooning* e il NAS *score* (Figura 23).

L'espressione di BNIP3L era direttamente associata al *Kleiner lobular inflammation*, al *Kleiner ballooning* ed al grado di fibrosi (Figura 24).

L'espressione di RP11-128N14.5 era associata con AST, il *Kleiner Ballooning*, il NAS *score* e il grado di fibrosi (Figura 25).

Il *coding/non-coding* TGFB2/TGFB2-OT1 mostrava una relazione di regressione lineare positiva con FIB-4, la *Liver Stiffness*, il *Kleiner lobular inflammation*, il *Kleiner ballooning* ed il grado di fibrosi (Figura 26).

Infine, abbiamo trovato una relazione lineare inversa tra i livelli di espressione di *sherveebu* ed i trigliceridi (Figura 27) e tra HBA2 ed i livelli di colesterolo totale. I *p-value* ed i valori di  $R^2$  sono riportati nella Tabella 3.

	Coding RNA				Non-coding RNA				Coding/Non-coding RNA			
	TC2000010025.hg.1 (UBE2V1)	TC1600006445.hg.1 (HBA2)	TC0800007080.hg.1 (BNIP3L)	TC1300007781.hg.1 (RPI1-128N14.5)	TC1700007071.hg.1 (sherveebu)	TC0100011621.hg.1 (IGFB2-OT1)	R square	p value	R square	p value		
AST	1.48E-01	<b>2.00E-03</b>	3.50E-02	9.20E-02	9.00E-03	4.26E-01	2.40E-02	<b>5.00E-03</b>	3.20E-02	1.60E-01	4.00E-03	6.04E-01
ALT	9.70E-02	<b>6.00E-03</b>	0.00E+00	9.72E-01	1.00E-03	7.75E-01	1.60E-02	2.45E-01	1.80E-02	2.90E-01	2.00E-03	7.43E-01
GGT	4.00E-02	1.50E-01	5.60E-02	7.30E-02	1.00E-03	8.50E-01	0.00E+00	8.78E-01	0.00E+00	9.59E-01	7.00E-03	5.69E-01
TOT. CHOL	6.00E-03	5.35E-01	7.40E-02	<b>1.80E-02</b>	0.00E+00	8.69E-01	1.20E-02	3.49E-01	1.00E-03	8.03E-01	8.00E-03	4.65E-01
HDL	2.90E-02	2.12E-01	2.00E-02	2.77E-01	0.00E+00	9.17E-01	2.00E-03	7.15E-01	7.00E-03	5.84E-01	3.00E-03	6.74E-01
TRI	6.00E-02	<b>4.40E-02</b>	1.10E-02	3.72E-01	1.60E-02	3.18E-01	2.10E-02	2.23E-01	6.60E-02	<b>3.80E-02</b>	1.20E-02	3.87E-01
BMI	1.00E-02	3.82E-01	0.00E+00	9.56E-01	2.00E-02	2.34E-01	6.00E-03	5.03E-01	3.50E-02	1.46E-01	0.00E+00	9.78E-01
WC	1.40E-02	3.08E-01	2.00E-03	6.94E-01	1.80E-02	2.57E-01	4.00E-03	5.74E-01	5.00E-03	5.68E-01	1.00E-03	8.19E-01
PLT	1.00E-03	8.17E-01	5.00E-03	5.52E-01	9.00E-03	4.35E-01	4.50E-02	6.40E-02	2.10E-02	2.93E-01	1.40E-02	3.39E-01
KSG	5.60E-02	7.70E-02	1.00E-03	8.03E-01	1.50E-02	3.82E-01	1.50E-02	3.44E-01	2.00E-03	7.88E-01	1.10E-02	4.44E-01
KLIS	4.30E-02	1.23E-01	2.70E-02	2.03E-01	1.26E-01	<b>8.00E-03</b>	9.00E-03	4.51E-01	0.00E+00	9.23E-01	8.50E-02	<b>3.10E-02</b>
KBS	6.80E-02	<b>5.00E-02</b>	1.00E-02	4.44E-01	9.00E-02	<b>2.60E-02</b>	8.70E-02	<b>1.90E-02</b>	3.00E-03	7.33E-01	5.00E-03	6.09E-01
KNS	1.40E-01	<b>4.00E-03</b>	2.20E-02	2.53E-01	6.90E-02	5.60E-02	7.40E-02	<b>3.10E-02</b>	0.00E+00	9.22E-01	5.80E-02	7.70E-02
KFS	5.30E-02	8.50E-02	4.90E-02	8.40E-02	8.10E-02	<b>3.60E-02</b>	7.00E-02	<b>3.70E-02</b>	1.00E-03	7.93E-01	1.04E-01	<b>1.60E-02</b>
FTB-4	1.80E-02	3.15E-01	4.70E-02	9.90E-02	1.20E-02	4.42E-01	4.30E-02	1.13E-01	6.20E-02	1.21E-01	7.40E-02	<b>4.90E-02</b>
APRI	2.00E-03	6.34E-01	3.80E-02	1.38E-01	1.00E-03	8.22E-01	1.70E-02	3.75E-01	4.10E-02	2.02E-01	5.10E-02	1.09E-01
LSM	2.60E-02	2.38E-01	3.20E-02	1.67E-01	2.00E-02	3.04E-01	1.30E-02	3.76E-01	2.00E-03	8.15E-01	7.30E-02	<b>4.80E-02</b>

Tabella 3. Valori P value e R square tra RNA codificanti/non codificanti e dati istologici/biochimici. La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

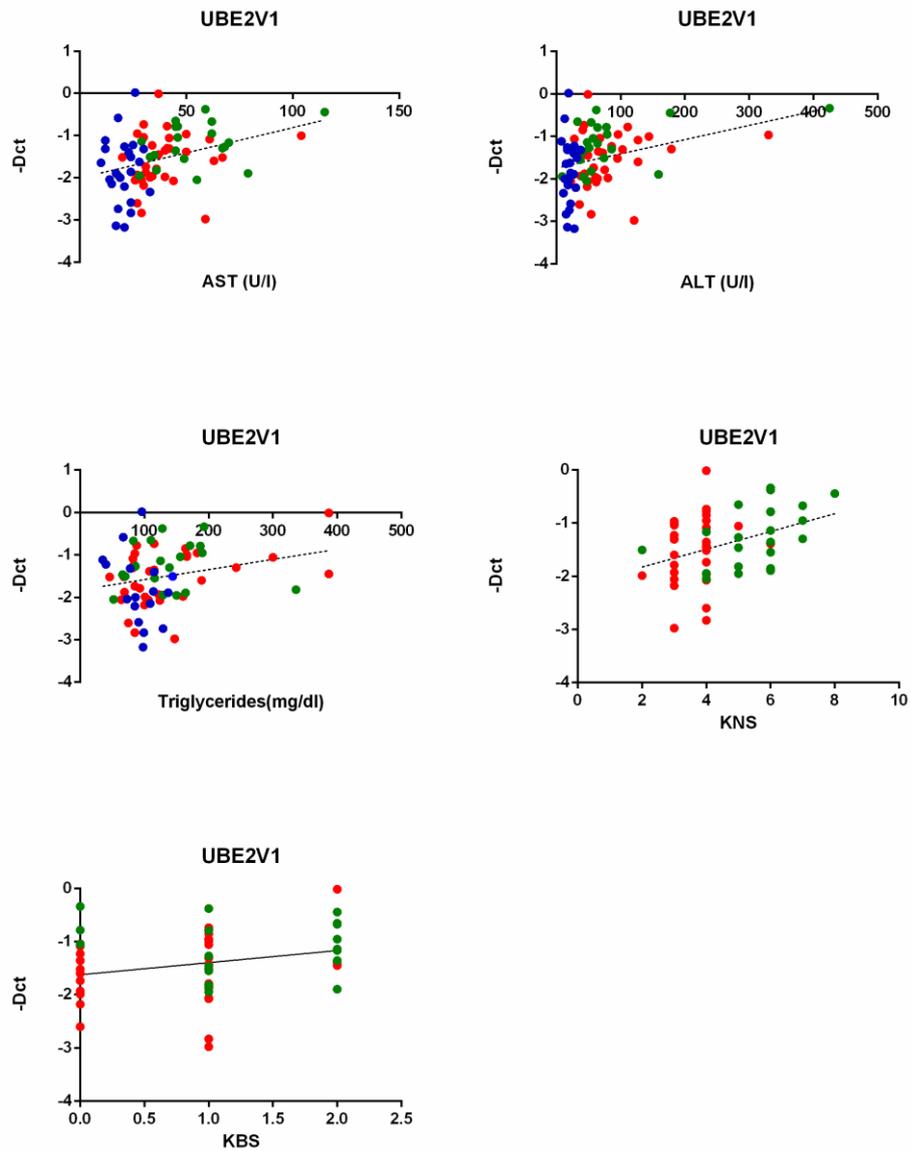


Figura 23: Regressione lineare tra i livelli sierici di UBE2V1 ed i dati istologici/biochimici. Dati istologici: *Kleiner Ballooning Score* (KBS), *Kleiner NAS Score* (KNS). Dati clinici: AST, ALT, trigliceridi. n=88: 37 F=0-2 (rosso), 26 F=3-4 (verde), 25 CTRL (blu). La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

