

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA Curriculum - SCIENZE DELLA NUTRIZIONE

IL FATTORE NEUROTROFICO CILIARE: AZIONE SU ORGANI PERIFERICI E CARATTERIZZAZIONE DELLE VIE DI TRASDUZIONE ATTIVATE IN SPECIFICI TIPI CELLULARI.

THE CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR: ACTION ON PERIPHERAL ORGANS AND CHARACTERIZATION OF THE TRANSDUCTION PATHWAYS ACTIVATED IN SPECIFIC CELL TYPES.

Tesi di Laurea Magistrale di:

Chiara Galli

Relatrice:

Dott.ssa Ilenia Severi

Correlatore:

Prof. Antonio Giordano

Sessione Estiva

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

1.	Riassunto			
2.	Introduzione			
	2.1 Il fattore neurotrofico ciliare (CNTF)	1		
	2.2 Il CNTF: una citochina della famiglia dell'Interleuchina-6 (IL-6)	2		
	2.3 I meccanismi di trasduzione del segnale impiegati dal CNTF	4		
	ed altre citochine della famiglia IL-6.			
	2.4 Espressione del CNTF e del CNTFRα	9		
	2.5 Il CNTF regola il bilancio energetico nel sistema nervoso centrale	11		
	2.6 IL CNTF e il bilancio energetico: effetto sui tessuti periferici	14		
	2.6.1 Tessuto adiposo	14		
	2.6.2 Muscolo scheletrico	16		
	2.6.3 Fegato e pancreas	17		
3.	Scopo della tesi	18		
4.	Materiali e metodi	19		
	4.1 Animali e condizioni sperimentali	19		
	4.2 Processamento dei tessuti	20		
	4.3 Immunoistochimica	21		
	4.4 Anticorpi primari	23		
5.	Risultati	24		
	5.1 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	24		
	5.1.1 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	24		
	nel tessuto adiposo			
	5.1.2 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	28		
	nel muscolo scheletrico e cardiaco			

	5.1.3 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	29	
	nel tratto digerente		
	5.1.4 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	31	
	nelle ghiandole salivari maggiori		
	5.1.5 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	33	
	nel fegato e nel pancreas		
	5.1.6 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	35	
	negli organi linfatici		
	5.1.7 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	40	
	nei bronchi extra-polmonari e nel polmone		
	5.1.8 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3	42	
	negli organi uro-genitali		
	5.2 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK (ERK1/2)	48	
	5.2.1 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK	48	
	nel tessuto adiposo		
	5.2.2 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK	51	
	nel muscolo cardiaco, ma non nel muscolo scheletrico		
	5.2.3 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK	52	
	nel fegato		
	5.2.4 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/42 MAPK	53	
	nella milza		
	5.2.5 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK	55	
	negli organi uro-genitali		
6.	Discussione	58	
7. Conclusioni			
8.	8. Bibliografia		

1. Riassunto

Il fattore neurotrofico ciliare (CNTF) è una molecola ad azione trofica nel sistema nervoso centrale e periferico, conosciuta anche per un ruolo determinante nella regolazione del bilancio energetico. Avendo un'azione anoressizzante leptino-simile, il CNTF è verosimilmente un nuovo fattore di sazietà e potrebbe rappresentare una possibile strategia terapeutica per l'obesità e le patologie ad essa correlate. Il suo ruolo nel metabolismo non è confinato al sistema nervoso centrale, ma coinvolge numerosi organi periferici, come confermato soprattutto da esperimenti *in vitro*. Una mappatura dettagliata degli organi che rispondono alla somministrazione di CNTF in vivo non è ad oggi ancora descritta in letteratura e viene proposta in questo progetto di tesi. Il CNTF infatti agisce su molteplici organi periferici, attivando il pathway JAK-STAT3 e p44/p42 MAPK anche in organi non coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico, indicando come questa molecola possa essere coinvolta in numerosi processi cellulari ad oggi conosciuti solo in parte.

2. Introduzione

2.1 Il fattore neurotrofico ciliare (CNTF).

Il fattore neurotrofico ciliare (CNTF) è una citochina isolata per la prima volta nel ganglio ciliare di pollo e riconosciuta come fattore di crescita in grado di promuovere la sopravvivenza dei neuroni parasimpatici (Adler et al. 1979). Questo fattore neurotrofico svolge infatti un'azione neuroprotettiva sia nel sistema nervoso centrale che periferico, promuovendo la differenziazione e la sopravvivenza dei neuroni sensoriali, parasimpatici e motori (Pasquin, Sharma, and Gauchat 2015). E' espresso in cellule gliali del sistema nervoso centrale (principalmente da astrociti della sostanza bianca) e del sistema nervoso periferico (da cellule di Schwann nei nervi periferici) (Sendtner et al. 1992; Stockli et al. 1991; Dallner et al. 2002). Il suo effetto sui motoneuroni ha incrementato l'interesse scientifico per questa molecola come possibile bersaglio terapeutico per malattie neurodegenerative come la malattia di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (Bachoud-Levi et al. 2000; Bezdjian et al. 2016; Miller, Petajan, et al. 1996). Proprio in uno studio sull'effetto del CNTF su pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (Axokine, molecola ricombinante) si è osservato un calo ponderale di peso dose dipendente, (Miller, Petajan, et al. 1996; Matthews and Febbraio 2008) che ha condotto numerosi gruppi di ricerca a studiare il possibile effetto di questa molecola nel metabolismo e nel controllo del bilancio energetico (Miller, Petajan, et al. 1996). Gli effetti del CNTF sul controllo del peso e dell'assunzione di cibo e sull'omeostasi dei livelli di glucosio e insulina, hanno introdotto questa molecola tra i possibili target farmacologici per la cura di una patologia di interesse mondiale, definita pandemica dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS): l'obesità.

2.2 Il CNTF: una citochina della famiglia dell'Interleuchina-6 (IL-6).

Il CNTF è una citochina di 200 amminoacidi, 23kDa di peso molecolare, appartenente alla famiglia dell'interleuchina-6, un gruppo di citochine che condividono tra loro analogie strutturali e funzionali (Kang et al. 2020). La famiglia comprende IL-6, IL-11, il fattore neurotrofico ciliare (CNTF), il fattore inibitorio della leucemia (LIF), l'oncostatina M (OSM), la cardiotrofina 1 (CT-1), la citochina "cardiotrophin-like" (CLC) e IL-27. Queste molecole possiedono una struttura elicoidale simile costituita da quattro α -eliche antiparallele e condividono la glicoproteina gp130 come subunità del recettore nelle membrane cellulari a cui esse si legano per mediare la cascata di segnali intracellulari (Kang et al. 2020; Rose-John 2018). La condivisione di una subunità nel complesso recettoriale e quindi dei meccanismi di trasduzione del segnale, implica che queste citochine abbiano anche delle proprietà funzionali ridondanti (Murakami, Kamimura, and Hirano 2019). Queste molecole inoltre mostrano una caratteristica tipica delle citochine che è il pleiotropismo, ovvero la capacità di agire su numerose cellule target (Heinrich et al. 1998) e, per tale ragione, sono coinvolte in numerose attività biologiche come la modulazione della risposta immunitaria e dei processi infiammatori, la regolazione del metabolismo, l'ematopoiesi e lo sviluppo del sistema cardiovascolare e nervoso (Murakami, Kamimura, and Hirano 2019; Jones and Jenkins 2018; Heinrich et al. 1998).

Nonostante le citochine della famiglia IL-6 mostrino proprietà comuni, ognuna di esse è specializzata anche in funzioni peculiari e riconosciuta da determinati tipi cellulari. Questo è dovuto al fatto che ogni molecola della famiglia è caratterizzata da un determinato profilo di assemblamento di diverse subunità recettoriali sulla membrana plasmatica, che comprende in tutti i casi gp130 (Heinrich et al. 2003) (Fig. 1). Quest'ultima è infatti espressa in tutte le cellule del nostro organismo, ma alcune citochine come IL-6, IL-11 e CNTF riescono ad interagire con essa solo dopo essersi legate ad un α -recettore definito "nonsignaling", la cui espressione cellulare è più ristretta e regolata rispetto a quella di gp130 (Heinrich et al. 1998; Heinrich et al. 2003; Rose-John 2018).

Il CNTF si lega ad un complesso recettoriale costituito da tre subunità (CNTFR): il recettore α (CNTFR α) che costituisce il sito di legame specifico per il ligando, la subunità gp130 e il recettore LIF beta (LIFR β). Il CNTF si

lega inizialmente alla subunità CNTFR α , ancorata alla membrana attraverso un glicosilfosfatidilinositolo. Il complesso CNTF-CNTFR α si lega a gp130 e recluta LIFR β , innescando l'eterodimerizzazione di gp130 e LIFR β , dando luogo al complesso recettoriale attivo e alla modulazione della trascrizione genica.



Figura 1 - Recettori delle citochine della famiglia IL-6. Ogni citochina della famiglia IL-6 (rappresentate come cerchi in grigio scuro) lega una diversa combinazione di subunità recettoriali; la subunità gp130 (rosa scuro) è presente in tutti i complessi o sottoforma di omodimero (IL-6, IL-11) o di eterodimero (LIF, CT-1, CNTF, OSM). Il recettore α (grigio chiaro) è presente nelle citochine IL-6, IL-11, CT-1 e CNTF (Heinrich et al. 1998).

2.3 I meccanismi di trasduzione del segnale impiegati dal CNTF ed altre citochine della famiglia IL-6.

Il CNTF utilizza il recettore di membrana con la subunità gp130 per mediare l'attivazione della chinasi "Janus" (JAK1/JAK2) appartenenti alla famiglia delle tirosina-chinasi e dei fattori di trascrizione della famiglia "trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione" (STAT) (Heinrich et al. 1998). Nei mammiferi sono stati descritti sette membri della famiglia STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a e STAT5b, e STAT6. Il CNTF è in grado di attivare principalmente STAT3, STAT5 e STAT1 (Severi et al. 2015). Le proteine STAT a seguito della fosforilazione (P-STAT) dalle chinasi Janus, vengono traslocate nel nucleo dove interagiscono con specifici elementi di DNA (siti di riconoscimento), situati a monte dei geni target, coinvolti nella regolazione di molteplici processi cellulari come il differenziamento, la sopravvivenza, la proliferazione, la regolazione immunitaria, l'angiogenesi e il metabolismo (Jones and Jenkins 2018). Il CNTF è in grado di attivare ulteriori signaling intracellulari come la cascata delle "Mitogen-activated" proteine chinasi (MAPK). CNTF può attivare la via MAPK (ERK) tramite delle proteine contenenti domini SH2, tra cui SHP2 e Shc, che sono legate alle subunità gp130 e LIFR del complesso del recettore del CNTF (Heinrich et al. 2003; Heinrich et al. 1998; Kang et al. 2020; Giordano et al. 1997). In particolare, tra le varie proteine MAPK, il CNTF in molti casi porta all'attivazione di p44/p42 MAPK anche denominate "chinasi regolate da segnali extracellulari" (ERK1/ERK2) (Askvig and Watt 2015; Chen et al. 2005; Zvonic et al. 2003; Raju et al. 2006). Le MAPK chinasi partecipano non solo a numerosi eventi cellulari come la proliferazione e differenziazione cellulare, ma anche alla regolazione di processi metabolici (Roskoski 2012; Longuet et al. 2005).

Il meccanismo mediante il quale il CNTF e altre citochine della famiglia IL-6 interagiscono con gp130 legato alla membrana cellulare e mediano l'assemblamento del recettore e l'attivazione di diversi signaling intracellulari, viene definito "classic-signaling" (Rose-John et al. 2007). Oltre a questo meccanismo classico, diversi membri della famiglia IL-6 impiegano una modalità alternativa di attivazione di gp130, denominata trans-signaling (Jones and Jenkins 2018; Rose-John et al. 2007) (Fig. 2). Questo meccanismo è stato studiato la prima volta per IL-6 e si svolge mediante una forma solubile del suo recettore (s-IL-6R). Questo recettore alternativo si può formare attraverso due processi principali: il taglio del recettore di membrana da parte di alcune metalloproteasi oppure lo splicing alternativo dell'm-RNA del recettore di IL-6 (IL-6R) che conduce alla traduzione di una proteina priva dei domini citosolico e trans-membrana (Mullberg et al. 1993; Lust et al. 1992). IL-6 è in grado di legarsi a s-IL-6R con la stessa affinità con cui si lega al suo recettore di membrana (IL-6R). A differenza del signaling classico mediato da IL-6R, il complesso formato da IL-6 e il suo recettore solubile può interagire direttamente con la subunità gp130 espressa sulla membrana cellulare di tutte le cellule del corpo (Jones and Jenkins 2018). Inoltre il recettore solubile agisce

come agonista nei confronti della citochina (Scheller et al. 2011). Queste premesse implicano che s-IL-6R agisce su tutte le cellule che esprimono gp130 e attiva il signaling mediato da IL-6 amplificandolo anche in quelle cellule che diversamente non interagiscono con la citochina poiché prive del recettore di membrana IL-6R.



