



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorziata: Ospedale Ca' Foncello, Treviso

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche "PG Cevese"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOLOGIA E MEDICINA DELLA
RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

CICLO: XX

TITOLO TESI

PATOGENESI MOLECOLARE DELLE MALATTIE DISEMBRIOGENETICHE DELL'EPITELIO BILIARE

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

Supervisore: Ch.mo Prof. Lajos Okolicsanyi

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche, Università di Padova

Ch.mo Prof. Mario Strazzabosco

Dept. Of Internal Medicine, Yale University

Dottorando: Massimiliano Cadamuro

DATA CONSEGNA TESI

31 gennaio 2008

RIASSUNTO

Con questa tesi mi sono proposto di studiare una serie di colangiopatie malformative causate da uno specifico difetto genetico e caratterizzate da diverse forme di lesioni biliari e di analizzare quali fattori molecolari potessero avere un ruolo nella patogenesi di tali malattie al fine di individuare un possibile link molecolare col difetto genetico; infine ho voluto valutare se questi fattori potessero influenzare la progressione clinica delle diverse colangiopatie. La tesi è stata articolata in tre studi successivi i cui titoli sono:

- **Studio 1.** Effetti sulla malattia policistica del rene autosomica dominante (ADPKD) dell'iperpressione di fattori angiogenetici in colangiociti umani e murini.
- **Studio 2.** Espressione dei fattori di crescita angiogenetici da parte delle cellule epiteliali modula l'arteriogenesi durante l'ontogenesi epatica.
- **Studio 3.** Analisi dei meccanismi di rigenerazione epatica nella sindrome di Alagille e nell'atresia delle vie biliari rivela un ruolo per il signaling del Notch.

In studio 1 ho dimostrato come un'aberrante espressione di fattori angiogenetici (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ang-1 Ang-2 e Tie-2) da parte delle strutture epiteliali epatiche dell'ADPKD sia responsabile non solo della crescita autocrina delle cisti biliari, ma anche del richiamo, per via paracrina del plesso peribiliare che circonda le cisti biliari stesse.

Nello studio 2 ho dimostrato come, nell'ontogenesi fetale umana, la secrezione di fattori angiogenetici da parte delle strutture biliari nascenti promuova lo sviluppo coordinato spazio-temporale di dotti biliari ed arterie epatiche.

Infine nello studio 3 ho dimostrato come nella sindrome di Alagille, perturbazioni del *signaling* mediato da Jagged1/Notch2 inducano un accumulo di cellule con fenotipo intermedio epato-biliare (IHBC) che non esita nella reazione duttare a differenza di quanto avviene nell'atresia biliare dove invece si realizza una pronunciata attivazione di cellule progenitrici e un'imponente reazione duttare. La presenza e l'estensione della reazione duttare è una delle cause che determinano la fibrosi portale nelle colangiopatie colestatiche e la maggior velocità di progressione della malattia nell'atresia biliare rispetto alla sindrome di Alagille.

Summary

The aim of this thesis was to investigate different malformative cholangiopathies due to specific genetic defects and characterised by different biliary lesions, and analyse the molecular factors involved in the pathogenesis of these cholangiopathies to characterise a molecular link between these molecular factors and the genetic defect; finally, I have evaluated if these factors could influence the clinical progression of these cholangiopathies. This thesis was divided in three studies:

- **Study # 1.** Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases
- **Study # 2.** Analysis of liver repair mechanisms in Alagille syndrome and biliary atresia reveals a role for notch signaling
- **Study # 3.** Epithelial expression of angiogenic growth factors modulate arterial vasculogenesis in human liver development.

In the study # 1 I have shown that an aberrant overexpression of angiogenic factors (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ang-1, Ang-2 e Tie-2) by the hepatic epithelial cells of the ADPKD is responsible for the autocrine overgrowth of the cystic epithelium and of the increased extension of the pericystic vascular plexus of the biliary cysts.

In the study # 2 I have showed that during the foetal liver ontogenesis, the expression of these angiogenic growth factors by biliary epithelial cells is responsible for the coordinated growth of bile ducts and hepatic arteries.

In the study # 3 I have demonstrated that lacking of the Jagged1/Notch2 signal pathway induce the accumulation of intermediate epato-biliary cells (IHBC) that cannot develop to reactive ductular cells, conversely to the biliary atresia, characterised by the activation of the progenitor cells compartement and by a huge ductular reaction. This ductular reaction is the pacemaker of the portal fibrosis in the cholestatic cholangiopathies and is responsible for the higher aggressivity of the biliary atresia respect to the Alagille's syndrome.

1. INTRODUZIONE

1.1. Cenni di Anatomia Epatica

Il fegato, la più grande ghiandola del corpo umano, si trova nella cavità addominale; macroscopicamente si presenta suddiviso in quattro lobi (destro, sinistro, caudato e quadrato) ed è completamente avvolto da una capsula di tessuto connettivo, detta capsula di Glisson. Microscopicamente esso si suddivide in lobuli epatici, formati da epatociti, separati tra loro da spazi portali all'interno dei quali decorrono, immersi nel tessuto connettivo, le diramazioni della vena porta, dell'arteria epatica e dell'albero biliare intraepatico (Fig. 1); le prime due strutture sono i sistemi vascolari deputati al sostentamento ed alla nutrizione del fegato, mentre l'albero biliare è la struttura epiteliale dedicata alla modificazione, al drenaggio ed all'eliminazione della bile. All'interno dei lobuli epatici decorrono i sinusoidi epatici, che, a partire dai vasi convergono verso la vena centrolobulare. A seconda del diametro dei dotti biliari, le strutture biliari possono essere suddivise in differenti distretti, con proprietà fisiologiche diverse e le diverse sezioni sono suddivise in: piccoli dotti (o colangioli terminali, diametro $< 15 \mu\text{m}$), dotti interlobulari ($15\text{-}100 \mu\text{m}$), dotti settali ($100\text{-}300 \mu\text{m}$), dotti areali ($300\text{-}400 \mu\text{m}$), dotti segmentali ($400\text{-}800 \mu\text{m}$) e dotti epatici ($> 800 \mu\text{m}$) (Ludwig, 1987; Roskams, 2004) (tab 1); le diverse branche dell'albero biliare intraepatico vanno a sfociare nei due dotti epatici (destro e sinistro) che a loro volta si fondono, a livello dell'ilo epatico, a formare il dotto epatico comune (albero biliare extraepatico). Altre strutture caratteristiche sono i canalicoli

biliari, formati dallo spazio che si crea tra due epatociti adiacenti e che si continuano nei piccoli dotti ed i dotti di Hering; questi ultimi sono strutture caratteristiche, descritti inizialmente da Hering alla fine

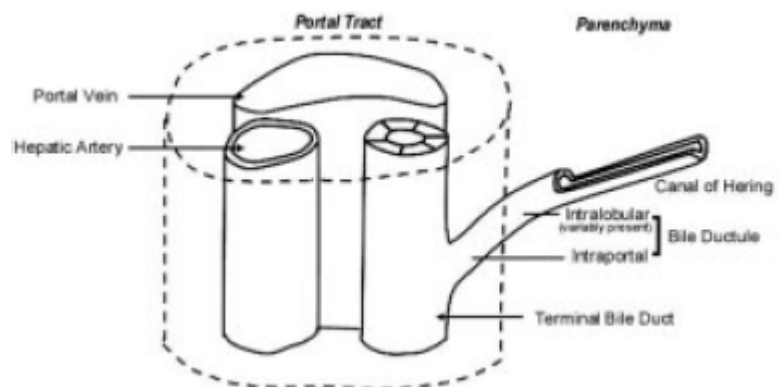


Fig. 1: Diagramma illustrante lo spazio portale normale; da Roskams, Hepatology 2004

dell'800, che si trovano all'interfaccia dello spazio portale e che drenano la bile dai canalicoli biliari al sistema dei dotti biliari veri e propri. Morfologicamente i dotti di Hering si presentano composti per metà da colangiociti e per metà da epatociti, ma la loro caratteristica principale è quella di essere considerati, in tempi recenti, come nicchie putative delle cellule progenitrici epatiche (Hepatic Progenitor Cells, HPC) (Roskams, 2004; Sell, 1994 e 2001). Le HPC sono cellule rinvenibili singolarmente od in piccoli ammassi, con grosso nucleo e scarso citoplasma che si trovano all'interfaccia dello spazio portale o all'interno del parenchima epatico e sono attivate in caso di insulto epatico sia lieve che massivo (Lowes, 1999; Sell, 2001; Eleazar, 2004; Clouston, 2005); queste cellule presentano un immunofenotipo particolare in quanto esprimono sia marcatori epatocitari che colangiocitari (Libbrecht, 2002a) e si presume possano essere cellule pluripotenti, o quanto meno bipotenti (Sell, 2001; Libbrecht, 2002a; Roskams, 2003a), in grado di generare diverse popolazioni cellulari epatiche implicate nella risposta rigenerativa epatica in caso di patologia.

1.2. Cenni di Ontogenesi Epatica

Ontogenesi umana La genesi dell'albero biliare epatico comincia dalle strutture di maggior calibro che si trovano presso l'ilo epatico, per poi continuare in senso centrifugo verso le zone periferiche del fegato. A partire dall'8° settimana gestazionale (GW, *gestational week*), mentre i dotti biliari extraepatici cominciano a svilupparsi come estroflessione della parte ventrale dell'intestino (Bezerra, 1998), i dotti biliari intraepatici si formano a partire dagli epatoblasti, cellule primordiali bipotenti del fegato embrionale. L'interazione tra epatoblasti e mesenchima portale, attraverso un segnale ad oggi sconosciuto, fa sì che a partire dall'ottava GW si formi una struttura monostratificata che circonda lo spazio portale e che è denominata lamina duttale (DP, *ductal plate*) (Terada, 1997). Tale struttura si caratterizza per l'espressione di diverse citocheratine (CK8, CK18, CK19) (Van Eyken, 1988) e per la sua espressione fugace di NCAM, una molecola d'adesione neurale che viene espressa tra la 12° e la 16° GW e di Bcl-2 (Fabris, 2000), una proteina con attività antiapoptotica. Successivamente, a partire dalla 12° GW, la lamina duttale comincia a duplicarsi ed

a formare, in punti discreti della periferia dello spazio portale, strutture tubulari con lume riconoscibile (Van Eyken, 1988; Terada, 1997); a partire dalla 19° settimana queste strutture cominceranno ad esprimere un altro marcatore caratteristico di lineage biliare, CK7 (Van Eyken, 1988; Terada, 1997) e questi segmenti tubulari cominceranno ad essere incorporati all'interno dello spazio portale, mentre i residui di lamina duttale non duplicata ed incorporata verranno riassorbiti per apoptosi (Terada, 1995).

I differenti compartimenti vascolari epatici riconoscono una diversa origine embrionale: i sinusoidi derivano dai capillari presenti nel setto trasverso, mentre vena porta ed arteria epatica, derivano rispettivamente dai vasi vitellini e da precursori mesenchimali contenuti nell'ilo epatico. Pertanto, mentre vena porta e sinusoidi originano attraverso la differenziazione di vasi preesistenti (**angiogenesi**), l'arteria epatica si forma attraverso un processo che avviene *de novo* (**vasculogenesi**).

Tra la 5° e la 10° GW inizia la differenziazione della vena porta e dei sinusoidi che decorrono all'interno del lobulo tra gli epatociti, mentre le vene centrolobulari cominciano ad essere riconoscibili a partire dalla 10° GW. L'arteria epatica comincia a formarsi a partire dalla 10° GW in area periilare ed a partire dalla 15° GW nelle zone periferiche del fegato, indicando come anche la neoangiogenesi si svolge in senso centrifugo. Il processo di vasculogenesi dei capillari ha inizio anch'esso a partire dalla 10° GW, e si completa nella differenziazione sinusoidale verso la 20° GW; dalla 25° GW, l'architettura vascolare epatica risulta sostanzialmente completa (Gouysse, 2002). Lo sviluppo dell'albero biliare umano si accompagna quello dell'arteria epatica e del plesso peribiliare che accompagna le strutture biliari (Kono, 1992; Terada, 1993). Questi due sistemi, che decorrono parallelamente all'interno dello spazio portale si sviluppano quasi simultaneamente ed in maniera coordinata (Crawford, 1998); malgrado sia noto che le cellule endoteliali ed epiteliali si scambiano diversi segnali per via paracrina, in special modo durante la morfogenesi degli organi (Kim, 2002) ed il rimodellamento tissutale (Tufro, 1999; Yankopoulos, 2000), non è però ancora noto quali siano.

Proteine che rivestono un ruolo fondamentale per la crescita del sistema vascolare e per la sua maturazione e differenziazione durante la vasculogenesi e l'angiogenesi embrionale (Tufro, 1999; Yankopoulos, 2000) sono i fattori di crescita angiogenetici; tra questi il vascular endothelial growth factor (VEGF), i suoi recettori (VEGFR-1 e VEGFR-2), le angiopoietine 1 (Ang-1) e 2 (ang-2) ed il loro recettore Tie-2 risultano di fondamentale importanza nello sviluppo, nella maturazione e nella stabilizzazione dei vasi.

VEGF, interagendo con i suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2, agisce sulla vascolatura promuovendone la differenziazione e la proliferazione (Holash, 1999), mentre Ang-1 e Ang-2 sono una famiglia di fattori di crescita vascolari che agiscono in concerto con VEGF e che promuovono specificatamente il rimodellamento, la maturazione e la stabilizzazione dei vasi (Holash, 1999); queste due angiopoietine si legano al loro recettore Tie-2 ma hanno funzioni opposte: Ang-1 infatti attiva Tie-2 tramite la fosforilazione di un residuo di tirosina, mentre Ang-2 antagonizza l'azione di Ang-1 competendo con essa per lo stesso sito di legame. L'attivazione di Tie-2 quindi dipende non tanto dalla presenza di una delle angiopoietine ma dalla loro concentrazione relativa (Maisonpierre, 1997). Malgrado fino a pochi anni fa si ritenesse che l'espressione e la funzione di questi fattori di crescita si esplicasse solo a livello di cellule endoteliali, recentemente è stato dimostrato che VEGF e VEGFR-1 siano espressi sia dagli epitelii di fegati cirrotici (van den Heuvel, 2006; Gouw, 2006) che dalle cellule epiteliali che compongono i glomeruli e i tubuli renali durante lo sviluppo renale nel ratto (Tufro, 1999; Kanellis, 2000) e che quindi possano essere implicare nel *cross-talk* tra epitelii ed endoteli.

Ontogenesi biliare murina Lo sviluppo del sistema biliare umano e murino risultano essere relativamente simili, e le maggiori differenze si riscontrano nel timing dello sviluppo dell'arteria epatica. L'ontogenesi biliare comincia a partire dal giorno embrionale (E) 13.5-14.5 con la comparsa della lamina duttale monostratificata che ad E15.5 circonda completamente lo spazio portale. A partire da E16.5 la lamina duttale comincia a duplicarsi e da E17.5 si formano delle strutture tubulari che daranno vita al dotto biliare vero e proprio (Shiojiri, 1997; Lemaigre, 2003)

(Fig.2); i dotti biliari maturi cominciano la loro incorporazione nel periodo perinatale (Lemaigre, 2003). Come precedentemente accennato lo sviluppo dell'arteria epatica risulta differente nella tempistica nel topo rispetto all'uomo, infatti, mentre in quest'ultimo entrambi i sistemi si sviluppano simultaneamente

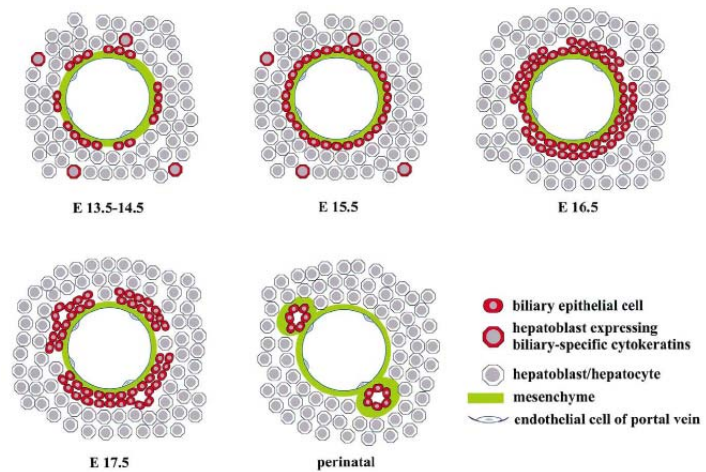


Fig. 2: principali fasi dello sviluppo dell'albero biliare nel topo; da Lemaigre FP, Mech Dev 2003

durante tutto il periodo fetale, nel topo invece, l'arteria epatica comincia il suo sviluppo solo nel periodo postnatale e solo dopo che i dotti biliari sono completamente incorporati nello spazio portale e circondati dal mesenchima (Clotman, 2003).

1.3. L'Albero Biliare Normale

Storicamente la funzione più nota del colangiocita è quella di elaborare e fluidificare la bile primaria secreta dagli epatociti, ma vi è una montante quantità di articoli scientifici che dimostrano come l'albero biliare non sia semplicemente un insieme di canali deputati al mero trasporto della bile ma che esso possa andare incontro a limitati cambiamenti fenotipici (plasticità), che sia implicato nella risposta infiammatoria e fibrotica al danno epatico (reattività) e che possa essere una nicchia di cellule progenitrici epatiche (Strazzabosco, 2008).

All'interno dell'albero biliare si può riconoscere una differente specializzazione funzionale e morfologica tra piccoli e grossi dotti; in particolare, le funzioni secretorie sono svolte dai colangiociti che compongono i dotti interlobulari, settali ed i dotti maggiori, mentre le funzioni di plasticità, reattività e di nicchia di cellule progenitrici sembrano essere appannaggio dei piccoli dotti (Strazzabosco, 2008) (fig 3).

Produzione ed elaborazione della bile La bile canalicolare primaria prodotta dagli epatociti, prima di essere riversata nell'intestino subisce una serie di modificazioni da parte dei colangiociti

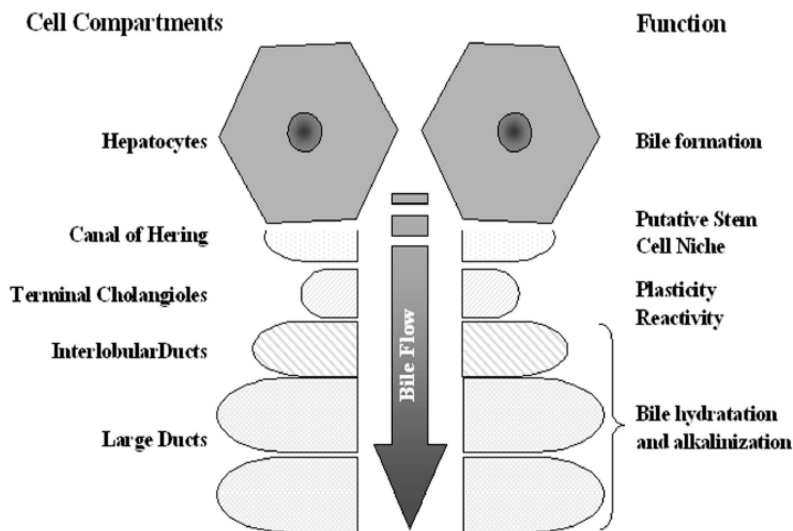


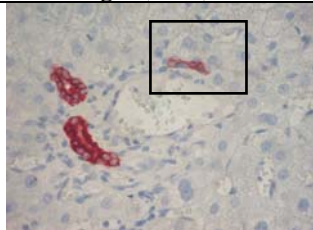
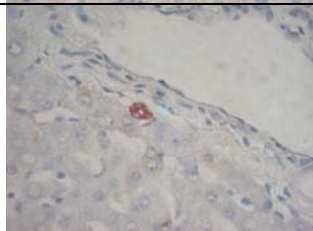
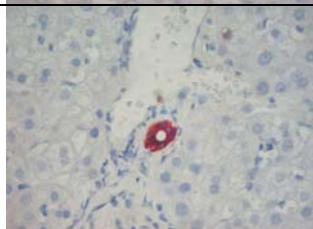

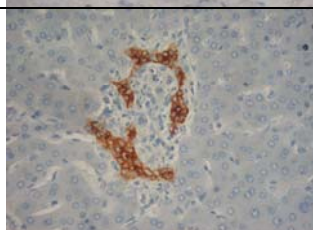
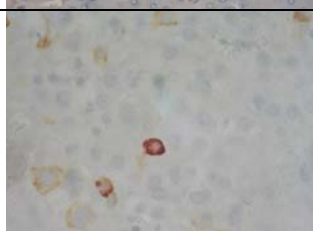
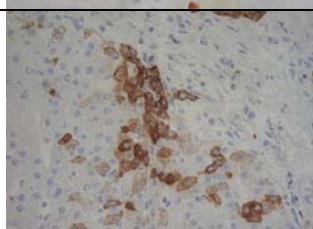
Fig. 3: l'albero biliare origina dal canale di Hering, non solo connette i canalicoli epatici con l'albero biliare vero e proprio, ma considerata la nicchia dove risiedono le cellule staminali epatiche; i diversi segmenti dell'albero biliare hanno funzioni fisiologiche diverse: i colangioli terminali ($\varnothing < 15\mu\text{m}$) hanno sono estremamente plastici e reattivi e fanno parte del meccanismo epatico di riparazione del danno, mentre i dotti maggiori $15 < \varnothing < 800\mu\text{m}$) sono deputati principalmente all'alcalinizzazione e fluidificazione della bile epatocitaria primaria. Da Strazzabosco M e Fabris L, Anat. Rec. 2008

che compongono l'albero biliare, atte a fluidificarla ed alcalinizzarla. L'ammontare del bicarbonato e l'idratazione della bile sono processi finemente regolati da una serie di segnali pro-secretori come secretina (Strazzabosco, 1997; Lenzen, 1997), glucagone (Lenzen, 1997), acetilcolina (Alvaro, 1997), bombesina (Cho, 1999a) e vasoactive intestinal peptide (VIP) (Cho, 1999b) ed anti-secretori come endotelina 1 (Caligiuri, 1998), insulina (LeSage, 2002), gastrina (Glaser, 2003) e somatostatina (Gong, 2003); questi peptidi, attraverso l'attivazione o l'inibizione di specifici trasportatori di membrana, fanno sì che si generi un gradiente osmotico atto a far fluire l'acqua all'interno del dotto biliare attraverso dei trasportatori specifici come le acquaporine 1 (AQP1) e 4 (AQP4) (Marinelli, 1999 e 2000). Oltre ad una funzione secretoria, i colangiociti hanno anche una funzione di riassorbimento di alcuni costituenti della bile come glucosio e glutatione e nella circolazione colo-epatica dei sali biliari.

Dotti biliari e sistema vascolare Le strutture biliari sono accompagnate da un ricco plesso vascolare peribiliare (PBP) che trae origine dalle arterie epatiche che decorrono all'interno dello spazio portale e che è demandato al nutrimento dei colangiociti che compongono l'albero biliare (Kono, 1992; Terada, 1993; Gaudio, 1996). Studi di Crawford et al. (Crawford, 1998), hanno dimostrato come vi sia un parallelismo preferenziale tra dotto biliare ed arteria epatica rispetto a quello tra dotto biliare e vena porta; egli ha infatti dimostrato come ben il 40% degli spazi portali risulti privo di PV, mentre quelli privi di HA o BD siano solo il 9% (Crawford, 1998). Questa

associazione è stata dimostrata anche durante lo sviluppo epatico fetale sia nell'uomo, dove i primi abbozzi di arteria epatica nascono in prossimità della lamina duttale nascente (Libbrecht, 2002b; Clotman, 2003), sia nel topo, nel quale l'arteria epatica si sviluppa dopo la nascita del cucciolo nei pressi delle strutture biliari mature ed incorporate nel parenchima (Clotman, 2003). Inoltre molte patologie malformative epatiche (i.e. le sindromi di Jeune e di Meckel) (Clotman 2003) presentano, accanto ad un'iperplasia delle strutture biliari, un concomitante aumentato numero di strutture arteriose. Diversi studi su modelli di danno epatico sperimentale hanno evidenziato come vi sia una stretta relazione tra lo sviluppo delle strutture biliari reattive e quello delle arterie epatiche: ratti trattati con ANIT (α -naftil-isotiacianato), un agente tossico che induce selettivamente un'intensa proliferazione colangiocitaria, presentano, accanto ad un aumento della massa biliare, anche un aumento delle strutture arteriose epatiche il cui numero però raggiunge il plateau con un ritardo di circa una settimana rispetto alle strutture biliari (Masyuk, 2003); inoltre, topi ingegnerizzati portanti l'inattivazione di *Hnf1 β* o *Hnf6* (Coffinier, 2002; Clotman, 2002), proteine fondamentali per lo sviluppo biliare, ma che non sono espressi dalle strutture vascolari, presentano anomalie o assenza di strutture biliari accompagnate dall'assenza dell'arteria epatica, ma non della vena porta.

Immunofenotipo I colangiociti formanti l'albero biliare normale hanno un immunofenotipo caratteristico, essi infatti esprimono, oltre a marcatori condivisi anche dagli epatociti, come le citocheratine (CK) 8 e CK18 (Libbrecht, 2002a; Roskams, 2003a), anche altri marcatori specifici di epitelio biliare quali CK7, CK19 (Libbrecht, 2002a; Roskams, 2003a), OV-6 (van den Heuvel, 2001), egp34 (noto anche come HEA-125 od EpCAM) (Momburg, 1987), epithelial membrane antigen (EMA) (Fabris, 2000), HNF1 β (Tanimizu, 2004) e HNF6 (Clotman, 2002; Tanimizu 2004).

	Nome	Definizione	Immunofenotipo	Morfologia (CK7)
Fegato normale	Canali di Hering	Canale delineato in parte da epatociti ed in parte da colangiociti che rappresenta il link anatomico tra i canalicoli epatici ed il sistema dei dotti biliari.	CK7, CK8, CK18, CK19, HEA-125, EMA, OV-6, HNF1 β , HNF6	
	Piccoli dotti	I più piccoli dotti biliari completamente formati da colangiociti. $\varnothing < 20 \mu\text{m}$	CK7, CK8, CK18, CK19, HEA-125, EMA, OV-6, HNF1 β , HNF6	
	Dotti interlobulari	Dotti delineati da epitelio cuboidale che originano dai piccoli dotti e che si congiungono ai dotti settali. $15 < \varnothing < 100\mu\text{m}$	CK7, CK8, CK18, CK19, HEA-125, EMA, OV-6, HNF1 β , HNF6	
	Grossi dotti (settali, areali, segmentali ed epatici)	Dotti delineati da epitelio colonnare. $100 < \varnothing < 800\mu\text{m}$	CK7, CK8, CK18, CK19, HEA-125, EMA, OV-6, HNF1 β , HNF6	
Fegato patologico	Cellule duttulari reattive (RDC)	Lesioni tipiche a differenti forme di patologia epatica cronica o acuta caratterizzato da strutture biliari dimorfiche e anastomizzate tra loro con lume poco definito od assente ed accompagnate da cellule infiammatorie, fibrosi e neovasi	Chrom-A, CK7, CK8; CK18, CK19, HEA-125, NCAM, OV-6, c-Kit	
	Cellule progenitrici epatiche (HPC)	Cellule singole od in piccoli clumps che si trovano all'interfaccia con lo spazio portale o nel parenchima epatico, caratterizzate da grossonucleo, scarso citoplasma e forma a fuso o tondeggianti	CK7, CK8; CK18, CK19, Chrom-A, HEA-125, NCAM, OV-6, Hepar-1, CD34, c-Kit	
	Cellule intermedie epatobiliari (IHBC)	Cellule con morfologia ed immunofenotipo intermedio tra epatociti e colangiociti che si trovano nel parenchima epatico e spesso in continuità con le RDC; formazione di tali cellule si suppone possa essere indotta da colestasi o da particolari deficit genetici	α -1-antitripsina, albumina, Chrom-A, CK7, CK8; CK18, Hea-125, Hepar-1, NCAM, OV-6	

Tab. 1: principali strutture epiteliali rintracciabili nel fegato normale e patologico; abbreviazioni: AFP: α -Fetoproteina, CEA: Carcinoembryonic Antigen, Chrom-A: Cromogranina-A, CK7: Citocheratina 7, CK8: Citocheratina 8, CK18: Citocheratina 18, CK19: Citocheratina 19, egp34: Epithelial Cell-surface Glycoprotein of 34kd, EMA: Epithelial Membrane Antigen, NCAM: Nuclear Cell Adhesion Molecule; \varnothing : diametro del lume.