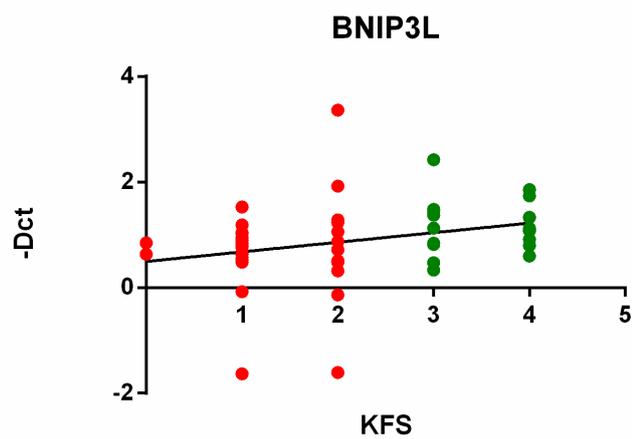
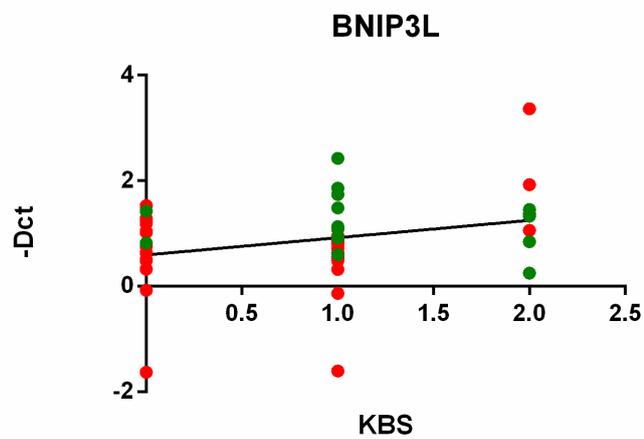
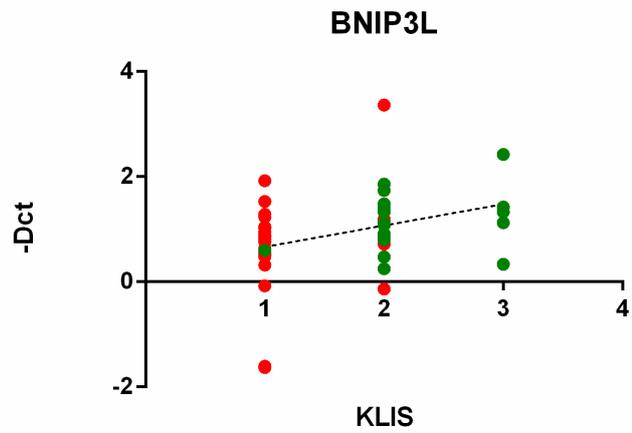


Figura 24: Regressione lineare tra i livelli sierici di BNIP3L ed i dati istologici. Dati istologici: *Kleiner Lobular Inflammation Score* (KLIS). *Kleiner Ballooning Score* (KBL). *Kleiner Fibrosis Score* (KFS). n=63: 37 F = 0-2 (rosso). 26 F = 3-4 (verde). La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

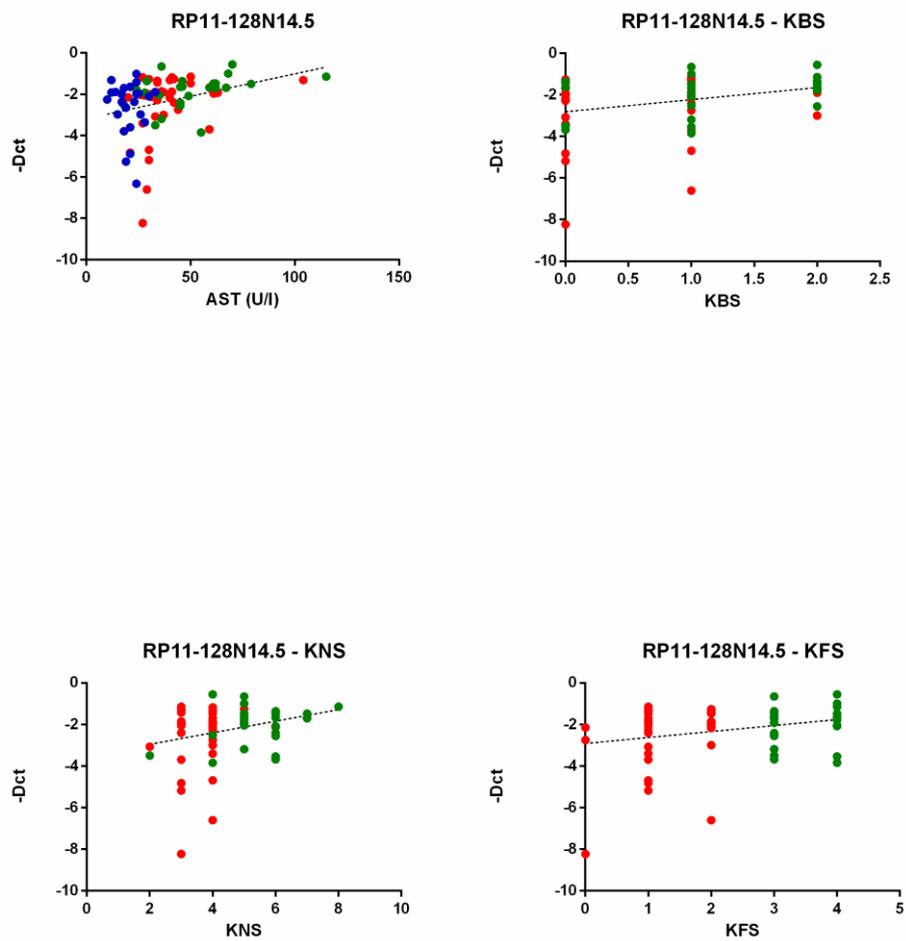


Figura 25: Regressione lineare tra i livelli sierici del lncRNA RP11-128N14.5 ed i dati istologici/biochimici. Dati istologici: Kleiner NAS Score (KNS). Kleiner Fibrosis Score (KFS). Dati clinici: AST. n=88: 37 F=0-2 (rosso), 26 F=3-4 (verde), 25 CTRL (blu). La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

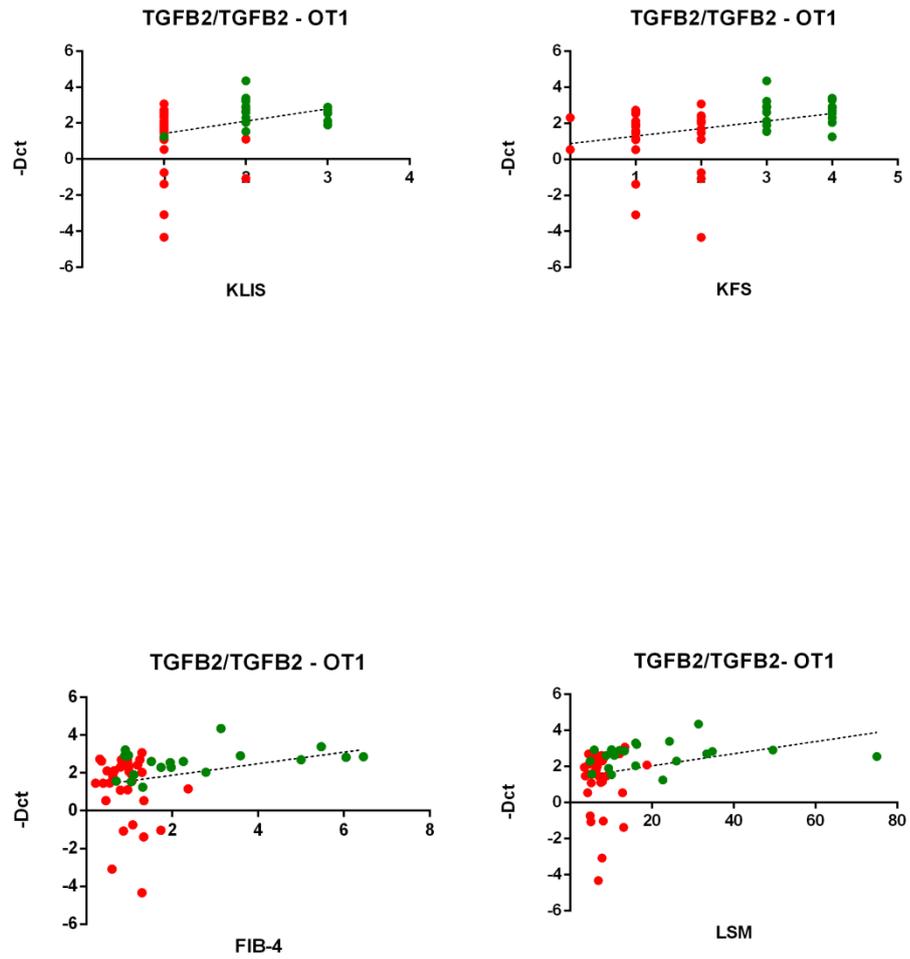


Figura 26: Regressione lineare tra i livelli sierici di TGFB2/TGFB2-OT1 ed i dati istologici/biochimici. Dati istologici: *Kleiner Lobular Inflammation Score* (KLIF). *Kleiner Fibrosis Score* (KFS). Dati clinici: FIB-4. *Liver Stiffness Measurement* (LSM). n=63; 37 F=0-2 (rosso). 26 F=3-4 (verde). La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