Figura 2 - Meccanismi di trasduzione del segnale mediati da IL-6 (Rose-John et al. 2012).

Lo studio del trans-signaling mediato da IL-6 ha portato alla luce ulteriori molecole appartenenti alla stessa famiglia di citochine, in grado di partecipare al medesimo processo. In particolare, il CNTF può legarsi ad una forma solubile del suo recettore, derivante dal taglio mediato dalla Fosfolipasi C del glicosilfosfatidilinositolo che lega il recettore alla membrana cellulare (Davis et al. 1993). Questo processo è stato confermato da esperimenti basati sull'espressione in cellule COS-7 (cellule renali di scimmia) di una proteina ricombinante di fusione chiamata Hyper-CNTF, derivante dalla fusione del CNTF umano e del recettore solubile umano (s-CNTFR), in grado di attivare la fosforilazione di STAT3 e MAPK in tutte le cellule che esprimevano gp130 e LIFR ma non in quelle che esprimevano CNTFR (Marz et al. 2002). Lo stesso risultato è stato ottenuto usando il CNTF ricombinante di ratto (Monville et al. 2001).

Un ulteriore meccanismo alternativo di interazione con il recettore è stato descritto per il CNTF umano. Quest'ultimo non può mediare direttamente l'eterodimerizzazione di gp130 e LIFR, poiché non può agire in assenza di un α -recettore, ma può legarsi, seppur con più bassa affinità, al recettore α di IL-6 e mediare la trasduzione del segnale attraverso un complesso recettoriale formato da gp130 e LIFR (Schuster et al. 2003). Questo processo è un esempio di promiscuità del recettore che permette al CNTF di effettuare un cross-talk con il recettore di IL-6 e gli conferisce la capacità di controllare funzioni cellulari ad essa correlate (ad esempio: metabolismo, rimodellamento osseo e regolazione immunitaria) (Jones and Jenkins 2018). Inoltre, il CNTF può usare sia il recettore di membrana che il recettore solubile di IL-6 allargando così ulteriormente lo spettro di cellule target (Schuster et al. 2003).

Il CNTF si dimostra quindi essere una molecola ad elevata plasticità, in grado di sfruttare meccanismi alternativi di interazione con il recettore che gli permettono di ampliare lo spettro di cellule target e amplificare così la sua attività.

2.4 Espressione del CNTF e del CNTFRα.

Nel 1979 il CNTF è stato descritto per la prima volta in grandi quantità nel ganglio ciliare di pollo (Adler et al. 1979); successivamente ne è stata dimostrata la presenza e attività a livello del nervo sciatico di ratto e coniglio (Manthorpe et al. 1986; Lin et al. 1989). Ulteriori studi mediante immunoistochimica su topi e ratti hanno consentito di rilevare una forte espressione di CNTF a livello delle cellule gliali del sistema nervoso centrale e periferico, in particolare negli astrociti della sostanza bianca e nelle cellule di Schwann, che formano la guaina mielinica degli assoni nel sistema nervoso periferico (Stockli et al. 1989). Mentre l'espressione del CNTF in condizioni normali è bassa nelle aree di sostanza grigia del sistema nervoso centrale (SNC), viene significativamente sovra-espresso in risposta a lesioni meccaniche o ischemiche nel sito della lesione, indicando il coinvolgimento del CNTF endogeno nella protezione dei neuroni danneggiati e delle proiezioni assonali (Lee et al. 1997; Dallner et al. 2002). Inoltre, studi sull'espressione del CNTF endogeno hanno evidenziato la presenza di cellule positive al CNTF principalmente lungo il terzo ventricolo encefalico in tutta la sua estensione; queste cellule sono state successivamente tipizzate come taniciti e cellule ependimali (Severi et al. 2012). Recenti studi di immunoistochimica forniscono prove che i taniciti e le cellule ependimali del terzo ventricolo producono CNTF e esprimono il suo recettore funzionale. La stretta relazione spaziale di cellule che producono CNTF e cellule che rispondono a CNTF nello strato ependimale è coerente con la possibilità che l'ependima del topo sia dotato di un meccanismo di produzione del CNTF mediato dal CNTF stesso mediante un'azione autocrina/paracrina, in risposta a stimoli fisiologici o patologici (Severi et al. 2012).

A differenza dell'espressione specifica del ligando, il recettore CNTFRa mostra una espressione più diffusa, a livello dell'ipotalamo, del talamo, del tronco encefalico, della corteccia, del bulbo olfattivo e di altre aree del cervello (Lee, Hofmann, and Kirsch 1997). Il CNTFRa è inoltre espresso a livello dei neuroni nel sistema nervoso in via di sviluppo. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il recettore è espresso anche negli astrociti, indicandole come cellule bersaglio della citochina, oltre che cellule in cui la citochina è altamente espressa (Rudge et al. 1994). L'espressione del recettore CNTFRa inoltre non si limita alle cellule del sistema nervoso, ma si espande anche alle cellule degli organi periferici. In particolare, è stato rilevato nel cuore, nel polmone, nel muscolo scheletrico, nella ghiandola surrenale, nella cute, nel fegato, nel rene e nei testicoli (MacLennan et al. 2000).

2.5 Il CNTF regola il bilancio energetico nel sistema nervoso centrale.

In vivo, il CNTF promuove la sopravvivenza dei motoneuroni spinali nel ratto e, durante lo sviluppo embrionale, nel pollo (Oppenheim et al. 1991; Lee et al. 1996). Utilizzando modelli murini, è stato inoltre possibile dimostrare che il CNTF rallenta la perdita dei motoneuroni, migliora la funzione motoria e prolunga la durata della vita in animali affetti da neuropatia motoria progressiva (Sendtner et al. 1992). Tali effetti hanno indotto la sperimentazione del CNTF come potenziale molecola terapeutica nei confronti della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), patologia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni spinali. Verso la metà degli anni '90, sono stati intrapresi trials clinici basati sulla somministrazione sottocutanea di CNTF ricombinante umano in pazienti affetti da SLA. Sorprendentemente l'azione del CNTF non si correlava ad un miglioramento dei disturbi motori, ma ad una significativa perdita di peso fino ad una condizione di anoressia dei pazienti, associata a perdita di appetito (Miller, Petajan, et al. 1996). Questi risultati hanno sollevato notevole interesse per il possibile ruolo del CNTF nel trattamento dell'obesità e delle malattie ad essa associate: diabete di tipo II, dislipidemia, ipertensione arteriosa, malattie cardio-vascolari e cancro. Per questo scopo, una ditta farmaceutica americana, "Regeneron", ha sintetizzato Axokine, analogo ricombinante del CNTF umano dotato di maggiore effetto e specificità, da utilizzare come farmaco anti-obesità. L'efficacia di questo farmaco è stata testata su pazienti obesi leptino-resistenti, mostrando un'azione sulla riduzione del peso che perdurava fino a due mesi dopo la sospensione del trattamento (Ettinger et al. 2003). I prolungati effetti del CNTF potrebbero essere dovuti alla sua azione di neurogenesi, ovvero di stimolatore della proliferazione neuronale nelle zone ipotalamiche deputate al controllo dell'introito di cibo (Pasquin, Sharma, and Gauchat 2015). La somministrazione di CNTF, o Axokine, ad animali da esperimento comporta in aggiunta alla perdita di peso, un miglioramento dell'iperinsulinemia, iperglicemia e iperlipidemia indicando come questa citochina possa essere efficace anche per il trattamento delle malattie metaboliche correlate all'obesità (Gloaguen et al. 1997). Nonostante le sue potenzialità, gli studi clinici basati sull'utilizzo di Axokine sono stati sospesi a causa dello sviluppo, nel trattamento a lungo termine, di anticorpi contro il farmaco nel 70% dei pazienti obesi (Ettinger et al. 2003).

Molti studi si sono in seguito focalizzati sulla ricerca dei meccanismi con cui il CNTF regola la perdita di peso. Il CNTF funziona a livello ipotalamico come fattore di sazietà agendo con un meccanismo simile alla leptina, un ormone prodotto nel tessuto adiposo ,che agisce come fattore di sazietà legandosi al suo recettore nei nuclei ipotalamici deputati al controllo dell'assuzione di cibo e il bilancio energetico (Friedman 2016). Le prime supposizioni al riguardo, derivarono dall'osservazione di una similarità strutturale del recettore della leptina (OB-R) con il complesso recettoriale del CNTF; questi recettori mostrano anche una simile distribuzione nei nuclei cerebrali coinvolti nella regolazione dell'omeostasi (Tartaglia et al. 1995). Sia la leptina che il CNTF, attivano il fattore di trascrizione STAT3, attraverso la via JAK/STAT ed entrambi agiscono su neuroni localizzati a livello di centri ipotalamici che controllano l'omeostasi energetica, compreso il nucleo arcuato (ARC) (Gloaguen et al. 1997). L'azione anoressigena del CNTF esogeno nei roditori è infatti riconducibile alla riduzione dell'espressione del gene codificante per il neuropeptide Y (NPY) e ad un aumento della trascrizione del gene della proopiomelanocortina (POMC) (Xu et al. 1998). Nonostante il CNTF agisca in modo simile alla leptina, la sua azione è totalmente leptina-indipendente. Infatti, l'iniezione intraperitoneale di CNTF in topi *ob/ob* (mancanti del gene che codifica per la leptina) e db/db (mancanti del gene che codifica per il recettore della leptina), ha portato a una perdita di peso dose-dipendente e ad una diminuzione dell'assunzione di cibo, suggerendo che il CNTF possa agire indipendentemente dalla leptino-resistenza e possa superarne gli effetti (Gloaguen et al. 1997; Xu et al. 1998).

Inoltre, è stato valutato se il CNTF endogeno fosse coinvolto nella regolazione fisiopatologica del bilancio energetico in topi alimentati con una dieta ad alto

13

contenuto lipidico (HFD), in topi *ob/ob* e in topi sottoposti a restrizione calorica (Severi et al. 2013). Nei topi resi obesi da una dieta ricca di grassi, l'espressione di CNTF aumenta significativamente nelle cellule ependimali, cellule che rivestono i ventricoli cerebrali e nei taniciti, un tipo di cellule ependimali presenti nella regione tuberale e mammillare dell'ipotalamo e dotate di lunghi prolungamenti; (Severi et al. 2012) l'espressioni diminuisce invece nei topi tenuti in condizioni di restrizione calorica. Queste variazioni corrispondono a dei cambiamenti nei livelli di espressione del suo recettore, CNTFR α . Questi dati suggeriscono che l'azione del CNTF aumenta nei topi alimentati con dieta grassa e al contrario diminuisce nei topi sottoposti a restrizione calorica (Severi et al. 2013). Invece in animali *ob/ob*, l'espressione sia del CNTF che del suo recettore non risulta alterata, evidenziando come il meccanismo d'azione del CNTF endogeno sia indipendente dalla leptina.

2.6 IL CNTF e il bilancio energetico: effetto sui tessuti periferici.

2.6.1 Tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è formato da due componenti principali, il tessuto adiposo bianco e il tessuto adiposo bruno (Cinti 2018). Gli adipociti bianchi, immagazzinano l'energia proveniente dagli alimenti sotto forma di trigliceridi organizzati in un'unica grande goccia lipidica (adipociti uniloculari); nei momenti di elevato fabbisogno calorico, i trigliceridi vengono idrolizzati e gli acidi grassi risultanti vengono secreti nel flusso sanguigno e forniti ad altri tessuti. Gli adipociti bruni sono il principale tipo di cellule parenchimali presenti nel tessuto adiposo bruno. Sono caratterizzati da più piccole goccioline di trigliceridi (adipociti multiloculari) e contengono numerosi grandi mitocondri, dove la proteina di disaccoppiamento 1 (UCP1) consente l'uso dell'energia derivata dall'ossidazione degli acidi grassi per la generazione di calore (termogenesi senza brividi) (Cannon and Nedergaard 2004).

