



**SAPIENZA**  
**UNIVERSITÀ DI ROMA**

**FACOLTÀ DI FARMACIA E MEDICINA**  
**Dottorato in Epatogastroenterologia Sperimentale e clinica**

**EFFETTI DEL MODULATORE DI FXR SUL  
POTENZIALE CANCEROGENICO DELLE  
CELLULE STAMINALI TUMORALI ISOLATE  
DA COLANGIOCARCINOMA UMANO**

Relatore:

Prof. Domenico Alvaro

Dottoranda:

Sabina Di Matteo

A.A. 2017/2018

## INDICE

<b>ABSTRACT</b>	3
<b>ABBREVIAZIONI</b>	4
<b>INTRODUZIONE</b>	6
Il Colangiocarcinoma: Definizione e Classificazione	6
Epidemiologia del CCA	7
Fattori di rischio del CCA	8
Patogenesi del CCA	9
Cellule di origine del CCA e cellule tumorali staminali (Cancer Stem Cells)	10
Segni e sintomi del CCA	11
Diagnosi e stadiazione del CCA	11
Prognosi del CCA	13
Terapia del CCA	14
Il Recettore Farnesoide X (FXR)	15
L'Acido Obeticolico come agonista di FXR	17
<b>SCOPO DEL PROGETTO</b>	18
<b>MATERIALI E METODI</b>	19
Campioni di iCCA umano	19
Allestimento di colture cellulari primarie di iCCA umano	19
Isolamento di hBTSC	20
Trattamento farmacologico	20
Analisi dell'espressione genica di FXR e ASBT tramite RT-qPCR	21
Saggio di proliferazione cellulare, MTS	22
Tempo di Duplicazione (PDT) della popolazione cellulare	22
Test di Apoptosi AnnessinaV-FITC/PI	23
Analisi della capacità di formare colonie (Clonogenic ssay)	23
Saggio di formazione di sferoidi	24
Wound Healing Assay	24
Matrigel® invasion assay	24
Xeno trapianto di cellule tumorali di iCCA in topi BALB/c nude (saggio di tumorigenicità <i>in vivo</i> )	25
Metodi di analisi statistica	26
<b>RISULTATI</b>	28
Caratterizzazione delle linee primarie di iCCA umane per espressione genica di FXR e ASBT	28
OCA inibiva la proliferazione delle iCCA	28
OCA aumentava il Tempo di Duplicazione della Popolazione cellulare (PDT)	29
L'OCA aumentava l'apoptosi delle cellule di iCCA	30
L'OCA inibiva la capacità di formazione delle colonie delle linee primarie di iCCA	30
L'OCA inibiva la formazione degli sferoidi di entrambi i sottotipi dell'iCCA	30
OCA riduceva la migrazione cellulare di iCCA-Misto: Wound Healing Assay	31
OCA riduceva l'invasione tumorale dell'iCCA <i>in vitro</i>	32

Aumento dell'effetto antiproliferativo di Gemcitabina e Cisplatino in associazione con OCA	32
Aumento dell'effetto pro-apoptotico di Gemcitabina e Cisplatino in combinazione con OCA	33
Il trattamento combinato con OCA in associazione con Gemcitabina e Cisplatino aboliva la formazione di colonie dell'iCCA	35
L'OCA da solo riduceva marcatamente e combinato con Gemcitabina o Cisplatino abrogava totalmente, la crescita degli xenotrapianti dell'iCCA-Misto, <i>in vivo</i>	35
<b>DISCUSSIONI</b>	37
<b>CONCLUSIONI</b>	41
<b>PROSPETTIVE FUTURE</b>	41
<b>FIGURE</b>	42
Figura 1. Classificazione del CCA basata sulle caratteristiche istologiche.	42
Figura 2. Nicchie di cellule staminali epatiche.	43
Figura 3. Recettore Nucleare Farnesoide X(FXR)	43
Figura 4. Acido Obeticolico (OCA)	44
Figura 5. Livelli di espressione genica di FXR e ASBT in colture di cellule primarie di iCCA-Misto e Mucinoso.	44
Figura 6. Effetto di OCA, CDCA e UDCA sulla proliferazione di colture cellulari primarie umane di iCCA-Misto e Mucinoso.	45
Figura 7. Il trattamento con OCA allungava il tempo di duplicazione cellulare delle cellule di iCCA.	46
Figura 8. L'OCA aumentava l'apoptosi delle cellule di iCCA-Misto e Mucinoso.	47
Figura 9. L'OCA inibiva la capacità di formazione delle colonie delle cellule iCCA.	48
Figura 10. Il trattamento con OCA inibiva la formazione degli sferoidi (tumorsfere) delle cellule di iCCA.	49
Figura 11. OCA impediva la migrazione delle cellule di cellule iCCA-Misto.	50
Figura 12. OCA riduceva la capacità invasiva delle cellule di iCCA.	51
Figura 13. L'OCA potenziava gli effetti inibitori di Gemcitabina o Cisplatino sulla proliferazione delle cellule iCCA.	52
Figura 14. La combinazione farmacologica di OCA potenziava l'effetto pro-apoptodico dell'antitumorale Gemcitabina.	53
Figura 15. L'OCA combinata con Gemcitabina o Cisplatino annullava totalmente la capacità di formazione delle colonie delle cellule iCCA.	54
Figura 16. OCA da solo diminuiva marcatamente, e combinato con Gemcitabina o Cisplatino annullava totalmente, la crescita degli xenotrapianti di iCCA-Misto.	55
Figura 17. Analisi istomorfologica e immunoistochimica dei tessuti tumorali degli xenotrapianti di iCCA-Misto dopo 5 settimane di trattamento con OCA, Gemcitabina, Cisplatino e le combinazioni indicate.	56
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	57
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	61

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Cholangiocarcinoma (CCA) is an aggressive cancer with high resistance to chemotherapeutics. CCA is enriched in cancer stem cells, which correlate with aggressiveness and prognosis.

FXR, a member of metabolic nuclear receptor family, is markedly down-regulated in human CCA. Our aim was to evaluate, in primary cultures of human intrahepatic CCA (iCCA), the effects of the FXR agonist obeticholic acid (OCA), a semisynthetic bile acid, on their cancerogenic potential.

### **Material and methods**

Primary human iCCA cell cultures were prepared from surgical specimens of mucinous or mixed iCCA subtypes. Increasing concentrations (0 – 2.5  $\mu\text{M}$ ) of OCA were added to culture media and, after 3 – 10 days, effects on proliferation (MTS assay, cell population doubling time), apoptosis (annexin V-FITC/propidium iodide), cell migration and invasion (wound healing response and Matrigel invasion assay), and cancerogenic potential (spheroid formation, clonogenic assay, colony formation capacity) were evaluated.

### **Results**

FXR gene expression was downregulated (RT-qPCR) in iCCA cells vs. normal human biliary tree stem cells ( $p < 0.05$ ) and in mucinous iCCA vs. mixed iCCA cells ( $p < 0.05$ ). OCA significantly ( $p < 0.05$ ) inhibited proliferation of both mucinous and mixed iCCA cells, starting at a concentration as low as 0.05  $\mu\text{M}$ . Also, CDCA (but not UDCA) inhibited cell proliferation, although to a much lower extent than OCA, consistent with the different affinity for FXR. OCA significantly induced apoptosis of both iCCA subtypes and decreased their *in vitro* cancerogenic potential, as evaluated by impairment of colony and spheroid formation capacity and delayed wound healing and Matrigel invasion. In general, these effects were more evident in mixed than mucinous iCCA cells. When tested together with Gemcitabine and Cisplatin, OCA potentiated the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of these chemotherapeutics, but mainly on mixed iCCA cells. OCA abolished the capacity of both mucinous and mixed iCCA cells to form colonies when administered together with Gemcitabine and Cisplatin. In subcutaneous xenografts of mixed iCCA cells, OCA alone or combined with Gemcitabine or Cisplatin markedly reduced the tumor size after 5 weeks of treatment by inducing necrosis of tumor mass and inhibiting cell proliferation.

### **Conclusion**

In conclusion, FXR is down-regulated in iCCA cells, where its activation by OCA results in anti-cancerogenic effects against mucinous and mixed iCCA cells, both *in vitro* and *in vivo*. The effects of OCA predominated in mixed iCCA cells, consistent with the lower aggressiveness and the higher FXR expression in this CCA subtype. These results represent the basis for testing OCA in clinical trials of CCA patients.

## **ABBREVIAZIONI**

ABC: ATP binding cassette

ASBT: Trasportatore Apicale dei Sali Biliari

BiLIN: neoplasia biliare intraepiteliale

CA: acido colico

CDCA: acido chenodeossicolico

cDNA: complementary DNA

CK-19: Citocheratina19

CSCs: Cancer Stem Cells

DCA: acido deossicolico

dCCA: CCA distale

DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium

DMT2: Diabete mellito di tipo 2

dNTP: desossinucleotide trifosfato

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline

DS: Deviazione Standard

DTT: Dithiothreitol

ES: Errore Standard

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorter

FBS: Fetal bovine serum

FGF19: Fattore di Crescita Fibroblastico 19

FXR: Recettore farnesoide X

H&E: Ematossilina ed Eosina

hBTSC: Human Biliary Tree Stem Cell

HBV: Human B virus

HCC: Epatocarcinoma

HCV: Human C virus

hHpSC: Human Hepatic Progenitor Stem Cells

iCCA: CCA intraepatico

IgG: immunoglobuline G

IHC: immunoistochimica

IL-6: Interleuchina-6

iNOS: forma inducibile dell'ossido nitrico sintasi

IORT: radioterapia intraoperatoria

IPBN: neoplasia biliare papillare intraduttale

LCA: acido litocolico  
LOS: lesione occupante spazio  
MIC: Concentrazione di massima inibizione  
miRNA: micro-RNA  
MMPs: Metalloproteasi  
NASH: Steatoepatite Non Alcolica  
NO: ossido nitrico  
OCA: acido 6-alpha-etinil-chenodeossicolico  
oligo-dT: oligonucleotidi di Timidina  
PAS: acido periodico - reattivo di Schiff  
PBC: Colangite Biliare Primitiva  
PBGs: ghiandole peribiliari, peribiliary glands  
pCCA: CCA perilare  
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen  
PSC: Colangite sclerosante primitiva  
qPCR: quantitative Polimerase Chain Reaction  
RM: Risonanza Magnetica  
RT-qPCR: Quantitative reverse transcription PCR  
RXR: Recettore X dell'acido Retinoico  
SHP: small heterodimer protein  
SHP: Small Heterodimer Protein  
STAT: signal transducers and activators of transcription  
TACE: Transarterial Chemoembolization  
TARE: Transarterial Radioembolization  
TC: tomografia computerizzata  
UDCA: acido ursodeossicolico

# INTRODUZIONE

## Il Colangiocarcinoma: Definizione e Classificazione

Il colangiocarcinoma (CCA) include un insieme eterogeneo di neoplasie primitive maligne che possono originare da qualsiasi porzione dell'albero biliare, intra od extra-epatico, ad esclusione di quelle a partenza dalla papilla di Vater e dalla colecisti<sup>[1]</sup>. Originano dall'epitelio di rivestimento e/o dalle ghiandole peribiliari dell'albero biliare intra ed extra-epatico e, dal punto di vista istologico, si presentano generalmente come degli adenocarcinomi<sup>[2-4]</sup>.

Per quanto riguarda la classificazione, la più recente proposta classificativa del CCA basata su criteri anatomico-topografici, identifica tre forme di CCA: l'intraepatico (iCCA), il perilare (pCCA o tumore di Klatskin) e il distale (dCCA). Il punto di separazione per distinguere i primi due tipi di CCA è rappresentato dai dotti biliari di secondo ordine, mentre il punto di reperi tra pCCA e dCCA è dato dal punto di inserzione del dotto cistico nel coledoco; in particolare il pCCA origina a monte di tale inserzione e può interessare il dotto epatico comune e i dotti epatici destro e sinistro; il dCCA origina invece a valle dell'inserzione del dotto cistico nel coledoco o dotto biliare<sup>[4-7]</sup>. Insieme, l'iCCA e il pCCA costituiscono più del 90% delle forme di CCA.

Considerando la modalità di crescita del CCA, l'iCCA è stato classificato dalla Liver Cancer Study Group of Japan (LCSGJ) nei tipi formante-massa, periduttale-infiltrante ed intraduttale (LCSGJ, 2003). Il tipo formante-massa rappresenta il tipo più frequente dell'iCCA ed è tipica dei tumori che originano dai dotti biliari intraepatici di piccolo calibro<sup>[5]</sup>. I tipi periduttale-infiltrante ed intraduttale sono tipici dei tumori che originano dai dotti biliari intraepatici di calibro maggiore. Il tipo periduttale-infiltrante cresce longitudinalmente in prossimità del dotto biliare e può determinare stenosi biliare ed invasione del parenchima epatico circostante dando origine a forme miste formante-massa insieme con forme periduttali-infiltranti<sup>[5]</sup>. Il tipo intraduttale ha generalmente una crescita di tipo papillare e può essere preceduto da lesioni precancerose quali la neoplasia biliare intra-epiteliale, la neoplasia papillare intraduttale, la neoplasia cistica mucinosa e la neoplasia tubulare intraduttale<sup>[5]</sup>.

In merito alla modalità di crescita, i tipi pCCA e dCCA possono presentarsi in forma periduttale-infiltrante ed intraduttale; la forma pCCA inoltre, può presentarsi in forma nodulare e nell'80% dei casi in forma mista nodulare e periduttale infiltrante<sup>[5, 8, 9]</sup>.

Tuttavia, il limite principale di questa classificazione risiede nel fatto di non considerare le differenze istologiche dei vari tratti dell'albero biliare da cui prende origine la neoplasia, le quali sono alla base dell'eterogeneità della stessa.

Dal punto di vista anatomico ed istologico, i duttuli biliari rappresentano i rami di calibro minore dell'albero biliare sono rivestiti da un epitelio cubico non secernente mucina. Hanno decorso intralobulare e si versano nei dotti biliari intralobulari rivestiti da colangiociti non secernenti mucina. I tumori che originano da queste strutture intraepatiche presentano aree di differenziazione epatocitaria e aree di reazione duttulare e vengono definiti misti. Man mano che si procede verso i dotti di calibro maggiore, da quelli segmentali fino al coledoco, si assiste alla comparsa di una parete del dotto specializzata contenente ghiandole in comunicazione con il lume, denominate ghiandole peribiliari, e l'epitelio di rivestimento dei dotti da cubico diviene un epitelio cilindrico mucino-secernente <sup>[10]</sup>. I tumori che originano in questi tratti, sia intraepatici che extraepatici, istologicamente richiamano un adenocarcinoma tubulare mucino-secernente e vengono definiti mucinosi. Questa classificazione basata su criteri puramente istologici e sui tessuti di origine è stata proposta da Komuta *et al.* <sup>[11]</sup> e Cardinale *et al.* <sup>[12]</sup> nel 2012 ed ha l'indubbio vantaggio di considerare la diversa origine della neoplasia lungo l'albero biliare e le differenze tra i vari tipi di CCA, comprese quelle prognostiche <sup>[11]</sup> (Figura 1).

In merito all'iCCA, tra tipo Misto e Mucinoso ci sono svariate differenze; il tipo Misto si presenta generalmente come formante-massa, si associa a patologie croniche epatiche e non è preceduto da lesione precancerose; il tipo Mucinoso invece si può presentare in forma periduttale-infiltrante od intraduttale, si associa più frequentemente alla Colangite Sclerosante Primitiva (PSC), una malattia a base infiammatoria, e può essere preceduto da lesioni precancerose. Inoltre, il tipo Misto condivide somiglianze clinicopatologiche con il carcinoma epatocellulare esprime Citocheratina-19 (CK-19), mentre il Mucinoso condivide tratti fenotipici con il pCCA e con i tumori pancreatici <sup>[5]</sup>.

## **Epidemiologia del CCA**

Il CCA rappresenta la seconda neoplasia epatica più frequente dopo l'epatocarcinoma (HCC) ed il 3% di tutti i tumori gastrointestinali.

I dati epidemiologici a disposizione sul CCA sono influenzati da una serie di fattori quali la mancanza di una classificazione universalmente adottata o della definizione della sede della neoplasia a causa di diagnosi tardive; inoltre la diagnosi istologica manca nel 20% dei casi <sup>[6]</sup>. I tassi di incidenza sono fortemente influenzati dall'area geografica e quindi dalla diversa esposizione ai fattori di rischio. Questi risultano molto elevati nel Nord est della Thailandia ed in altri Paesi Asiatici (85/100.000) mentre nei paesi Occidentali, in Giappone e in Australia, il CCA rimane un tumore raro (<6/100.000). Se consideriamo i due tipi principale di CCA, l'iCCA rappresenta il 3-15% di tutti i tumori primitivi maligni epatici nei Paesi occidentali, ma più dell'80% in alcuni Paesi Asiatici. Infatti, mentre l'incidenza dell'dCCA e pCCA è superiore



a quella dell'iCCA nei Paesi occidentali ed in Giappone; nei Paesi Orientali avviene esattamente il contrario. Inoltre, in molti paesi, compresa l'Italia è stato evidenziato un progressivo aumento di incidenza e mortalità per l'iCCA, mentre per i dCCA e pCCA sembra essere stabile od in lieve diminuzione. Oltre alle differenze nella distribuzione geografica, si hanno anche differenze di incidenza tra uomo e donna, con una netta prevalenza nel sesso maschile. Per quanto riguarda l'età invece, la fascia più colpita, è quella della settima decade di vita con un'età alla diagnosi maggiore per i dCCA e pCCA rispetto all'iCCA (71.5 vs 66,9 anni) <sup>[6]</sup>; tuttavia, i soggetti affetti da PSC presentano un esordio anticipato della neoplasia, in media tra i 30 e i 50 anni e di solito questa compare entro 2 anni dalla diagnosi <sup>[6]</sup>.

### **Fattori di rischio del CCA**

I fattori di rischio associati allo sviluppo del CCA sono numerosi <sup>[13, 14]</sup> ed hanno la caratteristica di determinare, seppur con meccanismi diversi, uno stato di infiammazione a carico dell'albero biliare associato o meno a colestasi <sup>[6]</sup>. Alcuni fattori di rischio sono stati associati prevalentemente alla sola forma intraepatica (HBV, HCV, cirrosi, epatoliti, schistosomiasi, trematodi epatici), altri alle forme distali e periilari (anomalia della giunzione bilio-pancreatica con dilatazione del dotto biliare, coleliti); infine ve ne sono alcuni responsabili dello sviluppo di tutte le forme; un esempio è quello della PSC, anche se più frequentemente si associa allo sviluppo della forma pCCA. I vari fattori di rischio presentano una diversa distribuzione geografica e questo sarebbe alla base delle differenze di incidenza dei due tipi principali di CCA nei vari Paesi del mondo. Infatti, nei Paesi Orientali, i principali fattori di rischio sono dati da trematodi epatici (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*), schistosomiasi, epatoliti e virus epatici (HBV, HCV). L'alta prevalenza di questi fattori di rischio, associata alle scarse disponibilità economiche per i trattamenti sanitari, spiega la più alta incidenza dell'iCCA rispetto agli altri due tipi in questi paesi <sup>[15]</sup>. Nei Paesi occidentali invece, i maggiori fattori di rischio sono rappresentati dai virus epatici e dalla PSC. Tuttavia, si osserva un'incidenza maggiore della forma extraepatica rispetto a quella intraepatica poiché, nonostante l'alta prevalenza di infezioni da HBV ed HCV, i pazienti con epatopatia cronica virus-correlata sono sottoposti a trattamento e follow-up a lungo termine grazie alle maggiori disponibilità economiche <sup>[6]</sup>.

Ulteriori fattori di rischio sono rappresentati da patologie delle vie biliari (malattia di Caroli, adenoma dei dotti biliari, cisti del coledoco), epatopatia cronica non virale (metabolica, alcolica), tossine ed inquinanti ambientali eliminati con la bile (thorotrast, derivati della diossina, asbesto, nitriti e nitrati) <sup>[16, 17]</sup>.

Oltre ai fattori di rischio certi, sono stati individuati anche fattori di rischio probabili: farmaci ( $\alpha$ -Metildopa, contraccettivi orali), predisposizione genetica con interessamento di geni codificanti per enzimi responsabili del DNA-repair, del metabolismo dei cancerogeni e della modulazione dei processi infiammatori come nella sindrome di Lynch II <sup>[13, 17]</sup>, malattie infiammatorie croniche intestinali come la rettocolite ulcerosa, colangite e coledocolitiasi, colecistectomia, alcol, fumo di tabacco e diabete mellito (DMT2) <sup>[18]</sup>. In particolare, il DMT2 costituisce un fattore di rischio soprattutto per lo sviluppo della forma iCCA <sup>[17]</sup>.

### **Patogenesi del CCA**

Il CCA è il prototipo di neoplasia che emerge in un contesto di flogosi cronica. Recenti lavori hanno dimostrato che l'attivazione dei pathways infiammatori è essenziale per la cancerogenesi, l'invasione e la metastatizzazione. In particolare, l'infiammazione favorisce la cancerogenesi inducendo il danno a carico del DNA, inibendo i meccanismi pro-apoptotici e promuovendo la proliferazione e la neoangiogenesi <sup>[19]</sup>.

Alcune citochine rilasciate durante il processo infiammatorio cronico, quali IL-6 e TNF- $\alpha$ , sono in grado di indurre nei colangiociti l'iNOS (forma inducibile dell'ossido nitrico sintasi) con conseguente aumento dei livelli di NO (ossido nitrico). Quest'ultimo agisce attraverso la nitrosilazione delle basi di DNA e di proteine responsabili dei processi di DNA-repair con conseguente sviluppo di mutazioni. Il loro accumulo e mantenimento sarebbe favorito dall'inibizione dei meccanismi apoptotici e dalla proliferazione cellulare incontrollata, favorita dall'IL-6 e dalle PGE2 prodotte dalla COX2 (attività aumentata del 75% nel CCA) <sup>[20]</sup>.

Anche la stasi biliare riveste un ruolo importante infatti alcuni Sali biliari e gli ossisteroli, cioè i prodotti della degradazione ossidativa del colesterolo, avrebbero un ruolo come modulatori di proliferazione, apoptosi cellulare e come agenti pro- infiammatori. A questo proposito, alcuni sali biliari sono capaci di attivare l'EGFR e la COX2 attraverso l'attivazione della cascata delle MAPK. Inoltre, agiscono come ligandi endogeni per l'attivazione del segnale di Sonic Hedgehog <sup>[19]</sup>. L'attivazione di queste vie di segnalazione è considerata una tappa importante del processo di trasformazione neoplastica dei colangiociti, la quale seguirebbe la sequenza adenoma-carcinoma già individuata per altre neoplasie. Infatti, è stato dimostrato come la neoplasia biliare intraepiteliale (BiLIN) e la neoplasia biliare papillare intraduttale (IPBN) rappresentino i precursori tumorali dell'adenocarcinoma delle vie biliari <sup>[6, 20]</sup>.

### **Cellule di origine del CCA e cellule tumorali staminali (cancer stem cells)**

In seguito alla scoperta delle staminali nei tessuti adulti, accanto al classico modello "stocastico" di cancerogenesi, secondo il quale ogni cellula tissutale può essere bersaglio del

processo di cancerogenesi, si è affiancato quello “staminale”. Secondo quest’ultimo modello, una cellula staminale o committed, lungo il lineage differenziativo, subisce una mutazione che provoca un arresto della maturazione portando una continua ed incontrollata proliferazione. Le mutazioni a carico delle cellule staminali sono estremamente pericolose perché vengono trasmesse a tutte le generazioni di cellule figlie derivanti da quest’ultima. La cellula staminale che subisce la mutazione non risponde ai controlli fisiologici e continua a proliferare con un rate proliferativo relativamente basso, senza morire, mantiene molti dei suoi marcatori di staminalità ed esprime pompe che le conferiscono resistenza ai chemioterapici.