1.4. Lesioni Biliari nella Patologia Epatica

Le colangiopatie, ossia le patologie che colpiscono prevalentemente l'epitelio biliare, presentano, oltre ad un diverso grado di fibrosi portale ed infiammazione, anche un reperto istopatologico comune, rappresentato da un accumulo di strutture biliari nella zona periportale chiamato *reazione duttulare* (Popper, 1990). Desmet, fu il primo che ipotizzò che questa lesione fosse responsabile o quantomeno il *pacemaker* della fibrosi e dell'infiammazione epatica (Desmet, 1998). La reazione duttulare è parte integrante di un fenomeno riparativo/rigenerativo epatico che comprende tre distinti tipi cellulari epiteliali, le Reactive Ductular Cells (RDC), le Intermediate Hepato-Biliary Cells (IHBC) e le Hepatic Progenitor Cells (HPC). Queste tre popolazioni possono essere riconosciute per le loro caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche; le HPC, in particolare, sono cellule che per le loro caratteristiche di staminalità possono proliferare differenziandosi sia verso un lineage biliare (RDC) che epatocitario (IHBC) (Sell, 2001; Roskams, 2004). In corso di patologia epatica umana i tre fenotipi possono essere rintracciabili nello stesso campione spesso in stretta contiguità tra loro (Fig. 4), e l'aumento di una popolazione rispetto all'altra dipende da condizioni specifiche, come il tipo di danno epatico, il grado di mitoinibizione, il grado di colestasi ed altro. Le **RDC** si presentano come duttuli dismorfici, anastomizzati tra loro e con lume poco definito od assente e l'immunofenotipo è caratterizzato dall'espressione di marcatori biliari come CK7, CK8, CK18, CK19 (Libbrecht, 2002a; Roskams, 2003a), HEA-125 (Fabris, 2000), OV6 (van den Heuvel, 2001), dalla neoespressione di marcatori neurali, come

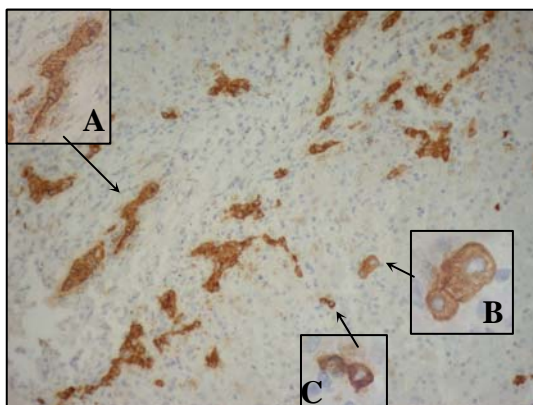


Fig. 4: colorazione immunohistochimica per CK7 di un campione di BA che mostra la concomitante presenza delle tre popolazioni di cellule epiteliali coinvolte nella risposta rigenerativa/riparativa al danno; ingrandimento 200x. Negli inserti sono evidenziati RDC (A, 400x), IHBC (B, 600x) e HPC (C, 600x)

Cromogranina-A (Chrom-A) (Roskams, 1990) e Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) (Roskams, 1990; Fabris, 2000; Libbrecht 2001), di marcatori di staminalità, come c-Kit (Baumann, 1999) e dalla downregolazione di EMA, un marcatore specifico di dotti maturi e differenziati (Momburg, 1987; Fabris, 2000) (tab 1). Le **IHBC** sono caratterizzate da un fenotipo intermedio tra quello dei colangiociti e degli epatociti; infatti esse si trovano all'interno del parenchima epatico e mantengono una forma poligonale che ricorda quella degli epatociti, ma presentano, oltre all'espressione di marcatori prettamente epatocitari come CK8, CK18, albumina, α 1-antitripsina ed Hepar-1 (Gerber, 1983), anche un'immunoreattività per marcatori biliari specifici come CK7, CK19, HEA-125 ed OV6 (Fabris, 2000; Roskams, 2003a) e neurali come NCAM e cromogranina A (Fabris, 2000; Roskams 2003) (tab 1). Infine le **HPC** (in passato note come "oval cells") si caratterizzano per la forma ovoidale o fusiforme, il grosso nucleo tondeggiante e lo scarso citoplasma; esse si possono ritrovare nel parenchima od all'interfaccia con lo spazio portale sole od in piccoli clumps (Roskams, 2004). Le HPC esprimono diversi marcatori sia epatocitari che colangiocitari come albumina, Chrom-A, Hepar-1, CK7, CK8, CK18, CK19, HEA-125, NCAM, OV-6 (Ruck, 1997; van den Heuvel 2001; Roskams, 2003a) sia marcatori di staminalità come CD34 e c-Kit (Baumann, 1999; Crosby, 2001) (tab 1). Inizialmente questa popolazione cellulare è stata descritta in modelli murini ai quali è stata indotta una necrosi epatica massiva, ad esempio tramite trattamento con CCl₄ (Ghoshal, 1983); l'effetto di una contemporanea somministrazione di AAF (acetaminofene), un agente in grado di bloccare la replicazione epatocitaria, risultava in un aumento nel numero delle HPC, da ciò è stato ipotizzato che questa popolazione si attivasse solo in caso di un esteso danno epatico e di un concomitante blocco della replicazione cellulare (Yin, 2002), come nel caso di epatiti croniche virali B o C in stadio avanzato; studi recenti però hanno dimostrato come anche lesioni epatiche minime (epatiti autoimmuni, NASH, ASH, epatiti da virus B e C lievi/moderate) possano dare un incremento della popolazione di HPC ed RDC (Lowe, 1999; Sell, 2001; Eleazar, 2004; Clouston, 2005), facendo ipotizzare che la proliferazione di queste due

popolazioni cellulari sia una risposta stereotipata del fegato al danno nel tentativo di riparare l'organo compromesso.

1.5. Le Colangiopatie

Le colangiopatie sono un ampio gruppo di patologie che colpiscono l'albero biliare intraepatico che, in base alla loro eziologia, possono essere classificate come: genetiche ed ereditarie, immuno-mediate, infettive, indotte da tossicità da farmaci, ischemiche, idiopatiche o di origine tumorale (tab 2). Malgrado siano tutte patologie abbastanza rare, la loro incidenza è piuttosto variabile e l'età di insorgenza può andare dall'età pediatrica (come l'atresia delle vie biliari) all'età adulta (come il colangiocarcinoma). Le colangiopatie presentano però alcuni tratti anatomopatologici comuni, tutte infatti presentano un'inflammation portale più o meno intensa e tendono alla cirrosi, cioè tendono a formare setti fibrotici all'interno del parenchima epatico (Lazaridis, 2004; Strazzabosco, 2005).

Genetiche ed ereditarie	Sindrome di Alagille, fibrosi cistica, deficienza di MDR3, rene policistico autosomico dominante (ADPKD), rene policistico autosomico recessivo (ARPKD), fegato policistico autosomico dominante (ADPLD), malattia di Caroli, fibrosi epatica congenita (CHF), assenza congenita della vena porta (CAPV)
Immunomediate	Cirrosi biliare primitiva (PBC), colangite autoimmune (AIH), colangite sclerosante primitiva (PSC), rigetto acuto, rigetto cronico, graft vs host disease
Infettive	Batterica, parassitaria, fungina, virale
Ischemiche	Stenosi dell'arteria epatica post-trapianto, infusione di chemoterapici dall'arteria epatica, vasculite sistemica
Indotte da farmaci	Acido clavulanico, anti-infiammatori non steroidei, statine
Idiopatiche	Atresia biliare intraepatica, atresia biliare extraepatica, duttopenia idiopatica dell'adulto
Tumoriali	Colangiocarcinoma

Tab. 2: Classificazione delle colangiopatie

Le **colangiopatie disembrionogenetiche** costituiscono a loro volta un ampio gruppo di patologie di varia eziologia, incidenti principalmente, ma non unicamente, in età pediatrica, che si caratterizzano per il perdurare nel fegato adulto di tratti caratteristici di immaturità (colangiopatie DPM-relate) o da un mancato od anomalo sviluppo dell'albero biliare nel periodo postnatale (colangiopatie non DPM-relate). Le **colangiopatie DPM-relate** (o correlate a malformazioni della lamina duttale) sono patologie malformative caratterizzate dalla persistenza di un eccesso di dotti

biliari che mantengono un fenotipo immaturo (*ductal plate remnants*) e sono verosimilmente dovute ad un difetto nella maturazione e nel rimodellamento della lamina duttale (DP), la struttura embrionale che darà successivamente origine alle strutture biliari. Altro reperto istopatologico piuttosto comune nelle colangiopatie DPM-relate, oltre alla presenza di *ductal plate remnants*, è il riscontro di un elevato ed anomalo numero di strutture vascolari portali aberrante che accompagna le strutture biliari, caratteristica descritta alla fine degli anni ottanta dal Prof. Desmet che la denominò “*pollard willow branching pattern*” (Desmet, 1992 e 1998). Morfologicamente, gli spazi portali risultano essere allargati per l’accumulo di strutture duttulari e vascolari malformate e per la presenza di una fibrosi epatica pronunciata. Tra le malattie DPM-relate possono essere annoverate le patologie fibropolicistiche (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD; Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease, ARPKD; Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease, ADPLD; Congenital Hepatic Fibrosis, CHF; malattia di Caroli, CD*) e l’atresia delle vie biliari (BA) nella forma “early severe” o embrionale. Le **colangiopatie non DPM-relate** presentano duttopenia o malformazioni dell’albero biliare, ma, a differenza di quelle DPM-relate, non sono riscontrabili reperti istopatologici che richiama un mancato sviluppo epatico; alcuni esempi sono la sindrome di Alagille o l’Atresia Biliare perinatale. Tra queste patologie particolarmente interessanti risultano essere la malattia del rene policistico autosomico dominante (ADPKD), una patologia ereditaria DPM-relata che si caratterizza per un abnorme sviluppo dell’epitelio biliare che origina cisti anche di grosse dimensioni, l’atresia delle vie biliari (BA), una patologia multiforme poco nota, sia DPM che non DPM relata ad origine verosimilmente immunomediata e/o genetica, e che si caratterizza per un’estesa reazione duttulare ed un’importante fibrosi ed infine la sindrome di Alagille (AGS), una patologia genetica non DPM relata caratterizzata da una spiccata duttopenia e scarsa fibrosi. Queste tre patologie, pur se i meccanismi fisiopatologici fin qui sono a tutt’oggi sconosciuti, sono paradigmatiche dell’intero spettro delle lesioni dovute a colangiopatie che possono colpire il fegato e mostrano un meccanismo patogenetico di risposta al danno e di rigenerazione epatica completamente differente tra loro.

Malattia del rene policistico autosomico dominante (ADPKD)

Tale patologia è una malattia ereditaria piuttosto comune, con una prevalenza nel rene di 1:400/1.000 abitanti, mentre cisti epatiche si ritrovano in circa il 70% dei pazienti affetti da ADPKD al di sopra dei 65 anni d'età; lesioni cistiche inoltre possono essere individuate nel pancreas e nelle ovaie (Wilson, 2004; Torres 2006 e 2007). Macroscopicamente il fegato si presenta ingrossato, con grosse cisti ripiene di liquido che possono raggiungere anche il diametro di diversi centimetri; microscopicamente, il parenchima epatico risulta alterato dalla presenza di microamartomi biliari, microcisti e grosse cisti biliari caratterizzate da un epitelio colonnare o appiattito e circondate da un ricco plesso vascolare pericistico (Bello-Reuss, 2001). Cisti e microamartomi biliari presentano un fenotipo ed un immunofenotipo con caratteristiche di immaturità che fanno ipotizzare che la loro formazione implichi un blocco durante il rimodellamento della lamina duttale embrionale e che perciò rientrino nella categoria delle patologie correlate a malformazioni della lamina duttale (DPM). L'ADPKD è causata da che possono colpire i geni della policistina 1 (*PKD1*) in circa l'85% dei casi (Hughes, 1995) o 2 (*PKD2*) nel restante 15% (Mochizuki, 1996); questi due geni codificano due proteine di membrana implicate nel trasporto del calcio localizzate a livello giunzioni inter-cellulari e sulle ciglia dell'epitelio sia tubulare renale che biliare (Yoder, 2002; Pazour, 2002; Wilson, 2004; Torres, 2006 e 2007) mutazioni in queste proteine generano perturbazioni a livello di sviluppo del cilio primario biliare che si presenta più tozzo e corto, se non assente, rispetto al cilio presente su colangiociti normali (Alvaro, 2008). Il modello patogenetico più accreditato risulta essere quello del *two hit mechanism*, ossia perché si formi una ciste, oltre ad essere necessaria una mutazione eterozigote germinale, ad essa si deve assommare una seconda mutazione a carico dello stesso gene (Watnik, 1998). PKD-1 è una proteina di membrana codificante da un gene mappante nel cromosoma 16; essa è composta da 11 domini transmembrana e la sua funzione è quella di interagire con PKD-2 per modulare il trasporto del calcio, oltre ad essere deputata ad interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. PKD-2 è invece una proteina che mappa nel cromosoma 4 ed è composta da 6 domini transmembrana che

formano un canale del calcio il cui flusso viene verosimilmente regolato dall'interazione con PDK-1 (Torres, 2006 e 2007). Entrambe queste proteine sono implicate nell'embriogenesi di diversi organi ed in particolare di fegato e reni, infatti risultano essere fortemente espresse sia dalla lamina duttale che dai duttuli renali nascenti (Chauvet, 2002). Malgrado la patologia dell'ADPKD sia una delle più importanti cause di disfunzione renale che portano a trapianto, la sintomatologia epatica risulta per lo più latente; eventuali complicanze epatiche, come effetto massa, infezione, emorragia o rottura delle cisti possono però essere molto gravi e richiedere un trapianto epatico urgente (Chauveau, 2000).

Atresia biliare (BA)

Si tratta di una grave patologia fibroobliterante che si presenta nel periodo neonatale; pur essendo una patologia rara, prevalenza di 1:20.000 nati, rappresenta la prima causa di trapianto di fegato nella popolazione pediatrica (ben il 50% negli USA) (Perlmutter, 2002). In questa patologia i dotti extraepatici ed i dotti settali maggiori non si sviluppano o vengono distrutti nei primi mesi dopo la nascita (Laurent, 1990; Desmet, 1992; Perlmutter, 2002; Kahn 2004; Utterson, 2005). Dal punto istopatologico si caratterizza per la presenza di una grossa componente fibrotica ed infiammatoria portale e dalla presenza di numerosi duttuli biliari reattivi accompagnati da iperplasia delle arterie epatiche che si caratterizzano anche per una marcata ipertrofia della tonaca media della parete muscolare (Desmet, 1992). Tale malattia esordisce entro i primi tre mesi di vita e risulta letale entro i due anni dalla nascita se non adeguatamente curata. L'unica reale opzione curativa è il trapianto di fegato (OLTx, *Orthoptic Liver Transplant*), ma il corso della malattia può essere modificato tramite intervento di portoenterostomia (o intervento di Kasai), che consiste nell'eliminare la zona fibrotica periilare e di collegare i dotti biliari rimasti integri direttamente all'intestino, in modo da permettere il drenaggio della bile; ciò permette di dilazionare nel tempo, ma non di evitare il trapianto epatico (Laurent, 1990; Utterson, 2005). Le cause che inducono il trapianto possono essere diverse e comprendono, prurito, ritardo della crescita, peggioramento della funzionalità epatica e, più raramente ipertensione portale e colangiti ricorrenti. Tale patologia si può

presentare in due forme: una feto-embrionale, detta anche “*early severe*”, ed una perinatale; la forma *early severe*, che copre il 20/25% dei casi e che rappresenta la forma DPM-relata della patologia, presentando residui istologici di lamina duttale, risulta essere la forma piu’ aggressiva e precoce, mentre la forma perinatale pur presentando duttuli dismorfici non presenta residui di lamina duttale (Desmet, 1992). Al momento le cause che portano allo sviluppo dell’atresia delle vie biliari non sono note, ma vi sono diverse ipotesi che, vista la grande variabilità della patologia, possono non escludersi mutualmente; le principali ipotesi patogenetiche per le forme di atresia biliare non malformativa (forma perinatale) sono infezioni virali occulte da rotavirus o reovirus, assunzione di tossine ambientali, patologie vascolari od un’aberrante risposta immunitaria, mentre per quanto riguarda la forma “*early severe*”, i geni candidati riconducibili allo sviluppo di tale patologia sono *invesina (Inv)*, *Jagged/Notch*, *Hes 1*, *HNF1 α* , *HNF6*, *Forkhead box F1* o *M1b* (Perlmutter, 2002; Sokol, 2007).

Sindrome di Alagille (AGS)

Tale sindrome, ad ereditarietà autosomica dominante, è causata da mutazioni a carico del gene *JAGGED1* (Oda, 1997; Li, 1997), un ligando del recettore Notch, e di *NOTCH2* (McDaniell, 2006). La prevalenza è bassa, circa 1:70.000 nati vivi, e spesso esordisce nel periodo neonatale. La famiglia dei recettori Notch è composta da quattro membri (Notch1-4) che possono interagire con diversi ligandi (*Jagged1*, *Jagged2*, *Delta-like1*, *Delta-like3* e *Delta-like4*) (Gridley, 2003). Tali interazioni sovrintendono e regolano diversi *pathways* coinvolti nella determinazione del tipo cellulare nello sviluppo embrionale di diversi organi, compreso il fegato (Crosnier, 2000); ciò spiega come le manifestazioni cliniche dell’AGS possano essere molto varie ed includano anche manifestazioni extraepatiche come una particolare *facies* triangolare, anomalie vascolari (aneurismi aortici) e cardiache, vertebre a farfalla ed embriotaxon posteriore (Krantz, 1999; Emerik, 1999) oltre a duttopenia e colestasi; inoltre i pazienti possono presentare un ittero ingravescente, che può dar luogo a prurito intrattabile, ed ipercolesterolemia (Krantz, 1999; Emerick, 1999; Piccoli, 2001). La spiccata duttopenia dei pazienti sofferenti di AGS può essere spiegata dal fatto che diversi lavori

sia su topo che su *zebrafish* mutati (Flynn, 2004; Kodama, 2004; Lorent, 2004) che su campioni umani, hanno dimostrato che il segnale indotto da Notch risulta fondamentale per lo sviluppo del sistema biliare a partire dal rimodellamento della lamina duttale (Louis 1999, Kodama, 2004; Lorent, 2004). Il sistema del notch infatti sembra controllare la transdifferenziazione di epatoblasti ed epatociti in colangiociti (Tanimizu, 2004; Nishikawa, 2005) alterando l'espressione di diversi fattori di trascrizione epatici; è interessante però notare come cambiamenti nell'espressione di Jagged1 e Notch2 siano stati notati solo in patologie epatiche croniche (Nijjar, 2001). Pur essendo una patologia rara, l'AGS rappresenta però una causa frequente di trapianto epatico nella popolazione pediatrica, tanto che, ad esempio, rappresenta circa il 10% dei trapianti pediatrici effettuati presso gli Ospedali Riuniti di Bergamo (Maldini, 2005). Proprio la grande variabilità di tale sindrome fa sì che malgrado circa il 90% dei pazienti affetti presentino duttopenia e colestasi, solo il 30% dei pazienti totali subisca un trapianto epatico (Lykavieris, 2001); le cause più comuni per il trapianto non sono colestasi e cirrosi epatica, ma ritardo della crescita, peggioramento della funzionalità epatica, ascite e prurito intrattabile (Emerick, 1999).

2. SCOPO DELLA TESI

Le colangiopatie, ossia le patologie che colpiscono l'albero biliare, sono un ampio gruppo di malattie a varia eziologia che, malgrado prese singolarmente risultino piuttosto rare, nel loro insieme colpiscono un grosso numero di individui; dal punto di vista istopatologico, tali malattie sono piuttosto varie potendo presentare di volta in volta fibrosi, infiammazione portale e parenchimale, duttopenia o, viceversa, iperplasia biliare e vascolare, fino alla formazione di microamartomi e cisti biliari; vista tale grande variabilità, queste patologie possono rappresentare dei buoni modelli per studiare i diversi meccanismi patofisiologici che rappresentano la risposta al danno nelle patologie malformative. Queste rappresentano un sottogruppo di malattie particolarmente interessanti dal punto di vista scientifico perché la loro patogenesi è ad oggi poco nota e spesso, come nel caso dell'atresia delle vie biliari, dibattuta, e per le quali non esistono reali interventi curativi ad esclusione del trapianto epatico.

Come archetipo dei diversi meccanismi fisiopatologici che possono intervenire in questo gruppo di malattie, abbiamo deciso di studiare tre colangiopatie che presentano lesioni istopatologiche totalmente differenti: l'ADPKD, una colangiopatia dell'adulto che si caratterizza per la presenza di grosse cisti biliari, ma scarsa fibrosi ed infiammazione, e due patologie pediatriche, che presentano aspetti contrastanti, quali l'atresia delle vie biliari intraepatiche, nella quale ad un'imponente reazione duttulare si accompagnano una marcata fibrosi, un ricco infiltrato infiammatorio ed iperplasia ed ipertrofia vascolare, e la Sindrome di Alagille che, di contra presenta duttopenia, scarsa fibrosi e scarso infiltrato infiammatorio.

Infine, in considerazione del fatto che tutte le colangiopatie disembrionogenetiche sono dovute ad un blocco nella maturazione delle strutture biliari durante il periodo fetale e perinatale, e che le lesioni biliari sono solitamente accompagnate da un'iperplasia del plesso peribiliare (l'insieme di microvasi che accompagna i dotti biliari), abbiamo anche analizzato l'espressione dei diversi fattori di crescita angiogenetici da parte delle strutture biliari durante lo sviluppo fetale e se esisteva un rapporto tra lo sviluppo coordinato delle ramificazioni biliari e di quelle dell'arteria epatica.

Le finalità di questo progetto di studio sono state:

- Identificare una serie di colangiopatie malformative causate da uno specifico difetto genetico e caratterizzate ciascuna da forme diverse di lesione dell'epitelio biliare come esempi di diversa risposta rigenerativo-riparativa dell'epitelio biliare al danno epatico;
- Analizzare quali fossero i meccanismi patogenetici coinvolti in ciascuna di queste malattie;
- Valutare i fattori molecolari che avevano un ruolo nel determinismo di queste meccanismi fondamentali di malattia come possibile link molecolare col difetto genetico;
- Valutare se questi fattori potevano avere anche un ruolo nel condizionare la progressione clinica della colangiopatia.

Una più profonda comprensione di tali meccanismi fisiopatologici è infatti indispensabile per poter sviluppare approcci terapeutici alternativi al trapianto epatico, atti a modificare il decorso di queste gravi patologie.

Ho perseguito questi scopi complessivi attraverso tre studi successivi i cui titoli sono riportati in calce:

- **Studio 1.** Effetti sulla malattia policistica del rene autosomica dominante (ADPKD) dell'iperpressione di fattori angiogenetici in colangiociti umani e murini.
- **Studio 2.** Espressione dei fattori di crescita angiogenetici da parte delle cellule epiteliali modula l'arteriogenesi durante l'ontogenesi epatica.
- **Studio 3.** Analisi dei meccanismi di rigenerazione epatica nella sindrome di Alagille e nell'atresia delle vie biliari rivela un ruolo per il signaling del Notch.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Tessuti epatici

Studio 1

Tessuto umano di ADPKD (n = 21), malattia di Caroli (n = 8) sono stati ottenuti da trapianti epatici fatti in differenti centri trapianto europei (Ospedali Riuniti di Bergamo, Italia; Queen Elizabeth Hospital di Birmingham, UK; Ospedale universitario St. Raphael, Leuven, Belgio); le diagnosi si sono basati su criteri clinici e laboratoristici e sull'analisi istochimica di blocchetti di tessuto fissato in paraffina. Come controllo abbiamo utilizzato campioni di fegato ottenuto da pazienti con minime alterazioni di test di funzionalità epatica ed istologia normale (assenza di necrosi, steatosi, epatite, proliferazione o assenza di dotti biliari) (n = 4). 23 fegati fetali (di età gestazionale dalle 8 alle 23 settimane) sono stati forniti dal dipartimento di Anatomia Patologica dell'Università di Leuven.

Studio 2

16 fegati fetali umani ottenuti da autopsie di aborti spontanei o per cause mediche, di età gestazionale dalle 10 alle 36 settimane sono stati forniti dal dipartimento di Anatomia Patologica dell'Università di Leuven; i campioni, all'esame autoptico, non presentavano alcuna anomalia epatica. 2 fegati normali di adulto (entrambi maschi dell'età di 49 e 18 anni) sono stati ottenuti da fegati normali scartati al momento del trapianto per cause iatrogene.

Sezioni epatiche di topi ko per il gene HNF6 ($Hnf6^{-/-}$) sono stati forniti dal Dr Frederic Lemaigre dell'università cattolica di Louvain (Clotmann, 2002). Sono stati studiati i campioni di 5 topi $Hnf6^{-/-}$ e di 5 controlli normali. Poiché i dotti biliari nel topo si formano solo dopo la nascita (Clotman, 2003), abbiamo studiato sezioni di topo di 1, 3 e 4 giorni dopo la nascita (P1, P3 e P4).

Studio 3

Sono state studiate sezioni di fegato ottenute da pazienti sofferenti di AGS (n = 10) e BA al trapianto od al momento dell'operazione di Kasai (n = 17). Tutti i campioni sono stati ottenuti da trapianti o manovre chirurgiche svolte presso gli Ospedali Riuniti di Bergamo. Sono stati studiati

come controlli anche n = 2 fegati normali di adulto (entrambi maschi dell'età di 49 e 18 anni) scartati al momento del trapianto per cause iatrogene. Le diagnosi si sono basate su dati clinici e laboratoristici e su sezioni istologiche di fegati espantati (Krantz, 1999; Perlmutter, 2002; Kahn, 2004).

Tutti i campioni utilizzati nei tre studi sono stati congelati in isopentano raffreddato con azoto liquido e conservati in freezer a -80°C .

3.2. Valutazione Istopatologica dei Fegati Fetali

I diversi spazi portalari sono stati stratificati in tre stadi maturativi a seconda del grado di maturazione ed incorporazione delle strutture biliari che li compongono; i tre stadi sono: *ductal plate stage*, *migratory stage* e *bile duct stage* (Nakanuma, 1997; Libbrecht, 2001). Nel *ductal plate stage* le strutture biliari sono rappresentate dalla lamina duttale monostratificata (sDP), riconoscibile come una sottile struttura monostratificata formata da cellule biliari cuboidali localizzate all'interfaccia tra il parenchima epatico ed il mesenchima dello spazio portale nascente; da queste strutture trarranno origine in seguito le lamine duttali duplicate (dDP) caratterizzate da un foglietto epiteliale, sempre all'interfaccia tra parenchima e spazio portale che duplicandosi in punti discreti formerà delle strutture tubulari che presentano un abbozzo di lume. Con il procedere della maturazione, durante il *migratory stage*, questi segmenti tubulari biliari (iBD) aumenteranno il proprio lume e migreranno progressivamente all'interno dello spazio portale. Infine, nel *bile duct stage*, le strutture biliari risulteranno finalmente mature e completamente circondate dal mesenchima portale.