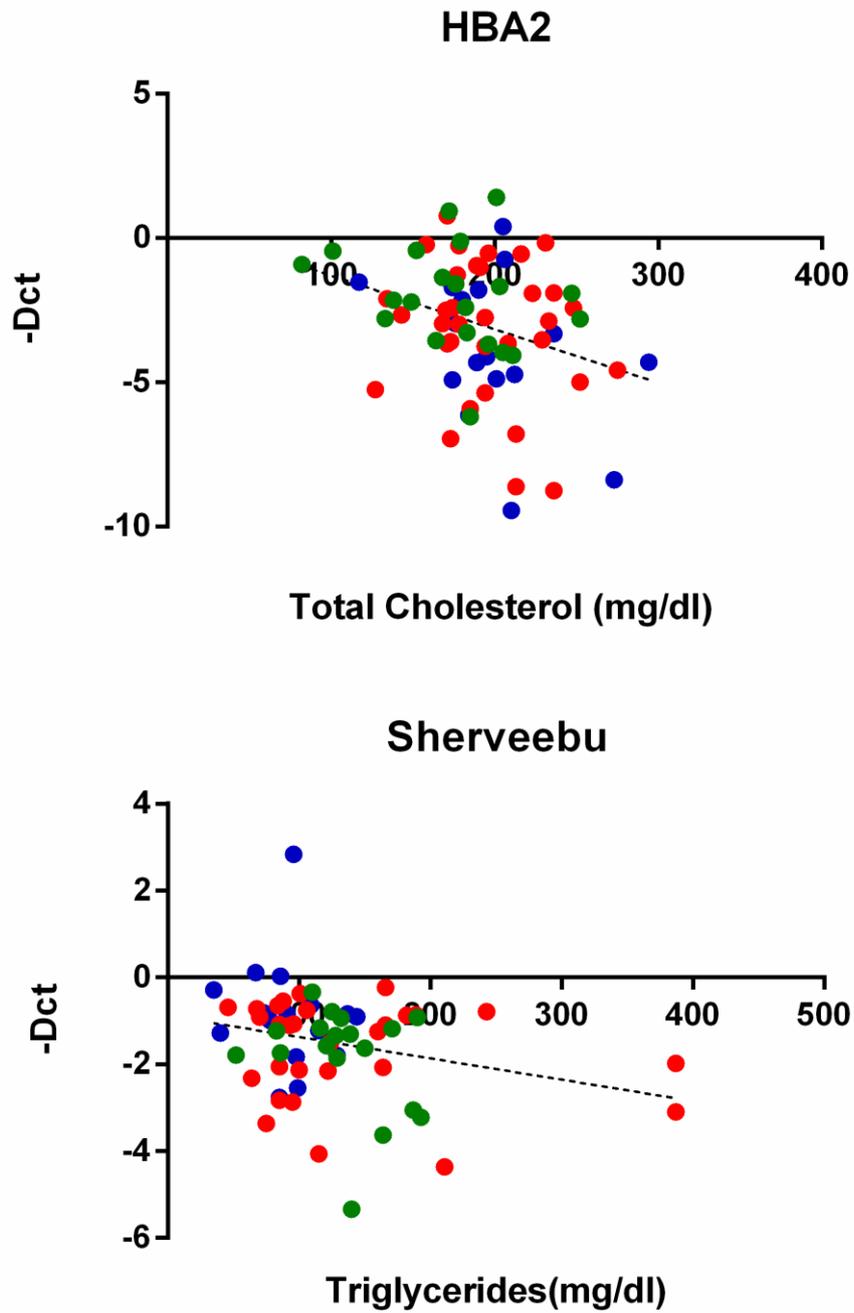


Figura 27: Regressione lineare tra i livelli sierici di HBA2 e di *sherveebu* con dati biochimici. Dati clinici: trigliceridi, colesterolo totale. n=88: 37 F=0-2 (rosso), 26 F=3-4 (verde), 25 CTRL (blu). La significatività statistica è stata stabilita a  $p \leq 0,05$ .

## **4.5 ANALISI DEI TRASCritti VALIDATI NELLE BIOPSIE EPATICHE E NEL MODELLO *IN VITRO***

Al fine di indagare ulteriormente il possibile legame tra i trascritti validati ed i meccanismi cellulari e molecolari associati all'evoluzione della malattia, abbiamo valutato se la deregolazione dell'RNA, osservata nel siero di pazienti con NAFLD, fosse presente anche nel tessuto epatico dei pazienti con NAFLD ed in modelli *in vitro* di NAFL e NASH (a livello intracellulare ed extracellulare).

L'RNA totale è stato estratto da biopsie epatiche di 12 soggetti (4 CTRL; 4 campioni *mild* NAFLD, NAS score  $\leq 4$  con fibrosi =0; 4 campioni *severe* NAFLD, NAS score  $\geq 5$  con fibrosi=3).

Le cellule HepG2 sono state esposte per 48 ore a una miscela di Oleato:Palmitato (OA:PA) o solo al Palmitato (PA), per simulare rispettivamente un modello *in vitro* di steatosi semplice o di steatoepatite non alcolica, come è già stato riportato in un nostro lavoro precedentemente pubblicato (180).

Nel tessuto epatico abbiamo riscontrato *l'up*-regolazione statisticamente significativa dell'mRNA UBE2V1, del lncRNA RP11-128N14.5 e del *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 in pazienti con *severe* NAFLD rispetto a pazienti con *mild* NAFLD e rispetto ai soggetti di controllo sani. L'RNA messaggero codificante per HBA2 era *up*-regolato in maniera statisticamente significativa solo nel confronto *severe* NAFLD rispetto al controllo. Nelle biopsie epatiche analizzate, la deregolazione di BNIP3L del

ncRNA sherveebu (AC020558.4) non raggiungevano la significatività statistica (Figura 28 A).

In accordo con i dati ottenuti nel tessuto epatico, il *coding* RNA UBE2V1, il lncRNA RP11-128N14.5 e il *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 erano up-regolati nelle cellule trattate con PA rispetto a quelle trattate con OA:PA e rispetto ai controlli (Figura 28 B). A differenza dei dati osservati nelle biopsie epatiche, i livelli di espressione dell'mRNA HBA2 a livello intracellulare non erano influenzati dal trattamento con acidi grassi; il ncRNA sherveebu (AC020558.4), invece, mostrava un trend di espressione crescente da NAFL a NASH statisticamente significativo.

A livello extracellulare, l'mRNA UBE2V1 ed il ncRNA sherveebu (AC020558.4) erano deregolati in maniera statisticamente significativa solo nel confronto PA rispetto a OA:PA; il lncRNA RP11-128N14.5, l'mRNA BNIP3L ed il *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 secreti nel mezzo di coltura, erano significativamente *up*-regolati sia nel confronto PA rispetto a CTRL che nel confronto PA rispetto a OA:PA (Figura 28 B). Inoltre, è importante notare che l'mRNA di HBA2 era espresso solo a livello intracellulare.

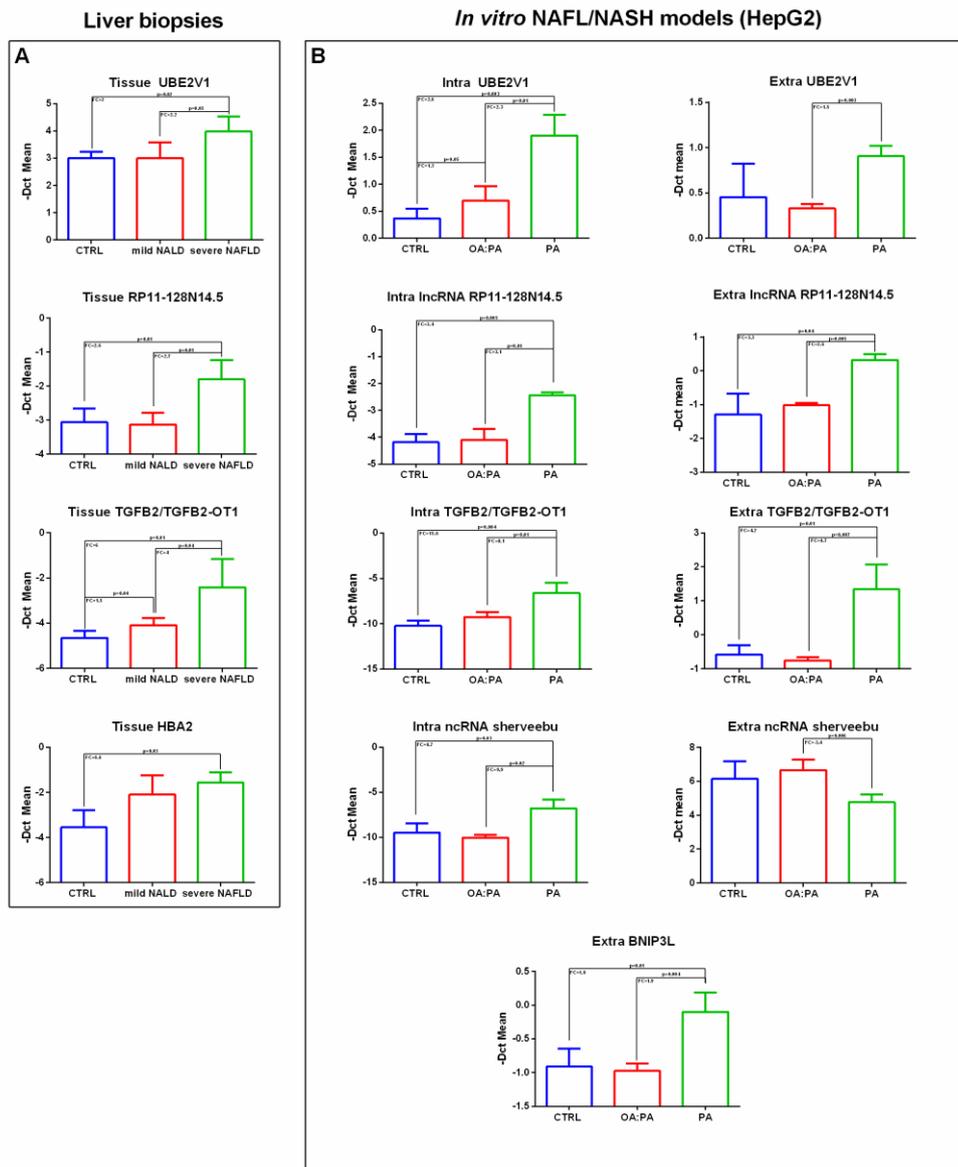


Figura 28: Istogrammi che rappresentano i livelli di espressione dell'mRNA UBE2V1, del lncRNA RP11-128N14.5, del *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 e dell'mRNA HBA2 (pannello A) nelle biopsie epatiche.  $n = 12$ , four CTRL, four mild NAFLD:  $NAS \leq 4$   $F = 0$ , four severe NAFLD  $NAS$  SCORE  $\geq 5$   $F = 3$ . Istogrammi che rappresentano i livelli di espressione dell'mRNA UBE2V1, del lncRNA RP11-128N14.5, del *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 e di sherveebu (AC020558.4) nelle cellule HepG2 trattate con OA:PA e PA rispetto ai controlli a livello intracellulare ed extracellulare; istogramma dei livelli di espressione a livello extracellulare dell'mRNA BNIP3L (pannello B).

## 4.6 ANALISI DELLE CURVE ROC

Mediante l'analisi delle curve ROC, abbiamo analizzato le *performance* diagnostiche dei trascritti validati per l'identificazione dei pazienti F=3-4 o  $NAS \geq 5$  nelle coorti di validazione NAFLD.

I trascritti che hanno raggiunto la significatività statistica nell'analisi della curva ROC sono stati: I) TGFB2/TGFB2-OT1 nel confronto F=3-4 rispetto a F=0-2 (coorte interna: AUROC=0.797, IC 95%=0.675-0.918 sensibilità=65%, specificità=81,3%, valore p=3,5 E-04; coorte esterna: AUROC=0,786, IC 95%=0,623-0,950, sensibilità=62,5%, specificità=94,4%, valore p=4,4E-03); II) RP11-128N14.5 nel confronto  $NAS \geq 5$  rispetto a  $NAS \leq 4$ , (coorte interna: AUROC=0,706, IC 95%=0,554-0,857, sensibilità=73,7%, specificità=70,4%, valore p=1,9E-02; coorte esterna: AUROC=0,694, IC 95%=0,545-0,843, sensibilità=78,3%, specificità=63%, valore p=2,0E-02). BNIP3L nel confronto  $NAS \geq 5$  rispetto a  $NAS \leq 4$ , (coorte interna: AUROC=0,676, IC 95%=0,512-0,841, sensibilità=57,9%, specificità=81,5%, valore p=4,3E-02; coorte esterna: AUROC=0,686, IC 95% =0,537-0,835, sensibilità=51,9%, specificità=91,3%, valore p=3,0E-02).