Data la capacità del CNTF di regolare il peso corporeo, l'effetto di questo fattore sul tessuto adiposo è stato oggetto di numerosi studi sia *in vitro* che *in vivo*. Il CNTF *in vitro* svolge una funzione diretta sugli adipociti del tessuto adiposo bianco. Esperimenti su cellule 3T3-L1 (una linea cellulare immortalizzata di adipociti bianchi di roditore) hanno dimostrato che il peptide stimola la fosforilazione di STAT3 e l'attivazione dose-dipendente di MAPK negli adipociti bianchi in coltura; *in vivo*, la somministrazione di CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel tessuto adiposo epididimale (Zvonic et al. 2003). L'azione del CNTF è stata confermata anche su adipociti umani differenziati da cellule staminali adipose multipotenti umane (hMADS) (Perugini et al. 2019). In queste cellule, il CNTF attiva il pathway JAK-STAT3 e modifica l'espressione di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del tessuto adiposo; in particolare il CNTF inibisce la sintesi lipidica diminuendo

l'espressione dell'enzima "acido grasso sintasi" e del suo principale elemento regolatore SREBP "sterol regulatory element-binding protein" e stimola invece la lipolisi aumentando l'espressione di enzimi deputati alla degradazione degli acidi grassi, come l'enzima carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) (Perugini et al. 2019).

L'azione del CNTF è stata dimostrata anche negli adipociti del tessuto adiposo bruno dove induce l'attivazione di STAT3, MAPK chinasi e Akt, un signaling coinvolto nella regolazione del pathway dell'insulina. Inoltre, il trattamento con CNTF aumenta significativamente l'espressione della proteina UCP1 *in vitro* negli adipociti bruni (Ott et al. 2002).

Tutti questi dati testimoniano un'importante azione del CNTF sul tessuto adiposo nel limitare l'immagazzinamento di acidi grassi nel tessuto adiposo bianco e stimolare la termogenesi nel bruno, andando così a contribuire alla regolazione del bilancio energetico.

2.6.2 Muscolo scheletrico

Il CNTF ha un impatto importante anche sulla regolazione metabolica nel muscolo scheletrico. In particolare, migliora la sensibilità all'insulina, l'assorbimento di glucosio e aumenta l'ossidazione degli acidi grassi con conseguente diminuzione dell'accumulo di grasso nel muscolo (Watt et al.

16

2006) (Steinberg et al. 2009). Esperimenti in vivo indicano un aumento della fosforilazione di STAT3 nei topi a seguito del trattamento con CNTF (Zvonic et al. 2003). Uno studio interessante *in vitro*, denota una proprietà peculiare del CNTF nel muscolo scheletrico, ovvero la capacità di de-differenziare mioblasti in coltura in cellule progenitrici attraverso l'attivazione e del pathway p44/p42 MAPK e indirizzandoli verso nuovi fenotipi, principalmente neuroni, cellule gliali, cellule muscolari lisce e adipociti (Chen et al. 2005).

2.6.3 Fegato e pancreas

Il ruolo metabolico del CNTF si esplica anche con una azione sui meccanismi che regolano l''insulino-resistenza, limitando il rischio di sviluppo della sindrome metabolica correlata all'obesità e lo fa agendo su due organi molto importanti che regolano questi processi: il fegato ed il pancreas. Nel fegato il CNTF è in grado di agire riducendo la steatosi epatica e migliorando la risposta epatica all'insulina (Sleeman et al. 2003). Nel ratto in cui la steatosi epatica viene indotta da una dieta ricca di grassi, l'accumulo di trigliceridi epatici diminuisce sia *in vivo* che *in vitro* mediante trattamenti con CNTF ricombinante (Cui et al. 2017).

Migliorando la sensibilità all'insulina, il CNTF ha quindi un potente effetto preventivo sull'insorgenza del diabete di tipo 2 (Matthews and Febbraio 2008). L'effetto diretto del CNTF nei confronti della sensibilità insulinica è stato dimostrato usando topi non obesi con diabete di tipo 2 indotto dal trattamento con "Alloxan", un analogo tossico del glucosio che distrugge le cellule β del pancreas (Rezende et al. 2012). In questi topi, il CNTF è in grado di migliorare la sensibilità all'insulina, agendo sulle cellule β nel pancreas. Il CNTF quindi protegge dal diabete di tipo 2 e lo fa con un effetto diretto nei confronti delle cellule β del pancreas, indipendente dai suoi noti effetti anti-obesità.

3. Scopo della tesi

Il CNTF è un fattore neurotrofico con effetti importanti sul metabolismo e sul bilancio energetico. Attualmente è noto che non agisce esclusivamente nel sistema nervoso centrale, ma anche in alcuni organi periferici come tessuto adiposo, muscolo, fegato e pancreas. Lo scopo di questa tesi è quello di indagare, mediante l'immunoistochimica, l'azione del CNTF *in vivo* nei diversi tipi cellulari appartenenti agli organi periferici di topo. Per valutare i citotipi che si attivano a seguito del trattamento con CNTF vengono studiati due dei principali signaling coinvolti nella cascata di trasduzione del segnale che porta alla fosforilazione della proteina STAT3 e di p44/p42 MAPK. La scelta di non ricercare direttamente l'espressione del recettore per dimostrare l'azione di questo fattore negli organi studiati, deriva dalla difficile reperibilità di un anticorpo sufficentemente sensibile per il recettore CNTFR α per immunoistochimica.

4. Materiali e metodi

4.1 Animali e condizioni sperimentali

Per effettuare gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi B6 (C57BL/6 wild type) acquistati dalla Charles River (Calco, Italia) a 4 settimane di età. Gli animali sono stati tenuti all'interno di gabbie in condizioni ambientali costanti a 22°C, con accesso *ad libitum* all'acqua e al cibo. La dieta con cui sono stati alimentati aveva le seguenti caratteristiche: 19 kJ% da grassi, 50 kJ% da carboidrati e 31 kJ% da proteine (acquistata da Charles River). Gli animali sono stati maneggiati esclusivamente per la pulizia delle gabbie. Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con la Direttiva del Consiglio 2010/63/EU del Parlamento Europeo in materia di protezione degli animali usati per scopi scientifici. Tutti gli esperimenti sono stati inoltri approvati dal Ministero Italiano della Salute (Autorizzazione No. 405/2018-PR).

Gli animali sono stati sottoposti a trattemento con CNTF (animali trattati) o soluzione fisiologica (gruppo di controllo). Nel dettaglio, il trattamento avviene prima del sacrificio mediante iniezione intraperitoneale di CNTF ricombinante di ratto (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) o di soluzione fisiologica. La quantità iniettata di peptide ricombinante dipende dal peso dell'animale stesso (0.3 mg/kg di peso corporeo).

Dopo 45 minuti dal trattamento l'animale è stato anestetizzato e processato per effettuarne l'analisi morfologica.

4.2 Processamento dei tessuti

A 12-14 settimane di età, i topi sono stati sacrificati per effettuare studi morfologici. L'animale viene sedato con un'iniezione intraperitoneale di 2,2,2-tribromoetanolo (Avertin) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) a dose elevata. Dopo aver fatto agire l'anestetico, si sacrifica l'animale mediante perfusione intracardiaca: con un'incisione sotto lo sterno, si effettua l'apertura della cavità toracica in modo da consentire l'accesso al cuore. A questo punto viene iniettato il fissativo (soluzione di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0.1 M a pH 7.4) nel ventricolo sinistro, mentre l'atrio destro è tagliato per permettere il drenaggio del sangue dal cuore. Quindi la soluzione fissativa entra in circolo eliminando il sangue dai tessuti.

A seguire sono stati prelevati gli organi di interesse: ghiandole salivari, cuore, timo, esofago, intestino con tessuto adiposo mesenterico, fegato, milza, pancreas, bronchi extra-polmonari e polmone, muscolo, tessuto adiposo bruno interscapolare (IBAT), tessuto adiposo sottocutaneo, rene, testicolo, epididimo con tessuto adiposo epididimale, vescichette seminali, ghiandole bulbouretrali (di Cowper). Gli organi sono stati post-fissati per 24h a 4°C con la stessa soluzione fissativa. Dopo un lavaggio in tampone fosfato, vengono disidratati con passaggi graduali in alcoli a concentrazioni crescenti ($50^{\circ},75^{\circ},95^{\circ},100^{\circ}$) e chiarificati in xilolo. Il processamento si conclude con l'inclusione degli organi in paraffina e il taglio al microtomo in sezioni di 3,5 µm.

4.3 Immunoistochimica

Per la rilevazione del P-STAT3, P-ERK è stata impiegata l'immunoistochimica su sezioni di tessuti inclusi in paraffina e montate su vetrini carichi positivamente (Menzel-Glaser, Thermo Scientific, Braunschweig, Germania). Le sezioni sono state innanzitutto de-paraffinate, reidratate e poi introdotte in pentola a pressione per 20 minuti a 95°C in soluzione Citrato a pH 6 (Pang et al. 2021), al fine di effettuare lo smascheramento antigenico. I passaggi successivi sono stati il blocco della perossidasi endogena mediante H₂O₂ (in dH₂O; 5 minuti), lavaggio in tampone fosfato salino (PBS) e l'incubazione dei tessuti con siero normale al 3% (in PBS; 30 minuti) per bloccare il legame dell'anticorpo secondario ai siti aspecifici. A seguire, è stato applicato l'anticorpo primario (diluito in PBS; overnight a 4°C). Dopo un abbondante lavaggio per rimuovere completamente l'eccesso di anticorpo primario, le sezioni sono state incubate con una soluzione di anticorpo secondario

21

biotinilato (diluizione 1:200 in PBS, per 30 minuti). Effettuato un ulteriore lavaggio in PBS, è seguita l'incubazione con il complesso avidina-biotinaperossidasi (ABC Kit Elite Peroxidase Standard PK6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); questo complesso si basa sulla forte affinità tra la biotina e l'avidina (la quale dispone di ben quattro siti di legame per la biotina) ed è un efficace dispositivo di rivelazione dell'anticorpo secondario, in quanto permette di amplificare il segnale. Infine, dopo diversi lavaggi in PBS è avvenuta l'incubazione per 5 minuti con 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) (DAB Substrate kit Peroxidase SK4105, Vector Laboratories), cromogeno comunemente utilizzato in immunoistochimica e producente un precipitato di colore marrone in presenza dell'enzima perossidasi. Si ha poi un breve lavaggio in dH₂O, dopo il quale le sezioni vengono contrastate con ematossilina, disidratate e, dopo un passaggio in xilolo, montate con vetrino coprioggetto utilizzando una resina sintetica trasparente (Eukitt mounting medium, Bio Optica Milano S.p.A, Mi, Italia) avente indice di rifrazione simile al vetro. Le reazioni di immunoistochimica sono state analizzate e fotografate utilizzando un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon; Sesto Fiorentino, Firenze, Italia) a cui è stata montata una videocamera per ottenere le immagini.

4.4 Anticorpi primari

Gli anticorpi primari utilizzati sono elencati in Tab. 1:

Tabella 1 - Anticorpi primari utilizzati per l'immunoistochimica (IHC)

Anticorpo	Diluizione utilizzata	Ospite/ Isotopo	Ditta
Anti- Phoshpo- specific- Tyr705- STAT3	1:600	Monoclonal Rabbit	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA) Cat 9145
Anti- Phospho- specific- Tyr202/204- p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1500	Monoclonal Rabbit	Cell Signaling Technology Inc. Cat 4370

5. Risultati

L'attivazione dei signaling STAT3 e p44/p42 MAPK, è stata osservata in tutti gli organi di interesse nel topo, a seguito del trattamento con CNTF o con soluzione fisiologica. Entrambi questi segnali, dopo la fosforilazione subiscono la traslocazione nel nucleo della cellula, dove avviene la modulazione della trascrizione genica. I risultati ottenuti sono stati pertanto valutati per una positività di tipo nucleare.

5.1 II CNTF induce la fosforilazione di STAT3

5.1.1 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel tessuto adiposo.

I dati di immunoistochimica sono stati ottenuti utilizzando il tessuto adiposo bianco sottocutaneo, epididimale e mesenterico sia del topo controllo che del topo trattato con CNTF. A seguito del trattamento con CNTF risultano positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 numerosi nuclei di adipociti del tessuto adiposo sottocutaneo (Fig. 3).