3.3. Valutazione Istopatologica delle Lesioni Cellulari fondamentali nei Fegati Patologici post-natali

Le differenti componenti epiteliali che caratterizzano le differenti patologie sono state categorizzate secondo la definizione di Roskams et al (Roskams, 2004). Le Cellule Duttulari

Reattive (RDC) sono state definite come cellule CK7 e CK19 positive con fenotipo biliare e struttura irregolare e strettamente anastomizzata (Sell 2001; Strazzabosco, 2005); le Cellule Intermediarie Epato-Biliari (IHBC) sono state definite come cellule di taglia e morfologia intermedia tra epatociti e colangiociti, con un'immunoreattività per CK7 particolare caratterizzata da una positività citoplasmatica spesso debole e rinforzata a livello di membrana plasmatica (Roskams, 2004). Le Cellule Progenitrici Epatiche (HPC) sono caratterizzate da forma fusiforme od ovoidale, con grosso nucleo e scarso citoplasma, rinvenibili all'interno del parenchima epatico da sole od in piccoli aggregati; sono caratterizzate per la positività a CK7 e CK19 (Libbrecht, 2002a; Roskams, 2004;). I microamartomi biliari sono definiti come strutture irregolari formate da dilatazioni dell'albero biliare; i colangiociti che li compongono sono solitamente cuboidali e presentano positività per CK7, CK19 ed HEA-125. Le cisti biliari invece sono strutture biliari molto dilatate, spesso visibili ad un esame macroscopico, accompagnate da microamartomi multipli; le strutture biliari che le compongono possono presentare un epitelio sia cubico che appiattito e sono positivi per CK7, CK19 ed HEA-125. Vene ed arterie sono caratterizzate per la positività delle EC a CD31 e CD34 ed inoltre le arterie presentano una spessa parete muscolare ASMA-positiva.

3.4. Colorazioni Immunoistochimiche

Immunoperossidasi

Sono state colorate sezioni seriate di tessuto congelato dello spessore di 4µm; per tutti gli anticorpi primari fatti in capra è stata utilizzata la tecnica immunoistochimica in tre fasi (Cassiman, 2002), mentre per quelli in coniglio o topo è stata usata la tecnica in due fasi con l'utilizzo del polimero DAKO EnVision. Brevemente, gli anticorpi sono stati diluiti in PBS1M supplementato con il 5% di siero umano normale per evitare crossreazioni ed incubati per il tempo dovuto (Tab. 3) a temperatura ambiente od a 4°C; dopo lavaggio con PBS 0.1M, le sezioni sono state incubate per 45min. a temperatura ambiente con DAKO EnVision (se gli anticorpi primari erano stati fatti in topo o coniglio) mentre gli anticorpi primari generati in capra sono stati incubati sequenzialmente prima

con un secondario anti-capra generato in coniglio e successivamente con un terziario anti-coniglio generato in maiale, entrambi HRP-coniugati (Tab. 4). Dopo lavaggio in PBS 0.1M le sezioni sono state incubate 5' in una soluzione di 0.04mg/ml di 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloride (DAB) e 0.01% H₂O₂ ed infine contrastate con ematossilina di Gill n° 2 (Sigma). Infine le sezioni sono state disidratate con un gradiente di alcol, chiarificati in xilolo e montati in resina.

Doppia Immunoperossiasi

Per analizzare la coespressione di anticorpi primari generati nello stesso animale è stata utilizzata una doppia colorazione tramite immunoperossidasi. Brevemente si tratta di due colorazioni sequenziali fatti sullo stesso campione sviluppando il primo anticorpo con DAB che da una colorazione rosso/bruma, mentre il secondo anticorpo primario è stato sviluppato con il reagente TrueBlue (KPL) che reagisce con le perossidasi dando una colorazione blu.

Doppia Immunofluorescenza su Campioni Umani

Per studiare la coespressione di diversi anticorpi primari, generati in animali diversi, sulle strutture che compongono lo spazio portale (dotti biliari, vena porta ed arteria epatica) sono state fatte doppie immunofluorescenze tra i fattori di interesse e diversi marcatori epiteliali, endoteliali o muscolari. Brevemente, dopo un'incubazione delle sezioni epatiche congelate overnight a 4°C con un mix dei due anticorpi, le sezioni sono state lavate tre volte in PBS 0.1M e quindi incubati per 45min. con l'anticorpo fluorescente secondario adatto (Tab. 4); infine le sezioni sono state montate in una soluzione di 90% glicerolo, 5% di DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]ottane, Sigma) e 5% di acqua distillata, o in Vectastain (Vector) supplementato con DAPI, al fine di evidenziare i nuclei delle cellule.

Doppia Immunofluorescenza su Campioni Murini

L'espressione di VEGF, VEGFR-1, Ang-1 e Tie-2 è stata valutata anche su campioni di topo Hnf6^{-/-} e su controlli normali. E' stata valutata la coespressione di VEGF da parte di strutture esprimenti pan-citocheratine (pan-CKs) ed ASMA rispettivamente marcatosi epiteliale e muscolare) mentre per VEGFR-1, Ang-1 e Tie-2 è stata fatta una doppia immunofluorescenza con ASMA. Per

aumentare il segnale dei diversi fattori angiogenetici prodotti in topo è stato utilizzato il TSA kit #12 (Invitrogen). Brevemente i tessuti sono stati preincubati con soluzione bloccante all'1% per 60min. e poi è stata fatta un incubazione overnight a 4°C con l'anticorpo primario (Tab. 3). Quindi le sezioni sono state incubate con l'HRP working solution per 60min. a temperatura ambiente ed infine è stata applicata la soluzione di tiramidine Alexa Fluor 488 coniugata per 10min. Gli anticorpi primari non generati in coniglio sono stati visualizzati con scimmia anti-topo Alexa Fluor 594 o 488, mentre Ang-1 con un secondario scimmia anti-capra Alexa Fluor 594.

Esperimenti con Peptidi Bloccanti

Al fine di confermare la genuinità di legame degli anticorpi primari anti-VEGF, VEGFR-1, Ang-1, Ang-2 e Tie-2 abbiamo condotto esperimenti di neutralizzazione con peptidi bloccanti specifici su campioni selezionati (n = 5). Brevemente, gli anticorpi primari sono stati preincubati overnight a 4°C con un eccesso di cinque volte di peptide bloccante, quindi questo mix è stato utilizzato per incubare le sezioni di interesse. Infine, è stato applicato l'opportuno anticorpo secondario e/o terziario e le sezioni sono state montate ed analizzate

3.5. Valutazione dell'High Grade Staining dei Fattori Angiogenetici

Sezioni tissutali colorate con i diversi fattori angiogenetici (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ang-1, Ang-2 e Tie-2) sono state analizzate da due osservatori indipendenti e la proporzione di strutture positive per ogni anticorpo sono state valutate in modo semiquantitativo (Libbercht, 2001a) come 0 (assenza di colorazione), 1 (< 20% di strutture positive), 2 (tra 20% e 70%) e 3 (> 70%); è quindi stata valutata la percentuale di strutture biliari presentanti un High Grade staining (valori 2 e 3).

3.6. Indice di Proliferazione/Mitoinibizione

Per studiare il bilancio tra proliferazione e mitoinibizione epatocitaria abbiamo determinato il rapporto tra Ki67 e p21^{waf1} come descritto da Clouston et al (Clouston, 2005). Per differenziare gli

epatociti veri e propri dalle IHBC abbiamo eseguito una doppia immunoperossidasi per Ki67 o p21^{waf1} su sezioni congelate utilizzando CK7 come marcatore di IHBC. Sono state successivamente contati gli epatociti positivi per Ki67 (marcatore di proliferazione) e p21^{waf1} (marcatore di blocco proliferativo) in cinque campi fotografati a 200x non sovrapposti per ogni campione.

Marcatore	Ditta fornitrice	Isotipo	Clone	Diluizione	Incubazione	Significato Biologico
Ang-1	Santa Cruz	Ca. Policlonale		1:75 (HRP) 1:20 (IF)	Overnight, 4°C	Ligando di Tie-2 coinvolta nel reclutamento di EC e nella maturazione e stabilizzazione delle strutture vascolari
Ang-2	Santa Cruz	Ca. Policlonale		1:75 (HRP) 1:20 (IF)	Overnight, 4°C	Ligando di Tie-2 ed antagonista di Ang-1; permette alle strutture vascolari di rimanere plastiche e pronte al rimodellamento
ASMA	DAKO	T. IgG _{2A}	1A4	1:100 (HRP ed IF)	45min, temperatura ambiente	Proteina del citoscheletro espressa dalle cellule muscolari lisce; utilizzata come marcatore delle arterie
BSEP	Santa Cruz	Ca. Policlonale		1:100 (IF)	Overnight, 4°C	Proteina transmembrana espressa selettivamente dagli epatociti e coinvolta nell'esporto dei sali biliari nei canalicoli
CD31	NeoMarkers	T. IgG ₁	JC/70A	1:40 (HRP) 1:20 (IF)	45min, temperatura ambiente	Glicoproteina coinvolta nell'adesione cellulare utilizzata come marcatore di cellule endoteliali
CD34	Novocastra	T. IgG ₁	QBEnd/10	1:50 (HRP ed IF)	45min, temperatura ambiente	Antigene di membrana selettivamente espresso dalle cellule endoteliali
CK7	Acris	T. IgG ₁	OVTL-12/30	1:5 (HRP) 1:50 (IF)	45min, temperatura ambiente	Proteina citoscheletrica utilizzata come marcatore di fenotipo biliare; viene espressa dai colangiociti solo in stadi avanzati dello sviluppo biliare
CK19	DAKO	T. IgG ₁	RCK108	1:20 (HRP)	45min, temperatura ambiente	Proteina citoscheletrica utilizzata come marcatore di fenotipo biliare; viene espressa dai colangiociti sin dai primi stadi di sviluppo biliare
EMA	DAKO	T. IgG _{2A}	E29	1:20 (HRP)	45min, temperatura ambiente	Proteine di membrana espressa selettivamente da dotti biliari maturi
HEA-125	Progen Biotechnik	T. IgG ₁	HEA-125	1:100 (HRP ed IF)	45min, temperatura ambiente	Glicoproteina di membrana analoga al Nidogeno espresso selettivamente da cellule appartenenti al lineage biliare
HNF1β	Santa Cruz	Ca. Policlonale		1:300 (HRP)	Overnight, 4°C	Fattore di trascrizione nucleare espresso selettivamente dai dotti biliari coinvolto nel signaling di Jagged1/Notch; proteina fondamentale per lo sviluppo del sistema biliare
HNF4α	R&D Systems	T. IgG _{2A}	K9218	1:100 (HRP)	Overnight, 4°C	Fattore di trascrizione nucleare coinvolto nell'ontogenesi di fegato e reni; a livello epatico è espresso dai soli epatociti
HNF6	Santa Cruz	C. Policlonale		1:200 (HRP)	Overnight, 4°C	Fattore di trascrizione nucleare espresso sia da colangiociti che epatociti e coinvolto nello sviluppo epatico
Ki67	DAKO	T. IgG ₁	Ki-S5	1:50 (HRP)	45min, temperatura ambiente	Proteina coinvolta nella proliferazione cellulare
LKM-1	Gentilmente donato dal Dr Ballardini	IgG di uomo, FITC-coniugato		1:10 (IF)	1h, temperatura ambiente	Citocromo epatocita specifico (CYP2D6) che appartiene alla superfamiglia del citocromo P450II e localizzato nel reticolo endoplasmico rugoso degli epatociti
NCAM	DAKO	T. IgG _{2A}	UJ13A	1:20 (HRP)	45min, temperatura ambiente	Sialoglicoproteina di membrana espressa da cellule biliari immature
p21 ^{waf1}	Oncogene	T. IgG ₁		1:50 (HRP)	45min, temperatura ambiente	Inibitore della proliferazione cellulare in risposta a danneggiamenti a carico del DNA. blocca la progressione del

						ciclo cellulare inibendo la fosforilazione di chinasi ciclina-dipendenti
Pan-CKs	Sigma	T. IgG ₁	PCK-26	1:100 (IF)	Overnight, 4°C	Insieme di citocheratine (1, 5, 6 ed 8) espresse nel fegato murino ed utilizzate come marcatore epiteliale
Tie-2	Santa Cruz	C. Policlonale		1:50 (HRP) 1:20 (IF)	Overnight, 4°C	Tirosin-chinasi di membrana che agisce da recettore per Ang-1 ed Ang-2, espresso da cellule murale ed endoteliali
VEGF	Santa Cruz	C. Policlonale		1:50 (HRP) 1:20 (IF)	Overnight, 4°C	Glicoproteina fondamentale coinvolta nella vasculogenesi e tumorigenesi
VEGFR-1	Santa Cruz	C. Policlonale		1:50 (HRP) 1:20 (IF)	Overnight, 4°C	Recettore tirosin-chinasico di membrana del VEGF coinvolto nella morfogenesi delle ramificazioni vascolari
VEGFR-2	Santa Cruz	T. IgG ₁		1:100 (HRP) 1:20 (IF)	Overnight, 4°C	Recettore tirosin-chinasico di membrana del VEGF coinvolto nella migrazione e proliferazione delle EC ed espresso, durante l'ontogenesi epatica dagli emangioblasti
VEGFR-2	NeoMarkers	C. Policlonale		1:25 (IF)	Overnight, 4°C	

Tab. 3: lista degli anticorpi primari utilizzati in immunistochemica e breve descrizione del loro significato biologico; abbreviazioni: C., coniglio; Ca., capra; T., topo.

Anticorpo secondario	Ditta fornitrice	Cromogeno	Diluizione
DAKO EnVision vs T.	DAKO	HRP	Al netto
DAKO EnVision vs C.	DAKO	HRP	Al netto
C. vs Ca.	DAKO	HRP	1:50
M. vs C.	DAKO	HRP	1:100
Ca. vs C.	Santa Cruz	FITC	1:20
C. vs Ca.	DAKO	FITC	1:20
C. vs T.	DAKO	FITC	1:20
Cv. vs T.	Vector	Texas Red	1:20
A. vs T.	Invitrogen	Alexa Fluor 594	1:1000
A. vs T.	Invitrogen	Alexa Fluor 488	1:1000
A. vs Ca.	Invitrogen	Alexa Fluor 594	1:1000

Tab. 4: lista degli anticorpi secondari utilizzati in immunistochemica; abbreviazioni: A., asino; C., coniglio; Ca., capra; Cv., cavallo; M., maiale; T., topo; tutti gli anticorpi sono stati incubati per 45min a temperatura ambiente.

3.7. Analisi Morfometriche Computerizzate

I campioni sono stati analizzati con un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon) equipaggiato con una fotocamera digitale Coolpix 995 (Nikon). Le immagini sono state archiviate con il programma Fotostation 4.5 (FotoWare) ed analizzate con i software Photoshop 5.0 (Adobe), UTHSCS Image Tool 3.0 (Università del Texas) e LUCIA G 5.0 (Nikon).

Correlazione area biliare VEGF-positiva/densità microvascolare (MVD)

Tre campi fotografici a 200x non sovrapposti sono stati fotografati per ogni campione di ADPKD (n = 10), malattia di Caroli (n = 4) e l'area VEGF positiva delle strutture biliari è stata calcolata utilizzando il software UTHSCS Image Tool 3.0 (Università del Texas), come percentuale di pixel positivi sopra il valore soglia impostato, rispetto al numero di pixel totali. Per valutare la densità microvascolare, su sezioni seriate di ogni campione sono state contate le strutture CD34 positive (El-Assal, 1998) in campi omologhi a quelli utilizzati per l'analisi morfometrica dell'espressione di VEGF.

Quantificazione di RDC, IHBC ed HPC

Per ogni campione sono stati fotografati 10 campi fotografici a 200x non sovrapposti; l'area citocheratina positiva (CK19 per le RDC e CK7 per le IHBC) è stata calcolata come la percentuale di pixel superiori al valore soglia rispetto al numero totale dei pixels per campo fotografico; l'area delle IHBC è stata calcolata sottraendo il valore di CK19 dal valore di CK7 per ogni area. Il numero di HPC è stato valutato da due osservatori indipendenti in cinque campi fotografici non sovrapposti, fotografati a 200x per campione. Le misurazioni sono state effettuate con il software UTHSCS Image Tool 3.0 (Università del Texas).

Quantificazione della fibrosi

I campioni sono stati sviluppati con la colorazione tricromica di Masson per evidenziare la fibrosi. Lo spessore dei setti fibrotici è stato analizzato misurando la larghezza di dieci lesioni fibrotiche per ogni campione (Nagula, 2006). La misura in micron di ogni setto fibroso è misurata al centro dello stesso con il programma di analisi d'immagine LUCIA G 5.0 (Nikon). L'estensione

della fibrosi pericellulare invece è stata valutata in modo semiquantitativo da due osservatori indipendenti secondo il numero di campi positivi ravvisabili ad una visione a basso ingrandimento (10x) e stadiati come 0 = assente; 1 = lieve (presente in uno o due campi); 2 = moderata (da tre a cinque campi positivi) e 3 = severa (più di cinque campi positivi).

3.8. Real Time-PCR

L'RNA totale è stato estratto da campioni epatici di ADPKD (n = 16) e di fegati controllo (n = 4). Gli RNA sono stati risospesi in acqua trattata con DEPC (Sigma), sono stati quantificati tramite spettrofotometro analizzando il rapporto $\lambda_{260}/280$ e l'integrità degli acidi nucleici è stata verificata con una corsa su gel di agarosio impregnato di etidio bromuro; la retrotrascrizione dell'RNA totale è stata fatta con un mix di reazione composto da RNA (1 μ g), 100ng di random hexamers (Applied Biosystems) e 50u di retrotrascrittasi M-MLV (Applied Biosystems) in un volume finale di 20 μ l a 42°C per 30'. La Real time-PCR è stata utilizzata per quantificare i livelli delle isoforme di Ang-1 ed Ang-2; lo strumento utilizzato è stato il sistema LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Frammenti PCR di Ang-1 ed Ang-2 sono stati prodotti in 10 μ l di mix di reazione comprendente 1 μ l di ciascun DNA, 0.5 μ M dei corrispettivi primers senso ed antisense in buffer 1x fornito dal kit QuantiTecttm SYBR® Green PCR kit (Qiagen). Un frammento di cDNA di Ang-1 di 266-bp è stato amplificato con gli oligonucleotidi: 5'CTGTGCAGATGTATATCAAGC e 5'AGCATGTACTGCCTCTGACT, mentre un frammento di cDNA di Ang-2 di 297-bp fragment of cDNA è stato amplificato con gli oligonucleotidi: 5'GGAAGACAAGCACATCATCC e 5'ATGCCATTTGTGGTGTGTCC, per entrambi la temperatura di annealing era di 61°C. La PCR prevede una prima denaturazione a 95°C per 10', seguita da 40 cicli con un periodo di denaturazione a 95°C per 15s, un periodo di annealing a 56-61°C per 30s ed un periodo di allungamento a 72°C per 30s. Alla fine di ogni ciclo è stata misurata la fluorescenza dopo lo step di estensione. Come controllo per la normalizzazione per ogni campione è stato utilizzato un

frammento di cDNA di β -actina di 174-bp sfruttando i primers senso ed antisenso 5'AGCCTCGCCTTTGCCGA e 5'CTGGTGCCTGGGGCG con una temperatura di annealing di 60°C. Le curve standard sono state generate utilizzando diluizioni decimali di uno dei campioni da analizzare e la quantità per ogni campione è stata calcolata con il software LightCycler.

3.9. Isolamento e Coltura di Colangiociti di Ratto

Ratti Sprague Dawley sono anestetizzati con sodio pentobarbital (50mg/Kg di peso corporeo). L'isolamento immunomagnetico di colangiociti di ratto è stato condotto come descritto da Glaser et al (2003) utilizzando l'anticorpo primario OC-2 (1:1000) (per gentile concessione del Dr. D. Hixson, Brown University, Providence, Rhode Island). La purezza delle colture, superiore al 95%, è stata valutata via colorazione istochimica per γ -glutamiltanspeptidasi (GGT), mentre la vitalità delle colture è stata valutata con Tripan Blue.

3.10. Determinazione della Proliferazione Cellulare con Western Blot per PCNA su Colangiociti Isolati di Ratto

La proliferazione dei colangiociti ottenuti da ratti Sprague Dawley è stata valutata misurando l'espressione, con Western Blot, di PCNA (Glaser, 2003). Dodici ratti del peso da 150-200gr sono stati utilizzati per valutare l'espressione di PCNA dopo che colture cellulari di colangiociti puri sono state stimulate con VEGF, Ang-1 ed Ang-2 (R&D Systems), in singolo o come mix. Dopo incubazione di 2h con uno o più fattori di crescita le colture sono state risospese in buffer di lisi e sonicate 3 volte per 10sec; le proteine sono state fatte correre su gel di poliacrilammide al 12% in ambiente denaturante (sodio dodecil solfato) e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham Biosciences). Per evitare aspecifici le membrane sono state bloccate incubandole per 1h a temperatura ambiente con una soluzione di latte in polvere al 3% e quindi sono state incubate per 1h a temperatura ambiente con gli anticorpi primari anti-PCNA (Santa Cruz, diluizione 1:1000) e con anti-actina (1:30000) entrambi generati in topo; la membrana è stata quindi

lavata ed incubata per 1h con un anticorpo secondario anti-topo HRP coniugato (Bio-Rad laboratories, diluizione 1:2000). Le proteine sono state visualizzate per chemiluminescenza sfruttando il kit ECL Plus (Amersham Biosciences) e l'intensità delle bande è stata determinata tramite densitometria.

3.11. Isolamento e Coltura di Colangiociti Umani

I colangiociti umani sono stati isolati da fegati espantati presso gli Ospedali Riuniti di Bergamo come descritto da Joplin et al (Joplin, 1989). Brevemente, 30gr di fegato umano vengono sminuzzati e incubati con Collagenasi IA (Sigma) per 60/90min; il tessuto semidigerito viene nuovamente sminuzzato e ri-incubato per altri 30/45min con Collagenasi IA. La soluzione ottenuta viene filtrata attraverso un passino a maglie larghe e si opera una prima semipurificazione per centrifugazione (30min a 4°C a 2000rpm) su gradiente di Percoll. Il pellet così ottenuto, dopo una serie di lavaggi per eliminare i Percoll viene immunopurificato tramite una prima incubazione di 30min a 37°C con l'anticorpo HEA-125 (Progen Biotechnik, diluizione 1:10), una proteina espressa specificamente dai colangiociti ed una seconda incubazione di 30min a 4°C con DynaBeads (Dyna, diluizione 1:50). Tramite un magnete si separa la popolazione cellulare ancorata alle DynaBeads che viene piastrata su fiasche da coltura contenenti medium.

3.12. Isolamento e Coltura di Colangiociti di Topo Pkd2^{WS25/-} (Modello Murino di ADPKD)

Il modello di topo Pkd2^{WS25/-} (gentilmente messi a disposizione dal Dr S. Somlo, Yale University, New Haven, CT) è un modello ortologo all'ADPKD umano causata da una mutazione condizionale di PKD2, indotte tramite somministrazione di tamoxifene (Wu, 1998). Questo modello sviluppa cisti epatiche sia su rene che sul fegato; i topi WT sono stati utilizzati come controllo. Dotti biliari e cisti biliari sono stati isolati seguendo il protocollo di microdissezione descritto da Masyuk et al (Masyuk, 2000), opportunamente modificato. Dotti e cisti biliari così ottenuti sono

state piastrati su piastre rivestite di collagene e coltivati con un medium di coltura contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Vroman, 1996; Nishio, 2005). Il fenotipo biliare di queste colture è stato confermato con colorazione immunohistochimica per CK7.

3.13. Determinazione della Proliferazione Cellulare con Saggio MTS su Colangiociti Umani e Murini

Colangiociti umani e murini sono stati coltivati in fiasche da coltura ed espansi con un medium contenente rispettivamente il 3% ed il 10% di FBS. Sono state successivamente passate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 5000 cellule/pozzetto e mantenute in medium quiescente (0.5% FBS) per 48h. Successivamente le cellule sono state stimolate per 4 giorni con medium contenente VEGF e/o Ang-1 a differenti concentrazioni (R&D Systems). La proliferazione è stata valutata con il kit CellTiter96 Aqueous One Solution (Promega), che sfrutta la riduzione dei sali di tetrazolio contenuti nel kit da parte delle cellule per dare una reazione colorimetrica.

3.14. Misurazione dei Livelli di VEGF

Per valutare la quantità di VEGF secreta da colture cellulari di colangiociti umani isolati da ADPKD e da fegati di pazienti trapiantati per cirrosi alcolica ed utilizzati come controllo, abbiamo utilizzato un saggio ELISA per VEGF (Biosource International) con il quale abbiamo valutato la concentrazione di VEGF presente nel medium ottenuto da inserti sui quali erano stati coltivati i colangiociti (5000 cellule/pozzetto).

3.15. Analisi Statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard; la comparazione tra i gruppi è stata calcolata con il test-*t* di Student mentre l'analisi statistica dei dati immunohistochimici è stata eseguita utilizzando il test χ^2 . Le correlazioni tra variabili continue normalmente distribuite sono state calcolate con il coefficiente di correlazione di Pearson, mentre le correlazioni non

parametriche tra elementi cellulari (RDC, IHBC ed HPC) e estensione della fibrosi pericellulare (valutazione semiquantitativa) sono state calcolate con il test di Spearman. L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS 10.0 (SPSS Inc.) e valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

4. Studio 1. EFFETTI SULLA MALATTIA POLICISTICA DEL RENE AUTOSOMICA DOMINANTE (ADPKD) DELL'IPERESPRESSIONE DI FATTORI ANGIOGENETICI IN COLANGIOCITI UMANI E MURINI.

4.1. Premessa

Nella prima parte di questa tesi siamo andati a studiare l'ADPKD, una patologia caratterizzata da un'abnorme sviluppo di cisti renali, epatiche e pancreatiche, che si ingrandiscono nel tempo e che appaiono circondate da un ricco plesso vascolare; poiché diversi lavori hanno dimostrato il coinvolgimento del sistema del VEGF e di quello delle angiopoietine, nella patogenesi di malattie che colpiscono l'epitelio renale e polmonare (Tufro, 1999; Jakkula, 2000) abbiamo ipotizzato che anomalie nella concentrazione locale di questi fattori angiogenetici potessero essere responsabili della crescita delle cisti biliari e della formazione del plesso vascolare peribiliare che le circonda.

Abbiamo quindi studiato il profilo immunofenotipico di questi fattori angiogenetici sulle strutture biliari di campioni umani di ADPKD e malattia di Caroli, una patologia cistica non correlata geneticamente con l'ADPKD e su campioni di fegati fetali normali; ne abbiamo valutato l'effetto su colture cellulari di colangiociti umani, di ratto e di topo $Pkd2^{SW25/-}$ un modello murino ortologo dell'ADPKD.

4.2. Risultati

Espressione immunoistochimica dei fattori angiogenetici sull'epitelio biliare nell'ADPKD. Abbiamo analizzato l'espressione dei diversi fattori angiogenetici su campioni di ADPKD, Malattia di Caroli e fegati normali. Per entrambe le patologie, ADPKD e malattia di Caroli, tutti i fattori angiogenetici presentavano un high grade staining significativamente superiore ai normali, mentre tra le due patologie, solo Ang-1 e Tie-2 risultavano significativamente aumentati nell'ADPKD rispetto alla malattia di Caroli (tab. 5).

	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2	Ang-1	Ang-2	Tie-2
NL	0%	0%	33.3%	0%	33.3%	0%
ADPKD	82.3%	78.6%	86.6%	85.7%*	87.5%	85.7%#
Caroli	80%	80%	100%	25%*	75%	28.6%#

Tab 5: percentuale di high grade staining (HGS) per i differenti fattori angiogenetici sulle strutture biliari di ADPKD, malattia di Caroli e fegati normali; entrambe le patologie presentano un HGS significativamente superiore ai normali, mentre solo Ang-1 e Tie-2 risultano up-regolati nell'ADPKD rispetto al Caroli * $p < 0.05$; # $p < 0.01$

Con tecniche di doppia immunofluorescenza, campioni selezionati di ADPKD e Caroli sono stati colorati simultaneamente con VEGF, Ang-1 o Tie-2 e con un marcatore di epitelio biliare (HEA-125): mentre le cisti dei campioni di ADPKD esprimevano i tre fattori angiogenetici, invece quelle della malattia di Caroli risultavano essere solo VEGF positive (Fig. 5).

