

**RUOLO DELL'IGF1 NELLO SVILUPPO E PROGRESSIONE DELLA COLESTASI**

**SPERIMENTALE ED UMANA**

**DOTT. GUIDO CARPINO, DIP. DI ANATOMIA UMANA, "LA SAPIENZA" UNIVERSITÀ DI ROMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN EPATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA**

**XIX CICLO**

**DIPARTIMENTO DI ANATOMIA UMANA, "LA SAPIENZA" UNIVERSITÀ DI ROMA**

**DIRETTORE: PROF. EUGENIO GAUDIO**

**TUTORE SCIENTIFICO: PROF. EUGENIO GAUDIO, DIP. DI ANATOMIA UMANA, "LA**

**SAPIENZA" UNIVERSITÀ DI ROMA**

**DOCENTI ESAMINATORI: PROF. DOMENICO ALVARO, DIP. DI MEDICINA CLINICA,**

**DIVISIONE DI GASTROENTEROLOGIA, UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"; PROF. SSA**

**ADELAIDE CONTINEZA, PROF. GIUSEPPE RICCIARDI, DIP. DI SCIENZE CHIRURGICHE,**

**UNIVERSITÀ STATALE, L'AQUILA**

**ABSTRACT**

**Background:** Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) is a circulating hormone mainly produced by hepatocytes under the control of pituitary gland through the Growth Hormone (GH). The proliferative and anti-apoptotic effects of IGF1 are mediated by the interaction with a specific receptor (IGF1-R) and by the further activation of the intracellular PI3K/AKT pathway. The aim of the present study is to evaluate the role of the IGF1 pathway in normal liver and during cholestasis.

**Materials and methods:** the expression of cytokeratin 19, IGF1, IGF1-R, pAKT, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Bax (pro-apoptotic protein), Bcl<sub>2</sub> (anti-apoptotic) and Tunel was evaluated by immunohistochemistry (IHC) in cholangiocytes of normal (N= 6) and bile duct-ligated

(BDL; N= 6) rat liver and in human liver biopsies of patients with primary biliary cirrhosis (PBC; n= 35) and normal subjects (n= 5).

**Results:** in normal rat livers, cholangiocytes are rarely positive for IGF1 and IGF1-R while, in BDL rat livers, the proliferating cholangiocytes highly express IGF1 and IGF1-R. In normal human liver, cholangiocytes are almost negative for IGF1, IGF1-R and pAKT. In PBC, interlobular bile ducts are positive for IGF1, IGF1-R and pAKT and the percentage of positive cholangiocytes increases from PBC stage I to PBC stage IV. In PBC stages III and IV, the IGF1, IGF1-R and pAKT expression is directly correlated with the anti-apoptotic protein Bcl<sub>2</sub> and inversely correlated with the pro-apoptotic protein Bax, the Bax/ Bcl<sub>2</sub> ratio and the Tunel positivity.

**Discussion:** during cholestasis, cholangiocytes start to produce IGF1 and to express IGF1-R. The interaction of IGF1 with its receptor leads to the activation of PI3K/AKT which favours cell survival modulating the mitochondrial apoptotic pathway. In PBC, IGF1 system represents a major mechanism of cholangiocytes survival and resistance to damage and apoptosis.

## INTRODUZIONE

### Insulin-like Growth Factors (IGFs)

I fattori di crescita insulino-simili (Insulin-like Growth Factors: IGFs) partecipano allo sviluppo ed alla funzione di quasi tutti gli organi del corpo (Daughaday WH, Rotwein P 1989; Le Roith D. 1997). Tali fattori sono una componente fondamentale del sistema che controlla la crescita ed il metabolismo e rappresentano gli effettori intermedi dell'ormone della crescita (GH) (Yakar et al 2005; Rosenfeld RG 2003). La famiglia delle IGFs è composta da due proteine: l'IGF1 ha un ruolo predominante nel regolare la crescita dopo la nascita e l'IGF2 la cui funzione fisiologica è ancora da chiarire (Le Roith D. 1997). Inoltre la famiglia delle IGFs partecipa al controllo dello sviluppo embriologico (Baker j et al 1993).

Recentemente è emerso il ruolo di IGF1 ed IGF2 come fattori capaci di agire sulla sopravvivenza e sulla proliferazione delle cellule in vitro (Alvaro et al 2006; Kooijman R 2006). Tali fattori di crescita sembrano in grado di ritardare la morte cellulare programmata influenzando il pathway mitocondriale (intrinseco) dell'apoptosi ovvero antagonizzando l'effetto apoptotico delle citochine citotossiche (pathway estrinseco dell'apoptosi) (Furstenberger G, Senn HJ 2002; Kurmasheva RT, Houghton PJ 2006). IGFs è inoltre chiamato in causa nello sviluppo di numerosi tumori umani (Alvaro et al 2006; Furstenberger G, Senn HJ 2002; Kurmasheva RT, Houghton PJ 2006; Kooijman R 2006).

L'esistenza dell'IGF1 fu inizialmente proposta negli anni '50 quando fu chiaro che l'ormone della crescita non agiva direttamente sull'incorporazione di solfato nella cartilagine durante l'accrescimento ma che i suoi effetti erano mediati da un fattore sierico (Murphy WR et al 1956; Denko CW, Bergenstal DM 1955). Tale fattore fu inizialmente denominato "sulfation factor" e successivamente "somatomedina" per sottolinearne il ruolo di mediatore dell'azione del GH (ormone somatotropo) (Daughaday WH et al 1972).

Nel 1978 furono per la prima volta purificati l'IGF1 e l'IGF2 che devono il loro nome all'omologia strutturale con l'insulina e alla loro capacità di stimolare l'uptake del glucosio negli adipociti e nelle cellule muscolari (Rinderknecht E, Humbel RE 1978; Blundell TL et al 1978). Solo successivamente fu dimostrato che l'IGF1 corrispondeva alla somatomedina prodotta e rilasciata in seguito a stimolazione da parte del GH (Klapper DG et al 1983).

In questo periodo fu formulata la "*Somatomedin Hypothesis*" secondo la quale l'azione del GH sulla crescita verrebbe mediata unicamente dall'IGF1 prodotto a livello epatico; in particolare, secondo tale ipotesi, il fegato rappresenta l'organo bersaglio del GH capace di indurre la sintesi da parte degli epatociti di IGF1 ed il suo successivo rilascio nel sangue (Le Roith et al 2001). L'IGF1 sierico, con un meccanismo endocrino, agirebbe a sua volta su numerosi organi (osso, cartilagine, etc.) stimolandone la crescita. L'IGF1 circolante, inoltre, sarebbe in grado di ridurre, mediante un feedback negativo, l'ulteriore rilascio di GH dall'ipofisi (Le Roith et al 2001).

Tale ipotesi fu modificata in seguito alla scoperta che IGFs venivano prodotti non solo nel fegato ma in numerosi altri tessuti del corpo dove erano in grado di agire localmente con effetti di tipo autocrino/paracrino (Le Roith et al 2001, D'Ercole et al 1980, Isaksson OG et al 1982).

Green et al nel 1985 proposero la "*dual effector hypothesis*" per spiegare l'azione dell'asse GH/IGF1 sulla crescita dell'osso. Secondo tale teoria, il GH sarebbe responsabile direttamente della stimolazione dello sviluppo delle ossa ed inoltre sarebbe in grado di stimolare localmente la sintesi di IGF1 che avrebbe un'azione autocrina/paracrina sui condrociti. Di fatto tale ipotesi riduce l'importanza endocrina della IGF1 circolante prodotto dal fegato (Green et al 1985; Le Roith et al 2001).

Recenti studi hanno però sottolineato il ruolo fondamentale posseduto dall'IGF1 circolante. In particolare la creazione di topi knock-out per il gene dell'IGF1 e per il gene dell'ALS (Acid-Labile Subunit, una delle proteine a cui l'IGF1 circolante è legato nel siero) ha permesso di notare

che una riduzione dell'85-90% dei livelli sierici di IGF1 comporta un'importante riduzione della crescita post-natale (Yakar S et al 2005, 1999; Kooijman R 2006; Sjogren K et al 1999). Pertanto ad oggi è largamente accettato che l'IGF1 è in grado di agire sia come fattore endocrino sia localmente come fattore paracrino ed autocrino (Kooijman R 2006).

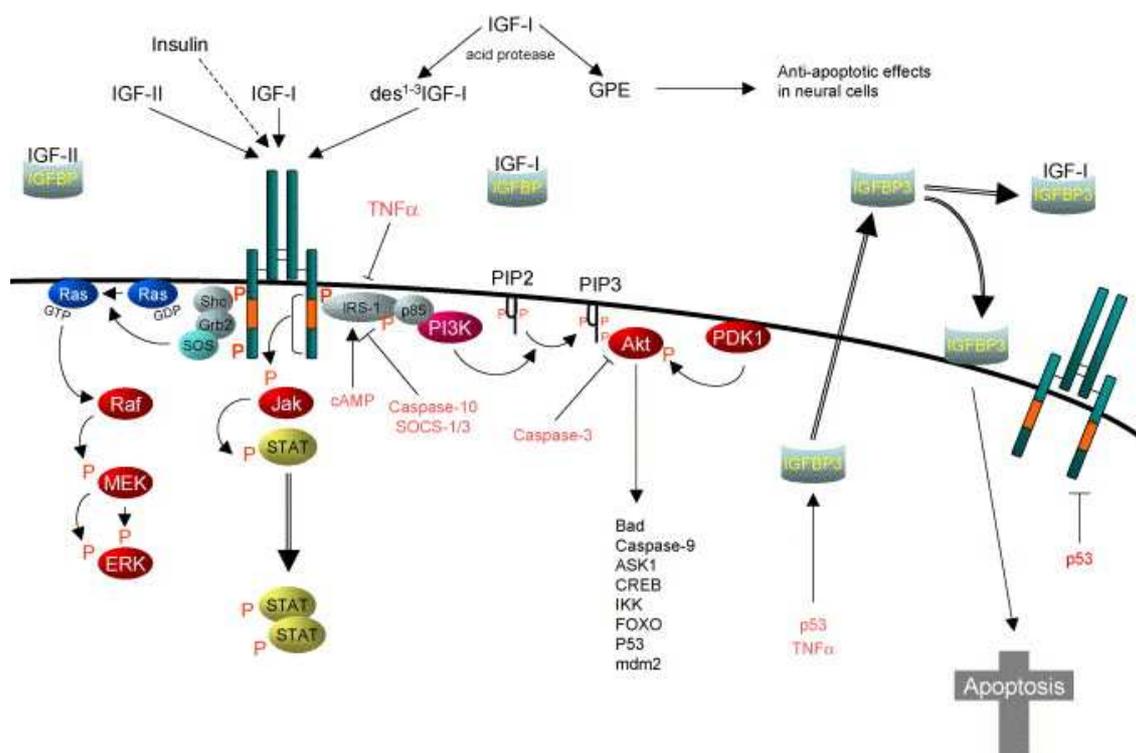
### Elementi della famiglia dell'IGF

La famiglia dell'IGF è composta da tre ormoni peptidici (insulina, IGF1 ed IGF2), da sei binding proteins (IGFBP1-6) e da tre recettori di membrana che mediano l'azione dello specifico ligando (insulin-receptor, IGF1-R ed IGF2-R) (Le Roith et al 2001).

Insulina, IGF1 ed IGF2 hanno circa il 50% dei loro amminoacidi in comune. L'insulina è sintetizzata nelle cellule beta del pancreas come proinsulina che viene successivamente clivata formando insulina e peptide C. IGF1 e IGF2 sono prodotti principalmente dagli epatociti e circolano nel sangue legati a binding proteins (IGFBPs) che mediano la loro azione a livello tissutale (Daughaday WH, Rotwein P 1989; Jones JJ et al 1995).

Il recettore dell'IGF1 e quello dell'insulina sono molto simili e mostrano circa il 60% di omologia nella struttura primaria (Ullrich A et al 1986). Entrambi i recettori sono costituiti da due subunità alfa, localizzate interamente sul versante extracellulare della membrana plasmatica e da due subunità beta che, dopo aver attraversato la membrana citoplasmatica, si localizzano principalmente sul versante intracellulare. Le due subunità alfa mediano il legame con il ligando mentre le subunità beta contengono regioni ad attività tirosin-kinasica e residui tirosinici che vengono fosforilati in seguito all'attivazione del recettore. L'attivazione del recettore e la fosforilazione dei residui tirosinici delle subunità beta sono responsabili della trasduzione intracitoplasmatica del messaggio (*Figura 1*) mediante il reclutamento di una serie di proteine che coinvolgono principalmente i pathways della fosfatidil inositolo-3 chinasi (PI3K), delle MAP chinasi e di JAK/STAT (Steele-Perkins G et al 1988; Sasaki N et al 1985; Le Roith et al 2001).

L'esistenza di sei IGF Binding Proteins (IGFBPs) rende il sistema dell'IGF molto più complesso. Le IGFBPs vengono principalmente prodotte dal fegato e sono capaci di agire come fattori endocrini; inoltre possono essere espresse da numerose altre cellule in organi diversi dal fegato ed agire con un meccanismo paracrino ed autocrino (Kooijman R 2006, Firth SM, Baxter RC 2002). Tali proteine, pur non presentando omologia con i recettori per insulina, IGF1 ed IGF2, sono capaci di legare IGF1 ed IGF2 con un'affinità maggiore degli specifici recettori (Kooijman R 2006, Firth SM, Baxter RC 2002). Di conseguenza, la maggior parte (99%) dell'IGF1 circolante è legato alle IGFBPs; in particolare l'80% di IGF1 circolante forma un complesso ternario con IGFBP-3 e ALS (acid-labile subunit) prodotte entrambe nel fegato. Le binding proteins hanno la funzione di prolungare l'emivita dell'IGF1 nel sangue e di regolarne la distribuzione a livello tissutale e recettoriale (Kooijman R 2006, Firth SM, Baxter RC 2002).



**Figura 1.** IGF1-R e pathway intracitoplasmatici di trasduzione del segnale coinvolti in seguito all'attivazione del recettore; ruolo delle IGFBPs (tratta da Kooijman R 2006).

### Apoptosi e IGFs

L'apoptosi è la forma più importante di morte cellulare programmata ed è fondamentale nella funzione degli organismi pluricellulari per eliminare o rimuovere le cellule non più necessarie. È un processo programmato e finemente regolato ed è fondamentale durante lo sviluppo dell'organismo (Lawen A 2003; Kooijman R 2006). Nei tessuti adulti, l'omeostasi è ottenuta dal bilanciamento tra proliferazione ed apoptosi cellulare; pertanto la fine regolazione dei processi apoptotici è fondamentale per le funzioni fisiologiche tissutali (Savill J 1997).