Figura 3 – Immunoistochimica per il P-STAT3 nel tessuto adiposo sottocutaneo di topo. Nei nuclei (freccia) del tessuto adiposo sottocutaneo dell'animale controllo non si attiva STAT (**A**,**C**). L'attivazione di STAT3 avviene nei nuclei (freccia) degli adipociti a seguito del trattamento con CNTF (**B**,**D**). A, B: 50 μ m; C, D: 25 μ m.

L'attivazione di STAT3 è stata rilevata anche negli adipociti del tessuto adiposo

epididimale dell'animale trattato con CNTF (Fig. 4).



Figura 4 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel tessuto adiposo epididimale di topo. Nei nuclei (freccia) degli adipociti dell'animale controllo non avviene l'attivazione di STAT3 (A), mentre a seguito del trattamento con CNTF alcuni nuclei (freccia) rispondono all'anticorpo anti-P-STAT3 (B). Scala: A, B: 50 μ m.

Non è stato ottenuto lo stesso risultato nel tessuto adiposo mesenterico, che mostra nuclei negativi sia nell'animale controllo che nell'animale trattato con CNTF (Fig. 5).



Figura 5 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel tessuto adiposo mesenterico di topo. Nel tessuto adiposo mesenterico non c'è attivazione di STAT3 né nei nuclei dell'animale controllo (**A**) né nei nuclei dell'animale trattato con CNTF (**B**). Scala: A, B: 50 µm

Analogamente a quanto osservato nel tessuto adiposo bianco, il CNTF induce attivazione di STAT3 anche nei nuclei degli adipociti del tessuto adiposo bruno (Fig. 6). L'attivazione è stata riscontrata anche nelle cellule endoteliali dei vasi che irrorano il tessuto (Fig. 6B).



Figura 6 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel tessuto adiposo bruno di topo. Nei nuclei (freccia) degli adipociti bruni dell'animale controllo non avviene l'attivazione di STAT3 (**A,C**). Il signaling si attiva nei nuclei (freccia) degli adipociti bruni a seguito del trattamento con CNTF (**B,D**). Nell'inserto B è possibile osservare l'attivazione di STAT3 nei nuclei delle cellule che costituiscono la parete del vaso. Scala: A, B: 50 µm (inserto 25 µm); C, D: 25 µm.

5.1.2 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel muscolo scheletrico e cardiaco.

Attraverso l'immunoistochimica è stato osservato che il trattamento con CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel muscolo scheletrico. Risultano pertanto positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 numerosi nuclei di fibrocellule muscolari del topo trattato con CNTF (Fig. 7).



Figura 7 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel muscolo scheletrico di topo. I nuclei delle fibrocellule muscolari sono negativi all'anticorpo per il P-STAT3 nell'animale controllo (**A**), mentre risultano positivi nell'animale trattato con CNTF (**B**,**C**). C è l'ingrandimento dell'area evidenzata dal riquadro in B. Scala A, B: 50 μ m; C: 25 μ m.

Inoltre un'attivazione del P-STAT3 è stata riscontrata anche nei nuclei dei cardiomiociti nel tessuto muscolare cardiaco del topo trattato (Fig. 8).



Figura 8 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel cuore di topo. Nell'animale controllo i nuclei (freccia) dei cardiomiociti sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3 (A,C). Si possono osservare nuclei (freccia) positivi all'anticorpo anti-p-STAT3 nell'animale trattato con CNTF (**B**,**D**). C e D sono gli ingrandimenti delle rispettive zone nei due riquadri. Scala: A,B: 50 μ m; C,D: 25 μ m.

5.1.3 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel tratto digerente.

L' effetto del CNTF lungo il tratto digerente è stato valutato nell'esofago e nell'intestino tenue. Rispetto al controllo, nell'esofago del topo trattato con CNTF compaiono nuclei positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 nelle cellule connettivali della tonaca sottomucosa (Sm) e in alcune fibrocellule muscolari della tonaca muscolare (Mus), formanti la parete dell'esofago. (Fig. 9)



Figura 9 - Immunoistochimica per P-STAT3 nell'esofago di topo. Nell'animale controllo non c'è attivazione di STAT3 nei nuclei delle cellule (**A**). Nell'animale trattato con CNTF, STAT3 si attiva nei nuclei delle cellule della tonaca sottomucosa (Sm) e della tonaca muscolare (Mus) (**B**,**C**,**D**). In C e D sono mostrati degli ingrandimenti della zona evidenziata dal riquadro in B. Scala: A,B: 100 µm; C: 50µm; D: 25µm.

Analogamente, nella parete dell'intestino tenue risultano positivi i nuclei delle cellule della lamina propria (LP) nella tonaca mucosa (M) che nell'intestino si organizza a formare i villi intestinali, i nuclei delle cellule della tonaca sottomucosa (SM) e i nuclei delle fibrocellule muscolari dello strato circolare e longitudinale della tonaca muscolare (Mus) (Fig. 10).



Figura 10 - Immunoistochimica per P-STAT3 nell'intestino di topo. Nell'animale controllo non si evidenziano nuclei positivi per l'anticorpo anti-P-STAT3 (**A**). Nell'animale trattato con CNTF sono positivi all'anticorpo i nuclei delle cellule della lamina propria (LP) nella tonaca mucosa (M), i nuclei delle cellule della tonaca sottomucosa (SM) e muscolare (Mus). (**B**,**C**). In C è mostrato l'ingrandimento dell'area evidenziata in B. Scala A, B: 50 µm; C: 18 µm.

5.1.4 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nelle ghiandole salivari maggiori.

Le ghiandole salivari maggiori di topo comprendono la ghiandola sottomandibolare, parotide e sottolinguale (Fig. 11). Nel topo, la ghiandola sottolinguale è strettamente associata con la superficie anterolaterale della ghiandola sottomandibolare (Treuting P. M. 2012) e per questa ragione durante il prelievo degli organi sono state estratte congiuntamente e utilizzate per l'immunoistochimica.



Figura 11 – Illustrazione delle ghiandole salivari maggiori di topo (Treuting P. M. 2012).

Vengono definite ghiandole tubulo-acinose composte, in cui sono riconoscibili due tipologie di adenomeri, gli acini a secrezione sierosa e i tubuli a secrezione mucosa. Nelle ghiandole salivari sottomandibolare e sottolinguale del topo trattato con CNTF si attiva P-STAT3 in numerosi nuclei cellulari dell'epitelio ghiandolare. I nuclei positivi all'anticorpo P-STAT3 sono localizzati nelle cellule sierose degli acini, nelle cellule mucose dei tubuli e nelle cellule dell'epitelio dei dotti escretori (Fig. 12).


Figura 12 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nelle ghiandole salivari di topo. Nell'animale controllo sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3 i nuclei delle cellule della componente sierosa (**A**) e mucosa (**C**) della ghiandola. Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule sierose che compongono gli acini (**B**) e le cellule mucose che compongono i tubuli (**D**). Nell'inserto in B viene mostrato un ingrandimento dell'unità secernente, gli acini a secrezione sierosa. Nell'inserto in D viene mostrato l'ingrandimento dei tubuli a secrezione mucosa. In entrambe le componenti si attivano anche i nuclei cellulari dell'epitelio dei dotti escretori (freccia) (**A**,**B**,**C**,**D**). Scala: A,B,C,D 50 µm (inserto C, D 25 µm).

5.1.5 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel fegato e nel pancreas.

La somministrazione di CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nel fegato. In particolare, sono positivi all'anticorpo anti-P-STAT3, dei nuclei larghi e rotondeggianti localizzati al centro delle cellule e pertanto somiglianti morfologicamente agli epatociti (Fig. 13). Sono inoltre positivi i nuclei delle cellule endoteliali della parete dei sinusoidi epatici e all'interno di quest'ultimi sono localizzate delle cellule, i cui nuclei hanno dimensioni inferiori rispetto a quelli degli epatociti, che risultano anch'essi positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 (Fig. 13C). Per la loro forma e localizzazione essi potrebbero rappresentare i nuclei dei macrofagi epatici chiamati cellule di Kupffer (Baratta et al. 2009).



Figura 13 - Immunoistochimica per P-STAT3 nel fegato di topo. Nell'animale controllo non si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei di cellule riconducibili agli epatociti (freccia nera), alle cellule endoteliali delle vene e dei capillari sinusoidi (freccia azzurra) e alle cellule di Kupffer (freccia bianca) (**B**,**C**).

C è un ingrandimento dell'area del riquadro in B. Nelle immagini è raffigurato lo spazio portale (SP) e la vena centrolobulare (CV) (A,B,C). Scala: A, B50 µm; C 25µm.

Per quanto riguarda l'immunoistochimica del pancreas, la positività all'anticorpo è stata rilevata nella sua componente endocrina, a livello dei nuclei delle cellule nelle isole di Langherans (Fig. 14). La componente esocrina non risponde al trattamento con CNTF.



Figura 14 - Immunoistochimica del P-STAT3 nel pancreas di topo. Nell'animale controllo i nuclei delle cellule sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3. (**A**) Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nelle cellule delle isole di Langherans (freccia). (**B**) Scala A, B 50µm.

5.1.6 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 negli organi linfatici.

Il trattamento con CNTF ha indotto la fosforilazione di STAT3 sia negli organi linfatici primari che secondari. Del primo gruppo è stata prelevato il timo e ne è stata osservata l'immunoistochimica. Il timo è suddiviso in due regioni, la corticale esterna (Co) e la midollare interna (Mi) in cui risiedono cellule epiteliali specializzate, i timociti, responsabili del differenziamento dei linfociti T. I timociti fungono da reticolo tridimensionale in cui si infiltrano altre popolazione cellulari, come linfociti, macrofagi e cellule dendritiche (Pearse 2006). La midollare si distingue dalla corticolare in quanto è meno ricca di linfociti, quindi alla colorazione con coloranti acidofili risulta più chiara. Alla reazione con l'anticorpo anti-P-STAT3, nel topo controllo compaiono alcuni nuclei positivi e, a seguito del trattamento con CNTF, l'attivazione dei nuclei dei timociti appare aumentata sia nella zona corticale che midollare del timo (Fig. 15). In particolar modo, la popolazione di cellule che sembra più ricca di nuclei positivi, è quella dei timociti della midollare (Fig. 15C).



Figura 15 - Immunoistochima per P-STAT3 nel timo di topo. Nell'animale controllo vi sono alcuni nuclei positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 nei timociti della midollare (Mi) (freccia) (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei dei timociti della corticale (Co) e della midollare (Mi), con una maggior popolazione di nuclei positivi nella zona midollare (**B**,**C**). C è un indrandimento della zona nel riquadro in B. Scala A, B 50µm; C 25μ m.

Tra gli organi linfatici secondari è stata processata la milza. Essa è composta da due zone funzionalmente e morfologicamente distinte, la polpa bianca con funzione linfopoietica e la polpa rossa con funzione emocaterica. La polpa bianca risulta alla colorazione più scura per la presenza di una maggior popolazione di linfociti, affini ai coloranti acidofili (Cesta 2006). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule della polpa rossa, a cui appartengono le cellule endoteliali costituenti la fitta rete di sinusoidi che la irrorano, i macrofagi e le plasmacellule; risultano positive anche alcuni nuclei della polpa bianca riconducibili a linfociti B e T (Fig.16).



Figura 16 – Immunoistochimica per il P-STAT3 nella milza di topo. I nuclei delle cellule sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3 nel tessuto dell'animale controllo (**A**). Si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule della polpa bianca (Pb) e della polpa rossa (Pr) nell'animale trattato (**B**). I nuclei delle cellule nella polpa rossa risultano essere la popolazione cellulare che risponde maggiormente all'anticorpo (**C**,**D**). D è un ingrandimento dell'area nel riquadro in C. Scala: A,B: 100µm; C,D: 25µm.

Infine è stata valutata la positività al P-STAT3 nel linfonodo, un altro organo linfatico secondario e localizzato nel tessuto adiposo sottocutaneo dell'animale. Il parenchima dell'organo è costituito da cellule linfatiche sostenute da uno stroma di tessuto connettivo reticolare, ed è suddivisibile in tre zone principali: corticale (Co), paracorticale (PCo) e midollare (Mi) (Willard-Mack 2006).

Sono risultati positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 nuclei cellulari nel parenchima dell'organo sia nell'animale controllo che trattato (Fig.17). Nel controllo ci sono alcuni nuclei positivi all'anticorpo nella zona corticale, paracorticale e midollare (Fig. 17C). La positività aumenta nell'animale trattato con CNTF, dove le cellule positive al P-STAT3 sono riconducibili per la loro localizzazione nel parenchima ai linfociti B nella zona corticale, ai linfociti T e alle cellule endoteliali dei vasi nella zona paracorticale ed infine alle plasmacellule nella zona midollare, che è risultata essere l'area più ricca in cellule positive (Figura 17 D).