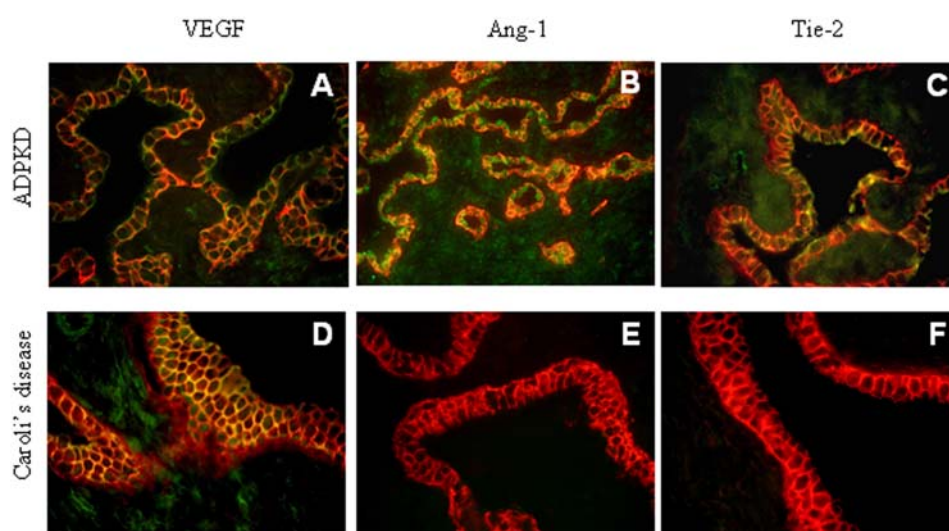


Fig. 5: doppia immunofluorescenza di sezioni di ADPKD e malattia di Caroli che mostra le principali differenze immunofenotipiche tra ADPKD e malattia di Caroli. Nell'ADPKD, la coespressione (fluorescenza gialla) di HEA-125 (fluorescenza rossa), un marcatore biliare, con VEGF, Ang-1 e Tie-2 (fluorescenza verde, rispettivamente A, B e C) mostra la loro espressione sulle strutture cistiche. Nella malattia di Caroli solo VEGF (D) risulta essere coespresso con HEA-125 dalle cisti, ma non Ang-1 (E) e Tie-2 (F)

Espressione dell'mRNA delle angiopoietine -1 e -2 nell'ADPKD. Poiché da studi condotti sulle cellule endoteliali è noto che l'attivazione di Tie-2 ad opera delle angiopoietine dipende dal rapporto tra Ang-1 (agonista) ed Ang-2 (antagonista), siamo andati a calcolare il rapporto Ang-1/Ang-2 tramite *Real Time-PCR*, utilizzando la β -actina come gene di normalizzazione; *primers* specifici per le angiopoietine umane sono stati disegnati utilizzando il programma OLIGO Primer Analysis Software. Nel 65% dei campioni di ADPKD esaminati (9/16), il rapporto Ang-1/Ang-2 risultava aumentato rispetto al valore massimo trovato nei normali (Fig. 6); ciò risulta compatibile con l'ipotesi di un'attivazione di Tie-2.

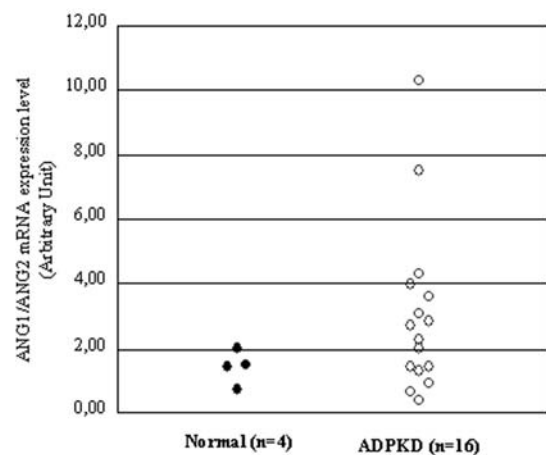


Fig. 6: livelli di espressione di mRNA di Ang-1 ed Ang-2 in campioni di ADPKD e su fegati normali valutati tramite real-time PCR. Il rapporto Ang-1/Ang-2 risulta aumentato nei campioni di ADPKD rispetto ai normali.

Secrezione del VEGF da parte di colangiociti umani in coltura. Su colangiociti umani ottenuti da trapianti per ADPKD e cirrosi alcoliche (controlli) posti in coltura abbiamo misurato la quantità di VEGF secreta nel terreno di coltura con saggio ELISA. La concentrazione di VEGF secreta da colangiociti ottenuti da ADPKD (n = 9) è risultata significativamente superiore rispetto ai controlli (n = 9) (326 ± 134 pg/ml vs 109 ± 66 pg/ml, $P < .001$) (Fig. 7).

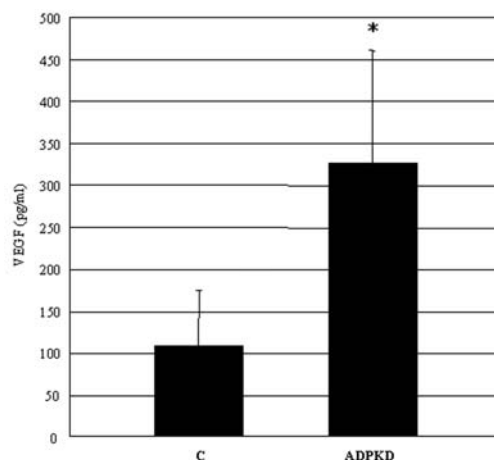


Fig. 7: secrezione di VEGF nel terreno di coltura di colangiociti normali (C) e di ADPKD valutata tramite ELISA. * $P < .001$ (media \pm SD): n = 9

Correlazione tra l'espressione immunohistochimica di VEGF sull'epitelio cistico e la densità microvascolare pericistica nell'ADPKD. Per valutare se il VEGF iper-espresso

dall'epitelio biliare cistico di ADPKD e malattia di Caroli potesse esercitare un effetto paracrino di richiamo sulla ricca vascolatura che accompagna le cisti biliari, è stata valutata la correlazione tra l'area cistica VEGF-positiva e la *microvessel density* (MVD); si è ottenuta una elevata correlazione lineare tra area VEGF-positiva e MVD ($r_s = 0.61$, $P < .01$) (Fig. 8), compatibile con un azione paracrina delle cisti biliari nel richiamo del plesso peribiliare che le circonda.

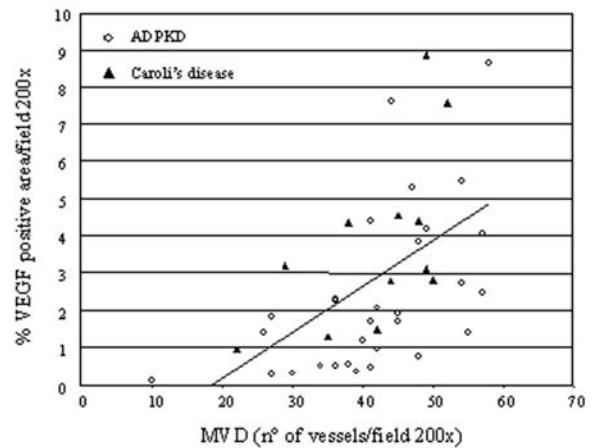


Fig. 8: correlazione tra area cistica VEGF-positiva ed MVD. L'area VEGF positiva correla strettamente con l'estensione del plesso peribiliare ($r_s = 0.61$, $P < .01$)

Effetto proliferativo del VEGF e delle angiopoietine su colangiociti di ratto. Al fine di verificare se l'aberrante espressione colangiocitaria dei fattori angiogenetici nell'ADPKD potesse esercitare, oltre ad un effetto paracrino sui vasi, anche un effetto autocrino di tipo proliferativo è stato testato l'effetto di VEGF, Ang-1 e Ang-2 su colangiociti di ratto isolati e coltivati. Stimolazioni con dosi crescenti di VEGF (5-50ng/ml) aumentavano l'espressione di PCNA, mentre dosi crescenti di entrambe le angiopoietine (50-400ng/ml) non producevano alcuno stimolo proliferativo (Fig. 9); la somministrazione combinata di VEGF (25ng/ml) ed Ang-1 (200ng/ml)

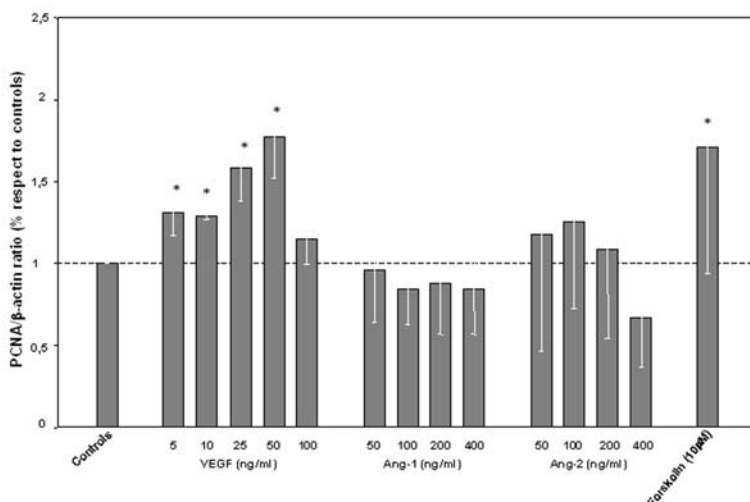
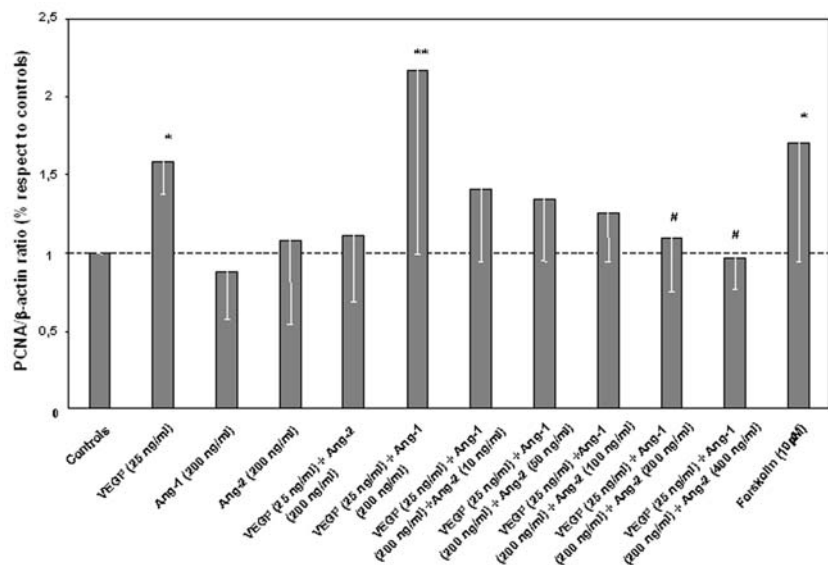


Fig. 9: curva dose-risposta relativa all'effetto proliferativo indotto da VEGF, Ang-1 ed Ang-2 su colangiociti di ratto, valutato con western blot per PCNA. VEGF, ma non Ang-1 ed Ang-2, stimola l'espressione di PCNA colangiocitaria in maniera comparabile alla forskolina. * $P < .05$ (media \pm SD); $n=6$ esperimenti per gruppo.

produceva il massimo incremento di espressione di PCNA, superiore di circa il 30% a quello osservato per il VEGF somministrato da solo; inoltre, questo stimolo proliferativo veniva contrastato da dosi crescenti di Ang-2 (Fig. 10). Questi dati dimostrano quindi come l'azione combinata di VEGF e Ang-1 sia in grado di indurre un'importante effetto proliferativo, un evento che può essere implicato nella crescita tumultuosa dell'epitelio cistico nell'ADPKD.

Fig. 10: effetto proliferativo indotto da VEGF, Ang-1 ed Ang-2 su colangiociti di ratto, valutato con western blot per PCNA. L'effetto massimo viene indotto da VEGF (25ng/ml) ed Ang-1 (200ng/ml); la somministrazione di Ang-2 inibisce sia la proliferazione indotta da VEGF solo sia quello da VEGF + Ang-1 in maniera dose dipendente. * P < .05; ** P < .01; # P < .05 vs VEGF+Ang-1 (media \pm SD); 6 esperimenti per gruppo.



Effetto proliferativo del VEGF su colangiociti murini ed umani. Per confermare i dati sperimentali nel ratto, abbiamo compiuto studi sull'effetto proliferativo di VEGF ed Ang-1 su colangiociti murini, ottenuti da topi $Pkd2^{SW25/-}$ (un modello ortologo dall'ADPKD umana) ed umani, ottenuti da pazienti trapiantati per ADPKD. Su colangiociti di topo abbiamo confermato i dati ottenuti nel ratto (Fig. 11); VEGF ha un effetto proliferativo dose-dipendente con un picco stimolatorio a 25 ng/ml ed un effetto sinergico esercitato dalla somministrazione contemporanea a VEGF di Ang-1. La risposta proliferativa di VEGF risultava significativamente superiore a quella dei controlli sia stimolati che non stimolati. Inoltre la stimolazione di VEGF aumentava la proliferazione dei colangiociti umani di cirrosi alcolica e di ADPKD in maniera dose dipendente, con picco massimo a 50 ng/ml (Fig. 12).

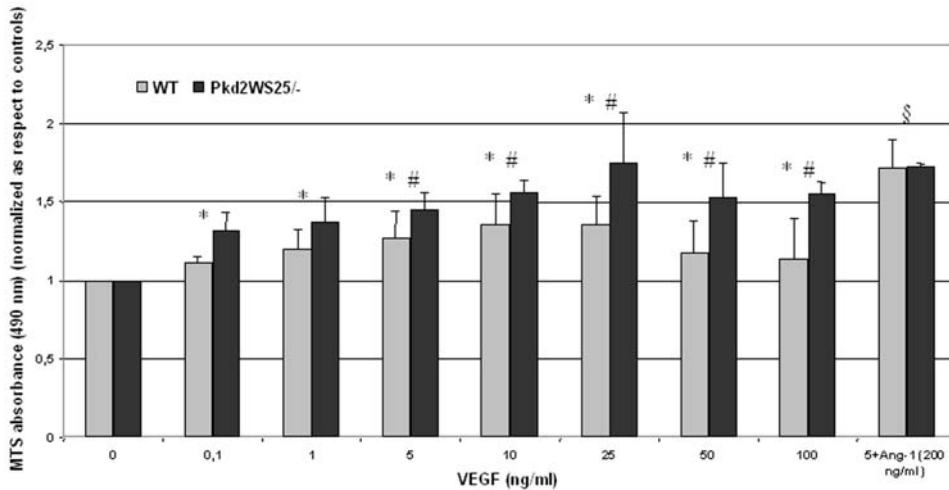


Fig. 11: curva dose-response dell'effetto proliferativo indotto da VEGF ed Ang-1 su colture di colangiociti di topo Pkd2^{SW25/-} (colonne nere) e WT (colonne grige), valutata con MTS proliferation assay. VEGF stimola la proliferazione dei colangiociti sia mutati che WT rispetto ai controlli non stimolati (* p < .05); a partire dai 5 ng/ml i colangiociti mutati risultano essere significativamente più sensibili alla proliferazione rispetto ai WT (# p < .05). La somministrazione combinata di VEGF 25 ng/ml ed Ang-1 (200 ng/ml) mostra un effetto additivo rispetto ai colangiociti stimolati col solo VEGF (§ p < .05) (media ± SD); 4-20 esperimenti per gruppo.

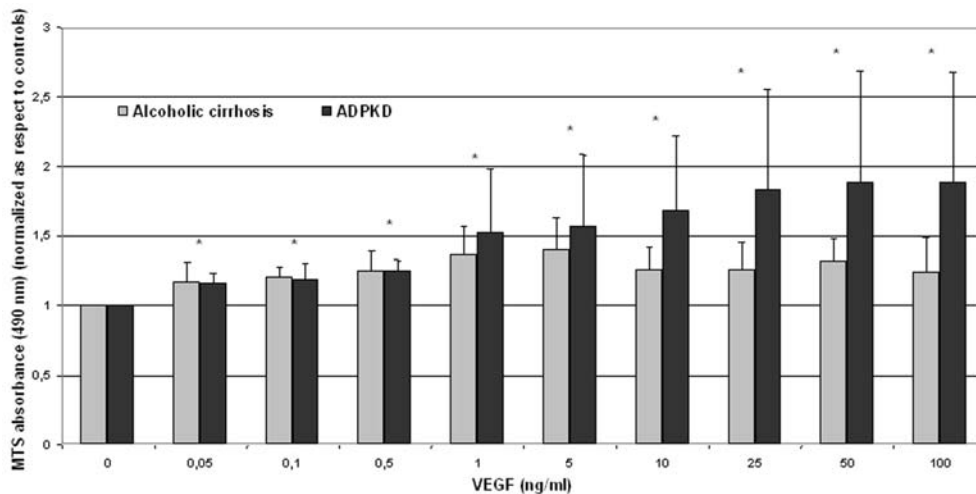


Fig. 12: curva dose-response dell'effetto proliferativo indotto da VEGF su colture di colangiociti umani ottenuti da fegati trapiantati per ADPKD (colonne nere) e controlli (cirrosi alcolica, colonne grige), valutata con MTS proliferation assay. VEGF stimola la proliferazione sia dei controlli che dei colangiociti di ADPKD rispetto ai controlli non stimolati (* p < .05) (media ± SD); 3-8 esperimenti per gruppo.

Espressione immunoistochimica di fattori angiogenetici sulle lamine duttali durante l'ontogenesi biliare nell'uomo. Poiché nell'ADPKD, come in tutte le malattie DPM-relate, è patogeneticamente implicato un arresto maturativo dei dotti biliari durante l'ontogenesi epatica, abbiamo voluto indagare se i fattori angiogenetici fossero espressi durante i differenti stadi di

maturazione epatica embrionale. Nel corso dell'intero processo maturativo, le lamine duttali sono risultate costantemente positive per il VEGF e negative per entrambe le angiopoietine Ang-1 ed Ang-2; l'espressione dei recettori di VEGF e di Tie-2 è riscontrabile solo nelle fasi più immature di sviluppo per venire poi progressivamente *down*-regolata col procedere della maturazione (Fig. 13). Questi dati indicano come l'espressione dei fattori angiogenetici ed in particolare quella dei recettori di VEGF ed angiopoietine, possa essere indice di un blocco maturativo a livello fetale della maturazione dei dotti biliari.

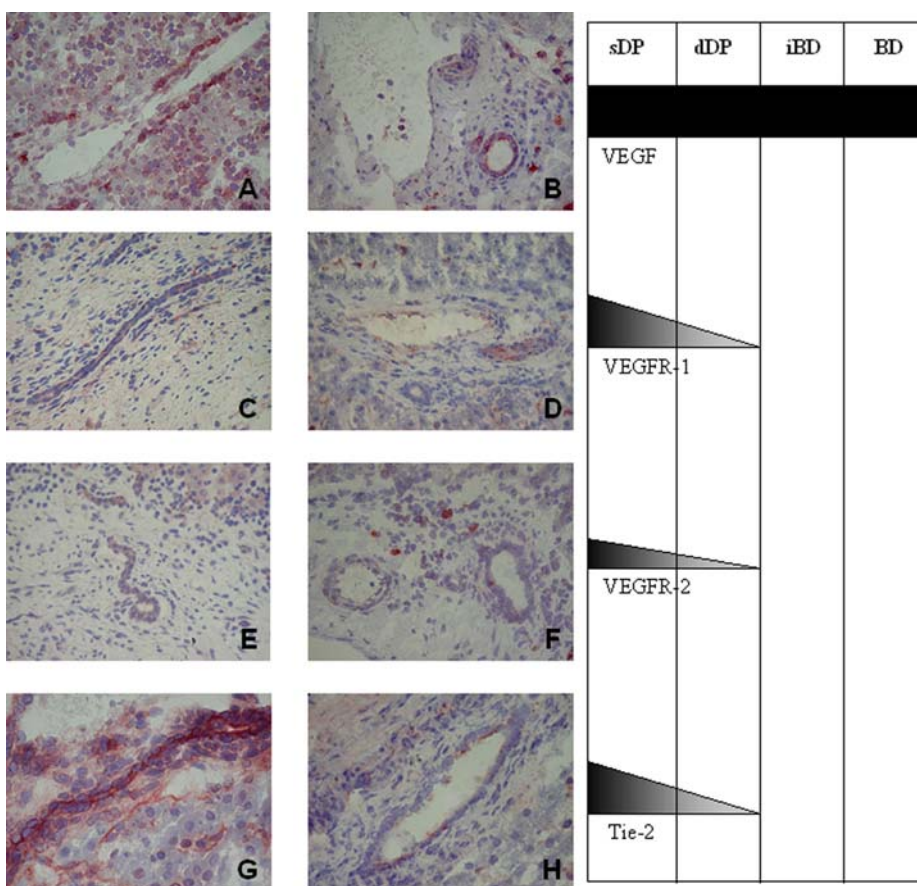


Fig. 13: espressione di VEGF (A,B), VEGFR-1 (C,D), VEGFR-2 (E,F) e Tie-2 (G,H) nello sviluppo embrionale dei dotti biliari. Il diagramma di destra illustra le variazioni di intensità della colorazione a livello di strutture biliari nei diversi stadi maturativi epatici (cfr. materiali e metodi). VEGF viene costantemente espresso dalle strutture biliari durante tutto l'arco maturativo (A,B), mentre VEGFR-1, VEGFR-2 e Tie-2 sono espressi solo nelle fasi più precoci dello sviluppo biliare per venire progressivamente *down*-regolati. Ingrandimento: A-H x400.

5. Studio 2. ESPRESSIONE DEI FATTORI DI CRESCITA ANGIOGENETICI DA PARTE DELLE CELLULE EPITELIALI MODULA L'ARTERIOGENESI DURANTE L'ONTOGENESI EPATICA.

5.1. Premessa

Dopo aver analizzato l'azione autocrina e paracrina dei sistemi del VEGF e delle Angiopietine, sia su tessuti patologici umani che in sistemi *in vitro*, ed aver analizzato l'espressione di questi su campioni di fegato fetale, al fine di dimostrarne l'effetto autocrino sui dotti biliari durante lo sviluppo fetale, siamo andati a studiare l'espressione immunohistochimica di VEGF, dei suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2, di angiopoietina 1 e 2 e del loro recettore Tie-2 in sezioni di fegato fetale normale umano a differenti età gestazionali ed in topi *Hnf6^{-/-}*, topi che presentano perturbazioni nello sviluppo delle strutture biliari.

La nostra ipotesi è che, durante lo sviluppo fetale, l'espressione di questi fattori angiogenetici da parte della lamina duttale potesse essere il link molecolare che lega tra loro lo sviluppo coordinato nel tempo e nello spazio dei dotti biliari e dell'arteria epatica.

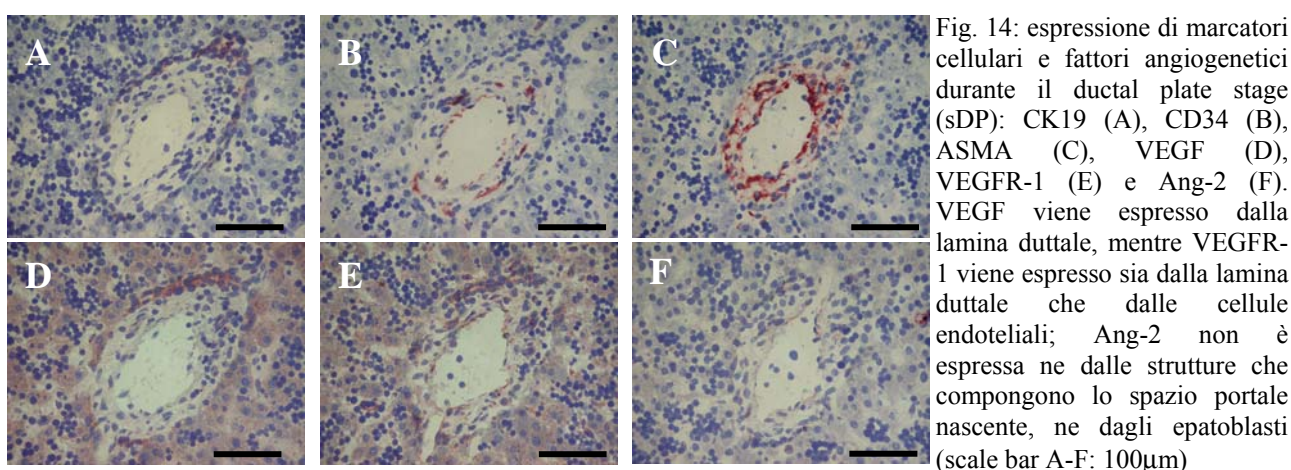
5.2. Risultati

Fegati fetali umani l'espressione immunohistochimica dei diversi fattori angiogenetici nei differenti stadi maturativi è riassunta in tabella 6. Al fine di evitare delle false positività indotte da reazioni aspecifiche degli anticorpi utilizzati, abbiamo provveduto a fare degli esperimenti con peptidi bloccanti. Tali esperimenti hanno portato alla completa abolizione del segnale dell'anticorpo primario, confermando così la genuinità della reazione immunohistochimica.

Stadio di Sviluppo	Marcatore/ tipo cellulare	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2	Ang-1	Ang-2	Tie-2	n° spazi portali analizzati
Ductal plate (sDP)	CK19	+	+	±	-	-	+	75
	CD34	-	+	±	-	-	-	
	ASMA	-	-	-	-	-	-	
	epatoblasti	±	-	-	+	-	-	
Ductal plate (dDP)	CK19	+	+	±	-	-	±	135
	CD34	-	+	-	-	-	-	
	ASMA	-	-	-	-	±	±	
	epatoblasti	±	-	-	+	-	-	
Migratory stage	CK19	+	±	-	-	-	-	79
	CD34	-	+	-	-	-	-	
	ASMA	-	-	-	-	+	+	
	epatoblasti	±	-	-	+	-	-	
Bile duct stage	CK19	±	-	-	-	-	-	30
	CD34	-	+	-	-	-	+	
	ASMA	-	-	-	-	+	+	
	epatoblasti	±	-	-	+	-	-	

Tab. 6: espressione dei fattori di crescita angiogenetici nelle diverse popolazioni cellulari epatiche durante le fasi dello sviluppo epatico. +: espressione diffusa; ± espressione debole; -: nessuna espressione.

Nel *ductal plate stage*, gli epatoblasti cominciano a formare un monostrato di cellule CK19 positive che circondano lo spazio portale nascente che viene denominato “*lamina duttale monostratificata*” (sDP, fig. 14A). La sDP è intensamente VEGF (Fig. 14D) e VEGFR-1 (Fig. 14E)



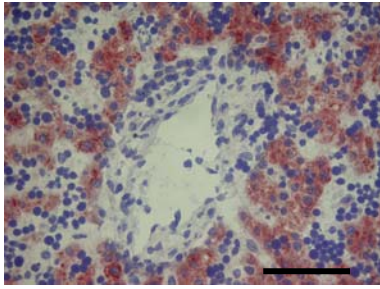


Fig. 15: espressione di Ang-1 da parte degli epatoblasti: Ang-1 è espresso dagli epatoblasti durante tutto lo sviluppo embrionale (scale bar: 100µm)

positiva, mentre è Ang-1 (Fig. 15) ed Ang-2 (Fig. 14F) negativa.

Gli epatoblasti invece risultano essere intensamente positivi per Ang-1 (Fig. 15) durante tutta l'ontogenesi epatica. In questo

stadio si possono notare cellule endoteliali, singole o come corte

strutture lineari, CD34 positive (Fig. 14B) sparse all'interno

dello spazio portale nascente, che sono VEGFR-1 positive (Fig.

14E) ed Ang-1, Ang-2 e Tie-2 negative. All'interno del

parenchima epatico si possono invece notare cellule singole od in piccoli aggregati che

coesprimono CD34 e VEGFR-2 (Fig. 16A-D); questo immunofenotipo è caratteristico degli

emangioblasti, una popolazione cellulare nota per fare da precursore alle cellule endoteliali (Ziegler,

1999; Pelosi, 2002). Infine si possono notare cellule ASMA-positive (Fig. 14C) sparse all'interno

dello spazio portale; queste, caratterizzate da una struttura fusiforme, non coesprimono alcun fattore

angiogenetico ad eccezione di Tie-2 (Fig. 17A).