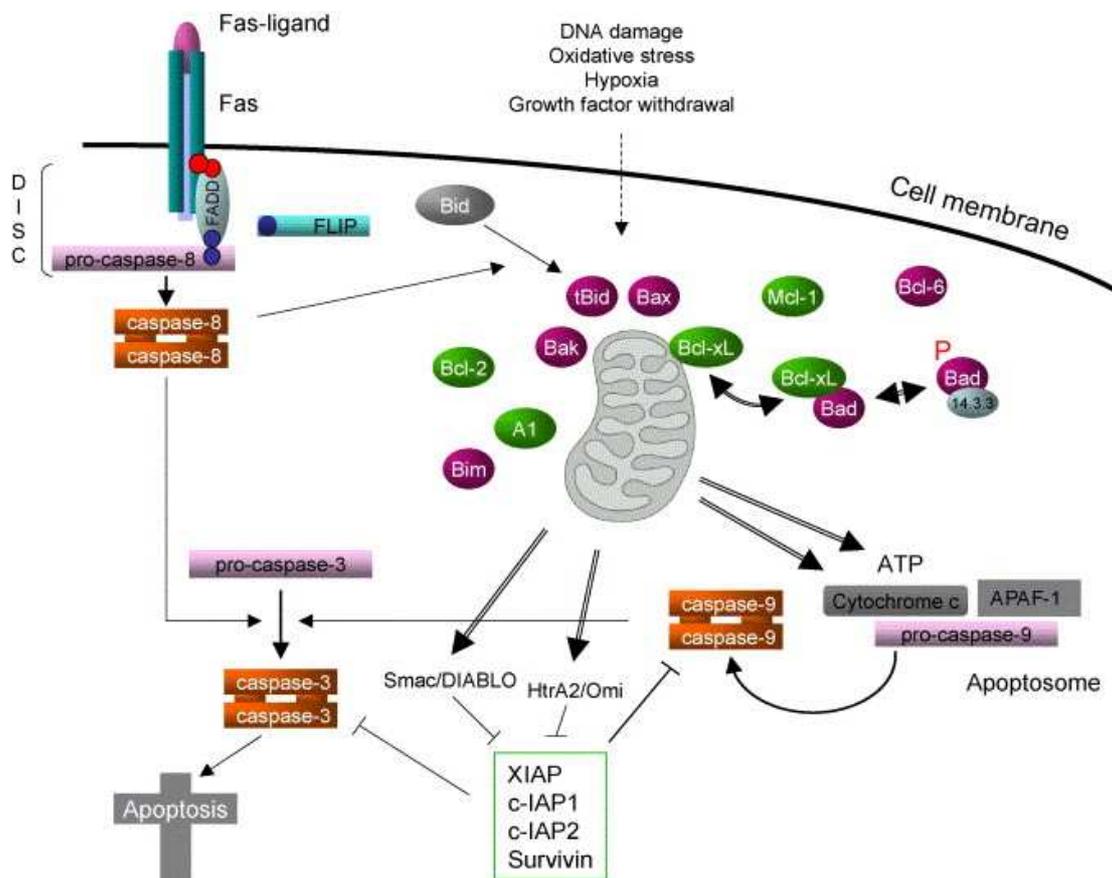
Le caspasi sono enzimi proteolitici che hanno il ruolo chiave nella trasduzione del segnale e nell'esecuzione dell'apoptosi (Degterev A et al 2003). Tali proteine sono sintetizzate come precursori inattivi e vengono attivate mediante clivaggio proteolitico. Vi sono due pathways interconnessi capaci di attivare le caspasi e di dare inizio alla cascata di reazioni che conduce all'apoptosi (*Figura 2*, Kooijman R 2006).

Il *pathway estrinseco dell'apoptosi* viene attivato attraverso specifici recettori di membrana (death-inducing receptors). Tali recettori possono rispondere a segnali intercellulari del tipo contatto cellula-cellula (Fas/Fas-ligando) oppure a mediatori solubili (per esempio Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ). L'attivazione del pathway estrinseco determina una cascata di reazioni che, passando attraverso il reclutamento delle caspasi 8 e 10, giunge infine ad attivare la caspasi 3 responsabile dell'induzione della morte cellulare programmata (Thorburn A 2004).

Il *pathway intrinseco dell'apoptosi* è chiamato in causa in seguito a danneggiamento del DNA, stress ossidativo, ipossia e privazione di fattori di crescita. Tale sistema situato a livello della membrana mitocondriale è controllato da una serie di proteine che fanno parte della superfamiglia di Bcl<sub>2</sub>. Alcune proteine di questa superfamiglia possiedono un'azione anti-apoptotica (Bcl<sub>2</sub>, Bcl-X<sub>1</sub>, mcl-1) mentre altre hanno un'azione pro-apoptotica (Bax, Bid, Bad) e sono in grado di distruggere la membrana mitocondriale. La rottura della membrana mitocondriale

innesca l'attivazione della caspasi 9 che agisce sulle caspasi 3, 6 e 7 con l'effetto finale della morte cellulare. Il bilanciamento dell'attività delle proteine pro- ed anti-apoptotiche della superfamiglia di Bcl<sub>2</sub> è responsabile della successiva attivazione delle caspasi (Van Gurp M et al 2003).

I due pathway sono in connessione mediante la caspasi-8 (sistema estrinseco) capace di attivare Bid (sistema intrinseco) (Kooijman R 2006).



**Figura 2.** Pathway estrinseco ed intrinseco dell'apoptosi e loro interconnessione (tratta da Kooijman R 2006)

L'IGF1 attraverso il suo recettore è in grado di agire sulle proteine che regolano l'apoptosi. In particolare, l'attivazione del pathway PI3K/pAKT gioca un ruolo chiave in quanto pAKT è capace sia di modulare l'espressione/attivazione delle proteine del pathway intrinseco sia di agire sull'apoptosi mediata da Fas-ligando e TNF (sistema estrinseco). Inoltre anche l'attivazione del sistema delle MAP chinasi da parte di IGF1 è in grado di agire sui processi apoptotici (Kurnasheva RT, Houghton PJ 2006; Kooijman R 2006).

### I colangiociti e le vie biliari intraepatiche

Le vie biliari intraepatiche rappresentano quella parte delle vie biliari che, originando a fondo cieco con i canalicoli biliari, terminano a livello delle vie biliari extraepatiche (Robert SK et al 1997, Kanno et al 2000). I canalicoli biliari sono formati dalla giustapposizione di due docce presenti sulle pareti cellulari dei poli biliari di due epatociti adiacenti. Ai canalicoli biliari fanno seguito i canali di Hering la cui parete è costituita in parte da epatociti ed in parte da colangiociti. I canali di Hering si continuano nei duttuli biliari che sono completamente delimitati da colangiociti e che, dopo un breve decorso, terminano nei dotti biliari interlobulari situati nello spazio portale. I colangiociti sono cellule cubiche che costituiscono l'epitelio di rivestimento delle vie biliari e che, attraverso processi di secrezione ed assorbimento sotto il controllo di ormoni e neuropeptidi, sono responsabili nella composizione finale della bile (Alpini G et al 1988, LeSage et al 2001, Roskams

et al 2004). Tali cellule rappresentano il target di un gruppo di patologie croniche colestatiche del fegato che prendono il nome, nel complesso, di colangiopatie. Le colangiopatie sono caratterizzate dalla progressiva scomparsa dei dotti biliari intraepatici che conduce ad una severa duttopenia negli stadi terminali. Negli stadi precoci di tali malattie, la scomparsa dei dotti biliari viene compensata dalla proliferazione dei dotti sopravvissuti. La progressione del quadro patologico è legata al bilancio tra i fenomeni di morte e di proliferazione cellulare; pertanto, gli stadi terminali sono contraddistinti dall'incapacità dei fenomeni proliferativi di far fronte alla continua perdita dei colangiociti (Desmet V et al 1998a, 1995). Per tali ragioni un numero sempre crescente di studi ha posto l'attenzione sui meccanismi di proliferazione dei colangiociti nel tentativo di individuare possibili strategie terapeutiche per sostenere e supportare un'efficace proliferazione dei dotti biliari intraepatici e ritardare l'evoluzione del quadro patologico. Dal punto di vista sperimentale, un utile modello animale per lo studio della proliferazione delle vie biliari intraepatiche è rappresentato dalla legatura delle vie biliari (bile duct ligation: BDL) nel ratto che determina una selettiva proliferazione dei dotti biliari intraepatici. Tale proliferazione è responsabile di un marcato incremento della massa dei dotti biliari intraepatici e dei colangiociti che arrivano a rappresentare fino al 30% delle cellule parenchimali del fegato (normalmente ne rappresentano il 2%) (Alpini G et al 1988, Alvaro D et al 2002). La proliferazione dei colangiociti fa parte della cosiddetta "ductular reaction", termine coniato da Popper et al nel 1957 e che designa la proliferazione di una popolazione di cellule epiteliali all'interfaccia tra epatociti e spazio portale costituita da colangiociti, cellule progenitrici epatiche ed epatociti (Alvaro et al 2007, Roskams et al 2004, Popper et al 1957). Diversi studi sperimentali hanno definito quattro tipi di proliferazione colangiocitaria (Alvaro D et al 2007):

1. Proliferazione *di tipo I* o *tipica*: rappresenta una reazione iperplastica che comporta un aumento, confinato nello spazio portale, del numero dei dotti biliari intraepatici. I colangiociti proliferanti formano strutture tubulari ben differenziate che presentano un lume ben definito (Desmet et al 1998b). Nel ratto una proliferazione "tipica" viene osservata in diverse condizioni sperimentali quali, ad esempio, la legatura delle vie biliari (BDL) (Alpini G et al 1998), l'epatotomia parziale (LeSage G et al 1996) ed il trattamento cronico con L-prolina (Vacanti JP et al 1979). Nell'uomo, una proliferazione colangiocitaria tipica può essere osservata in corso di una colestasi ostruttiva acuta di grado severo (James L et al 1989) e nelle prime fasi delle patologie colestatiche croniche (Alvaro et al 2000b). Questo tipo di proliferazione sembra essere dovuta all'allungamento dei dotti biliari preesistenti localizzati negli spazi portali e ciò è confermato da diverse evidenze sperimentali nel ratto e nell'uomo (Alpini G et al 1988, Slott PA et al 1990).
2. Proliferazione *di tipo II* o *atipica*: nel ratto si presenta in seguito a somministrazione di tetracloruro di carbonio (Le Sage GD et al 1999); nell'uomo è presente dopo epatopatia alcolica, iperplasia nodulare focale e nelle patologie colestatiche croniche quali cirrosi biliare primitiva e colangite sclerosante primitiva (Desmet VJ 1986; Fausto N et al 1994); è caratterizzata da una proliferazione irregolare dei dotti biliari intraepatici non confinata nello spazio portale ma estesa nella zona periportale e nel parenchima epatico adiacente e capace di costituire occasionalmente cordoni cellulari con gli epatociti. Questo tipo di proliferazione determina la formazione di strutture duttulari irregolari e tortuose che non possiedono un lume ben definito e sono associate ad infiammazione e ad infiltrazione di polimorfonucleati neutrofili (Desmet VJ 1986; Desmet et al 1998a; Fausto N et al 1994); inoltre i dotti neofornati non sono funzionalmente efficienti. Tale tipo di proliferazione può originare dalla proliferazione di dotti biliari preesistenti oppure dall'attivazione delle cellule progenitrici epatiche (Alvaro et al 2007, Roskams TA et al 2003; Roskams TA et al 2004m Desmet VJ 1986; Desmet et al 1998a; Fausto N et al 1994).

3. Proliferazione di *tipo III*: é una proliferazione massiva ad origine dal compartimento delle cellule progenitrici epatiche in seguito a necrosi epatica submassiva (Alvaro et al 2007).
4. Proliferazione di *tipo IV* (“*oval cell*” proliferation): é tipica degli stadi precoci della carcinogenesi nel fegato di ratto ed è causata da numerosi composti chimici. È caratterizzata dalla formazione di strutture tubulari irregolari e disorganizzate con un lume non ben definito che si aggettano all’interno del lobulo epatico con alterazione dell’architettura dell’intero parenchima (Petropoulos CJ et al 1985; Sirica AE et al 1984).

Tale classificazione della proliferazione colangiocitaria é basata soprattutto su studi sperimentali; nella patologia umana la distinzione tra proliferazione “tipica” (con origine da dotti biliari pre-esistenti ed associata ad ostruzione biliare acuta) e “proliferazione atipica” (maggiormente legata all’attivazione delle cellule progenitrici epatiche ed associata alle colangiopatie) é problematica e l’uso di tali termini é scoraggiato (Roskams et al 2004). Numerosi fattori di crescita, ormoni e neuropeptidi sono coinvolti nella regolazione della proliferazione dei colangiociti (*Tabella 1*). Lo stimolo proliferativo sembra essere legato sia all’aumento della pressione all’interno del lume dei dotti biliari intraepatici sia a numerosi fattori bioumorali che sembrano giocare un ruolo importante (Alvaro et al 2000b).

	<b>Proliferazione</b>	<b>Inibizione</b>
<b>Fattori di crescita/citochine</b>	✓ IL-1 $\alpha$	✗ TGF- $\beta$ 1
	✓ IL-6	✗ TGF- $\beta$ 2
	✓ TGF- $\alpha$	
	✓ TNF- $\alpha$	
	✓ EGF	
	✓ HGF	
	✓ IGF-1	
<b>Ormoni/neuropeptidi</b>	✓ Estrogeni	✗ Somatostatina
	✓ Acetilcolina	✗ Gastrina
<b>Sali biliari</b>	✓ Litocolato	✗ Ursodesossicolato
	✓ Taurocolato	✗ Tauroursodesossicolato
	✓ Taurolitocolato	

**Tabella 1.** Sostanze che regolano la proliferazione dei colangiociti. Modificata da Alvaro D et al 2000.

#### Fattori di crescita e citochine

Gli approcci sperimentali volti a chiarire il possibile ruolo e l’effetto di fattori di crescita e citochine sulla proliferazione colangiocitaria sono numerosi ed includono studi *in vitro* su colture cellulari o studi *in vivo* in ratti sottoposti a legatura delle vie biliari o ad epatectomia parziale ovvero nell’uomo mediante lo studio di patologie in cui è presente una risposta proliferativa dei colangiociti al danno.

L’epidermal growth factor (EGF), l’hepatocyte growth factor (HGF), l’insulin-like growth factor 1 (IGF1), l’interlukina-6 (IL-6), l’interlukina-1 $\alpha$  e il tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sono capaci di stimolare *in vitro* la proliferazione di colangiociti e di linee cellulari di colangiociti (Joplin R et al 1992; Matsumoto K et al 1994; Alvaro et al 2005).

Nel modello del ratto BDL, la proliferazione “tipica” dei colangiociti è associata con l’aumento dell’espressione di EGF, IGF-1, IL-6 e TGF- $\beta$  (Liu Z et al 1998; Napoli J et al 1997). I dati provenienti da altri modelli sperimentali quali l’epatectomia parziale o la somministrazione di tetracloruro di carbonio, sottolineano il ruolo di altri fattori di crescita quali l’HGF e il TGF- $\alpha$  (Michalopoulos GK 1990; LeSage GD et al 1999).

Più difficile risulta essere la comprensione dei fenomeni che sottendono alla proliferazione colangiocitaria nell’uomo dove nei quadri patologici che possono essere studiati va valutato il

delicato ruolo dell'interazione tra colangiociti, cellule infiammatorie e cellule stromali epatiche. L'attivazione di macrofagi e cellule di Kupffer determina il rilascio di una serie di mediatori dell'infiammazione quali TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  (Desmet et al 1995). I colangiociti non solo possiedono recettori specifici per tali mediatori ma, in risposta, sono in grado di produrre IL-6, mettendo in atto un loop che attraverso meccanismi paracrini ed autocrini amplifica la risposta proliferativa (Matsumoto K et al 1994; Paradis K et al 1995). Inoltre, i colangiociti possono produrre TGF- $\beta$  che, da un lato, è capace di inibire la proliferazione colangiocitaria e, dall'altro, di attivare le cellule stellate epatiche (HSC) nella produzione di matrice extracellulare (Paradis K et al 1995; Morland CM et al 1996).