Figura 17 - Immunoistochimica per P-STAT3 nel linfonodo di topo. Nell'animale controllo compaiono alcuni nuclei positivi (freccia) all'anticorpo anti-P-STAT3 nelle cellule della zona corticolare (Co), paracorticale (PCo) e midollare (Mi) del linfonodo (**A**,**C**). Nell'animale trattato con CNTF aumentano i nuclei positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 nella zona corticolare (Co) e paracorticale (PCo), ma soprattutto nella zona midollare del linfonodo (Mi) (**B**,**D**). Scala: A, B: 50µm; C: 25µm.

5.1.7 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 nei bronchi extrapolmonari e nel polmone.

L'azione del CNTF è stata studiata anche nelle vie aeree inferiori, di cui fanno parte la trachea, i bronchi e i polmoni. La somministrazione di CNTF ha indotto la fosforilazione di STAT3 nei nuclei delle cellule della tonaca muscolare nell'epitelio respiratorio dei bronchi extra-polmonari (Fig.18).



Figura 18 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nei bronchi extrapolmonari di topo. Nell'animale controllo i nuclei delle cellule sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3 (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule della tonaca muscolare (**B**, **C**). C è l'ingrandimento della zona del riquadro in B. Scala A, B: 100 μ m; C: 50 μ m.

Nei polmoni dell'animale trattato con CNTF, sono positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 i nuclei di alcune cellule che compongono l'epitelio respiratorio degli alveoli polmonari. I nuclei positivi hanno una forma rotondeggiante riconducibile per tale morfologia ai nuclei dei macrofagi o degli pneumociti di tipo II (Fig. 19) (Guillot et al. 2013).



Figura 19 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel polmone di topo. Nell'animale controllo i nuclei delle cellule sono negativi (freccia) per l'anticorpo anti-P-STAT3 (A,C). Nell'animale trattato con CNTF sono positivi (freccia) all'anticorpo i nuclei di cellule rotondeggianti riconducibili per tale forma a macrofagi o pneumociti di tipo II (**B**,**D**). Scala: A, B: 50 μ m; C, D: 25 μ m.

5.1.8 Il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 negli organi uro-genitali.

L'attivazione di STAT3 a seguito del trattamento con CNTF è stata studiata attraverso l'immunoistochimica degli organi uro-genitali come rene, testicolo, vescichette seminali, ghiandole bulbouretrali e surrene. A seguito del trattamento con CNTF, si osserva l'attivazione di STAT3 nel parenchima renale, nei nuclei cellulari dei corpuscoli renali (CR) e dei tubuli renali, sia prossimali che distali (Fig. 20). Tale attivazione si osserva anche nel surrene, in particolare nei nuclei delle cellule che risiedono nelle due zone principali che lo compongono: la corticale (Co), le cui cellule sono responsabili della sintesi di ormoni mineralcorticoidi, glucocorticoidi e ormoni sessuali, e la midollare (Mi) del surrene, le cui cellule producono le catecolammine (adrenalina e noradrenalina) (Fig. 20 D).



Figura 20 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel rene e surrene di topo. Nell'animale controllo i nuclei delle cellule sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3. (**A**) Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule dei corpuscoli renali (CR), dei tubuli renali (**B**). Nel surrene dell'animale controllo i nuclei delle cellule sono negative all'anticorpo anti-P-STAT3 (**C**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule della corticale (Co) e della

midollare (Mi) del surrene (**D**). L'inserto in D è un'ingrandimento della zona nel riquadro in D. Scala: A, B: 50 μ m; C, D: 100 μ m; E: 25 μ m.

I dati di immunoistochimica rivelano che nel testicolo del topo trattato con CNTF, STAT3 viene fosforilato a livello dei tubuli seminiferi, dove risultano positivi all'anticorpo anti-P-STAT3 i nuclei di cellule simili per morfologia alle cellule del Sertoli (S), in quanto quest'ultime sono le cellule più grandi dell'epitelio germinale dei tubuli seminiferi e possiedono una forma irregolare (Fig. 21). Le cellule del Sertoli possono essere distinte dagli spermatogoni primari che si trovano posizionati vicini ad esse in quanto hanno un nucleo più chiaro, sono più grandi e irregolari e si trovano attaccate alla lamina basale della membrana dei tubuli, mentre gli spermatogoni sono localizzati in posizione più luminale (Griswold 2018).

Risultano positivi anche nuclei di cellule sottili che circondano il tubulo seminifero, plausibilmente cellule miofibroblastiche (M). Un'ulteriore popolazione di cellule i cui nuclei sono positivi per l'anticorpo si trova negli spazi interstiziali tra i tubuli seminiferi, e sono pertanto riconducibili alle cellule di Leydig (L) (Fig. 21).



Figura 21 - Immunoistochimica per il P-STAT3 nel testicolo di topo. Nell'animale controllo i nuclei delle cellule sono negativi all'anticorpo anti-P-STAT3 (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei di cellule riconducibili a cellule del Sertoli (S) e miofibroblastiche (M) nei tubuli seminiferi e alle cellule del Leydig (L) negli spazi esterni (**B**). Scala: A,B: 50 μm.

Infine l'attivazione di STAT3 successiva al trattamento con CNTF si è estesa anche alle ghiandole sessuali accessorie prelevate durante il sacrificio: le ghiandole bulbouretrali (di Cowper) e le vescichette seminali. Istologicamente, le ghiandole bulbouretrali sono multi-lobulari. Ogni lobulo è composto da acini che si aprono in un canale centrale. Una sottile capsula di tessuto connettivo fibroso circonda e separa gli acini. Nei topi, gli acini ghiandolari sono rivestiti da un alto epitelio colonnare.

Nella ghiandola bulbouretrale dell'animale trattato con CNTF, STAT3 si attiva nei nuclei delle cellule del tessuto connettivo che riveste gli acini e che divide la ghiandola in lobi. Sono positivi anche alcuni nuclei di cellule dell'epitelio colonnare che compone gli acini (Fig. 22).



Figura 22 - Immunoistochimica del P-STAT3 nelle ghiandole bulbouretrali di topo. Nell'animale controllo i nuclei cellulari non rispondono all'anticorpo anti-P-STAT3 (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva STAT3 nei nuclei delle cellule appartenenti al tessuto connettivo che riveste gli acini e che suddivide la ghiandola in lobuli e nei nuclei delle cellule dell'epitelio colonnare (**B**,**C**). C è l'ingrandimento dell'area nel riquadro in B, in cui si possono osservare alcuni nuclei di cellule dell'epitelio colonnare (freccia bianca) e i nuclei delle cellule del tessuto connettivo (freccia nera) positive all'anticorpo anti-P-STAT3. Scala: A, B: 100 µm; C: 50 µm.

Come nelle ghiandole bulbouretrali, anche nelle vescichette seminali le cellule rispondono con l'attivazione dello STAT3 al trattamento con CNTF. In particolare, queste ultime sono organizzate in un epitelio colonnare che forma la mucosa dell'organo. Sono positive all'anticorpo anti-P-STAT3 i nuclei delle cellule dell'epitelio colonnare e i nuclei delle cellule del tessuto muscolare e connettivo che circondano l'epitelio dell'organo (Fig. 23).



Figura 23 - Immunostochimica per PSTAT3 nelle vescichette seminali di topo. Nell'animale controllo PSTAT3 è assente nei nuclei delle cellule epiteliali (Ep) e muscolari (Mus) (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva P-STAT3 nei nuclei delle cellule dell'epitelio colonnare (Ep) e dello strato muscolare che le avvolge (Mus) (**B**). Nella figura sottostante è illustrata l'attivazione di STAT3 nei nuclei delle cellule del tessuto muscolare (Mus) e connettivo (Co) che avvolgono l'organo. (**C**) Scala A,B,C: 100 µm.

5.2 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/42 MAPK (ERK1/2) 5.2.1 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK nel tessuto adiposo.

Il trattamento con CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK nei nuclei degli adipociti del tessuto adiposo bianco sottocutaneo di topo (Fig. 24). Non ci sono, al contrario, nuclei positivi nell'animale non trattato.



Figura 24 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel tessuto adiposo sottocutaneo di topo. Nell'animale controllo non si attivano p44/p42 MAPK nei nuclei degli adipociti bianchi (freccia) (**A**,**C**), mentre l'attivazione è osservabile nei nuclei degli adipociti (freccia) a seguito del trattamento con CNTF (**B**,**D**). Scala: A, B: 50 µm; C, D: 25 µm.

Risultano positivi all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK anche gli adipociti del tessuto adiposo epididimale (Fig. 25).



Figura 25 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel tessuto adiposo epididimale di topo. Nell'animale controllo i nuclei degli adipoci bianchi sono negativi (freccia) all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK (**A**,**C**) mentre risultano positivi (freccia) nel tessuto adiposo a seguito del trattamento con CNTF (**B**,**D**). Scala: A, B: 50 µm; C, D: 25 µm.

Come per P-STAT3, nel tessuto adiposo mesenterico la citochina non attiva i nuclei degli adipociti, che sono pertanto negativi all'anticorpo sia nel controllo che nel trattato (Fig. 26).



Figura 26 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel tessuto adiposo mesenterico di topo. Non c'è attivazione del signaling né nei nuclei degli adipociti dell'animale controllo (**A**) né nei nuclei dell'animale trattato con CNTF (**B**). Scala: A, B: 50 μ m.

Risultano invece positivi all'anticorpo anti-P-p44/p42 numerosi adipociti del

tessuto adiposo bruno (Fig. 27).



Figura 27 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel tessuto adiposo bruno di topo. Nell'animale controllo i nuclei degli adipociti bruni sono negativi (freccia) all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK (**A**) mentre nell'animale trattato con CNTF compaiono alcuni nuclei positivi (freccia) all'anticorpo (**B**). Scala: A, B: 25 µm.

5.2.2 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK nel muscolo cardiaco, ma non nel muscolo scheletrico.

L'immunoistochimica sul muscolo scheletrico mostra nuclei negativi all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK sia nell'animale controllo che nell'animale trattato (Fig. 28).



Figura 28 - Immunoistochimica per p44/p42 nel muscolo scheletrico di topo. Non c'è attivazione del signaling nei nuclei delle fibrocellule del muscolo scheletrico dell'animale controllo (**A**) e dell'animale trattato (**B**). Scala: A, B: 25 μ m.

A seguito del trattamento con CNTF sembra esserci invece una forte attivazione

del signaling nei nuclei cellulari dei cardiomici, rispetto al controllo (Fig. 29).



Figura 29 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel cuore di topo. Nell'animale controllo compaiono sporadici nuclei positivi all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK (**A**, **C**). A seguito del trattamento con CNTF risulta esserci complessivamente una maggior risposta all'anticorpo nei nuclei dei cardiomiociti rispetto al controllo (**B**,**D**). Scala: A, B: 50 μ m; C, D: 25 μ m.

5.2.3 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK nel fegato.

A seguito del trattamento con CNTF, nel fegato dell'animale trattato si attiva p44/p42 MAPK principalmente nei nuclei delle cellule di Kupffer. Sembra esserci inoltre un'attivazione a livello citoplasmatico nei colangiociti (cellule pavimentose cubiche) del dotto biliare, negli spazi portali (Fig. 30).



Figura 30 - Immunoistochimica per il p44/p42 MAPK nel fegato di topo. Nel fegato dell'animale controllo risultano positivi all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK solamente alcune cellule endoteliali (freccia azzurra) formanti la parete delle vene dello spazio portale (SP) (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attiva p44/p42 MAPK principalmente nelle cellule di Kupffer (freccia bianca). Come nel controllo anche nel trattato si attivano le cellule endoteliali degli spazi portali (freccia azzurra). Nei colangiociti dei dotti biliari risulta esserci una debole positività citoplasmatica (freccia nera) (**B**,**C**). C è un ingrandimento dell'area evidenziata dal riquadro in B. Scala: A, B: 50 µm; C: 25 µm.

5.2.4 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/42 MAPK nella milza.

L'organo linfatico in cui il trattamento con CNTF aumenta maggiormente il livello di fosforilazione di p44/p42 MAPK, è la milza. Nell'animale controllo sembrano esserci alcuni nuclei debolmente attivati, ma l'attivazione è nettamente maggiore a seguito del trattamento con CNTF e i nuclei positivi sono localizzati prevalentemente nella polpa rossa in cui risiedono macrofagi, le cellule endoteliali dei capillari che la irrorano, e le plasmacellule (Fig. 31).



