

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
EPATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA - XXV CICLO**  
*Coordinatore Prof. Eugenio Gaudio*

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ANATOMICHE, ISTOLOGICHE,  
MEDICO-LEGALI E DELL'APPARATO LOCOMOTORE**

**SEZIONE DI ANATOMIA UMANA  
“SAPIENZA”  
UNIVERSITÀ DI ROMA**

**RUOLO DELLA MELATONINA E DEL PATHWAY SU CUI ESSA  
AGISCE NELLA REGOLAZIONE DELLA CRESCITA  
DELL'EPITELIO BILIARE SIA IN CONDIZIONI SPERIMENTALI  
CHE NELLE COLANGIOPATIE UMANE E NEL  
COLANGIOCARCINOMA.**

**Dott.ssa Anastasia Renzi**

**Tutor: Prof. Antonio Franchitto**

**Anno Accademico 2012-2013**

## ABSTRACT

I colangiociti sono cellule epiteliali che rivestono l'albero biliare e che in condizioni normali sono quiescenti. In condizioni sperimentali invece, come in seguito a legatura del dotto biliare (BDL) o in alcune colangiopatie umane (es. cirrosi biliare primitiva-PBC) i colangiociti vanno incontro ad una marcata proliferazione. Molti fattori, come per esempio il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e l'ormone follicolo stimolante (FSH) regolano la crescita dell'albero biliare. La melatonina è un ormone secreto dalla ghiandola pineale e da altri tessuti dove agisce da regolatore locale della crescita, come nel tratto gastroenterico. La melatonina esercita i suoi effetti attraverso due recettori di membrana (MT1 e MT2) ed è sintetizzata a partire dal triptofano ad opera di quattro enzimi: triptofano idrossilasi (TPH), aromatico aminoacido decarbossilasi (AADC), serotonina N-acetiltransferasi (AANAT) e acetilserotonina O-metiltransferasi (ASMT). La melatonina agisce modulando l'espressione dei Clock genes nella ghiandola pineale. Nel fegato la melatonina riduce il danno ossidativo. Scarse sono le informazioni circa gli effetti della melatonina sull'epitelio biliare. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare il ruolo della melatonina nella regolazione della proliferazione dell'epitelio biliare. A tal fine abbiamo utilizzato ratti normali e BDL trattati o meno con: i) melatonina, ii) Arilalkilamina-N-acetiltransferasi (AANAT) mismatch, iii) AANAT Vivo Morpholino per 7 giorni e iiii) nude mice iniettati con la linea cellulare di colangiocarcinoma (Mz-Cha-1) trattati o meno con melatonina. Sui campioni epatici dei modelli sperimentali abbiamo valutato: i) l'espressione della melatonina, dei recettori della melatonina (MT1 e MT2) e dei Clock genes, la proliferazione e l'apoptosi colangiocitaria,

ii) i livelli di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) basali e dopo secretina e iii) la fosforilazione della protein-chinasi-A. In aggiunta, abbiamo studiato l'espressione dei recettori della melatonina e di AANAT in frammenti di fegato umano sia normale che affetto da PBC e da colangiocarcinoma. *In vitro*, linee cellulari di grandi colangiociti di topo (LMC), di colangiociti normali umani (H69) e di colangiocarcinoma (Mz-Cha-1) sono state stimulate con melatonina per 48h alla concentrazione di  $10^{-11}$  M, più o meno Luzindolo (MT1 antagonista) o cis-4-Fenil-2-propionamidotetralina (4P-PDOT) (MT1 e MT2 antagonista). Infine, abbiamo valutato l'effetto dell'overespressione di AANAT in LMC e in Mz-Cha-1 su proliferazione, apoptosi e livelli intracellulari di cAMP. I risultati ottenuti hanno dimostrato che: i colangiociti esprimono gli enzimi implicati nella sintesi della melatonina, i recettori MT1 e MT2 e i Clock genes. Il trattamento *in vivo* con melatonina determina una parziale inibizione nella proliferazione dell'epitelio biliare in particolare dopo BDL; la ridotta espressione di AANAT indotta dal Morpholino in ratti normali e BDL induce un parziale aumento della proliferazione. La stimolazione *in vitro* dei colangiociti di topo riduce la crescita colangiocitaria, diminuzione che è prevenuta dal Luzindolo ma non dal 4P-PDOT. Anche l'overespressione *in vitro* di AANAT in LMC determina la diminuzione della crescita colangiocitaria e dei livelli intracellulari di cAMP. L'espressione di AANAT e della melatonina è ridotta nel colangiocarcinoma, mentre aumenta l'espressione dei recettori MT1 e MT2. Nei nude mice iniettati con linee cellulari di colangiocarcinoma si assiste alla diminuzione della massa tumorale in seguito al trattamento con melatonina. L'overespressione di AANAT nelle cellule Mz-Cha-1 determina la riduzione della proliferazione e l'aumento dell'apoptosi. Nella PBC si ha l'aumento

dell'espressione di AANAT, della melatonina e dei suoi recettori MT1 e MT2 rispetto al fegato umano normale.

Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare quindi che la melatonina svolge un ruolo importante nella regolazione della proliferazione colangiocitaria in corso di patologie epatiche colestatiche e nel colangiocarcinoma.

## **ABSTRACT (english)**

Cholangiocytes are epithelial cells which line the biliary tree and that in normal condition are mitotically quiescent. Under experimental conditions, such as bile duct ligation (BDL) or in some human cholangiopathies (eg, primary biliary cirrhosis-PBC) cholangiocytes undergo a marked proliferation. A number of factors including Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Follicle-stimulating hormone (FSH) regulate biliary tree growth. Melatonin is secreted by the pineal gland and other tissues where it acts as a local regulator of growth, as in the gastrointestinal tract. Melatonin exerts its effects through two membrane receptors (MT1 and MT2) and is synthesized from tryptophan by four enzymes: tryptophan-hydroxylase (TPH), aromatic-amino acid decarboxylase (AADC), serotonin N-acetyltransferase (AANAT) and acetylserotonin- O-methyltransferase (ASMT). Melatonin acts by modulating the expression of Clock genes in the pineal gland. In the liver melatonin reduces oxidative damage. Little information exists about the effects of melatonin on biliary epithelium, therefore the aim of this study was to evaluate the role of melatonin in the regulation of proliferation of biliary epithelium. To this end, we used normal and BDL rats treated or not with: i) melatonin, ii) Arilalkilamina-N-acetyltransferase (AANAT) mismatch and iii) AANAT Vivo Morpholino for 7days and iiiii) nude mice injected with the cholangiocarcinoma cell line (Mz-Cha-1) treated or not with melatonin. On liver samples of the experimental models we evaluated: i) the expression of melatonin, the melatonin receptors (MT1 and MT2) and Clock genes, cholangiocytes proliferation and apoptosis, ii) basal and secretin Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and Protein Kinase A (PKA) phosphorylation. In

addition, we evaluated the expression of melatonin, its receptors and AANAT also in fragments of normal human liver, cholangiocarcinoma and PBC. In vitro, large mouse cholangiocytes (LMC), normal human cholangiocytes (H69) and cholangiocarcinoma cell line (Mz-Cha-1) were treated with melatonin  $10^{-11}$  M for 48h, plus or minus Luzindole (MT1 antagonist) or cis-4-Phenyl-2-propionamidotetralin(4P-PDOT) (MT1 and MT2 antagonist); Finally, we evaluated the effects of AANAT overexpression in LMC and in Mz-Cha-1 on proliferation, apoptosis and cAMP pathway. The results obtained showed that: cholangiocytes express AANAT, melatonin and its receptors MT1 and MT2 and Clock genes. Chronic administration of melatonin *in vivo* decreased cholangiocytes proliferation after BDL, and the down-regulation of AANAT in Normal and BDL AANAT Morpholino treated rats increased proliferation. In vitro, melatonin decreased LMC proliferation, decreased which is blocked by Luzindole but not by (4P-PDOT). Overexpression of AANAT in LMC decreased cholangiocytes proliferation, and the intracellular cAMP levels. The expression of AANAT and melatonin decreased in cholangiocarcinoma, instead increased is the expression of MT1 and MT2. In nude mice injected with CCA cell lines the tumor decreased after treatment with melatonin. Overexpression of AANAT in Mz-Cha-1 decreased proliferation and increased apoptosis. In PBC the expression of AANAT, melatonin and its receptors increased if compared to normal. Based on the results obtained, we can say that melatonin plays an important role in the regulation of cholangiocytes proliferation during cholestatic liver diseases and cholangiocarcinoma.