### Neuropeptidi/ormoni

L'attività e la proliferazione dei colangiociti sono regolate dal sistema nervoso vegetativo, parasimpatico ed ortosimpatico, in modo coordinato. Tali cellule infatti esprimono il recettore per l'acetilcolina che è responsabile del controllo dei processi di secrezione. Il sistema nervoso parasimpatico gioca inoltre un importante ruolo nel regolare la proliferazione cellulare come mostrato nel ratto BDL dopo vagotomia. In questo modello sono presenti una riduzione delle cellule in proliferazione ed un aumento di quelle in apoptosi; tale effetto sembra essere legato alla regolazione dell'attività dell'adenilato ciclasi e conseguentemente dei livelli intracellulari di cAMP che ha un ruolo fondamentale nel sostenere la proliferazione e prevenire l'apoptosi (Le Sage G et al 1999; Yang L et al 1993). I livelli intracellulari di cAMP sono inoltre sotto il controllo dalla somatostatina, i cui recettori SSTR2 sono presenti nei colangiociti murini ed umani; nel ratto BDL, la somatostatina agisce come inibitore della proliferazione colangiocitaria mediante l'inibizione dell'adenilato ciclasi (Tietz P et al 1995; Tan CK et al 1995).

Nel ratto sottoposto ad epatectomia parziale, la conservazione dell'innervazione simpatica è un requisito fondamentale per la rigenerazione epatocitaria e colangiocitaria; i colangiociti del ratto esprimono sia recettori adrenergici sia dopaminergici e ciò sottolinea il ruolo anche del sistema ortosimpatico nel regolare le funzioni e la proliferazione delle cellule dei dotti biliari (Iwai M et al 1992; Glaser S et al 1999).

Gli estrogeni rappresentano un ulteriore ed importante stimolo alla proliferazione dei colangiociti. Le cellule dei dotti biliari possono esprimere entrambi i due recettori per gli estrogeni (ER- $\alpha$  ed ER- $\beta$ ) a differenza degli epatociti che esprimono solo il recettore ER- $\alpha$  (Alvaro et al 2000a). In vitro, il 17- $\beta$  estradiolo è in grado di stimolare e sostenere la proliferazione dei colangiociti. Nel ratto BDL, l'aumento della massa biliare è legato ad alti livelli di estradiolo nel siero ed è correlato ad un aumento dell'espressione dei recettori per gli estrogeni nei colangiociti; la somministrazione di antagonisti degli estrogeni è in grado di bloccare la proliferazione colangiocitaria tipicamente presente nel ratto BDL con il contemporaneo aumento dei fenomeni di apoptosi dei colangiociti proliferanti (Alvaro et al 2002a, 2002b, 2002c, 2006).

Nell'uomo, il ruolo di questi ormoni è sicuramente molto importante nel quadro delle malattie delle vie biliari, in particolare nelle colangiopatie. Tali malattie sono sicuramente legate al profilo degli ormoni sessuali presentandosi più frequentemente nel sesso femminile e tendendo a manifestarsi clinicamente nel periodo peri-menopausale. Inoltre, nelle colangiopatie ma non nel fegato umano normale, i colangiociti esprimono i recettori per gli estrogeni. In particolare, nella cirrosi biliare primitiva, viene soprattutto espresso il recettore beta (ER- $\beta$ ); la ridotta espressione dell'ER- $\alpha$  e la sua scomparsa nello stadio terminale di tale patologia (in cui è presente una marcata duttopenia) sottolinea come una riduzione dell'azione degli estrogeni possa favorire l'evoluzione verso la fase duttopenica (Alvaro et al 2004, 2006; Invernizzi P et al 2004).

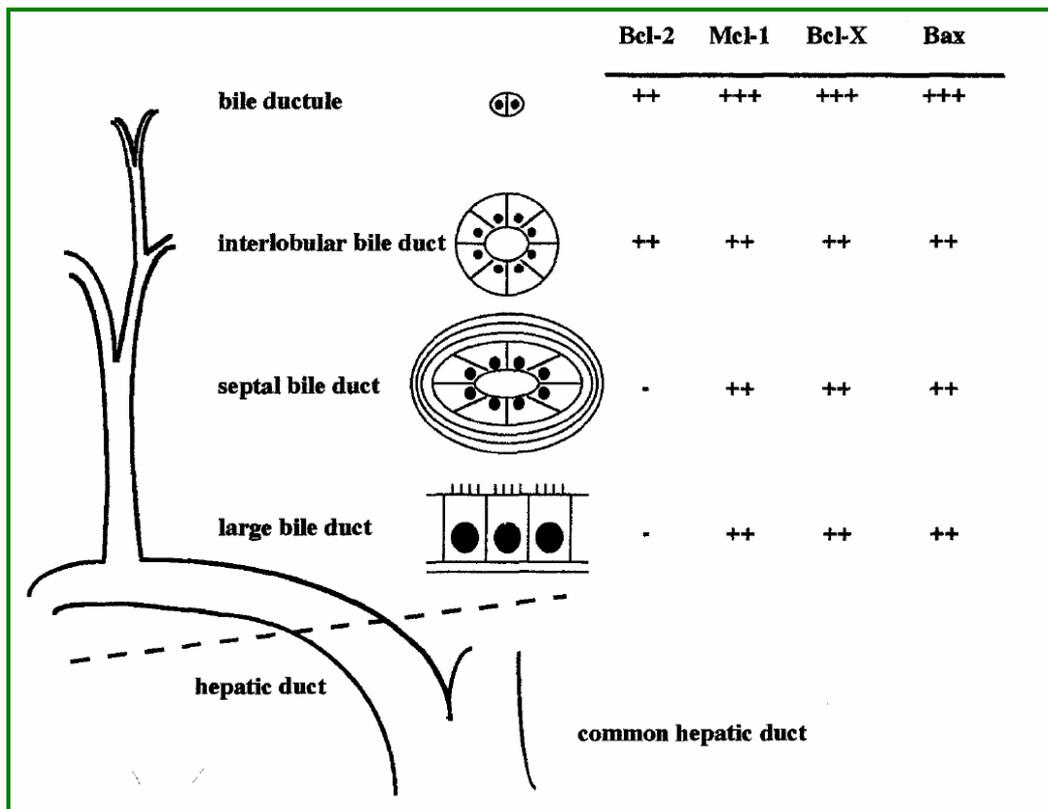
### Sali biliari

I sali biliari sono capaci di influenzare la proliferazione dei dotti biliari. Infatti nel ratto BDL i colangiociti risultano molto sensibili alle variazioni della composizione del pool dei sali biliari. Anche in vitro, il litocolato ed il taurocolato sono in grado di stimolare la proliferazione dei colangiociti. Gli effetti dei principali sali biliari sono riportati nella *Tabella 1* (Alpini G et al 1997a e b; Baiocchi L et al 1999).

#### Apoptosi e colangiociti

L'apoptosi rappresenta un meccanismo chiave per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. Nelle vie biliari intraepatiche normali umane, il numero e la distribuzione dei colangiociti in apoptosi e l'espressione delle proteine del pathway mitocondriale dell'apoptosi sono molto variabili: infatti, maggiore è il diametro del dotto biliare intraepatico e maggiore è il numero di cellule in apoptosi; ciò sottolinea la differente cinetica cellulare dei colangiociti a seconda della posizione anatomica all'interno delle vie biliari.

Nel fegato normale umano l'espressione delle proteine del pathway mitocondriale dell'apoptosi varia nelle diverse porzioni dell'albero biliare (vedi *Figura 3*): le cellule dei piccoli dotti interlobulari esprimono diffusamente le proteine anti-apoptotiche Bcl<sub>2</sub>, Bcl-X<sub>1</sub> e mcl-1 che, di contro, sono solo raramente espresse nelle cellule dei grandi dotti biliari e dei dotti biliari settali; la proteina pro-apoptotica Bax risulta invece espressa diffusamente lungo tutto l'albero biliare. Il rapporto (balance) tra l'espressione di Bax e di Bcl<sub>2</sub> è diverso nei grandi dotti biliari se paragonato ai piccoli dotti interlobulari; infatti i grandi dotti biliari, a differenza dei dotti biliari più piccoli, hanno un balance tra proteine anti- (Bcl<sub>2</sub>) e pro- (Bax) apoptotiche a favore di quest'ultime. Ciò potrebbe spiegare la differente distribuzione del numero dei colangiociti in apoptosi lungo le vie biliari e la loro prevalenza nei dotti di diametro maggiore (Harada K et al 2000).



**Figura 3.** Distribuzione delle proteine pro- ed anti-apoptotiche del pathway mitocondriale dell'apoptosi nelle diverse parti delle vie biliari intraepatiche (da Iwata et al 2000).

In seguito a rimozione dell'ostruzione nel ratto BDL, il ritorno ad una normale massa biliare è legato a fenomeni di apoptosi dell'albero biliare iperplastico (Bhathal PS et al 1985). Le variazioni della massa biliare nei vari modelli di ratto BDL sono correlate all'espressione di proteine dell'apoptosi quali Bcl<sub>2</sub> (anti-apoptotica) e Bax (pro-apoptotica) (Charlotte F et al 1994; Stahelin BJ et al 1996). L'apoptosi può essere indotta da numerosi fattori quali la deprivazione di fattori di crescita, processi immuno-mediati, agenti infettivi e sostanza tossiche (Alvaro D et al 2000b). Il ruolo dell'apoptosi nei colangiociti e nella patofisiologia di queste cellule è ad oggi di grande interesse scientifico. Nella patologia umana è molto importante il ruolo della morte programmata nella patogenesi e nella progressione delle colangiopatie ed in particolare nella cirrosi biliare primitiva in cui l'evoluzione verso la fase duttopenica è legata al balance tra fenomeni proliferativi e fenomeni apoptotici con la prevalenza di quest'ultimi (Kuroki T et al 1996; Alvaro D et al 2004).

### La Cirrosi Biliare Primitiva (CBP)

La cirrosi biliare primitiva (CBP) è una patologia del fegato di tipo autoimmune lentamente progressiva che colpisce soprattutto le donne. Ha un picco di incidenza verso i 50 anni di età ed è estremamente rara in persone con età minore di 25 anni. Istologicamente è caratterizzata da infiammazione portale e distruzione immuno-mediata dei dotti biliari intraepatici. Tali alterazioni si presentano con un grado di severità e con una velocità di progressione differente da paziente a paziente. L'evoluzione della patologia comporta la progressiva perdita dei dotti biliari intraepatici con la successiva riduzione della secrezione biliare e la mancata eliminazione di sostanze tossiche dal fegato responsabili di un ulteriore danno epatico. La cronicità del processo patologico determina progressivamente fibrosi e conseguente cirrosi epatica con l'evoluzione finale verso l'insufficienza epatica (Kaplan MM, Gershwin ME 2005).

La CBP è caratterizzata dalla presenza di auto-anticorpi contro antigeni mitocondriali (AMA); tali anticorpi sono presenti nel 90-95% dei pazienti e spesso sono dosabili nel sangue già diversi anni prima della comparsa della sintomatologia clinica (Kaplan MM, Gershwin ME 2005).

La cirrosi biliare primitiva presenta una prevalenza che varia da 40 a 400 affetti per milione di abitanti a seconda dell'area geografica e si presenta molto frequentemente in Nord Europa. Tale patologia è più comune tra i familiari di primo grado e dall'1% al 6% dei malati ha almeno un parente affetto. Il rapporto donne/uomini è di 10:1 ma la storia clinica della malattia non differisce nei due sessi (Howel D et al 2000; Bittencourt PL, Farias AQ 2004).

### Caratteristiche istopatologiche

La cirrosi biliare primitiva è suddivisa in quattro stadi non sempre nettamente distinti. Solitamente le lesioni epatiche non sono uniformemente distribuite nell'intero fegato, pertanto in una biopsia possono essere contemporaneamente presenti quadri istologici imputabili a tutti gli stadi (Kaplan MM, Gershwin ME 2005, Ludwig J et al 1978, Lanza G 1985).

Nel *I stadio* (stadio colangitico), le alterazioni interessano soprattutto i dotti biliari interlobulari che appaiono circondati da manicotti di linfociti e plasmacellule; inoltre l'epitelio biliare si presenta danneggiato. Gli spazi portalici coinvolti sono allargati e infiltrati da cellule infiammatorie, in particolare da istiociti, da plasmacellule e da linfociti spesso aggregati in follicoli provvisti di centro germinativo. Non è rara la presenza di granulomi epitelioidi all'interno dei suddetti follicoli linfatici. Gli epatociti risultano scarsamente interessati dal processo in atto e mancano i segni di colestasi (Kaplan MM, Gershwin ME 2005, Ludwig J et al 1978, Lanza G 1985).

Nel *II stadio* (stadio della proliferazione dottulare), ha inizio la sclerosi delle pareti dei dotti biliari interlobulari; si osserva inoltre una rigogliosa e caratteristica, seppure inefficace, proliferazione dei dotti biliari che si trovano situati all'interno di un tessuto connettivo flogisticamente infiltrato; i limiti tra gli spazi portalici ed il resto del parenchima epatico sono perlopiù netti seppure può notarsi una modesta necrosi della lamina limitante (piecemeal necrosis) degli epatociti periportalici; in questo stadio sono inoltre evidenti i segni di colestasi intralobulare (Kaplan MM, Gershwin ME 2005, Ludwig J et al 1978, Lanza G 1985).

Il *III stadio* (stadio della fibrosi o precirrotico) è caratterizzato dalla riduzione della flogosi periportale e peridottale e dalla progressiva comparsa di fibrosi inter- e perilobulare con l'iniziale formazione di setti senza peraltro rigenerazione nodulare; la progressiva distruzione ed ostruzione dei dotti interlobulari è responsabile della gravità della colestasi che è maggiormente evidente nelle zone periportalici piuttosto che pericentrali del lobulo epatico.

Il *IV stadio* (stadio cirrotico) è il solo stadio in cui il termine *cirrosi biliare* è giustificato; di fatto i tre precedenti stadi potrebbero essere meglio indicati con il termine di "*colangite cronica distruttiva non suppurativa*". Tale stadio è istologicamente caratterizzato dalla progressione e dall'aggravarsi della fibrosi con la comparsa di fenomeni rigenerativi epatocellulari sotto forma di noduli inizialmente fini, quindi discretamente voluminosi; tali noduli conferiscono all'organo un aspetto simil cirrotico o francamente cirrotico (macroscopicamente simile alla cirrosi post-epatitica). Inoltre, caratteristica fondamentale di questo stadio è la *duttopenia* che si presenta particolarmente marcata con una drastica riduzione numerica dei dotti biliari interlobulari; tale aspetto, riscontrabile anche nel III stadio, risulta essere l'elemento più importante per porre una diagnosi retrospettiva di cirrosi biliare primitiva (Desmet V et al 1995, 1998a, 1998b; Alvaro et al 2004, Lanza G 1985).

### Caratteristiche cliniche, storia naturale e prognosi

Ad oggi, la cirrosi biliare primitiva viene diagnosticata più precocemente nella sua evoluzione clinica rispetto al passato con circa il 50-60% dei pazienti che sono asintomatici al momento della diagnosi (Pares A, Rodes J 2003; Prince et al 2004).

La diagnosi viene posta sulla base di tre criteri principali: la presenza di anticorpi antimitocondrio (AMA) dosabili nel siero, l'aumento degli enzimi epatici (soprattutto la fosfatasi alcalina) per più di sei mesi e la presenza di quadri istopatologici compatibili con la patologia. La presenza di due criteri su tre consente di porre una diagnosi di probabilità di malattia, mentre è necessaria la contemporanea presenza dei tre criteri per porre una diagnosi di certezza. La biopsia epatica, ritenuta superflua da alcuni patologi, permette altresì di stadiare la patologia e di avere un punto di riferimento iniziale per la valutazione della risposta terapeutica al trattamento. Circa il 5-10% degli affetti non presenta anticorpi antimitocondrio nel siero; tuttavia tali pazienti non mostrano una progressione di malattia dissimile dai pazienti con anticorpi nel siero (Kaplan MM, Gershwin ME 2005).