Figura 31 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nella milza di topo. Nell'animale controllo sembra esserci una debole positività diffusa nei nuclei sia della polpa rossa (Pr) che della polpa bianca (Pb) (A). A seguito del trattamento con CNTF c'è una maggiore attivazione del signaling e localizzata principalmente nella polpa rossa (Pr) (**B**,**C**). C è un ingrandimento della zona nel riquadro in B. Scala: A, B: 50 µm; C: 25 µm.

5.2.5 Il CNTF induce la fosforilazione di p44/p42 MAPK negli organi urogenitali.

La somministrazione di CNTF induce un aumento dell'attivazione delle proteine p44/p42 MAPK in alcuni organi uro-genitali, in analogia con quanto osservato per STAT3 nei medesimi organi post-trattamento. Sono state rilevati alcuni sporadici nuclei positivi all'anticorpo anti-P-p44/p42 anche nei tessuti del topo controllo. Il trattamento con il CNTF induce una maggiore attivazione nucleare prevalentemente nelle cellule che compongono i corpuscoli renali (CR). Risultano positive anche le cellule dei capillari peri-tubulari (Pc) (Fig. 32).



Figura 32 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel rene di topo. Nell'animale controllo i nuclei sono negativi all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK (**A**). A seguito del trattamento con CNTF risultano positivi i nuclei delle cellule contenute nei corpuscoli renali (CR) e delle cellule dei capillari peri-tubulari (Pc) (**B**). Scala: A, B: 50 µm.

Nel testicolo del topo trattato con CNTF compaiono numerosi nuclei positivi riconducibili per la loro forma alle cellule del Sertoli e alle cellule miofibroblastiche che avvolgono i tubuli seminiferi (Griswold 2018), in analogia con l'attivazione di P-STAT3 (Fig. 33).



Figura 33 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nel testicolo di topo. Nell'animale controllo i nuclei sono negativi all'anticorpo anti-P-p44/p42 MAPK (**A**). Nell'animale trattato con CNTF risultano positivi alcuni nuclei di cellule riconducili per la loro morfologia alle cellule del Sertoli (S) e alle cellule miofibroblastiche (M) dei tubuli seminiferi (**B**). Scala: A, B: 50 μ m.

L'attivazione di p44/p42 MAPK si diffonde anche alle cellule dell'epididimo, in particolare la positività è stata rilevata nei nuclei delle cellule del tessuto connettivo posto tra i dotti epididimali e in alcune cellule dell'epitelio pseudostratificato che compone i dotti (Fig. 34).



Figura 34 - Immunoistochimica per p44/p42 MAPK nell'epididimo. Nell'animale controllo non c'è attivazione di p44/p42 nei nuclei delle cellule (**A**). Nell'animale trattato con CNTF si attivano i nuclei del tessuto connettivo (Co) posto tra i dotti epididimali e di cellule dell'epitelio pseudostratificato (Ep) (**B**,**C**). C è un ingrandimento della zona nel riquadro in B. Scala: A e B: 50 μ m, C: 25 μ m.

6. Discussione

Il CNTF è una citochina in grado di esercitare un'importante funzione neuroprotettiva nei confronti delle cellule del sistema nervoso centrale e periferico. La sua espressione è elevata negli astrociti della sostanza bianca nel sistema nervoso centrale e nelle cellule di Schwann negli assoni periferici (Sendtner et al. 1994; Stockli et al. 1991; Guthrie et al. 1997). Nei neuroni e negli astrociti della sostanza grigia, in cui questa citochina è solitamente poco presente, la sua espressione aumenta a seguito di lesioni, condizione in cui il CNTF viene rilasciato principalmente dalle cellule gliali adiacenti al sito lesionato (Guthrie et al. 1997). Parallelamente agli effetti sul sistema nervoso, il CNTF ha dimostrato un potente effetto anoressizzante a seguito della sua somministrazione, agendo direttamente sui neuroni ipotalamici responsabili del controllo dell'assunzione di cibo (Xu et al. 1998) con un meccanismo d'azione simile alla leptina (Tartaglia et al. 1995; Gloaguen et al. 1997). I meccanismi con cui il CNTF esogeno regola il bilancio energetico coinvolgono sia i centri ipotalamici, dove promuove lo stimolo di sazietà, sia gli organi periferici come il tessuto adiposo, il muscolo, il fegato e il pancreas, sedi dove il CNTF agisce regolando principalmente la sensibilità insulinica e il dispendio energetico (Matthews and Febbraio 2008). Ad oggi è quindi noto che il CNTF ha un ruolo al di fuori del sistema nervoso. Il suo recettore è presente in numerosi citotipi e per questa ragione molti studi si sono focalizzati sul determinare i bersagli cellulari del CNTF e il suo meccanismo d'azione in numerosi organi periferici. I dati di immunoistochimica di questo progetto di tesi sono volti a fornire una mappatura dettagliata, negli organi periferici, dei tipi cellulari che rispondono alla somministrazione di CNTF, attraverso un esperimento in vivo. È stata studiata la risposta delle cellule rilevando l'attivazione dei principali signaling, JAK-STAT3 e p44/p42 MAPK, implicati nella cascata di trasduzione del segnale mediata dal recettore del CNTF. La presenza del recettore non è stata rilevata in maniera diretta mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-CNTFRα nei vari tipi cellulari, poiché gli anticorpi attualmente reperibili sono poco sensibili. Gli studi in vitro presenti in letteratura indicano che la maggiore via di trasduzione del segnale innescata dal recettore del CNTF coinvolge la fosforilazione di STAT3 alla Tyr705 (MacLennan et al. 2000). I risultati di immunoistochimica qui descritti confermano che anche in vivo il CNTF agisce negli organi periferici inducendo principalmente la fosforilazione di STAT3 come segnale intracellulare. Attraverso l'immunoistochimica, l'attivazione di questo signaling è stata rilevata nel tessuto adiposo bianco sottocutaneo ed epididimale, confermando quanto descritto precedentemente in vitro e nel tessuto adiposo di topo (Zvonic et al. 2003). È inoltre noto in letteratura che il trattamento con il CNTF ricombinante umano induce una forte attivazione di

STAT3 anche negli adipociti differenziati dalle hMADS (human multipotent adipose-derived stem), cellule staminali umane multipotenti derivanti dal tessuto adiposo (Perugini et al. 2019). I risultati qui ottenuti mostrano inoltre che il CNTF induce la fosforilazione di STAT3 anche nel tessuto adiposo bruno, come precedentemente descritto *in vitro* negli adipociti bruni di topo (Ott et al. 2002). Inoltre, nel tessuto adiposo il CNTF attiva, oltre a STAT3, anche p44/p42 MAPK; questo dato è in linea con studi precedenti *in vitro* negli adipociti sia bianchi, che bruni (Ott et al. 2002; Zvonic et al. 2003).

Ad oggi l'azione del CNTF negli adipociti è stata studiata prevalentemente con studi *in vitro*, attraverso i quali sono emersi i suoi effetti in queste cellule: è principalmente in grado di ridurre l'accumulo di riserve energetiche ed incrementare la sensibilità all'insulina negli adipociti bianchi, favorendo invece la dissipazione energetica tramite la regolazione positiva di UCP1 negli adipociti bruni. L'attivazione dei signaling studiati in questo progetto di tesi nel tessuto adiposo bianco e bruno conferma questi dati anche *in vivo* nel topo.

Il CNTF inoltre agisce anche in altri organi periferici coinvolti nella regolazione del metabolismo: nel muscolo, nel fegato e nel pancreas. Studi precedenti su fibrocellule muscolari in coltura e sul tessuto muscolare scheletrico di topo dimostrano come il CNTF sia in grado di aumentare l'assorbimento di glucosio, l'ossidazione lipidica e la sensibilità all'insulina, regolando l'espressione di Akt e AMPK come signaling intracellulari (Steinberg et al. 2009). I dati di immunoistochimica ottenuti mostrano come il CNTF sia in grado di attivare principalmente STAT3 nel muscolo scheletrico, confermando quanto visto in analisi di tipo quantitativo sul muscolo scheletrico in vitro e in vivo (Steinberg et al. 2009) (Zvonic et al. 2003). I nostri risultati confermano che il trattamento con CNTF induce una risposta anche nel fegato; in particolare abbiamo rilevato che negli epatociti il principale signaling che viene attivato è STAT3, mentre in altre cellule, come i macrofagi epatici, viene attivato anche p44/p42 MAPK. Nel fegato è noto che il CNTF sia in grado di ridurre l'accumulo di trigliceridi e di contrastare la steatosi epatica indotta da dieta grassa, evidenza ottenuta da studi sia *in vitro* che *in vivo* (Cui et al. 2017). È anche noto che la citochina è in grado di migliorare la funzionalità epatica e la sensibilità all'insulina, rivestendo pertanto un ruolo molto importante nella prevenzione del diabete di tipo 2 (Sleeman et al. 2003). A conferma di ciò, abbiamo osservato come il CNTF agisca anche nelle β -cellule delle isole di Langherans nel pancreas, attivando STAT3 come segnale intracellulare. Uno studio precedente conferma che anche *in vitro*, nelle cellule prelevate dalle isole di Langherans, il CNTF attiva il signaling P-STAT3 ed è in grado di favorire la sopravvivenza delle β-cellule e di conseguenza di favorire la produzione ed il rilascio di insulina (Rezende et al. 2009). I dati di immunoistochimica qui

ottenuti nei principali organi periferici che regolano il metabolismo energetico, contribuiscono all'ipotesi che il CNTF contrasti l'insorgenza dell'obesità e delle patologie ad essa correlate, integrando la sua azione sul sistema nervoso centrale con un'azione diretta negli organi periferici, regolando così il metabolismo del tessuto adiposo, l'accumulo di trigliceridi nel fegato, la funzionalità del pancreas e migliorando la sensibilità insulinica periferica.

I dati ottenuti in questo progetto di tesi non si sono limitati ai soli organi coinvolti nel metabolismo energetico, ma ad un'ampia varietà di organi periferici e di tipi cellulari diversi. In particolare, il trattamento con CNTF induce l'attivazione di STAT3 e p44/p42 MAPK nel tessuto muscolare cardiaco. In questa sede, è noto che le cellule esprimano il recettore CNTFR α (Sleeman et al. 2000) e studi precedenti dimostrano che attraverso l'attivazione di STAT3 il CNTF svolge un effetto cardio-protettivo nei cardiomiociti, stimolandone la proliferazione e il differenziamento cellulare (Bise, de Preux Charles, and Jazwinska 2019; Smith et al. 2004). Inoltre, nei cardiomiociti in coltura e nel tessuto cardiaco di topi *ob/ob* e *db/db* con ipertrofia ventricolare associata a leptino-resistenza, il trattamento con CNTF causa l'attivazione di STAT3 e p44/p42 MAPK sia *in vitro* che *in vivo* svolgendo un'azione cardio-protettiva in una patologia associata all'obesità (Raju et al. 2006).

Dai risultati qui ottenuti inoltre, il CNTF ha mostrato un'attivazione di STAT3 anche nella parete dell'esofago e soprattutto nella parete intestinale. Il ruolo preciso che il CNTF possa svolgere nella parete di questi organi non è nota, ma studi recenti dimostrano come l'attivazione di STAT3 da parte di altre citochine della famiglia di IL-6 sia fondamentale per il mantenimento dell'integrità della barriera gastro-intestinale (Nguyen, Putoczki, and Ernst 2015). L'immunoistochimica ha inoltre rivelato che il CNTF attiva STAT3 in numerosi organi che accolgono una popolazione di cellule del sistema immunitario come timo, milza e linfonodo. In questi organi infatti risiedono cellule linfocitarie, macrofagi e plasmacellule. In letteratura, il pathway JAK-STAT3 è spesso associato a proliferazione, differenziazione e attivazione di numerose cellule del sistema immunitario (Bharadwaj et al. 2020) ed è inoltre noto che numerose citochine della famiglia di IL-6, a cui il CNTF appartiene, siano coinvolte nella risposta immunitaria e nella regolazione dell'ematopoiesi (Hirano, Ishihara, and Hibi 2000). I dati qui descritti permettono inoltre di affermare che l'azione del CNTF si estende anche negli organi dell'apparato genitale e dell'apparato escretore; tra questi, è già noto che il testicolo e il rene esprimono il recettore CNTFR α (Sleeman et al. 2000).