Esistono moltissime prove a favore di questo modello:

- Molti *pathways* associati all’oncogenesi sono fisiologicamente coinvolti nell’autorinnovamento delle cellule staminali;
- Esistono tumori più o meno differenziati che presentano numerosi marcatori di staminalità a seconda del tipo di cellula staminale che viene colpita dalle mutazioni;
- La remissione del tumore in seguito a terapia farmacologica e la comparsa di recidiva dopo chemioterapia è spiegabile con la teoria che il farmaco non colpisce la cellula staminale bensì la sua progenie parzialmente differenziata a più alto rate proliferativo.

Quindi, come nei tessuti normali, anche quello neoplastico è caratterizzato da una gerarchia cellulare in cui una popolazione di cellule staminali si autorigenera e dà origine ad una progenie di cellule tumorali, fenotipicamente diverse, che costituiscono la maggior parte della massa neoplastica <sup>[21]</sup>.

In merito alle cellule staminali presenti nell’albero biliare, sono state recentemente individuate due nicchie principali in cui sono presenti cellule staminali <sup>[3, 6, 12, 22]</sup> (Figura 2). La prima è localizzata nei canali di Hering del fegato adulto e contiene le Human Hepatic Progenitor Stem Cells (hHpSC), cellule bipotenti che possono differenziare in epatociti e colangiociti. La seconda nicchia è localizzata nelle ghiandole peribiliari (*peribiliary glands* PBGs) e contiene le cellule staminali/progenitrici dell’albero biliare umano (*Human Biliary Tree Stem/progenitor Cells* hBTSCs). Le PBGs sono ghiandole tubulo-acinose mucino-secerenti localizzate nella parete dei dotti biliari intraepatici di calibro maggiore ed in quelli extraepatici, soprattutto nei punti di biforcazione (dotto cistico, regione perilare e regione periampollare). Le cellule ivi contenute sono capaci di dare origine ad epatociti, colangiociti e cellule delle isole pancreatiche. Questi due tipi di cellule staminali sono capaci di dare origine a differenti tipi di CCA. Infatti, recenti teorie <sup>[23]</sup> sottolineano come dalle hBTSC potrebbero originare i tumori dCCA e pCCA di tipo Mucinoso, mentre le hHpSC potrebbero dare origine a neoplasie intraepatiche piuttosto eterogenee e non secernenti mucina (iCCA-Misto).

Uno studio pubblicato da Carpino *et al.* nel 2012 [24], sostiene il modello staminale come modello di cancerogenesi nel CCA ed identifica due popolazioni cellulari principali. La “*Cell-of-origin*” è definita come la cellula che acquisisce la prima mutazione che dà il via al processo di cancerogenesi (l’hHpSC e l’hBTSC), mentre le “*Cancer Stem Cells, (CSCs)*” rappresentano le cellule che sostengono la crescita della neoplasia [3, 23]. Sebbene questi termini siano spesso usati indifferentemente, essi rappresentano concetti diversi poiché si riferiscono rispettivamente alla cellula che da inizio al tumore e alle cellule che propagano il tumore [6, 24]. A sostegno di questo modello, recentemente sono stati identificati in campioni di CCA umano diversi marcatori di staminalità quali CD133, EpCAM, CD44, CD13, CD90, SOX2 e Nanog [22]. Il CCA è una neoplasia ricca di CSCs, infatti queste costituiscono più del 30% della massa neoplastica [22].

### **Segni e sintomi del CCA**

La sintomatologia del CCA è influenzata dalla sede della neoplasia e dalle sue dimensioni. La forma distale e perilare in più del 70% dei casi esordisce con un ittero indolente associato ad altri segni o sintomi quali febbre, dolore, calo ponderale, prurito generalizzato, feci ipo/acoliche ed urine ipercromiche. La colangite come manifestazione di esordio si riscontra in meno del 10% dei casi [25]. Le analisi di laboratorio mostrano un quadro di colestasi con iperbilirubinemia prevalentemente diretta, aumento di fosfatasi alcalina e  $\gamma$ -GT. I pazienti con PSC, che hanno un rischio aumentato di sviluppare il dCCA o pCCA, presentano tipicamente un rapido deterioramento del quadro clinico associato alla patologia di base o un peggioramento del quadro laboratoristico o la comparsa di stenosi dominanti lungo l’albero biliare. È stato dimostrato come in questi casi l’esecuzione semestrale di una ecografia epatica, associata al dosaggio del CA-19.9, sia in grado di diagnosticare la neoplasia in uno stadio precoce ed ancora suscettibile di resezione chirurgica in 2/3 dei pazienti [4].

La forma intraepatica invece, esordisce con i sintomi tipici della lesione occupante spazio (LOS) epatica quali dolenzia/dolore in ipocondrio destro e sintomi sistemici (perdita di peso fino alla cachessia neoplastica, astenia, nausea e vomito, malessere generale, sudorazione notturna). L’ittero è presente solo nel 28% dei casi [25].

### **Diagnosi e stadiazione del CCA**

Come per la sintomatologia, anche l’approccio diagnostico è condizionato dalla sede della neoplasia [7, 14].

L’iCCA nel 20-25% dei casi viene diagnosticato incidentalmente ed in più del 90% dei casi si presenta come una lesione occupante spazio (LOS) epatica. In questi casi è necessario escludere

che si tratti di metastasi o di un HCC. Se la LOS compare in un fegato cirrotico, è necessario ricorrere alla Risonanza Magnetica (RM) addome con mezzo di contrasto; l'assenza di un rapido wash in e di un rapido wash out, consentono di escludere l'HCC che presenta proprio tale comportamento contrastografico peculiare; tuttavia, quando la lesione ha un diametro < 3 cm, alla tomografia computerizzata (TC) il comportamento contrastografico può simulare un HCC. L'iCCA alla TC e alla RM presenta nel 50% dei casi una progressiva captazione del mezzo di contrasto e alla TC nel 50% dei casi un coinvolgimento vascolare ad anello. Quando il comportamento contrastografico è atipico per HCC, oppure quando siamo in presenza di un fegato non cirrotico, bisogna ricorrere alla biopsia epatica <sup>[5]</sup>. L'accertamento istologico è indispensabile in caso di massa epatica non resecabile per guidare eventuali chemioterapie o in caso di ipotesi di trapianto di fegato <sup>[4]</sup>.

Diversamente da quello che accade per altre neoplasie, nel CCA non esiste un marcatore immunohistochimico specifico che consenta di fare diagnosi. Di conseguenza la diagnosi istologica sul pezzo biotico si baserà sull'esecuzione di un pannello di marcatori per l'esclusione dell'HCC e delle metastasi <sup>[4]</sup>. La positività per la Citocheratina-7 e per la Citocheratina-19 e la negatività per la Citocheratina-20 e per HepPar-1 consentono di escludere l'HCC. La positività per l'N-Caderina, lo studio delle mutazioni dell'Isocitrato Deidrogenasi-1 (IDH1) e -2 (IDH2) e la valutazione dell'espressione dell'albumina tramite ibridizzazione *in situ* sono state proposte per la diagnosi differenziale dell'iCCA <sup>[5]</sup>.

Nel caso del dCCA e del pCCA, l'iter diagnostico inizia generalmente con il sospetto clinico, biochimico e/o ecografico di ostruzione dell'albero biliare. In questo caso, le indagini di secondo livello da preferire sono rappresentate dalla RM addome con mezzo di contrasto e dalla colangiopancreatografia-RM (MRCP), le quali andrebbero preferite alla TC. Nella maggior parte dei casi sono in grado di definire con precisione la sede della stenosi, pur non fornendo indicazioni sulla natura benigna o maligna della stessa <sup>[14, 26]</sup>. Per questa ragione è fondamentale ottenere un campione della stessa in corso di colangiopancreatografia retrograda endoscopica (CPRE) mediante l'esecuzione di citologia biliare, brushing e/o biopsie endoscopiche. Tuttavia, tali metodiche presentano una maggiore accuratezza diagnostica solo per le forme a crescita intraduttale, ma anche in questi casi risulta spesso scarsa a causa della natura desmoplastica della neoplasia. Infatti, almeno il 40% dei pazienti è sottoposto a resezione chirurgica in assenza di diagnosi definitiva di CCA e nel 10% dei casi, dopo chirurgia, non c'è evidenza di neoplasia sul pezzo operatorio. Nei rari casi in cui la RM addome e la MRCP evidenzino una massa lungo l'albero biliare non è necessario ricorrere all'accertamento istologico; infatti la diagnosi di CCA è definitiva quando la massa perilare si associa a stenosi biliare, coinvolgimento vascolare e al complesso atrofia/ipertrofia cioè atrofia del lobo epatico

coinvolto ed ipertrofia di quello risparmiato <sup>[4, 5]</sup>. Una volta fatta la diagnosi è necessario stadiare la neoplasia per programmare l'*iter* terapeutico del paziente.

Nel caso dell'iCCA, la stadiazione attualmente accettata ed utilizzata è quella dell'AJCC/UICC TNM (American Joint Committee on Cancer/ Union International Against Cancer Tumore-node-metastasis), oggi giunta alla settima edizione. Questo sistema stadiativo prende in considerazione il numero di masse tumorali, l'eventuale invasione vascolare e di strutture adiacenti, la presenza di metastasi linfonodali e l'aspetto istologico <sup>[5]</sup>.

Nel pCCA, il sistema stadiativo utilizzato per anni è stato quello di Bismuth-Corlette che tuttavia presentava il limite di non considerare né il coinvolgimento vascolare, né la presenza di metastasi, non avendo quindi alcuna utilità nella pratica clinica per definire la resecabilità o meno della neoplasia. Prendendo spunto da queste limitazioni, è stato recentemente proposto dal *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* un nuovo sistema di stadiazione per le forme di pCCA che considera l'estensione locale della neoplasia, la sede della stessa, l'invasione della vena porta e la presenza di atrofie lobare epatica. Nel 2011, la *Mayo Clinic* ha proposto un nuovo modello stadiativo comprendente la dimensione del tumore, l'estensione lungo l'albero biliare, l'invasione dell'arteria epatica e della vena porta, la presenza di metastasi linfonodali e a distanza ed il volume del fegato residuo dopo resezione chirurgica <sup>[5]</sup>.

## **Prognosi del CCA**

Il CCA è una neoplasia caratterizzata da scarsa o nulla risposta ai comuni chemioterapici impiegati nella pratica clinica e da prognosi infausta, con sopravvivenza media di 6-12 mesi <sup>[4]</sup>. Il principale motivo è da ricondurre alla sintomatologia che, essendo sfumata ed aspecifica, porta frequentemente a diagnosi tardive. A tal proposito basti considerare che molti casi vengono diagnosticati incidentalmente con indagini strumentali eseguite per altri motivi <sup>[25]</sup>. Spesso la neoplasia è già metastatica al momento della diagnosi e quindi le possibilità di attuare una resezione chirurgica radicale risultano scarse. Infatti, il CCA metastatizza precocemente per via linfatica (localizzandosi ai linfonodi regionali e para-aortici) <sup>[27]</sup> e per via ematica, raggiungendo fegato, peritoneo e polmoni. Rari siti di localizzazione secondaria sono rappresentati da cute, ghiandole surrenaliche e colon <sup>[28]</sup>. Sono state evidenziate differenze prognostiche tra CCA Mucinoso e Misto. Il primo infatti ha solitamente minori dimensioni, una crescita periduttale-infiltrante ed una maggiore invasione microvascolare e linfatica; il Misto presenta invece una crescita formante massa, una localizzazione periferica, dimensioni maggiori e una minore tendenza all'infiltrazione. Dunque, il CCA Mucinoso presenta una prognosi peggiore rispetto al Misto <sup>[6, 29]</sup>.

La chemioresistenza che caratterizza il CCA è legata a diversi meccanismi quali un minore uptake del farmaco per la riduzione dell'espressione dei trasportatori di membrana, un aumento dell'estrusione del farmaco dalla cellula per l'aumento di espressione delle pompe di efflusso della famiglia dell'ATP binding cassette (ABC), una minore attivazione del farmaco o una maggiore inattivazione dello stesso da parte di specifici enzimi, il cambiamento nelle molecole target d'azione del farmaco e l'attivazione di differenti strategie di riparazione dei danni a carico del DNA [5].

Un recente lavoro di Cardinale *et al.* ha messo in luce come la farmaco resistenza e la comparsa di recidive dopo terapia sia legata alle CSCs, particolarmente abbondanti nel CCA [22].

### **Terapia del CCA**

A causa della spiccata chemioresistenza del CCA, l'unico trattamento efficace rimane la chirurgia; questa tuttavia può essere applicata solo al 40% dei pazienti a causa delle frequenti diagnosi tardive e comunque, anche tra coloro i quali sono sottoposti ad intervento chirurgico radicale, la probabilità di recidiva locale risulta elevata [27]. Infatti, anche dopo R<sub>0</sub>, la sopravvivenza a 5 anni risulta essere del 22-44% nell'iCCA, dell'11-41% nel pCCA e del 27-37% nel dCCA [2, 5].

L'intervento chirurgico prevede la resezione del segmento/lobo epatico interessato nell'iCCA e la pancreatoduodenectomia nel dCCA. Nel pCCA l'intervento chirurgico risulta essere più demolitivo, con asportazione anche della colecisti e dei linfonodi regionali [5]. Per le forme perilari la resezione locale è possibile solo nel tipo I di Bismuth-Corlette. Tra i criteri che precludono la possibilità di un intervento chirurgico ricordiamo: tipo IV di Bismuth-Corlette nel pCCA, l'invasione della vena porta o dell'arteria epatica, la presenza di metastasi linfonodali e a distanza. Il trapianto di fegato viene preso in considerazione in casi molto selezionati di pCCA non resecabile e ad uno stadio precoce (stadio I e II) e viene effettuato solo in pochi centri di riferimento.

Nel caso di tumori non resecabili, la chemioterapia sistemica rimane la principale modalità di terapia palliativa. Il trattamento di prima linea di questi pazienti è dato dall'associazione di Cisplatino con Gemcitabina, che tuttavia conferisce un vantaggio in termini di sopravvivenza di soli 2-3 mesi con l'insorgenza di effetti avversi lievi quali nausea, vomito, astenia e gravi come anemia, neutropenia, infezioni ricorrenti, piastrinopenia ed emorragie [5, 30-32]. La chemioterapia è stata inoltre raccomandata nei pazienti con pCCA e recidiva locale di malattia dopo intervento chirurgico. Recentemente a questa combinazione è stato associato l'Errotinib o il Cetuximan, entrambi inibitori dell'EGFR [33], ma con modesti benefici [5].

Il ruolo della radioterapia nei pazienti con CCA ancora non è stato chiaramente definito; questa è stata valutata utilizzando vari metodi, quali la radioterapia a fasci esterni, la brachiterapia e la radioterapia intraoperatoria (IORT), ma i risultati sono stati deludenti [25]. L'associazione di radioterapia e chemioterapia è stata raccomandata nei pazienti con iCCA e con margini positivi dopo intervento chirurgico, nei pazienti con iCCA e pCCA e metastasi linfonodali oppure nei pazienti con pCCA non resecabili e non candidabili per il trapianto epatico [5].

Nei pazienti con iCCA non resecabile, le terapie locoregionali quali la Transarterial Radioembolization (TARE), la Transarterial Chemioembolization (TACE), la terapia fotodinamica e l'ablazione con radiofrequenza sembrano avere un impatto favorevole sulla sopravvivenza [5].

Infine, i pazienti inoperabili possono trarre beneficio dall'inserimento di stent per il drenaggio biliare [4]. Le linee guida attuali raccomandano di evitare il drenaggio biliare prima di definire lo stadio della neoplasia e la sua resecabilità in quanto lo stent aumenta il rischio infettivo e non consente una corretta stadiazione; tuttavia se il paziente presenta colangiti è indicato procedere all'inserimento dello stent [5].

Ad oggi quindi non esiste un approccio terapeutico soddisfacente in termini di sopravvivenza per i pazienti con tumore in stadio avanzato o non operabile.

## **Il Recettore Farnesoide X (FXR)**

Il Recettore Farnesoide X (Figura 3), conosciuto anche come Recettore degli Acidi Biliari (BAR) [34], è un recettore nucleare appartenente alla superfamiglia dei recettori ormonali nucleari e regola, in primo luogo, l'omeostasi cellulare degli acidi biliari [35]. E' costituito da due domini principali, uno per il ligando e uno che lega il DNA. Codificato nell'uomo dal gene *NR1H4* localizzato sul braccio lungo del cromosoma 12 (12q23.1) [36]. FXR è ampiamente espresso in epatociti e colangiociti essendo implicato in numerosissimi processi cellulari come la regolazione del metabolismo lipidico e glucidico [37, 38]. Il suo principale ligando endogeno è l'acido chenodeossicolico (CDCA), ma diversi sono i sali biliari in grado di legarsi a FXR anche se con minore affinità: tra questi i più studiati sono l'acido colico (CA), l'acido deossicolico (DCA) e l'acido litocolico (LCA) [34]. FXR, una volta attivato, dimerizza con RXR (Recettore X dell'acido Retinoico) e traslocando nel nucleo regola la trascrizione di geni quali *SHP* [38]; *SOCS3*, la cui proteina sopprime il signaling indotto dalle citochine infiammatorie [39]; *RECK*, che codifica per una proteina inibente le metalloproteasi [40]; *NDRG2*, un oncosoppressore downregolato da N-Myc [41] e *PLTP* (Phospholipid Transfer Protein) [42]. FXR interagisce, inoltre, con la  $\beta$ -Catenina, interferendo così con la formazione del complesso  $\beta$ -Catenina/TCF4 che ha come target il gene *Ciclina D1*, inibendo di conseguenza la progressione



del ciclo cellulare <sup>[43]</sup>. Tra questi il gene di SHP (Small Heterodimer Protein) è il suo target principale. La sua proteina inibisce la trascrizione di *CYP7A1* (colesterolo 7 alpha-idrossilasi) enzima fondamentale nella sintesi del colesterolo instaurando così un feed-back negativo sulla produzione di colesterolo e di acidi biliari. La proteina SHP, una volta trascritta, inibisce la fosforilazione di STAT3 da parte di JAK2 <sup>[44]</sup>. STAT3 fosforilata, è in grado di traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di Bcl-XL proteina il cui ruolo è quello di impedire la permeabilizzazione della membrana mitocondriale impedendo, quindi, la fuoriuscita del CitocromoC, prima tappa della via intrinseca del processo apoptotico. Perciò FXR, inducendo la trascrizione di SHP, inibisce indirettamente la fosforilazione di STAT3 e favorisce l'apoptosi <sup>[38]</sup>. Secondo Wang W. *et al.* <sup>[38]</sup> il Cisplatino interagirebbe proprio con i livelli trascrizionali di SHP influenzando l'espressione genica modulata da FXR <sup>[38]</sup>.

È stato inoltre, dimostrato come l'espressione del gene della Caspasi-3, principale proteina responsabile della morte cellulare per apoptosi, siano costantemente elevati in presenza di ligandi di FXR <sup>[45]</sup>. Oltre a ciò, è stato osservato come SHP sia in grado di attivare miR206, un microRNA con azione inibitoria nei confronti di NOTCH3, proteina che favorisce la proliferazione <sup>[46]</sup>. Inoltre, i livelli di FXR sono ampiamente diminuiti in numerosi tumori del tratto gastro-intestinale come carcinoma di vie biliari, fegato, pancreas, esofago, stomaco e colon <sup>[38, 47-49]</sup>. I livelli ridotti di FXR sono, inoltre, associati alla presenza massiva di mediatori infiammatori come IL-6 e NF-KB suggerendo, quindi, anche un ruolo antiinfiammatorio di FXR legato a quello antineoplastico <sup>[37]</sup>. È infatti ben noto in letteratura il ruolo di IL-6 nella crescita del CCA: questa interleuchina una volta legata al suo recettore causerebbe l'attivazione di STAT3 che, come già detto, produce un effetto proliferativo e anti-apoptotico <sup>[50]</sup>. Infine, recenti studi mostrano come FXR sia responsabile dell'attivazione di pathways che inibiscono l'invasione riducendo il metabolismo energetico mitocondriale <sup>[35]</sup>, promovendo la produzione di RECK che inibisce le metalloproteasi <sup>[40]</sup> e favorendo NDRG2 che può antagonizzare l'invasione cellulare indotta da TGF- $\beta$ 1 <sup>[41]</sup>.

### **L'Acido Obeticolico come agonista di FXR**

L'acido obeticolico (OCA), conosciuto anche come INT-747, è un analogo semisintetico derivato dal CDCA <sup>[51]</sup> prodotto da Intercept Pharmaceuticals, Inc. distribuito con il nome commerciale OCALIVA<sup>®</sup>. La struttura chimica (Figura 4) dell'OCA (acido 6-alpha-etinil-chenodeossicolico) conferisce alla molecola la maggiore affinità e selettività verso FXR rispetto a tutti gli altri possibili ligandi con una EC<sub>50</sub>= 99nM testata tramite cell-free ligand sensing assay <sup>[51]</sup>. Pertanto, l'OCA è ligando con più alta affinità per il recettore FXR rispetto ad altri come il CDCA.

L'ingresso della molecola (come anche degli altri sali biliari) nella cellula è garantita dal Trasportatore Apicale dei Sali Biliari (ASBT) e dalla diffusione passiva data l'elevata idrofobicità della molecola <sup>[52]</sup>. Oggi l'OCA, in fase 4 post-marketing, viene impiegato come terapia di seconda linea nel trattamento della Colangite Biliare Primitiva (PBC), una malattia autoimmune, in associazione con UDCA o in monoterapia nei pazienti non tolleranti l'UDCA. Già nel 2014 infatti uno studio di fase 3 condotto in doppio cieco randomizzato ha mostrato una riduzione significativa dei livelli di fosfatasi alcalina, usato come marker di progressione di malattia, nei pazienti trattati con OCA (5-10 mg/die) rispetto al gruppo placebo (Phase 3 study: POISE) <sup>[53, 54]</sup>. L'OCA è attualmente oggetto di studi per l'introduzione in terapia di Steatoepatite Non Alcolica (NASH), Iperensione Portale, diarrea da malassorbimento e Morbo di Crohn. Lo studio FLINT ha dimostrato come il trattamento con OCA abbia conseguito un estremo miglioramento del quadro istologico statisticamente significativo nei pazienti affetti da NASH <sup>[55]</sup>. L'OCA si è dimostrato efficace anche nella riduzione della pressione portale in ratti con ipertensione portale affetti da cirrosi epatica <sup>[56]</sup>. Infine, l'OCA migliora il quadro clinico di pazienti con diarrea da malassorbimento primaria o secondaria a morbo di Crohn <sup>[57]</sup> grazie alla stimolazione, indotta da OCA, del Fattore di Crescita Fibroblastico 19 (FGF19) che risulta essere ridotto in queste condizioni <sup>[58]</sup>.

## **SCOPO DEL PROGETTO**

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare i potenziali effetti anti-neoplastici indotti dall'agonista di FXR, l'Acido Obeticolico, sulla progressione tumorale del iCCA linee primarie umane di iCCA sottotipo Misto e Mucinoso, in uno studio preclinico *in vitro* ed *in vivo*.

In particolare, è stata analizzata l'azione dell'Acido Obeticolico, nell'inibizione dei processi proliferativi, nell'induzione dell'apoptosi, nel rallentare o arrestare il potenziale metastatico e tumorigenico delle linee cellulari primarie umane dell'iCCA *in vitro* o dopo xenotrapianto su topi balb/c nude. Lo studio è stato condotto testando l'azione dell'OCA singolarmente o in associazione con i classici chemioterapici già utilizzati in terapia: Gemcitamina e Cisplatino.