I principali sintomi all'esordio comprendono astenia e prurito (Bergasa NV 2003): l'astenia, presente nel 78% dei pazienti, può essere una importante causa di disabilità e la sua gravità non è dipendente dal grado di severità del danno epatico (Milkiewicz P, Heathcote EJ 2004; Forton DM et al 2004); il prurito, che colpisce dal 20 al 70% dei pazienti, può essere locale o diffuso, è di solito più intenso di notte e viene esacerbato dal contatto con la lana o dal calore. Tale sintomo di solito precede l'insorgenza di ittero di mesi oppure anni (Talwalkar JA et al 2003; Prince M 2002).

Altri segni clinici comuni comprendono iperlipidemia, ipotiroidismo, osteopenia e può esserci la concomitanza di altre patologie autoimmuni (sindrome di Sjögren, sclerodermia). Inoltre l'esame obiettivo può mostrare la presenza di spider nevi, iperpigmentazione cutanea, epatomegalia, splenomegalia (rara all'esordio dei sintomi) e ittero che compare però tardivamente (Watt FE et al 2004; Kaplan MM, Gershwin ME 2005).

Nel corso di mesi o anni, il prurito, l'ittero e l'iperpigmentazione cutanea peggiorano lentamente fino alla comparsa di segni di insufficienza epatica e ascite dovuta all'ipertensione portale. Il decorso e la progressione della CBP è estremamente variabile tanto che alcuni pazienti asintomatici possono non avere segni di progressione per una decade o più, mentre altri muoiono per insufficienza epatica nell'arco di 5-10 anni dopo i primi segni di malattia (Harrison 2002).

La possibilità di una diagnosi precoce e di un conseguente intervento terapeutico ha migliorato recentemente la prognosi di questi pazienti. La terapia si avvale principalmente dell'acido ursodesossicolico (ursodiolo) che, secondo alcune casistiche, determina una risposta nel 25-30% dei soggetti trattati, con normalizzazione degli enzimi epatici o miglioramento del quadro istologico epatico (Leuschner M et al 2000). L'ursodiolo però non è in grado di arrestare la progressione della CBP e pertanto l'unica cura efficace è il trapianto di fegato. I risultati del trapianto sono di solito eccellenti e la sopravvivenza è superiore a quella dei pazienti sottoposti a trapianto per altri tipi di malattia epatica terminale. La recidiva di CBP dopo il trapianto colpisce un numero limitato di pazienti seppure la maggior parte dei soggetti rimanga positiva per gli anticorpi anti-mitocondrio dopo il trapianto; di solito la recidiva dopo trapianto si presenta lentamente progressiva (Harrison 2002).

#### Patogenesi: autoimmunità e ruolo dell'apoptosi

Il target principale degli anticorpi anti-mitocondrio è rappresentato dalla subunità E2 del complesso della piruvato deidrogenasi (PDC-E2). Tale complesso è situato nella matrice mitocondriale e catalizza reazioni di carbosilazione ossidativa di acidi chetonici. La CBP sembra essere l'unica patologia in cui compaiono linfociti T e B che reagiscono verso la PDC-E2. Seppure i meccanismi della distruzione dei dotti biliari rimangono enigmatici, è chiara la presenza di un'intensa risposta autoimmunitaria diretta verso i colangiociti dei dotti biliari interlobulari che è

comprovata dalla specificità del danno colangiocitario, dall'infiltrazione linfocitaria dello spazio portale e dalla presenza di antigeni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità di Classe II sulla membrana citoplasmatica dei colangiociti. La distruzione delle cellule dei dotti biliari è mediata quindi da cellule T autoreattive che infiltrano il parenchima epatico e agiscono principalmente causando la morte cellulare per apoptosi (Harada et al 2001; Tinmouth et al 2002; Kita H et al 2002; Gershwin ME et al 2000). I colangiociti che sopravvivono vanno incontro a proliferazione nel tentativo di rimpiazzare le cellule danneggiate (Alvaro D et al 2004; Kaplan MM and Gershwin ME 2005). Ne risulta che la progressione della cirrosi biliare primitiva è caratterizzata dal rapporto tra due fenomeni: l'apoptosi dei colangiociti e la proliferazione delle cellule sopravvissute; tale rapporto è in equilibrio nelle fasi precoci mentre diventa sbilanciato a favore dell'apoptosi negli stadi tardivi e ciò determina una netta riduzione della massa biliare e quindi l'evoluzione verso la *fase duttopenica* (Alvaro D et al 2004).

Un importante pathway che dà inizio ai fenomeni di apoptosi dei colangiociti nella CBP è il Fas che interagisce con il Fas-ligando costitutivamente espresso sui linfociti T citotossici (Joplin R et al 1992). Inoltre gli autoanticorpi verso gli antigeni mitocondriali di tipo IgA sembra siano in grado di promuovere l'apoptosi dei colangiociti interferendo con la funzione mitocondriale (Neuberger J 2002, Matsumura S et al 2004). Inoltre grande importanza sembra aver il pathway mitocondriale dell'apoptosi che, con le sue proteine pro- (Bax, Bak) ed anti-apoptotiche (Bcl<sub>2</sub>, Bcl-X<sub>i</sub>, mcl-1), risulta essere implicato sia nella normale distribuzione dei fenomeni apoptotici all'interno dell'albero biliare nel fegato normale (Charlotte F et al 1994; Harada K et al 2000) sia nella progressione della cirrosi biliare primitiva (Iwata et al 2000).

### SCOPI DEL PROGETTO DI RICERCA

Gli scopi del presente progetto di ricerca sono stati:

- ✓ valutare l'espressione ed il ruolo di IGF1 ed IGF1-R nei colangiociti del fegato normale ed in corso di colestasi nel ratto;
- ✓ valutare l'espressione ed il ruolo di IGF1 ed IGF1-R nei colangiociti del fegato umano normale ed in corso di una patologia colestatica quale la cirrosi biliare primitiva;
- ✓ definire il ruolo di IGF1 nella progressione della cirrosi biliare primitiva;
- ✓ valutare nei colangiociti in corso di cirrosi biliare primitiva l'attivazione del pathway intracitoplasmatico di trasduzione del segnale PI3K/AKT ed il suo ruolo nella progressione della malattia;
- ✓ definire il ruolo dell'apoptosi dei colangiociti nella progressione della CBP con particolare riguardo al sistema mitocondriale dell'apoptosi;
- ✓ individuare nei colangiociti possibili correlazioni tra l'attivazione del pathway dell'IGF1 (IGF1, IGF1-R e pAKT) e le proteine che regolano l'apoptosi (Bax, Bcl2) e le eventuali implicazioni nell'evoluzione della cirrosi biliare primitiva.

### MATERIALI E METODI

#### **Colestasi sperimentale**

In questo progetto sono stati inseriti frammenti epatici provenienti da ratti Wistar di sesso maschile suddivisi in:

- *ratti normali*: n=6;
- *ratti BDL* (legatura delle vie biliari per 2 settimane): n=6.

#### **Colestasi umana: cirrosi biliare primitiva (CBP)**

In questo progetto di ricerca sono state incluse ed esaminate 35 biopsie provenienti da pazienti di sesso femminile nel periodo post-menopausa con la diagnosi di cirrosi biliare primitiva basata su

criteri internazionalmente accettati (Kaplan MM et al 2005). Le biopsie epatiche sono state classificate e suddivise secondo la stadiazione di Ludwig (Ludwig J et al 1978) in:

- *stadio I*: n=5;
- *stadio II*: n=9;
- *stadio III*: n=11;
- *stadio IV*: n=10.

5 biopsie su 10 provenienti dalle pazienti con cirrosi biliare primitiva in stadio IV sono state ottenute dal fegato espantato in seguito a trapianto epatico.

Come controlli, sono state incluse 5 biopsie epatiche ottenute da fegati normali di pazienti sottoposti ad intervento di laparotomia.

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono risultati negativi ai markers per i virus dell'epatite C (HCV) e dell'epatite B (HBV).

### **Microscopia ottica**

I frammenti di parenchima epatico, immediatamente dopo il prelievo, sono stati fissati per immersione in formalina tamponata al 10% per 24h a temperatura ambiente. Successivamente sono stati sottoposti alle routinarie procedure per l'inclusione in paraffina che prevedono la disidratazione del frammento in etanolo a concentrazioni crescenti, la diafanizzazione in xilolo e la successiva inclusione in paraffina a basso punto di fusione (56°C). Utilizzando un microtomo *Pabisch Top Automat S-140* sono state effettuate sezioni dello spessore di 3-4 µm che, dopo sparaffinatura in xilolo e disidratazione in alcoli a concentrazioni decrescenti, sono state colorate con *Ematossilina-Eosina*, *Gomori* e con le colorazioni tricromatiche *Azan-Mallory* e *Masson*.

### **Immunoistochimica**

La colorazione immunoistochimica è stata effettuata secondo la procedura già descritta in precedenti lavori (Gaudio E et al 2006a; Gaudio E et al 2006b; Carpino G et al 2005).

I frammenti di parenchima epatico sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per 2 ore a temperatura ambiente e, previa disidratazione e diafanizzazione, sono stati inclusi in paraffina a basso punto di fusione (56°C).

Sono state quindi effettuate sezioni di 3 µm che sono state successivamente raccolte su vetrini portaoggetti precedentemente trattati con L-polilisina allo 0,1%. Dopo la sparaffinatura in xilolo e disidratazione in alcoli a concentrazioni decrescenti, le sezioni sono state trattate con perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 20 minuti al fine di bloccare l'attività della perossidasi endogena.

Dopo 10 min. in acqua corrente le sezioni sono state lavate per 3 volte di 5 min. ciascuna in phosphate-buffered saline (PBS). Quindi è stato effettuato il blocco dell'attività della avidina-biotina mediante DAKO Biotin Blocking System.

Le sezioni sono state quindi incubate overnight a 4° C con i seguenti anticorpi primari:

- *Citocheratina 19*: CK-19 Dako; diluizione 1: 100.
- *PCNA* (Proliferating Cellular Nuclear Antigen): Dako, PC10, mouse monoclonal; diluizione 1:100;
- *IGF1*: Santa Cruz Inc., sc-7144, CA, USA, goat polyclonal; diluizione 1:100;
- *IGF1-R*: Santa Cruz Inc., sc-9038, CA, USA, rabbit polyclonal; diluizione 1:80;
- *pAKT*: Santa Cruz Inc., sc-16646-R, CA, USA, rabbit polyclonal; diluizione 1:100;
- *Bax*: Santa Cruz Inc., sc-7480, CA, USA, mouse monoclonal; diluizione 1:200;
- *Bcl<sub>2</sub>*: Santa Cruz Inc., sc-7382, CA, USA, mouse monoclonal; diluizione 1:100.

Dopo tre lavaggi di 5 min. ciascuno in PBS le sezioni sono state incubate per 20 min. con l'anticorpo secondario appropriato a temperatura ambiente: biotinylated anti-rabbit, anti-mouse,

anti-goat immunoglobulins in PBS (DAKO). Quindi dopo altri tre successivi lavaggi in PBS è stato aggiunto il complesso streptavidina-HRP (DAKO: Streptavidine conjugated to horseradish peroxidase in PBS) per 20 min. Infine, per visualizzare l'avvenuta reazione è stato utilizzato 3,3'-diaminobenzidina (DAB) in tampone imidazolo-HCl (pH 7,5) contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> controllando lo sviluppo al microscopio. Infine dopo lavaggio in acqua corrente per 10 min. le sezioni sono state contrastate con Ematossilina di Mayer per 40 sec. Dopo il viraggio in acqua corrente e disidratazione in alcool crescenti sono state montate con Eukitt.

Per la determinazione delle cellule in apoptosi è stato utilizzato il metodo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated triphosphate end-labeling*: ApopTag Kit, Oncor, USA).

I controlli negativi, effettuati con l'applicazione dell'adeguato siero non immune al posto dell'anticorpo primario, hanno uniformemente dimostrato assenza di reazione.

L'analisi immunoistochimica è stata effettuata su almeno 5 spazi portali per ciascun preparato e sono stati valutati solamente i dotti biliari interlobulari (con diametro < di 100 µm). L'avvenuta immunoreazione è stata espressa come percentuale di colangiociti positivi per l'antigene specifico. Tale percentuale è stata ottenuta dal rapporto tra il numero di colangiociti positivi all'anticorpo ed il numero dei colangiociti totali. La misurazione è stata effettuata in doppio cieco (GC-AF) come in precedenti lavori (Alvaro D et al 2002). Le immagini sono state ottenute mediante un microscopio ottico Leica DM 4500B corredato di videocamera (ProgRes C10 plus).

### **Massa biliare (Bile Duct Mass - BDM)**

La massa biliare e l'evoluzione della duttopenia sono state valutate mediante analisi morfometrica effettuata su sezioni per la microscopia ottica (Alvaro D et al 2004). Le immagini sono state acquisite mediante un microscopio ottico Leica DM 4500B corredato di videocamera (ProgRes C10 plus) e di un software per l'acquisizione ed elaborazione di immagini (Image Analysis System IAS, Delta-Sistemi, Roma, Italy). Le immagini, visualizzate su un monitor, possono essere modificate da un operatore per migliorare la definizione del parenchima, delle strutture vascolari e dei dotti biliari. È inoltre possibile escludere i campi troppo danneggiati per essere analizzati.

Quindi, una volta che l'immagine digitalizzata è stata acquisita, i dotti biliari interlobulari vengono selezionati e ne viene automaticamente calcolata l'area occupata.

Infine, la massa biliare viene calcolata come area occupata dai dotti biliari intralobulari/area totale X 100.

### **Esami di Laboratorio**

I test di funzionalità epatica e i marker per HCV e HBV sono stati ottenuti mediante routinarie metodiche di laboratorio. Gli anticorpi anti-mitocondrio (AMA) sono stati valutati mediante metodiche di immunofluorescenza indiretta e mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) come descritto in precedenti lavori (Alvaro D et al 2004; Moteki S et al 1996).

### **Analisi statistica**

I dati sono stati espressi come media ± standard error (SE). L'analisi statistica è stata effettuata mediante il Mann-Whitney test ed il coefficiente di correlazione di Sperman. Un p-value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

## **RISULTATI**

### **Colestasi sperimentale**

Nel fegato di ratto normale meno dell'1% dei colangiociti mostra una ridotta positività per IGF1 ed IGF1-R. Dopo due settimane di legatura delle vie biliari (ratto BDL), la maggior parte dei colangiociti in proliferazione mostra un'intensa espressione di IGF1 e recettore che risulta essere più spiccata a livello del polo apicale della cellula. Nel fegato del ratto BDL anche gli epatociti presentano positività per IGF1 ed IGF1-R.

### CBP: caratteristiche dei pazienti

Le caratteristiche dei pazienti con cirrosi biliare primitiva e dei pazienti normali di controllo sono riportate nella *Tabella 2*. Non vi sono differenze significative in termini di età tra i pazienti affetti da CBP (in differenti stadi) ed il gruppo di controllo.