## INTRODUZIONE

### Vie biliari

Le vie biliari originano a livello del polo biliare degli epatociti responsabili della produzione della bile. Una volta prodotta, la bile è secreta nel lume dei canalicoli biliari. I *canalicoli biliari* sono piccoli spazi di 0.5–2  $\mu\text{m}$  delimitati da semplici introflessioni della membrana plasmatica dei poli biliari di epatociti adiacenti. Il polo biliare dell'epatocita che delimita il canalicolo biliare è fornito di numerosi e brevi microvilli sporgenti nel lume ed è isolato dal polo vascolare ad opera di complessi giunzionali (zone occludenti)<sup>1</sup>.

In prossimità del polo biliare, il citoscheletro dell'epatocita presenta numerosi microfilamenti prevalentemente costituiti da proteine contrattili che, posti in prossimità del canalicolo, favoriscono il decorso della bile lungo i canalicoli stessi. I canalicoli biliari dalla regione centrolobulare si portano in prossimità degli spazi portobiliari e raggiungono i canali di Hering<sup>1-5</sup>.

Il punto in cui i canalicoli biliari si continuano con i canali di Hering viene definito giunzione *duttulo-calicolare*. A livello di tale giunzione, la parete delle vie biliari è in parte formata da colangiociti e in parte da epatociti. In questa sede, sono state inoltre identificate cellule parzialmente indifferenziate, le cellule progenitrici epatiche. Esse vanno a costituire un compartimento staminale residente nel fegato in grado di differenziarsi sia verso la linea colangiocitaria che verso la linea epatocitaria<sup>4</sup>.

I *canali di Hering* costituiscono quindi i punti di raccordo anatomico e fisiologico tra canalicoli biliari e dotti biliari interlobulari dello spazio portale. La parete di tali canali è costituita da poche (3 o 4) cellule epiteliali cubiche, o colangiociti, che poggiano su una sottile lamina

propria<sup>6</sup>.

Ai canali di Hering fanno seguito i *dotti interlobulari*, la cui parete è costituita da uno strato continuo di colangiociti di forma cilindrica<sup>1</sup>. I dotti interlobulari hanno un diametro compreso tra 15 e 100  $\mu\text{m}$  e si affiancano, all'interno degli spazi portobiliari, alle ramificazioni dell'arteria epatica, della vena porta, dei nervi e dei vasi linfatici. Tali dotti si portano in condotti di calibro progressivamente maggiore fino a formare due voluminosi condotti intraepatici (dotto epatico destro e sinistro) che drenano rispettivamente il lobo epatico destro e sinistro del fegato e che, a livello dell'ilo, danno origine alle vie biliari extraepatiche<sup>7,8,9</sup>.

I dotti biliari intraepatici si possono classificare nell'uomo in base al diametro: grandi dotti ( $>800 \mu$ ), e progressivamente dotti segmentali, zonali, settali, interlobulari(15-100  $\mu$ ) e duttuli ( $<15 \mu$ ). Alle vie biliari intraepatiche fanno seguito le vie biliari extraepatiche, esse hanno un'organizzazione ed una struttura del tutto caratteristiche<sup>1</sup>.

Infatti, nell'uomo sono costituite dai dotti epatici destro e sinistro. Questi a livello dell'ilo epatico, si uniscono andando a formare il dotto epatico comune che, a sua volta si unisce al dotto cistico proveniente dalla cistifellea o colecisti<sup>1</sup>.

Da questa confluenza ha origine il dotto coledoco che, percorrendo il legamento epato-duodenale, passa posteriormente alla prima porzione del duodeno e alla testa del pancreas e penetra nella seconda porzione duodenale per sboccare nell'ampolla duodenale maggiore insieme al dotto pancreatico principale<sup>1</sup>.

Dotto epatico destro e sinistro, dotto epatico comune costituiscono la via biliare principale, mentre la cistifellea e il dotto cistico rappresentano la via biliare accessoria<sup>1</sup>.

Studi morfologici condotti su sezioni di fegato di ratto hanno



dimostrato che le vie biliari intraepatiche si dividono in: piccoli dotti (<15  $\mu\text{m}$  di diametro) delimitati da piccoli colangiociti; e grandi dotti (>15  $\mu\text{m}$  di diametro) delimitati da grandi colangiociti<sup>7,8,10</sup>.

In particolare si è visto che le vie biliari intraepatiche nel ratto sono costituite da dotti di differenti dimensioni da 5 a 200  $\mu\text{m}$  di diametro delimitati da colangiociti eterogenei per dimensioni da 8 a 15  $\mu\text{m}^2$ .

Nel ratto, la via biliare extraepatica è caratterizzata dall'assenza della cistifellea: infatti, i dotti provenienti dai lobi epatici si uniscono tra di loro a formare il dotto biliare o coledoco che sbocca direttamente nel primo tratto dell'intestino tenue<sup>9</sup>.

Le vie biliari sono irrorate da rami terminali dell'arteria epatica, che costituiscono un complesso sistema vascolare denominato *Plesso Peribiliare (PPB)*. Il Plesso Peribiliare, si estende fino ai dotti interlobulari e termina nei sinusoidi epatici, sia direttamente attraverso rami lobulari, che indirettamente attraverso rami della vena porta o rami prelobulari<sup>9,11,12</sup>.

Le modalità di terminazione dell'arteria epatica e la dimostrazione dell'esistenza di un Plesso Peribiliare prima dello sbocco dell'arteria nella rete sinusoidale è stata resa possibile attraverso l'osservazione di calchi microvascolari con il Microscopio Elettronico a Scansione<sup>10,11</sup>.

Inoltre numerosi studi effettuati sul ratto hanno dimostrato che i piccoli ed i grandi dotti biliari presentano una differente vascolarizzazione. Infatti, il Plesso Peribiliare è maggiormente esteso a livello dei grandi dotti biliari. La conseguente differenza di apporto ematico influenza fortemente le capacità metaboliche e le funzioni dei dotti biliari di calibro diverso e dei colangiociti che ne costituiscono le pareti<sup>12,13</sup>.

Infine, da un punto di vista fisiologico, il Plesso Peribiliare è

fondamentale nel permettere l'attivo riassorbimento e quindi la modificazione della bile da parte dei colangiociti. In particolare, esso consente di riassorbire sostanze presenti nella bile e di ricondurle, attraverso il letto sinusoidale, in prossimità del polo vascolare degli epatociti<sup>12</sup>.

Nell'uomo le vie biliari intra- ed extraepatiche sono innervate da nervi del sistema nervoso autonomo che originano dal plesso celiaco (fibre simpatiche) e dal nervo vago (fibre parasimpatiche). Accanto ai classici neurotrasmettitori (adrenalina, noradrenalina ed acetilcolina), le fibre neurovegetative rilasciano nel fegato numerosi altri neuropeptidi come il Neuropeptide Y (NPY), il Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), la somatostatina, il Vasoactive Intestinal Polipeptide (VIP), l'encefalina e la bombesina. Molti di questi neuropeptidi si sono dimostrati capaci di influire in senso stimolatorio od inibitorio l'attività funzionale dei colangiociti<sup>14-18</sup>.