È importante notare che i livelli di espressione di TGFB2/TGFB2-OT1 erano associati a FIB-4 e LSM, questi parametri vengono utilizzati nella pratica clinica per la diagnosi non invasiva dei soggetti F=3-4.

Il confronto delle AUROC ha rivelato che le combinazioni TGFB2/TGFB2-OT1 più FIB-4 (coorte interna: AUROC=0,891, IC 95%=0,799-0,982, sensibilità=80%, specificità=87,5%, valore p=3,0E-06; coorte esterna: AUROC=0,889, IC 95%=0,771-0,998, sensibilità=87,5%, specificità=83,3%,

valore  $p=1,1E-04$ ) o TGF2/TGF2-OT1 più LSM (AUROC=0,892, IC 95%=0,802-0,983, sensibilità=80%, specificità=90,6%, valore  $p=2,0E-06$ ) presentavano una *performance* diagnostica superiore ad APRI (coorte interna: AUROC=0,759, IC 95%=0,626-0,893, sensibilità=55%, specificità=93,8%, valore  $p=1,8E-03$ , coorte esterna: AUROC=0,667, IC 95%=0,479-0,854, sensibilità=68,8%, specificità=66,7%, valore  $p=9,8E-02$ ); FIB-4 (coorte interna: AUROC=0,819, IC 95%=0,700-0,937, sensibilità=60%, specificità=93,8%, valore  $p=1,3E-04$ ; coorte esterna: AUROC=0,839, IC 95%=0,698-0,979, sensibilità=93,8%, specificità=66,7%, valore  $p=7,7E-04$ ); TGF2/TGF2-OT1 (coorte interna: AUROC=0,797, IC 95%=0,675-0,918, sensibilità=65%, specificità=81,3%, valore  $p=3,5E-04$ ; coorte esterna: AUROC=0,786, IC 95%=0,623-0,950, sensibilità=62,5%, specificità=94,4%, valore  $p=4,4E-03$ ) e LSM (AUROC=0,841, IC 95%=0,723-0,960, sensibilità=85%, specificità=81,3%, valore  $p=4,0E-05$ ) (Figura 29 e 30).

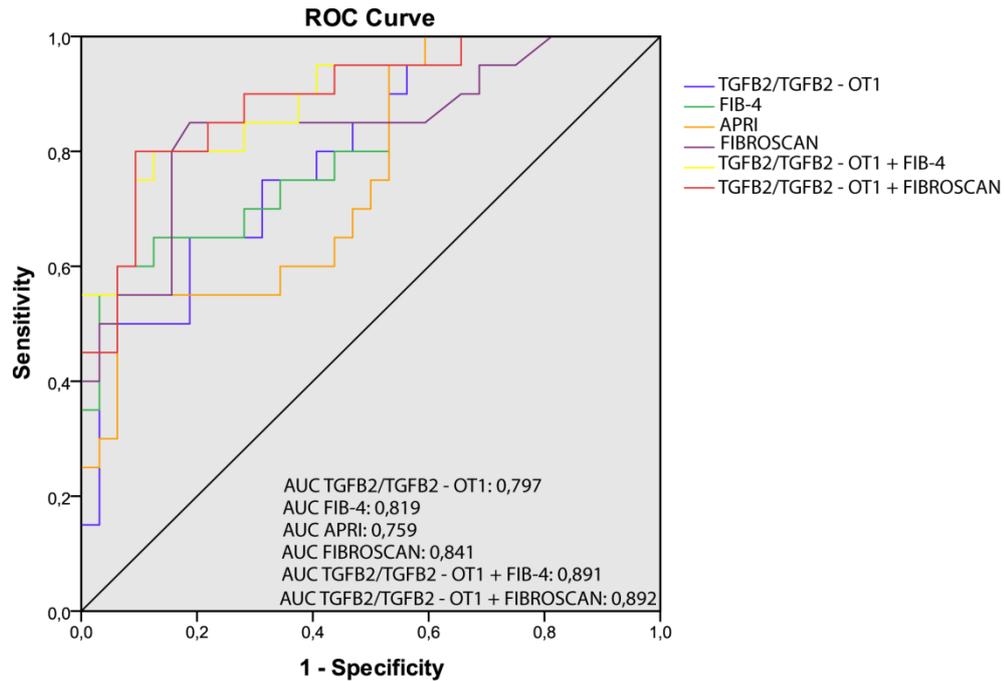


Figura 29: Analisi univariata e multivariata della curva ROC per valutare la *performance* diagnostica di APRI, FIB-4, LSM, TGFB2/TGFB2-OT1, TGFB2/TGFB2-OT1+FIB-4, TGFB2/TGFB2-OT1+Fibroscan per l'identificazione dei soggetti con F=3-4 rispetto F=0-2. AUC TGFB2/TFB2-OT1=0,797 (IC 95%=0,675-0,918, sensibilità=65%, specificità=81,3%,  $p=3,50E-04$ ); AUC FIB-4=0,819 (IC 95%=0,700-0,937, sensibilità=60%, specificità=93,8%,  $p=1,30E-04$ ); AUC APRI=0,759 (IC 95%=0,626-0,893, sensibilità=55%, specificità=93,8%,  $p=1,80E-03$ ); AUC Fibroscan=0,841 (IC 95%=0,723-0,960, sensibilità=85%, specificità=81,3%, valore  $p=4,0E-05$ ) AUC TGFB2/TGFB2-OT1+FIB4=0,891 (IC 95%=0,799-0,982, sensibilità=80%, specificità=87,5%,  $p=3,00E-06$ ). AUC TGFB2/TFB2-OT1+Fibroscan=0,892 (IC 95%=0,806-0,983, sensibilità=80%, specificità=90,6%,  $p=2,00E-06$ ).

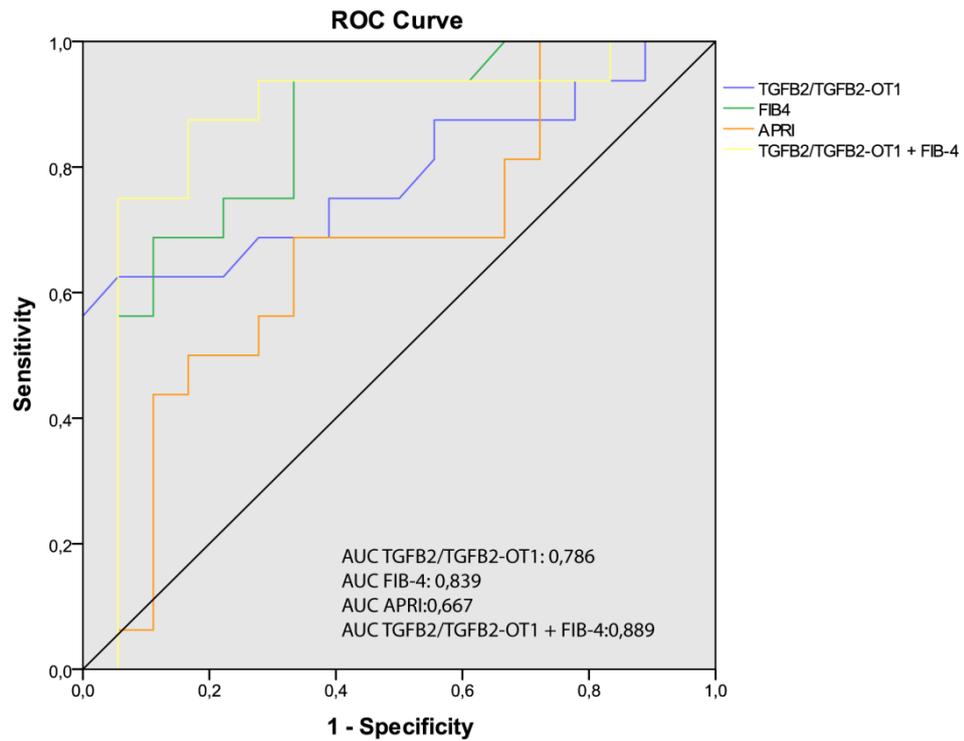


Figura 30: Analisi univariata e multivariata della curva ROC per valutare la performance diagnostica di APRI, FIB-4, TGFB2/TGFB2-OT1, TGFB2/TGFB2-OT1 + FIB-4 come biomarcatori di diagnosi dei soggetti F=3-4 rispetto ai soggetti F=0-2 nella coorte di validazione esterna. AUC TGFB2/TGFB2-OT1=0,786 (IC 95%=0,623-0,950, sensibilità=62,5%, specificità=94,4%,  $p=4,42E-03$ ); AUC FIB-4=0,839 (IC 95%=0,698-0,979, sensibilità=93,8%, specificità=66,7%,  $p=7,7E-04$ ); AUC APRI=0,667 (IC 95%=0,479-0,854, sensibilità=68,8%, specificità=66,6%,  $p=9,8E-02$ ); AUC TGFB2/TGFB2-OT1+FIB4=0,889 (IC 95%=0,771-0,998, sensibilità=87,5%, specificità=83,3%,  $p=1,1E-04$ ).

## 5. DISCUSSIONE

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di analizzare l'intero trascrittoma ed in particolare i lncRNA e gli mRNA sierici espressi nei pazienti con NAFLD per identificare delle "*molecular fingerprint*" che possano in parte riflettere ciò che accade nel tessuto epatico danneggiato.

Sebbene gli acidi nucleici circolanti nel plasma siano stati scoperti nel 1948 da Mandel e Metais (189), lo studio degli RNA come biomarcatori di diagnosi e prognosi si è sviluppato solo all'inizio del 2000, quando è stato dimostrato che gli RNA extracellulari sono inaspettatamente stabili nei confronti della degradazione da parte delle RNasi (190, 191).

Negli ultimi cinque anni, la ricerca di nuovi biomarcatori nel campo dell'epatologia si è concentrata quasi esclusivamente sull'analisi dell'espressione dei microRNA circolanti (192) piuttosto che su altre classi di molecole di RNA. Tuttavia, a nostro avviso, altre classi di molecole di RNA meritano la stessa importanza che è stata data ai miRNA, oltre che per la loro rilevanza biologica, anche per il fatto che queste molecole sono altrettanto resistenti alla degradazione mediata dalle RNasi; inoltre diversi studi suggeriscono che la resistenza di queste molecole di RNA sia regolata dagli stessi meccanismi che governano la stabilità dei miRNA nei fluidi corporei, come l'incapsulamento della vescicola della membrana o l'associazione ad RBP (168, 170, 191, 193, 194). Inoltre, è stato riportato che le molecole di RNA codificanti e non codificanti associate agli esosomi sono funzionalmente attive nelle cellule bersaglio agendo come ormoni (195).