	Pazienti normali (n= 5)	CBP Stadio I (n= 5)	CBP Stadio II (n= 9)	CBP Stadio III (n= 10)	CBP Stadio IV (n= 8)
<b>Età</b>	57 ± 3	59 ± 3	60 ± 3	62 ± 2	58 ± 3
<b>Fosfatasi alcalina (U/L)</b>	165 ± 11	310 ± 26 <sup>&amp;</sup>	306 ± 16 <sup>&amp;</sup>	510 ± 40 <sup>&amp;*</sup>	480 ± 39 <sup>&amp;*</sup>
<b>Bilirubina (mg/dl)</b>	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2 <sup>&amp;</sup>	1.8 ± 0.4 <sup>&amp;*</sup>

*Tabella 2.* Caratteristiche dei pazienti I dati sono espressi come Media ± Errore Standard (SE). I valori normali della fosfatasi alcalina sono: 98-270 U/L. &= p<0.05 vs normali; \*= p<0.05 vs CBP stadio I and II.

### CBP: massa biliare (bile duct mass)

La massa biliare e la progressione verso la fase duttopenica sono state valutate misurando il rapporto tra l'area occupata dai dotti biliari interlobulari e l'area dell'intero parenchima nei diversi stadi della CBP (*Tabella 3*). La massa biliare raggiunge il valore minimo nel IV stadio in cui risulta significativamente minore rispetto agli altri stadi (p<0.01). La massa biliare nel III stadio è significativamente ridotta rispetto al I ed al II stadio mentre tra i primi due stadi di CBP non vi sono differenze significative.

	Pazienti Normali	CBP Stadio I	CBP Stadio II	CBP Stadio III	CBP Stadio IV
<b>BDM</b>	0.20 ± 0.08	1.36 ± 0.56	1.97 ± 0.76	0.72 ± 0.21*	0.29 ± 0.03&

*Tabella 3.* Bile Duct Mass (% volume ± SE). I dati sono espressi come Media ± Errore Standard (SE). &= p<0.01 vs stadio I, II e III; \*= p<0.01 vs stadio I and II.

### CBP: espressione di IGF1, IGF1-R e pAKT

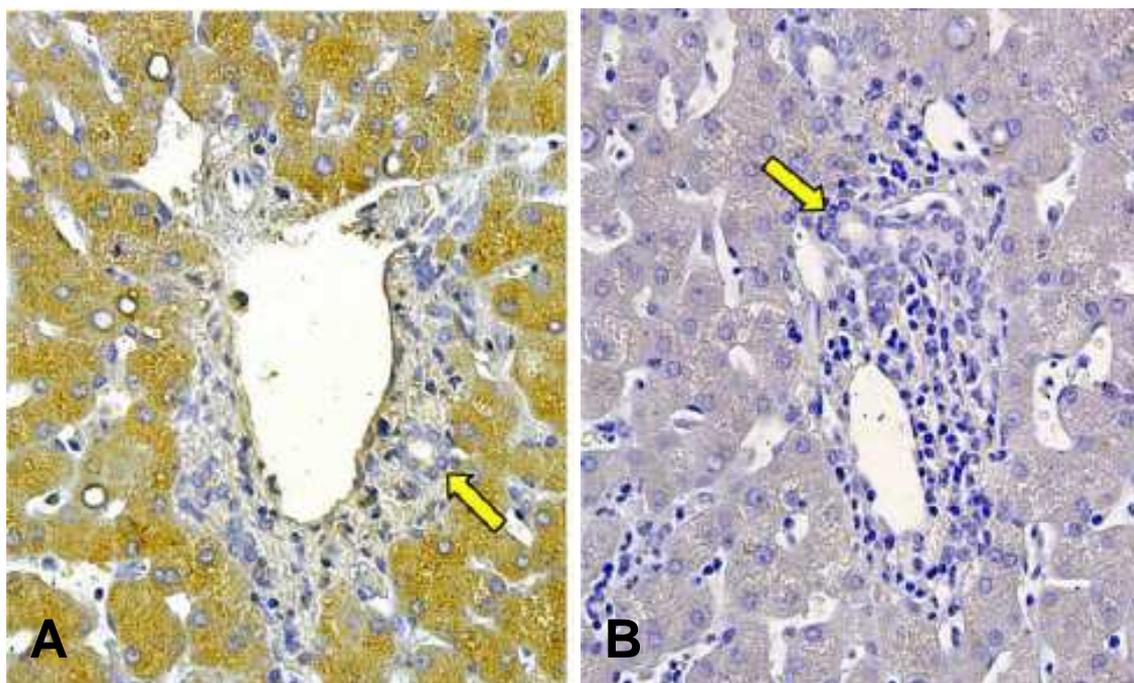
L'analisi immunostochimica è stata condotta sui dotti biliari interlobulari (diametro = 20-100 µm) sia nei pazienti con CBP in diversi stadi sia nel fegato normale senza significative differenze nel diametro dei dotti biliari analizzati.

L'espressione di IGF1, IGF1-R e pAKT nei diversi stadi di CBP e nel fegato umano normale è riassunta nella *Tabella 4* ed i dati sono riportati come media (± SE) della percentuale di colangiociti positivi all'antigene analizzato.

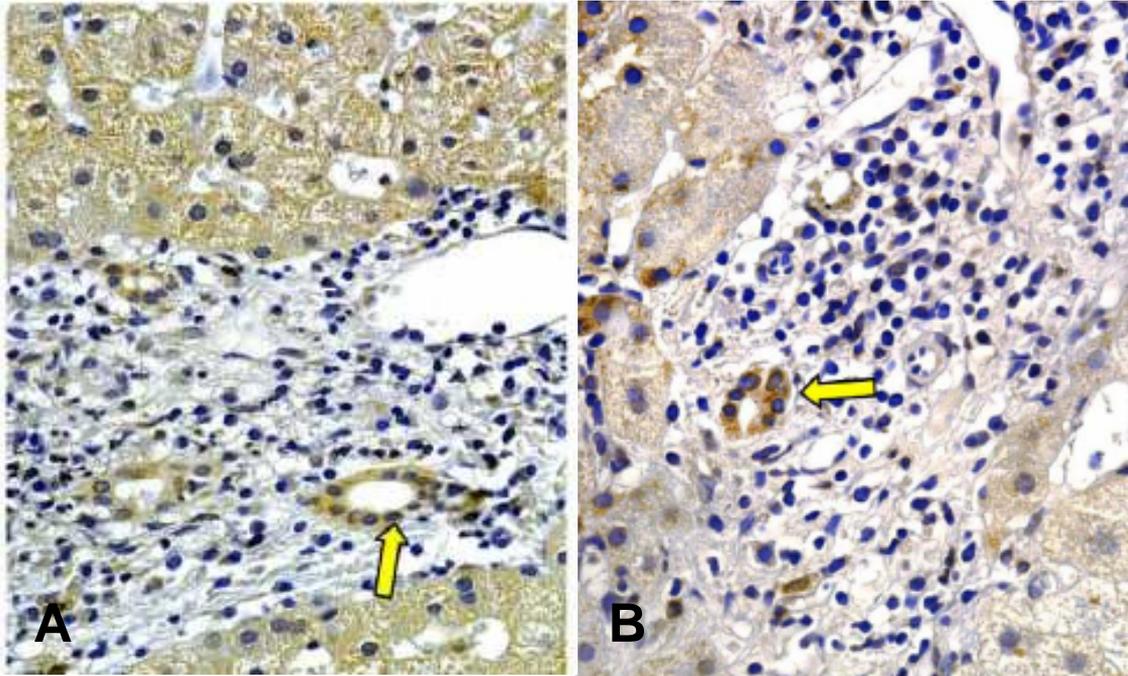
	Pazienti Normali (n= 5)	CBP Stadio I (n= 5)	CBP Stadio II (n= 9)	CBP Stadio III (n= 10)	CBP Stadio IV (n= 8)
<b>IGF1</b>	< 1	63.91±2.45	74.91±1.85*	75.45±1.64*	91.64±2.21 <sup>£</sup>
<b>IGF1- R</b>	< 1	35.28±2.27	38.51±1.49	39.55±2.15	75.89±1.72 <sup>£</sup>
<b>pAKT</b>	< 1	28.25±3.63	27.75±4.61	30.5±3.48	68.01±5.65 <sup>£</sup>

**Tabella 4.** Espressione immunoistochimica (% dei colangiociti totali) di IGF1, IGF1-R, pAKT nei colangiociti in pazienti con CBP e in controlli normali. I dati indicano la percentuale dei colangiociti positivi e sono espressi come media ± Errore Standard (SE). \* =  $p < 0.02$  vs CBP stadio I; £ =  $p < 0.01$  vs gli altri stadi di CBP.

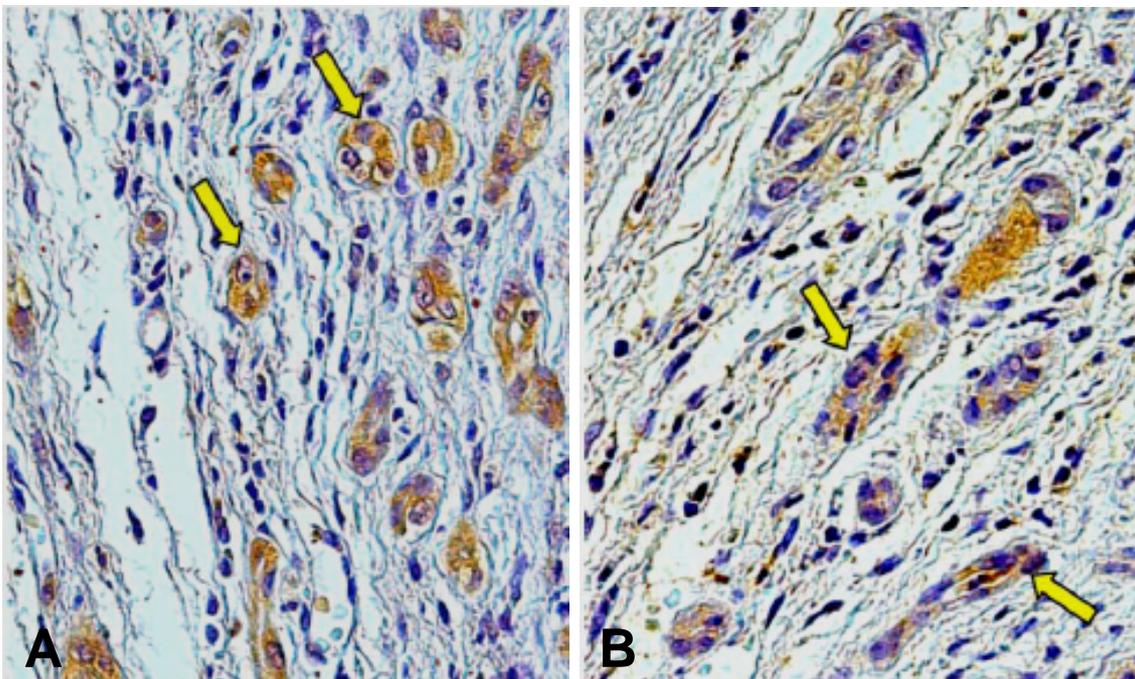
In particolare, lo studio immunoistochimico ha rilevato come meno dell'1% dei colangiociti presenti in un fegato normale esprimono IGF1 ed il suo recettore (*Figura 4*). Di contro la maggior parte dei colangiociti dei pazienti affetti da cirrosi biliare primitiva risultano positivi per IGF1 ed IGF1-R (*Figura 5*) con una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e tale espressione é massima nel IV stadio della patologia (*Figura 6*).



**Figura 4.** Fegato umano normale: colorazione immunoistochimica per IGF1 (A) ed IGF1-R (B). I colangiociti sono praticamente negativi sia all'IGF1 sia all'IGF1-R (freccie). Di contro, gli epatociti che sono responsabili della produzione di IGF1 circolante si mostrano diffusamente positivi ad IGF1. O.M. 20x.

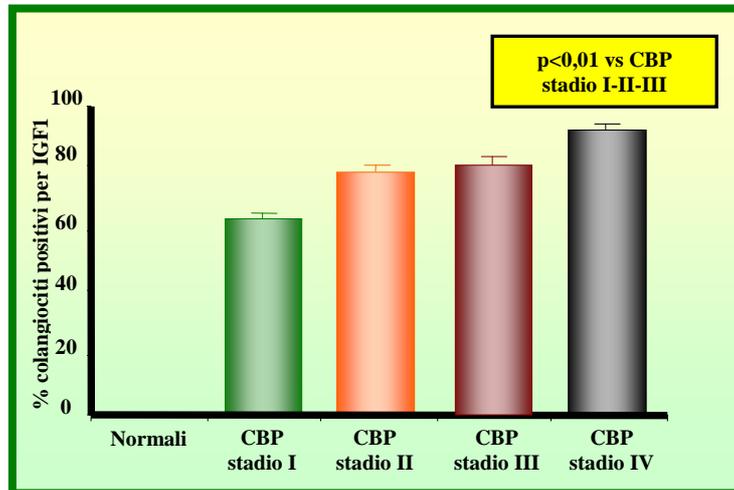


**Figura 5.** Cirrosi biliare primitiva: colorazione immunoistochimica per IGF1 (A) ed IGF1-R (B) nel fegato affetto da cirrosi biliare primitiva in III stadio. I colangiociti risultano essere fortemente positivi per IGF1 e recettore (frecce). O.M. 20x.



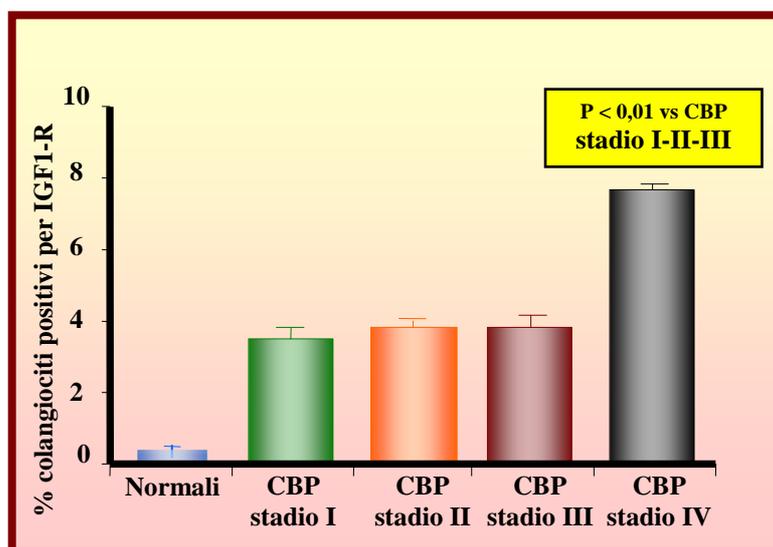
**Figura 6.** Cirrosi biliare primitiva: colorazione immunoistochimica per IGF1 (A) e IGF1-R (B) nel fegato affetto da cirrosi biliare primitiva in IV stadio. I colangiociti risultano essere fortemente positivi per IGF1 ed IGF1-R (frecce). O.M. 20x.

In particolare, dalla comparazione dell'espressione immunoistochimica di *IGF1* nei diversi stadi di CBP (*Grafico 1*), emerge come la percentuale dei colangiociti positivi aumenti significativamente passando dallo stadio I (64% dei colangiociti) agli stadi II-III (circa il 75%:  $p < 0.02$  vs stadio I; *Tabella 4*) e come sia massima nello stadio IV dove circa il 90% dei colangiociti sono positivi per IGF1 ( $p < 0.01$  vs stadio I, II e III; *Tabella 4*).