### **Colangiociti: funzioni e loro regolazione**

I colangiociti sono le cellule epiteliali che costituiscono la parete delle vie biliari. Sia nel ratto che nell'uomo si presentano come cellule eterogenee per quanto concerne la loro dimensione che può variare da 3 a 15  $\mu\text{m}^2$  in relazione al diametro dei dotti in cui si trovano<sup>7,8,10</sup>.

Tale eterogeneità di dimensioni corrisponde ad ulteriori differenze morfologiche, ultrastrutturali, antigeniche, funzionali e proliferative<sup>7,8,10</sup>.

Infatti, morfologicamente, i *piccoli colangiociti* possiedono forma cuboidale e sono caratterizzati dal possedere un grande nucleo e scarso citoplasma. Tale aspetto è tipico di cellule poco differenziate. I *grandi colangiociti* invece hanno forma cubica-colonnare, presentano un nucleo piccolo ed abbondante citoplasma<sup>7,8,10</sup>. Entrambi

esprimono la citocheratina 7 e 19, la fosfatasi alcalina e soltanto i grandi colangiociti il recettore per la secretina.

I colangiociti rappresentano le cellule target di un gruppo di patologie croniche colestatiche del fegato che prendono il nome, nel complesso, di colangiopatie. Le colangiopatie sono caratterizzate dalla progressiva scomparsa dei dotti biliari intraepatici che conduce ad una severa duttopenia negli stadi terminali. Negli stadi precoci di tali malattie, la scomparsa dei dotti biliari viene compensata dalla proliferazione dei dotti sopravvissuti. La progressione del quadro patologico è legata al bilancio tra i fenomeni di morte e di proliferazione cellulare; pertanto, gli stadi terminali sono contraddistinti dall'incapacità dei fenomeni proliferativi di far fronte alla continua perdita dei colangiociti<sup>19,20</sup>. Per tali ragioni un numero sempre crescente di studi ha posto l'attenzione sui meccanismi di proliferazione dei colangiociti nel tentativo di individuare possibili strategie terapeutiche per sostenere e supportare un'efficace proliferazione dei dotti biliari intraepatici e ritardare l'evoluzione del quadro patologico. Dal punto di vista sperimentale, un utile modello animale per lo studio della proliferazione delle vie biliari intraepatiche è rappresentato dalla legatura delle vie biliari (bile duct ligation: BDL) nel ratto che determina una selettiva proliferazione dei dotti biliari intraepatici. Tale proliferazione è responsabile dell'incremento della massa dei dotti biliari intraepatici e dei colangiociti che arrivano a rappresentare fino al 30% delle cellule parenchimali del fegato (normalmente ne rappresentano il 2%)<sup>21,22</sup>. La proliferazione dei colangiociti fa parte della cosiddetta "ductular reaction", termine che indica la proliferazione di una popolazione di cellule epiteliali all'interfaccia tra epatociti e spazio portale costituita da colangiociti, cellule progenitrici epatiche ed epatociti<sup>4,18,23</sup>. Diversi studi

sperimentali hanno definito quattro tipi di proliferazione colangiocitaria<sup>18</sup>.

1. *Proliferazione di tipo I o tipica*: rappresenta una reazione iperplastica che comporta un aumento, confinato nello spazio portale, del numero dei dotti biliari intraepatici. I colangiociti proliferanti formano strutture tubulari ben differenziate che presentano un lume ben definito<sup>4,24</sup>. Nel ratto una proliferazione “tipica” viene osservata in diverse condizioni sperimentali quali, ad esempio, la legatura delle vie biliari (BDL)<sup>25</sup>, l’epatectomia parziale<sup>24</sup> ed il trattamento cronico con L-prolina<sup>26</sup>. Inoltre, la proliferazione “tipica” può essere ottenuta anche con la somministrazione in acuto di alte dosi di CCL<sub>4</sub> e con la somministrazione cronica di  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanato (ANIT) o di sali biliari. Nell’uomo, una proliferazione colangiocitaria tipica può essere osservata in corso di una colestasi ostruttiva acuta di grado severo e nelle prime fasi delle patologie colestatiche croniche. Questo tipo di proliferazione sembra essere dovuta all’allungamento dei dotti biliari preesistenti localizzati negli spazi portali e ciò è confermato da diverse evidenze sperimentali nel ratto e nell’uomo<sup>18,27</sup>.

2. *Proliferazione di tipo II o atipica*: nel ratto si presenta in seguito a somministrazione di tetracloruro di carbonio<sup>28</sup>; nell’uomo è presente dopo necrosi epatica massiva, epatopatia alcolica, iperplasia nodulare focale e nelle patologie colestatiche croniche quali cirrosi biliare primitiva e colangite sclerosante primitiva<sup>18,29</sup>; è caratterizzata da una proliferazione irregolare dei dotti biliari intraepatici non confinata nello spazio portale ma estesa nella zona periportale e nel parenchima epatico adiacente e capace di costituire occasionalmente cordoni cellulari con gli epatociti.

Questo tipo di proliferazione determina la formazione di strutture duttulari irregolari e tortuose che non possiedono un lume ben definito e sono associate ad infiammazione e ad infiltrazione di polimorfonucleati neutrofilici; inoltre tali dotti neoformati non sono funzionalmente efficienti. A differenza della proliferazione “tipica”, nella proliferazione di tipo II è stata descritta la presenza di cellule di transizione con caratteristiche fenotipiche sia di colangiociti sia di epatociti. Tale riscontro è a favore dell'ipotesi che la proliferazione atipica sia un fenomeno di metaplasia e che possa quindi originare dal compartimento delle cellule progenitrici epatiche piuttosto che rappresentare una replicazione dei dotti preesistenti<sup>18,29</sup>.

3. *Proliferazione di tipo III*: è una proliferazione massiva ad origine dal compartimento delle cellule progenitrici epatiche in seguito a necrosi epatica submassiva<sup>18</sup>.
4. *Proliferazione di tipo IV (“oval cell” proliferation)*: è caratteristica degli stadi precoci della carcinogenesi nel fegato di ratto ed è causata da numerosi composti chimici. È caratterizzata dalla formazione di strutture tubulari irregolari e disorganizzate, con un lume non ben definito, che si aggettano all'interno del lobulo epatico con alterazione dell'architettura dell'intero parenchima<sup>18</sup>.

Tale classificazione della proliferazione colangiocitaria è basata soprattutto su studi sperimentali; nella patologia umana la distinzione tra proliferazione “tipica” e “atipica” non è di facile applicazione. Numerosi fattori di crescita, ormoni e neuropeptidi sono coinvolti nella regolazione della proliferazione dei colangiociti (*Tabella 1*). Lo stimolo proliferativo sembra essere legato sia all'aumento della pressione all'interno del lume dei dotti biliari intraepatici sia a numerosi fattori

biomateriali che sembrano giocare un ruolo importante<sup>30</sup>.

### *Fattori di Crescita e Citochine*

È stato dimostrato che l'epidermal growth factor (EGF), l'hepatocyte growth factor (HGF), l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1), l'interleukina-6 (IL-6), l'interleukina-1 $\alpha$ , il tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sono capaci di stimolare in vitro ed in vivo la proliferazione dei colangiociti (Tabella 1)<sup>18,31,32</sup>.

### *Estrogeni e asse GH – IGF1.*

È noto che gli ormoni steroidei sessuali sono in grado di influenzare lo sviluppo e il decorso di patologie epatiche<sup>33</sup>. È stato dimostrato come i colangiociti siano cellule estrogeno-sensibili in grado di esprimere entrambe i recettori per gli estrogeni (ER- $\alpha$  ed ER- $\beta$ ) a differenza degli epatociti che esprimono solo il recettore ER- $\alpha$ <sup>22</sup> (Tabella 1).