## **MATERIALI E METODI**

### **Campioni di iCCA umano**

Il protocollo di ricerca è stato preventivamente approvato dai Comitati Etici degli ospedali coinvolti nel progetto di ricerca: Policlinico Umberto I di Roma, Istituto nazionale tumori Regina Elena di Roma (IFO) e Policlinico Universitario Agostino Gemelli di Roma. I campioni di iCCA provengono da pazienti sottoposti a resezione chirurgica ai quali, dopo un'adeguata informazione, è stato fatto firmare il consenso informato scritto per partecipare allo studio. Successivamente all'intervento i campioni sono stati prelevati e trasferiti entro poche ore presso i nostri laboratori, in condizioni di assoluta sterilità. La loro lavorazione è stata eseguita in conformità alle buone pratiche di laboratorio (*Good Manufacturing Practice, GMP*).

### **Allestimento di colture cellulari primarie di iCCA umano**

Come stabilito dal protocollo di ricerca una parte del materiale biotico, dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica di iCCA, è stato inviato presso i laboratori del Dipartimento di scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore per l'analisi immunoistochimica, dopo fissazione in formalina al 4% (Laboratorio Anatomia Umana, Referente Prof. Guido Carpino, Direttore Prof. Eugenio Gaudio) ed una parte è stata utilizzata per l'allestimento della coltura di cellule primaria di iCCA.

I campioni di iCCA sono stati classificati in Misti e Mucinosi in accordo con la classificazione proposta da Komuta *et al.* tramite analisi immunoistochimica <sup>[11]</sup>. Sono stati tenuti in considerazione la reazione PAS (acido periodico - reattivo di Schiff) e criteri morfologici. In merito a questi ultimi, i tipi misti presentano aree focali di differenziazione epatocitaria, reazione dutturale neoplastica e aree focali di produzione di mucina; i tipi mucinosi invece sono composti principalmente da cellule secernenti mucina.

Parte del pezzo operatorio è stato frammentato meccanicamente e poi sottoposto a digestione enzimatica per mezzo di Collagenasi di tipo IV 1 mg/ml (Sigma Aldrich, Milan, Italy), DNAsi I 0,1 mg/ml (Sigma Aldrich, Milan, Italy) e Ialuronidasi 0,1 mg/ml (Sigma Aldrich, Milan, Italy) solubilizzate in terreno di coltura H69 per 12-16 ore (overnight) a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo la digestione enzimatica i frammenti tissutali parzialmente digeriti sono stati ulteriormente separati meccanicamente tramite l'uso di pipette a diametro decrescente e poi filtrati in sequenza prima con un filtro da 100 µm e poi con uno da 70 µm. Infine le cellule sono state piastrate su supporti idonei in terreno H69 e coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> in accordo con quanto già descritto <sup>[22, 29]</sup>.

Le cellule isolate sono state coltivate in terreno di coltura H69 composto da una soluzione a base di DMEM ad alto contenuto di glucosio (Gibco/BRL, Life Technologies, Italy srl, Milan, Italy) e DMEM/F12 (Gibco/BRL, Life Technologies, Italy srl, Milan, Italy) in rapporto 1:1, addizionato di: 243 µg/ml di adenina (Sigma Aldrich, Milan, Italy), 5 µg/ml di insulina (Sigma Aldrich, Milan, Italy), 8 µg/ml di apo-transferrina (Sigma Aldrich, Milan, Italy),  $2,1 \cdot 10^{-3}$  µg/ml di triiodothyronina (Sigma Aldrich, Milan, Italy),  $6,2 \cdot 10^{-1}$  µg/ml di idrocortisone (Sigma Aldrich, Milan, Italy), 0,01µg/ml di fattore di crescita epiteliale umano (EGF, Sigma Aldrich, Milan, Italy), 1 µg/ml di epinefrina (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), 10% di siero bovino fetale (FBS, Gibco/BRL, Life Technologies, Milan, Italy), 60 µg/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (Gibco/BRL, Life Technologies, Italy srl, Milan, Italy).

Le linee primarie di iCCA-Misto e Mucinoso sono state coltivate fino al 30° passaggio in coltura e successivamente utilizzate nel presente studio oltre che caratterizzate per diversi marcatori genetici e proteici come precedentemente descritto da: Fraveto A. *et al.*<sup>[29]</sup>, Cardinale V. *et al.*<sup>[22]</sup>.

### **Isolamento di hBTSC**

Nel presente studio sono state utilizzate come linee primarie di controllo le hBTSCs isolate in accordo con quanto descritto da Nevi, L., *et al.*<sup>[59, 60]</sup> e Carpino, G., *et al.*<sup>[23]</sup>.

### **Trattamento farmacologico**

L'acido Obeticolico (OCA) è stato fornito dall'azienda Intercept Pharmaceuticals, Inc. San Diego, USA, ed è stato solubilizzato in Dimetil Solfossido (DMSO, CAS Number 67-68-5, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) come stock solution e successivamente diluito ( $>1:10^5$ ) nel terreno di coltura alla concentrazione finale desiderata con diluizioni scalari. La medesima concentrazione finale di DMSO è stata aggiunta al terreno di coltura dei campioni di controllo. Campioni di OCA stock solutions sono stati ripreparati freschi ogni 15 giorni.

La Gemcitabina idroclorido (Sigma-Aldrich, CAS Number: 95058-81-4) è stata preparata come stock solution in acqua e aggiunta al terreno di coltura dopo opportuna diluizione scalare ( $>1:10^4$ ) alla concentrazione di 10 µM. Il Cisplatino (Sigma-Aldrich, CAS Number: 15663-27-1) è stato solubilizzato in DMSO come stock solution e aggiunto al terreno di coltura dopo un appropriata diluizione scalare ( $>1:10^5$ ) alla concentrazione di 20 µM come riportato nello studio di Fraveto *et al.* che utilizzava la stessa linea primaria di iCCA utilizzata nel presente studio<sup>[29]</sup>.

L'Acido Chenodeossicolico (CDCA, Sigma-Aldrich, CAS Number: 474-25-9) e l'Acido Ursodeossicolico (UDCA, Sigma-Aldrich, CAS Number: 128-13-2) sono stati diluiti in DMSO

e aggiunti nel terreno di coltura dopo opportuna diluizione scalare ( $>1: 10^5$ ) per raggiungere la concentrazione finale desiderata.

Dopo 24 ore dalla semina, delle linee cellulari primarie di CCA o di hBTSC, il terreno di coltura è stato sostituito da terreno fresco contenente o non contenente (controlli) i farmaci e sostituito ogni 3 giorni. Nel terreno di coltura la concentrazione di DMSO finale è risultata minore di  $0,05 \mu\text{M}$ .

### **Analisi dell'espressione genica di FXR e ASBT tramite RT-qPCR**

L'RNA totale è stato estratto mediante TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1-bromo-3-cloropropano (Sigma-Aldrich, CAS Number: 109-70-6) utilizzati in proporzione 1:5. L'RNA così ottenuto è stato purificato tramite precipitazione alcolica con isopropanolo (2-propanolo, Sigma-Aldrich, CAS Number: 67-63-0). Successivamente è stato effettuato un lavaggio con etanolo 75% a  $-20^\circ\text{C}$ . L'RNA totale estratto è stato solubilizzato in acqua RNAsi-Free (GIBCO Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). La concentrazione di ciascun campione è stata determinata mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

300 ng di RNA isolato per ciascun campione sono stati retrotrascritti tramite l'uso di primers Oligo(dT) 12-18  $0.5 \mu\text{g}$  (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), con 200U di trascrittasi inversa, in accordo con le specifiche del produttore (Cat. n. 28025013, Invitrogen s.r.l.), mediante un termociclatore (Quantaurus).

L'espressione di ciascun gene è stata determinata tramite Real-Time quantitativa (qPCR). La reazione di amplificazione qPCR è stata condotta utilizzando  $1 \mu\text{l}$  di cDNA template e il kit SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific Inc.) secondo le specifiche del produttore, insieme a  $0,12 \mu\text{M}$  per ogni primer specifico per ogni gene analizzato (Forward and Reverse) e  $0,5 \mu\text{M}$  di reference dye (ROX ThermoFisher Scientific Inc.).

La reazione di qPCR è stata effettuata in un termociclatore MX3000P Instrument (Agilent, La Jolla, CA, USA) e la fluorescenza è stata rilevata durante la fase di estensione di ogni ciclo. I livelli di espressione genica relativa per ogni gene e per ogni campione sono stati normalizzati rispetto all'espressione genica relativa del corrispettivo GAPDH utilizzato come gene housekeeping. I risultati sono stati riportati come quantità relativa di mRNA rispetto ai controlli considerati pari ad 1.

I primers utilizzati sono stati progettati tramite il software PROBEFINDER (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>) o attraverso il software Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partire dalle sequenze geniche rispettive e riportati in tabella 1.

<b>Gene</b>	<b>Primers (5'-3')</b>
GAPDH	F-5' AGCCACATCGCTCAGACAC 3' R-5' GCCCAATACGACCAAATCC 3'
FXR	F-5' GATGCCTGTAACAAAGAAGCCCC 3' R-5' CACACAGTTGCCCCCGTTTTTAC 3'
ASBT	F-5' TGTGTTGGCTTCCTCTGTCAG 3' R-5' GGCAGCATCCTATAATGAGCAC 3'

**Tabella 1. Primers utilizzati nell'analisi RT-qPCR.**

Sequenze delle coppie di primers utilizzate per amplificare il gene di interesse (GOI). Come gene di riferimento interno è stato utilizzato il gene GAPDH.

### **Saggio di proliferazione cellulare, MTS**

La proliferazione cellulare è stata valutata tramite il saggio MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]). Sono state seminate circa  $3 \times 10^3$  cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti in 100  $\mu$ L di terreno di coltura. Dopo 24 ore dalla semina è stato sostituito il terreno di coltura contenente il farmaco o solo DMSO o nulla nei controlli.

Il saggio di MTS è stato condotto dopo 72 ore di esposizione ai farmaci sostituendo il terreno con 20  $\mu$ l di reagente CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent (Promega) e 80  $\mu$ l di terreno cellulare per ogni pozzetto, in accordo con le specifiche del produttore. Dopo circa 20 min. di incubazione a 37 °C, in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>, è stata misurata l'assorbanza a 492 nm tramite il lettore di micropiastre (Agilent, La Jolla, CA, USA).

I risultati sono stati espressi come % di cambiamento di proliferazione rispetto ai controlli, considerati uguali al 100%.

### **Tempo di Duplicazione (PDT) della popolazione cellulare**

Circa  $8 \times 10^4$  cellule sono state seminate in piastre multi-well da 6. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco contenente i farmaci, solo DMSO o nulla (controlli).

Le cellule sono state coltivate per le successive 72 ore. Successivamente le cellule sono state raccolte, colorate mediante Tripan Blue (Sigma Aldrich, Milan, Italy) in rapporto 1:1 e contate mediante camere di conta Fast-Read 102 ® (Bio-Sigma BVS-100).

Il Tempo di Duplicazione della Popolazione cellulare (Population Doubling Time, PDT) è stato

ottenuto mediante le seguenti formule: <sup>[59-61]</sup>

$$PDT = \frac{\text{Log}_{10}(2) * \Delta T}{\text{Log}_{10}(N_f) - \text{Log}_{10}(N_0)}$$

### **Test di Apoptosi AnnessinaV-FITC/PI**

La percentuale di cellule apoptotiche è stata analizzata ricorrendo al test dell'AnnessinaV-FITC /Propidio ioduro (PI) (AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit, Miltenyi Biotec). Sono state piastrate circa 88000 cellule/pozzetto su piastra da 6 pozzetti e dopo 24 ore il terreno di coltura è stato sostituito con terreno contenente i farmaci, il solo DMSO o nulla per i controlli. Dopo 72 ore di trattamento le cellule sono state raccolte e risospese in 100 µL di Binding Buffer (BD Pharmingen™ kit) a cui sono stati aggiunti 5 µL di AnnessinaV-FITC per identificare l'apoptosi precoce, 10 µL di PI per identificare l'apoptosi tardiva, in cui le cellule sono AnnessinaV e PI positive, e 2 µL di RNasi in accordo con le specifiche del produttore. Le cellule sono state analizzate tramite BD FACS Canto™ II Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). 10<sup>4</sup> eventi sono stati acquisiti e analizzati tramite il software BD FACSDiva™ (Becton, Dickinson Company, NJ, USA). I risultati sono stati espressi come aumento % dell'apoptosi in rapporto alle cellule non trattate (controlli).

### **Analisi della capacità di formare colonie (Clonogenic ssay)**

Le cellule di iCCA sottotipo Misto e Mucinoso sono state coltivate in piastre da 24 well, alla densità di circa 150 cellule/pozzetto e sono state trattate con terreno di coltura H69 addizionato di farmaco o solo DMSO o niente (controlli). Dopo 10 giorni, il terreno è stato allontanato mediante lavaggi in DPBS, le cellule sono poi state bloccate per 30 min utilizzando il colorante Cristal Violet (Sigma-Aldrich) solubilizzato in 10% Etanolo. Successivamente il colorante in eccesso è stato allontanato con acqua distillata. Le cellule sono state fotografate tramite microscopio ottico dotato di fotocamera Nikon D40 (Nikon Corporation, Minato, Tokyo, Giappone) e le immagini ottenute sono state analizzate utilizzando il software ImageJ. Le colonie per ogni pozzetto sono state contate, considerando tali solo cluster composti da almeno 50 cellule. Successivamente il Cristal Violet fissato alle colonie è stato sciolto con SDS al 4% in H<sub>2</sub>O ed è stata misurata l'assorbanza a 595 nm. I dati ottenuti sono stati elaborati per ottenere la grandezza media delle colonie in ogni pozzetto tramite il Colony Dimension Index calcolato per ogni singolo pozzetto tramite la seguente formula:

$$\text{Colony Dimnesion Index} = \frac{\text{Assorbanza } 595\text{nm}}{\text{Numero di colonie}}$$



## **Saggio di formazione di sferoidi**

La formazione degli sferoidi *in vivo* è considerata un indice di self-renewal [62]. Il nostro Gruppo di ricerca ha già dimostrato [22, 29] che le cellule di iCCA formano sferoidi in condizioni di non adesione raggiungendo dimensioni di circa 100-500  $\mu\text{m}$  dopo 10 giorni di coltura. Come descritto da Cardinale *et al.* 2015 [22], circa  $2 \cdot 10^3$  cellule di iCCA per pozzetto sono coltivate in terreno H69 serum-free addizionato di B27 2% (GIBCO),  $1 \cdot 10^{-5}\%$  di bFGF in 90% AutoMACS Rising Solution (MACS 130-091-222) e 10% di BSA (MACS 130-091-376) in piastre 6-well Ultra-Low Attachment plates (Corning, Lowell, MA). Il terreno è stato addizionato di farmaco, di DMSO o nulla (controlli). Dopo 10 giorni, gli sferoidi sono stati fotografati con microscopio a contrasto di fase dotato di fotocamera Nikon D40, contati e ne è stata misurata l'area tramite il software ImageJ.

I risultati sono stati riportati come variazione della dimensione delle tumorsfere (sferoidi) con o senza trattamento farmacologico [62].

## **Wound Healing Assay**

Il test di migrazione cellulare (Wound Healing Assay) è stato impiegato per la valutazione *in vitro* della migrazione cellulare. Utilizzando la punta di un puntale sterile avente diametro di 400  $\mu\text{m}$ , è stato creato uno strappo (scratch) sul monostrato di cellule a confluenza ed il terreno di coltura è stato sostituito da terreno fresco contenente il farmaco oppure DMSO o nulla (Controlli). Le cellule sono state controllate ad intervalli di 24 ore per 7 giorni e fotografate ad intervalli regolari tramite microscopio ottico dotato di fotocamera Nikon D40. La migrazione cellulare è stata valutata quantitativamente attraverso il software Photoshop (Adobe Inc., San Jose, CA USA), calcolando la percentuale (%) dell'area dello strappo libera dalle cellule a diversi intervalli di tempo ( $t_i$ ) e rapportandola all'area del  $t_0$ . I risultati sono stati espressi come percentuale del tasso di chiusura dello strappo (Closure rate %) ovvero come rapporto dell'area coperta da cellule al tempo  $t_i$  rispetto a quella al tempo  $t_0$  per ogni trattamento.

## **Matrigel® invasion assay**

Il test di invasione cellulare *in vitro* è stato effettuato usando specifiche piastre all'interno delle quali sono presenti dei pozzetti con una membrana di PET con porosità di 8  $\mu\text{m}$  al di sopra del quale è presente un layer di Matrigel® (Corning Matrigel® Invasion Chamber 6-Well Plate 8.0 Micron). Circa  $90 \times 10^3$  cells/well sono state seminate in terreno di coltura H69 serum-free al di sopra dei pozzetti, mentre, al di sotto dei medesimi pozzetti è stato aggiunto terreno di coltura H69 con serum. Dopo 24 ore è stato aggiunto il farmaco o solo DMSO o nulla nei controlli. In questo modo le cellule presenti nel pozzetto, in coltura con un terreno privo di

FBS, hanno migrato attraverso il Matrigel e la membrana di PET sottostante per raggiungere la porzione inferiore del pozzetto dove era presente il terreno con FBS. Le cellule chemo-attratte dalle molecole presenti nel siero erano spinte ad invadere la matrice presente sul fondo del pozzetto, attraversarla e giungere al terreno con il siero sottostante il pozzetto. Dopo 96 ore i tutti terreni sono stati allontanati e le cellule sono state fissate per 30 minuti con Crystal Violet sciolto in 10% etanolo. L'eccesso di colorante è stato allontanato con H<sub>2</sub>O distillate e le cellule che non avevano invaso la matrice sono state allontanate. Le cellule che avevano invaso la matrice del Matrigel® sono state fotografate al microscopio ottico dotato di fotocamera Nikon D40 ed analizzate tramite il software ImageJ. Il tasso di invasione cellulare è stato valutato contando il numero di cellule che erano migrate attraverso la matrice, invadendola. Il risultato è stato espresso come percentuale (%) di cellule invadenti la matrice rispetto al controllo.

### **Xeno trapianto di cellule tumorali di iCCA in topi BALB/c nude (saggio di tumorigenicità *in vivo*).**

Xenograft sottocutanei di cellule primarie umane di iCCA sono state ottenute come precedentemente descritto da Fraveto et al. [29] e Cardinale et al. [12]. In breve, cellule di iCCA-Misto derivanti da colture primarie sono state iniettate (approssimativamente 10<sup>6</sup> cellule in 100 µl Matrigel HyStem®-C Cell Culture Scaffold, Sigma-Aldrich) per via sottocutanea nel lato destro dei topi maschi BALB/c nude di 4-5 settimane di età (il peso medio per ogni topo era circa 25 g, acquistati da Charles River Laboratories, Wilmington, MA) allevati in condizioni standard in un ambiente a temperatura controllata (20 – 22 °C) con cicli di 12 ore luce-buio, secondo le linee guida istituzionali per la cura degli animali.

La formazione delle masse tumorali è stata seguita da ispezioni macroscopiche giornaliere. Dopo 5 settimane, quando la dimensione del tumore era approssimativamente 100 mm<sup>3</sup>, i topi sono stati divisi in modo random in sei gruppi (N = 5) e sono stati trattati con OCA, Cisplatino, Gemcitabina, OCA + Cisplatino, OCA + Gemcitabina o solo DPBS (controlli), per le successive 5 settimane. La Gemcitabina è stata preparata come stock solution in acqua e somministrata, dopo diluizione in DPBS (1: 10<sup>4</sup>), mediante iniezione endovenosa della coda (1.05 mg/Kg in 100 µl) 2 volte a settimana. Il Cisplatino è stato preparato come stock solution in DMSO e somministrata, dopo diluizione in DPBS (1:10<sup>5</sup>), tramite iniezione intravenosa (2.4 mg/Kg in 100 µl), 2 volte a settimana. I topi hanno ricevuto una dieta chow (controllo) o una dieta integrata con OCA (0.03% w/w, 30 mg/kg/day). Il volume del tumore è stato calcolato secondo la formula [38, 63]  $V = \frac{\pi}{6} \cdot \text{length} \cdot (\text{width})^2$  ed espresso come percentuale delle variazioni di volume al momento t (V<sub>t</sub>) (i.e. dopo 5 settimane) in rapporto con il volume basale all'istante t<sub>0</sub> (V<sub>0</sub>= approx. 100 mm<sup>3</sup> usando la formula Percentage Increase (PI):

$$PI = \frac{V_t - V_0}{V_0} \cdot 100$$

Al termine del trattamento i topi sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale, i tumori sono stati rimossi e fissati per l'analisi istologica e immunohistochimica (IHC), come descritto [22, 29]. Brevemente, i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina a basso punto di fusione e tagliati in sezioni da 3 a 4  $\mu\text{m}$ . Le sezioni sono state colorate con Ematossilina ed Eosina (H&E). È stata eseguita l'immunohistochimica per il Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). In breve, l'attività della perossidasi endogena è stata bloccata tramite incubazione in 30 min. in perossido di idrogeno (2,5% in metanolo). Gli antigeni sono stati recuperati, come indicato dal fornitore, applicando Proteinase K (Dako, code S3020, Glostrup, Danimarca) per 10 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state quindi incubate overnight a 4 °C con l'anticorpo primario (PCNA, Dako, code M0879). I campioni sono stati quindi risciacquati con soluzione salina tamponata con fosfato e incubati con anticorpo secondario biotinilato e con Streptavidina-HRP (LSAB + System-HRP, Dako, code K0690). La 3,3' diaminobenzidina (Dako, code K3468) è stata usata come substrato e le sezioni sono state contro colorate con ematossilina. Infine, le sezioni sono state esaminate in tramite microscopio Leica Microsystems DM4500B Light Microscopy (Wetzlar, Germany), equipaggiato con videocamera Jenoptik Prog Res C10 Plus (Jena, Germany), scansionate tramite scanner digitale (Aperio Scanscope CS System, Aperio Digital Pathology, Leica Biosystems, Milan, Italy) e processate tramite ImageScope. I vetrini sono stati valutati indipendentemente da due ricercatori non a conoscenza del gruppo di trattamento in analisi. L'estensione dell'area necrotica è stata valutata su vetrini colorati con H&E, utilizzando il software ImageScope ed espressa come percentuale dell'area necrotica. Il numero di cellule positive al PCNA è stato calcolato automaticamente da un algoritmo specifico sull'intera sezione e quindi espresso come percentuale di cellule PCNA<sup>+</sup> proliferanti (% cellule proliferanti).

### **Metodi di analisi statistica**

I dati del presente lavoro sono espressi come Media aritmetica  $\pm$  Deviazione Standard (DS) o errore standard (ES) come indicato. Differenze tra variabili a distribuzione continua sono state calcolate utilizzando il Test del T di Student e tramite l'analisi della varianza (ANOVA) quando sono stati effettuati confronti multipli. Un p value minore di 0,05 ( $p < 0,05$ ) è stato considerato statisticamente significativo.

La determinazione della concentrazione di OCA, a cui si aveva il massimo effetto inibente della proliferazione cellulare, è stata ottenuta tramite il software MATLAB (The MathWorks, Inc.) inserendo i risultati ottenuti sperimentalmente tramite MTS.

I passaggi eseguiti tramite il software sono stati i seguenti:

1. Interpolazione dei dati a  $0,005\mu\text{M}$ , per rendere tutti gli intervalli di concentrazione uguali;
2. Filtraggio tramite filtro a media mobile;
3. Calcolo del minimo della curva risultante e relativa concentrazione.

## **RISULTATI**

### **Caratterizzazione delle linee primarie di iCCA umane per espressione genica di FXR e ASBT.**

Le linee primarie di iCCA-Misto e Mucinoso ottenute da campioni di iCCA asportati da pazienti sottoposti a resezione chirurgica sono stati ampiamente caratterizzati per diversi marcatori genetici e proteici, come descritto in precedenza [22, 29, 64].

In particolare, dopo circa 30 passaggi, le nostre colture cellulari primarie di sia sottotipo Mucinoso che Misto erano risultate particolarmente arricchite in cellule che esprimono marcatori staminali tumorali e marcatori di Epithelial Mesenchymal Transition (EMT). Le colture erano risultate negative per marcatori di cellule contaminanti, incluse le cellule ematopoietiche (CD45), macrofagi associati al tumore (CD163), cellule stellate epatiche attivate (GFAP), cellule endoteliali (CD31), proteina di attivazione fibroblastica (FAP) e stromal-derived factor (SDF1) [22, 29].