Al momento della duplicazione della lamina duttale, una struttura nota come *lamina duttale*

duplicata (ddp), le cellule mantengono lo stesso immunofenotipo della sDP (positività per CK19,

VEGF e VEGFR-1) (Fig.18A,D,E), mentre le cellule CD34 e VEGFR-1 positive (Fig. 18B,E) si

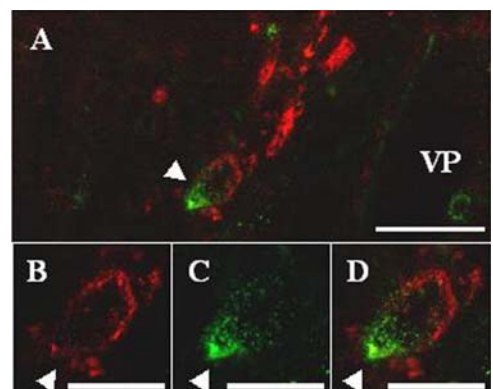
raggruppano in aggregati che rappresentano i primordi dell'arteria epatica nascente. Queste strutture

sono inoltre circondate dai primordi della parete muscolare dell'arteria, formata da uno strato

piuttosto disomogeneo di cellule ASMA (Fig. 18C), Ang-2 (Fig. 18F) e Tie-2-positive (Fig. 17B).

Inoltre attorno alla vena porta comincia a formarsi uno strato di cellule murali ASMA-positive.

Fig. 16: espressione di VEGFR-2 da parte di una sottopopolazione di cellule CD34 positive: doppia immunofluorescenza di VEGFR-2 (FITC) e CD34 (Texas Red). VEGFR-2 (A,D sovrapposti e B non sovrapposti) è coespresso da una piccola popolazione di cellule CD34 positive (A,D sovrapposti e C non sovrapposti) caratterizzate da forma ovoidale, e rintracciabili al margine dello spazio portale o nel parenchima epatico; è stato dimostrato che l'immunofenotipo CD34/VEGFR-2 positivo è caratteristico degli emangioblasti; le frecce indicano le aree di sovrapposizione (scale bar A: 50µm; B-D: 25µm). VP: vena porta



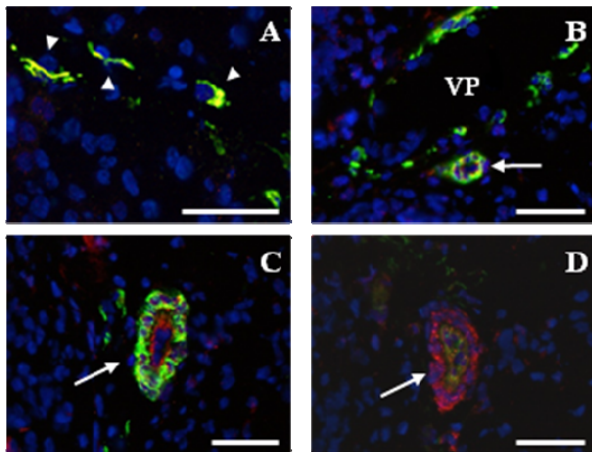


Fig. 17: espressione di Tie-2 sulle cellule vascolari nelle diverse fasi di sviluppo epatico. Doppia immunofluorescenza con Tie-2 (Texas Red) ed ASMA (FITC) (A-C) o CD34 (FITC) (D); colorazione nucleare con DAPI. Durante il Ductal plate stage Tie-2 è coespresso da singole cellule fusiformi ASMA positive (punta di freccia) sparse all'interno dello spazio portale (A). Le arterie immature esprimono Tie-2 solo a livello di cellule murali (B, freccia), mentre nel bile duct stage Tie-2 viene coespresso non solo dalle cellule ASMA positive (C, freccia), ma anche dalle EC Cd34 positive (D, freccia). Scale bar A-D: 50µm; VP: vena porta

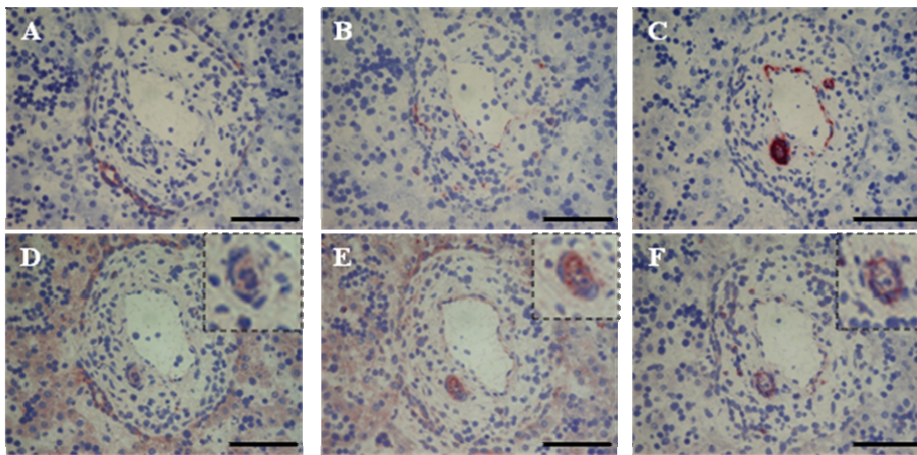


Fig. 18: espressione di marcatori cellulari e fattori angiogenetici durante il ductal plate stage (dDP): CK19 (A), CD34 (B), ASMA (C), VEGF (D), VEGFR-1 (E) e Ang-2 (F). VEGF viene espresso dalla lamina duttale, mentre VEGFR-1 viene espresso sia dalla lamina duttale che dalle cellule endoteliali; Ang-2 viene espressa dalle cellule muscolari lisce che circondano l'arteria immatura nascente (scale bar A-F: 100µm)

Durante il *migratory stage*, le lamine duttali maturate in strutture tubulari CK19 positive (Fig. 19A) migrano all'interno dello spazio portale a formare le strutture denominate *dotti biliari incorporanti* (iBD). Gli iBD mantengono la loro positività per VEGF (Fig. 19D), mentre VEGFR-1 viene downregolato (Fig. 19E).

Gli abbozzi dell'arteria nascente risultano maggiormente organizzati e formati da cellule endoteliali (CD34 positive) circondate da un primo abbozzo della parete arteriosa formata da cellule muscolari (ASMA positive) (Fig. 19B e C, rispettivamente). A questo stadio maturativo le arterie epatiche ancora immature mostrano un fenotipo caratterizzato dalla positività delle EC per CD34 (Fig. 19B), mentre le cellule murali che le circondano, ASMA positive (Fig. 19C), esprimono Tie-2 (Fig. 17B) e Ang-2 (Fig. 19F). A partire da questo stadio maturativo incomincia a formarsi anche il plesso peribiliare che accompagna le strutture biliari nascenti; questo è riconoscibile come un'insieme, a questo stadio ancora poco organizzato, di cellule CD34 positive non contornate da

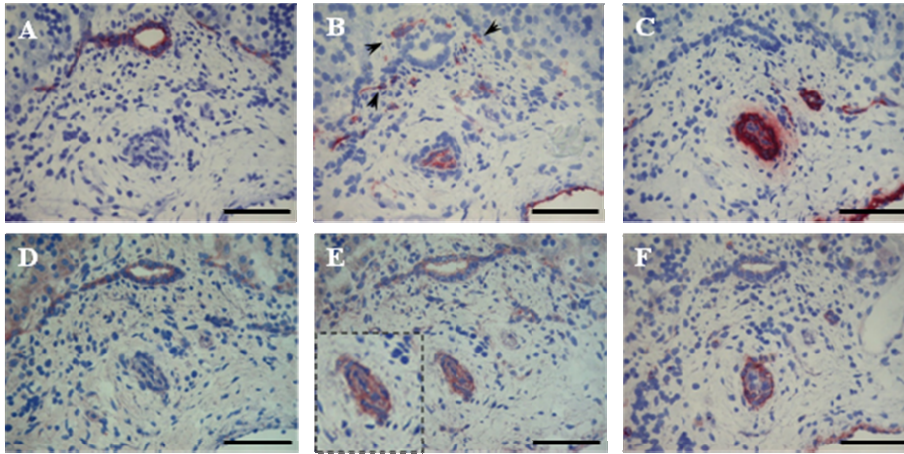


Fig. 19: espressione di marcatori cellulari e fattori angiogenetici durante il migratory stage: CK19 (A), CD34 (B), ASMA (C), VEGF (D), VEGFR-1 (E) e Ang-2 (F). VEGF viene espresso dalla lamina duttale, mentre VEGFR-1 viene down regolato nella lamina duttale mentre è intensamente espresso dalle EC; Ang-2 viene espressa dalle cellule muscolari lisce che circondano l'arteria immatura nascente; in B è possibile notare (freccie) la formazione di un abbozzo di plesso peribiliare CD34 positivo (scale bar A-F: 100µm)

cellule ASMA positive (freccie in Fig. 19B,C), strettamente anastomizzate alla lamina duttale in via di maturazione, formante una rete di piccoli capillari.

L'ultimo stadio maturativo esaminato è stato il **bile duct stage**, me quale i dotti biliari immaturi, formano strutture tubulari ben conformate e sono incorporate e completamente circondate dal mesenchima portale, mentre i residui di lamina duttale sono completamente riassorbiti per apoptosi. A questo stadio la positività duttale per VEGF diventa meno intensa (Fig. 20D) e scompare quella per VEGFR-1 (Fig. 20E) che si mantiene espresso solo dalle EC (Fig. 20E). L'arteria epatica inoltre risulta più matura ed è caratterizzata da un lume aperto e ben visibile formato da EC che esprimono CD34 (Fig. 20B) e da una parete muscolare più spessa ed organizzata ASMA positiva (Fig. 20C). Le arterie epatiche mature sono caratterizzate inoltre per la positività delle EC anche per Tie-2 (Fig. 17C,D), mentre le cellule murali esprimono intensamente sia Ang-2

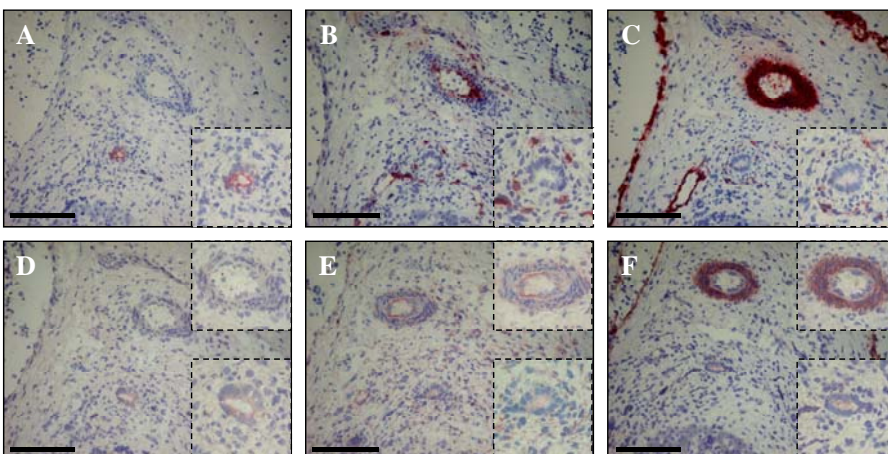


Fig. 20: espressione di marcatori cellulari e fattori angiogenetici durante il bile duct stage: CK19 (A), CD34 (B), ASMA (C), VEGF (D), VEGFR-1 (E) e Ang-2 (F). VEGF viene down-regolato nel dotto biliare incorporato e VEGFR-1 viene espresso solamente dalle EC; Ang-2 viene espressa dalle cellule muscolari lisce che circondano l'arteria matura; in B e C si nota un plesso peribiliare CD34 ed ASMA positivo più regolare e maturo (scale bar A-F: 100µm)

(Fig. 20F) che lo stesso Tie-2 (Fig. 17C,D). In questo stadio inoltre, il plesso peribiliare risulta essere maggiormente organizzato (Fig. 20B,C) anche se giungerà a completa maturazione solo verso i 15 anni di età (Terada 1993; Nakanuma, 1997).

Il *fegato adulto* infine è caratterizzato per una differente espressione di fattori angiogenetici sostanzialmente diversa rispetto a quanto avviene durante lo sviluppo epatico fetale: l'espressione di VEGF da parte delle strutture biliari risulta pressoché negativa, mentre rimane espresso dagli epatociti (**Studio 1**); VEGFR-1 viene espresso dalle sole EC, mentre la positività per VEGFR-2 scompare, inoltre, mentre l'espressione epatocitaria di Ang-1 rimane costante, scompare l'immunoreattività per Ang-2, mentre Tie-2 viene espresso selettivamente dalle EC (dati non mostrati).

Topi HNF6^{-/-} (Fig. 21) La formazione dell'arteria epatica nel topo differisce da quanto avviene nell'uomo, essa infatti comincia a formarsi, così come l'albero biliare, solo dopo la nascita e non nel periodo fetale (Clotman 2003). A partire dal giorno post-natale 1 (P1) piccoli aggregati di cellule ASMA positive si trovano presso le lamine duttali singole od in doppio strato; queste strutture cominciano ad assumere una struttura di arteria matura (con le cellule murali che circondano le cellule endoteliali formanti un lume riconoscibile), solo a partire da P4, periodo nel quale le strutture biliari vengono incorporate nello spazio portale. Nei topi WT, VEGF viene espresso dagli epatociti e dalle strutture biliari che siano esse lamine duttali (Fig. 21A) o dotti biliari maturi ed incorporati nello spazio portale (Fig. 21B); le arterie cominciano a strutturarsi in forma matura solo a partire dal momento nel quale il dotto biliare è incorporato nello spazio portale (Fig. 21C). In P4, le EC delle arterie mature nel topo WT esprimono VEGFR-1 (Fig. 21D), mentre le cellule muscolari lisce ASMA positive esprimono Tie-2 (Fig. 21E). I topi *Hnf6^{-/-}*, invece mantengono sia a P1 che a P4 strutture biliari immature VEGF positive (Fig. 21F,G) che ricordano delle lamine duttali ma queste strutture non maturano a dotti biliari maturi e le cellule muscolari lisce ASMA positive non si assemblano con le EC per formare degli abbozzi di arteria (Fig. 21H), cosicché le cellule VEGFR-1 e Tie-2 positive rimangono sparse e non strutturate all'interno del

parenchima portale (Fig. 21I,L). Come nell'uomo, infine, gli epatociti esprimono Ang-1 (dato non mostrato). Nel loro complesso questi dati dimostrano come la mancata incorporazione della lamina duttale esprime VEGF nel topo *Hnf6*^{-/-} si manifesta con il mancato sviluppo e maturazione dell'arteria epatica, che è verosimilmente dovuto ad un mancato reclutamento delle EC durante il *migratory stage*.

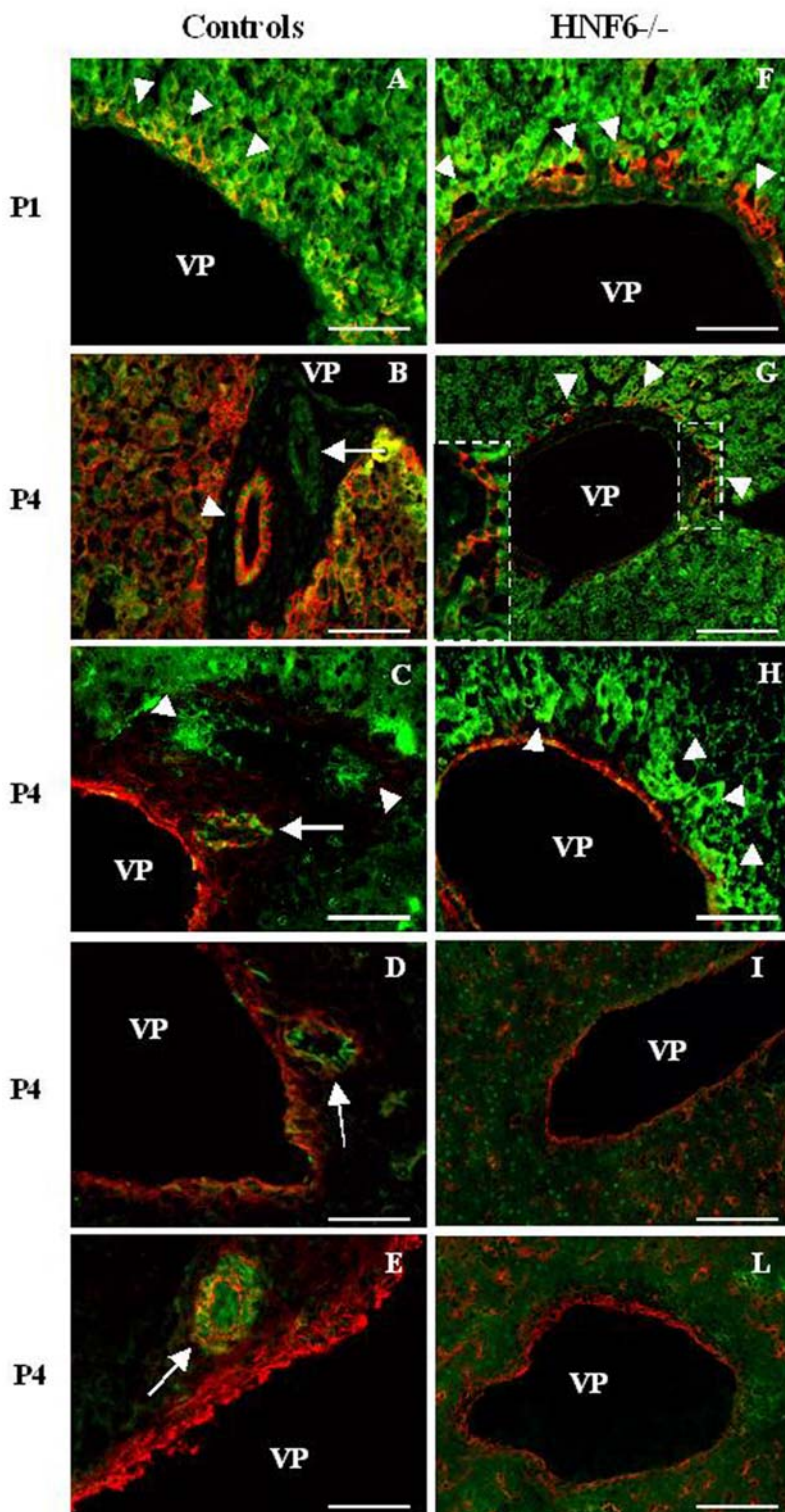


Fig. 21: espressione dei fattori di crescita angiogenetici in topi *Hnf6*^{-/-} e in controlli a P1 e P4. Doppia immunofluorescenza per pan-CKs (Alexa Fluor 594) e VEGF (Alexa Fluor 488) (A-B, F-G); ASMA (Alexa Fluor 594) e VEGF (Alexa Fluor 488) (C, H); ASMA (Alexa Fluor 594) e VEGFR-1 (Alexa Fluor 488) (D, I); ASMA (Alexa Fluor 594) e Tie-2 (Alexa Fluor 488) (E, L). VEGF è espresso sia dagli epatociti che dalle strutture biliari sia sottoforma di lamina duttale (P1) (A, F) che come dotti biliari maturi (P4) che si formano e si incorporano solo nei topi controllo ma non nei topi *Hnf6*^{-/-} (B, G). solo quando i dotti biliari (esprimenti VEGF) sono incorporati correttamente si formano gli abbozzi dell'arteria epatica (C), se le lamine duttali non si incorporano non è possibile notare alcuna struttura ASMA positiva ben conformata (D). L'immunoreattività per VEGFR-1 è limitata alle EC delle arterie mature dei topi controllo, contornate da uno spesso strato di cellule muscolari ASMA positive (D), strutture non presenti nei topi *Hnf6*^{-/-} (I). Tie-2 è espressa, mentre nei controlli vanno a formare le pareti muscolari dell'arteria (E), nei topi *Hnf6*^{-/-} invece si trovano sparse nel parenchima (L). Scale bar A-F, H: 50µm; G, I-L: 100µm). VP: vena porta. Freccie corte: lamina duttale/dotto biliare; freccie: arteria

6. Studio 3. ANALISI DEI MECCANISMI DI RIGENERAZIONE EPATICA NELLA SINDROME DI ALAGILLE E NELL'ATRESIA DELLE VIE BILIARI RIVELA UN RUOLO PER IL SIGNALING DEL NOTCH.

6.1. Premessa

In questo terzo studio siamo andati ad analizzare il meccanismo di rigenerazione/riparazione epatica in due patologie, una genetica e l'altra non genetica, le cui manifestazioni patofisiologiche sono agli estremi: la prima è la sindrome di Alagille (AGS), caratterizzata da marcata duttopenia e scarse infiammazione e fibrosi, la seconda è l'atresia delle vie biliari (BA) che si caratterizza per un'intensa reazione duttulare, fibrosi e marcato infiltrato infiammatorio; per questa patologia abbiamo analizzato sia campioni epatici ottenuti da pazienti trapiantati (BA-Tx), che da pazienti sottoposti ad intervento di Kasai (BA-Kasai).

Visto il ruolo fondamentale del gene Notch nella differenziazione biliare, abbiamo ipotizzato che difetti nel suo *pathway* potessero generare perturbazioni a carico del meccanismo riparativo/rigenerativo epatico. Al fine di testare questa ipotesi abbiamo studiato l'espressione di diversi marcatori fenotipici specifici e la quota relativa delle diverse popolazioni epiteliali coinvolte in questo meccanismo (RDC, IHBC ed HPC) in due patologie pediatriche, una con mutazione a carico di Jagged1/Notch2 (AGS) ed una senza (BA).

6.2. Risultati

Caratteristiche Cliniche dei Gruppi in Esame

Le principali caratteristiche cliniche e la numerosità dei gruppi analizzati sono state riportate in tabella 7. Da notare che tra i gruppi delle due patologie al momento del trapianto (AGS e Ba-Tx) non vi sono differenze significative né tra le età né tra i valori di bilirubina totale.

Patologia	n°	Età (Anni)*	Sesso (M/F)	Prurito	Bil tot (mg/dl)*	ALP (<140U/l)*	γGT (<35U/l)*	Indicazione per OLTx
AGS	10	1.66 [§] (0.94 – 16.78)	4/6	9/10 (90%)	22.35 [#] (8.3 – 85.1)	691 (120 – 1092)	434.5 ^{&} (37 – 1530)	- ritardo di crescita: 9/10 (90%) - ascite + difetti di sintesi proteica: 1/10 (10%)
BA-Tx	17	0.81 (0.50 – 27.70)	9/8	8/17 (47%)	12.6 (0.6 – 44.7)	432 (98 – 750)	151 ^{&^} (17 – 1164)	- ritardo di crescita: 12/17 (70%) - ascite: 6/17 (35%) - difetti di sintesi proteica: 2/17 (12%) - colangiti ricorrenti: 2/17 (12%) - ipertensione portale grave: 2/17 (12%)
BA-Kasai	13	0.21 [§] (0.08 – 0.94)	4/9	No	9 [#] (6.9 – 14)	464 (181 – 990)	421 [^] (200 – 1127)	

Tab. 7: caratteristiche cliniche e demografiche dei gruppi in esame; *median and range; [§] p<0.05; [#] p<0.01; [&] p<0.05; [^] p<0.01. Bil Tot: bilirubina Totale; ALP: fosfatasi alcalina; γGT: gamma glutamil-transpeptidasi.

Quantificazione delle Diverse Lesioni Istologiche

AGS e BA, sia al momento del trapianto che al momento dell'operazione di Kasai differiscono significativamente sia per la qualità che per l'estensione della reazione cellulare in risposta al danno (Fig. 22). L'area coperta dalle RDC è significativamente superiore sia nella BA-Tx ($8.37 \pm 6.69\%$) sia nelle BA-Kasai ($6.18 \pm 4.56\%$) rispetto all'AGS ($0.45 \pm 0.73\%$), nel quale le RDC sono praticamente assenti (Fig. 22A-C, G e I). Le HPC risultano essere aumentate in entrambi i gruppi di BA (BA-Tx 5.45 ± 4.46 e BA-Kasai 7.43 ± 5.32) rispetto all'AGS (0.64 ± 1.06). Al contrario l'area delle IHBC risulta essere significativamente superiore nell'AGS ($28.54 \pm 17.78\%$) rispetto alle due forme di BA (Ba-Tx 10.56 ± 10.55 e BA-Kasai $3.01 \pm 2.7\%$) (Fig. 22D-F ed H). interessante è il riscontro di una stretta correlazione positiva tra il numero delle HPC e l'area RDC ($r = 0.506$, $P < 0.0001$) (Fig. 23A), mentre vi è una correlazione inversa tra numero di HPS ed area

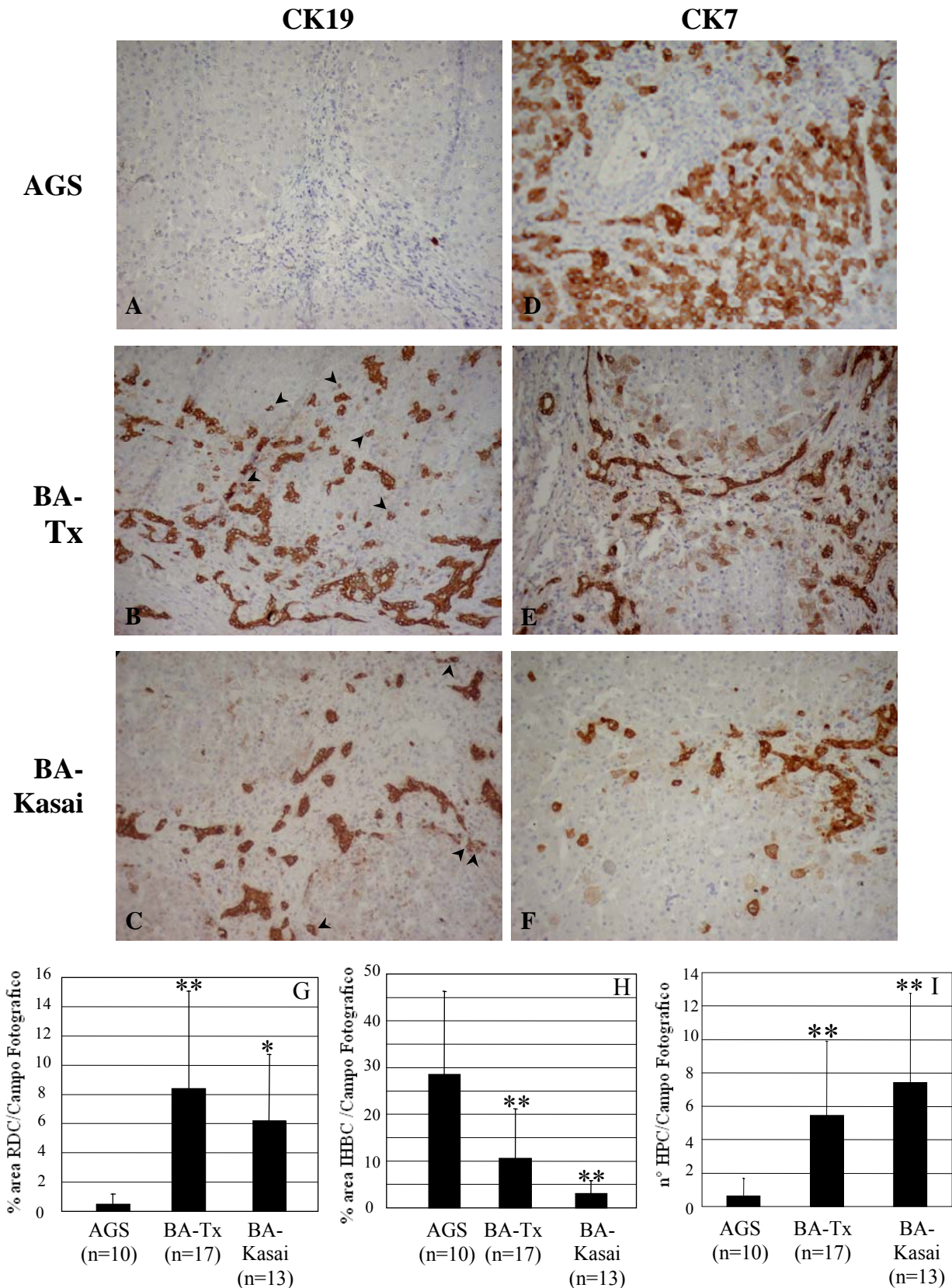


Fig. 22: analisi morfometrica delle aree di RDC (G) ed IHBC (H) e del numero di HPC (I) in campioni di AGS (A,D), BA al trapianto (B,E) e BA al momento della Kasai (C,F) colorati per CK19 (A-C) e CK 7 (D-F); da notarsi l'assenza di RDC ed HPC nei campioni di AGS (A) e la diminuzione dell'area localizzazione prettamente periportale delle IHBC di entrambi i campioni di BA (E,F); le punte delle frecce indicano le HPC in B e C; * P < 0.01 vs AGS; ** P < 0.0001 vs AGS; ingrandimento 200x (A-F)

IHBC ($r = -0.511, P < 0.0001$) (Fig. 23B). Non è invece stata riscontrata alcuna correlazione tra

l'area IHBC ed i valori di bilirubina ($r = 0.06$, $P =$ non significativo), risultato compatibile con l'ipotesi che la differente estensione del'area IHBC non sia dovuta ad un diverso grado di colestasi, ma al difetto genetico dell'AGS.