Anche l'IGF1 è in grado di regolare la proliferazione colangiocitaria. Infatti, l'IGF1 è un peptide circolante (di cui il fegato rappresenta la fonte produttiva principale) che agisce localmente come fattore di crescita dalle molteplici funzioni endocrine, paracrine ed autocrine<sup>34,35</sup> (Tabella 1).

L'IGF1 è sintetizzato dal fegato sotto il controllo ipofisario del GH (*Growth Hormone*) che, dopo essersi legato a recettori specifici (*GH-R*), induce la sintesi e il rilascio in circolo di IGF1 in grado di giocare un ruolo chiave nell'accrescimento postnatale di numerosi organi. Pertanto, nei colangiociti si assiste ad una complessa interazione tra estrogeni ed IGF1 che assieme intervengono nella modulazione dei processi di proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare

favorendo i processi di riparazione tissutale<sup>34,36</sup> (Tabella 1).

### *Neuropeptidi*

L'attività e la proliferazione dei colangiociti sono regolate dal sistema nervoso vegetativo, parasimpatico ed ortosimpatico, in modo coordinato. Tali cellule, infatti, esprimono il recettore per l'acetilcolina che è responsabile del controllo dei processi di secrezione. Il sistema nervoso parasimpatico svolge inoltre un importante ruolo nel regolare la proliferazione cellulare come mostrato nel ratto BDL dopo vagotomia. Questo modello è caratterizzato dalla riduzione delle cellule in proliferazione e dall'aumento di quelle in apoptosi; tale effetto sembra essere legato alla regolazione dell'attività dell'adenilatociclastasi e conseguentemente dei livelli intracellulari di cAMP che ha un ruolo fondamentale nel sostenere la proliferazione e prevenire l'apoptosi<sup>37</sup>. I livelli intracellulari di cAMP sono inoltre sotto il controllo dalla somatostatina, i cui recettori SSTR2 sono presenti nei colangiociti murini ed umani; nel ratto BDL, la somatostatina agisce come inibitore della proliferazione colangiocitaria mediante l'inibizione dell'adenilatociclastasi<sup>38</sup>. Nel ratto sottoposto ad epatectomia parziale, la conservazione dell'innervazione simpatica è un requisito fondamentale per la rigenerazione epatocitaria e colangiocitaria; i colangiociti del ratto esprimono sia recettori adrenergici sia dopaminergici e ciò sottolinea il ruolo anche del sistema ortosimpatico nel regolare le funzioni e la proliferazione delle cellule dei dotti biliari<sup>39</sup>.

La gastrina è un ormone polipeptidico prodotto dalle cellule G dello stomaco con funzione principale di regolare la secrezione gastrica. Tale ormone diminuisce la secrezione di bile e i livelli di cAMP indotti da secretina mediante l'interazione con i suoi recettori CCK-A e CCK-

B presenti sulla membrana basolaterale dei colangiociti<sup>40</sup>.

### *Sali Biliari*

Infine, anche i sali biliari sono in grado di influenzare la proliferazione dei dotti biliari. Infatti, nel ratto BDL i colangiociti risultano molto sensibili alle variazioni della composizione del pool dei sali biliari. E' stato infatti dimostrato che mentre il Litocolato, il Taurocolato ed il Taurolitocolato favoriscono la proliferazione dei colangiociti, l'Ursodesossicolato ed il Tauroursodesossicolato ne inibiscono la proliferazione (*Tabella 1*)<sup>41</sup>.

*Tabella 1. Principali fattori che regolano la proliferazione dei colangiociti.*

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>Fattori di crescita e citochine</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ IGF-1</li> <li>↑ EGF</li> <li>↑ HGF</li> <li>↑ TGF-<math>\alpha</math></li> <li>↑ TNF-<math>\alpha</math></li> <li>↑ VEGFs</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ TGF-<math>\beta</math></li> </ul>                              |
| <b>Ormoni E neuropeptidi</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Estrogeni</li> <li>↑ Secretina</li> <li>↑ Acetilcolina</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Gastrina</li> <li>↓ Somatostatina</li> </ul>                   |
| <b>Sali Biliari</b>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Litocolato</li> <li>↑ Taurocolato</li> <li>↑ Taurolitocolato</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Ursodesossicolato</li> <li>↓ Tauroursodesossicolato</li> </ul> |



### *Apoptosi e colangiociti*

Nelle vie biliari intraepatiche normali umane, i colangiociti in apoptosi variano per numero e distribuzione oltre che per l'espressione delle diverse proteine del pathway mitocondriale dell'apoptosi: infatti, maggiore è il diametro del dotto biliare intraepatico e, maggiore è il numero di cellule in apoptosi; ciò enfatizza la differente attività cellulare dei colangiociti che varia a seconda della posizione anatomica da essi occupata all'interno delle vie biliari. Nel fegato umano normale, infatti, è stato visto che l'espressione delle proteine del pathway mitocondriale dell'apoptosi varia nelle diverse porzioni dell'albero biliare, in particolare le cellule dei piccoli dotti interlobulari esprimono diffusamente le proteine anti-apoptotiche Bcl2, Bcl-Xl e mcl-1 che, di contro, sono poco espresse nelle cellule dei grandi dotti biliari e dei dotti biliari settali; la proteina pro-apoptotica Bax risulta invece espressa diffusamente lungo tutto l'albero biliare. Il balance tra l'espressione di Bax e di Bcl2 è diverso nei grandi dotti biliari se paragonato ai piccoli dotti interlobulari; infatti nei grandi dotti biliari il balance tra proteine anti-(Bcl2) e pro-(Bax) apoptotiche è a favore di quest'ultime, contrariamente a quanto avviene nei piccoli dotti biliari. Ciò potrebbe spiegare la differente distribuzione del numero dei colangiociti in apoptosi lungo le vie biliari e la loro prevalenza nei dotti di diametro maggiore<sup>42</sup>. L'apoptosi può essere determinata da numerosi fattori quali la deprivazione di fattori di crescita, processi immuno-mediati, agenti infettivi e sostanze tossiche<sup>30</sup>. Il ruolo dell'apoptosi nei colangiociti e nella patofisiologia di queste cellule è ad oggi di grande interesse scientifico. Nella patologia umana è molto importante il ruolo della morte programmata nella patogenesi e nella progressione delle colangiopatie ed in particolare nella cirrosi biliare primitiva in cui l'evoluzione verso la fase duttopenica è legata al

balance tra fenomeni proliferativi e fenomeni apoptotici con la prevalenza di questi ultimi<sup>43,44</sup>.

## **Colangiopatie**

I colangiociti hanno fisiologicamente bassa attività replicativa ma, in alcune condizioni patologiche, come nelle cosiddette colangiopatie anche note come “Vanishing Bile Duct Syndromes”, essi diventano le cellule target andando incontro a processi proliferativi seguiti poi da aumentata apoptosi. Le “Vanishing Bile Duct Syndromes”, sono infatti caratterizzate dalla progressiva scomparsa dei dotti biliari seguita da grave grado di duttopenia e quindi gravissime conseguenze per la funzionalità epatica. E' stato visto che le colangiopatie sono responsabili di oltre il 20% dei trapianti di fegato negli adulti e dell'80% delle indicazioni di trapianto di fegato in età pediatrica. Esempi di colangiopatie sono la Cirrosi Biliare Primitiva (PBC)<sup>43</sup> e la Colangite Sclerosante Primitiva (PSC)<sup>40</sup>.