L'analisi di RT-qPCR aveva mostrato che l'espressione di FXR era marcatamente inferiore ( $p < 0,01$ ) sia nelle cellule di iCCA-Misto ( $46 \times 10^6$  volte rispetto al controllo) che Mucinoso ( $9 \times 10^6$  volte rispetto al controllo) rispetto alle cellule staminali dell'albero biliare umano (hBTSC) utilizzate come controlli non neoplastici (Figura 5). Inoltre, le cellule ottenute da iCCA-Mucinoso avevano mostrato un'espressione inferiore di FXR rispetto al iCCA-Misto di 4,7 volte. Il trasportatore di sali biliari sodio-dipendente, ASBT, era risultato espresso nelle cellule di iCCA ad un livello inferiore rispetto alle hBTSCs (Figura 5), pari a 1320 volte in meno per il sottotipo Mucinoso e 645 volte in meno per il sottotipo Misto rispetto al controllo. Tali dati sono risultati statisticamente significativi tra iCCA e hBTSC ( $p < 0,01$ ) mentre non si era osservata la stessa tra i due sottotipi di iCCA.

### **OCA inibiva la proliferazione delle iCCA**

Tramite saggio MTS era stata valutata la capacità proliferativa delle linee primarie di iCCA-Misto e Mucinoso sottoposte a concentrazioni crescenti dei principali ligandi di FXR: OCA, CDCA ed il sale biliare UDCA. Il trattamento di 72 ore era stato condotto alle concentrazioni indicate nei grafici a barre della Figura 6. I risultati ottenuti (Figura 6a) mostrano che l'effetto inibitorio di OCA sulla proliferazione dell'iCCA-Misto erano statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) a partire dalla concentrazione di  $0,05 \mu\text{M}$  in poi. La massima inibizione (38%) era stata calcolata tramite il software MATLAB e si ottiene alla concentrazione di  $0,38 \mu\text{M}$ . Nel sottotipo Mucinoso di iCCA (Figura 6a), l'effetto inibitorio di OCA sulla proliferazione iniziava ad essere statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) a partire dalla concentrazione di  $0,01$

$\mu\text{M}$  in poi e la massima inibizione della proliferazione cellulare (42%) si otteneva alla concentrazione di  $0,5 \mu\text{M}$  calcolata secondo il software MATLAB. Aumentando la concentrazione di OCA fino ad un massimo di  $2,5 \mu\text{M}$  non si otteneva un miglioramento sull'inibizione della proliferazione cellulare in entrambe le linee di iCCA-Misto o Mucinoso (dati non mostrati,  $N = 3$  esperimenti ciascuno a  $1,5, 2$  e  $2,5 \mu\text{M}$  OCA).

I risultati ottenuti utilizzando il CDCA (Figura 6b), ligando endogeno di FXR, dimostravano una riduzione statisticamente significativa della proliferazione in entrambi i sottotipi di linee primarie di iCCA-Misto e Mucinoso dopo 72 ore di trattamento. Tuttavia, CDCA iniziava ad esercitare effetti inibitori sulla proliferazione delle cellule di iCCA solo ad una concentrazione superiore a  $0,5 \mu\text{M}$  (rispetto a  $0,05 \mu\text{M}$  di OCA) ed il massimo effetto inibitorio, che si otteneva a  $1 \mu\text{M}$ , era del 10%; quest'ultimo risultava essere statisticamente più basso ( $p < 0,01$ ) rispetto all'effetto ottenuto con OCA (circa il 35%). L'aumento di concentrazione del CDCA fino a  $2,5 \mu\text{M}$  non ne migliorava l'effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare (dati non mostrati). L'inibizione della proliferazione cellulare che si otteneva con il CDCA non era sufficiente per un'applicazione clinica.

Un altro sale biliare, l'UDCA che non attiva l'FXR, non era riuscito a influenzare la proliferazione cellulare di colture primarie iCCA-Misto e Mucinoso dopo un trattamento di 72 ore, a concentrazioni di  $0,1-1 \mu\text{M}$  (Figura 6c). Una maggiore concentrazione di UDCA fino a  $2,5 \mu\text{M}$  non aveva avuto effetti sulla proliferazione cellulare (dati non mostrati).

Le hBTSC usate come linea primaria di cellule non tumorali (controllo) non avevano mostrato alcuna sensibilità all'OCA al CDCA o al UDCA i quali non ne influenzavano la proliferazione (dati non mostrati).

### **OCA aumentava il Tempo di Duplicazione della Popolazione cellulare (PDT)**

Nelle colture primarie di iCCA esposte a OCA, era stato calcolato il tempo di duplicazione della popolazione cellulare tramite la formula del Population Doubling Time (PDT). Come mostrato in figura 7, nelle colture primarie di iCCA-Misto e Mucinoso, l'OCA aumentava il tempo di duplicazione della popolazione cellulare. Infatti, in cellule di iCCA-Misto, il PDT era risultato essere di  $0,58 \pm 0,03$  giorni in condizioni di coltura standard (controllo),  $0,83 \pm 0,05$  giorni dopo trattamento per 72 ore con  $0,5 \mu\text{M}$  OCA,  $1,12 \pm 0,05$  giorni dopo trattamento per 72 ore con  $1 \mu\text{M}$  di OCA ed infine  $1,46 \pm 0,06$  giorni dopo trattamento per 72 ore con  $1,5 \mu\text{M}$  di OCA ( $p < 0,05$  vs Controllo). Nelle colture primarie di iCCA sottotipo Mucinoso, il PDT era  $0,64 \pm 0,03$  giorni nelle cellule di controllo,  $0,92 \pm 0,04$  dopo trattamento per 72 ore  $0,5 \mu\text{M}$  di OCA,  $1,02 \pm 0,03$  dopo trattamento per 72 ore  $1 \mu\text{M}$  di OCA e  $1,34 \pm 0,05$  dopo trattamento

per 72 ore 1,5  $\mu\text{M}$  di OCA ( $p < 0,05$  vs Controllo). L'allungamento del tempo di duplicazione cellulare risulta essere dose-dipendente ( $p < 0,05$ ).

### **L'OCA aumenta l'apoptosi delle cellule di iCCA**

L'effetto dell'OCA sull'apoptosi cellulare nell'iCCA-Misto e Mucinoso era stato analizzato tramite il test AnnessinaV/PI. Il numero di cellule in apoptosi precoce e tardiva era stato valutato dopo 72 ore di trattamento con OCA. I risultati, riportati in figura 8, mostrano l'aumento percentuale di cellule apoptotiche, nel iCCA sottotipo Misto e Mucinoso, trattate con OCA normalizzato sui rispettivi controlli non trattati. Sulle linee primarie di iCCA sottotipo Misto l'effetto apoptotico di OCA era più evidente a 1,5  $\mu\text{M}$  rispetto a 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), mentre la percentuale di cellule apoptotiche non differiva tra 0,5 e 1,5  $\mu\text{M}$  di OCA nelle cellule di iCCA-Mucinoso.

### **L'OCA inibiva la capacità di formazione delle colonie delle linee primarie di iCCA**

Il potenziale inibente dell'OCA sulla formazione di colonie era stato valutato tramite Clonogenic Assay. A tale scopo, i parametri presi in considerazione sono stati il numero di colonie, espresso in percentuale rispetto al controllo non trattato, ed il Colony Dimension Index, indice rappresentativo della grandezza media delle colonie presenti in ogni pozzetto. Come mostrato in figura 9, il numero di colonie formate da entrambe le linee primarie di iCCA-Misto e Mucinoso era significativamente diminuito ( $p < 0,05$ ) a seguito del trattamento con 0,5  $\mu\text{M}$  di OCA per 10 giorni rispetto alle cellule non trattate (controlli). Come si può evincere dagli istogrammi della figura 9b, il sottotipo Misto trattato con OCA subiva una riduzione della percentuale del numero di colonie statisticamente significativo ( $p < 0,05$  vs controllo) pari al 53% mentre il sottotipo Mucinoso subiva un'inibizione pari al 43% ( $p < 0,05$  vs Controllo). Anche la dimensione media delle colonie in entrambi i sottotipi di iCCA era significativamente ridotta. Infatti, il Colony Dimension Index delle colonie di iCCA-Misto trattate con OCA ( $2,16 \pm 0,38$ ,  $p < 0,05$  vs Controlli) era significativamente più basso rispetto ai controlli non trattati ( $4,15 \pm 0,32$ ). Risultati simili sono stati trovati per le cellule di iCCA-Mucinoso dove il Colony Dimension Index delle cellule trattate con OCA era pari a  $2,85 \pm 0,55$  vs  $4,56 \pm 0,30$  dei controlli non trattati ( $p < 0,05$ ).

### **L'OCA inibisce la formazione degli sferoidi di entrambi i sottotipi dell'iCCA**

Lo studio della formazione degli sferoidi, anche noti come tumorsfere, ha permesso di valutare l'efficacia dell'OCA su un modello tridimensionale che ha il pregio di essere più fedele

alla architettura tissutale neoplastica *in vivo* rispetto al classico modello *in vitro* in due dimensioni [62].

Erano state coltivate cellule di linee primarie di iCCA-Misto e iCCA-Mucinoso in apposite piastre di non adesione e con terreno specifico per sferoidi addizionato con OCA alle concentrazioni di 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  oppure senza farmaco (controllo = 0  $\mu\text{M}$  OCA) per 10 giorni.

Come si può osservare nella figura 10, la formazione degli sferoidi da parte delle cellule di iCCA sottotipo Misto e Mucinoso era stata fortemente compromessa dal trattamento con OCA rispetto a cellule non trattate ( $p < 0,05$  vs Controlli) e questi effetti erano dose-dipendenti ( $p < 0,05$ ). Nello specifico, la formazione degli sferoidi era stata quasi totalmente compromessa dall'OCA alla massima concentrazione testata di 2  $\mu\text{M}$  dove erano osservabili aggregati formati al massimo di 3-5 cellule.

### **OCA riduceva la migrazione cellulare di iCCA-Misto: Wound Healing Assay**

Tramite wound healing assay erano state osservate le capacità migratorie delle cellule tumorali di iCCA-Misto e iCCA-Mucinoso come mostrato nella figura 11. I grafici a linea mostrano l'aumento dell'area coperta dalle cellule trattate o non trattate con OCA alla concentrazione di 0,5  $\mu\text{M}$  rispetto al giorno 0 ( $t_0$ ) mostrando pertanto la percentuale del tasso di chiusura dello strappo nel tempo (Closure rate %). In particolare, le cellule di controllo (0  $\mu\text{M}$  di OCA) dell'iCCA-Misto iniziavano a coprire gli strappi da noi creati dopo circa 2 giorni e la chiusura era stata completata in media tra il 4° e il 5° giorno e da noi monitorata fino al 7° giorno (Figura 11a). Al contrario, le medesime cellule trattate con OCA (0,5  $\mu\text{M}$ ) non riuscivano a rimarginare gli strappi, indicando che la migrazione delle cellule iCCA-Misto era stata quasi completamente compromessa dall'OCA. Nel sottotipo Misto dal 2° giorno era stato possibile rilevare una differenza di area statisticamente significativa pari al 16% rispetto al controllo ( $p < 0,01$ ), che aumentava fino al raggiungimento del plateau che si otteneva a partire in media dal 4° giorno e la riduzione massima registrata era stata pari al 64% raggiunta in media tra il 4° e il 5° giorno rispetto ai controlli ( $p < 0,01$ ). La figura 11a mostra come al giorno 7 lo strappo era ancora ampiamente visibile nelle cellule trattate e totalmente richiuso nelle cellule di controllo ( $p < 0,01$ ).

Nell'iCCA-Mucinoso, l'OCA non mostrava alcun effetto significativo sulla migrazione cellulare. Infatti, le cellule non trattate e trattate mostravano una capacità simile di coprire lo strappo, indicando una risposta migratoria paragonabile. Un leggero, ma significativo ( $p < 0,05$ ) effetto inibitorio era stato osservato verso il 3° e 4° giorno della coltura pari a circa -6% rispetto al controllo (Figura 11b). Il 7° giorno l'area coperta dalle cellule del campione trattato con



OCA non presentava differenze apprezzabili rispetto al controllo e lo strappo in entrambi era completamente rimarginato (Figura 11b).

### **OCA riduceva l'invasione tumorale dell'iCCA *in vitro***

Il test di invasione cellulare era stato svolto per valutare l'effetto dell'OCA sulla capacità delle cellule tumorali di iCCA di invadere la matrice extracellulare mimata dal Matrigel®. Era stata valutata la percentuale di cellule che avevano invaso la membrana rispetto al controllo dopo 96 ore di trattamento con OCA 0,5 µM. La figura 12 mostra come l'OCA aveva compromesso la capacità di entrambi i sottotipi di iCCA-Misto e Mucinoso di invadere il Matrigel®. In particolare, per il sottotipo Misto (Figura 12) si osservava una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) pari al 91,50%; mentre per il sottotipo Mucinoso (Figura 12) la riduzione era stata del 18,65% ( $p < 0,05$ ) al termine delle 96 ore di trattamento.

### **Aumento dell'effetto antiproliferativo di Gemcitabina e Cisplatino in associazione con OCA**

Gemcitabina e Cisplatino rappresentano l'attuale standard standard of care per il trattamento del CCA [65]. Un recente studio [29] condotto nei nostri laboratori di ricerca sulle medesime linee cellulari primarie di iCCA-Misto e Mucinoso usate nel presente lavoro, aveva dimostrato che Gemcitabina e Cisplatino inibiscono la proliferazione e inducono l'apoptosi nell'iCCA. Era stato inoltre individuata la concentrazione a cui si otteneva il massimo effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare che era risultata essere 10 µM per la Gemcitabina e 20 µM per il Cisplatino.

Nel presente studio abbiamo testato l'effetto della Gemcitabina (10 µM) e del Cisplatino (20 µM) in combinazione con l'OCA (0,5 e 1,5 µM). Nelle colture cellulari di iCCA-Misto e Mucinoso, il trattamento con OCA per 72 ore aveva potenziato l'effetto inibitorio della Gemcitabina sulla proliferazione cellulare indipendentemente dalla bassa (0,5 µM) o alta concentrazione di OCA (1,5 µM) analizzato tramite il test MTS. Nel dettaglio i risultati mostrati in figura 13a mostrano come le linee primarie di iCCA sottotipo Misto trattato con la sola Gemcitabina avevano una riduzione statisticamente significativa del 79% ( $p < 0,05$  vs Controllo) mentre i trattamenti combinati avevano portato a una riduzione della proliferazione rispetto al controllo del 90% per la combinazione Gemcitabina con OCA 0,5 µM ( $p < 0,05$  vs Controllo), e dell'87% per la combinazione Gemcitabina con OCA 1,5 µM ( $p < 0,05$  vs Controllo). Questi valori erano statisticamente significativi anche rispetto al trattamento con la sola Gemcitabina ( $p < 0,05$  OCA 0,5 µM + Gemcitabina vs Gemcitabina;  $p < 0,05$  OCA 1,5 µM + Gemcitabina vs Gemcitabina).

Nel sottotipo Mucinoso (Figura 13a) il trattamento con la sola Gemcitabina portava a una riduzione del 61% ( $p < 0,05$  vs controllo), mentre i trattamenti combinati portavano ad una riduzione della proliferazione statisticamente significativa rispetto al controllo del 78% per la combinazione Gemcitabina con OCA 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$  vs Controllo) e del 94% per la combinazione Gemcitabina con OCA 1,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$  vs Controllo). Questi valori risultano essere statisticamente significativi anche rispetto al trattamento con la sola Gemcitabina ( $p < 0,05$  OCA 0,5  $\mu\text{M}$  + Gemcitabina vs Gemcitabina;  $p < 0,05$  OCA 1,5  $\mu\text{M}$  + Gemcitabina vs Gemcitabina).

L'effetto inibitorio del Cisplatino sulla proliferazione cellulare delle colture di iCCA-Misto e Mucinoso era stato potenziato dall'OCA, ma solo alla massima concentrazione testata (1,5  $\mu\text{M}$ ). In particolare, (Figura 13b) il sottotipo Misto, trattato con il solo Cisplatino, subiva una riduzione rispetto al controllo pari al 56% ( $p < 0,05$  vs Controllo), mentre i trattamenti combinati avevano portato a una riduzione della proliferazione rispetto al controllo del 62% per la combinazione Cisplatino con OCA 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$  vs Controllo) e del 71% per la combinazione con OCA 1,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$  vs Controllo). Solo il trattamento OCA 1,5  $\mu\text{M}$  + Cisplatino era risultato statisticamente significativi rispetto al trattamento con il solo Cisplatino ( $p < 0,05$  OCA 1,5  $\mu\text{M}$  + Cisplatino vs Cisplatino). Nella figura 13b si può osservare come il sottotipo Mucinoso trattato con il solo Cisplatino abbia subito una riduzione della proliferazione statisticamente significativa rispetto al controllo pari al 61% ( $p < 0,05$  vs Controllo) mentre i trattamenti combinati avevano portato a una riduzione della proliferazione statisticamente significativa rispetto al controllo del 53% per la combinazione Cisplatino con OCA 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$  vs Controllo) e del 68% per la combinazione Cisplatino con OCA 1,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$  vs Controllo); quest'ultimo valore era risultato essere statisticamente significativo anche rispetto al trattamento con il solo Cisplatino ( $p < 0,05$  OCA 1,5  $\mu\text{M}$  + Cisplatino vs Cisplatino).

### **Aumento dell'effetto pro-apoptotico di Gemcitabina e Cisplatino in combinazione con OCA**

L'effetto sull'apoptosi del trattamento con OCA in combinazione con Gemcitabina e con Cisplatino era stato valutato tramite il test AnnessinaV-FITC/PI. Le cellule di iCCA-Mucinoso e Misto erano state trattate per 72 ore con il solo OCA alla concentrazione 0,5  $\mu\text{M}$ , con la sola Gemcitabina alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ , con il solo Cisplatino alla concentrazione di 20  $\mu\text{M}$  ed in fine con l'OCA in combinazione con Cisplatino e Gemcitabina.

Il trattamento di 72 ore delle linee primarie umane di iCCA-Misto con OCA migliorava l'effetto apoptotico della Gemcitabina mentre la combinazione OCA con il Cisplatino non esercitava

alcun effetto migliorativo dell'apoptosi cellulare rispetto all'uso del solo Cisplatino. Nelle cellule di iCCA-Mucinoso invece, l'OCA non riusciva ad aumentare l'effetto apoptotico di Gemcitabina e Cisplatino. I risultati riportati in figura 14 mostrano l'aumento percentuale normalizzato rispetto al controllo non trattato.

Nel dettaglio, per l'iCCA-Misto era stato registrato un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule apoptotiche pari al 48% per il trattamento con solo OCA ( $p < 0,05$  vs Controllo) di cui si era già parlato precedentemente (Figura 7), pari al 67% per il trattamento con la sola Gemcitabina (Figura 14a,  $p < 0,05$  vs Controllo) e pari all' 86% per il trattamento combinato Gemcitabina e OCA rispetto al controllo ( $p < 0,05$  vs Controllo). Il trattamento combinato Gemcitabina con OCA inoltre, determinava un aumento del 19% rispetto al solo trattamento con Gemcitabina ( $p < 0,05$  OCA + Gemcitabina vs Gemcitabina) e del 38% rispetto al solo OCA ( $p < 0,05$  OCA + Gemcitabina vs OCA).

Per il trattamento con il solo Cisplatino l'aumento percentuale di cellule apoptotiche di iCCA sottotipo Misto era stato dell'81% rispetto al controllo ( $p < 0,05$  vs Controllo) ed un valore simile era stato ottenuto dal trattamento combinato Cisplatino e OCA. Il trattamento combinato OCA e Cisplatino aveva registrato un aumento statisticamente significativo rispetto al trattamento con OCA usato singolarmente ( $p < 0,05$  vs OCA), ma non rispetto al trattamento con il solo Cisplatino.

Per l'iCCA sottotipo Mucinoso era stato registrato un aumento della percentuale di cellule apoptotiche pari al 16% per il trattamento con solo OCA, pari al 53% per il trattamento con la sola Gemcitabina (Figura 14a) e pari all'57% per il trattamento combinato Gemcitabina e OCA. Tutti questi valori sono risultati essere statisticamente significativi rispetto al controllo ( $p < 0,05$  vs Controllo). Anche la differenza (41%) tra il trattamento combinato Gemcitabina e OCA era risultata statisticamente significativa rispetto al solo trattamento con OCA ( $p < 0,05$  vs OCA) mentre non c'era stata differenza statisticamente significativa tra il trattamento con la sola Gemcitabina e il trattamento combinato Gemcitabina con OCA.

Per il trattamento con il solo Cisplatino (Figura 14b) l'aumento percentuale di cellule apoptotiche era dell'37% ( $p < 0,05$  vs Controllo) mentre il valore ottenuto dal trattamento combinato Cisplatino e OCA era del 39% ( $p < 0,05$  vs Controllo). Tra il trattamento con il solo Cisplatino e quello combinato Cisplatino con OCA non c'era una differenza statisticamente significativa mentre questa era stata osservata tra il trattamento combinato Cisplatino con OCA e il trattamento con solo OCA pari al 23% ( $p < 0,05$  vs OCA).

## **Il trattamento combinato con OCA in associazione con Gemcitabina e Cisplatino aboliva la formazione di colonie dell'iCCA**

La combinazione di OCA 0,5  $\mu$ M con Gemcitabina 10  $\mu$ M aveva abolito totalmente la capacità di formare colonie delle linee primarie umane di iCCA-Misto e Mucinoso ( $p < 0,01$  vs controlli;  $p < 0,05$  vs Gemcitabina) dopo 10 giorni di trattamento, mentre il trattamento con la sola Gemcitabina aveva solo parzialmente ridotto il numero di colonie (tra il -60 e il -70%) formatesi dopo 10 giorni di trattamento ( $p < 0,01$  vs controllo) (Figura 15a). Inoltre, la Gemcitabina da sola non aveva ridotto la dimensione media delle colonie formate da entrambi i sottotipi tumorali, rispetto ai controlli. Il Colony Dimension Index delle colonie di cellule dell'iCCA-Misto non trattate era di  $4,15 \pm 0,32$  rispetto a  $4,34 \pm 0,26$  nelle cellule trattate con Gemcitabina. Per le cellule di iCCA-Mucinoso non trattate, il Colony Dimension Index era di  $4,56 \pm 0,30$  rispetto a  $4,70 \pm 0,26$  delle cellule trattate con Gemcitabina. Queste differenze non erano statisticamente significative.

Il trattamento combinato di Cisplatino 20  $\mu$ M con OCA 0,5  $\mu$ M allo stesso modo, aveva completamente abolito la capacità delle cellule di iCCA-Misto di formare colonie dopo 10 giorni di trattamento ( $p < 0,01$ , Figura 15b); mentre il trattamento con solo Cisplatino (20  $\mu$ M) aveva ridotto solo parzialmente la formazione delle colonie (-86%,  $p < 0,05$  vs Controllo). Al contrario, nelle cellule di iCCA-Mucinoso la combinazione Cisplatino 20  $\mu$ M con OCA 0,5  $\mu$ M aveva indotto solo una riduzione del numero delle colonie (-96%,  $p < 0,01$  vs Cisplatino, Figura 15b). Inoltre, il Cisplatino da solo non riusciva a ridurre le dimensioni delle colonie in cellule iCCA-Misto e Mucinoso mentre la combinazione Cisplatino + OCA 0,5  $\mu$ M riusciva a ridurre di circa il 41% la dimensione delle colonie che si formavano in modo statisticamente significativo. Il Colony Dimension Index delle cellule di iCCA-Misto non trattate era risultato essere  $4,15 \pm 0,32$  rispetto a  $4,85 \pm 0,25$  per le cellule trattate con Cisplatino ( $p = ns$ ); il Colony Dimension Index delle cellule di iCCA-Mucinoso non trattate era  $4,56 \pm 0,30$  rispetto a  $4,40 \pm 0,38$  delle cellule trattate con Cisplatino, ( $p = ns$ ); mentre il Colony Dimension Index delle cellule di iCCA-Mucinoso trattate con la doppia combinazione OCA e Cisplatino era risultato essere  $1,83 \pm 0,48$  ( $p < 0,05$ ).