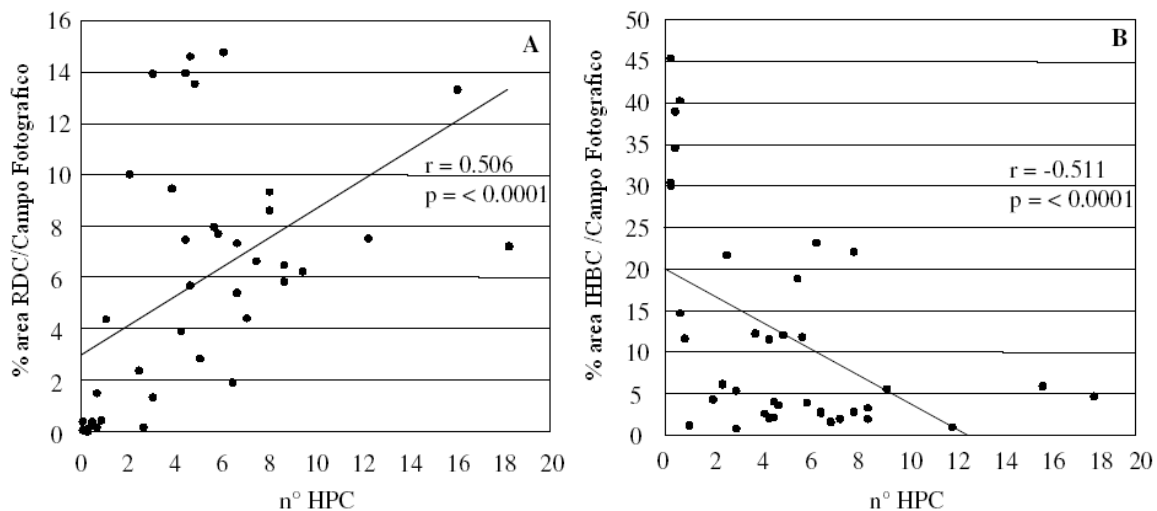


Fig. 23: Correlazione la % di area coperta da RDC (A) ed IHBC (B) con il numero delle HPC; il n° di HPC correla significativamente sia in maniera positiva con l'estensione della reazione dutturale ($r = 0.506$, $P < 0.0001$) sia negativamente con l'area delle IHBC ($r = -0.511$, $P < 0.0001$).

Immunofenotipo delle IHBC

L'immunofenotipo delle cellule transizionali è stato studiato tramite doppia immunofluorescenza utilizzando come marcatore per riconoscere le IHBC, l'espressione di CK7. Malgrado le IHBC si differenziassero tra le due patologie per l'estensione e la localizzazione di queste cellule (nella BA esse sono prettamente in zona periportale, mentre nell'AGS si spingono profondamente nel parenchima epatico) (Fig. 24), tali cellule non risultavano differire tra le colangiopatie ne per l'espressione di marcatori epatocitari come LKM-1 (un citocromo strettamente epatocitario) (Fig. 24A,B) e BSEP (una pompa espressa selettivamente dalla membrana epatocitaria) (Fig. 24C) ne per l'espressione di marcatori strettamente biliari come NCAM ed EMA, rispettivamente marcatori di dotti biliari immaturi e maturi (dato non mostrato); l'unica differenza immunofenotipica risultava la positività delle IHBC di BA per HEA-125, proteina non espressa dalle cellule intermedie dell'AGS. Poiché HEA-125 è espresso in diverse colangiopatie dalle RDC e dalle IHBC già indirizzate verso un lineage biliare (Fabris, 2000; Crosby, 2001), questo dato

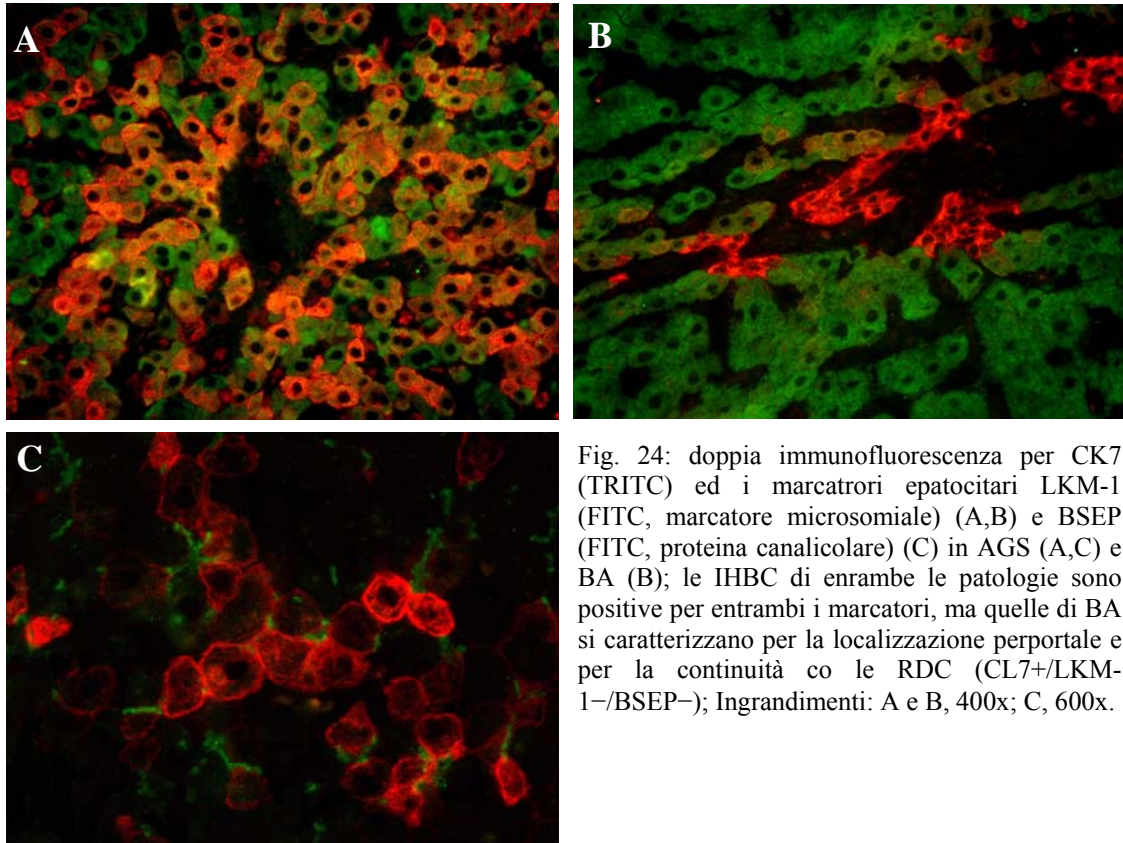


Fig. 24: doppia immunofluorescenza per CK7 (TRITC) ed i marcatori epatocitari LKM-1 (FITC, marcatore microsomiale) (A,B) e BSEP (FITC, proteina canalicolare) (C) in AGS (A,C) e BA (B); le IHBC di entrambe le patologie sono positive per entrambi i marcatori, ma quelle di BA si caratterizzano per la localizzazione perportale e per la continuità con le RDC (CL7+/LKM-1-/BSEP-); Ingrandimenti: A e B, 400x; C, 600x.

è compatibile con una incompleta maturazione delle IHBC dell'AGS verso un fenotipo strettamente biliare. Abbiamo cercato anche di caratterizzare l'immunofenotipo delle IHBC prendendo in esame l'espressione di diversi fattori di crescita implicati nello sviluppo biliare ed epatocellulare. In entrambe le colangiopatie gli epatociti e le IHBC erano positivi per HNF4 α ed HNF6 e le RDC risultavano positive per HNF6 ma non per HNF4 α (Fig. 25). HNF1 β viene espresso in entrambe le patologie da RDC e dotti biliari, ma è interessante notare come, mentre le IHBC della BA sono positive per tale fattore di trascrizione, invece quelle dell'AGS risultino negative (Fig. 26A,B). questi dati sono a supporto dell'ipotesi che il blocco della determinazione del lineage biliare, che portano ad un accumulo di cellule transizionali da parte delle mutazioni di Jagged1/Notch2, siano localizzate prima dell'espressione di HNF1 β .

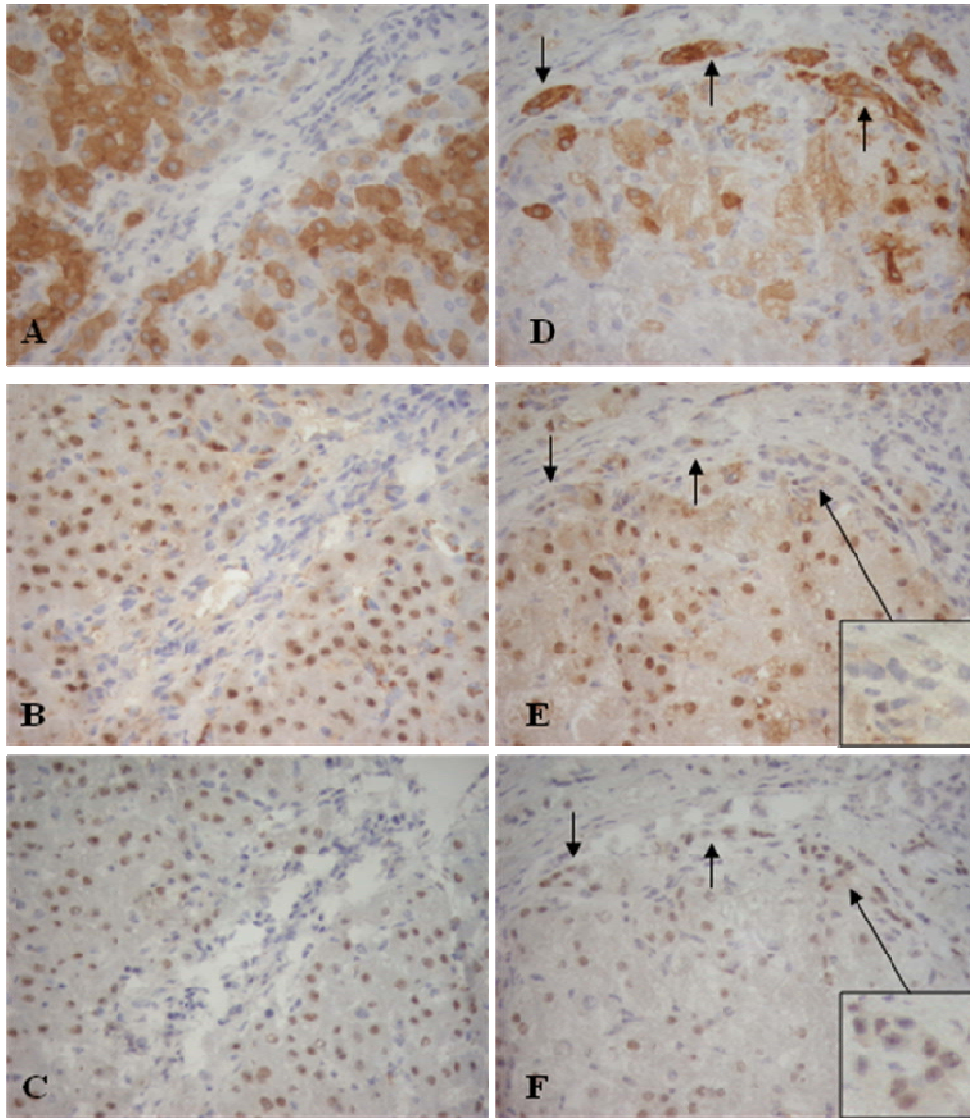


Fig. 25: espressione di HNF1 α ed HNF6 in sezioni seriate di AGS (A-C) e BA (D-F). RDC, IHBC ed HPC sono identificate dall'immunoreattività di CK7. In entrambe le colangiopatie HNF1 α (B,E) ed HNF6 (C,F) sono espresse dagli stessi tipi cellulari: HNF1 α ed HNF6 sono espresse sia dagli epatociti che dalle IHBC di AGS e BA, mentre le RDC (freccie in Ae D) sono positive per il solo HNF6. Ingrandimenti; A-F, 400x; inserti, 600x.

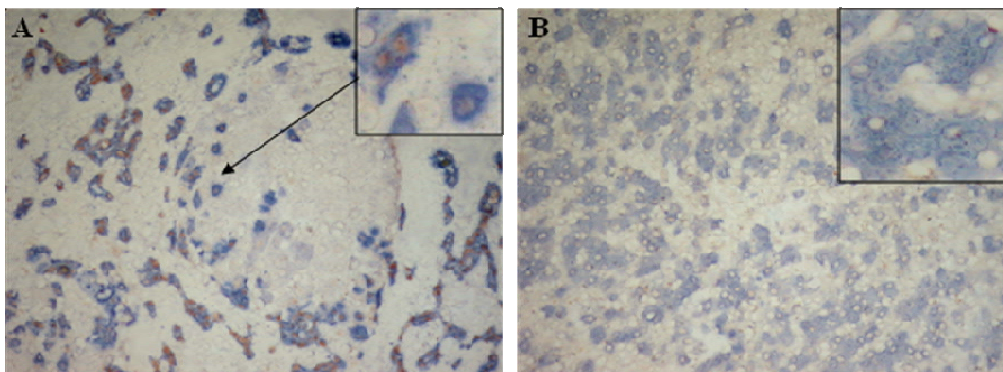


Fig. 26: doppia immunoperossidasi che evidenzia la differente espressione di HNF1 β in BA (A) ed AGS (B); RDC, IHBC ed HPC (CK7, blu) di BA esprimono HNF1 β (marrone), un fattore trascrizionale biliare regolato da Jagged1/Notch2, mentre le IHBC di AGS non esprimono tale proteina. Ingrandimenti: A e B, 200x; inserti, 600x

Calcolo del rapporto p21^{waf1}/Ki67 sugli epatociti di AGS e BA

L'ipotesi più comune riguardo l'attivazione del compartimento delle HPC è quella secondo la quale queste proliferino in risposta al blocco proliferativo degli epatociti (Roskams, 2003b; Clouston, 2005; Santoni-Rugiu, 2005). Ma differenze nella reazione dutturale potrebbero essere dovute ad una differente capacità proliferativa degli epatociti; per questo abbiamo studiato la proporzione tra l'espressione immunohistochimica di p21^{waf1} (un marcatore di una diminuzione della capacità replicativa) e di Ki67 (un marcatore di proliferazione). Per distinguere IHBC ed epatociti abbiamo fatto una doppia colorazione con CK7 (color blu) e p21^{waf1} e Ki67 (color rosso bruno). Tutti i gruppi sono caratterizzati da un aumento significativo della proliferazione degli epatociti rispetto ai controlli (AGS, 5.64 ± 2.75 ; BA-Tx, 5.58 ± 3.66 ; BA-Kasai, 12.57 ± 5.73 vs NL, 1.60 ± 0.97) (Fig. 27A). L'indice di arresto replicativo (cellule p21^{waf1}-positive/cellule Ki67-positive) non differisce significativamente tra le due colangiopatie, ma è significativamente inferiore ai controlli (AGS, 0.21 ± 0.36 ; BA-Tx, 0.16 ± 0.23 , BA-Kasai, 0.13 ± 0.24 ; NL, 0.62 ± 0.69) (Fig. 27B). Questi dati sono in accordo con l'ipotesi che le differenze di AGS e BA riguardo l'estensione di RDC ed IHBC non siano dovute ad una inibizione della proliferazione epatocitaria, ma ad un'intrinseca incapacità dei fegati di AGS di generare la reazione dutturale.

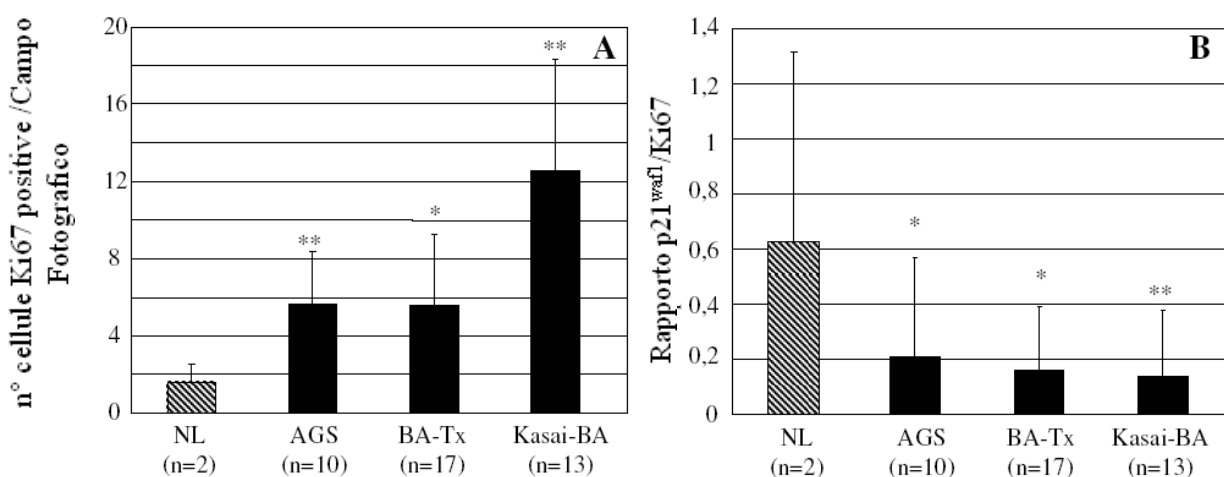


Fig. 27: proliferazione (A) ed indice di mitoinibizione (B), degli epatociti di AGS, BA-Tx e BA-Kasai. In tutte le colangiopatie la proliferazione degli epatociti è significativamente aumentata rispetto ai NL (A); di contro, l'indice di mitoinibizione è significativamente ridotto in AGS, BA-Tx e BA-Kasai rispetto ai normali. * $P < 0.01$ vs NL; ** $P < 0.0001$ vs NL.

Differenze nel Tipo di Reazione Duttulare Riflettono un Differente Tipo di Fibrosi ed una Diversa Severità della Malattia

E' ormai accettato che la reazione duttulare sia parte attiva nel processo infiammatorio e di risposta al danno epatico (Strazzabosco, 2005) e nella formazione della fibrosi portale; vista la quasi assenza di RDC nell'AGS, ci aspettiamo una fibrosi trascurabile. Abbiamo quindi calcolato lo spessore dei setti fibrotici e l'estensione della fibrosi pericellulare nelle due patologie in esame; le due colangiopatie presentavano grosse differenze riguardo entrambi i parametri in esame: la BA presentava setti fibrotici significativamente più spessi rispetto all'AGS (rispettivamente $339.44 \pm 230.39\mu\text{m}$ vs $66.58 \pm 75.42\mu\text{m}$, $P < 0.0001$) (Figg. 28A,B ed E), mentre la fibrosi pericellulare risultava più estesa nell'AGS rispetto alla BA (rispettivamente 1.8 ± 0.79 vs 0.35 ± 0.61 , $P < 0.0001$) (Figg. 28C,D ed F); la correlazione tra area RDC e spessore dei setti fibrotici è risultata molto significativa ($r = 0.742$, $P < 0.0001$) (Fig. 28G), così come quella tra HPC e spessore dei setti ($r = 0.605$, $P < 0.0001$), mentre l'estensione dell'area IHBC correla in modo inverso con lo spessore dei setti ($r = -0.620$, $P < 0.0001$) (Fig. 28H). la fibrosi pericellulare mostra invece una significativa correlazione negativa sia con le RDC ($r = -0.519$, $P < 0.006$) che con il numero di HPC ($r = -0.436$, $P < 0.05$). Questi risultati suggeriscono che l'estensione ed il tipo della reazione duttulare siano uno dei fattori più importanti nello sviluppo della fibrosi portale nelle colangiopatie colestatiche.

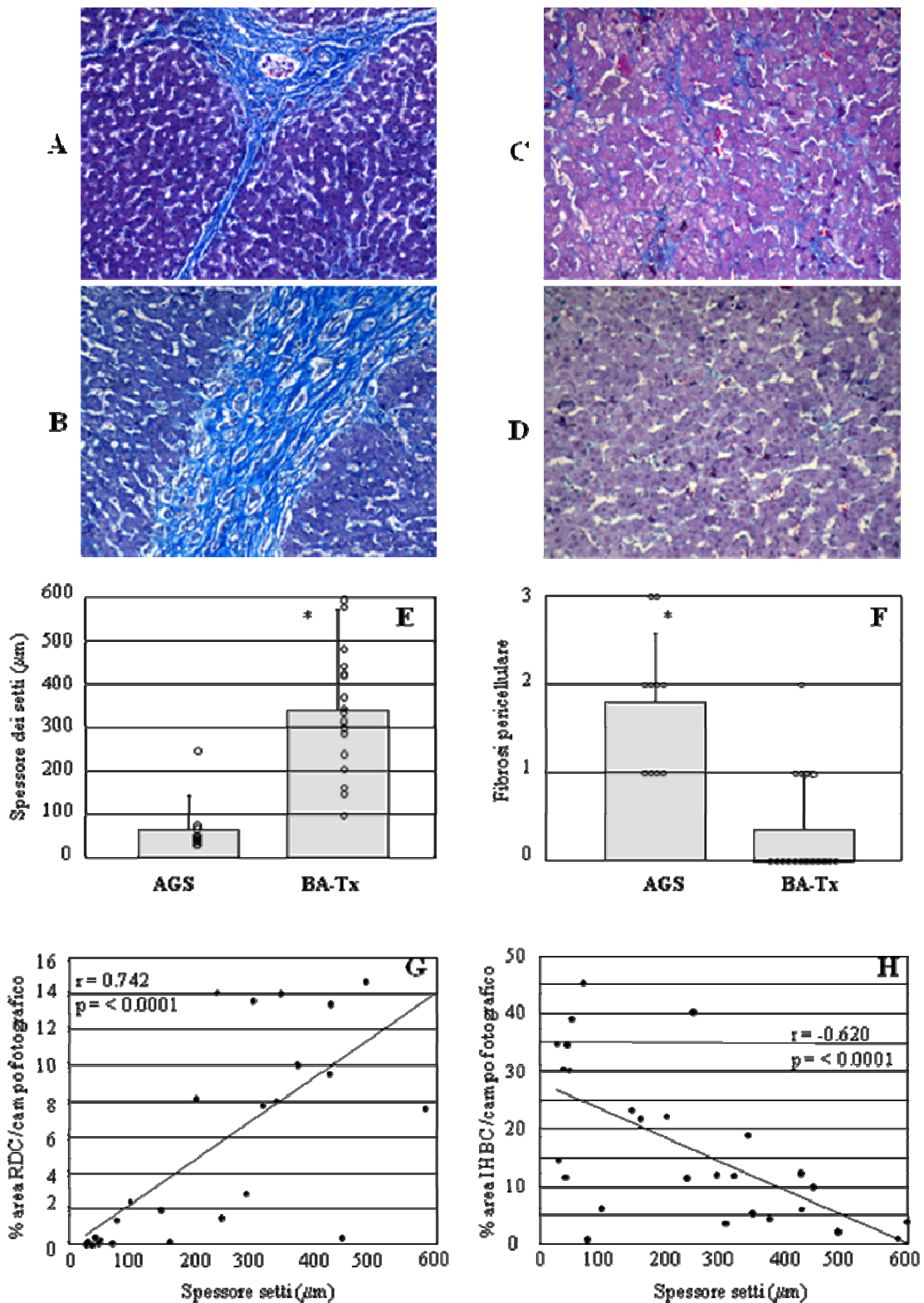


Fig. 28: differente tipologia di fibrosi tre AGS (A,C) e BA (B,D) sfruttando la colorazione tricromia di Masson; i setti fibrotici sono evidenziati in A e B, mentre la fibrosi pericellulare in C e D. E ed F mostrano i valori e la distribuzione dello spessore dei setti fibrotici e della fibrosi pericellulare nei campioni di AGS e BA. Lo spessore dei setti fibrotici correla positivamente con l'area delle RDC ($r = 0.742$, $P < 0.0001$) e negativamente con l'area delle IHBC ($r = -0.620$, $P < 0.0001$); * $P < 0.01$. Ingrandimento: A-D, 200x.

7. DISCUSSIONE:

7.1. Studio 1.

Mentre il difetto genetico che induce l'ADPKD è stato scoperto, risulta ancora ignoto il meccanismo fisiopatologico che porta all'ingrandimento delle cisti biliari. Come per le altre patologie disembrionogenetiche biliari è stato ipotizzato che anche queste derivino da malformazioni della lamina duttale embrionale; i fegati di pazienti sofferenti per ADPKD infatti presentano all'esame anatomopatologico sia residui di lamina duttale non riassorbita che un immunofenotipo in parte embrionale, come l'espressione di NCAM e MUC1 (Sasaki, 1996). La presenza di un aberrante plesso vascolare che circonda sia le cisti renali che quelle polmonari (Bello-Reus, 2001; Yakkula, 2000), nonché il ritrovamento di elevate quantità di fattori angiogenetici nel liquido prelevato da cisti epatiche (Nichols, 2004) ci ha fatto ipotizzare che la presenza e l'azione di fattori angiogenetici come VEGF, Ang-1 ed Ang-2, noti per la loro funzione di regolazione della crescita e maturazione delle strutture vascolari (Holash, 1999; Ross, 2001) potesse essere uno dei meccanismi fisiopatologici implicati nell'espansione cistica biliare.

A partire da questa ipotesi abbiamo deciso di analizzare l'espressione di VEGF, Ang-1, Ang-2 e dei rispettivi recettori (VEGFR-1, VEGFR-2 e Tie-2) in campioni di ADPKD, di malattia di Caroli, una patologia fibropolicistica dovuta a mutazioni di un gene differente (il gene della fibrocistina), e di fegati controllo. I dati ottenuti in questo studio dimostrano che 1) l'epitelio biliare cistico dell'ADPKD iperesprime VEGF, i suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2, Ang-1, Ang-2 e Tie-2; 2) l'iperespressione di VEGF da parte delle cisti biliari correla strettamente con il numero delle strutture vascolari portalì; 3) il rapporto Ang-1/Ang-2 risulta aumentato nei campioni di ADPKD rispetto ai controlli; 4) colangiociti umani isolati da pazienti trapiantati per ADPKD secernono nel medium di coltura una maggior quantità di VEGF rispetto ai controlli; 5) in colture di colangiociti ottenute da uomo, topo e ratto VEGF stimola la proliferazione colangiocitaria e l'effetto proliferativo è aumentato dalla somministrazione di Ang-1; 6) durante lo sviluppo epatico embrionale VEGF, i suoi recettori e Tie-2 sono espressi dalle strutture biliari nascenti e vengono

down-regolati col procedere della maturazione. L'insieme di questi dati suggeriscono che l'aberrante produzione di VEGF da parte dei colangiociti cistici nell'ADPKD possa da un lato promuovere, tramite un meccanismo autocrino, la proliferazione dei colangiociti stessi, dall'altro, tramite un meccanismo paracrino, sia responsabile dell'aumentato plesso vascolare pericistico.