Il profilo d'espressione degli RNA messaggeri circolanti è stato analizzato solo in due studi riguardanti la tossicità epatica in modelli animali (193, 196).

Per quanto riguarda i dati sul siero condotti nell'uomo, solamente due studi hanno esplorato l'espressione di specifici mRNA nell'epatocarcinoma, nella cirrosi e nelle epatiti virali (197, 198). Alcuni studi condotti su pazienti affetti da epatocarcinoma o cirrosi alcolica (173, 199) hanno riportato alterazioni dei lncRNA nel siero umano. Di conseguenza, la letteratura attuale su questo argomento, e specialmente nel contesto della malattia epatica metabolica, è piuttosto carente.

In questo studio, abbiamo eseguito uno *screening* iniziale degli mRNA e dei ncRNA nel siero di pazienti affetti da NAFLD sottoposti a biopsia epatica che presentavano differenti gradi di severità istopatologica, ed in soggetti di controllo (n=12: 4 CTRL, 4 NAS  $\leq$ 4 F=0, 4 NAS  $\geq$ 5 F=3). Abbiamo utilizzato il *Clariom D pico assay* che richiede concentrazioni molto basse di RNA totale come *input* di reazione, in accordo alle basse rese di RNA ottenute da siero. Quest'analisi ha portato all'identificazione di 990 trascritti deregolati nel confronto *mild* NAFLD rispetto al gruppo di controllo, 1842 trascritti deregolati nel confronto *severe* NAFLD rispetto al gruppo di controllo e 1098 trascritti deregolati nel confronto *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD. È interessante notare che i trascritti deregolati identificati mediante questo *screening* iniziale, erano statisticamente associati a *pathway* note per essere coinvolte nella fibrosi e nella fisiopatogenesi della NASH come l'infiammazione, lo stress UPR ed il metabolismo.

Per caratterizzare meglio i nostri risultati, abbiamo scelto, nella successiva fase di validazione mediante *real time* PCR, cinque trascritti differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa nel confronto *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD con un p-value  $\leq 0,02$  e potenzialmente associati alla progressione della NASH ed alle *pathway* fibrogeniche. Nei pazienti con NAFLD, è stata valutata l'efficienza dei trascritti validati nel predire la severità istologica della malattia (NAS  $\geq 5$ ) o della fibrosi (F=3-4). È interessante notare che le combinazioni di TGFB2/TGFB2-OT1 più FIB-4 (AUC=0,891, valore p=3,00E-06) o TGFB2/TGFB2-OT1 più LSM (AUC=0,892, valore p=2,00E-06) erano in grado di discriminare efficacemente i pazienti con F 3-4 rispetto ai pazienti F 0-2. La combinazione dei valori di espressione degli RNA codificanti e non codificanti e dei dati clinici di *routine* potrebbe essere applicata come strumento diagnostico per lo *screening* non invasivo e la stadiazione dei pazienti NAFLD sulla base del grado di fibrosi. Inoltre, il trascritto con la migliore *performance* diagnostica per l'identificazione dei pazienti NAS $\geq 5$ , RP11-128N14.5, ha ottenuto un AUC simile all'AST ed il loro uso combinato non migliorava la potenza diagnostica. Di conseguenza, l'identificazione di nuovi biomarcatori di diagnosi NASH è ancora aperta e deve essere ancora approfondita.

Al fine di determinare un possibile legame tra gli RNA codificanti/non codificanti ed i meccanismi sinergici e complessi che stanno alla base della progressione della malattia e della fibrosi, abbiamo valutato la correlazione tra i valori di espressione dei trascritti validati e le caratteristiche cliniche/istologiche dei pazienti con NAFLD.

Nel nostro studio, abbiamo osservato che UBE2V1, BNIP3L, RP11-128N14.5, TGFB2/TGFB2-OT1 erano correlati con gli score istologici di Kleiner, in particolare, il *Kleiner NAS score* era correlato con UBE2V1 ( $p=4,0E-03$ ) ed RP11-128N14.5 ( $p=3,10E-02$ ); il *Kleiner lobular inflammation score* era correlato con BNIP3L ( $p=8,00E-03$ ) e TGFB2/TGFB2-OT1 ( $p=3,10E-02$ ); il *Kleiner ballooning score* era correlato con UBE2V1 ( $p=4,50E-02$ ), BNIP3L ( $p=2,60E-02$ ) e RP11-128N14.5 ( $p=1,20E-02$ ); il *Kleiner fibrosis score* era correlato con BNIP3L ( $p=3,60E-02$ ), RP11-128N14.5 ( $p=3,70E-02$ ) e TGFB2/TGFB2-OT1 ( $p=1,60E-02$ ). La correlazione statistica con gli score istologici della severità della malattia e della fibrosi suggerisce che i trascritti analizzati potrebbero essere potenzialmente associati alle *pathway* molecolari della NASH e della fibrogenesi epatica.

Ad oggi, nonostante il numero di lavori pubblicati, riuscire a spiegare la relazione tra l'espressione degli RNA circolanti ed il danno tissutale indotto dalla malattia resta una sfida molto difficile. Abbiamo cercato di chiarire questo punto, verificando se la deregolazione degli RNA circolanti potesse essere in qualche modo riflessa nel tessuto epatico di soggetti con NAFLD ed in un modello *in vitro* di NAFLD.

Il gruppo di María José Gómez-Lechón ha sviluppato due modelli *in vitro* di NAFL e NASH (200), il nostro gruppo di ricerca (180) ha successivamente validato questi modelli sperimentali. Nel nostro studio abbiamo trattato le cellule HepG2 con una miscela di oleato/palmitato (OA:PA) o solo palmitato (PA) per mimare rispettivamente la NAFL o la NASH. È interessante notare che passando da condizioni di controllo a cellule trattate con OA:PA e PA, gli

RNA secreti nel mezzo riflettevano parzialmente il *trend* di espressione osservato nei campioni di siero dei soggetti di controllo e dei pazienti con *mild* NAFLD e con *severe* NAFLD. Nel nostro modello *in vitro*, abbiamo anche osservato che l'espressione intracellulare dell'mRNA UBE2V1, del lncRNA RP11-128N14.5, del ncRNA sherveebu (AC020558.4) e del *coding/non-coding* RNA TGFB2/TGFB2-OT1 aumentava progressivamente, passando dalle condizioni di controllo alle condizioni OA:PA e PA.

Nel nostro studio il palmitato (acido grasso libero saturo) è il principale responsabile degli effetti lipotossici rispetto all'oleato (acido grasso insaturo) e sembra innescare un'induzione dell'espressione di UBE2V1, RP11-128N14.5 e di TGFB2/TGFB2-OT1. La deregolazione dei *coding/non-coding* RNA validati nei nostri modelli *in vitro*, supporta ulteriormente l'associazione statisticamente significativa tra i trascritti analizzati nei sieri dei pazienti e gli *score* istologici di severità della malattia; inoltre esperimenti di induzione o di inibizione transiente dell'espressione genica dei trascritti identificati, ed in particolare dei ncRNA, nel nostro modello *in vitro*, potrebbero chiarire il ruolo di questi RNA nei processi cellulari e molecolari coinvolti nell'insorgenza ed nella progressione della patologia epatica, quali lo stress ossidativo, l'infiammazione, l'apoptosi, l'insulino-resistenza, l'alterazione del metabolismo dei lipidi e del glucosio.

Poiché la NASH colpisce non solo gli epatociti nel fegato, ma coinvolge altri tipi di cellule epatiche (cellule epatiche stellate, cellule di Kupffer, cellule *natural killer*) ed altri tessuti/organi (intestino, tessuto adiposo, cellule infiammatorie circolanti), la deregolazione dei trascritti analizzati in modelli

cellulari di NAFL/NASH rappresenta solo un tentativo di spiegare l'aumento dei livelli dei lncRNA e degli mRNA nel siero; infatti questi RNA potrebbero essere prodotti anche da altre cellule epatiche e da tessuti extraepatici o potrebbero essere il risultato di effetti cumulativi.

Per ottenere ulteriori informazioni sulla potenziale origine epatica dei trascritti che erano deregolati nel nostro studio e sulla loro relazione con i meccanismi biologici/molecolari alla base della severità della NASH/fibrosi, abbiamo analizzato l'espressione dei trascritti nelle biopsie epatiche di pazienti con NAFLD e di soggetti di controllo. È interessante notare che UBE2V1, RP11-128N14.5, TGFB2/TGFB2-OT1 erano *up*-regolati nei pazienti con *severe* NAFLD rispetto a *mild* NAFLD e nei controlli. HBA2 era *up*-regolato solo nei pazienti con *severe* NAFLD rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda l'*up*-regolazione di HBA2, è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione tra i livelli di emoglobina e la steatoepatite non alcolica. Akyuz *et al.* hanno riportato che l'aumento dell'emoglobina sierica è l'unico predittore indipendente sia della NASH che della fibrosi epatica nei pazienti con NAFLD e BMI <25 kg/m<sup>2</sup> (201). Trak-Smayra *et al.* hanno eseguito uno studio di proteomica in una coorte di pazienti obesi in presenza o in assenza di lesioni epatiche ed hanno osservato una deregolazione dei livelli delle subunità di emoglobina libera con livelli progressivamente crescenti in pazienti obesi senza lesioni epatiche, in pazienti con semplice steatosi e con NASH; nello stesso lavoro è stato anche dimostrato che le subunità di emoglobina libera ritornavano a valori normali dopo la perdita di peso (202). È necessario chiarire se l'aumento delle subunità di emoglobina sierica libera sia dovuto ad un

aumento dell'emolisi o ad un aumento dell'espressione genica e proteica che si verifica nel fegato interessato. A supporto della prima ipotesi, è stato riportato che lo stress ossidativo induce una maggiore suscettibilità degli eritrociti all'emolisi in modelli animali di NASH (183) e nei soggetti obesi (203). A sostegno della seconda ipotesi, Liu *et al.* hanno osservato un aumento dell'espressione di HBA1 e di HBB in biopsie epatiche di pazienti NASH rispetto ai controlli; gli stessi autori hanno dimostrato che il trattamento con perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nelle HepG2 aumenta l'espressione genica e proteica di HBA1 e HBB. In un altro lavoro, è stato dimostrato che la sovraespressione dell'emoglobina induce anche una riduzione dello stress ossidativo (182). In accordo con questi risultati, abbiamo osservato un'*up*-regolazione significativa del trascritto HBA2 in pazienti con *severe* NAFLD rispetto ai controlli. Tuttavia, nonostante il palmitato sia un noto induttore di stress ossidativo (204), non abbiamo osservato alcuna alterazione dell'espressione del gene HBA2 nei nostri modelli *in vitro* né a livello intracellulare né extracellulare. Probabilmente, nella NAFLD, il contributo principale dell'aumento dell'espressione genica di HBA2 è dato da altri tipi di cellule, diverse dagli epatociti, all'interno del tessuto epatico interessato.