## **L'OCA da solo riduceva marcatamente e combinato con Gemcitabina o Cisplatino abrogava totalmente, la crescita degli xenotrapianti dell'iCCA-Misto, *in vivo***

Le Cellule di linee primarie di iCCA-Misto erano state iniettate per via sottocutanea sul fianco di topi BALB/c nude maschi e la formazione del tumore era stata seguita tramite ispezione macroscopica. Dopo 4 settimane, quando le dimensioni medie dei tumori erano di circa 100 mm<sup>3</sup> (t<sub>0</sub>) i topi sono stati trattati con OCA addizionato al cibo (0,03% p/p, 30 mg/kg)

da solo o in combinazione con Cisplatino (2,4 mg/Kg in 100  $\mu$ l) o Gemcitabina (1,05 mg/Kg in 100  $\mu$ l) iniettati per via endovenosa 2 volte a settimana per le 5 settimane successive. I gruppi di controllo erano dieta chow, solo Gemcitabina o solo Cisplatino come descritto in materiali e metodi.

Al termine del trattamento il volume del tumore (Figura 16) era risultato significativamente più basso nei topi trattati con OCA rispetto ai controlli non trattati ( $p < 0,05$ ). I trattamenti con Gemcitabina o Cisplatino da soli avevano mantenuto i volumi medi dei tumori più bassi rispetto al solo OCA ( $p < 0,05$ ). La co-somministrazione di Gemcitabina + OCA o Cisplatino + OCA aveva mantenuto i volumi tumorali statisticamente più bassi rispetto al controllo e alla sola Gemcitabina o al solo Cisplatino a partire dal 21° giorno fino al termine del trattamento ( $p < 0,05$ ) il che indicava che l'OCA esercitava un effetto anti-neoplastico additivo quando combinato con i due chemioterapici (Figura 16). Non erano state trovate differenze statisticamente significative tra i trattamenti Gemcitabina + OCA o Cisplatino + OCA se non nell'ultima settimana di trattamento ( $p < 0,05$  Gemcitabina + OCA vs Cisplatino + OCA).

L'istomorfologia e l'immunoistochimica riportate nella figura 17 eseguite sui campioni tumorali prelevati al termine del trattamento avevano dimostrato che topi trattati con OCA, con o senza Gemcitabina o Cisplatino, mostravano aree necrotiche significativamente più alte (Figura 17a) rispetto ai topi di controllo ( $p < 0,05$ ). La necrosi più alta era parallela a una percentuale inferiore di cellule PCNA<sup>+</sup> (Figura 17b).

Pertanto, questo esperimento dimostrava che la co-somministrazione di OCA con Gemcitabina o Cisplatino aboliva quasi completamente la formazione del tumore nei modelli murini di xenotrapianto.

## DISCUSSIONI

I risultati più significativi ottenuti nel presente studio indicano che nelle linee cellulari primarie di iCCA umano: 1) Il recettore FXR era fortemente down-regolato in entrambi i sottotipi tumorali di iCCA; 2) L'OCA, uno dei più potenti agonisti selettivi di FXR, riduceva la proliferazione cellulare del tumore anche a concentrazioni molto basse (0,01-0,5  $\mu$ M); 3) *In vitro*, l'OCA induceva l'apoptosi delle cellule di iCCA, ne comprometteva la capacità di formazione delle colonie e di tumorsfere, così come la migrazione e l'invasione tumorale; 4) L'OCA potenzia l'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico della Gemcitabina e del Cisplatino su cellule di iCCA; 5) *In vivo*, l'OCA ha compromesso la crescita degli xenotrapianti tumorali ed ha esercitato effetti additivi in combinazione con la Gemcitabina o con il Cisplatino. Pertanto, presi insieme, i nostri risultati suggeriscono che l'OCA svolge effetti anti-neoplastici contro l'iCCA.

FXR è il principale sensore di acidi biliari nel fegato e nell'intestino, appartiene alla superfamiglia di recettori nucleari metabolici e regola la trascrizione di geni chiave coinvolti nella sintesi e nel trasporto degli acidi biliari. Inoltre, FXR regola geni chiave coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico, proliferazione cellulare e processi infiammatori [34, 62, 66, 67]. Pertanto, dato il ruolo chiave di FXR nel controllare le principali funzioni cellulari, non sorprende che sia spiccatamente down-regolato in una cellula neoplastica che è tipicamente anarchica e sganciata da qualsiasi forma di regolazione [35, 48, 49, 68]. Coerentemente con queste osservazioni, i topi FXR<sup>-/-</sup> sviluppano spontaneamente il cancro del fegato dopo i 12 mesi di età, la down-regolazione del recettore FXR è stata descritta in diversi tumori e durante lo sviluppo e la progressione del cancro del colon [68-73].

Nel presente lavoro, abbiamo voluto confrontare l'espressione di FXR nell'iCCA con l'espressione nelle hBTSC, data l'alta presenza di CSCs nelle nostre colture primarie di iCCA sia nel sottotipo Misto sia nel Mucinoso; come suggerisce l'ipotesi di un'origine tumorale a partire dalle cellule staminali/progenitrici situate nei canali di Hering o dalle ghiandole peribiliari intraepatiche [12]. Gli esperimenti da noi effettuati hanno mostrato una riduzione di espressione di FXR sia nelle cellule sottotipo Misto sia in quelle sottotipo Mucinoso rispetto alle hBTSC, in linea con quanto affermato da Obama *et al.* [47] e Erice *et al.* [35], che avevano già osservato una down-regolazione di tale gene nelle cellule di CCA rispetto cellule normali epiteliali dell'albero biliare intraepatico, rispetto ai colangiociti normali o rispetto ai tessuti peritumorali non neoplastici [35, 47]. Infatti, in un gran numero di pazienti con CCA provenienti da due coorti indipendenti, è stata osservata un'espressione FXR più bassa nei tumori rispetto al tessuto epatico normale circostante e, soprattutto, un livello inferiore di espressione nei

tumori scarsamente differenziati rispetto a quelli moderatamente/ben differenziati, indicando una correlazione diretta dell'espressione di FXR con aggressività e prognosi del CCA [35].

Le osservazioni degli studi in letteratura effettuati sul possibile ruolo antineoplastico di FXR hanno stimolato l'interesse alla valutazione dei ligandi di FXR, in particolare l'OCA, che rappresenta il più potente agonista recettoriale, come strategia terapeutica per il CCA.

Nel presente studio, abbiamo utilizzato colture cellulari iCCA primarie che ricapitolano le caratteristiche tipiche del CCA umano, tra cui un'alta presenza di marcatori di CSC ed EMT, oltre ad un alto potenziale cancerogeno *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, abbiamo valutato gli effetti dell'OCA sui classici test di cancerogenesi, tra cui proliferazione, apoptosi, clonogenicità, formazione di tumorsfere, migrazione e invasione. Per quanto riguarda la proliferazione, abbiamo dimostrato nelle curve dose-risposta che l'OCA esercita un significativo effetto anti-proliferativo a concentrazioni molto basse come 0,01-0,05  $\mu\text{M}$ .

La dose di massima inibizione della proliferazione da noi ottenuta tramite l'analisi dei dati di MTS, risulta essere più bassa rispetto a quelle utilizzate da altri autori [35, 38]. Ciò potrebbe essere dovuto all'uso di linee primarie isolate da pazienti, invece che linee immortalizzate utilizzate comunemente in letteratura, le quali risultano meno sensibili all'OCA e quindi necessitano di concentrazioni più elevate per ottenere effetti evidenti sulla tumorigenicità.

L'OCA è stato approvato per l'uso clinico in pazienti affetti da Colangite Biliare Primitiva a dosi orali di 5-10 mg/die che portano ad una concentrazione plasmatica di OCA di circa 0.3  $\mu\text{M}$  [53, 54]. In modo simile ad altri acidi biliari, l'OCA subisce un'ampia glyco- e tauroconiugazione, tale che meno dell'1% di OCA rimanente non coniugato nel siero [54, 74]. Pertanto, tutti gli effetti *in vitro* di OCA documentati nel presente studio su cellule iCCA si sono verificati a concentrazioni compatibili con le concentrazioni plasmatiche raggiunte dall'OCA nei pazienti trattati. Inoltre, la relativa idrofobicità dell'OCA, consente l'ingresso passivo nella cellula, come dimostrato in studi precedenti [74, 75], superando il limite di internalizzazione dato dalla elevata down-regolazione del trasportatore di acidi biliari ASBT nelle cellule iCCA;

Ancora più importante, l'effetto anti-proliferativo di OCA, CDCA e UDCA nelle cellule iCCA corrisponde al profilo dell'effetto agonistico su FXR. L'OCA è 100 volte più potente del CDCA nell'attivazione FXR, mentre l'UDCA non mostra proprietà di attivazione FXR [51, 54]. Ciò avvalorava la nostra conclusione secondo cui gli effetti anti-proliferativi dell'OCA sulle cellule di iCCA sono mediati dall'agonismo di FXR. L'OCA non solo ha inibito la proliferazione, ma ha anche indotto apoptosi e contrastato l'invasione e la migrazione delle colture cellulari di iCCA. In generale, questi effetti erano più evidenti nell'iCCA-Misto piuttosto che nel Mucinoso, coerentemente con la diversa espressione di FXR registrata nei due sottotipi, maggiore

nell'iCCA-Misto e minore nell'iCCA-Mucinoso e con la maggiore aggressività e la peggiore prognosi dell'iCCA-Mucinoso già dimostrata in diversi studi clinici [5, 10, 11, 76, 77].

I nostri dati mostrano che l'OCA induce meno apoptosi nell'iCCA-Mucinoso rispetto al Misto, inoltre l'OCA ha effetti minimi sull'inibizione della migrazione e dell'invasione delle cellule dell'iCCA-Mucinoso nei test di wound-healing ed invasione in Matrigel®. Ciò potrebbe spiegare la maggiore resistenza dell'iCCA-Mucinoso agli effetti dell'OCA ma, allo stesso tempo, indica che l'inibizione della migrazione e dell'invasione cellulare osservata nell'iCCA-Misto non è solo la conseguenza di una ridotta proliferazione e di effetti pro-apoptotici indotti dal farmaco che sono stati osservati anche nell'iCCA-Mucinoso, ma una conseguenza diretta dell'azione dell'OCA. Verrebbe, quindi, confermato il ruolo di FXR come inibitore dell'invasione tumorale già osservato da [40] che aveva dimostrato come FXR inibisce la produzione di metalloproteasi.

L'accumulo di acidi biliari è stato considerato giocare un ruolo patogenico nello sviluppo del CCA, pertanto diverse strategie in fase di valutazione sono volte ad inibirne la sintesi o a promuoverne l'eliminazione [66, 78]. Tra queste, l'attivazione di FXR gioca un ruolo centrale, inibendo la sintesi degli acidi biliari tramite Cyp7 $\alpha$ 1 ed esercitando diversi effetti anti-cancro, come la soppressione dell'espressione e della funzione della  $\beta$ -Catenina [38, 79]. Molto recentemente, nei pazienti con iCCA, l'espressione di FXR è risultata essere correlata negativamente con il livello di IL-6 [80]. È ben noto che IL-6 ha un ruolo fondamentale nella prognosi dell'iCCA fungendo da fattore di crescita e sopravvivenza per le cellule tumorali. Lv, B. *et al.* hanno dimostrato *in vitro* ed *in vivo* che l'attivazione di FXR porta ad inibire la produzione di IL-6 che a sua volta porta all'inibizione della crescita e della metastatizzazione dell'Intrahepatic Cholangiocellular Carcinoma (ICC) causata dal blocco della transizione epitelio mesenchimale (EMT) [80].

Pertanto, stanno emergendo prove convincenti su una stretta relazione tra FXR e colangiocarcinoma, mentre il ruolo anti-tumorale svolto da FXR era già ben noto in letteratura per altri tumori [35, 38, 40, 41, 43, 45].

Il risultato clinicamente più rilevante del nostro studio, tuttavia, è stato osservato negli xenotrapianti di iCCA *in vivo*, poiché l'OCA da solo ha contrastato di oltre il 50% la crescita tumorale e ha ulteriormente esercitato effetti additivi con Gemcitabina e Cisplatino. Sorprendentemente, l'OCA combinata con Gemcitabina o Cisplatino ha completamente inibito la crescita degli xenotrapianti.

Gli xenotrapianti di iCCA ricapitolano le caratteristiche desmoplastiche del cancro originale formando una massa neoplastica con un alto rapporto tra la componente mesenchimale rispetto a quella epiteliale [22]. È interessante notare che l'OCA da solo ha indotto aree necrotiche nella



massa neoplastica oltre a inibire la proliferazione cellulare, coerentemente con quanto dimostrato con i risultati ottenuti *in vitro*. I dati da noi ottenuti *in vivo* sono coerenti con precedenti studi che mostrano l'effetto inibitorio esercitato da un altro agonista FXR sulla crescita sottocutanea di cellule di CCA in topi nudi: il GW4064, una molecola sintetica non steroidea con struttura derivante dall' isossazolo <sup>[37]</sup>. Inoltre, è stato dimostrato che l'attivazione di FXR promuove la chemiosensibilizzazione <sup>[38, 63]</sup> e ciò è coerente con i nostri risultati che mostrano effetti anti-neoplastici additivi *in vitro* e *in vivo* di OCA somministrati insieme a Gemcitabina o Cisplatino.

I pazienti con CCA vengono frequentemente diagnosticati in stadi avanzati, quando i trattamenti curativi chirurgici sono inapplicabili <sup>[14, 81]</sup>. Inoltre, molto frequentemente, la presenza di cirrosi o danno epatico colestatico nei pazienti con iCCA controindica l'uso di chemioterapici <sup>[82, 83]</sup>. Per tutte queste considerazioni, dovrebbero essere usati farmaci con un elevato profilo di sicurezza ma, al momento, nessun farmaco con questa caratteristica è stato approvato. L'OCA potrebbe rappresentare un candidato ideale, dal momento che l'effetto collaterale maggiore è il prurito, che è comunque gestibile mediante aggiustamenti della dose <sup>[84]</sup>. Inoltre, l'OCA potrebbe essere testata come agente chemiopreventivo in pazienti ad alto rischio di iCCA come i pazienti con PSC.

## CONCLUSIONI

In conclusione, il nostro studio dimostra importanti effetti anti-cancro *in vitro* e *in vivo* di OCA contro le colture primarie di iCCA umane e ciò si unisce alle evidenze già presenti in letteratura di FXR come bersaglio terapeutico in pazienti con CCA. Dato l'ottimo profilo di sicurezza, gli studi clinici che hanno testato OCA da solo o in combinazione con chemioterapici in pazienti con CCA non trattabili chirurgicamente potrebbero offrire prospettive interessanti. Questo lavoro è stato il primo passo necessario verso una completa comprensione delle proprietà anti-neoplastiche dell'OCA che grazie a studi futuri potrebbe rappresentare una nuova arma nella lotta al CCA.

L'OCA ha effetto anti-tumorale sul iCCA-Misto e Mucinoso anche a basse concentrazioni grazie alla sua grande affinità per FXR, recettore che svolge un ruolo da protagonista in diverse funzioni cellulari comprese quelle anti-proliferative.

Inoltre, l'OCA, bloccando l'invasione e la migrazione delle cellule tumorali, mostra un effetto anti-metastatico che ad oggi è uno dei problemi principali su cui focalizzare l'attenzione per la gestione terapeutica del CCA.

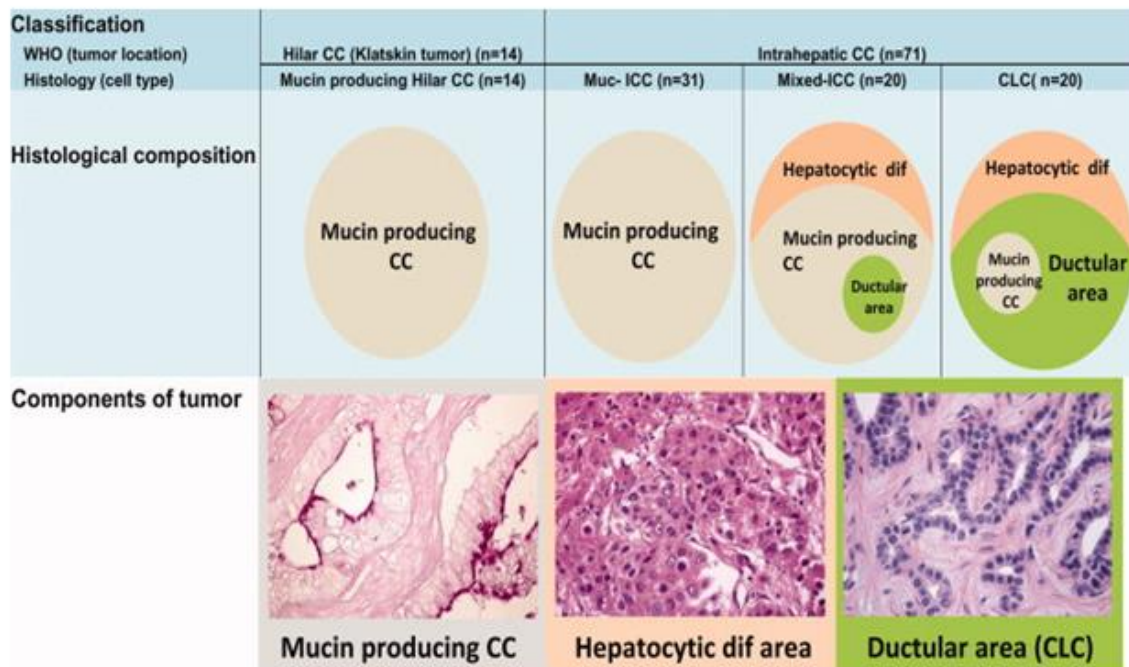
I risultati della nostra ricerca indicano che effetti maggiori in senso antineoplastico si ottengono combinando l'OCA con la Gemcitabina suggerendo quindi, che proprio questa combinazione sia la candidata migliore per le fasi future di questo studio in particolare per una futura applicazione nella gestione clinica del iCCA-Misto.

## PROSPETTIVE FUTURE

Il prossimo passo da compiere verso una comprensione più ampia dell'efficacia dell'OCA sul iCCA è rappresentato dallo studio del Pathways molecolari tramite cui il farmaco agisce, dopo l'attivazione del recettore FXR. Recenti studi fanno indirizzare l'attenzione su un possibile ruolo giocato dalla via di segnalazione mediata da SHP e BCLX-L che porterebbe all'induzione dell'apoptosi con la fuoriuscita del Citocromo C dal mitocondrio.

Inoltre, in prospettiva di un futuro impiego clinico, grazie ai risultati ottenuti dal presente studio, uniti ai dati già presenti in letteratura, è stato attualmente presentato dal nostro team di ricerca uno studio interventistico presso il Comitato Etico dell'Ospedale Policlinico Umberto I. La domanda, ad oggi in via di valutazione, prevede l'uso dell'OCA in combinazione con Gemcitabina e Cisplatino nella terapia dei pazienti con CCA sottoposti a chemioterapia nel rispetto delle attuali linee guida.

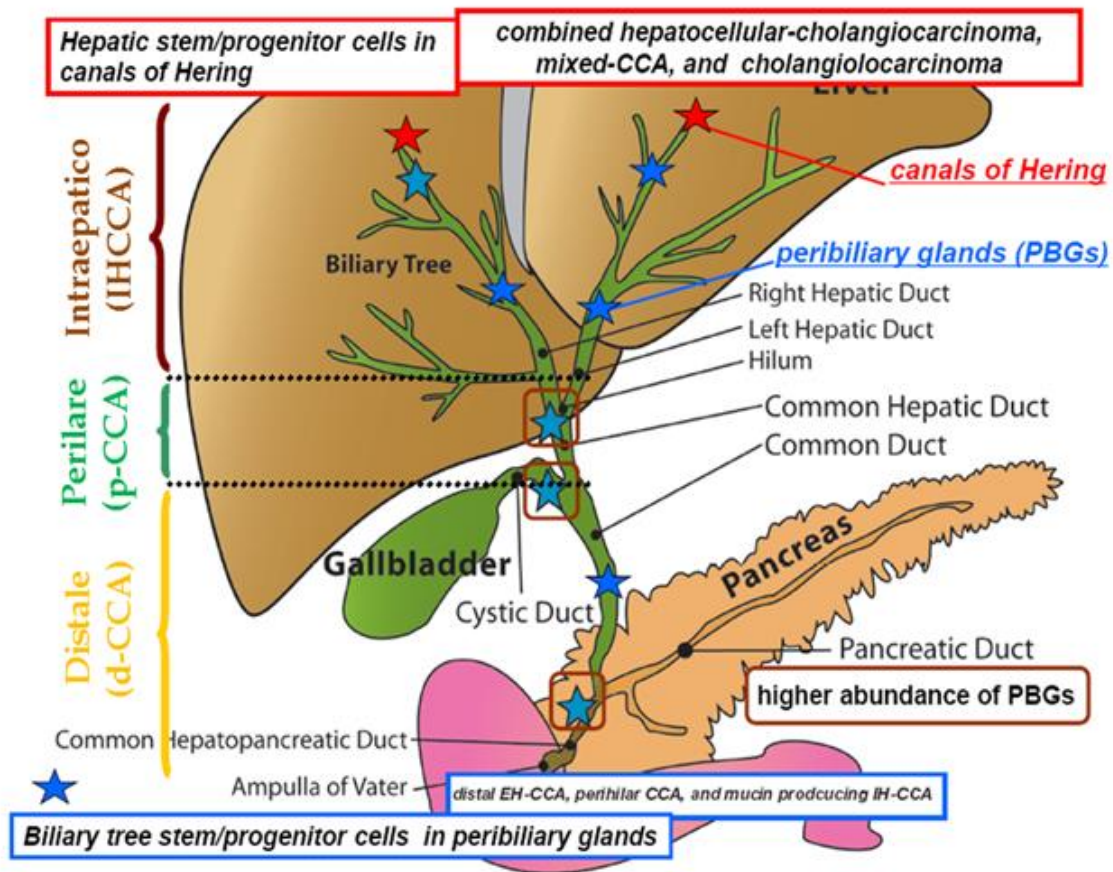
## FIGURE



**Figura 1. Classificazione del CCA basata sulle caratteristiche istologiche.**

La classificazione proposta da Komuta et al. nel 2012 identifica due tipi di CCA, Mucinoso e Misto. Il tipo Mucinoso comprende il CCA extraepatico e quello intraepatico dei grandi dotti ed istologicamente si caratterizza per la presenza di cellule secementi mucina; il tipo Misto comprende il CCA intraepatico dei piccoli dotti ed istologicamente si caratterizza per la presenza di aree con secrezione mucipara, aree con differenziazione epatocitaria e aree con reazione duttulare.

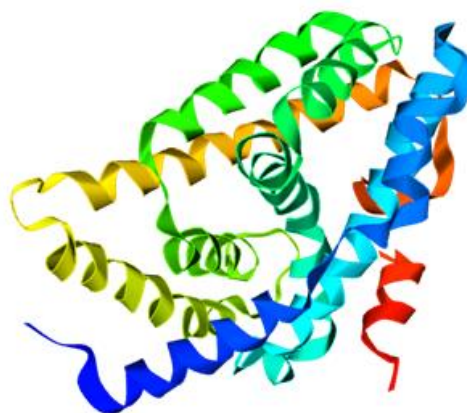
Da Komuta et al. *Hepatology*. 2012 <sup>[11]</sup>.