### *La Cirrosi Biliare Primitiva (CBP)*

La cirrosi biliare primitiva è una malattia del fegato di tipo autoimmune, di cui non si conosce ancora la precisa eziopatogenesi, che colpisce maggiormente le donne tra i 35 a 60 anni<sup>45</sup>. Dal punto di vista istologico, è caratterizzata da infiammazione portale con progressiva distruzione dei dotti biliari intraepatici e successiva fibrosi, cirrosi e fallimento epatico<sup>46</sup>. Tali alterazioni si presentano con un grado di severità e con una velocità di progressione differente da paziente a paziente. L'evoluzione della patologia comporta la progressiva perdita dei dotti biliari intraepatici con la successiva riduzione della secrezione biliare e la mancata eliminazione di sostanze tossiche dal fegato responsabili di un ulteriore danno

epatico. La cronicità del processo patologico determina progressivamente fibrosi e conseguente cirrosi epatica con l'evoluzione finale verso l'insufficienza epatica<sup>46</sup>.

La cirrosi biliare primitiva può essere suddivisa in quattro stadi non sempre nettamente distinguibili e, possono essere contemporaneamente presenti quadri istologici imputabili a tutti gli stadi<sup>46,47</sup>.

Nel I stadio (stadio colangitico), le alterazioni interessano soprattutto i dotti biliari interlobulari e l'epitelio biliare si presenta danneggiato. Gli spazi portali coinvolti sono allargati e infiltrati da cellule infiammatorie. Gli epatociti risultano scarsamente interessati dal processo in atto e mancano i segni di colestasi<sup>21,48</sup>.

Nel II stadio (stadio della proliferazione duttulare), ha inizio la sclerosi delle pareti dei dotti biliari interlobulari; caratterizzata dalla inefficace proliferazione dei dotti biliari; in questo stadio sono inoltre evidenti i segni di colestasi intralobulare<sup>18,48</sup>.

Il III stadio (stadio della fibrosi o precirrotico) è caratterizzato dalla riduzione della flogosi periportale e periduttale e dalla progressiva comparsa di fibrosi inter- e perilobulare con l'iniziale formazione di setti senza rigenerazione nodulare; la progressiva distruzione ed ostruzione dei dotti interlobulari è responsabile della gravità della colestasi.

Il IV stadio (stadio cirrotico) è il solo stadio in cui il termine cirrosi biliare è appropriato ed è istologicamente caratterizzato dalla progressione ed all'aggravarsi della fibrosi con la comparsa di fenomeni rigenerativi epatocellulari sotto forma di noduli; noduli che conferiscono all'organo un aspetto simil cirrotico o francamente cirrotico. Inoltre, caratteristica fondamentale di questo stadio è la duttopenia che si presenta particolarmente marcata con una drastica

riduzione dei dotti biliari interlobulari<sup>19,20,29,43</sup>; Nella maggior parte dei casi, la PBC progredisce lentamente, anche se l'età avanzata, gli elevati livelli sierici di bilirubina, la diminuzione di quelli dell'albumina insieme allo sviluppo di cirrosi, possono contribuire ad accorciare la sopravvivenza del paziente. Farmaci immunosoppressivi e anti-infiammatori vengono utilizzati per il trattamento di questa colangiopatia, basandosi sulla sua patogenesi autoimmune, ma una cura soddisfacente per la completa risoluzione della malattia ancora non è disponibile. Ad oggi, solo l'acido ursodeossicolico contribuisce a prevenire o ritardare la necessità di un trapianto di fegato<sup>49</sup>.

### *Il Colangiocarcinoma*

Il colangiocarcinoma o carcinoma colangiocellulare (CCA) è un tumore altamente maligno che si sviluppa dalla trasformazione maligna di colangiociti intra o extraepatici con prognosi devastante.

Tenendo conto della sede da cui origina, il colangiocarcinoma può essere classificato in extraepatico ed intraepatico. La forma extraepatica interessa il coledoco o i dotti epatici. La forma intraepatica origina dai dotti biliari intraepatici e si presenta generalmente come lesione epatica occupante spazio. E' una delle neoplasie a prognosi più infausta; infatti, la sopravvivenza media è del 7-8% a 5 anni dalla diagnosi<sup>50</sup>.

Il colangiocarcinoma, inoltre, è una neoplasia per la quale in tutto il mondo è segnalato un progressivo incremento di incidenza e prevalenza<sup>51</sup>. La forma extraepatica è la più comune con una frequenza che va dall'80% al 90%. Nella maggior parte dei casi, il colangiocarcinoma si presenta senza evidenti fattori causali. Tuttavia, in una minoranza di casi, sono noti fattori di rischio quali precedenti condizioni predisponenti, abitudini e stili di vita oppure esposizioni a

fattori ambientali che aumentano la probabilità di sviluppare il tumore<sup>51,52</sup>. In particolare, tutti i principali fattori di rischio identificati hanno in comune un processo di infiammazione cronica delle vie biliari e tra questi abbiamo:

- ✓ colangite sclerosante primitiva: una malattia nella quale i dotti biliari intraepatici ed extraepatici si presentano “stenotici” in seguito ad un quadro infiammatorio cronico che provoca la formazione di tessuto cicatriziale; tale restringimento ostacola il deflusso della bile che si accumula nel fegato, danneggiando ulteriormente le sue cellule<sup>25,28</sup>;
- ✓ malformazioni cistiche delle vie biliari (malattia di Caroli e cisti coledociche): determinano un reflusso e una stasi delle secrezioni biliari e pancreatiche con la conseguente formazione di calcoli e possibile superinfezione batterica<sup>25,28</sup>.
- ✓ infestazioni parassitarie: frequente nei Paesi Orientali, di solito determinata dal parassita *Fasciola Epatica* che è collegata al consumo di pesce crudo o poco cotto ed è responsabile della cosiddetta colangioepatite d’Oriente<sup>28,53</sup>.
- ✓ cirrosi epatica: caratterizzata da degenerazione e rigenerazione nodulare del fegato; è più frequentemente dovuta ad abuso di alcol oppure all’infezione cronica da virus dell’epatite B (HBV) o C (HCV) oppure ad alcune rare malattie ereditarie del metabolismo, come l'emocromatosi, la tirosinemia, il deficit di alfa-1 tripsina, l'ipercitrullinemia, la glicogenosi e il morbo di Wilson<sup>28,53</sup>.
- ✓ litiasi biliare: caratterizzata dalla formazione di calcoli di dimensioni variabili da pochi millimetri a qualche centimetro all’interno della colecisti. E’ una patologia a maggiore diffusione nel sesso femminile in associazione spesso a gravidanze multiple, obesità o drastici cali ponderali<sup>54,55</sup>.

- ✓ esposizione ad agenti fisici e chimici: in particolare radon, asbesto, thorostrast, nitrosammine e diossina<sup>28,53</sup>;
- ✓ obesità: è considerata fattore di rischio per lo sviluppo del colangiocarcinoma extraepatico<sup>28,53</sup>;
- ✓ fumo di tabacco: non può essere considerato un fattore di rischio per la popolazione generale, ma è associato allo sviluppo di colangiocarcinoma in pazienti con PSC<sup>28,53</sup>.

A tutt'oggi, scarse sono le conoscenze sulla biologia del colangiocarcinoma, in particolare delle alterazioni genetiche che potrebbero essere alla base del colangiocarcinoma. L'identificazione di difetti genetici associati allo sviluppo di tumore potrebbe permettere di identificare individui ad alto rischio (ad esempio pazienti con CSP a rischio di sviluppare colangiocarcinoma) o di fare uno screening sui familiari di pazienti con tumore. Questo potrebbe aggiungere informazioni prognostiche ai metodi tradizionali per la stadiazione dei pazienti e per migliorare la predittività dell'andamento clinico della malattia<sup>28,53</sup>.