**Grafico 1.** Percentuale di colangiociti positivi per IGF1 nel fegato normale e nei vari stadi della cirrosi biliare primitiva

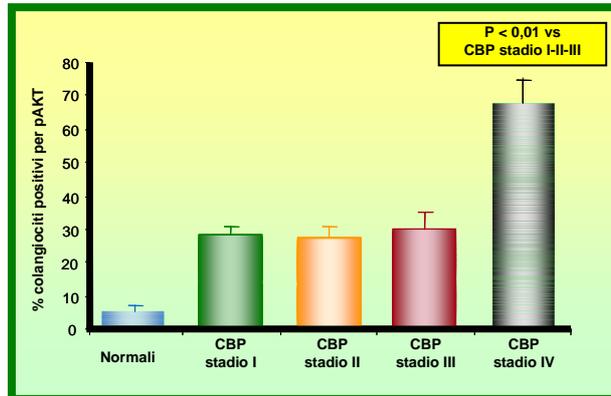
L'espressione immunoistochimica di *IGF1-R* (*Grafico 2*) aumenta, passando dagli stadi I-III in cui in circa il 35-40% dei colangiociti è positivo, allo stadio IV dove più del 75% delle cellule che rivestono i dotti biliari esprimono tale antigene ( $p < 0.01$  vs stadi I, II e III; *Tabella 4*).



**Grafico 2.** Percentuale di colangiociti positivi per IGF-R nel fegato normale e nei vari stadi della cirrosi biliare primitiva

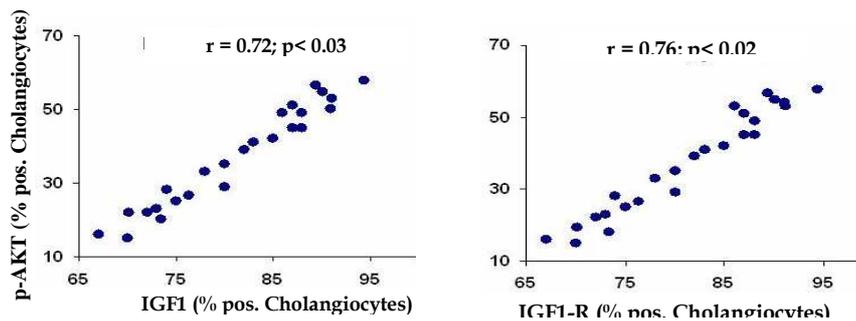
Per lo studio del pathway intracitoplasmatico di trasduzione del segnale attivato da IGF1 è stata valutata immunoistochimicamente l'espressione della forma fosforilata di AKT (pAKT); tale analisi (*Grafico 3*) ha mostrato che meno dell'1% dei colangiociti nel fegato normale di controllo

esprime pAKT (*Figura 7*). Nella cirrosi biliare primitiva (*Figura 7*), circa il 30% dei colangiociti negli stadi I, II, III esprime pAKT e circa il 70% nel IV stadio ( $p < 0.01$  vs stadi I, II e III; *Tabella 4*).

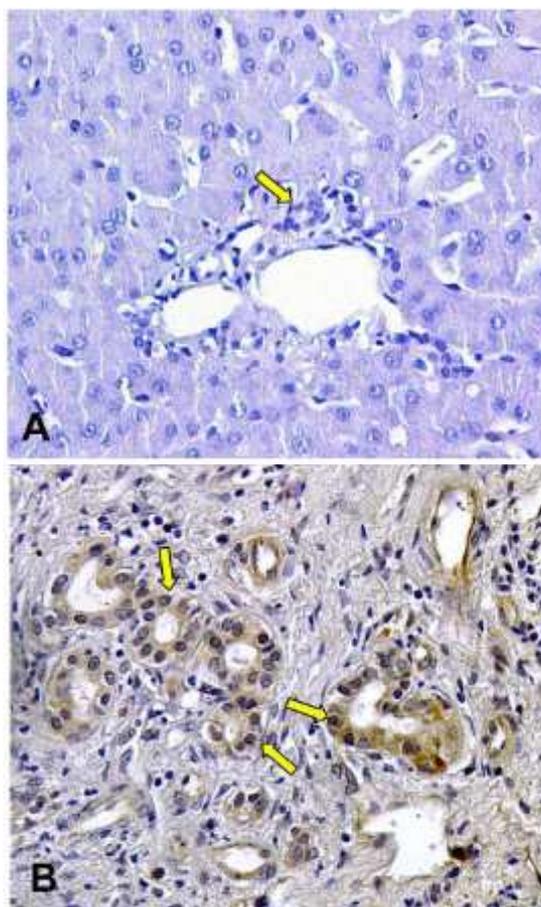


**Grafico 3.** Percentuale di colangiociti positivi per pAKT nel fegato normale e nei vari stadi della cirrosi biliare primitiva

Considerando nel complesso tutti gli stadi della cirrosi biliare primitiva, la percentuale dei colangiociti positivi per pAKT risulta direttamente correlata con quella dei colangiociti che esprimono GF1 ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.03$ ; *Grafico 4*) o IGF1-R ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.02$ ; *Grafico 4*).



**Grafico 4.** Correlazione tra espressione di pAKT, IGF1 e IGF1-R nei pazienti con cirrosi biliare primitiva



**Figura 7.** Colorazione immunoistochimica per pAKT. Nel fegato umano normale (A), i colangiociti (freccia) risultano essere negativi per pAKT. Di contro, nella CBP, i colangiociti esprimono marcatamente pAKT (freccie). O.M. 20x.

### CBP: apoptosi e correlazione con il pathway dell'IGF1

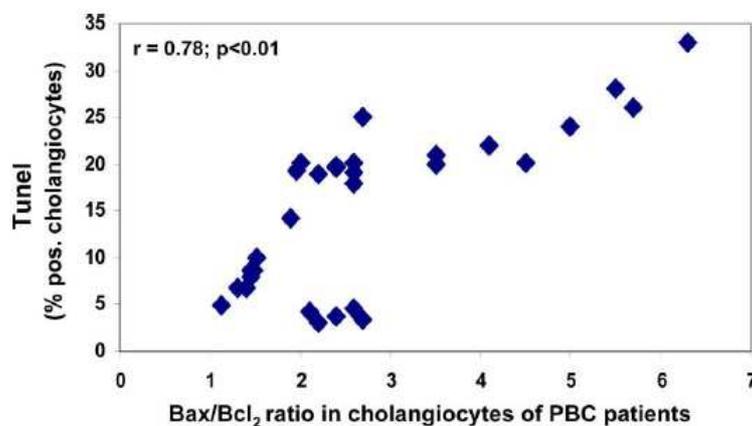
In una seconda fase del progetto abbiamo analizzato l'espressione immunoistochimica di Bax e Bcl<sub>2</sub> (Figura 8) ed il loro balance. Tali proteine sono fondamentali nella regolazione della cascata apoptotica (Willis et al. 2003). Abbiamo inoltre analizzato la percentuale delle cellule in apoptosi mediante TUNEL. I dati ottenuti sono riassunti nella Tabella 5.

	<b>Pazienti Normali (n=5)</b>	<b>CBP Stadio I (n= 5)</b>	<b>CBP Stadio II (n=9)</b>	<b>CBP Stadio III (n=10)</b>	<b>CBP Stadio IV (n=8)</b>
<b>TUNEL</b>	< 1	3.80±0.29	19.60±0.93*	24.01±1.50*	7.80±0.56 <sup>£</sup>
<b>Bax</b>	53.5±3,42	89.25±0.85 <sup>&amp;</sup>	89.75±1.49 <sup>&amp;</sup>	92.09±1.22 <sup>&amp;</sup>	80.81±1.39 <sup>&amp;£</sup>
<b>Bcl<sub>2</sub></b>	32.75±2,8	37.05±1.99	38.82±1.88	21.77±1.82 <sup>&amp;£</sup>	57.95±1.45 <sup>&amp;£</sup>
<b>Bax/Bcl<sub>2</sub></b>	1.64±0,08	2.42±0.12 <sup>&amp;</sup>	2.32±0.12 <sup>&amp;</sup>	4.6±0.42 <sup>&amp;£</sup>	1.41±0.04 <sup>&amp;£</sup>

**Tabella 5.** Espressione immunoistochimica (% dei colangiociti totali) di TUNEL, Bax Bcl<sub>2</sub> e Bax/Bcl<sub>2</sub> nei colangiociti in pazienti con CBP e in controlli normali. I dati indicano la percentuale dei colangiociti positivi e sono espressi come media ± Errore Standard (SE). \* = p<0.02 vs CBP stadio I; £ = p<0.01 vs gli altri stadio di CBP; & = p<0.05 vs normali.

Nel fegato normale, circa il 33% dei colangiociti dei dotti biliari interlobulari risultano positivi per la proteina anti-apoptotica Bcl<sub>2</sub> e tale positività risulta modicamente aumentata negli stadi I (37%) e II (39%) della cirrosi biliare primitiva. Di contro nel III stadio di CBP, l'espressione di Bcl<sub>2</sub> risulta significativamente ridotta (22%, p< 0.05 vs normali e CBP stadio I e II); infine nel IV stadio, la proteina Bcl<sub>2</sub> è marcatamente espressa coinvolgendo circa il 58% dei colangiociti (p< 0.01 vs normali e altri stadi di CBP). Un andamento differente è stato osservato nell'espressione della proteina pro-apoptotica Bax che è presente nel 53% dei colangiociti nel fegato normale, nel 90% circa negli stadi I,II e III della cirrosi biliare primitiva (p< 0.01 vs normali) e nell'81% nella fase terminale (IV stadio) di CBP (p< 0.05 vs CBP stadio I, II e III).

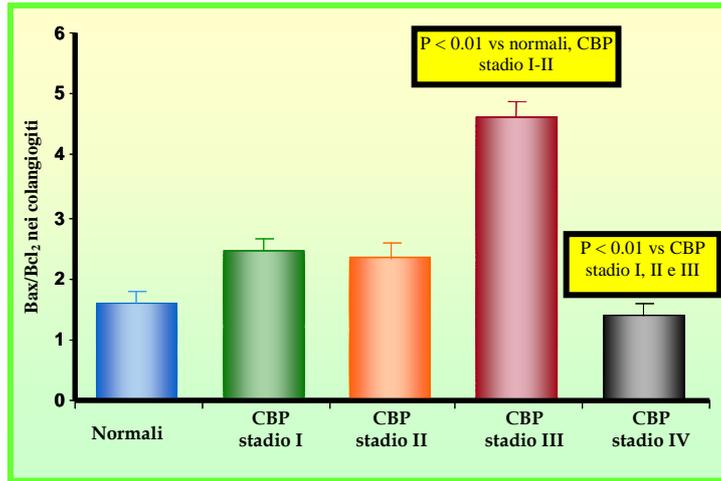
Il rapporto tra Bax/Bcl<sub>2</sub> (balance) è stato considerato come un'espressione del balance tra proteine pro- ed anti-apoptotiche nella cellula (Harada K et al 2000) ed infatti, considerando tutti i pazienti affetti da CBP indipendentemente dallo stadio, tale rapporto risulta direttamente correlato al TUNEL (r = 0.78, p< 0.01: *Grafico 5*).



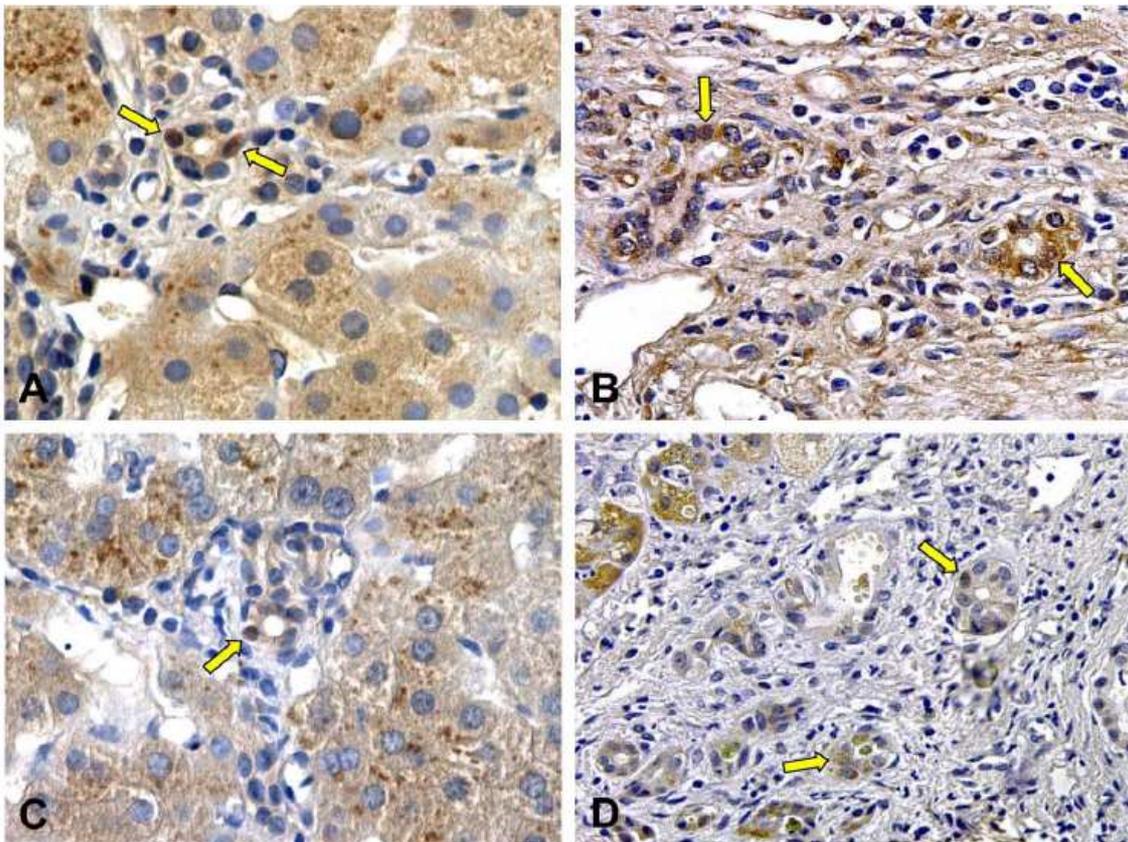
**Grafico 5.** Correlazione tra Tunel e Bax/ Bcl<sub>2</sub> nei pazienti con cirrosi biliare primitiva

Il rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> (*Grafico 6*) aumenta da un valore di 1.64 nei colangiociti normali fino a 2.42/2.32 rispettivamente nel I e II stadio di cirrosi biliare primitiva (p<0.01 vs normali) per raggiungere il suo valore massimo nel III stadio di CBP (4.6; p< 0.01 vs normali e CBP stadio I-II) dove l'apoptosi è massima (24% dei colangiociti sono positivi al TUNEL). Nel IV stadio di CBP, di contro, il rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> si riduce a 1.41 (p< 0.01 vs CBP stadio I, II e III) e ciò coincide con una marcata riduzione della percentuale dei colangiociti in apoptosi (7.8% dei colangiociti TUNEL positivi).

Considerando solamente gli stadi duttopenici della cirrosi biliare primitiva (stadio III e IV), l'espressione di IGF1, IGF1-R e pAKT nei colangiociti risulta essere direttamente correlata con la proteina anti-apoptotica Bcl<sub>2</sub> (r= 0.87, 0.86, 0.88; p< 0.01) e inversamente correlata con la proteina pro-apoptotica Bax (r= - 0.73, -0.76, -0.75; p< 0.01) e con il rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> (r= - 0.81, -0.80, -0.82; p< 0.01).



**Grafico 6.** Rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> nel fegato normale di controllo e nei vari stadi della cirrosi biliare primitiva



**Figura 8.** Immunoistochimica per Bax e Bcl<sub>2</sub>. I dotti biliari del fegato normale (A,C) e del fegato affetto da CBP (B,D) esprimono Bax (A, B) e Bcl<sub>2</sub> (C, D). O.M. 20x.