**Figura 2. Nicchie di cellule staminali epatiche.**

Le nicchie di cellule staminali epatiche sono localizzate nei canali di Hering (stelle rosse) e nelle ghiandole peribiliari (stelle blu). Nei canali di Hering si trovano le Human Hepatic Progenitor Stem Cells (hHpSC), precursori di epatociti e colangiociti; le ghiandole peribiliari (PBGs) sono abbondanti nei punti di biforcazione (dotto cistico, regione perilare e regione periampollare) e contengono le Human Biliar Tree Stem Cells (hBTSCs), precursori di epatociti, colangiociti e cellule delle isole pancreatiche.

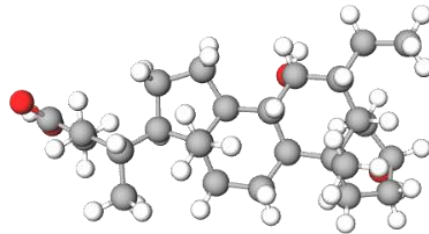
Modificata da *Cardinale et al. Hepatobiliary Surg Nutr.* 2013 <sup>[6]</sup>.



**Figura 3. Recettore Nucleare Farnesoide X(FXR).**

Cristallografia a raggi X ed elaborazione grafica del recettore FXR umano.

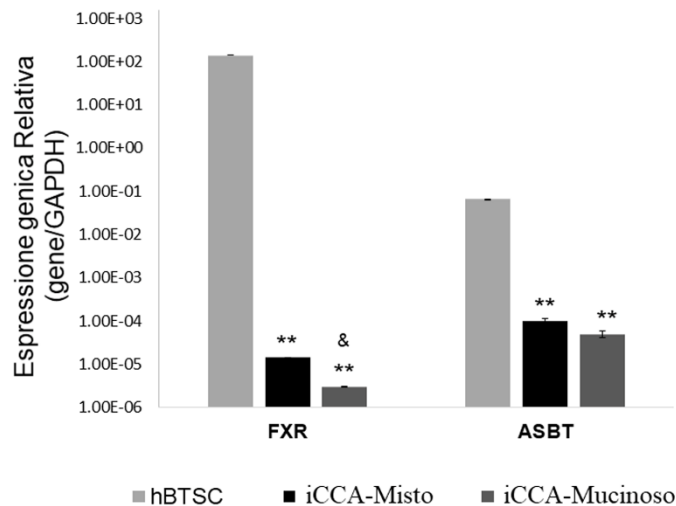
Da [www.molview.org](http://www.molview.org)



**Figura 4. Acido Obeticolico (OCA).**

Struttura molecolare dell'acido 6- $\alpha$ -etnil-chenodeossicolico (OCA)

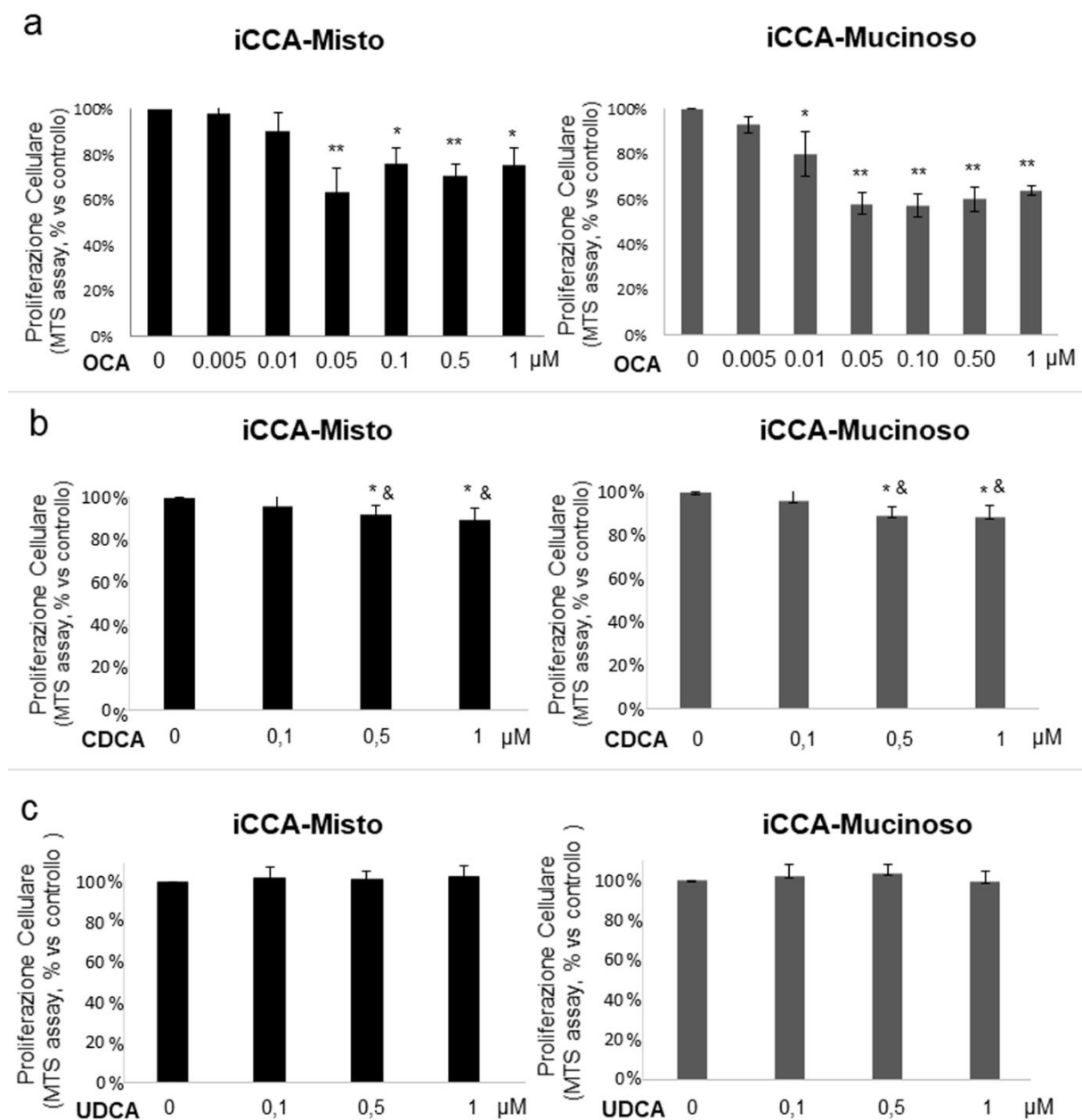
Da [www.molview.org](http://www.molview.org)



**Figura 5. Livelli di espressione genica di FXR e ASBT in colture di cellule primarie iCCA-Misto e Mucinoso.**

L'espressione del recettore FXR in colture di cellule primarie iCCA-Misto e Mucinoso era stata valutata mediante RT-qPCR, utilizzando GAPDH come gene di riferimento. Le cellule staminali dell'albero biliare umano (hBTSCs) sono state utilizzate come cellule non neoplastiche di controllo, data l'elevata presenza dei marcatori di cellule staminali tumorali nelle cellule di CCA. L'istogramma mostra che l'espressione di FXR era risultata marcatamente più bassa (down regolato) nelle cellule di iCCA-Misto e Mucinoso rispetto alle hBTSCs. Il trasportatore degli acidi biliari ASBT era risultato espresso in modo simile nelle cellule iCCA-Misto e Mucinoso, ma a un livello molto più basso rispetto alle hBTSC.

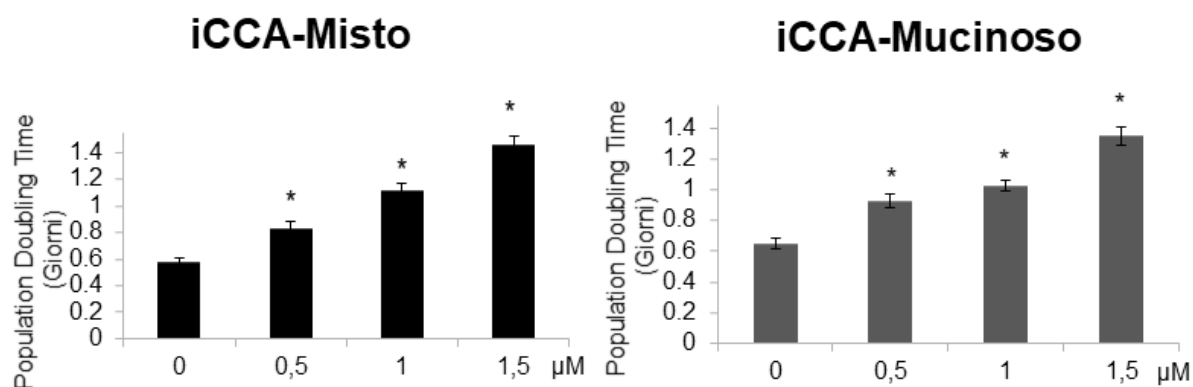
I dati rappresentano la media  $\pm$  DS di N = 5 esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0,01$  vs hBTSCs, &  $p < 0,05$  vs celle iCCA misti.



**Figura 6. Effetto di OCA, CDCA e UDCA sulla proliferazione di colture cellulari primarie umane di iCCA-Misto e Mucinoso.**

La proliferazione cellulare era stata valutata mediante saggio MTS ed espressa come valore percentuale rispetto ai controlli (= 100%). Nell'iCCA-Misto, dopo 72 ore di incubazione, l'effetto inibitorio dell'OCA sulla proliferazione cellulare era iniziato ad essere significativo con una concentrazione di 0,05 μM. Nell'iCCA-Mucinoso, gli effetti inibitori dell'OCA sulla proliferazione cellulare hanno iniziato ad essere significativi a 0,01 μM. Dopo un trattamento di 72 ore, CDCA aveva alterato la proliferazione delle colture cellulari primarie dell'iCCA sia Misto che Mucinoso solo a concentrazioni superiori a 0,5 μM e in modo quantitativamente inferiore rispetto all'OCA. L'UDCA non era riuscito a influenzare la proliferazione cellulare in colture primarie di iCCA sia Misto che Mucinoso dopo 72 ore di trattamento.

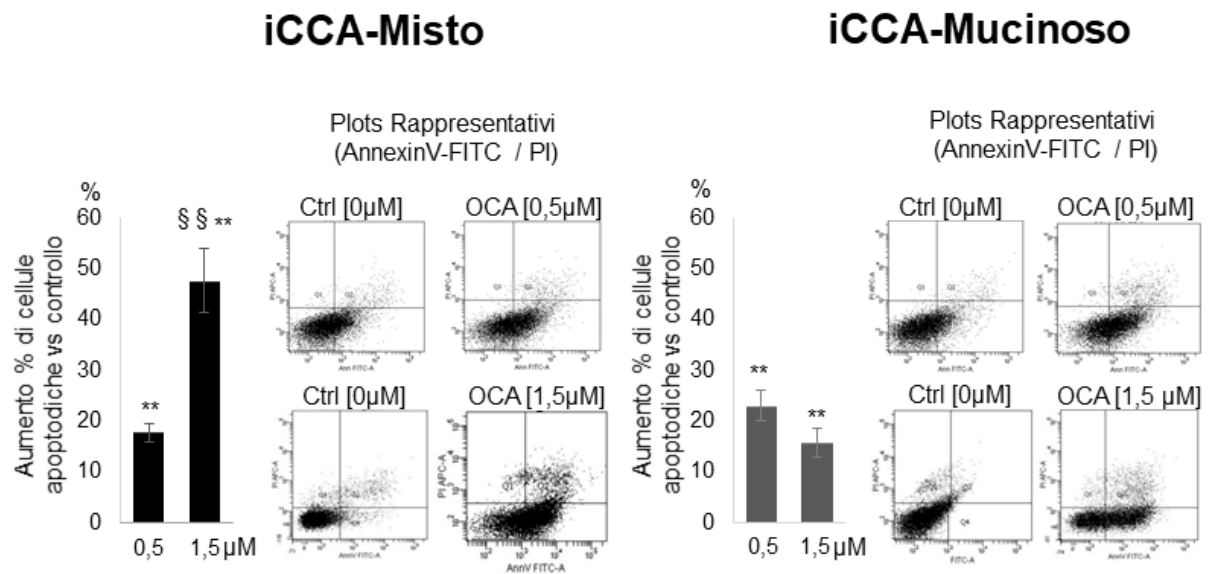
I dati rappresentano la media ± DS di N = 5 esperimenti indipendenti. \* p< 0,05 vs controlli (0 μM), \*\* p< 0,01 vs controlli; & p< 0,05 contro la stessa concentrazione di OCA.



**Figura 7. Il trattamento con OCA allungava il tempo di duplicazione cellulare delle cellule di iCCA.**

Il tempo di duplicazione delle linee primarie di iCCA-Misto e Mucinoso era stato valutato tramite la formula del Population Doubling Time dopo 72 ore di trattamento a concentrazioni crescenti di OCA 0,5, 1 e 1,5 μM come riportato nell'istogramma. L'OCA allungava il tempo di duplicazione cellulare in modo direttamente proporzionale alla concentrazione.

I dati rappresentano la media ± DS di N = 5 esperimenti indipendenti. \* p < 0.05 vs controlli (0 μM);

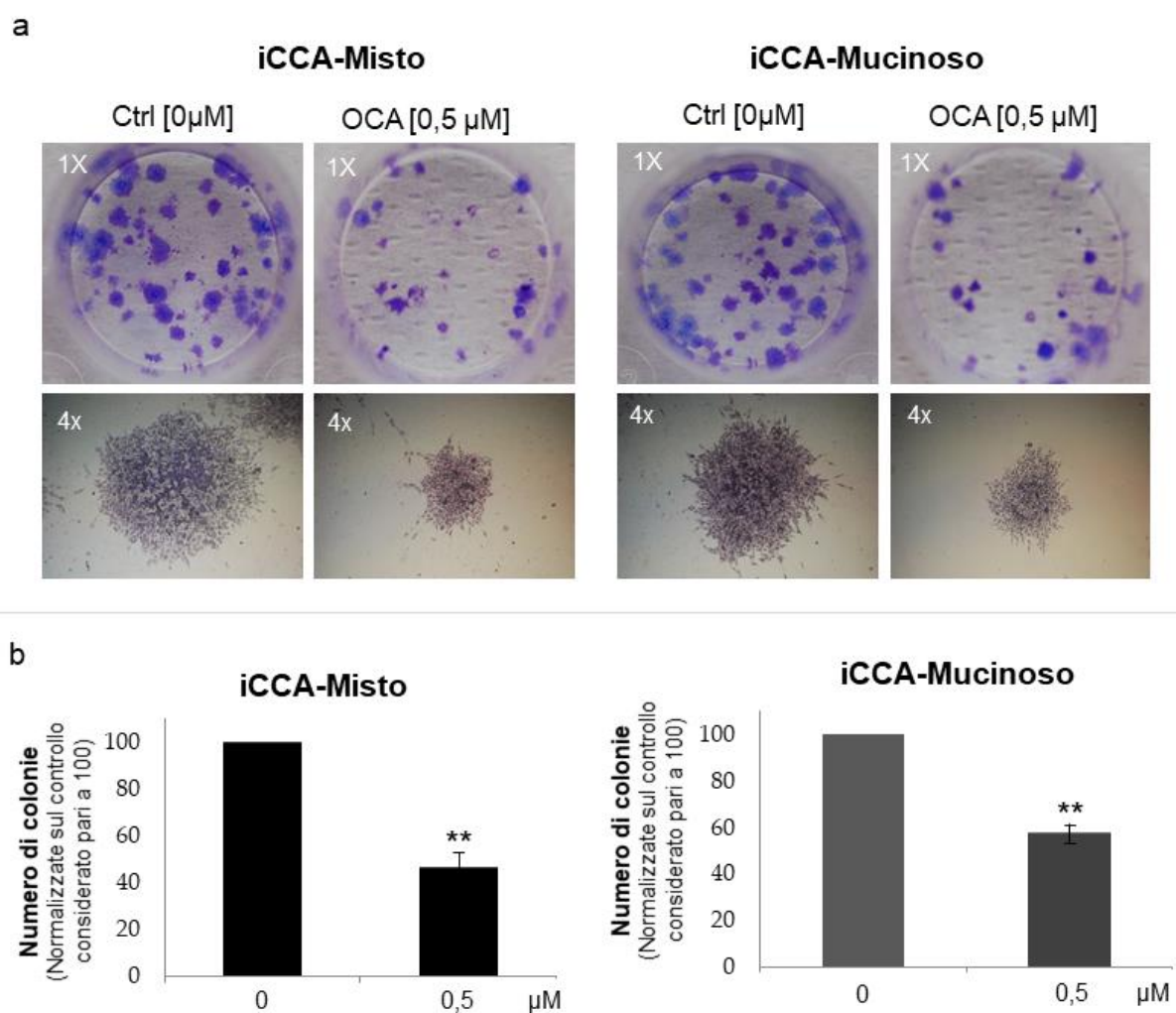


**Figura 8. L'OCA aumentava l'apoptosi delle cellule di iCCA-Misto e Mucinoso.**

L'apoptosi delle cellule derivanti da colture primarie di iCCA-Misto e Mucinoso era stata analizzata mediante il dosaggio di Annexin V/ PI dopo incubazione per 72 ore con OCA a 0,5 o 1,5  $\mu\text{M}$ . I risultati sono stati espressi come aumento percentuale delle cellule apoptotiche normalizzate rispetto ai controlli non trattati (0 $\mu\text{M}$  di OCA). L'OCA aumenta l'apoptosi in entrambi i sottotipi tumorali di iCCA-Misto e Mucinoso. Tuttavia, l'effetto apoptotico dell'OCA sulle cellule di iCCA-Misto è più evidente a 1,5  $\mu\text{M}$  rispetto a 0,5  $\mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ), mentre non si osservano differenze significative nelle cellule di iCCA-Mucinoso tra le due concentrazioni.

I dati riportati nei grafici a barre rappresentano la media  $\pm$  DS di N = 5 esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0,01$  vs controlli, §§  $p < 0,01$  vs 0,5  $\mu\text{M}$ . A destra di ogni grafico sono riportati i Plot Annexin V/ PI rappresentativi di ogni condizione sperimentale.





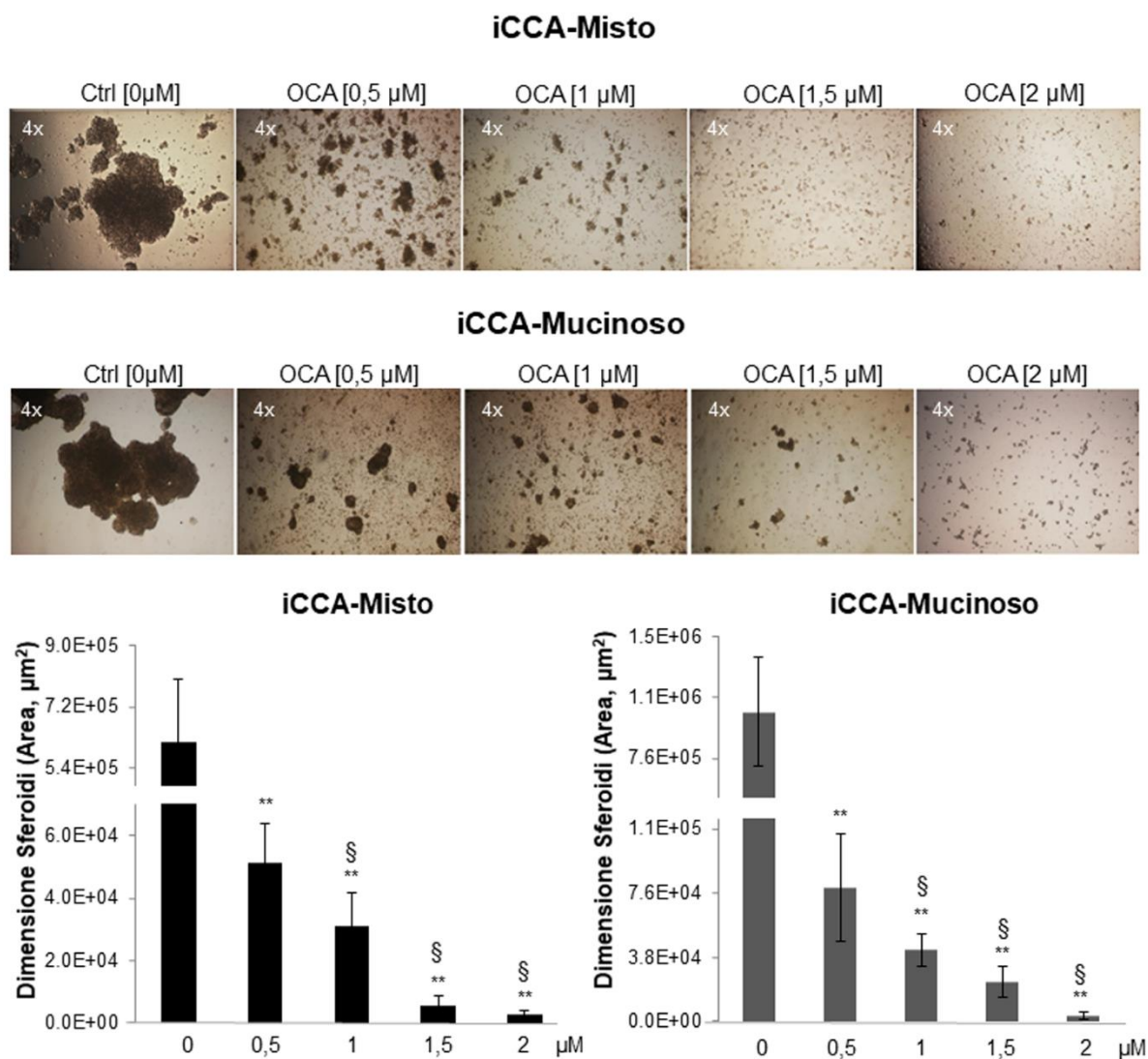
**Figura 9. L'OCA inibiva la capacità di formazione delle colonie delle cellule iCCA.**

Dopo 10 giorni di coltura con o senza OCA 0,5  $\mu$ M le colonie di iCCA-Misto e Mucinoso erano state colorate con Cristal Violet e contate (Una colonia era stata considerata tale solo se formata da un cluster di almeno 50 cellule).

- a) Le fotografie, ad ingrandimento 1x, mostrano pozzetti rappresentativi di ogni gruppo sperimentale in cui le colonie di iCCA-Misto e Mucinoso appaiono come punti viola. Si può osservare che il numero di colonie diminuiva in presenza di 0,5  $\mu$ M di OCA. Le fotografie, ad ingrandimento 4x, mostrano le colonie rappresentative di ogni condizione sperimentale formate da cellule di iCCA-Misto e Mucinoso, con un evidente riduzione della dimensione della colonia indotta dal trattamento con 0,5  $\mu$ M di OCA.
- b) Il numero di colonie era stato normalizzato sul controllo (0  $\mu$ M di OCA) considerato pari a 100. Il numero delle colonie formate, al termine dei 10 giorni di trattamento, risultava significativamente diminuito dopo trattamento con 0,5  $\mu$ M di OCA in entrambi i sottotipi di iCCA-Misto e Mucinoso.

I dati riportati nei grafici a barre rappresentano la media  $\pm$  DS di N = 5 esperimenti indipendenti.