Il colangiocarcinoma è un adenocarcinoma che come già detto ha origine dall'epitelio delle vie biliari e nelle forme ben differenziate ricorda assai da vicino i dotti biliari<sup>28,53</sup>. E' possibile trovare muco nei citoplasmi delle cellule tumorali e nei lumi simil-ghiandolari; talvolta la diagnosi differenziale rispetto a metastasi epatiche da adenocarcinomi dell'intestino può essere assai ardua. Una caratteristica importante dal punto di vista differenziale è rappresentata dalla ricchezza di connettivo fibroso, questo può talora conferire al tumore un aspetto scirroso, ed è responsabile della notevole consistenza della massa neoplastica. Più del 90% dei colangiocarcinomi sono ben differenziati e sono classificati come adenocarcinomi mucino-secernenti<sup>56</sup>.

Macroscopicamente il colangiocarcinoma può presentarsi come tumore sclerosante, nodulare, misto o come tumore papillare. Il colangiocarcinoma papillare è associato ad una prognosi migliore. La sopravvivenza è in relazione al grado di differenziazione tumorale, certamente un colangiocarcinoma ben differenziato ha una sopravvivenza maggiore (più di 10 mesi), di un colangiocarcinoma anaplastico che ha una sopravvivenza inferiore a 2 mesi. Studi recenti hanno dimostrato una peggiore prognosi nei giovani con età inferiore ai 40 anni che non nei pazienti anziani, dopo la resezione di un colangiocarcinoma intraepatico<sup>57,58</sup>. Il colangiocarcinoma ha un'alta frequenza di metastasi a distanza. Queste si hanno prevalentemente per via linfatica, con diffusione ai linfonodi dell'ilo epatico e di altre stazioni addominali e toraciche.

I segni e i sintomi clinici di presentazione del colangiocarcinoma dipendono dalla sede del tumore. L'ittero è frequentemente un segno iniziale dei tumori delle vie biliari extraepatiche mentre è meno frequente nei pazienti con colangiocarcinoma intraepatico. Altre presentazioni cliniche comuni in caso di ostruzione biliare sono: le feci poco colorate e cretacee, le urine di colore scuro, il prurito; inoltre, segni clinici tipici sono l'aumento del volume del fegato, anche sotto forma di massa nella regione addominale superiore destra talora associata a dolore, la perdita di peso e la febbre<sup>58</sup>. La diagnosi di colangiocarcinoma non risulta sempre semplice, specie quando vengono a mancare le manifestazioni tipiche (ittero, dolore, alterazione di feci e urine ipercromiche) che allarmano il paziente e lo inducono a rivolgersi al medico e a sottoporsi agli accertamenti del caso. Nel sospetto di presenza di una neoplasia delle vie biliari occorre effettuare una serie di esami clinici, ematici e strumentali che consentano di giungere a una rapida e corretta diagnosi di conferma

o di esclusione della malattia oncologica. Tra gli esami di laboratorio risulta utile il dosaggio della bilirubina, della fosfatasi alcalina, della glutamiltrasferasi, nonché dei marcatori tumorali CEA e soprattutto CA 19.9, i cui valori sembrano importanti anche per escludere residui di tessuto tumorale dopo l'exeresi chirurgica, per documentare un'iniziale recidiva della malattia o per valutare gli effetti delle terapie mediche, in particolar modo della chemioterapia<sup>58</sup>.

Scarse sono le conoscenze sulla biologia del colangiocarcinoma il quale è caratterizzato da una notevole resistenza ai comuni chemioterapici tanto che allo stato attuale sembrano scarsi i trattamenti in grado di migliorare la prognosi di questa neoplasia. Anche a causa della mancanza di sufficiente conoscenza dei meccanismi intracellulari che regolano la crescita del colangiocarcinoma, non sembrano esistere ancora per questa neoplasia trattamenti efficaci<sup>59</sup>. Alla base dello sviluppo e della crescita del colangiocarcinoma c'è molto probabilmente uno squilibrio tra i meccanismi che regolano la proliferazione dei colangiociti e quelli che ne regolano l'apoptosi<sup>60,61</sup>, squilibrio che porta ad una crescita non controllata delle cellule neoplastiche. Come già descritto, la proliferazione dei colangiociti è regolata da numerosi fattori tra cui ormoni (secretina, gastrina), neuropeptidi (somatostatina, dopamina, acetilcolina), fattori di crescita e sali biliari<sup>60</sup>.

Tuttavia, il ruolo di queste sostanze nella patogenesi e nella modulazione della proliferazione del colangiocarcinoma e delle colangiopatie in genere è poco nota. Alcuni studi sembrano suggerire che neuropeptidi ed ormoni possano svolgere un ruolo importante nella biologia del colangiocarcinoma e delle colangiopatie<sup>62,63</sup>.

Grande risalto è stato dato al ruolo degli ormoni sessuali nella regolazione della proliferazione maligna e non dei colangiociti<sup>64,65</sup>. In



particolare, è noto che gli estrogeni svolgano un ruolo importante nel favorire la proliferazione delle cellule neoplastiche che ne esprimono i recettori.

Gli estrogeni potrebbero agire sulla proliferazione delle cellule neoplastiche anche potenziando l'effetto di ulteriori fattori di crescita<sup>64</sup>. Tra i fattori di crescita, l'IGF1 ha un ruolo chiave nella patogenesi neoplastica come dimostrato dalla stretta correlazione tra i suoi livelli nel sangue e la rapidità di crescita di numerosi tumori<sup>65,66</sup>. Infine, recentemente grande risalto è stato dato al ruolo della melatonina nella patogenesi tumorale e delle colangiopatie<sup>63,67</sup>.

## **Melatonina**

La melatonina è un ormone secreto prevalentemente dalla ghiandola pineale<sup>9</sup> e da altri tessuti come ad esempio quelli del tratto gastrointestinale dove agisce da regolatore locale della crescita<sup>63</sup>. La melatonina è sintetizzata a partire dal triptofano da quattro enzimi: triptofano idrossilasi (TPH), aromatico aminoacido decarbossilasi (AADC), serotonina N-acetiltransferasi (AANAT) e acetilserotonina O-metiltransferasi (ASMT)<sup>63,68</sup>. Essa esercita i suoi effetti interagendo con due recettori di membrana legati a proteina G, il recettore 1A e 1B della melatonina (MT1 e MT2) modulando secondi messaggeri intracellulari come il cAMP, molecola chiave nella regolazione delle funzioni dei grandi colangiociti, e il Ca<sup>2+</sup>, un importante molecola di segnale in grado di regolare le funzioni dei piccoli colangiociti<sup>16</sup>. Infatti è stato visto che l'interazione della melatonina con il proprio recettore inibisce i livelli di cAMP in svariati tipi di cellule incluse le cellule pancreatiche di ratto<sup>55</sup>. I recettori della melatonina sono presenti a livello del sistema nervoso centrale<sup>69</sup> così come in alcuni tessuti periferici compreso il piccolo intestino e gli epatociti<sup>70,71</sup>. Nel fegato la

melatonina riduce il danno ossidativo, attenua la proliferazione e stimola l'apoptosi degli epatociti in ratti sottoposti ad epatectomia parziale<sup>72</sup>. La melatonina migliora la fibrosi epatica e lo stress ossidativo sistemico in ratti BDL colestatici<sup>52,73</sup>. Scarse sono le informazioni riguardo il ruolo ed i meccanismi d'azione tramite cui la melatonina modula l'iperplasia biliare nei ratti colestatici. La melatonina regola inoltre la mitosi cellulare modulando il ritmo circadiano che a sua volta è regolato da un set di Clock genes: Period 1, 2, e 3 (PER1–3); Cryptochrome 1 e 2 (CRY1 e CRY2); CLOCK; BMAL1 e BMAL2<sup>74</sup>. Per esempio è stato visto che la melatonina ha azione antiproliferativa nel tumore della mammella in quanto è in grado di risincronizzare i Clock genes<sup>65</sup>. Diversi studi hanno dimostrato che la secrezione di melatonina è compromessa in pazienti affetti da tumore della mammella, tumore dell'endometrio e tumore del colon retto<sup>67,75,76</sup>, suggerendo che ridotti livelli di melatonina sono legati all'aumentata incidenza di diversi tipi di tumore. Tuttavia non esistono dati riguardo il ruolo della melatonina come regolatore autocrino della crescita del colangiocarcinoma. E' stato inoltre dimostrato che la melatonina svolge azione chemoprotettiva nel CCA indotto dall'infezione da *O. viverrini*, riducendo i danni ossidativi del DNA<sup>77</sup>. Tuttavia, è ancora sconosciuto l'esatto ruolo della melatonina nella fisiologia delle vie biliari e nella patogenesi del colangiocarcinoma e delle colangiopatie umane come la Cirrosi Biliare Primitiva.