Sebbene non sia stato riportato alcun legame diretto tra l'espressione del gene UBE2V1 e la NAFLD, UBE2V1 è coinvolto nella poli-ubiquitinazione non canonica di IKK, che a sua volta attiva la cascata NF-κB, che è una delle principali vie di trasduzione del segnale pro-infiammatorie attive nella NASH (205).

Non ci sono dati di letteratura riguardanti il coinvolgimento di RP11-128N14.5 nella NAFLD. RP11-128N14.5 è un lungo RNA intronico trascritto nella stessa direzione del suo gene ospite RAP2A, codificante per proteine. RP11-128N14.5, come già riportato per diversi lncRNA, potrebbe avere un ruolo nella regolazione epigenetica del proprio *locus* genico ospite. Non ci sono dati in letteratura sull'associazione tra il gene codificante RAP2A e la NAFLD, tuttavia, è stato riportato che nell'epatocarcinoma, RAP2A regola MAP4K4, che porta all'attivazione delle vie di segnalazione di JNK e NF- $\kappa$ B già note per essere associate alla patogenesi della NASH (206).

TGF- $\beta$  è un omodimero che nei mammiferi esiste in tre diverse isoforme (- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3) e tutti i ligandi di TGF- $\beta$  agiscono attraverso gli stessi sistemi di trasduzione del segnale. È stato ampiamente dimostrato che, nel fegato, la trasduzione del segnale di TGF- $\beta$  è coinvolta nella fibrogenesi attraverso l'attivazione delle cellule epatiche stellate (HSC). Inoltre, è stato osservato che la via di trasduzione del segnale di TGF- $\beta$  negli epatociti contribuisce alla morte cellulare e all'accumulo di lipidi che promuovono lo sviluppo della NASH (207). Negli esperimenti di validazione mediante *real time* PCR, abbiamo utilizzato dei *primer* in grado di amplificare sia l'RNA messaggero di TGFB2 che il lncRNA TGFB2-OT1 (*TGFB2-Overlapping Transcript 1*), un lncRNA recentemente scoperto derivante dal 3'-UTR di TGFB2. Abbiamo riscontrato che i livelli di TGFB2/TGFB2-OT1 erano aumentati nei campioni di siero di pazienti con un NAS score  $\geq 5$  e fibrosi F = 3-4. Diversi studi hanno evidenziato il ruolo di TGFB2-OT1 nella regolazione di *pathway* associate all'autofagia, all'apoptosi, all'infiammazione ed alla fibrosi, tutte note per

essere coinvolte nella progressione della NAFLD (208). Nelle cellule endoteliali vascolari, è stato dimostrato che TGFB2-OT1 è coinvolto nella regolazione negativa dell'apoptosi e nella regolazione positiva dell'autofagia e dell'infiammazione (184, 209). Long Tu *et al.* hanno riportato l'*up*-regolazione di TGFB2-OT1 nei fibroblasti derivati da cicatrici ipertrofiche, suggerendo il suo coinvolgimento nell'eccessiva proliferazione dei fibroblasti e nell'accumulo di matrice extracellulare (210). Il ruolo pro-fibrogenico e/o la maggiore espressione genica o proteica di TGFB2 è stato evidenziato nella fibrosi renale, nella fibrosi cardiaca e nella fibrosi epatica (211).

Diversi studi hanno riportato il coinvolgimento di BNIP3L nella regolazione delle *pathway* associate alla patogenesi della NASH, in particolare all'apoptosi, alla necrosi, all'autofagia ed alla fibrosi. Diversi studi hanno supportato il coinvolgimento di BNIP3L nell'apoptosi e nella necrosi dei cardiomiociti in malattie cardiache (212). L'incremento dell'espressione genica e proteica di BNIP3L HIF1b-dipendente è stato riportato in epatociti primari trattati con etanolo e in modelli murini di danno epatico e di steatosi indotti da alcol (213). Sebbene questi dati supportino la potenziale attivazione di questa *pathway* nella steatosi epatica, non abbiamo osservato la sua attivazione nelle biopsie epatiche e nei modelli *in vitro* a livello intracellulare. Per quanto riguarda il ruolo pro-fibrogenico di BNIP3L, Weili Liu *et al.* hanno osservato che l'espressione di BNIP3L aumenta nella fibrosi cardiaca (185).

## 6. PROSPETTIVE FUTURE

Il nostro studio ha portato all'identificazione di un *set* di *coding* e di *non-coding* RNA (UBE2V1, BNIP3L, RP11-128N14.5, TGFB2/TGFB2-OT1 e sherveebu) differenzialmente espressi nel siero di pazienti con NAFLD, nelle biopsie epatiche e nelle cellule HepG2 esposte ad una miscela di oleato e palmitato o solo palmitato (modello cellulare di NAFL/NASH) sia a livello intracellulare che extracellulare.

I dati sui trascritti che sono stati trovati differenzialmente espressi nel nostro studio e che sono stati validati in *real time* PCR, dovrebbero essere ulteriormente analizzati in coorti di pazienti più grandi con una stratificazione più definita in base al NAS *score* (NAS  $\leq 3$  rispetto a NAS  $\geq 5$ ). Gli RNA sierici dovrebbero essere analizzati in modelli animali *in vivo* in cui i fattori (genetici e ambientali) che possono influenzare il trascrittoma sono ridotti al minimo. I nostri dati, e quelli che saranno ottenuti mediante questi esperimenti futuri, potrebbero fornire le basi per l'identificazione di nuovi biomarcatori come alternative future alla biopsia epatica.

La deregolazione dei livelli di espressione dei trascritti che abbiamo osservato nelle biopsie epatiche di 12 soggetti (4 CTRL, 4 *mild* NAFLD, 4 *severe* NAFLD), dovrebbe essere validata in biopsie epatiche ottenute da coorti di pazienti più ampie. Inoltre, il potenziale coinvolgimento dei trascritti identificati, ed in particolare dei *non-coding* RNA, nelle *pathway* di progressione da NAFL a NASH dovrebbe essere dimostrato mediante

esperimenti funzionali *in vitro* di induzione dell'espressione o di inibizione transiente. Questi ulteriori esperimenti a livello tissutale e nei modelli *in vitro* potrebbero contribuire ad ampliare ed a migliorare le conoscenze sui meccanismi molecolari associati alla fisiopatologia della NAFLD.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Nowak R. Mining treasures from 'junk DNA'. *Science*. 1994;263(5147):608-10.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
3. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
4. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(49):19428-33.
5. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Human molecular genetics*. 2014;23(22):5866-78.
6. Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, Condorelli AG, Battaglia R, Tamburello L, et al. Non-coding landscapes of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(41):11709-39.
7. Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447(7146):799-816.
8. . *Human molecular genetics*. 2006;15:Review Issue 1 R17–R29
9. Jacquier A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(12):833-44.
10. Shabalina SA, Spiridonov NA. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome biology*. 2004;5(4):105.
11. Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(11):699-712.
12. Szymanski M, Barciszewski J. Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome biology*. 2002;3(5):reviews0005.
13. Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(6):423-37.
14. Nam JW, Choi SW, You BH. Incredible RNA: Dual Functions of Coding and Noncoding. *Molecules and cells*. 2016;39(5):367-74.
15. Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome biology*. 2017;18(1):206.
16. Dhanoa JK, Sethi RS, Verma R, Arora JS, Mukhopadhyay CS. Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. *Journal of animal science and technology*. 2018;60:25.

17. Bar C, Chatterjee S, Thum T. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy. *Circulation*. 2016;134(19):1484-99.
18. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*. 2012;22(9):1775-89.
19. Luan A, Paik KJ, Li J, Zielins ER, Atashroo DA, Spencley A, et al. RNA Sequencing for Identification of Differentially Expressed Noncoding Transcripts during Adipogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2015;136(4):752-63.
20. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends in cell biology*. 2011;21(6):354-61.
21. Clark MB, Mattick JS. Long noncoding RNAs in cell biology. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(4):366-76.
22. Salviano-Silva A, Lobo-Alves SC, Almeida RC, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Besides Pathology: Long Non-Coding RNA in Cell and Tissue Homeostasis. *Non-coding RNA*. 2018;4(1).
23. Szell M, Danis J, Bata-Csorgo Z, Kemeny L. PRINS, a primate-specific long non-coding RNA, plays a role in the keratinocyte stress response and psoriasis pathogenesis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2016;468(6):935-43.
24. Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, Hacisuleyman E, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(9):3387-92.
25. Chen G, Yu D, Nian X, Liu J, Koenig RJ, Xu B, et al. LncRNA SRA promotes hepatic steatosis through repressing the expression of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Scientific reports*. 2016;6:35531.
26. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews Genetics*. 2016;17(1):47-62.
27. [www.ildiabeteonline.it/wp-content/uploads/2018/05/Medicina Traslazionale](http://www.ildiabeteonline.it/wp-content/uploads/2018/05/Medicina-Traslazionale).
28. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell*. 2010;38(5):662-74.
29. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-23.
30. Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature*. 2007;445(7128):666-70.
31. Boon RA, Jae N, Holdt L, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67(10):1214-26.
32. Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(9):637-43.

33. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*. 2011;470(7333):284-8.
34. Villegas VE, Zaphiropoulos PG. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):3251-66.
35. Engreitz JM, Ollikainen N, Guttman M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(12):756-70.
36. Paraskevopoulou MD, Hatzigeorgiou AG. Analyzing MiRNA-LncRNA Interactions. *Methods in molecular biology*. 2016;1402:271-86.
37. Hoyumpa AM, Jr., Greene HL, Dunn GD, Schenker S. Fatty liver: biochemical and clinical considerations. *The American journal of digestive diseases*. 1975;20(12):1142-70.
38. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
39. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37(5):1202-19.
40. Demir M, Lang S, Steffen HM. Nonalcoholic fatty liver disease - current status and future directions. *Journal of digestive diseases*. 2015;16(10):541-57.
41. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in liver disease*. 2015;35(3):221-35.
42. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2011;9(6):524-30 e1; quiz e60.
43. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
44. Spengler EK, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clinic proceedings*. 2015;90(9):1233-46.
45. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2018;15(1):11-20.
46. Marchesini G, Marzocchi R. Metabolic syndrome and NASH. *Clinics in liver disease*. 2007;11(1):105-17, ix.
47. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *Journal of hepatology*. 2015;62(5):1148-55.