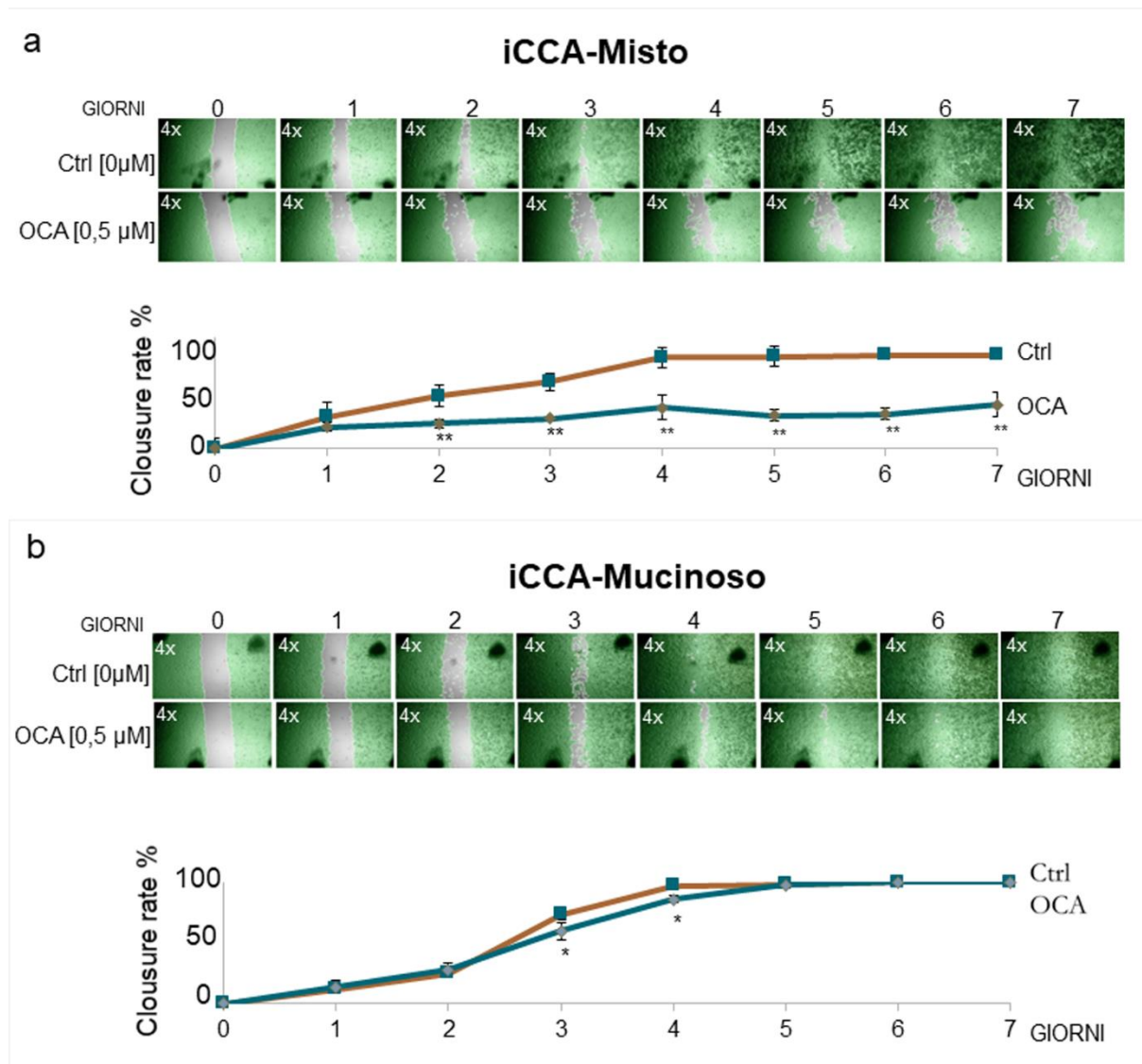
\*\* =  $p < 0,01$  vs controlli.



**Figura 10. Il trattamento con OCA inibiva la formazione degli sferoidi (tumorsfere) delle cellule di iCCA.**

La capacità delle linee primarie di iCCA di formare sferoidi in condizioni di non adesione è stata valutata confrontando le cellule trattate o non trattate con OCA a concentrazioni crescenti come indicato. Il trattamento di 10 giorni con OCA comprometteva la capacità delle cellule di formare sferoidi sia nel sottotipo di iCCA-Misto che Mucinoso e questo effetto risultava essere dose e tempo dipendente. Alla più alta concentrazione di OCA, 2  $\mu$ M, la formazione degli sferoidi era stata quasi completamente compromessa in entrambi i sottotipi tumorali. Il grafico mostra la riduzione dell'area ( $\mu$ m<sup>2</sup>) degli sferoidi misurata rispetto al controllo (OCA 0  $\mu$ M) a concentrazioni crescenti di farmaco sia per il sottotipo Misto che Mucinoso. Le foto al microscopio ottico, ad ingrandimento 4x, sono rappresentative di ogni condizione sperimentale e mostrano il cambiamento della dimensione degli sferoidi all'aumentare della concentrazione di OCA al termine dei 10 giorni di trattamento.

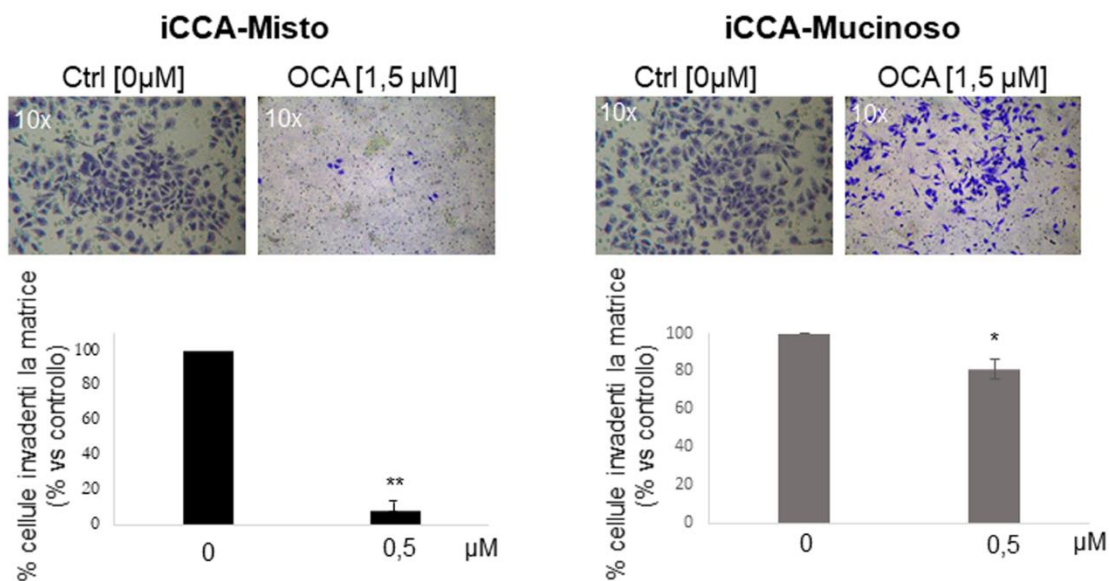
I dati riportati nei grafici a barre rappresentano la media  $\pm$  DS di N = 15 esperimenti indipendenti. \*\* p < 0,01 vs controlli. § p < 0.05 vs concentrazione più bassa precedente.



**Figura 11. OCA impedisce la migrazione delle cellule di cellule iCCA-Misto.**

Per effettuare il Test di Wound Healing era stato creato un graffio nel monolayer di cellule di iCCA a confluenza di diametro circa 400 µm ( $t_0$ ); successivamente la migrazione delle cellule era stata monitorata a intervalli di 24 ore per 7 giorni. La migrazione cellulare era stata valutata calcolando la percentuale di area coperta (Closure rate %) nei diversi tempi ( $t_i$ ) e normalizzata rispetto all'area  $t_0$ . Le fotografie, ad ingrandimento 4x, sono rappresentative di N = 6 esperimenti indipendenti per ogni condizione sperimentale in cui le celle sono evidenziate in verde e l'area cell-free in grigio.

- a) Le cellule di controllo del iCCA-Misto avevano completato la chiusura dello strappo da noi creato in media verso il 4°. Al contrario, nelle cellule trattate con OCA (0,5 µM), i graffi erano rimasti praticamente non coperti fino a 7 giorni, ad indicare che la migrazione delle cellule di iCCA-Misto era stata quasi completamente compromessa dall'OCA. I dati riportati nei grafici a linee rappresentano media  $\pm$  DS di N = 6 esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0,01$  vs controlli.
- b) Nelle cellule di iCCA-Mucinoso, al contrario, l'OCA non aveva mostrato alcun effetto significativo sulla migrazione cellulare; un leggero effetto inibitorio era stato osservato tra il 3° e il 4° giorno. I dati riportati nei grafici a linee rappresentano media  $\pm$  DS di N = 6 esperimenti indipendenti. \*  $p < 0,05$  vs controlli.

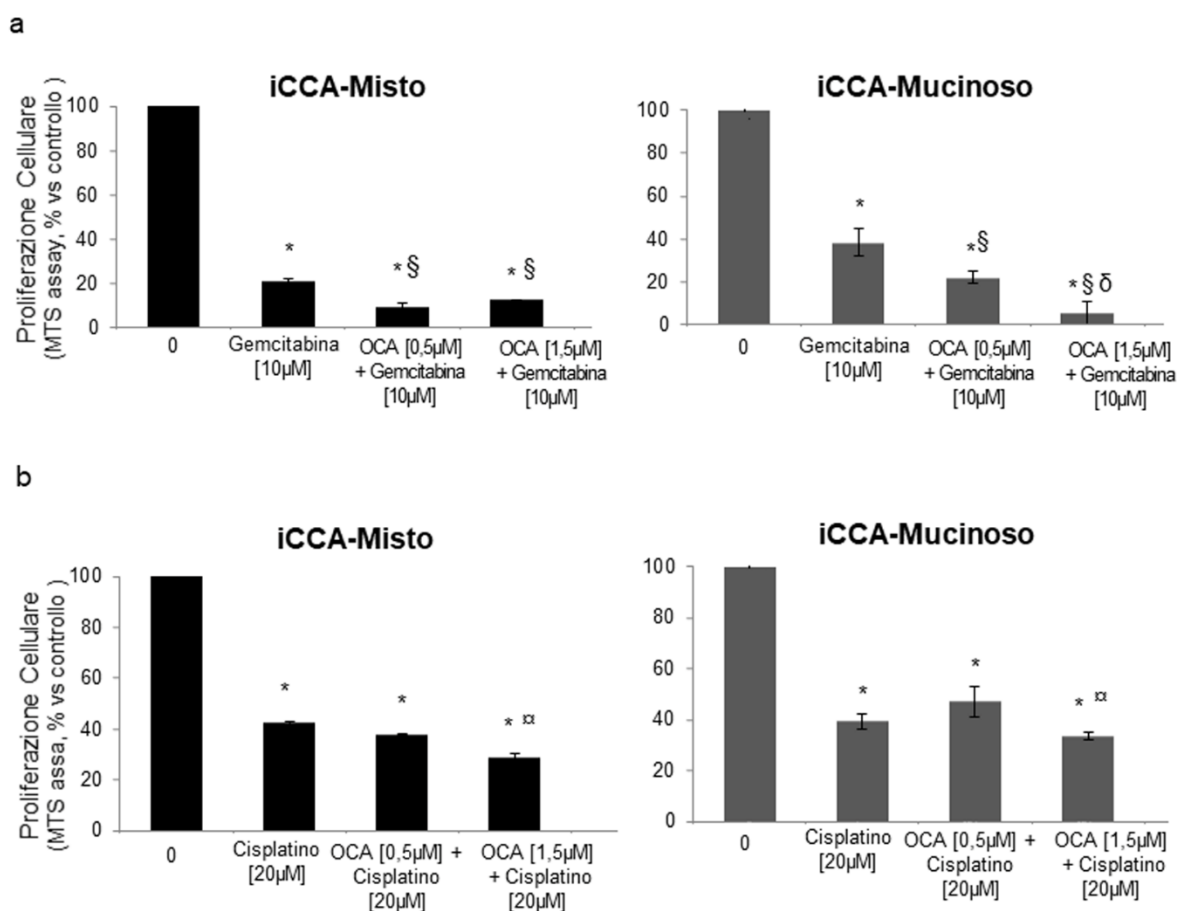


**Figura 12. OCA riduceva la capacità invasiva delle cellule di iCCA.**

La capacità delle cellule tumorali di migrare attraverso la matrice extracellulare sintetica era stata valutata tramite il saggio di invasione cellulare in Matrigel®. Dopo 96 ore di coltura, le cellule migrate attraverso Matrigel erano state fissate con Cristal Violet e il loro numero era stato riportato come percentuale rispetto ai controlli considerati pari a 100 (vedi grafico a barre). Il trattamento con OCA 0,5 µM per 96 ore aveva ridotto notevolmente la capacità di invadere il Matrigel® da parte dell'iCCA-Misto ed in misura minore la capacità di invasione da parte dell'iCCA-Mucinoso.

Le fotografie ad ingrandimento 10x sono rappresentative di N = 6 esperimenti indipendenti. I dati riportati negli istogrammi rappresentano media ± DS di N = 6 esperimenti indipendenti.

\*\* p < 0,01 rispetto ai controlli, \* p < 0,05 rispetto ai controlli.

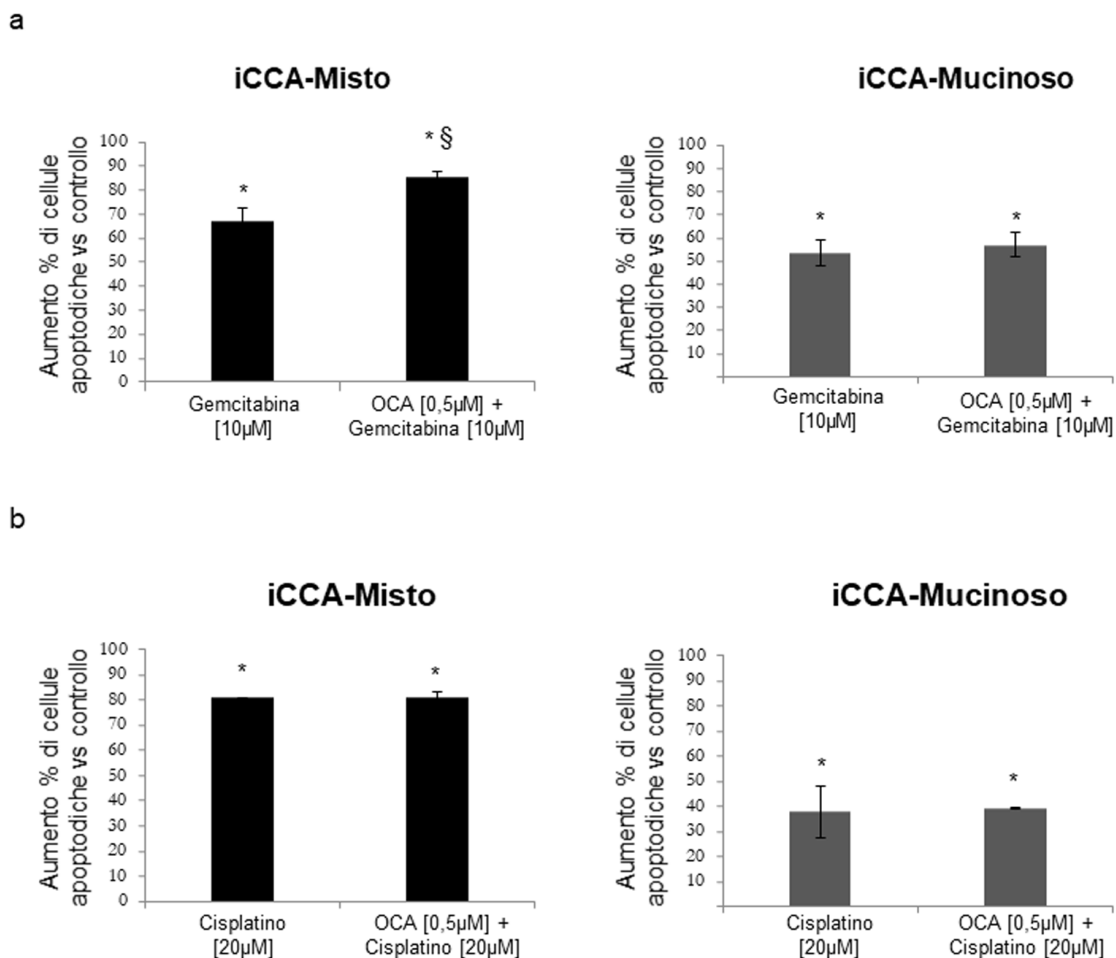


**Figura 13. L'OCA potenziava gli effetti inibitori di Gemcitabina o Cisplatino sulla proliferazione delle cellule iCCA.**

La proliferazione cellulare era stata valutata mediante saggio MTS, dopo 72 ore di trattamento con 0,5 μM di OCA, ± 10 μM Gemcitabina o ± 20 μM Cisplatino ed era stata espressa come percentuale di proliferazione cellulare di ogni campione normalizzata sul controllo (= 100).

- a) Nell'iCCA-Misto e Mucinoso, l'OCA aveva potenziato l'effetto inibitorio della Gemcitabina sulla proliferazione cellulare. Nelle cellule di iCCA-Misto non era stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa tra basse concentrazioni di OCA (0,5 μM) e alte (1,5 μM). Nell'iCCA-Mucinoso, al contrario, 1,5 μM di OCA era statisticamente più efficace nel potenziare gli effetti anti-proliferativi della Gemcitabina rispetto allo 0,5 μM ( $p < 0,05$ ).
- b) L'effetto inibitorio del Cisplatino sulla proliferazione delle cellule iCCA sia Misto che Mucinoso era stato potenziato dall'OCA, ma solo alla più alta concentrazione testata (1,5 μM).

I dati riportati negli istogrammi rappresentano media ± DS di N = 12 esperimenti indipendenti. \*  $p < 0,05$  vs. controlli (0 μM di OCA), §  $p < 0,05$  vs Gemcitabina, δ  $p < 0,05$  vs 0,5μM OCA + Gemcitabina, Ⓜ  $p < 0,05$  vs Cisplatin.

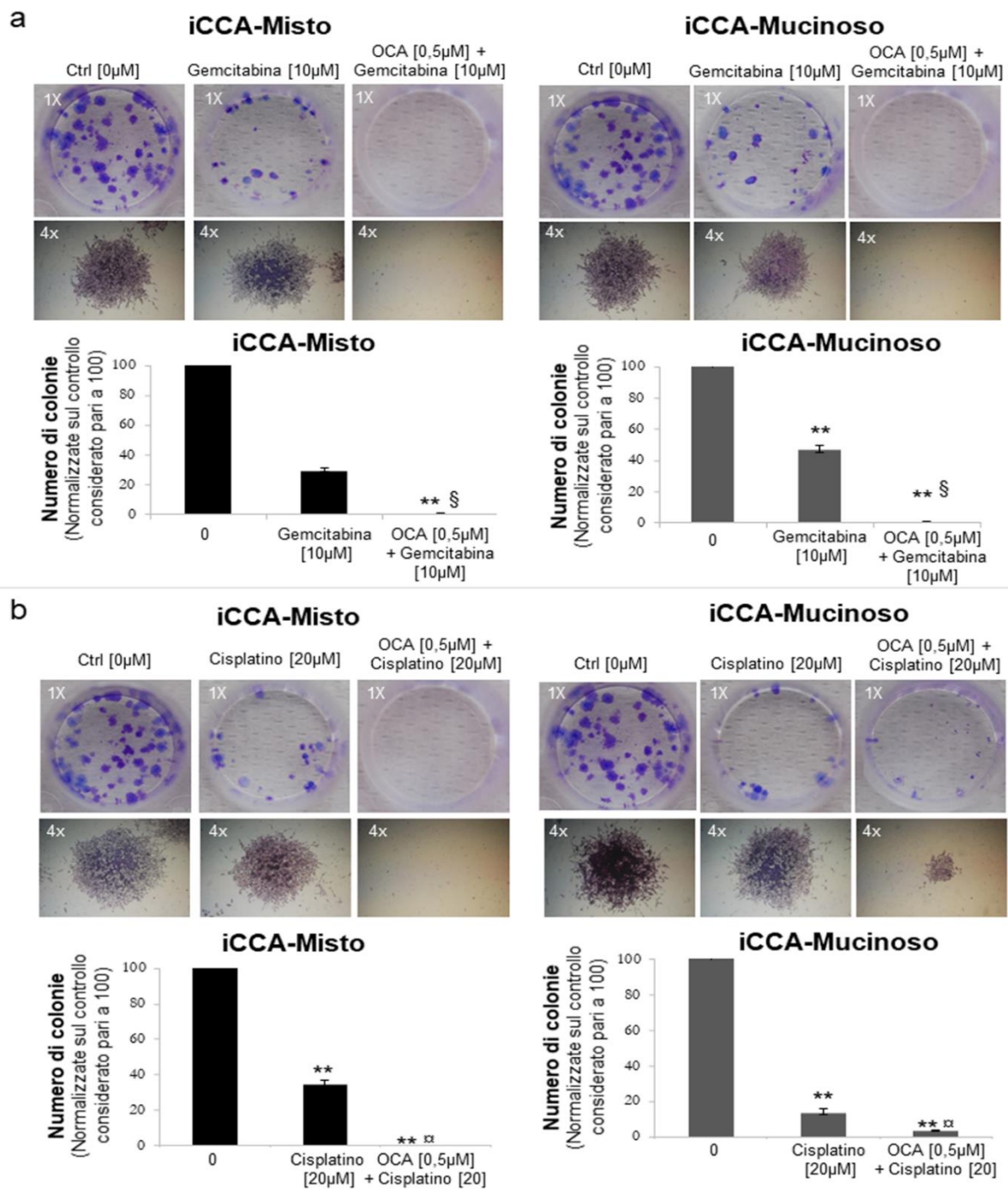


**Figura 14. La combinazione farmacologica di OCA potenziava l'effetto pro-apoptodico dell'antitumorale Gemcitabina.**

L'effetto sull'apoptosi della combinazione farmacologica 0,5 µM di OCA, ± 10 µM Gemcitabina o ± 20 µM Cisplatino era stata valutata mediante saggio AnnessinaV/PI, dopo 72 ore di trattamento sulle linee primari di iCCA-Misto e Mucinoso. I risultati sono stati riportati nei grafici a barre come aumento % dell'apoptosi in rapporto alle cellule non trattate (controlli).

- a) Sulle cellule derivanti da linee primarie di iCCA-Misto, l'OCA aveva potenziato l'effetto apoptotico della Gemcitabina mentre non era stato rilevato alcun effetto sinergico dei due farmaci sulle cellule derivanti da linee primarie di iCCA-Mucinoso.
- b) L'OCA non era riuscito ad aumentare l'effetto apoptodico dato dal Cisplatino su entrambi i sottotipi di linee primarie di iCCA.