## DISCUSSIONE

I principali risultati di questo progetto, volto a chiarire il ruolo dell'IGF1 nella proliferazione e sopravvivenza dei dotti biliari in corso di colestasi sperimentale e umana, hanno messo in evidenza che: 1) i colangiociti proliferanti nel ratto BDL esprimono IGF1 ed il suo recettore (IGF1-

R); 2) i colangiociti dei dotti biliari interlobulari nel fegato umano normale esprimono solo raramente IGF1 e IGF1-R; 3) nei pazienti affetti da cirrosi biliare primitiva, i dotti biliari interlobulari mostrano una diffusa positività per i componenti del sistema dell'IGF1 (IGF1, IGF1-R e pAKT) e tale positività è correlata all'evoluzione della patologia; 4) Nel III e IV stadio della cirrosi biliare primitiva, l'espressione nei colangiociti del pathway dell'IGF1 è direttamente correlata con l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl<sub>2</sub> ed è inversamente correlata con la proteina pro-apoptotica Bax, con il rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> e con il TUNEL.

L'IGF1 è un ormone peptidico circolante e agisce localmente come fattore di crescita con azione endocrina, paracrina ed autocrina (Ge et al 2000; Tumber et al 2000; van Golen et al 2000; Hong et al 2001; Agnusdei et al 2005). Un numero sempre crescente di evidenze sperimentali ha messo in luce che l'attivazione dell'IGF1-R gioca un ruolo chiave nei processi di sopravvivenza cellulare e di protezione nei confronti della morte cellulare programmata. Tale ruolo è stato dimostrato in differenti citotipi tra cui osteoblasti (Tumber et al 2000), cellule del melanoma (Ge et al 2000), mioblasti cardiaci (Hong et al 2001), cellule neuronali (van Golen et al 2000) e numerose cellule epiteliali (Ahmad et al 1999). L'effetto dell'IGF1 è mediato dal legame con lo specifico recettore (IGF1-R) seppure risulta molto importante il ruolo delle IGF1-Rs responsabili del controllo della quantità totale di IGF1 libero di legarsi al recettore (Baxter et al 2000). L'attivazione del recettore da parte di IGF1 ne induce la stimolazione del dominio tirosin-chinasi con conseguente fosforilazione di residui tirosinici del recettore stesso e di altre proteine associate (O'Connor et al. 1997; Chen et al. 1998). Il pathway intracitoplasmatico di trasduzione del segnale collegato all'IGF1-R più importante è quello mediato da PI3K/AKT che agisce sull'apoptosi e sulla sopravvivenza cellulare. Dopo la fosforilazione ad opera di IGF1-R, IRS-1 (insulin receptor substrate-1) si lega al dominio SH2 di PI3K determinandone l'attivazione. Il conseguente aumento dei livelli di fosfatidil inositolo 3,4,5-trifosfato (PIP3) induce la fosforilazione di AKT che possiede un ruolo centrale nel prevenire la morte cellulare programmata agendo sull'attività di numerose proteine coinvolte nella cascata apoptotica (Dudek H et al. 1997). Target primario di pAKT sono le proteine della superfamiglia di Bcl<sub>2</sub> ed in particolare Bad la cui forma inattiva è localizzata sulla membrana mitocondriale dove interagendo con Bcl<sub>2</sub> ne blocca le funzioni anti-apoptotiche (Leverrier et al 1999; Chrysis et al 2001). Una volta fosforilata da pAKT, Bad non è più capace di interferire con l'azione di Bcl<sub>2</sub> (Heck et al 1999; Peruzzi et al 1999). pAKT determina inoltre l'aumento dell'espressione di proteine anti-apoptotiche quali Bcl<sub>2</sub> e Bcl-X<sub>1</sub> (Leverrier et al 1999; Chrysis et al 2001) e del fattore di trascrizione anti-apoptotico NF-κB (Leverrier et al 1999); inoltre sembra capace di ridurre l'attività della molecola pro-apoptotica p53 (Yamaguchi et al 2001) che ha il potere di ridurre l'espressione di IGF1-R e di aumentare l'espressione della proteina pro-apoptotica Bax (Grimberg et al 2000). La rilevanza dei dati che sottolineano il ruolo di IGF1 nel favorire la sopravvivenza cellulare ha indotto alcuni ricercatori all'utilizzo di IGF1 esogeno in differenti patologie umane inclusa la cirrosi epatica (Agnusdei et al. 2005; Conchillo et al. 2005; Fernandez et al. 2005).

I nostri risultati mostrano che il pathway dell'IGF1 è attivato nei colangiociti in corso di colestasi ed è legato alla proliferazione ed all'apoptosi di tali cellule. In particolare, questo progetto è stato focalizzato sulla cirrosi biliare primitiva che rappresenta una patologia progressiva che evolve verso la duttopenia con la riduzione del numero dei dotti biliari intraepatici (Desmet et al 1995, 1998a, 1998b; Kuroki et al 1996; Boyer 1997; Nakanuma et al 2000; Harada et al 2001, Tinmouth et al 2002; Alvaro et al 2004; Kaplan, Gesrhwing 2005). È dimostrato che la riduzione del numero dei dotti biliari presente nelle fasi tardive di CBP è legato principalmente a fenomeni di apoptosi indotti attraverso meccanismi di autoimmunità (Kuroki et al 1996; Nakanuma et al 2000; Harada et al 2001, Tinmouth et al 2002; Alvaro et al 2004). Tale dato è confermato anche dai nostri risultati sulla distribuzione del numero di colangiociti in apoptosi (TUNEL) nei diversi stadi della

CBP. Un precedente lavoro (Alvaro et al 2004) ha messo in evidenza come l'evoluzione della cirrosi biliare primitiva sia legata al balance tra le cellule in apoptosi (TUNEL) e le cellule in proliferazione (PCNA); in particolare, l'evoluzione verso la fase duttopenica della patologia (III-IV stadio) è legata alla prevalenza della percentuale di cellule in apoptosi rispetto a quelle in proliferazione. Inoltre tale lavoro sottolinea che mentre nel III stadio, apoptosi e proliferazione erano marcatamente presenti nei colangiociti, nel IV stadio entrambi i fenomeni si riducevano sensibilmente indicando una sorta di spegnimento dei processi del danno immunomediato (Alvaro et al 2004). Nel presente progetto abbiamo focalizzato l'attenzione solamente sui dotti biliari interlobulari che rappresentano l'esclusivo target della patogenesi della cirrosi biliare primitiva (Desmet et al 1995, 1998a, 1998b); a tal scopo è importante sottolineare che il diametro dei dotti biliari valutati non differiva nei diversi stadi della patologia e nei controlli normali. Inoltre lo studio è stato condotto su biopsie ottenute da pazienti donne in menopausa in modo da escludere l'interferenza delle fisiologiche modificazioni dei livelli sierici di estrogeni dovute al ciclo mestruale; tale accorgimento è stato adottato per l'interazione esistente tra IGF1 ed estrogeni (Kahlert et al 2000). I nostri risultati indicano che i colangiociti dei dotti interlobulari dei fegati affetti da CBP esprimono IGF1, IGF1-R e pAKT a differenza del fegato umano normale di controllo. pAKT è stata analizzata per indagare se il più importante pathway di trasduzione del segnale legato all'interazione tra IGF1 ed IGF1-R fosse effettivamente attivato. La presenza di una correlazione diretta tra la percentuale di colangiociti che esprimono IGF1/IGF1-R e quelli che esprimono pAKT indica che in tali cellule il pathway PI3K/AKT, che controlla la sopravvivenza cellulare all'apoptosi (Ge et al 2000; Tumber et al 2000; van Golen et al 2000; Hong et al 2001; Agnusdei et al 2005), è attivato. Un dato molto significativo è che, negli stadi duttopenici della cirrosi biliare primitiva, più del 70% dei colangiociti esprime IGF1, IGF1-R e pAKT; tale risultato suggerisce che, nella progressione di malattia, i colangiociti in cui il sistema dell'IGF1 è attivato sono favoriti nella sopravvivenza al danno immuno-mediato.

L'importanza dell'azione del sistema dell'IGF1 è confermata dai risultati ottenuti dallo studio dell'apoptosi nei colangiociti. In particolare, è stata valutata l'espressione delle proteine Bax e Bcl<sub>2</sub> il cui rapporto (balance) è stato utilizzato in precedenti lavori come un parametro per valutare la tendenza delle cellule ad andare in apoptosi (Ortiz et al 2000; Martinez-Arribas et al 2003; Alvaro et al 2005; Harada K et al 2000). Nel nostro lavoro è stata individuata una correlazione inversa tra l'espressione di IGF1, IGF1-R, pAKT ed il rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> che sottolinea il ruolo di IGF1 nel sostenere la sopravvivenza cellulare. Inoltre, i dati ottenuti mostrano come il rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> rappresenta un segnale della tendenza dei colangiociti ad andare in apoptosi. A tal proposito, nel fegato normale i nostri risultati sono in linea con i dati ottenuti in precedenti lavori (Harada K et al 2000). Inoltre nella CBP, il valore più elevato del rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> è presente nel terzo stadio (4.6) dove anche il numero delle cellule in apoptosi è significativamente più alto rispetto agli altri stadi (24% di colangiociti TUNEL positivi); di contro, il valore più basso del rapporto Bax/Bcl<sub>2</sub> è stato individuato nel IV stadio in cui il numero delle cellule in apoptosi è ridotto significativamente (7.8%) rispetto ai primi tre stadi. In molti tipi di cellule il pathway dell'IGF1 modula direttamente l'espressione e l'attività della proteina anti-apoptotica Bcl<sub>2</sub> ed i nostri dati indicano che anche nei colangiociti l'IGF1 possiede questa azione; infatti la percentuale dei colangiociti che esprimono le proteine del sistema dell'IGF1 è statisticamente correlata con l'espressione di Bcl<sub>2</sub>. Sfortunatamente una doppia immunolocalizzazione delle proteine del pathway dell'IGF1 e dell'apoptosi mitocondriale non è stata possibile a causa del materiale insufficiente. Tuttavia, una valutazione istologica ha indicato che più del 90% dei colangiociti positivi per IGF1, IGF1-R e pAKT non presenta gli aspetti morfologici tipici delle cellule in apoptosi (condensazione della cromatina, nucleo picnotico, etc.) mentre più del 90% dei colangiociti negativi per IGF1, IGF1-R e pAKT mostra i caratteristici segni di apoptosi.

Numerosi studi sperimentali e sull'uomo hanno dimostrato che esiste un sinergismo d'azione tra estrogeni ed IGF1 nel modulare la sopravvivenza e la resistenza all'apoptosi. Tale sinergismo è presente nelle cellule capaci di esprimere i recettori per gli estrogeni e coinvolge principalmente il recettore  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) (Kahlert et al 2000; Cossette et al 2002; Alvaro et al 2005). È stato inoltre dimostrato che nei colangiociti in pazienti affetti da CBP l'espressione di  $ER\alpha$  viene meno nel IV stadio dove pertanto il sistema dell'IGF1 rimane il pathway più importante nel promuovere la sopravvivenza cellulare (Alvaro et al 2005).

In conclusione, il presente progetto di ricerca ha messo in luce il ruolo del sistema dell'IGF1 nel promuovere la sopravvivenza colangiocitaria in corso di colestasi sperimentale ed umana. In particolare ha dimostrato come l'attivazione da parte di IGF1 del pathway intracitoplasmatico PI3K/AKT sia in grado, in corso di cirrosi biliare primitiva, di modulare l'espressione di proteine del pathway intrinseco dell'apoptosi garantendo la sopravvivenza dei colangiociti stessi. I colangiociti che sopravvivono negli stadi terminali (duttopenici) di tale malattia sono pertanto quelli in cui il pathway dell'IGF1 è attivato e riesce ad impedire la morte cellulare programmata indotta dal danno immunomediato.

### **PROSPETTIVE FUTURE**

Alla luce dei risultati ottenuti dal presente progetto di ricerca, strategie farmacologiche o genetiche tese a sostenere il sistema dell'IGF1 potrebbero essere utili nel ritardare la progressione della cirrosi biliare primitiva.

In particolare, la clonazione dell'IGF1 ricombinante umano (rhIGF1) ha aperto la possibilità di produrre una quantità sufficiente di rhIGF1 per l'utilizzo clinico. Il rhIGF1 è stato sperimentato nella terapia di alcune patologie dell'accrescimento: ad esempio, le sindromi di insensibilità al GH (sindrome di Laron), caratterizzate da alti livelli sierici di GH, bassi livelli di IGF1 ed insensibilità alla somministrazione esogena di GH, sono un gruppo di patologie in cui l'utilizzo di rhIGF1 rappresenta un razionale ed appropriato approccio terapeutico (Ranke MB 2005).

L'utilizzo del rhIGF1, grazie alle sue proprietà ipoglicemizzanti, è stato preso in considerazione e sperimentato nel diabete mellito di tipo I per il controllo metabolico nei pazienti in cui le terapie convenzionali risultano scarsamente efficaci (Ranke MB 2005). Inoltre l'azione neuroprotettiva dell'IGF1 suggerisce che la terapia con tale ormone possa essere utile nel trattamento delle malattie neurodegenerative (Carro E, Torres-Aleman I 2004).

Nella patologia epatica, alcuni lavori hanno mostrato come la somministrazione di IGF1 sia nel ratto che nell'uomo possa essere efficace nel ridurre l'apoptosi degli epatociti ed nell'aumentare la produzione di albumina (Sheen-Chen SM et al 2006; Conchillo M et al 2005). I nostri risultati indicano l'importanza del sistema IGF1 anche nella patologia colangiocitaria prospettandone un possibile ruolo terapeutico nelle patologie che colpiscono primariamente tali cellule.

### **BIBLIOGRAFIA**

- Agnusdei D, Gentilella R (2005). GH and IGF-I as therapeutic agents for osteoporosis. *J Endocrinol Invest*; 28 (8 Suppl): 32-36.
- Ahmad NS, Glazer RI (1999). Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol*; 58: 425-430.
- Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N (1988). Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest*; 81: 569-578.