48. Hanson A, Wilhelmsen D, DiStefano JK. The Role of Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in the Development and Progression of Fibrosis Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Non-coding RNA*. 2018;4(3).
49. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-31.
50. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(4):643-54 e1-9; quiz e39-40.
51. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012;10(12):1342-59 e2.
52. Banini BA, Sanyal AJ. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Pathogenesis, Natural History, Diagnosis, and Current Treatment Options. *Clinical medicine insights Therapeutics*. 2016;8:75-84.
53. Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(23):7392-402.
54. Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, Kechagias S, Stal P, Bedossa P, et al. SAF score and mortality in NAFLD after up to 41 years of follow-up. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2017;52(1):87-91.
55. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
56. Rastogi A, Shasthry SM, Agarwal A, Bihari C, Jain P, Jindal A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease - histological scoring systems: a large cohort single-center, evaluation study. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2017;125(11):962-73.
57. Alkhouri N, Carter-Kent C, Feldstein AE. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2011;5(2):201-12.
58. 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(4):1072-8.
59. Feldstein AE, Alkhouri N, De Vito R, Alisi A, Lopez R, Nobili V. Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children. *The American journal of gastroenterology*. 2013;108(9):1526-31.
60. 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(11):1249-54.

61. 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. *Journal of hepatology*. 2012;56(6):1363-70.

62. 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. *Journal of hepatology*. 2014;60(1):167-74.

63. Aida Y, Abe H, Tomita Y, Nagano T, Seki N, Sugita T, et al. Serum cytokeratin 18 fragment level as a noninvasive biomarker for non-alcoholic fatty liver disease. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(11):4191-8.

64. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2002;16(5):663-78.

65. Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;287(5):G1070-7.

66. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(8):1497-502.

67. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *The American journal of gastroenterology*. 2005;100(4):850-5.

68. Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, et al. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(1):39-45.

69. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2008;103(6):1372-9.

70. Fitzpatrick E, Dhawan A. Noninvasive biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease: current status and a glimpse of the future. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(31):10851-63.

71. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001;121(1):91-100.

72. Alkhoury N, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet? *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1087-95.

73. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Messous D, Munteanu M, Imbert-Bismut F, et al. Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholo steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC gastroenterology*. 2006;6:34.

74. Dongiovanni P, Valenti L. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1026-37.
75. Hyysalo J, Mannisto VT, Zhou Y, Arola J, Karja V, Leivonen M, et al. A population-based study on the prevalence of NASH using scores validated against liver histology. *Journal of hepatology*. 2014;60(4):839-46.
76. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30(6):1356-62.
77. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*. 2000;118(6):1117-23.
78. Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology*. 2010;51(2):373-5.
79. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2010;59(9):1265-9.
80. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2009;7(10):1104-12.
81. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*. 2007;46(1):32-6.
82. Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, Wang Q, Jiang XJ, Zhan SH, et al. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. *Hepatology*. 2011;53(3):726-36.
83. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Annals of internal medicine*. 2013;158(11):807-20.
84. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.
85. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of medicine*. 2011;43(8):617-49.
86. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008;47(2):455-60.
87. Parkes J, Roderick P, Harris S, Day C, Mutimer D, Collier J, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut*. 2010;59(9):1245-51.
88. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-

- FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC gastroenterology*. 2006;6:6.
89. Wilder J, Patel K. The clinical utility of FibroScan((R)) as a noninvasive diagnostic test for liver disease. *Medical devices*. 2014;7:107-14.
  90. Bonder A, Tapper EB, Afdhal NH. Contemporary assessment of hepatic fibrosis. *Clinics in liver disease*. 2015;19(1):123-34.
  91. European Association for Study of L, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del H. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of hepatology*. 2015;63(1):237-64.
  92. Ebinuma H, Saito H, Komuta M, Ojio K, Wakabayashi K, Usui S, et al. Evaluation of liver fibrosis by transient elastography using acoustic radiation force impulse: comparison with Fibrosan((R)). *Journal of gastroenterology*. 2011;46(10):1238-48.
  93. Friedrich-Rust M, Roman D, Vermehren J, Kriener S, Sadet D, Herrmann E, et al. Acoustic radiation force impulse-imaging and transient elastography for non-invasive assessment of liver fibrosis and steatosis in NAFLD. *European journal of radiology*. 2012;81(3):e325-31.
  94. Venkatesh SK, Wang G, Teo LL, Ang BW. Magnetic resonance elastography of liver in healthy Asians: normal liver stiffness quantification and reproducibility assessment. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2014;39(1):1-8.
  95. Lee Y, Lee JM, Lee JE, Lee KB, Lee ES, Yoon JH, et al. MR elastography for noninvasive assessment of hepatic fibrosis: reproducibility of the examination and reproducibility and repeatability of the liver stiffness value measurement. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2014;39(2):326-31.
  96. Serai SD, Obuchowski NA, Venkatesh SK, Sirlin CB, Miller FH, Ashton E, et al. Repeatability of MR Elastography of Liver: A Meta-Analysis. *Radiology*. 2017;285(1):92-100.
  97. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2010;103(2):71-83.
  98. Papandreou D, Rousso I, Mavromichalis I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. *Clinical nutrition*. 2007;26(4):409-15.
  99. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.
  100. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1038-48.
  101. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(2):147-52.
  102. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(3):829-38.
  103. Moon YA. The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. *Endocrinology and metabolism*. 2017;32(1):6-10.

104. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004;86(11):839-48.
105. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 1999;31(3):430-4.
106. 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(4):999-1007.
107. 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(5):1184-93.
108. 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(10):20704-28.
109. Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59(4):1393-405.
110. Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World journal of hepatology*. 2015;7(19):2184-8.
111. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(2):785-97.
112. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(3):577-94 e1.
113. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of hepatology*. 2014;60(5):1090-6.
114. Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang FS. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cellular & molecular immunology*. 2014;11(3):224-31.
115. Ibusuki R, Uto H, Arima S, Mawatari S, Setoguchi Y, Iwashita Y, et al. Transgenic expression of human neutrophil peptide-1 enhances hepatic fibrosis in mice fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2013;33(10):1549-56.
116. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology international*. 2013;7 Suppl 2:771-81.
117. Idrissova L, Malhi H, Werneburg NW, LeBrasseur NK, Bronk SF, Fingas C, et al. TRAIL receptor deletion in mice suppresses the inflammation of nutrient excess. *Journal of hepatology*. 2015;62(5):1156-63.
118. Lu M, Lawrence DA, Marsters S, Acosta-Alvear D, Kimmig P, Mendez AS, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*. 2014;345(6192):98-101.
119. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology*. 2011;6:425-56.
120. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):209-18.

121. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):539-48.
122. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *The New England journal of medicine*. 2004;350(16):1646-54.
123. Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *The American journal of medicine*. 1970;49:707-21.
124. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2000;279(2):G245-9.
125. Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2003;8:d69-77.
126. Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *Journal of hepatology*. 1999;31(6):1120-30.
127. Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Current molecular medicine*. 2003;3(6):483-90.
128. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39(2):273-8.
129. Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver*. 2001;21(1):1-12.
130. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of hepatology*. 2002;36(2):200-9.
131. Kelly JD, Haldeman BA, Grant FJ, Murray MJ, Seifert RA, Bowen-Pope DF, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(14):8987-92.
132. Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990;171(3):1122-9.
133. Win KM, Charlotte F, Mallat A, Cherqui D, Martin N, Mavier P, et al. Mitogenic effect of transforming growth factor-beta 1 on human Ito cells in culture: evidence for mediation by endogenous platelet-derived growth factor. *Hepatology*. 1993;18(1):137-45.
134. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2007;56(2):284-92.
135. Breilkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2006;44(1):57-66.
136. Marra F. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1529-32.

137. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology*. 2003;37(3):493-503.
138. Ariel I, Miao HQ, Ji XR, Schneider T, Roll D, de Groot N, et al. Imprinted H19 oncofetal RNA is a candidate tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Molecular pathology : MP*. 1998;51(1):21-5.
139. Braconi C, Kogure T, Valeri N, Huang N, Nuovo G, Costinean S, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer. *Oncogene*. 2011;30(47):4750-6.
140. Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*. 2007;132(1):330-42.
141. Lai MC, Yang Z, Zhou L, Zhu QQ, Xie HY, Zhang F, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Medical oncology*. 2012;29(3):1810-6.
142. Geng YJ, Xie SL, Li Q, Ma J, Wang GY. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *The Journal of international medical research*. 2011;39(6):2119-28.
143. Braconi C, Valeri N, Kogure T, Gasparini P, Huang N, Nuovo GJ, et al. Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(2):786-91.
144. Sun C, Liu X, Yi Z, Xiao X, Yang M, Hu G, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profiles in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *IUBMB life*. 2015;67(11):847-52.
145. Chen Y, Huang H, Xu C, Yu C, Li Y. Long Non-Coding RNA Profiling in a Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Rodent Model: New Insight into Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1).
146. Paschos GK, Ibrahim S, Song WL, Kunieda T, Grant G, Reyes TM, et al. Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nature medicine*. 2012;18(12):1768-77.
147. Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, et al. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PloS one*. 2011;6(9):e25231.
148. Li P, Ruan X, Yang L, Kiesewetter K, Zhao Y, Luo H, et al. A liver-enriched long non-coding RNA, lncLSTR, regulates systemic lipid metabolism in mice. *Cell metabolism*. 2015;21(3):455-67.
149. Zhang M, Chi X, Qu N, Wang C. Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic lipogenesis via Akt/SREBP-1c pathway and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;499(1):66-70.
150. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, et al. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma. *Cell metabolism*. 2010;12(5):509-20.