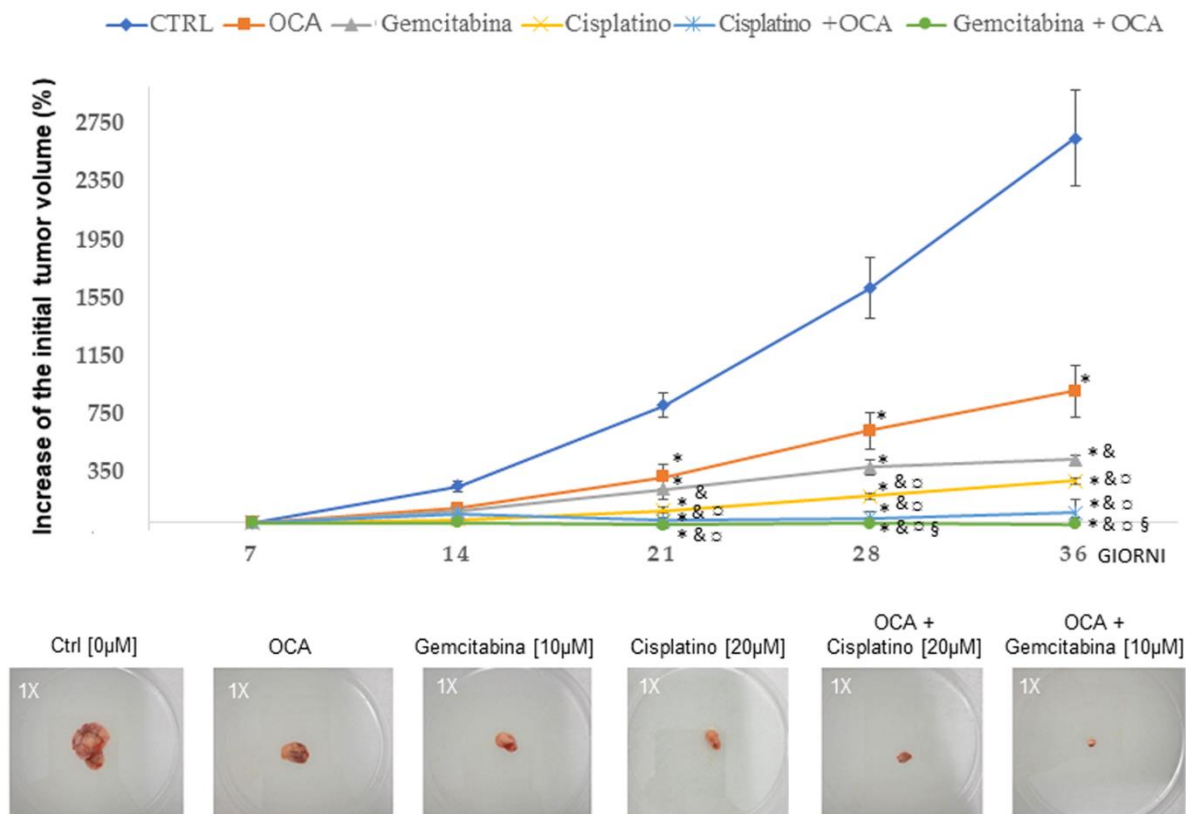
I dati riportati negli istogrammi rappresentano la media ± DS di N = 12 esperimenti indipendenti. \* p < 0.05 vs controlli (0µM di OCA), § p < 0.05 vs Gemcitabina.



**Figura 15. L'OCA combinata con Gemcitabina o Cisplatino annullava totalmente la capacità di formazione delle colonie delle cellule iCCA.**

- a) La combinazione di OCA 0,5 µM + Gemcitabina 10 µM, dopo 10 giorni di trattamento, ha abolito totalmente la capacità di formazione delle colonie da parte dell'iCCA-Misto e Mucinoso. La dimensione media delle colonie di cellule iCCA-Misto e Mucinoso era rimasta invariata dal trattamento con Gemcitabina da sola come si può notare dalle fotografie esemplificative ad ingrandimento 4x.
- b) La combinazione di OCA 0,5 µM + Cisplatino 20 µM + OCA 0,5 µM ha completamente abolito la capacità di formazione delle colonie da parte delle cellule di iCCA-Misto, mentre nelle cellule di iCCA-Mucinoso la formazione di colonie era notevolmente ridotta rispetto al solo Cisplatino. La dimensione media delle colonie di cellule di iCCA-Misto e Mucinoso era rimasta invariata dal trattamento con Gemcitabina da sola come si può notare dalle fotografie esemplificative ad ingrandimento 4x.

I dati rappresentano la media ± DS di N = 5 esperimenti indipendenti. \*\* p < 0,01 vs controlli (0µM di OCA), § p < 0,05 vs Gemcitabina, ¶ p < 0,05 vs Cisplatino.



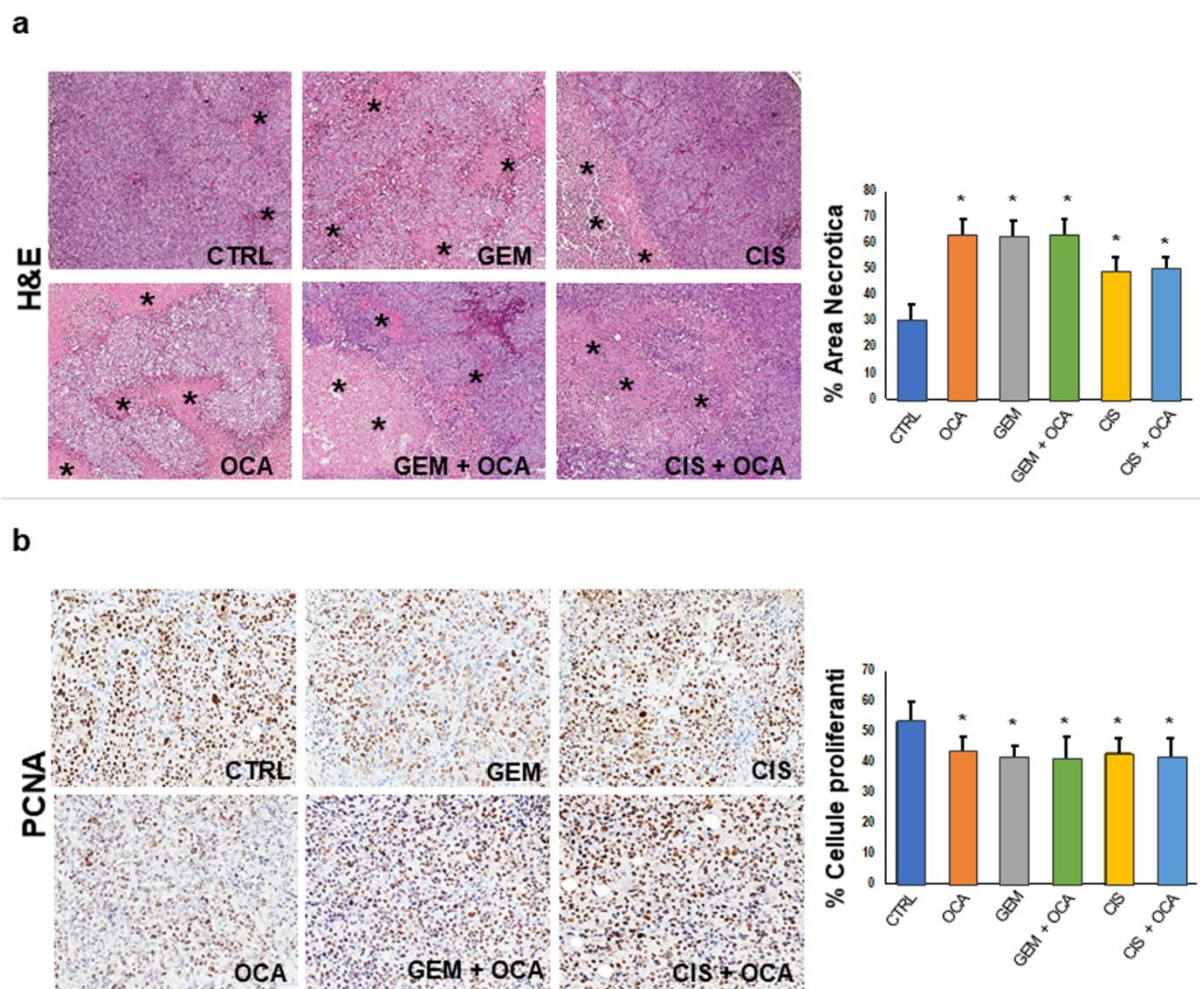
**Figura 16. OCA da solo diminuiva marcatamente, e combinato con Gemcitabina o Cisplatino annullava totalmente, la crescita degli xenotrapianti di iCCA-Misto.**

$10^6$  cellule di iCCA-Misto provenienti da colture primarie umane sono state iniettate in  $100 \mu\text{l}$  di Matrigel per via sottocutanea in topi maschi BALB/c nude maschi. La formazione degli xenotrapianti di tumore era stata seguita nel tempo tramite ispezione macroscopica. Dopo 4 settimane, quando la dimensione del tumore era di circa  $100 \text{ mm}^3$  ( $t_0$ ) i topi sono stati trattati con OCA (0,03% p / p, 30 mg / kg) da soli o in combinazione con cisplatino (2,4 mg / Kg in  $100 \mu\text{l}$ ) o Gemcitabina (1,05 mg / Kg in  $100 \mu\text{l}$ ) per 5 settimane aggiuntive. I gruppi di controllo sono stati il trattamento con la sola Gemcitabina, con il solo Cisplatino o la sola dieta chow. I risultati sono espressi come percentuale delle variazioni di volume al momento  $t$  ( $V_t$ ) in rapporto con il volume basale all'istante  $t_0$  ( $V_0 = \text{approx. } 100 \text{ mm}^3$ ) e riportati nel grafico a linee. Il grafico mostra come la co-somministrazione di Gemcitabina + OCA o Cisplatino + OCA aveva mantenuto il volume del tumore statisticamente più basso rispetto agli altri gruppi di trattamento ( $p < 0,05$ ).

I dati riportati nel grafico a linee rappresentano media  $\pm$  ES di  $N = 5$  per ciascun gruppo. \*  $p < 0.05$  vs controlli ( $0 \mu\text{M}$  di OCA), &  $p < 0.05$  vs OCA,  $^{\text{a}}$   $p < 0.05$  vs Cisplatin,  $^{\text{s}}$   $p < 0.05$  vs Gemcitabina.

Le fotografie ad ingrandimento 1x sono rappresentative dei tumori ( $N = 5$  esperimenti indipendenti) formati al termine delle 5 settimane di trattamento.





**Figura 17. Analisi istomorfológica e immunoistochimica dei tessuti tumorali degli xenotrapianti di iCCA-Misto dopo 5 settimane di trattamento con OCA, Gemcitabina, Cisplatino e le combinazioni indicate.**

- a) Colorazione ematossilina ed eosina (H&E) sui campioni tumorali prelevati dai topi formati al termine delle 5 settimane di trattamento secondo i gruppi sperimentali indicati (OCA,  $\pm$  Gemcitabina o Cisplatino). I campioni tumorali dei topi trattati mostravano aree necrotiche significativamente piú grandi (asterischi) rispetto ai topi di controllo. Gli istogrammi rappresentano medie  $\pm$  deviazioni standard. \*  $p < 0,01$  vs controllo. Le fotografie sono rappresentative di  $N = 5$  esperimenti indipendenti
- b) Analisi di immunoistochimica per l'antigene nucleare Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) sui campioni tumorali dei topi trattati con OCA,  $\pm$  Gemcitabina o Cisplatino. I campioni tumorali dei topi trattati erano caratterizzati da una percentuale significativamente inferiore di cellule PCNA<sup>+</sup> e quindi di cellule proliferanti, rispetto ai topi di controllo. Gli istogrammi rappresentano medie  $\pm$  deviazioni standard. \*  $p < 0.05$  vs controllo. Le fotografie sono rappresentative di  $N = 5$  esperimenti indipendenti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bridgewater, J., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma*. J Hepatol, 2014. **60**(6): p. 1268-89.
2. Gatto, M. and D. Alvaro, *New insights on cholangiocarcinoma*. World J Gastrointest Oncol, 2010. **2**(3): p. 136-45.
3. Bragazzi, M.C., et al., *New insights into cholangiocarcinoma: multiple stems and related cell lineages of origin*. Ann Gastroenterol, 2018. **31**(1): p. 42-55.
4. Alvaro D, C.V., *Neoplasie delle vie biliari*. In *Manuale di Gastroenterologia*. Unigastro Ed, 2013-2015: p. 119-125.
5. Banales, J.M., et al., *Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA)*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016. **13**(5): p. 261-80.
6. Cardinale, V., et al., *Cholangiocarcinoma: increasing burden of classifications*. Hepatobiliary Surg Nutr, 2013. **2**(5): p. 272-80.
7. Sobin L H, G.M.K., Wittekind C., *TNM classification of malignant tumours* Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2010., 2009. **7th ed. 2009**.
8. Deoliveira, M.L., et al., *New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma*. Hepatology, 2011. **53**(4): p. 1363-71.
9. Suarez-Munoz, M.A., et al., *Risk factors and classifications of hilar cholangiocarcinoma*. World J Gastrointest Oncol, 2013. **5**(7): p. 132-8.
10. Nakanuma, Y., et al., *Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept*. World J Hepatol, 2010. **2**(12): p. 419-27.
11. Komuta, M., et al., *Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1876-88.
12. Cardinale, V., et al., *Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity*. World J Gastrointest Oncol, 2012. **4**(5): p. 94-102.
13. Tyson, G.L. and H.B. El-Serag, *Risk factors for cholangiocarcinoma*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 173-84.
14. Blechacz, B., et al., *Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(9): p. 512-22.
15. Tao, L.Y., et al., *Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a case-control study in China*. Liver Int, 2010. **30**(2): p. 215-21.
16. Welzel, T.M., et al., *Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(10): p. 1221-8.
17. Kaewpitoon, S.J., et al., *Development of a Health Education Modification Program Regarding Liver Flukes and Cholangiocarcinoma in High Risk Areas of Nakhon Ratchasima Province Using Self-Efficacy and Motivation Theory*. Asian Pac J Cancer Prev, 2016. **17**(6): p. 2947-51.
18. Li, J., et al., *Diabetes mellitus and the risk of cholangiocarcinoma: an updated meta-analysis*. Prz Gastroenterol, 2015. **10**(2): p. 108-17.
19. Rizvi, S. and G.J. Gores, *Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma*. Dig Dis, 2014. **32**(5): p. 564-9.
20. Schmitz, K.J., et al., *Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for overall survival in intrahepatic cholangiocarcinoma*. Virchows Arch, 2007. **450**(2): p. 135-41.
21. Marusyk, A. and K. Polyak, *Tumor heterogeneity: causes and consequences*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(1): p. 105-17.
22. Cardinale, V., et al., *Profiles of cancer stem cell subpopulations in cholangiocarcinomas*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1724-39.
23. Carpino, G., et al., *Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder*. J Hepatol, 2014. **60**(6): p. 1194-202.
24. Carpino G, C.V., Reid L, Alvaro D, Gaudio E., *Cells of origin and cancer stem cells in cholangiocarcinoma*. Transl Gastrointest Cancer, 2012. **1**: p. 33-43.

25. Alvaro Domenico, B.A., Bragazzi MariaConsiglia, Capocaccia Riccardo, Crocetti Emanuele, Fabris Luca, Fava Gianmarco; Ferretti Stefano, Floreani AnnaRosa, Grazi Gianluca, Invernizzi Pietro, Laghi Andrea, Mancino MariaGrazia, Marzioni Marco, Mutignani Massimiliano, Paolantonio Pasquale, Sonzogni Aurelio, Strazzabosco Mario, Stroffolini Tommaso., *IL COLANGIOCARCINOMA*. A.I.S.F. ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LO STUDIO DEL FEGATO, 2009. A cura della Commissione "Colangiocarcinoma" dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (A.I.S.F.).
26. Razumilava, N. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma*. *Lancet*, 2014. **383**(9935): p. 2168-79.
27. Shi, X.D., et al., *Dickkopf-1 expression is associated with tumorigenity and lymphatic metastasis in human hilar cholangiocarcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(43): p. 70378-70387.
28. Niazi, A. and M.W. Saif, *Colon Mass as a Secondary Metastasis from Cholangiocarcinoma: A Diagnostic and Therapeutic Dilemma*. *Cureus*, 2016. **8**(7): p. e707.
29. Fraveto, A., et al., *Sensitivity of Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Subtypes to Chemotherapeutics and Molecular Targeted Agents: A Study on Primary Cell Cultures*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0142124.
30. Yamashita, Y., et al., *[Gemcitabine in Combination with Cisplatin in Patients with Unresectable Advanced or Recurrent Biliary Tract Cancer--A Multicenter Prospective Observational Study in Fukuoka]*. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2015. **42**(10): p. 1185-9.
31. Benavides, M., et al., *Biliary tract cancers: SEOM clinical guidelines*. *Clin Transl Oncol*, 2015. **17**(12): p. 982-7.
32. Pharmaceuticals, E.L.a.C., *GEMZAR® Package Revised: 09/2017*. 2017.
33. Malka D, T.T., Fartoux L, Mendiboure J, de la Fouchardiere C, Viret F D, Assenat E, Boucher E, Rosmorduc O, Greten T, *A multicenter, randomized phase II trial of gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) alone or in combination with biweekly cetuximab in the first-line treatment of advanced biliary cancer: interim analysis of the BINGO trial*. *J Clin Oncol*, 2009.
34. Wang, H., et al., *Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR*. *Mol Cell*, 1999. **3**(5): p. 543-53.
35. Erice, O., et al., *Differential effects of FXR or TGR5 activation in cholangiocarcinoma progression*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. **1864**(4 Pt B): p. 1335-1344.
36. Forman, B.M., et al., *Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 687-93.
37. Dai, J., et al., *Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR*. *J Hematol Oncol*, 2011. **4**: p. 41.
38. Wang, W., et al., *FXR agonists enhance the sensitivity of biliary tract cancer cells to cisplatin via SHP dependent inhibition of Bcl-xL expression*. *Oncotarget*, 2016. **7**(23): p. 34617-29.
39. Wang, Y., et al., *The Prognostic Role of SOCS3 and A20 in Human Cholangiocarcinoma*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0141165.
40. Peng, X., et al., *Activation of farnesoid X receptor induces RECK expression in mouse liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **443**(1): p. 211-6.
41. Deuschle, U., et al., *FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e43044.
42. Jiang, X.C., W. Jin, and M.M. Hussain, *The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism*. *Nutr Metab (Lond)*, 2012. **9**(1): p. 75.
43. Liu, X., et al., *Farnesoid X receptor associates with beta-catenin and inhibits its activity in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(6): p. 4226-38.
44. Koh, J.S., et al., *Inhibition of STAT3 in gastric cancer: role of pantoprazole as SHP-1 inducer*. *Cell Biosci*, 2018. **8**: p. 50.
45. Attia, Y.M., et al., *The FXR Agonist, Obeticholic Acid, Suppresses HCC Proliferation & Metastasis: Role of IL-6/STAT3 Signalling Pathway*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 12502.
46. Song, G. and L. Wang, *Nuclear receptor SHP activates miR-206 expression via a cascade dual inhibitory mechanism*. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e6880.
47. Obama, K., et al., *Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic*

- cholangiocarcinoma*. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1339-48.
48. Su, H., et al., *Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. **303**(11): p. G1245-53.
  49. Lax, S., et al., *Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(10): p. 2232-9.
  50. Zhu, H., et al., *miR-17-92 cluster promotes cholangiocarcinoma growth: evidence for PTEN as downstream target and IL-6/Stat3 as upstream activator*. *Am J Pathol*, 2014. **184**(10): p. 2828-39.
  51. Pellicciari, R., et al., *6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity*. *J Med Chem*, 2002. **45**(17): p. 3569-72.
  52. Xia, X., et al., *Degradation of the apical sodium-dependent bile acid transporter by the ubiquitin-proteasome pathway in cholangiocytes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(43): p. 44931-7.
  53. Edwards, J.E., et al., *Modeling and Experimental Studies of Obeticholic Acid Exposure and the Impact of Cirrhosis Stage*. *Clin Transl Sci*, 2016. **9**(6): p. 328-336.
  54. Zhang, Y., et al., *Comparative potency of obeticholic acid and natural bile acids on FXR in hepatic and intestinal in vitro cell models*. *Pharmacol Res Perspect*, 2017. **5**(6).
  55. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2015. **385**(9972): p. 956-65.
  56. Verbeke, L., et al., *Obeticholic acid, a farnesoid X receptor agonist, improves portal hypertension by two distinct pathways in cirrhotic rats*. *Hepatology*, 2014. **59**(6): p. 2286-98.
  57. Walters, J.R., et al., *The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015. **41**(1): p. 54-64.
  58. Zhang, J.H., et al., *Potent stimulation of fibroblast growth factor 19 expression in the human ileum by bile acids*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. **304**(10): p. G940-8.
  59. Nevi, L., et al., *Cryopreservation protocol for human biliary tree stem/progenitors, hepatic and pancreatic precursors*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 6080.
  60. Nevi, L., et al., *Hyaluronan coating improves liver engraftment of transplanted human biliary tree stem/progenitor cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2017. **8**(1): p. 68.
  61. Pisciotta, A., et al., *Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50542.
  62. Lee, C.H., et al., *Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs*. *Oncotarget*, 2016. **7**(2): p. 1215-26.
  63. Cha, T.L., et al., *Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2287-95.
  64. Lustri, A.M., et al., *TGF-beta signaling is an effective target to impair survival and induce apoptosis of human cholangiocarcinoma cells: A study on human primary cell cultures*. *PLoS One*, 2017. **12**(9): p. e0183932.
  65. Valle, J., et al., *Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(14): p. 1273-81.
  66. Schaap, F.G., M. Trauner, and P.L. Jansen, *Bile acid receptors as targets for drug development*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(1): p. 55-67.
  67. Claudel, T., B. Staels, and F. Kuipers, *The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2020-30.
  68. Yang, F., et al., *Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor*. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 863-7.
  69. Degirolamo, C., et al., *Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice by intestinal-specific farnesoid X receptor reactivation*. *Hepatology*, 2015. **61**(1): p. 161-70.
  70. Giordano, C., et al., *Farnesoid X receptor inhibits tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cell*

- growth through downregulation of HER2 expression*. *Oncogene*, 2011. **30**(39): p. 4129-40.
71. Lee, F.Y., et al., *FXR, a multipurpose nuclear receptor*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(10): p. 572-80.
  72. Maran, R.R., et al., *Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **328**(2): p. 469-77.
  73. Gadaleta, R.M., O. Garcia-Irigoyen, and A. Moschetta, *Bile acids and colon cancer: Is FXR the solution of the conundrum?* *Mol Aspects Med*, 2017. **56**: p. 66-74.
  74. Roda, A., et al., *Semisynthetic bile acid FXR and TGR5 agonists: physicochemical properties, pharmacokinetics, and metabolism in the rat*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014. **350**(1): p. 56-68.
  75. Roda, A., et al., *Metabolic Profile of Obeticholic Acid and Endogenous Bile Acids in Rats with Decompensated Liver Cirrhosis*. *Clin Transl Sci*, 2017. **10**(4): p. 292-301.
  76. Aishima, S. and Y. Oda, *Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type*. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2015. **22**(2): p. 94-100.
  77. Liao, J.Y., et al., *Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features*. *Mod Pathol*, 2014. **27**(8): p. 1163-73.
  78. Bernstein, C., et al., *Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid*. *Arch Toxicol*, 2011. **85**(8): p. 863-71.
  79. Thompson, M.D., et al., *beta-Catenin regulation of farnesoid X receptor signaling and bile acid metabolism during murine cholestasis*. *Hepatology*, 2018. **67**(3): p. 955-971.
  80. Lv, B., et al., *FXR Acts as a Metastasis Suppressor in Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Inhibiting IL-6-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **48**(1): p. 158-172.
  81. Khan, S.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update*. *Gut*, 2012. **61**(12): p. 1657-69.
  82. Pinter, M., et al., *Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management*. *ESMO Open*, 2016. **1**(2): p. e000042.
  83. Ramadori, G. and S. Cameron, *Effects of systemic chemotherapy on the liver*. *Ann Hepatol*, 2010. **9**(2): p. 133-43.
  84. Goldstein, J. and C. Levy, *Novel and emerging therapies for cholestatic liver diseases*. *Liver Int*, 2018. **38**(9): p. 1520-1535.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il Prof. Domenico Alvaro per avermi dato la possibilità di crescere come persona e come scienziato dandomi la possibilità di costruire con i miei colleghi un gruppo di lavoro affiatato e preparato.

Ringrazio Vincenzo per la sua costante presenza e tutti coloro con i quali ho collaborato in questi anni e che hanno partecipato allo studio.

Un pensiero speciale va ad i miei colleghi Lorenzo e Daniele che con me hanno condiviso e convissuto tutta questa avventura standomi vicino nella gioia e nel dolore, in salute e in malattia finchè tripsina non ci separi. Un grazie speciale va anche a Samira con la quale, negli ultimi anni, ho condiviso molte esperienze integrandosi perfettamente nel nostro gruppo.

Un ringraziamento speciale va anche a tutti gli studenti con cui ho lavorato che mi hanno insegnato molto e a cui spero di aver lasciato qualcosa di più che nozioni di biologia molecolare e cellulare.

Infine, un ringraziamento va anche a tutta la mia famiglia e al mio ragazzo che come sempre mi appoggiano in ogni scelta e fase della vita.