I dati ottenuti indicano che nel testicolo di topo il CNTF attivi STAT3 e p44/p42 MAPK in cellule riconducibili per la loro morfologia alle cellule di

Sertoli. A sostegno di questo dato, uno studio *in vitro*, dimostra che CNTF e LIF, un'altra citochina della famiglia IL-6, sono in grado di stimolare la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule di Sertoli, promuovendo così l'inizio della spermatogenesi (De Miguel et al. 1996). È inoltre noto che P-STAT3 sia coinvolto nella spermatogenesi anche *in vivo* nel testicolo del topo, dove i suoi livelli sono alti nelle prime fasi della spermatogenesi in correlazione con elevati livelli di un altro fattore neurotrofico, il GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (Nagasawa et al. 2018).

Nel rene, l'azione del CNTF promuove l'attivazione sia di STAT3 che di p44/p42 MAPK; in particolare entrambi i signaling vengono attivati nei glomeruli, mentre nei tubuli renali è coinvolta solo l'attivazione di STAT3. Un'ipotesi interessante del possibile ruolo del CNTF nel rene può essere formulata grazie alla dimostrazione che *in vivo*, a seguito di un danno renale causato da un'ischemia, aumenta l'espressione del CNTF e del suo recettore in particolare nei tubuli renali, indicando come questo fattore neurotrofico possa anche comportarsi come fattore di crescita nel tessuto renale (Yang et al. 2001). Se in alcuni organi periferici qui descritti la possibile azione del CNTF è stata precedentemente ipotizzata e/o è noto che in alcuni di essi le cellule esprimano il recettore CNTFRα (Yang et al. 2001; Sleeman et al. 2000), in altri non è mai

stata studiata. I dati di immunoistochimica qui descritti quindi analizzano per

la prima volta l'azione del CNTF in organi quali le ghiandole salivari, le ghiandole bulbo uretrali, le vescichette seminali e organi dell'apparato respiratorio come bronchi e polmoni. Una così diffusa attivazione dei signaling qui studiati potrebbe trovare una spiegazione plausibile con quanto riportato in numerosi studi riguardo al CNTF ed altre citochine come IL-6: è stato dimostrato che queste molecole sono in grado di interagire con le cellule attraverso diversi meccanismi d'interazione con il recettore, un meccanismo definito "classico", che prevede il loro legame con il recettore α e seguente eterodimerizzazione di gp130, e un meccanismo alternativo descritto come "trans-signaling" (Rose-John 2018). Il CNTF infatti, insieme ad altre citochine della famiglia IL-6, è in grado di legarsi al suo recettore solubile per viaggiare nel torrente circolatorio e agire quindi sulle cellule che esprimono solo la subunità gp130 del recettore (Rose-John et al. 2007; Rose-John 2018; Kang et al. 2020; Murakami, Kamimura, and Hirano 2019). Il trans-signaling, nella famiglia delle citochine IL-6, è stato studiato in relazione a molteplici condizioni sia fisiologiche che patologiche: differenziamento cellulare, rimodellamento e rigenerazione dei tessuti, reclutamento delle cellule immunitarie, immunomodulazione, febbre, allergie, infiammazione cronica e oncogenesi (Jones and Jenkins 2018). È stato inoltre dimostrato nell'uomo che il CNTF sia in grado di legarsi anche al recettore α dell'IL-6 (Wagener et al.

2014; Schuster et al. 2003). Tale legame può offrire al CNTF la capacità di controllare processi cellulari correlati ad IL-6, non normalmente associati al suo coinvolgimento primario nel sistema nervoso, strettamente legati alla regolazione immunitaria (Schuster et al. 2003). La possibilità che il CNTF agisca su un ampio spettro di cellule target attraverso meccanismi come il transsignaling o il legame con IL-6Ra può avere un impatto importante in merito allo studio di questa citochina come possibile molecola terapeutica contro l'obesità e contro la SLA (Schuster et al. 2003; Pasquin, Sharma, and Gauchat 2015; Matthews and Febbraio 2008; Wagener et al. 2014). Inoltre, gli effetti collaterali associati alla somministrazione di CNTF ricombinante osservati in molteplici trials clinici (principalmente nausea, vomito, affaticamento, dolori muscolari, reazione locale nel sito dell'iniezione) più frequenti all'aumentare della dose somministrata, (Ettinger et al. 2003; Miller, Petajan, et al. 1996; Miller, Bryan, et al. 1996) potrebbero trovare una giustificazione attraverso questi meccanismi d'azione alternativi (Schuster et al. 2003; Pasquin, Sharma, and Gauchat 2015). Nel caso della somministrazione di Axokine, una forma di CNTF ricombinante umano la cui seguenza amminoacidica viene modificata per potenziarne l'efficacia, un importante effetto avverso deriva dallo sviluppo di anticorpi contro il farmaco (Preti 2003); la ragione di questo fenomeno potrebbe derivare dalla modifica nella seguenza amminoacidica o anche dalla stimolazione diretta del CNTF sul sistema immunitario (Duff and Baile 2003), dato in parte confermato dai risultati morfologici di questo progetto di tesi. Alla luce di queste considerazioni, la progettazione di una molecola sintetica CNTF-simile, con delle specifiche modifiche strutturali che la rendono specifica per il suo recettore α e incapace di effettuare il trans-signaling, potrebbe diventare uno strumento con un maggior profilo di sicurezza ed efficacia (Wagener et al. 2014; Pasquin, Sharma, and Gauchat 2015; Kraakman et al. 2015; Jostock et al. 2001).

7. Conclusioni

Il CNTF è un fattore neurotrofico, conosciuto per la sua azione neuroprotettiva sia nel sistema nervoso centrale che periferico e successivamente studiato anche per il suo ruolo nel bilancio energetico. Il CNTF infatti attiva i suoi signaling intracellulari nei principali organi coinvolti nella regolazione del metabolismo, dove svolge un potente effetto contro l'obesità e le malattie ad essa correlate. Il CNTF inoltre, analogamente a quanto avviene nel sistema nervoso, potrebbe svolgere una funzione trofica e protettiva anche nei confronti di organi periferici non coinvolti nel metabolismo energetico, in cui promuove principalmente il differenziamento e la proliferazione cellulare. La capacità del CNTF di legarsi al suo recettore solubile, amplia ancora di più il numero di possibili target cellulari e le corrispondenti funzioni. Questo progetto di tesi fornisce per la prima volta una mappatura dettagliata dei citotipi negli organi periferici che rispondono alla somministrazione di CNTF *in vivo* nel topo. Nello specifico, il CNTF attiva il pathway JAK-STAT3 e p44/p42 MAPK negli organi studiati, evidenziando la sua interazione con vari tipi cellulari e ipotizzando quindi molteplici funzioni ad oggi non note. Questo progetto potrebbe essere in futuro ampliato, valutando altri possibili signaling, noti per essere attivati dal CNTF a livello centrale e in alcuni organi periferici (es. AKT, AMPK o altre proteine STAT) e studiando con doppie marcature e attraverso l'utilizzo di microscopia confocale a fluorescenza quali citotipi nello specifico rispondono a questa citochina dalle molteplici azioni.
8. Bibliografia

Adler, R., K. B. Landa, M. Manthorpe, and S. Varon. 1979. 'Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons', *Science*, 204: 1434-6.

- Askvig, J. M., and J. A. Watt. 2015. 'The MAPK and PI3K pathways mediate CNTF-induced neuronal survival and process outgrowth in hypothalamic organotypic cultures', *J Cell Commun Signal*, 9: 217-31.
- Bachoud-Levi, A. C., N. Deglon, J. P. Nguyen, J. Bloch, C. Bourdet, L. Winkel, P. Remy, M. Goddard, J. P. Lefaucheur, P. Brugieres, S. Baudic, P. Cesaro, M. Peschanski, and P. Aebischer. 2000. 'Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF', *Hum Gene Ther*, 11: 1723-9.
- Baratta, J. L., A. Ngo, B. Lopez, N. Kasabwalla, K. J. Longmuir, and R. T. Robertson. 2009. 'Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis', *Histochem Cell Biol*, 131: 713-26.
- Bezdjian, A., V. J. Kraaijenga, D. Ramekers, H. Versnel, H. G. Thomeer, S. F. Klis, and W. Grolman. 2016. 'Towards Clinical Application of Neurotrophic Factors to the Auditory Nerve; Assessment of Safety and Efficacy by a Systematic Review of Neurotrophic Treatments in Humans', *Int J Mol Sci*, 17.
- Bharadwaj, U., M. M. Kasembeli, P. Robinson, and D. J. Tweardy. 2020. 'Targeting Janus Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Treat Inflammation, Fibrosis, and Cancer: Rationale, Progress, and Caution', *Pharmacol Rev*, 72: 486-526.
- Bise, T., A. S. de Preux Charles, and A. Jazwinska. 2019. 'Ciliary neurotrophic factor stimulates cardioprotection and the proliferative activity in the adult zebrafish heart', *NPJ Regen Med*, 4: 2.
- Cannon, B., and J. Nedergaard. 2004. 'Brown adipose tissue: function and physiological significance', *Physiol Rev*, 84: 277-359.
- Cesta, M. F. 2006. 'Normal structure, function, and histology of the spleen', *Toxicol Pathol*, 34: 455-65.
- Chen, X., Z. Mao, S. Liu, H. Liu, X. Wang, H. Wu, Y. Wu, T. Zhao, W. Fan, Y. Li, D. T. Yew, P. M. Kindler, L. Li, Q. He, L. Qian, X. Wang, and M. Fan. 2005. 'Dedifferentiation of adult human myoblasts induced by ciliary neurotrophic factor in vitro', *Mol Biol Cell*, 16: 3140-51.
- Cinti, S. 2018. 'Adipose Organ Development and Remodeling', Compr Physiol, 8: 1357-431.
- Cui, M. X., L. N. Yang, X. X. Wang, L. Wang, R. L. Li, W. Han, and Y. J. Wu. 2017. 'Alleviative effect of ciliary neurotrophic factor analogue on high fat-induced hepatic steatosis is partially independent of the central regulation', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 44: 395-402.
- Dallner, C., A. G. Woods, T. Deller, M. Kirsch, and H. D. Hofmann. 2002. 'CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain', *Glia*, 37: 374-8.
- Davis, S., T. H. Aldrich, N. Y. Ip, N. Stahl, S. Scherer, T. Farruggella, P. S. DiStefano, R. Curtis, N. Panayotatos, H. Gascan, and et al. 1993. 'Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses', *Science*, 259: 1736-9.
- De Miguel, M. P., M. De Boer-Brouwer, R. Paniagua, R. van den Hurk, D. G. De Rooij, and F. M. Van Dissel-Emiliani. 1996. 'Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system', *Endocrinology*, 137: 1885-93.
- Duff, E., and C. A. Baile. 2003. 'Ciliary neurotrophic factor: a role in obesity?', *Nutr Rev*, 61: 423-6.

Ettinger, M. P., T. W. Littlejohn, S. L. Schwartz, S. R. Weiss, H. H. McIlwain, S. B. Heymsfield, G. A. Bray, W. G. Roberts, E. R. Heyman, N. Stambler, S. Heshka, C. Vicary, and H. P. Guler. 2003. 'Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study', *JAMA*, 289: 1826-32.

Friedman, J. 2016. 'The long road to leptin', J Clin Invest, 126: 4727-34.