Studi precedenti del nostro gruppo (Fabris, 2000) hanno dimostrato come le cisti biliari di ADPKD presentassero un aspetto immaturo sottolineato dall'espressione di NCAM, una molecola di adesione espressa dalle strutture biliari solo durante i primi stadi di sviluppo epatico fetale. L'espressione di VEGF, dei suoi recettori e di Tie-2 da parte delle strutture biliari fetali e delle cisti biliari depone ulteriormente a favore di un'immaturità di queste strutture. Abbiamo quindi ipotizzato che le mutazioni di policistina 1 e 2, proteine site nel cilio del colangiocita e che hanno funzione di meccanocettore che coordina l'azione di diverse proteine regolatorie (Masyuk, 2006), inducano il mantenimento di questo fenotipo immaturo; ciò è in accordo con l'ipotesi che mutazioni in queste proteine, inducendo malformazioni o assenza del cilio sulle cellule epiteliali, siano responsabili di un mancato spegnimento di numerosi geni di origine fetale, permettendo quindi l'espressione postnatale di proteine coinvolte nello sviluppo fetale (Wilson, 2001).

L'espressione di questi diversi fattori angiogenetici e dei loro recettori da parte delle cisti biliari, la presenza di un ricco plesso vascolare pericistico e l'aumentata secrezione di VEGF da parte di colangiociti di ADPKD in coltura indicano come i colangiociti mutati possano essere i responsabili sia della crescita autocrina delle cisti stesse sia dell'aumento del plesso pericistico. Inoltre l'iperespressione di Ang-1 sulle cisti biliari di ADPKD risulta essere un dato importante poiché la sua interazione con Tie-2 induce una maggior proliferazione sia su colangiociti di ratto che di topo $Pkd2^{sw25/-}$, mentre l'espressione di Ang-2 e la sua azione anti-proliferativa indicano come il rapporto locale tra queste due proteine sia fondamentale per l'attivazione di Tie-2; il ruolo fondamentale a livello epatico di questo rapporto è stato dimostrato nell'iperplasia nodulare focale (Paradis, 2003), una patologia malformativa vascolare. Abbiamo quindi quantificato l'espressione di Ang-1 ed Ang-2 ed il loro rapporto tramite Real Time-PCR, dimostrando come vi sia un aumento

del rapporto Ang-1/Ang-2 nei campioni di ADPKD rispetto ai controlli, indice di una maggiore risposta allo stimolo proliferativo da parte dei fegati malati. Infine, il fatto che Ang-1 sia più espresso da parte delle cisti di ADPKD rispetto a quelle di malattia di Caroli potrebbe spiegare le maggiori dimensioni raggiunte dalle prime rispetto a quelle della malattia di Caroli.

Poiché gli effetti del VEGF e delle angiopoietine sulle cellule endoteliali risultano ancora poco noti, abbiamo condotto esperimenti su colture cellulari; poiché da nostri dati non pubblicati, i colangiociti di ratto normale risultano esprimere i recettori del VEGF e Tie-2, a differenza di quanto accade nell'uomo, li abbiamo sfruttati inizialmente per studiare l'espressione di PCNA, e quindi la proliferazione cellulare, dopo stimolo con VEGF, Ang-1, Ang-2 o mix di queste proteine. Abbiamo dimostrato come vi sia una chiara risposta proliferativa dose-dipendente alla somministrazione di VEGF e come questa sia aumentata in presenza di Ang-1 e abolita in presenza di Ang-2. L'effetto proliferativo sinergico di VEGF ed Ang-1 da noi osservato è stato dimostrato a livello di cellule endoteliali, dove la somministrazione combinata di VEGF ed Ang-1 risultava in un significativo aumento della vascolarizzazione corneale rispetto al solo VEGF od a VEGF più Ang-2 (Asahara 1998). Abbiamo dimostrato inoltre come VEGF abbia un effetto proliferativo anche su colangiociti isolati da pazienti trapiantati per ADPKD e su colangiociti isolati da topi *Pkd2^{-/-}*, un modello murino ortologo all'ADPKD umano. L'effetto proliferativo autocrino di VEGF è stato dimostrato anche in un modello di ratto che presenta un'intensa proliferazione biliare, il ratto BDL (Gaudio 2006) ed inoltre è recente lavori hanno mostrato come VEGF sia aberrantemente espresso da strutture biliari in differenti patologie epatiche (Gouw, 2006; Van den Heuvel, 2006), a dimostrazione di come questo fattore di crescita possa essere implicato nella patogenesi di diverse patologie epatiche.

In conclusione abbiamo dimostrato come mutazione a carico del gene della policistina conferiscano un fenotipo immaturo ai colangiociti di ADPKD caratterizzata dall'up-regolazione di VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ang-1 e Tie-2 e come l'iperespressione dei diversi fattori di crescita angiogenetici possa essere responsabile dell'aberrante crescita delle cisti biliari e del ricco plesso peribiliare caratteristici dell'ADPKD. A sostegno di questa ipotesi è stato pubblicato da poco un

lavoro nel quale, sfruttando l'azione del SU-5416, un inibitore specifico del VEGFR-2, sono riusciti a ridurre il numero e le dimensioni delle cisti biliari in topi $Pkd2^{ws25/-}$, un modello murino di ADPKD (Amura, 2007).

7.2. Studio 2.

La stretta relazione anatomica tra dotti biliari, arteria epatica e plesso peribiliare è un reperto comune non solo durante l'ontogenesi embrionale epatica ma anche in diverse condizioni patologiche di risposta al danno. Durante lo sviluppo epatico le ramificazioni dei dotti biliari e dell'arteria epatica sembrano svilupparsi in modo spazialmente e temporalmente coordinato, inoltre, dati ottenuti da studi su diverse colangiopatie malformative (Studio 1; Gaudio, 1996 e 1998) e su modelli murini (Masyuk, 2003; Clotmann 2003) suggeriscono che siano segnali che originano dai dotti biliari a guidare la vasculogenesi arteriosa embrionale e la neoangiogenesi arteriosa in caso di danno epatico. Nello Studio 1 abbiamo dimostrato come in due colangiopatie malformative DPM relate come l'ADPKD e la malattia di Caroli, le strutture biliari mantengono caratteristiche di immaturità come l'iperespressione di VEGF e delle angiopoietine; abbiamo ipotizzato che i fattori angiogenetici secreti dalle strutture biliari siano responsabili dell'aumento di strutture vascolari che circondano le cisti biliari al fine di portare loro nutrimento. Mentre nello studio 1 abbiamo focalizzato la nostra attenzione sugli effetti autocrini proliferativi che la secrezione del VEGF da parte delle strutture biliari esercita sui colangiociti stessi, in questo secondo studio ci siamo concentrati sull'effetto paracrino di induzione della vasculogenesi indotto dal VEGF e come la secrezione di tale proteina da parte di cellule endoteliali possa guidare ed influenzare la vasculogenesi.

Per verificare se anche durante lo sviluppo epatico embrionale il meccanismo di richiamo delle strutture vascolari da parte dei dotti biliari fosse simile a quanto accade in caso di patologia, abbiamo studiato l'espressione immunostochimica dei fattori angiogenetici VEGF, Ang-1 ed Ang-2 e dei loro recettori VEGFR-1, VEGFR-2 e Tie-2 durante lo sviluppo biliare ed arterioso di fegati

umani. Abbiamo dimostrato l'espressione di VEGF sulle strutture biliari e di Ang-1 sugli epatoblasti durante tutte le fasi dello sviluppo embrionale epatico, inoltre abbiamo dimostrato un'espressione stadio-specifica dei diversi recettori sulle cellule endoteliali e murali delle arterie. Abbiamo infine cercato di proporre un modello che potesse spiegare il meccanismo dello sviluppo coordinato tra queste due strutture. I nostri dati sono in accordo con l'ipotesi che le strutture biliari siano responsabili dello sviluppo delle arterie e del plesso peribiliare durante l'ontogenesi epatica.

Malgrado le cellule endoteliali e muscolari risultino essere VEGF negative, le strutture biliari esprimono tale proteina sin dalle prime fasi di sviluppo epatico (sDP). VEGFR-1 invece viene espresso nei primi periodi di sviluppo maturativo da parte dei colangiociti che formano le lamine duttali, ma questi perdono la loro positività a partire dal *migratory stage*; di converso, le cellule endoteliali CD34 positive risultano essere positive per VEGFR-1 durante tutta l'ontogenesi epatica ed anche nel fegato adulto. Infine VEGFR-2 viene debolmente espresso dalle lamine duttali, ma tale positività viene persa, come per il recettore 1, a partire dal *migratory stage*. Una peculiarità è l'espressione di VEGFR-2 in un limitato numero di cellule CD34 positive che si trovano non nello spazio portale, ma all'interno del parenchima epatico. Tale immunofenotipo risulta essere peculiare degli emangioblasti, una popolazione di cellule staminali embrionali che hanno la possibilità di differenziarsi sia in cellule endoteliali che epiteliali (Ziegler, 1999; Pelosi, 2002).

L'effetto del VEGF prodotto dalle strutture biliari nascenti viene mediato inizialmente da VEGFR-2, che viene espresso dai precursori delle cellule endoteliali (gli emangioblasti), mentre le fasi più tardive di sviluppo vascolare (vasculogenesi), ossia quando gli emangioblasti sono indirizzati verso il lineage endoteliale, è mediata dall'azione di VEGFR-1.

Durante il *migratory stage*, quando le strutture tubulari derivanti dalla lamina duttale, migrano all'interno dello spazio portale e vengono gradatamente circondati dallo stroma, le strutture CD34/VEGFR-1 positive possono assumere 2 distinti pattern: o formare una ricca rete di sottili capillari adiacenti alle strutture biliari, o formare strutture più grandi e complesse che accompagnano ma non sono in contatto con i dotti biliari; nel primo caso ci si trova di fronte alle

strutture primordiali che andranno a formare il PBP, che con il procedere degli stadi maturativi si svilupperà fino a giungere a completa maturazione attorno ai quindici anni (Nakanuma, 1997), mentre nel secondo caso ci si trova di fronte ai primi abbozzi dell'arteria epatica nascente. L'espressione di VEGF da parte delle strutture biliari e quello dei due recettori del VEGF da parte delle cellule endoteliali e dei loro precursori ci suggerisce che il VEGF rilasciato dai dotti biliari, agendo localmente su VEGFR-1 moduli lo sviluppo sincrono e parallelo di PBP e delle strutture biliari.

Il VEGF secreto dalle strutture biliari inoltre agisce da segnale per le cellule muscolari e quelle endoteliali affinché si riuniscano in punti discreti nei pressi della lamina duttale; perché vi sia una corretto assemblaggio ed una crescita normale delle arterie epatiche sembra fondamentale che vi sia una corretta formazione ed incorporazione dei dotti biliari durante il *migratory stage*. Questo è particolarmente evidente nel topo *Hnf6^{-/-}*, un modello murino nel quale strutture simili alla lamina duttale si formano ma non progrediscono fino a formare dei dotti maturi ed incorporati; in questo modello animale, infatti, a P4 le lamine duttali non vengono incorporate all'interno del mesenchima portale e non si riconoscono strutture che possano ricordare delle arterie in formazione a differenza di quanto avviene nel WT, nel quale è possibile osservare arterie in via di sviluppo nei pressi dei dotti biliari incorporati nel parenchima. Ciò indica come, in mancanza di una corretta incorporazione delle strutture biliari il cross-talk mediato da VEGF tra cellule epiteliali ed endoteliali venga perturbato impedendo il corretto reclutamento di EC e di conseguenza la formazione dei primi abbozzi delle strutture arteriose.

Le arterie assemblate correttamente sono caratterizzate da un nucleo di EC circondate da un sottile strato di cellule muscolari lisce che esprimono Tie-2, il recettore delle angiopoietine, ed Ang-2; è noto che l'espressione di Tie-2 da parte delle cellule murali delle arterie media la risposta di tali cellule all'Ang-1 e fa sì che le cellule muscolari migrino e secernano enzimi proteolitici come la metalloproteinasi 2 (Iurlaro, 2003). Ang-1, quindi, può modulare il reclutamento delle cellule di supporto necessarie per lo sviluppo delle arterie epatiche, un momento fondamentale per la

stabilizzazione dei vasi durante l'arteriogenesi (Suri, 1996). Si ipotizza che le cellule murali derivino da precursori differenti da quelli sia delle cellule epiteliali che endoteliali e che questi siano attivati dalle angiopoietine (Iurlaro, 2003). A supporto di tale ipotesi, noi abbiamo notato che nei primi stadi maturativi dello spazio portale, quando le EC non sono ancora raggruppate, vi sono sparse all'interno del mesenchima portale cellule ASMA/Tie-2 positive, caratterizzate da una morfologia fusiforme e di origine mesenchimale (come indicato dalla positività per ASMA); queste cellule sono simili alle cellule simil-miofibroblastiche indicate come la popolazione che da origine alle cellule muscolari lisce all'interno dello spazio portale nascente (Libbrecht, 2002b).

Il reclutamento di cellule murali attorno al nucleo di cellule endoteliali che da origine alle arterie, queste cellule esprimono, oltre a Tie-2 anche Ang-2; la funzione di Ang-2 in questo stadio è quello di rendere le arterie plasmabili e prone alla proliferazione ed alla ramificazione le arterie nascenti, impedendo in parte l'azione stabilizzatrice di Ang-1 (Iurlaro, 2003). Questi dati ci suggeriscono che il rimodellamento delle arterie sia mediato dall'azione paracrina locale di Ang-1 ed autocrina di Ang-2 sulle arterie stesse.

Durante l'ultimo stadio maturativo analizzato (*bile duct stage*), le arterie sono caratterizzate dalla positività delle cellule muscolari per Ang-2 e Tie-2 e per l'espressione di Tie-2 da parte delle cellule endoteliali VEGFR-1 positive; in questo stadio le strutture biliari continuano ad esprimere VEGF e gli epatoblasti Ang-1. In questo stadio l'azione combinata di VEGF e delle Angiopoietine è fondamentale per permettere la proliferazione e la migrazione delle cellule biliari e vascolari in modo temporalmente e spazialmente coordinato (Chae, 2000; Kim, 2000). In particolare VEGF agisce in concerto con Ang-1 sulle cellule endoteliali dandole un forte stimolo mito e motogenico e promuovendo l'aumento del lume delle arterie (Suri, 1996; Asahara, 1998). Tale stimolo è mediato dall'attivazione di Tie-2 che solo a partire da questo stadio maturativo comincia ad essere espresso dalle cellule endoteliali.

Infine, nel fegato adulto, l'avvenuta stabilizzazione delle arterie è indicata dalla mancanza di espressione da parte delle arterie stesse di Tie-2 e di Ang-2 non essendo più necessaria la sua azione di stabilizzatrice.

Un sommario di quanto esposto è dato dalla Fig. 29.

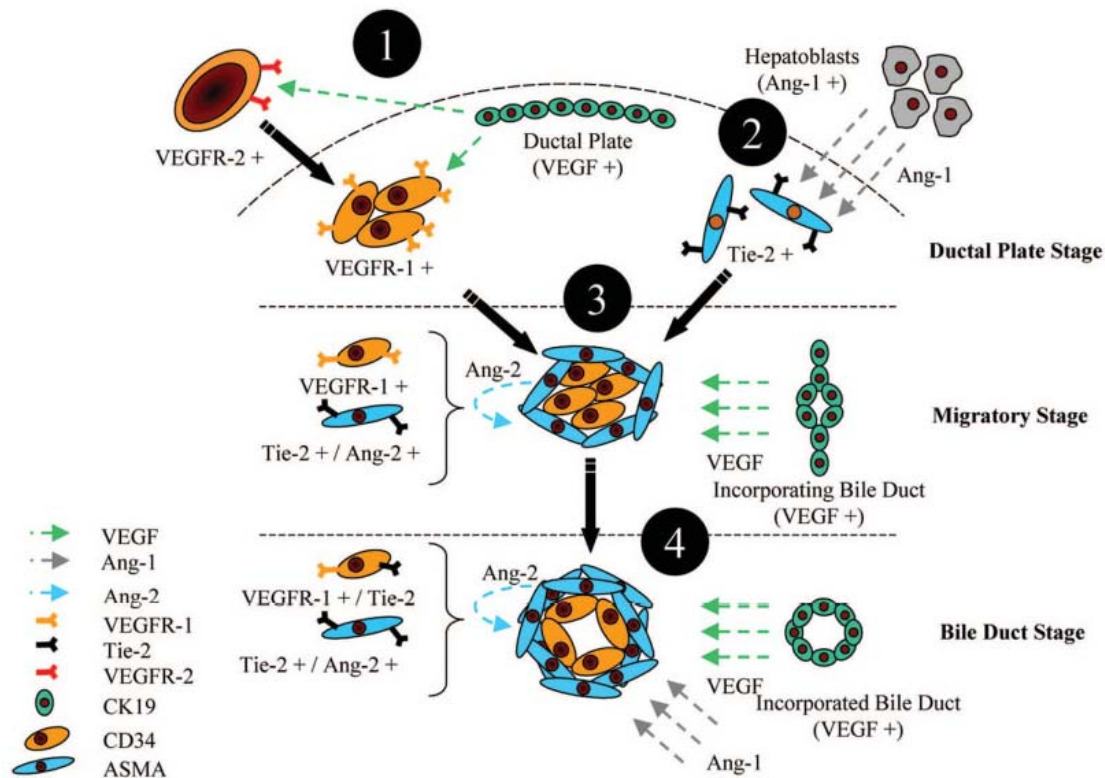


Fig. 29: ipotesi riguardante lo sviluppo coordinato di dotti biliari ed arteria epatica nell'ontogenesi epatica. Affinchè vi sia uno sviluppo coordinato di dotti biliari ed arterie sono necessari almeno i sistemi del VEGF e delle angiopoietine. Nel *ductal plate stage* la lamina duttale secreta VEGF che, per gradiente locale, richiama i precursori delle EC (CD34/VEGFR-2) all'interno dello spazio portale (1), dove assumono un'immunofenotipo strettamente endoteliale (CD34/VEGFR-1). Nello stesso momento Ang-1 secreto dagli epatoblasti (2), mobilita i precursori delle cellule murali (ASMA/Tie-2 positivi) all'interno dello spazio portale. Queste due popolazioni vanno a aggregarsi in maniera ordinata in punti discreti nei pressi delle strutture biliari (3) nel *migratory stage*; questi aggregati rimangono plastici e pongono alla proliferazione per l'azione autocrina di Ang-2 sulle cellule murali. Infine (4), nel *bile duct stage*, le arterie mature si caratterizzano per una parete muscolare spessa ed ordinata e per l'espressione di Tie-2 da parte delle EC; l'attivazione di Tie-2 è infatti indispensabile per l'apertura del lume delle arterie.

In conclusione questo secondo studio dimostra come il VEGF secreto dalle cellule epiteliali che formano le strutture biliari, non sia solo necessario per la formazione e la proliferazione delle strutture biliari durante lo sviluppo epatico ed in caso di patologia, ma come esso sia necessario anche per la formazione del PBP e delle arterie epatiche, tutte strutture che risultano necessarie per la sopravvivenza dell'albero biliare stesso. Recentemente inoltre è stato dimostrato come un meccanismo simile mediato dal VEGF sia necessario per la formazione delle arterie che seguono

l'innervazione periferica (Mukouyama, 2002). Infine questi dati sono consistenti con l'ipotesi che i meccanismi di riparazione epatica rappresentino una ricapitolazione di quanto avviene durante l'ontogenesi del fegato (Golding, 1996; Fabris, 2000).

7.3. Studio 3.

Poiché nelle patologie croniche epatiche vi è una continua interazione tra danno e meccanismo riparativo/rigenerativo, la comprensione di tali meccanismi rappresenterebbe un passo fondamentale nel tentativo di preservare l'organo e di prolungare la vita del paziente (Strazzabosco, 2005). Tali patologie croniche epatiche, a prescindere dall'eziologia, presentano una "reazione duttile" di diversa intensità, che sono sintomo di un'attivazione del compartimento delle cellule progenitrici epatiche; tale fenomeno è caratterizzato dalla presenza di diverse popolazioni di cellule epiteliali che mantengono strette relazioni anatomiche con cellule mesenchimali, infiammatorie ed endoteliali che si pensa derivino dall'espansione del compartimento staminale epatico (Strazzabosco, 2005). Inizialmente, esperimenti su modelli murini, avevano indotto a pensare che l'attivazione del compartimento delle cellule progenitrici (chiamate anche "cellule ovali"), fosse conseguenza solo di danni epatici massicci che presentassero necrosi epatocitaria ed una marcata mitoinibizione degli epatociti stessi (Sell, 2001). Studi più recenti su patologie epatiche umane hanno invece dimostrato come questo compartimento staminale possa essere indotto a proliferare anche in risposta a danni moderati o addirittura minimi (Lowes, 1999; Eleazar, 2005; Clouston, 2005). I meccanismi che guidano la trasformazione di queste cellule progenitrici epatiche nelle popolazioni epiteliali derivate sono ad oggi largamente ignote. Secondo l'ipotesi del gruppo guidato dalla Prof. Roskams, le cellule progenitrici epatiche (o HPC) sono bipotenti e possono differenziarsi o verso il lineage biliare, dando vita a cellule duttulari reattive (o RDC) o verso quello epatocitario, originando le cellule transizionali epato-biliari (o IHBC) (Libbrecht, 2002a). Recenti lavori hanno però evidenziato come vi sia la possibilità che le RDC possano essere generate da una transdifferenziazione degli epatociti in senso biliare (Michalopoulos, 2001 e 2002; Tanimizu, 2004;

Nishikawa, 2005; Michalopoulos, 2005). In questo terzo studio abbiamo analizzato le differenze tra le popolazioni endoteliali di due colangiopatie colestatiche dell'età pediatrica, la sindrome di Alagille e l'atresia delle vie biliari ed abbiamo anche valutato come differenze nella distribuzione e qualità di queste popolazioni cellulari potessero influenzarne il grado di fibrosi e progressione.

L'AGS è causata da mutazioni di Jagged1 o del suo recettore Notch2. Poiché i recettori Notch sono proteine transmembrana coinvolte nello sviluppo epatico e particolarmente importanti per la determinazione del tipo cellulare e per la formazione dei dotti biliari (Louis, 1999; Crosnier, 2000; Flynn, 2004; Kodama, 2004), abbiamo ipotizzato che difetti nel segnale trasmesso da Notch potessero influenzare il complesso riparativo epatico ed infatti, l'analisi di questo sistema, ha evidenziato profonde differenze nel tipo di reazione epatica al danno di AGS e BA; la prima è caratterizzata da una marcata espansione del compartimento delle IHBC e da una concomitante pressoché assenza di RDC ed HPC, mentre la BA presenta un quadro riparativo diametralmente opposto.

La caratteristica più peculiare dell'AGS è la grandissima espansione, come detto in precedenza, della popolazione delle IHBC rispetto alla BA; poiché non abbiamo riscontrato differenze significative né nella concentrazione di bilirubina totale, né nell'indice di mitoinibizione ($p21^{waf1}/Ki67$) epatocitaria, né infine nella proliferazione degli epatociti, tra le due condizioni patologiche, abbiamo ipotizzato che l'aumento nel numero delle IHBC nell'AGS fosse dovuto principalmente a difetti nei meccanismi di trasduzione del segnale mediati da Notch. Tra i quattro recettori di Notch, quello maggiormente coinvolto nella patogenesi dell'AGS appare essere Notch2, infatti mutazioni a carico di questo gene sono state descritte in famiglie che presentavano tale sindrome ma non mutazioni di Jagged1 (McDaniell, 2006), inoltre un fenotipo ortologo all'AGS è quello che presenta un modello murino con mutazione in eterozigosi di Jagged1 e l'allele ipomorfico di Notch2 (McCright, 2002). Infine sembra essere Notch2 a regolare l'espressione di geni fondamentali per lo sviluppo biliare, tra i quali HNF1 β , e la down-regolazione di geni che favoriscono la differenziazione in senso epatocitario (Coffinier, 2002; Lemaigre, 2004). I nostri dati

indicano quindi come la regolazione di Notch non sia fondamentale solo per lo sviluppo epatico fetale, ma anche per i meccanismi riparativi/rigenerativi del fegato dell'adulto.

Malgrado l'alto grado di proliferazione degli epatociti, la mancata espressione di HNF1 β da parte delle IHBC dell'AGS, e la correlazione negativa tra HPC ed IHBC indicano come il segnale mediato da Notch necessario per la transdifferenziazione degli epatociti in RDC (Michalopoulos, 2001 e 2002; Tanimizu, 2004; Nishikawa, 2005; Michalopoulos, 2005). Dati su colture di organoidi (Michalopoulos, 2001 e 2002) e su modelli murini chimerici (Michalopoulos, 2005) dimostrano come gli epatociti possano transdifferenziare in senso biliare; il grande numero di cellule intermedie nell'AGS deriverebbero quindi dalla proliferazione degli epatociti che però non riescono a formare strutture biliari a causa della mancanza del segnale mediato da Notch; la sorgente delle IHBC, quindi, non sarebbero le HPC, ma gli epatociti stessi, che avrebbero quindi una sorta di "capacità staminale", capacità già ben nota (Van Eyken, 1988; Haruna, 1996; Fabris, 2000; Forbes, 2002). La transdifferenziazione *in vitro* degli epatociti maturi (Nishikawa, 2005) e degli epatoblasti (Tanimizu, 2004) in cellule epiteliali è mediata dall'azione regolatoria di Notch che up-regola l'espressione di HNF1 β , una proteina fondamentale per la differenziazione in senso colangiocitario degli epatoblasti e contemporaneamente fa diminuire l'espressione di HNF4 α ed HNF6, fattori di trascrizione necessari per la differenziazione verso il lineage epatocitario (Lemaigre, 2004).

Questo studio fornisce inoltre ulteriori prove a sostegno dell'influenza del sistema riparativo/rigenerativo epatico nella genesi e sviluppo della fibrosi portale nelle colangiopatie colestatiche; è ormai chiaro che la reazione dutturale è uno degli artefici dell'infiammazione e della fibrosi, poiché tali strutture reattive generano un'ampia gamma di citochine, chemochine e fattori di crescita proinfiammatori e profibrotici (Spirli, 2003; Lazaridis, 2004; Strazzabosco, 2005). La capacità di RDC ed HPC di influenzare sia fibrosi che infiammazione in caso di patologia epatica è stata dimostrata, oltre che nelle epatiti fulminanti e nelle colangiopatie colestatiche croniche, anche in patologie di diversa eziologia, come epatiti autoimmuni, steatoepatite alcolica e non alcolica

ed epatiti da virus B e C (Tan, 2002; Roskams, 2003b; Clouston, 2005). Questi lavori hanno dimostrato come vi sia una relazione tra l'estensione della reazione duttulare e la stadiazione istologica della fibrosi; in questo lavoro abbiamo dimostrato come RDC ed HPC presentino una relazione diretta con lo spessore dei setti fibrotici ed inversa con la fibrosi pericellulare in due colangiopatie colestatiche croniche pediatriche; in particolare la BA presentava setti spessi che si accompagnavano ad un'imponente reazione duttulare, mentre l'AGS presentava setti molto fini e reazione duttulare pressoché assente. Tale dato ha importanti implicazioni cliniche, innanzitutto può essere un criterio di differenziazione tra le due patologie ed inoltre può spiegare il differente decorso clinico e la diversa aggressività delle due malattie, infatti è stato dimostrato che lo spessore dei setti correla sia con la severità della cirrosi, sia con la presenza di un'ipertensione portale importante (Nagula, 2006). I nostri dati, che dimostrano come ad un'assenza di RDC corrisponda uno spessore di setti molto ridotto, nell'AGS, è concorde con i dati sopra descritti.