151. Atanasovska B, Rensen SS, van der Sijde MR, Marsman G, Kumar V, Jonkers I, et al. A liver-specific long noncoding RNA with a role in cell viability is elevated in human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2017;66(3):794-808.
152. Leti F, Legendre C, Still CD, Chu X, Petrick A, Gerhard GS, et al. Altered expression of MALAT1 lncRNA in nonalcoholic steatohepatitis fibrosis regulates CXCL5 in hepatic stellate cells. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2017;190:25-39 e21.
153. Li Z, Wang J, Zeng Q, Hu C, Zhang J, Wang H, et al. Long Noncoding RNA HOTTIP Promotes Mouse Hepatic Stellate Cell Activation via Downregulating miR-148a. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;51(6):2814-28.
154. Wu JC, Luo SZ, Liu T, Lu LG, Xu MY. linc-SCRG1 accelerates liver fibrosis by decreasing RNA-binding protein tristetraprolin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019;33(2):2105-15.
155. Zhang K, Han X, Zhang Z, Zheng L, Hu Z, Yao Q, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGFbeta and Notch pathways. *Nature communications*. 2017;8(1):144.
156. Yu F, Zheng J, Mao Y, Dong P, Li G, Lu Z, et al. Long non-coding RNA APTR promotes the activation of hepatic stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;463(4):679-85.
157. Zheng J, Yu F, Dong P, Wu L, Zhang Y, Hu Y, et al. Long non-coding RNA PVT1 activates hepatic stellate cells through competitively binding microRNA-152. *Oncotarget*. 2016;7(39):62886-97.
158. Bian EB, Wang YY, Yang Y, Wu BM, Xu T, Meng XM, et al. Hotair facilitates hepatic stellate cells activation and fibrogenesis in the liver. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2017;1863(3):674-86.
159. Zhu J, Luo Z, Pan Y, Zheng W, Li W, Zhang Z, et al. H19/miR-148a/USP4 axis facilitates liver fibrosis by enhancing TGF-beta signaling in both hepatic stellate cells and hepatocytes. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(6):9698-710.
160. Yu F, Jiang Z, Chen B, Dong P, Zheng J. NEAT1 accelerates the progression of liver fibrosis via regulation of microRNA-122 and Kruppel-like factor 6. *Journal of molecular medicine*. 2017;95(11):1191-202.
161. Gong Z, Tang J, Xiang T, Lin J, Deng C, Peng Y, et al. Genomewide identification of long noncoding RNAs in CCl4-induced liver fibrosis via RNA sequencing. *Molecular medicine reports*. 2018;18(1):299-307.
162. Yu F, Geng W, Dong P, Huang Z, Zheng J. LncRNA-MEG3 inhibits activation of hepatic stellate cells through SMO protein and miR-212. *Cell death & disease*. 2018;9(10):1014.
163. Zhou B, Yuan W, Li X. LncRNA Gm5091 alleviates alcoholic hepatic fibrosis by sponging miR-27b/23b/24 in mice. *Cell biology international*. 2018;42(10):1330-9.

164. Zheng J, Dong P, Mao Y, Chen S, Wu X, Li G, et al. lincRNA-p21 inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis via p21. *The FEBS journal*. 2015;282(24):4810-21.
165. Carter G, Miladinovic B, Patel AA, Deland L, Mastorides S, Patel NA. Circulating long noncoding RNA GAS5 levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus. *BBA clinical*. 2015;4:102-7.
166. Sun J, Ruan Y, Wang M, Chen R, Yu N, Sun L, et al. Differentially expressed circulating LncRNAs and mRNA identified by microarray analysis in obese patients. *Scientific reports*. 2016;6:35421.
167. Hackl M, Heilmeyer U, Weilner S, Grillari J. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases - Complex signatures for multifactorial diseases? *Molecular and cellular endocrinology*. 2016;432:83-95.
168. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(28):8527-40.
169. Xi X, Li T, Huang Y, Sun J, Zhu Y, Yang Y, et al. RNA Biomarkers: Frontier of Precision Medicine for Cancer. *Non-coding RNA*. 2017;3(1).
170. Shi T, Gao G, Cao Y. Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Disease markers*. 2016;2016:9085195.
171. Sumida Y, Nakajima A, Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(2):475-85.
172. DiStefano JK. Long noncoding RNAs in the initiation, progression, and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Non-coding RNA research*. 2017;2(3-4):129-36.
173. Yang Z, Ross RA, Zhao S, Tu W, Liangpunsakul S, Wang L. LncRNA AK054921 and AK128652 are potential serum biomarkers and predictors of patient survival with alcoholic cirrhosis. *Hepatology communications*. 2017;1(6):513-23.
174. Toraih EA, Ellawindy A, Fala SY, Al Ageeli E, Gouda NS, Fawzy MS, et al. Oncogenic long noncoding RNA MALAT1 and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;102:653-69.
175. Tang J, Jiang R, Deng L, Zhang X, Wang K, Sun B. Circulation long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4505-15.
176. Fu N, Niu X, Wang Y, Du H, Wang B, Du J, et al. Role of LncRNA-activated by transforming growth factor beta in the progression of hepatitis C virus-related liver fibrosis. *Discovery medicine*. 2016;22(119):29-42.
177. Yu F, Zhou G, Huang K, Fan X, Li G, Chen B, et al. Serum lincRNA-p21 as a potential biomarker of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients. *Journal of viral hepatitis*. 2017;24(7):580-8.
178. Younes R, Rosso C, Petta S, Cucco M, Marietti M, Caviglia GP, et al. Usefulness of the index of NASH - ION for the diagnosis of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver: An external validation study. *Liver*

international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2018;38(4):715-23.

179. Petta S, Wong VW, Camma C, Hiriart JB, Wong GL, Marra F, et al. Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values. *Hepatology*. 2017;65(4):1145-55.

180. Di Mauro S, Ragusa M, Urbano F, Filippello A, Di Pino A, Scamporrino A, et al. Intracellular and extracellular miRNome deregulation in cellular models of NAFLD or NASH: Clinical implications. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2016;26(12):1129-39.

181. Vallelunga 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. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:156.

182. Liu W, Baker SS, Baker RD, Nowak NJ, Zhu L. Upregulation of hemoglobin expression by oxidative stress in hepatocytes and its implication in nonalcoholic steatohepatitis. *PloS one*. 2011;6(9):e24363.

183. Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of pathology*. 2007;170(3):967-80.

184. Huang S, Lu W, Ge D, Meng N, Li Y, Su L, et al. A new microRNA signal pathway regulated by long noncoding RNA TGFB2-OT1 in autophagy and inflammation of vascular endothelial cells. *Autophagy*. 2015;11(12):2172-83.

185. Liu W, Wang X, Mei Z, Gong J, Huang L, Gao X, et al. BNIP3L promotes cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts through [Ca(2+)]<sub>i</sub>-TGF-beta-Smad2/3 pathway. *Scientific reports*. 2017;7(1):1906.

186. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB. BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 1:S114-27.

187. Dropmann A, Dediulia T, Breitkopf-Heinlein K, Korhonen H, Janicot M, Weber SN, et al. TGF-beta1 and TGF-beta2 abundance in liver diseases of mice and men. *Oncotarget*. 2016;7(15):19499-518.

188. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical journal*. 2008;412(2):179-90.

189. MANDEL P MP. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948.

190. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical chemistry*. 2002;48(10):1647-53.

191. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clinical chemistry*. 2001;47(8):1488-9.

192. 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(8):613-20.

193. Wetmore BA, Brees DJ, Singh R, Watkins PB, Andersen ME, Loy J, et al. Quantitative analyses and transcriptomic profiling of circulating messenger RNAs as biomarkers of rat liver injury. *Hepatology*. 2010;51(6):2127-39.
194. Yuan T, Huang X, Woodcock M, Du M, Dittmar R, Wang Y, et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Scientific reports*. 2016;6:19413.
195. Quesenberry PJ, Aliotta J, Deregibus MC, Camussi G. Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. *Stem cell research & therapy*. 2015;6:153.
196. Miyamoto M, Yanai M, Ookubo S, Awasaki N, Takami K, Imai R. Detection of cell-free, liver-specific mRNAs in peripheral blood from rats with hepatotoxicity: a potential toxicological biomarker for safety evaluation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;106(2):538-45.
197. Zhang X, Zhang Z, Dai F, Shi B, Chen L, Zhang X, et al. Comparison of circulating, hepatocyte specific messenger RNA and microRNA as biomarkers for chronic hepatitis B and C. *PloS one*. 2014;9(3):e92112.
198. Chan RW, Wong J, Chan HL, Mok TS, Lo WY, Lee V, et al. Aberrant concentrations of liver-derived plasma albumin mRNA in liver pathologies. *Clinical chemistry*. 2010;56(1):82-9.
199. Bao H, Su H. Long Noncoding RNAs Act as Novel Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma: Progress and Prospects. *BioMed research international*. 2017;2017:6049480.
200. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-biological interactions*. 2007;165(2):106-16.
201. Akyuz U, Yesil A, Yilmaz Y. Characterization of lean patients with nonalcoholic fatty liver disease: potential role of high hemoglobin levels. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015;50(3):341-6.
202. Trak-Smayra V, Dargere D, Noun R, Albuquerque M, Yaghi C, Gannage-Yared MH, et al. Serum proteomic profiling of obese patients: correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. *Gut*. 2009;58(6):825-32.
203. Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *Journal of lipid research*. 2004;45(10):1846-51.
204. Urbano F, Bugliani M, Filippello A, Scamporrino A, Di Mauro S, Di Pino A, et al. Atorvastatin but Not Pravastatin Impairs Mitochondrial Function in Human Pancreatic Islets and Rat beta-Cells. Direct Effect of Oxidative Stress. *Scientific reports*. 2017;7(1):11863.
205. Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut and liver*. 2012;6(2):149-71.
206. . *International journal of clinical and experimental pathology*. 2017;ISSN:1936-2625.
207. Yang L, Roh YS, Song J, Zhang B, Liu C, Loomba R, et al. Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in

- steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology*. 2014;59(2):483-95.
208. Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, et al. TGF-beta signalling and liver disease. *The FEBS journal*. 2016;283(12):2219-32.
209. Ma H, Su L, Zhang S, Kung H, Miao J. Inhibition of ANXA7 GTPase activity by a small molecule promotes HMBOX1 translation of vascular endothelial cells in vitro and in vivo. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2016;79:33-40.
210. Tu L, Huang Q, Fu S, Liu D. Aberrantly expressed long noncoding RNAs in hypertrophic scar fibroblasts in vitro: A microarray study. *International journal of molecular medicine*. 2018;41(4):1917-30.
211. Pohlers D, Brenmoehl J, Loffler I, Muller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1792(8):746-56.
212. Diwan A, Wansapura J, Syed FM, Matkovich SJ, Lorenz JN, Dorn GW, 2nd. Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation. *Circulation*. 2008;117(3):396-404.
213. Ni HM, Bhakta A, Wang S, Li Z, Manley S, Huang H, et al. Role of hypoxia inducing factor-1beta in alcohol-induced autophagy, steatosis and liver injury in mice. *PloS one*. 2014;9(12):e115849.