- Giordano, V., G. De Falco, R. Chiari, I. Quinto, P. G. Pelicci, L. Bartholomew, P. Delmastro, M. Gadina, and G. Scala. 1997. 'Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase', *J Immunol*, 158: 4097-103.
- Gloaguen, I., P. Costa, A. Demartis, D. Lazzaro, A. Di Marco, R. Graziani, G. Paonessa, F. Chen, C. I. Rosenblum, L. H. Van der Ploeg, R. Cortese, G. Ciliberto, and R. Laufer. 1997.
 'Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance', *Proc Natl Acad Sci US A*, 94: 6456-61.
- Griswold, M. D. 2018. '50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells', *Biol Reprod*, 99: 87-100.
- Guillot, L., N. Nathan, O. Tabary, G. Thouvenin, P. Le Rouzic, H. Corvol, S. Amselem, and A. Clement. 2013. 'Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis', *Int J Biochem Cell Biol*, 45: 2568-73.
- Guthrie, K. M., A. G. Woods, T. Nguyen, and C. M. Gall. 1997. 'Astroglial ciliary neurotrophic factor mRNA expression is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus', *J Comp Neurol*, 386: 137-48.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. 'Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation', *Biochem J*, 374: 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. 'Interleukin-6type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway', *Biochem J*, 334 (Pt 2): 297-314.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. 'Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors', *Oncogene*, 19: 2548-56.
- Jones, S. A., and B. J. Jenkins. 2018. 'Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer', *Nat Rev Immunol*, 18: 773-89.
- Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath, and S. Rose-John. 2001. 'Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses', *Eur J Biochem*, 268: 160-7.
- Kang, S., M. Narazaki, H. Metwally, and T. Kishimoto. 2020. 'Historical overview of the interleukin-6 family cytokine', *J Exp Med*, 217.
- Kraakman, M. J., H. L. Kammoun, T. L. Allen, V. Deswaerte, D. C. Henstridge, E. Estevez, V. B. Matthews, B. Neill, D. A. White, A. J. Murphy, L. Peijs, C. Yang, S. Risis, C. R. Bruce, X. J. Du, A. Bobik, R. S. Lee-Young, B. A. Kingwell, A. Vasanthakumar, W. Shi, A. Kallies, G. I. Lancaster, S. Rose-John, and M. A. Febbraio. 2015. 'Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance', *Cell Metab*, 21: 403-16.
- Lee, D. A., L. Gross, D. A. Wittrock, and A. J. Windebank. 1996. 'Localization and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in postmortem sciatic nerve from patients with motor neuron disease and diabetic neuropathy', *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 915-23.
- Lee, M. Y., T. Deller, M. Kirsch, M. Frotscher, and H. D. Hofmann. 1997. 'Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion', *J Neurosci*, 17: 1137-46.
- Lee, M. Y., H. D. Hofmann, and M. Kirsch. 1997. 'Expression of ciliary neurotrophic factor receptor-alpha messenger RNA in neonatal and adult rat brain: an in situ hybridization study', *Neuroscience*, 77: 233-46.

- Lin, L. F., D. Mismer, J. D. Lile, L. G. Armes, E. T. Butler, 3rd, J. L. Vannice, and F. Collins. 1989. 'Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF)', *Science*, 246: 1023-5.
- Longuet, C., C. Broca, S. Costes, E. H. Hani, D. Bataille, and S. Dalle. 2005. 'Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans', *Endocrinology*, 146: 643-54.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle, and N. J. Maihle. 1992. 'Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor', *Cytokine*, 4: 96-100.
- MacLennan, A. J., K. L. Neitzel, B. K. Devlin, J. Garcia, G. A. Hauptman, I. Gloaguen, A. Di Marco, R. Laufer, and N. Lee. 2000. 'In vivo localization and characterization of functional ciliary neurotrophic factor receptors which utilize JAK-STAT signaling', *Neuroscience*, 99: 761-72.
- Manthorpe, M., S. D. Skaper, L. R. Williams, and S. Varon. 1986. 'Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor', *Brain Res*, 367: 282-6.
- Marz, P., S. Ozbek, M. Fischer, N. Voltz, U. Otten, and S. Rose-John. 2002. 'Differential response of neuronal cells to a fusion protein of ciliary neurotrophic factor/soluble CNTF-receptor and leukemia inhibitory factor', *Eur J Biochem*, 269: 3023-31.
- Matthews, V. B., and M. A. Febbraio. 2008. 'CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease?', *J Mol Med (Berl)*, 86: 353-61.
- Miller, R. G., W. W. Bryan, M. A. Dietz, T. L. Munsat, J. H. Petajan, S. A. Smith, and J. C. Goodpasture. 1996. 'Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis', *Neurology*, 47: 1329-31.
- Miller, R. G., J. H. Petajan, W. W. Bryan, C. Armon, R. J. Barohn, J. C. Goodpasture, R. J. Hoagland, G. J. Parry, M. A. Ross, and S. C. Stromatt. 1996. 'A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group', *Ann Neurol*, 39: 256-60.
- Monville, C., M. Coulpier, L. Conti, C. De-Fraja, P. Dreyfus, C. Fages, D. Riche, M. Tardy, E. Cattaneo, and M. Peschanski. 2001. 'Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor', *Mol Cell Neurosci*, 17: 373-84.
- Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1993. 'The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding', *Eur J Immunol*, 23: 473-80.
- Murakami, M., D. Kamimura, and T. Hirano. 2019. 'Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines', *Immunity*, 50: 812-31.
- Nagasawa, K., K. Imura-Kishi, A. Uchida, R. Hiramatsu, M. Kurohmaru, and Y. Kanai. 2018. 'Regionally distinct patterns of STAT3 phosphorylation in the seminiferous epithelia of mouse testes', *Mol Reprod Dev*, 85: 262-70.
- Nguyen, P. M., T. L. Putoczki, and M. Ernst. 2015. 'STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease?', *J Interferon Cytokine Res*, 35: 340-50.
- Oppenheim, R. W., D. Prevette, Q. W. Yin, F. Collins, and J. MacDonald. 1991. 'Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor', *Science*, 251: 1616-8.
- Ott, V., M. Fasshauer, A. Dalski, H. H. Klein, and J. Klein. 2002. 'Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis', *J Endocrinol*, 173: R1-8.
- Pang, L., J. Huynh, M. G. Alorro, X. Li, M. Ernst, and A. L. Chand. 2021. 'STAT3 Signalling via the IL-6ST/gp130 Cytokine Receptor Promotes Epithelial Integrity and Intestinal Barrier Function during DSS-Induced Colitis', *Biomedicines*, 9.

- Pasquin, S., M. Sharma, and J. F. Gauchat. 2015. 'Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies', *Cytokine Growth Factor Rev*, 26: 507-15.
- Pearse, G. 2006. 'Normal structure, function and histology of the thymus', *Toxicol Pathol*, 34: 504-14.
- Perugini, J., E. Di Mercurio, G. Tossetta, I. Severi, F. Monaco, M. Reguzzoni, M. Tomasetti, C. Dani, S. Cinti, and A. Giordano. 2019. 'Biological Effects of Ciliary Neurotrophic Factor on hMADS Adipocytes', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 768.
- Preti, A. 2003. 'Axokine (Regeneron)', IDrugs, 6: 696-701.
- Raju, S. V., M. Zheng, K. H. Schuleri, A. C. Phan, D. Bedja, R. M. Saraiva, O. Yiginer, K. Vandegaer, K. L. Gabrielson, P. O'Donnell C, D. E. Berkowitz, L. A. Barouch, and J. M. Hare. 2006. 'Activation of the cardiac ciliary neurotrophic factor receptor reverses left ventricular hypertrophy in leptin-deficient and leptin-resistant obesity', *Proc Natl Acad Sci US A*, 103: 4222-7.
- Rezende, L. F., G. J. Santos, J. C. Santos-Silva, E. M. Carneiro, and A. C. Boschero. 2012. 'Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects non-obese Swiss mice against type 2 diabetes by increasing beta cell mass and reducing insulin clearance', *Diabetologia*, 55: 1495-504.
- Rezende, L. F., A. S. Vieira, A. Negro, F. Langone, and A. C. Boschero. 2009. 'Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis', *Cytokine*, 46: 65-71.
- Rose-John, S. 2018. 'Interleukin-6 Family Cytokines', Cold Spring Harb Perspect Biol, 10.
- Rose-John, S., G. H. Waetzig, J. Scheller, J. Grotzinger, and D. Seegert. 2007. 'The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches', *Expert Opin Ther Targets*, 11: 613-24.
- Roskoski, R., Jr. 2012. 'ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation', *Pharmacol Res*, 66: 105-43.
- Rudge, J. S., D. Morrissey, R. M. Lindsay, and E. M. Pasnikowski. 1994. 'Regulation of ciliary neurotrophic factor in cultured rat hippocampal astrocytes', *Eur J Neurosci*, 6: 218-29.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John. 2011. 'The pro- and antiinflammatory properties of the cytokine interleukin-6', *Biochim Biophys Acta*, 1813: 878-88.
- Schuster, B., M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhard, V. Matthews, J. Grotzinger, S. Rose-John, and K. J. Kallen. 2003. 'Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF', *J Biol Chem*, 278: 9528-35.
- Sendtner, M., P. Carroll, B. Holtmann, R. A. Hughes, and H. Thoenen. 1994. 'Ciliary neurotrophic factor', J Neurobiol, 25: 1436-53.
- Sendtner, M., H. Schmalbruch, K. A. Stockli, P. Carroll, G. W. Kreutzberg, and H. Thoenen. 1992. 'Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy', *Nature*, 358: 502-4.
- Severi, I., M. R. Carradori, T. Lorenzi, A. Amici, S. Cinti, and A. Giordano. 2012. 'Constitutive expression of ciliary neurotrophic factor in mouse hypothalamus', *J Anat*, 220: 622-31.
- Severi, I., J. Perugini, E. Mondini, A. Smorlesi, A. Frontini, S. Cinti, and A. Giordano. 2013. 'Opposite effects of a high-fat diet and calorie restriction on ciliary neurotrophic factor signaling in the mouse hypothalamus', *Front Neurosci*, 7: 263.
- Severi, I., M. Senzacqua, E. Mondini, F. Fazioli, S. Cinti, and A. Giordano. 2015. 'Activation of transcription factors STAT1 and STAT5 in the mouse median eminence after systemic ciliary neurotrophic factor administration', *Brain Res*, 1622: 217-29.
- Sleeman, M. W., K. D. Anderson, P. D. Lambert, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand. 2000. 'The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha', *Pharm Acta Helv*, 74: 265-72.

- Sleeman, M. W., K. Garcia, R. Liu, J. D. Murray, L. Malinova, M. Moncrieffe, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand. 2003. 'Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice', *Proc Natl Acad Sci U S* A, 100: 14297-302.
- Smith, R. M., N. Suleman, L. Lacerda, L. H. Opie, S. Akira, K. R. Chien, and M. N. Sack. 2004. 'Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning', *Cardiovasc Res*, 63: 611-6.
- Steinberg, G. R., M. J. Watt, M. Ernst, M. J. Birnbaum, B. E. Kemp, and S. B. Jorgensen. 2009. 'Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity', *Diabetes*, 58: 829-39.
- Stockli, K. A., L. E. Lillien, M. Naher-Noe, G. Breitfeld, R. A. Hughes, M. C. Raff, H. Thoenen, and M. Sendtner. 1991. 'Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain', *J Cell Biol*, 115: 447-59.
- Stockli, K. A., F. Lottspeich, M. Sendtner, P. Masiakowski, P. Carroll, R. Gotz, D. Lindholm, and H. Thoenen. 1989. 'Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor', *Nature*, 342: 920-3.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe, and R. I. Tepper. 1995. 'Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R', *Cell*, 83: 1263-71.
- Treuting P. M., Dintzis S.M. 2012. 'Salivary Glands', *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*, Comparative Anatomy and Histology - A Mouse and Human Atlas 111-20.
- Wagener, E. M., M. Aurich, S. Aparicio-Siegmund, D. M. Floss, C. Garbers, K. Breusing, B. Rabe, R. Schwanbeck, J. Grotzinger, S. Rose-John, and J. Scheller. 2014. 'The amino acid exchange R28E in ciliary neurotrophic factor (CNTF) abrogates interleukin-6 receptordependent but retains CNTF receptor-dependent signaling via glycoprotein 130 (gp130)/leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)', *J Biol Chem*, 289: 18442-50.
- Watt, M. J., A. Hevener, G. I. Lancaster, and M. A. Febbraio. 2006. 'Ciliary neurotrophic factor prevents acute lipid-induced insulin resistance by attenuating ceramide accumulation and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in peripheral tissues', *Endocrinology*, 147: 2077-85.
- Willard-Mack, C. L. 2006. 'Normal structure, function, and histology of lymph nodes', *Toxicol Pathol*, 34: 409-24.
- Xu, B., M. G. Dube, P. S. Kalra, W. G. Farmerie, A. Kaibara, L. L. Moldawer, D. Martin, and S. P. Kalra. 1998. 'Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotropic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin', *Endocrinology*, 139: 466-73.
- Yang, C. W., S. W. Lim, K. W. Han, H. J. Ahn, J. H. Park, Y. H. Kim, M. Kirsh, J. H. Cha, J. H. Park, Y. S. Kim, J. Kim, and B. K. Bang. 2001. 'Upregulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha in rat kidney with ischemia-reperfusion injury', *J Am Soc Nephrol*, 12: 749-57.
- Zvonic, S., P. Cornelius, W. C. Stewart, R. L. Mynatt, and J. M. Stephens. 2003. 'The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes', *J Biol Chem*, 278: 2228-35.