## SCOPI DEL PROGETTO DI RICERCA

Gli scopi del presente progetto di ricerca sono stati:

- ✓ valutare l'espressione ed il ruolo della melatonina, dei suoi recettori e dei Clock genes (CLOCK, BMAL1, PER1 e CRY1) nel fegato normale ed in corso di colestasi nel ratto;
- ✓ valutare l'espressione ed il ruolo di AANAT, l'enzima chiave della sintesi della melatonina, e gli effetti della sua modulazione *in vivo* ed *in vitro* sulla proliferazione colangiocitaria nel fegato normale ed in corso di colestasi nel ratto;
- ✓ valutare il ruolo della melatonina nella regolazione della crescita colangiocitaria.
- ✓ valutare l'espressione della melatonina e dei suoi recettori nei colangiociti di fegato umano normale ed in corso di cirrosi biliare primitiva;
- ✓ valutare il ruolo della melatonina nella evoluzione del colangiocarcinoma

## MATERIALI E METODI

### ***Modello sperimentale***

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

- ✓ ratti normali: n=8;
- ✓ ratti BDL (legatura delle vie biliari per 1 settimana): n=8;
- ✓ ratti normali e BDL trattati con melatonina (2 mg/g di peso corporeo per 1 settimana): n=8;
- ✓ ratti Normali e BDL trattati con AANAT mismatch e AANAT Vivo Morpholino per una settimana: n=8;
- ✓ Topi Balb nude (nu/nu) di sei settimane.

I ratti normali e BDL, di ceppo Fischer (peso compreso tra 150 e 175 gr) maschi sono stati acquistati dalla Charles River (Wilmington, MA) e sono stati mantenuti in un ambiente a temperatura costante di 22°C con un ciclo luce-buio di 12 ore ed alimentati ad libitum con cibo standard per ratti e con libero accesso all'acqua o ad acqua contenente melatonina (20 mg/l corrispondente ad un introito di melatonina di 2 mg/g di peso corporeo al giorno) per una settimana. Allo stesso tempo, ratti normali e BDL, sono stati trattati con sequenze di AANAT Vivo-Morpholino (5'-GTTCCCCAGCTTTGGAAGTGGTCCC, per ridurre l'espressione epatica di AANAT) o mismatched Morpholino (5'-GTTCCCGACCTTTGCAACTCGTCCC) (Gene Tools LCC, Philomath, OR) per 1 settimana attraverso un catetere impiantato nella vena porta. La procedura chirurgica per l'impianto del catetere in vena porta (tramite cui AANAT Vivo-Morpholino o Morpholino mismatched sono stati somministrati) è stata effettuata da Charles River. La procedura per l'impianto del catetere è descritta in dettaglio al link della Charles River, <http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rmssrportalveincath.pdf>.

Prima di ogni procedura sperimentale, gli animali sono stati anestetizzati con sodio pentobarbital (50 mg/kg di peso, IP) secondo le locali regolamentazioni. Da tutti gli animali trattati sono stati collezionati frammenti epatici e i colangiociti purificati attraverso la tecnica di separazione per immunoaffinità usando un anticorpo monoclonale di topo gentilmente concesso dal Dr. R. Faris della Brown University, Providence, RI che riconosce un antigene di membrana non identificato, espresso da tutti i colangiociti intraepatici<sup>42</sup>. La sopravvivenza cellulare e la conta è stata eseguita

usando Tripan blue.

Sono stati inoltre utilizzati topi maschi di 8 settimane BALB/c nudi (nu/nu), forniti dalla Taconic Farms (German town, NY) stabulati a una temperatura costante di 20-22 °C e sottoposti a cicli luce/buio di 12 ore con libero accesso ad acqua e cibo. Le cellule della linea cellulare Mz-ChA-1 di colangiocarcinoma sono state poste in sospensione in 0,5 ml di extracellular matrix gel (Sigma-Aldrich) ed iniettate nel tessuto sottocutaneo dei suddetti topi. Dopo due settimane dall'impianto delle cellule tumorali i topi sono stati divisi in due gruppi:

- ✓ Gruppo 1 (n=6): topi trattati con una soluzione di NaCl allo 0,9% iniettata nella massa tumorale per 43 giorni;
- ✓ Gruppo 2 (n=6): topi trattati con melatonina (4 mg/kg di peso corporeo) iniettata nella massa tumorale per 43 giorni.

Le dimensioni del tumore sono state misurate immediatamente prima del trattamento con un compasso elettronico e sono state espresse in mm<sup>3</sup>. Dopo 43 giorni i topi sono stati anestetizzati con pentothal e sacrificati in accordo con le linee guida.

Inoltre, sono stati ottenuti frammenti epatici dai topi BALB/c nudi (nu/nu) trattati con NaCl allo 0,9% o con melatonina (4 mg/kg di peso corporeo) per 43 giorni al fine di controllare gli effetti della melatonina sul fegato normale.

### ***Biopsie umane***

Sono stati inclusi in questo lavoro frammenti epatici umani suddivisi nei seguenti gruppi:

- ✓ Frammenti di fegato umano normale (n = 6) provenienti da donatori per il trapianto epatico;
- ✓ Frammenti di massa tumorale proveniente da pazienti con lesioni

adenocarcinomatose a livello delle vie biliari e con la diagnosi finale di colangiocarcinoma (n=12);

- ✓ 6 biopsie provenienti da pazienti di sesso femminile con cirrosi biliare primitiva in stadio IV sono state ottenute dal fegato espantato in seguito a trapianto epatico.

*Espressione di MT1, MT2, CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1 e AANAT in sezioni di fegato, colangiociti isolati e colangiocarcinoma.*

La presenza di MT1, MT2, CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1 e AANAT è stata valutata tramite: (i) immunisto chimica su sezioni di fegato proveniente dai gruppi di animali trattati in vivo e, (ii) real-time PCR sull'RNA totale proveniente dai colangiociti purificati da tutti i gruppi sperimentali. L'espressione della melatonina e dei suoi recettori è stata valutata tramite immunisto chimica anche sulle biopsie umane di CCA. I frammenti di parenchima epatico, immediatamente dopo il prelievo, sono stati fissati per immersione in formalina tamponata al 10% per 24 ore a temperatura ambiente.