- Alpini G, Glaser S, Robertson W, Phinizy JL, Rodgers R, Caligiuri A, et al (1997a). Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. *Am J Physiol*; 273: G518-G529.
- Alpini G, Glaser S, Phinizy JL, Rodgers R, Robertson W, Caligiuri A, et al (1997b). Bile acid depletion decreases cholangiocyte proliferative capacity and secretin-stimulated ductal bile secretion in bile duct ligated (BDL) rats. *Gastroenterology*; 112: A1210.
- Alvaro D, Alpini G, Onori O, Perego L, Sveglisi Baroni G, Franchitto A, Baiocchi L, Glaser SS, Le Sage G, Folli F, Gaudio E (2000a). Estrogen stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats. *Gastroenterology*; 119: 1681-1691.
- Alvaro D, Gigliozzi A, Attili AF (2000b). Regulation and deregulation of cholangiocyte proliferation. *J Hepatol*; 33: 333-340.
- Alvaro D, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Glaser SS, Le Sage G, Folli F, Attili AF, Gaudio E (2002a). Alfa and beta estrogen receptors and the biliary tree. *Mol Cell Endocrinol*; 193 (1-2): 105-8.
- Alvaro D, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Glaser SS, Le Sage G, Gigliozzi A, Vetuschi A, Morini S, Attili AF, Gaudio E (2002b). Effect of ovariectomy on the proliferative capacity of intrahepatic rat cholangiocytes. *Gastroenterology*; 123: 336-344.
- Alvaro D, Onori P, Metalli VD, Svegliati-Baroni G, Folli F, Franchitto A, Alpini G, Mancino MG, Attili AF, Gaudio E (2002c). Intracellular pathways mediating estrogen-induced cholangiocyte proliferation in the rat. *Hepatology*; 36 (2): 297-304.
- Alvaro D, Invernizzi P, Onori P, Franchitto A, De Santis A, Crosignani A, Sferra R, Ginanni-Corradini S, Mancino MG, Maggioni M, Attili AF, Podda M and Gaudio E (2004). Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*; 41: 905–912.
- Alvaro D, Metalli VD, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Barbaro B, Glaser SS, Francis H, Cantafora A, Blotta I, Attili AF, Gaudio E (2005). The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis. *J Hepatol*; 43 (5): 875-83.
- Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, Glaser S, Gaudio E (2006). Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World J Gastroenterol*; 12 (22): 3537-45.
- Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E et al (2007). Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology*; 132: 415-431.
- Baiocchi L, Alpini G, Glaser S, Eisel W, Francis H, Phinizy JL, et al (1999). The inhibitory effect of ursodeoxycholate (UDCA) on cholangiocyte growth and secretion in bile duct ligated (BDL) rats is not affected by its conjugation with taurine. *Gastroenterology*; 116: AL0033.
- Baker J, Liu J-P, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*; 75: 73-82.
- Baxter RC (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endo Metab*; 278: E967–E976.
- Bergasa NV (2003). Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis*; 7: 879-900.
- Bhathal PS, Gall JAM (1985). Deletion of hyperplastic biliary epithelial cells by apoptosis following removal of the proliferative stimulus. *Liver*; 5: 311-325.
- Bittencourt PL, Farias AQ, Abrantes-Lemos CP, et al (2004). Prevalence of immune disturbances and chronic liver disease in family members of patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*; 19: 873-8.

- Blundell TL, Bedarkar S, Rinderknecht E, Humbel RE (1978). Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*; 75: 180–184.
- Boyer JL (1997). Vanishing Bile Duct Syndrome-from bench to bed side. In: Alvaro D, Benedetti A, Strazzabosco M, (eds). *Vanishing Bile Duct Syndrome*. Kluwer Ac.Pub., London, pp 240-246.
- Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, Franchitto A, Merli M, Siciliano M, Gentili F, Onetti Muda A, Berloco P, Rossi M, Attili AF, Gaudio E (2005). Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis*; 37 (5): 349-56.
- Carro E, Torres-Aleman I (2004). Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: therapeutic prospects? *Expert Rev Neurother*; 4 (1): 79-86.
- Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn Y, Nollet M, Gaulard P, et al (1994). Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol*; 144: 460-465.
- Chen H, Yan GC and Gishizky ML (1998). Identification of structural characteristics that contribute to a difference in antiapoptotic function between human insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. *Cell Growth Differ*; 9: 939–947.
- Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ (2001). Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci*; 21: 1481–1489.
- Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JJ, Castilla-Cortazar I, Frystyk J, Flyvbjerg A, Yoshizawa C, Jansen PL, Scharschmidt B, Prieto J (2005). Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol*; 43 (4): 630-636.
- Cossette LJ, Gaumont I, Martinoli MG (2002). Combined effect of xenoestrogens and growth factors in two estrogen-responsive cell lines. *Endocrine*; 18 (3): 303-308.
- D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE (1980). Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol*; 75: 315–328.
- Daughaday WH, Rotwein P (1989). Insulin-like growth factors I and II: peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*; 10: 68-91.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003). A decade of caspases. *Oncogene*; 22: 8543–67.
- Denko CW, Bergental DM (1955). The effect of hypophysectomy and growth hormone on cartilage sulfate metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med*; 84: 603–605.
- Desmet VJ (1986). Current problems in diagnosis of biliary disease and-cholestasis. *Semin Liv Dis*; 6: 233-245.
- Desmet V, Roskams T, and Van Eyken P (1995). Ductular reaction in the liver. *Path Res Pract*; 191: 513-524.
- Desmet V, Roskams T, and Van Eyken P (1998a). Histopathology of vanishing bile duct diseases. *Adv Clin Pathol*; 2: 87-99.
- Desmet V, Roskams T, and Van Eyken P (1998b). Pathology of the biliary tree in cholestasis: ductular reaction. In: Manns MP, Boyer JL, Jansen PLM, and Reichen J (eds) *Cholestatic liver diseases*. Kluwer Academic Publishers, pp143-154.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF (1997). Regulation of neuronal survival by the serine–threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661–665.

- Fausto N, Webber EM (1994). Liver regeneration. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. (3rd ed.) New York: Raven Press, Ltd.:1059-1084.
- Fernandez AM, Carro EM, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I (2005). Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Res Brain Res Rev*; 50(1): 134-141.
- Firth SM, Baxter RC (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*; 23: 824–54.
- Forton DM, Patel N, Prince M et al (2004). Fatigue and primary biliary cirrhosis: association of globus pallidus magnetisation transfer ratio measurements with fatigue severity and blood manganese levels. *Gut*; 53: 587-92.
- Furstenberger G, Senn HJ (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol*; 3 (5): 298-302.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G (2006a). Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 291 (2): G307-17.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G (2006b). Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology*; 130 (4): 1270-82.
- Ge NL, Rudikoff S (2000). Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood*; 96: 2856–2861.
- Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, et al (2000). Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev*;174: 210-25.
- Glaser S, LeSage G, Alvaro D, Chowdhury U, Kanno N, Francis H et al (1999). Ablation of the D2 dopaminergic innervation by intraportal injection of 6-hydroxidopamine (6-OHDA) reduces cholangiocyte proliferative and secretory activity in bile duct ligated (BDL) rats. *Hepatology*; 30: A1088.
- Green H, Morikawa M, Nixon T (1985). A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*; 29: 195–198.
- Grimberg A (2000). P53 and IGFBP-3: apoptosis and cancer protection. *Mol Genet Metab* 70: 85–98.
- Harada K, Furubo S, Ozaki S, Hiramatsu K, Sudo Y, Nakanuma Y (2001). Increased expression of WAF1 in intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis relates to apoptosis. *J Hepatol*; 34: 500-506.
- Harada K, Iwata M, Kono N, Koda W, Shimonishi T, Nakanuma Y (2000). Distribution of apoptotic cells and expression of apoptosis-related proteins along the intrahepatic biliary tree in normal and non-biliary diseased liver. *Histopathology*; 37 (4): 347-54.
- Harrison (2002). *Principi di Medicina Interna*. McGraw-Hill, 15<sup>a</sup> edizione.
- Heck S, Lezoualc'h, F, Engert S, Behl C (1999). Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*; 274: 9828–9835.
- Hong F, Kwon SJ, Jhun BS (2001). Insulin-like growth factor-1 protects H9c2 cardiac myoblasts from oxidative stress-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Life Sci*; 68: 1095–1105.

- Howel D, Fischbacher CM, Bhopal RS, Gray J, Metcalf JV, James OF (2000). An exploratory population-based case-control study of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*; 31: 1055-60.
- Invernizzi P, Alvaro D, Crosignani A, Gaudio E, Podda M (2004). Tamoxifen in treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*; 39 (4): 1175-6.
- Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*; 216: 1237–1239
- Iwai M, Shimazu T (1992). Alteration in sympathetic nerve activity during liver regeneration in rats after partial hepatectomy. *J Auton Nerv Syst*; 41: 209-214.
- Iwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y (2000). Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol*; 31(2): 179-84.
- Jones JJ, Clemmons DR (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*; 16: 3-34.
- Joplin R, Hishida T, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Ayres R, Neuberger JM et al (1992). Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor. *J Clin Invest*; 90: 1284-1289.
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R (2000). Estrogen Receptor  $\alpha$  Rapidly Activates the IGF-1 Receptor Pathway. *J Biol Chem* 75: 18447–18453.
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G (2000). Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology*; 31: 555-561.
- Kaplan MM, Gershwin ME (2005). Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*; 353 (12): 1261-1273.
- Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M et al (2002). Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology*; 123: 1031-43.
- Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ (1983). Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology*; 112: 2215–2217.
- Kooijman R (2006). Tegulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-1. *Cytokine Growth Factor Rev*; 17 (4): 305-23.
- Kurmasheva RT, Houghton PJ (2006). IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta*; 1766 (1): 1-22.
- Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani K, Hisa T (1996). Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch*; 429: 119-129.
- Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani, K, and Hisa T (1996). Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virch Arch*; 429: 119-125.
- Lanza G (1985). *Anatomia Patologica Sistematica*. Piccin editore.
- Lawen A (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays*; 25: 888–96.
- Le Roith D (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*; 336 (9): 633-40.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*; 22 (1): 53-74.
- LeSage G, Glaser S, Gubba S, Robertson WE, Phinizy JL, Lasater J et al (1996). Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal bile secretion. *Gastroenterology*; 111: 1633-1644.

- LeSage G, Alvaro D, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Eisel W et al (1999). Cholinergic system modulates growth, apoptosis and secretion of cholangiocytes from bile duct ligated rats. *Gastroenterology*; 117: 191-199.
- LeSage G, Glaser S, Alpini G (2001). Regulation of cholangiocyte proliferation. *Liver*; 21 (2): 73-80.
- LeSage GD, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Tretjak Z, Caligiuri A et al (1999). Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver. *Hepatology*; 29: 307-319.
- Leuschner M, Dietrich CF, You T, et al (2000). Characterisation of patients with primary biliary cirrhosis responding to long term ursodeoxycholic acid treatment. *Gut*; 46: 121-6.
- Leverrier Y, Thomas J, Mathieu AL, Low W, Blanquier B, Marvel J (1999). Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ*; 6: 290-296.
- Liu Z, Sakamoto T, Ezure T, Yokomuro S, Murase N, Michalopoulos G et al (1998). Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium. *Hepatology*; 28: 1260-1268.
- Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS (1978). Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*; 379 (2): 103-12.
- Martinez-Arribas F, Nunez-Villar MJ, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J (2003). Immunofluorometric study of Bcl-2 and Bax expression in clinical fresh tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res*; 23 (1B): 565-568.
- Matsumoto K, Fuji H, Michalopoulos G, Fung JJ, Demetris AJ (1994). Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factor in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology*; 20: 376-382.
- Matsumura S, Van de Water J, Leung P et al (2004). Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*; 39: 1415-1422.
- Milkiewicz P, Heathcote EJ (2004). Fatigue in chronic cholestasis. *Gut*; 53: 475-7.
- Morland CM, Fear J, Joplin R, Adams DH (1996). Human biliary epithelial cells express chemokines interleukine-8 and monocyte chemotactic protein-1 in response to inflammatory cytokine stimulation. *Hepatology*; 24 (suppl): 332A.
- Moteki S, Leung PS, Coppel RL, Dickson ER, Kaplan MM, Munoz S et al (1996). Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology*; 24: 97-103.
- Murphy WR, Daughaday WH, Hartnett C (1956). The effect of hypophysectomy and growth hormone on the incorporation of labeled sulfate into tibial epiphyseal and nasal cartilage of the rat. *J Lab Clin Med*; 47: 715-722.
- Nakanuma Y, Tsuneyama K, Sasaki M, Harada K (2000). Destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 14: 549-570
- Napoli J, Prentice D, Niinami C, Bishop GA, Desmond P, McCaughan GW (1997). Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and TGF-beta in a bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology*; 26: 624-633.

- Neuberger J (2002). Antibodies and primary biliary cirrhosis: piecing together the jigsaw. *J Hepatol*; 36: 126-129.
- O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu YM (1997). Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*; 17: 427-435.
- Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egido J, Neilson EG (2000). Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int*; 57 (3): 969-981.
- Paradis K, Le ON, Russo P, St-Cyr M, Fournier H, Bu D (1995). Characterization and response to interleukin 1 and tumor necrosis factor of immortalized murine biliary epithelial cells. *Gastroenterology*; 109: 1308-1315.
- Pares A, Rodes J (2003). Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis*; 7: 779-794.
- Peruzzi F, Prisco M, Dews M (1999). Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*; 19: 7203-7215.
- Petropoulos CJ, Yaswen P, Panzica M, Fausto N (1985). Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of the distribution of alpha-fetoprotein RNA sequences in cell populations isolated from normal, regenerating, and preneoplastic rat livers. *Cancer Res*; 43: 5762-5768.
- Popper H, Kent G, Stein R (1957). Ductular reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp*; 24: 551-556.
- Prince M, Chetwynd A, Newman W, Metcalf JV, James OFW (2002). Survival and symptom progression in a large geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years. *Gastroenterology*; 123: 1044-51.
- Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OF (2004). Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in large population based cohort. *Gut*; 53: 865-860.
- Ranke MB (2005). Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*; 16 (4): 190-7.
- Rinderknecht E, Humbel RE (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*; 253: 2769-2776.
- Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF (1997). The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology*; 112: 269-279
- Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ (2003). Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis*; 23 (4): 385-96.
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Brunt EM et al. (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*; 39: 1739-1745.
- Savill J (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*; 61: 375-80.
- Sheen-Chen SM, Ho HT, Chia-Pei L, Hung KS, Eng HL (2006). The effect of insulin-like growth factor-I on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat. *Dig Dis Sci*; 51 (12): 2220-4.
- Sirica AE, Cihla HP (1984). Isolation and partial characterizations of oval and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. *Cancer Res*; 44: 3454-3466.

- Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V et al (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for post-natal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 7088–92.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N (1990). Origin pattern and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*; 99: 466-477.
- Stähelin BJ, Zimmermann H, Reichen J (1996). The balance of Bax and Bcl-2 regulates apoptosis in biliary epithelial cells (BEC). *J Hepatol*; 26 (Suppl 1): 67
- Talwalkar JA, Souto E, Jorgensen RA, Lindor KD (2003). Natural history of pruritus in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 1: 297-302.
- Tan CK, Podila PV, Taylor JE, Nagorney DM, Wiseman GA, Gores GJ et al (1995). Human cholangiocarcinomas express somatostatin receptors and respond to somatostatin with growth inhibition. *Gastroenterology*; 108: 1908-1916.
- Thorburn A (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*; 16: 139–44.
- Tietz P, Alpini G, Pham LD, LaRusso NF (1995). Somatostatin inhibits secretin-induced ductal choleresis in vivo and exocytosis by cholangiocytes. *Am J Physiol*; 269: G110-G118.
- Tinmouth J, Lee M, Wanless IR, Tsui FW, Inman R, Heathcote EJ (2002). Apoptosis of biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Liver*; 22: 228-34.
- Tumber A, Meikle MC, and Hill PA (2000). Autocrine signals promote osteoblast survival in culture. *J Endocrinol*; 167: 383–390.
- Vacanti JP, Folkman J (1979). Bile duct enlargement by infusion of L-proline: potential significance in biliary atresia. *J Pediatr Surg*; 14: 814-818.
- Van Golen CM, Feldman EL (2000). Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J Cell Physiol*; 182: 24–32.
- Van Gurp M, Festjens N, van LG, Saelens X, Vandenabeele P (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*; 304: 487–97.
- Watt FE, James OF, Jones DE (2004). Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a populationbased cohort study. *QJM*; 97: 397-406.
- Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC (2003). The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci*; 116: 4053-4056.
- Yakar S, Kim H, Zhao H, Toyoshima Y, Pennisi P, Gavrilova O, Leroith D (2005). The growth hormone-insulin like growth factor axis revisited: lessons from IGF-1 and IGF-1 receptor gene targeting. *Pediatr Nephrol*; 20 (3): 251-4.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B et al (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulinlike growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 7324–9.
- Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H (2001). Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem*; 276: 5256–5264.
- Yang L, Faris RA, Hixson DC (1993). Long-term culture and characteristics of normal rat liver bile duct epithelial cells. *Gastroenterology*; 104: 840-852.