Numerosi aspetti riguardanti la patogenesi dell'AGS sono ancora ignoti, in particolare non è chiaro se la duttopenia sia dovuta ad un mancato sviluppo delle strutture biliari (Libbrecht, 2005) o se sia dovuta ad una progressiva perdita (per apoptosi o necrosi) dei dotti biliari (Berman, 1981; Emerick, 1999). Con questo lavoro suggeriamo che la duttopenia possa derivare dall'impossibilità da parte degli epatociti di transdifferenziare in colangiociti, a causa di perturbazioni a carico del *signaling* Jagged1/Notch2; la mancata reazione duttulare nell'AGS fa sì che in tale sindrome non si sviluppino grossi setti fibrotici e che vi sia invece una prevalente fibrosi pericellulare. Differenze nel sistema di riparazione/rigenerazione epatica possono quindi spiegare le differenze cliniche tra AGS e BA.

8. CONCLUSIONI

Le colangiopatie disembrionogenetiche comprendono un **gruppo di patologie dell'epitelio biliare** invalidanti, ad andamento cronico-progressivo, rare se prese singolarmente, ma abbastanza frequenti se considerate collettivamente, tali da rappresentare la più frequente indicazione a trapianto di fegato nella popolazione pediatrica (circa il 50% dei trapianti di fegato pediatrici negli USA sono sostenuti dalla BA). Pur essendo stato recentemente riconosciuto in molte di queste patologie l'origine genetica e identificato lo specifico difetto genetico che ne è alla base, i meccanismi patogenetici che ne derivano e che sono responsabili della progressione di malattia, restano del tutto sconosciuti. L'interesse per questi meccanismi deriva poi anche dal fatto che queste malattie, proprio in virtù del difetto genetico responsabile, rappresentano dei modelli molto utili per studiare la reazione epiteliale al danno epatico ed i meccanismi che regolano la risposta rigenerativo-riparativa nel fegato. Partendo da questi presupposti, ho focalizzato la mia attenzione su tre patologie che rappresentano gli archetipi delle principali lesioni fondamentali dell'epitelio biliare, l'aberrante crescita cistica e la duttopenia senza/con reazione duttulare. Queste tre lesioni sono esemplificate nell'ADPKD, nell'AGS e nella BA rispettivamente.

I **difetti genetici** che portano allo sviluppo dell'ADPKD sono mutazioni dei geni che codificano per le proteine policistina 1 e 2 (*PKD1* e *PKD2*) (Wilson, 2004; Torres, 2007), mentre l'AGS è causata da mutazioni a carico di *JAG1* o *NOTCH2* (Oda, 1997; Li, 1997; McDaniel, 2006). Va sottolineato il fatto che queste proteine sono tutte fortemente coinvolte nello sviluppo maturativo-differenziativo dell'epitelio biliare durante l'ontogenesi embrio-fetale. Nell'ADPKD, ad esempio, il deficit nell'espressione o nella funzione delle Policistine comporta la presenza di dotti biliari de-differenziati, con un fenotipo di tipo fetale riconducibile alla persistenza di residui della lamina duttale per un arresto del processo maturativo dell'epitelio biliare. Nella BA un'origine genetica sembra essere coinvolta soprattutto nella forma "*early severe*", quella più prettamente malformativa con "*remnants*" della lamina duttale, piuttosto che nelle forme perinatali, dove sembra essere preponderante un'eziologia di tipo infettivo/auto-immune. Nella forma "*early*

severe”, pur non essendo stato individuato un singolo gene responsabile, è stato ipotizzato l'intervento di diversi geni potenziali, quali *inversina (Inv)*, *Jagged/Notch*, *Hes1*, *HNF1 α* , *HNF6*, *Forkhead box F1* o *M1b*, tutti implicati nella regolazione dell'ontogenesi biliare (Perlmutter, 2002; Sokol, 2007).

In stretta relazione con questi difetti genetici, il danno a carico dei colangiociti è sostenuto da una serie di **meccanismi patogenetici** alquanto diversi che riassumono lo spettro delle lesioni che possono colpire l'epitelio biliare anche in altre condizioni di malattia. L'ADPKD si caratterizza per la presenza di microamartomi e cisti biliari a crescita tumultuosa e progressiva sino a raggiungere dimensioni anche molto cospicue, che si accompagnano ad un plesso vascolare peribiliare molto esteso. All'altro lato dello spettro di lesioni abbiamo le colangiopatie con vanificazione dei dotti biliari. Mentre nell'AGS la duttopenia è accompagnata da un accumulo di una popolazione cellulare con fenotipo intermedio tra epatociti e colangiociti (IHBC), nella BA la stessa vanificazione procede contestualmente con una cospicua attivazione del compartimento cellulare di RDC ed HPC, che è presente sin dalle fasi più precoci di malattia.

Abbiamo quindi cercato di identificare i **fattori molecolari** che sostengono questi meccanismi e che quindi promuovono lo sviluppo delle lesioni biliari caratterizzanti in maniera opposta queste colangiopatie. Nell'ADPKD abbiamo trovato che i fattori angiogenetici VEGF ed Ang-1 sono up-regolati sull'epitelio biliare che riveste le cisti e i micromartomi dove agiscono con un doppio meccanismo: autocrino, promuovendo la proliferazione degli stessi colangiociti, e paracrino, inducendo lo sviluppo sincronizzato del plesso vascolare peribiliare che verosimilmente fornisce il supporto nutritivo alla crescita esuberante delle cisti. Il meccanismo di *cross-talk* tra epitelio biliare e cellule endoteliali mediato dai fattori di crescita angiogenetici con i loro rispettivi recettori richiama un comportamento che il colangiocita svolge normalmente durante l'embriogenesi, dove promuove lo sviluppo coordinato spazio-temporale di dotti biliari ed arterie epatiche. Nelle forme duttopeniche l'espressione di HNF1 β , un fattore di trascrizione che determina lo sviluppo in senso biliare delle cellula epiteliale epatica, sembra invece assumere un ruolo cruciale

nel regolare la risposta riparativa alla scomparsa dell'epitelio duttale. Infatti, nell'AGS dove per un difetto del signalling Jagged1/Notch2, HNF1 β non viene indotto e si verifica un accumulo di cellule con fenotipo intermedio che non esita nella reazione duttulare. Viceversa nella BA, dove HNF1 β viene regolarmente indotto, si realizza una pronunciata attivazione di cellule progenitrici e reazione duttulare come risposta cellulare alla duttopenia.

La diversa risposta riparativa tra le varie forme di colangiopatia non ha solo un mero significato speculativo, ma sembra svolgere anche un ruolo specifico nell'**evoluzione clinica** delle colangiopatie. Infatti, nell'ADPKD l'*outcome* clinico è condizionato dalla continua crescita di cisti ipervascolarizzate, che in virtù dell'effetto autocrino sinergico promosso da VEGF e Ang-1 può raggiungere dimensioni anche molto cospicue, con il rischio di complicanze anche gravi legate all'effetto massa o allo sviluppo di emorragie intracistiche. Nella BA invece, la vigorosa reazione duttulare in risposta alla duttopenia si accompagna ad una forma clinicamente grave di fibrosi epatica con formazione di larghi setti, che manca invece nell'AGS, dove, per effetto dell'assenza di HNF1 β , la risposta alla vanificazione duttale risulta in qualche modo bloccata alle IHBC e non può sfociare nella reazione duttulare: il risultato è una forma di fibrosi meno evolutiva con *pattern* di tipo pericellulare, che corrisponde clinicamente ad una forma meno aggressiva di colangiopatia.

9. REFERENZE

- Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C, Francia C, Fraioli F, Romeo R, Marucci L, Le Sage G, Glaser SS, Benedetti A. 1997. Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J Clin Invest* 100:1349-1362.
- Alvaro D, Onori P, Alpini G, Franchitto A, Jefferson DM, Torrice A, Cardinale V, Stefanelli F, Mancino MG, Strazzabosco M, Angelico M, Attili A, Gaudio E. 2008. Morphological and Functional Features of Hepatic Cyst Epithelium in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Pathol* *in press*.
- Amura CR, Brodsky KS, Groff R, Gattone VH, Voelkel NF, Doctor RB. 2007. VEGF receptor inhibition blocks liver cyst growth in *pkd2(WS25/-)* mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C419-C428.
- Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. 1998. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 83: 233-240.
- Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. 1999. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 30:112-117.
- Bello-Reuss E, Holubec K, Rajaraman S. 2001. Angiogenesis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 60:37-45.
- Berman MD, Ishak KG, Schaefer EJ, Barnes S, Jones EA. 1981. Syndromatic hepatic ductular hypoplasia (arteriohepatic dysplasia): a clinical and hepatic histologic study of three patients. *Dig Dis Sci* 26:485-497.
- Bezerra JA. 1998. Liver development: a paradigm for hepatobiliary disease in later life. *Semin Liver Dis* 18:203-216.

- Caligiuri A, Glaser S, Rodgers RE, Phinizy JL, Robertson W, Papa E, Pinzani M, Alpini G. 1998. Endothelin-1 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by interacting with ETA receptors on large cholangiocytes. *Am J Physiol* 275:G835-G846.
- Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Deneff C, Roskams T. 2002. The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol* 161:521-530.
- Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. 2000. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2573-2578.
- Chauveau D, Fakhouri F, Grünfeld JP. 2000. Liver involvement in autosomal-dominant polycystic kidney disease: therapeutic dilemma. *J Am Soc Nephrol* 11:1767-1775.
- Chauvet V, Qian F, Boute N, Cai Y, Phakdeekitacharoen B, Onuchic LF, Attié-Bitach T, Guicharnaud L, Devuyst O, Germino GG, Gubler MC. 2002. Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. *Am J Pathol* 160:973-983.
- Cho WK, Boyer JL. 1999a. Characterization of ion transport mechanisms involved in bombesin-stimulated biliary secretion in rat cholangiocytes. *J Hepatol* 30:1045-1051.
- Cho WK, Boyer JL. 1999b. Vasoactive intestinal polypeptide is a potent regulator of bile secretion from rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 117:420-428.
- Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, Roskams T, Rousseau GG, Lemaigre FP. 2002. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* 129:1819-1828.
- Clotman F, Libbrecht L, Gresh L, Yaniv M, Roskams T, Rousseau GG, Lemaigre FP. 2003. Hepatic artery malformations associated with a primary defect in intrahepatic bile duct development. *J Hepatol* 39:686-692.

- Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. 2005. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 41:809-818.
- Coffinier C, Gresh L, Fiette L, Tronche F, Schütz G, Babinet C, Pontoglio M, Yaniv M, Barra J. 2002. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 129:1829-1838.
- Crawford AR, Lin XZ, Crawford JM. 1998. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 28:323-331.
- Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. 2001. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 120:534-44.
- Crosnier C, Attié-Bitach T, Encha-Razavi F, Audollent S, Soudy F, Hadchouel M, Meunier-Rotival M, Vekemans M. 2000. JAGGED1 gene expression during human embryogenesis elucidates the wide phenotypic spectrum of Alagille syndrome. *Hepatology* 32:574-581.
- Desmet VJ. 1992. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "ductal plate malformation". *Hepatology* 16:1069-1083.
- Desmet VJ. 1998. Ludwig symposium on biliary disorders--part I. Pathogenesis of ductal plate abnormalities. *Mayo Clin Proc* 73:80-89.
- El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. 1998. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 27: 1554-1562.
- Eleazar JA, Memeo L, Jhang JS, Mansukhani MM, Chin S, Park SM, Lefkowitz JH, Bhagat G. 2004. Progenitor cell expansion: an important source of hepatocyte regeneration in chronic hepatitis. *J Hepatol* 41:983-991.

- Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, Krantz ID, Spinner NB, Piccoli DA. 1999. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 29:822-829.
- Fabris L, Strazzabosco M, Crosby HA, Ballardini G, Hubscher SG, Kelly DA, Neuberger JM, Strain AJ, Joplin R. 2000. Characterization and isolation of ductular cells coexpressing neural cell adhesion molecule and Bcl-2 from primary cholangiopathies and ductal plate malformations. *Am J Pathol* 156:1599-15612.
- Flynn DM, Nijjar S, Hubscher SG, de Goyet Jde V, Kelly DA, Strain AJ, Crosby HA. 2004. The role of Notch receptor expression in bile duct development and disease. *J Pathol* 204: 55-64.
- Forbes S, Vig P, Poulsom R, Thomas H, Alison M. 2002. Hepatic stem cells. *J Pathol* 197:510-218.
- Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. 1996. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 111:1118-24.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. 2006. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 130:1270-82.
- Ghoshal AK, Mullen B, Medline A, Farber E. 1983. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis. Regeneration of liver after carbon tetrachloride-induced liver necrosis when hepatocyte proliferation is inhibited by 2-cetylaminofluorene. *Lab Invest* 48:224-230.
- Glaser S, Alvaro D, Ueno Y, Francis H, Marzioni M, Phinizy JL, Baumann B, Mancino MG, Venter J, LeSage G, Alpini G. 2003. Gastrin reverses established cholangiocyte proliferation and enhanced secretin-stimulated ductal secretion of BDL rats by activation of apoptosis through increased expression of Ca²⁺- dependent PKC isoforms. *Liver Int* 23:78-88.
- Golding M, Sarraf C, Lalani EN, Alison MR. 1996. Reactive biliary epithelium: the product of a pluripotential stem cell compartment? *Hum Pathol* 27:872-884.

- Gong AY, Tietz PS, Muff MA, Splinter PL, Huebert RC, Strowski MZ, Chen XM, LaRusso NF. 2003. Somatostatin stimulates ductal bile absorption and inhibits ductal bile secretion in mice via SSTR2 on cholangiocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1205-C1214.
- Gouysse G, Couvelard A, Frachon S, Bouvier R, Nejjari M, Dauge MC, Feldmann G, Henin D, Scoazec JY. 2002. Relationship between vascular development and vascular differentiation during liver organogenesis in humans. *J Hepatol* 37:730-740.
- Gouw AS, van den Heuvel MC, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. 2006. Dynamics of the vascular profile of the finer branches of the biliary tree in normal and diseased human livers. *J Hepatol* 45:393-400.
- Gridley T. 2003. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* 12:R9-R13.
- Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. 1996. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 23:476-481.
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. 1999. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18:5356-5262.
- Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, Gamble V, Harris PC. 1995. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 10:151-160.
- Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF. 2003. Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J Cell Sci* 116:3635-3643.
- Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, Abman SH. 2000. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L600-L607.

- Joplin R, Strain AJ, Neuberger JM. 1989. Immuno-isolation and culture of biliary epithelial cells from normal human liver. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 1189-1192.
- Kahn E. 2004. Biliary atresia revisited. *Pediatr Dev Pathol* 7:109-124.
- Kanellis J, Fraser S, Katerelos M, Power DA. 2000. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F905-F915.
- Kim BS, Chen J, Weinstein T, Noiri E, Goligorsky MS. 2002. VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *J Am Soc Nephrol* 13:2027-2036.
- Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY. 2000. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 86:952-959.
- Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. 2004. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 127:1775-1786.
- Kono N, Nakanuma Y. 1992. Ultrastructural and immunohistochemical studies of the intrahepatic peribiliary capillary plexus in normal livers and extrahepatic biliary obstruction in human beings. *Hepatology* 15:411-418.
- Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. 1999. Clinical and molecular genetics of Alagille syndrome. *Curr Opin Pediatr* 11:558-564.
- Laurent J, Gauthier F, Bernard O, Hadchouel M, Odièvre M, Valayer J, Alagille D. 1990. Long-term outcome after surgery for biliary atresia. Study of 40 patients surviving for more than 10 years. *Gastroenterology* 99:1793-1797.
- Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. 2004. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 127:1565-1577.
- Lemaigre FP. 2003. Development of the biliary tract. *Mech Dev* 120:81-87.

- Lemaigre F, Zaret KS. 2004. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 14:582-590.
- Lenzen R, Elster J, Behrend C, Hampel KE, Bechstein WO, Neuhaus P. 1997. Bile acid-independent bile flow is differently regulated by glucagon and secretin in humans after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 26:1272-1281
- Lesage GD, Marucci L, Alvaro D, Glaser SS, Benedetti A, Marzioni M, Patel T, Francis H, Phinzy JL, Alpini G. 2002. Insulin inhibits secretin-induced ductal secretion by activation of PKC alpha and inhibition of PKA activity. *Hepatology* 36:641-651.
- Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB. 1997. Alagille syndrome is caused by mutations in human *Jagged1*, which encodes a ligand for *Notch1*. *Nat Genet* 16:243-251
- Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. 2001. Expression of neural cell adhesion molecule in human liver development and in congenital and acquired liver diseases. *Histochem Cell Biol* 116:233-239.
- Libbrecht L, Roskams T. 2002a. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 13:389-996.
- Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. 2002b. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver* 22:252-258.
- Libbrecht L, Spinner NB, Moore EC, Cassiman D, Van Damme-Lombaerts R, Roskams T. 2005. Peripheral bile duct paucity and cholestasis in the liver of a patient with Alagille syndrome: further evidence supporting a lack of postnatal bile duct branching and elongation. *Am J Surg Pathol* 29:820-826.
- Lorent K, Yeo SY, Oda T, Chandrasekharappa S, Chitnis A, Matthews RP, Pack M. 2004. Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and

generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development* 131:5753-5766.

- Louis AA, Van Eyken P, Haber BA, Hicks C, Weinmaster G, Taub R, Rand EB. 1999. Hepatic jagged1 expression studies. *Hepatology* 30:1269-1275.
- Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. 1999. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 154:537-541
- Ludwig J. 1987. New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 7:293-301
- Lykavieris P, Hadchouel M, Chardot C, Bernard O. 2001. Outcome of liver disease in children with Alagille syndrome: a study of 163 patients. *Gut* 49:431-435.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.
- Maldini G, Torri E, Lucianetti A, Guizzetti M, Pinelli D, Bertani A, Corno V, Giovanelli M, Zambelli M, Stroppa P, Alberti D, Torre G, Spada M, Gridelli B, Colledan M. 2005. Orthotopic liver transplantation for alagille syndrome. *Transplant Proc* 37:1174-1176.
- Marinelli RA, Tietz PS, Pham LD, Rueckert L, Agre P, LaRusso NF. 1999. Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 276:G280-G286.
- Marinelli RA, Pham LD, Tietz PS, LaRusso NF. 2000. Expression of aquaporin-4 water channels in rat cholangiocytes. *Hepatology* 31:1313-1317.
- Masyuk AI, Gong A, Kip S, Burke MJ, LaRusso NF. 2000. Perfused rat intrahepatic bile ducts secrete and absorb water, solute and ions. *Gastroenterology* 119: 1672-1680.
- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. 2003. Hepatic artery and portal vein remodeling in rat liver: vascular response to selective cholangiocyte proliferation. *Am J Pathol* 162:1175-1182.

- Masyuk AI, Masyuk TV, Splinter PL, Huang BQ, Stroope AJ, LaRusso NF. 2006. Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca²⁺ and cAMP signaling. *Gastroenterology* 131:911-920.
- McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. 2006. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 79:169-173.
- Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Stolz DB. 2001. Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am J Pathol* 159:1877-1887.
- Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Lopez-Talavera JC, Mars W. 2002. Hepatocytes undergo phenotypic transformation to biliary epithelium in organoid cultures. *Hepatology* 36:278-283.
- Michalopoulos GK, Barua L, Bowen WC. 2005. Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology* 41:535-544.
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. 1996. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272:1339-1342
- Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. 1987. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 47:2883-2891
- Mukoyama YS, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ. 2002. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109:693-705.
- Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. 2006. Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis-a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol* 44:111-117.

- Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M. 1997. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 38:552-570.
- Nichols MT, Gidey E, Matzakos T, Dahl R, Stiegmann G, Shah RJ, Grantham JJ, Fitz JG, Doctor RB. 2004. Secretion of cytokines and growth factors into autosomal dominant polycystic kidney disease liver cyst fluid. *Hepatology* 40:836-846.
- Nijjar SS, Crosby HA, Wallace L, Hubscher SG, Strain AJ. 2001. Notch receptor expression in adult human liver: a possible role in bile duct formation and hepatic neovascularization. *Hepatology* 34:1184-1192.
- Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H, Tokairin T, Omori Y, Su M, Yoshioka T, Enomoto K. 2005. Transdifferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells in vitro. *Am J Pathol* 166:1077-1088.
- Nishio S, Hatano M, Nagata M, Horie S, Koike T, Tokuhisa T, Mochizuki T. 2005. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J Clin Invest* 115: 910-918.
- Oda T, Elkahoul AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC. 1997. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16:235-242.
- Paradis V, Bièche I, Dargère D, Laurendeau I, Nectoux J, Degott C, Belghiti J, Vidaud M, Bedossa P. 2003. A quantitative gene expression study suggests a role for angiopoietins in focal nodular hyperplasia. *Gastroenterology* 124:651-659.
- Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB. 2002. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* 12: R378–R380.

- Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. 2002. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 100:3203-3208.
- Perlmutter DH, Shepherd RW. 2002. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype? *Hepatology* 35:1297-1304.
- Piccoli DA, Spinner NB. 2001. Alagille syndrome and the Jagged1 gene. *Semin Liver Dis* 21:525-534.
- Popper H. 1990. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial systems. *Prog Liver Dis* 9:27-38.
- Roskams T, van den Oord JJ, De Vos R, Desmet VJ. 1990. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *Am J Pathol* 137:1019-1025.
- Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. 2003a. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 23:385-296.
- Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. 2003b. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 163:1301-1311.
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39:1739-1745.
- Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. 2001. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 34: 1135-1148.

- Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, Von Schweinitz D, Kaiserling E. 1997. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology* 31:324–329.
- Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson SS, Bisgaard HC. 2005. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 113:876-902.
- Sasaki M, Nakanuma Y. 1996. Abnormal expression of MUC1 apomucin and mature MUC1 mucin in biliary epithelial cells in various cystic liver diseases. *Hepatology* 24:539-543.
- Sell S. 1994. Liver stem cells. *Mod Pathol* 7:105-112.
- Sell S. 2001. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33:738-750.
- Shiojiri N. 1997. Development and differentiation of bile ducts in the mammalian liver. *Microsc Res Tech* 39:328-335.
- Sokol RJ, Shepherd RW, Superina R, Bezerra JA, Robuck P, Hoofnagle JH. 2007. Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop. *Hepatology* 46:566-581.
- Spirli C, Fabris L, Duner E, Fiorotto R, Ballardini G, Roskams T, LaRusso NF, Sonzogni A, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. 2003. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits adenylyl cyclase and cAMP-dependent secretion in cholangiocytes. *Gastroenterology* 124:737-753.
- Strazzabosco M. 1997. New insights into cholangiocyte physiology. *J Hepatol* 27:945-952.
- Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C. 2005. Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol* 39:S90-S102.
- Strazzabosco M, Fabris L. 2008. Functional anatomy of the normal bile ducts. *Anat. Rec in press*

- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:1171-1180.
- Tanimizu N, Miyajima A. 2004. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci* 117:3165-374.
- Terada T, Nakanuma Y. 1993. Development of human peribiliary capillary plexus: a lectin-histochemical and immunohistochemical study. *Hepatology* 18:529-536.
- Terada T, Nakanuma Y. 1995. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 146:67-74.
- Terada T, Kitamura Y, Nakanuma Y. 1997. Normal and abnormal development of the human intrahepatic biliary system: a review. *Tohoku J Exp Med* 181:19-32.
- Torres VE, Harris PC. 2006. Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:40-55.
- Torres VE, Harris PC, Pirson Y. 2007. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 369:1287-1301.
- Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA. 1999. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* 10:2125-2134.
- Utterson EC, Shepherd RW, Sokol RJ, Bucuvalas J, Magee JC, McDiarmid SV, Anand R; The Split Research Group. 2005. Biliary atresia: clinical profiles, risk factors, and outcomes of 755 patients listed for liver transplantation. *J Pediatr* 147:180-185.
- van den Heuvel MC, Slooff MJ, Visser L, Muller M, De Jong KP, Poppema S, Gouw AS. 2001. Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. *Hepatology* 33:1387-1393.

- van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. 2006. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol* 44:947-955.
- Van Eyken P, Sciot R, Callea F, Van der Steen K, Moerman P, Desmet VJ. 1988. The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 8:1586-1595.
- Vroman B, LaRusso NF. 1996. Development and characterization of polarized primary cultures of rat intrahepatic bile duct epithelial cells. *Lab Invest* 74: 303-313.
- Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. 1998. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 2:247-251.
- Wilson PD. 2001. Polycystin: new aspects of structure, function, and regulation. *J Am Soc Nephrol* 12: 834-845.
- Wilson PD. 2004. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med*; 350:151-64
- Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. 1998. Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93: 177-188.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248.
- Yin L, Lynch D, Ilic Z, Sell S. 2002. Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl₄/2-AAF injury. *Histol Histopathol* 17:65-81
- Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. 2002. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13: 2508–2516.

- Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C. 1999. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285:1553-1558.

10. INDICE

RIASSUNTO/SUMMARY	Pag. 1
1. INTRODUZIONE	Pag. 3
1.1. Cenni di Anatomia Epatica	Pag. 3
1.2. Cenni di Ontogenesi epatica	Pag. 4
1.3. L'albero Biliare Normale	Pag. 7
1.4. Lesioni Biliari nella Patologia Epatica	Pag. 11
1.5. Le Colangiopatie	Pag. 13
2. SCOPO DELLA TESI	Pag. 19
3. MATERIALI E METODI	Pag. 21
3.1. Tessuti Epatici	Pag. 21
3.2. Valutazione Istopatologica dei Fegati Fetalì	Pag. 22
3.3. Valutazione Istopatologica delle Lesioni di Fegati Patologici post-natali	Pag. 22
3.4. Colorazioni Immunoistochimiche	Pag. 23
3.5. Valutazione dell'High Grade Staining dei Fattori Angiogenetici	Pag. 25
3.6. Indice di Proliferazione/Mitoinibizione	Pag. 25
3.7. Analisi Morfometriche Computerizzate	Pag. 29
3.8. Real Time-PCR	Pag. 31
3.9. Isolamento e Coltura di Colangiociti di Ratto	Pag. 32
3.10. Determinazione della Proliferazione Cellulare con Western Blot per PCNA su Colangiociti Isolati di Ratto	Pag. 33
3.11. Isolamento e Coltura di Colangiociti Umani	Pag. 33
3.12. Isolamento e Coltura di Colangiociti di Topo Pkd2 ^{WS25/-} (Modello Murino di ADPKD)	Pag. 33
3.13. Determinazione della Proliferazione Cellulare con Saggio MTS su Colangiociti Umani e Murini	Pag. 34

3.14. Misurazione dei Livelli di VEGF	Pag. 34
3.15. Analisi Statistica	Pag. 34
4. <u>Studio 1.</u> EFFETTI SULLA MALATTIA POLICISTICA DEL RENE AUTOSOMICA DOMINANTE (ADPKD) DELL'IPERESPRESSIONE DI FATTORI ANGIOGENETICI IN COLANGIOCITI UMANI E MURINI.	Pag. 36
4.1. Premessa	Pag. 36
4.2. Risultati	Pag. 37
5. <u>Studio 2.</u> ESPRESSIONE DEI FATTORI DI CRESCITA ANGIOGENETICI DA PARTE DELLE CELLULE EPITELIALI MODULA L'ARTERIOGENESI DURANTE L'ONTOGENESI EPATICA.	Pag. 43
5.1. Premessa	Pag. 43
5.2. Risultati	Pag. 44
6. <u>Studio 3.</u> ANALISI DEI MECCANISMI DI RIGENERAZIONE EPATICA NELLA SINDROME DI ALAGILLE E NELL'ATRESIA DELLE VIE BILIARI RIVELA UN RUOLO PER IL SIGNALING DEL NOTCH.	Pag. 50
6.1. Premessa	Pag. 50
6.2. Risultati	Pag. 51
7. DISCUSSIONE	Pag. 59
7.1. Studio 1	Pag. 59
7.2. Studio 2	Pag. 62
7.3. Studio 3	Pag. 67
8. Conclusioni	Pag. 71
9. REFERENZE	Pag. 73
10. INDICE	Pag. 88