Successivamente sono stati sottoposti alle procedure di inclusione in paraffina che prevedono disidratazione del frammento in etanolo a concentrazioni crescenti, diafanizzazione in xilolo e conseguente inclusione in paraffina a basso punto di fusione (56°C). Sono, quindi, state effettuate sezioni dello spessore di 3-4 µm, poste su vetrini precedentemente trattati con L-polilisina allo 0,1% e, dopo sparaffinatura in xilolo e idratazione in alcool a concentrazioni decrescenti sono state trattate con perossido d'idrogeno al 2,5% in metanolo per 30 minuti al fine di bloccare l'attività della perossidasi endogena. Dopo lavaggio in tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4, i preparati sono stati incubati overnight a 4°C con anticorpi primari specifici per: MT1 (Santa Cruz, sc-13179, 1:50), MT2 (Santa Cruz,

sc-13177, 1:50), AANAT (Santa Cruz, sc-68346, 1:100), CLOCK (Santa Cruz, sc-25361, 1:50), BMAL1(Santa Cruz, sc-8550, 1:50), CRY1 e PER1 rispettivamente ((Santa Cruz, sc-5953, e sc-7724 1:50). Successivamente le sezioni sono state incubate con l'appropriato anticorpo secondario biotinilato e con il complesso streptavidina-HRP. L'avvenuta reazione è stata infine sviluppata mediante l'utilizzo di 3,3'-diaminobenzidina (DAB).I controlli negativi sono stati ottenuti omettendo l'Ab primario. Le osservazioni sono state effettuate con un microscopio ottico BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan) dotato di videocamera (Spot Insight; Diagnostic Instrument, Inc., Sterling Heights, MI) e processate con un programma di analisi delle immagini (IAS. Delta Sistemi, Rome, Italy). In aggiunta, abbiamo valutato l'espressione del messaggio di MT1, MT2, CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1 e AANAT nei colangiociti purificati usando RT2 Real-Time assay da SuperArray (Frederick, MD)<sup>16</sup>. L'RNA totale è stato estratto dai colangiociti (1x10<sup>5</sup>) con RNeasy Mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) e reverso con Reaction Ready TM First Strand cDNA synthesis kit (SuperArray, Frederick, MD). Ad 1 µl del template sono stati aggiunti 12,5 µl di SYBR Green PCR master mix, 10,5 µl di acqua distillata e 1 µl di RT2 PCR primer (Superarray, Frederick, MD) specificamente designato per l'mRNA di MT1, MT2, CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1 e AANAT e del gene di controllo (GAPDH). Il plate è stato posto nel realtime thermal cyler (MX30005P, Strata gene) e fatto correre a 95°C per 10 minuti e poi per 40 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. I dati sono stati espressi come livelli di mRNA relativo  $\pm$  SEM di ciascuno dei fattori analizzati su GAPDH. In aggiunta a questi dati, sono stati eseguiti anche immunoblots sugli stessi colangiociti per verificare l'espressione dei recettori MT1 e MT2 ed AANAT. Le cellule sono state solubilizzate in lysis buffer

contenente: 15 mM Tris HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, Ig epal 1%, 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 2 mM benzamidina e 1% aprotina in ghiaccio per 30 minuti. Dopo una breve sonicazione i campioni sono stati centrifugati a 10.000 g per 20 secondi a 4°C; del supernatante è stata determinata la concentrazione delle proteine mediante BIORAD Protein Assay-Dye Reagent (BIO-RAD Laboratories GmbH). Così 10 µg di lisato totale di colangiociti puri sono stati diluiti in 6x LSB (Laemly sample buffer) contenente 0.3M 2-mercaptoethanolo e blu di bromofenolo e sottoposti a SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) in gel al 4-12%. Successivamente è stato effettuato il trasferimento su nitrocellulosa e le proteine di interesse visualizzate utilizzando anticorpi primari specifici. Infine gli immunoblots sono stati normalizzati confrontando gli immunoblots della  $\beta$ -actina (house keeping protein)<sup>78</sup>. L'intensità delle bande è stata determinata con un densitometro a scansione video (Storm 860, GE Healthcare, Piscataway, NJ) ed analizzata con un software ImageQuant TL versione 2003.02 (GE, Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

*Effetto della melatonina e della down-regolazione di AANAT sulla proliferazione e sull'apoptosi colangiocitaria*

Per valutare la massa biliare è stato effettuato uno studio immunohistochimico in tutti i gruppi sperimentali per la citocheratina 19 (CK-19), un marker specifico dell'epitelio biliare. La colorazione è stata eseguita come precedentemente indicato, utilizzando come anticorpo primario l'anti-CK-19 (Santa Cruz biotechnologies, Inc; sc-33120; 1:50). Parallelamente alla crescita colangiocitaria abbiamo, anche valutato l'apoptosi delle stesse cellule dopo i diversi trattamenti



in vivo. Per far ciò è stato utilizzato il metodo Tunel (terminal deoxy nucleotidyl transferase-mediated triphosphate end-labeling) (ApoTag kit), secondo le indicazioni suggerite dal produttore. I controlli negativi sono stati eseguiti tramite incubazione con un adeguato siero non immune al posto dell'anticorpo primario ed hanno mostrato un'assenza dell'immunoreazione. Le immagini sono state acquisite con microscopio ottico (precedentemente descritto), per poi essere analizzate con il sistema di elaborazione d'immagine IAS 2000 (Delta Sistemi, Roma) al fine di quantificare la massa biliare e l'apoptosi.

#### *Pathway intracellulare su cui agisce la melatonina*

In accordo con altri studi<sup>44,79</sup> abbiamo misurato i livelli intracellulari di cAMP basali e indotti dalla stimolazione per 5 minuti con secretina. Poiché l'aumento dei livelli di cAMP dopo secretina sono stati dimostrati essere associati a cambiamenti nella proliferazione e secrezione di un gran numero di epitelii, incluso quello biliare<sup>40,68</sup>. Così, dopo l'isolamento, i colangiociti sono stati incubati per 1 ora a 37°C per permettere la rigenerazione delle proteine di membrana danneggiate dagli enzimi proteolitici delle tecniche di isolamento delle cellule<sup>45</sup>. Di seguito, le cellule ( $1 \times 10^5$ ) sono state stimolate a temperatura ambiente per 5 minuti con 0,2% di BSA (basale) o con secretina (100 nmol/L). In ciascun trattamento è stato aggiunto 3-isobutilmetilxantine, un inibitore della fosfodiesterasi per prevenire la degradazione del cAMP. Infine, i livelli di cAMP (espressi in mol per  $10^5$  cellule) sono stati misurati attraverso un kit commercialmente disponibile (cAMP [<sup>125</sup>I] Biotrak Assay System, RPA509). In aggiunta a questi dati, sono stati eseguiti anche immunoblots come precedentemente descritto sugli stessi colangiociti per verificare la fosforilazione di alcune proteine che appartengono al pathway del

cAMP, come PKA.

### *Valutazione dei livelli sierici di melatonina, transaminasi e bilirubina totale*

I livelli sierici di transaminasi e di bilirubina totale sono stati valutati usando un sistema bidimensionale RxLMax Integrated Chemistry system (Dade Behring, Deerfield, IL) dal Chemistry Department, Scott & White. I livelli sierici di melatonina sono stati misurati tramite ELISA kits (Genway, San Diego, CA).

### *Espressione di melatonina, MT1, MT2 e AANAT nelle biopsie umane*

In questo caso, i frammenti di tessuto epatico umano sono stati fissati in formalina e trattati come precedentemente descritto. La valutazione dell'espressione di melatonina, MT1, MT2 e AANAT è stata effettuata tramite immunistoichimica utilizzando la metodica e gli anticorpi precedentemente descritti.

### **Studio in vitro:**

#### Linee cellulari

La prima linea cellulare che abbiamo preso in considerazione è stata quella dei grandi colangiociti di topo (LMC). Tali cellule sono state sviluppate e caratterizzate come precedentemente descritto<sup>80</sup> e mantenute in coltura a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5% in 0,1 mM di soluzione MEM di aminoacidi non essenziali con aggiunta di L-glutammina (20 nM), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina e siero fetale bovino al 5%. Le altre due linee cellulari che abbiamo usato sono di origine umana: la H69 di colangiociti non maligni gentilmente conceseci dal Dr. GJ Gores della Mayo Clinic, Rochester MN<sup>46</sup>. Queste cellule sono state mantenute a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% nel

Dulbecco's modified Eagle's medium Ham's F-12 nutrient mixture (CambrexBio Science, Walkersville, MD), con aggiunta di adenina ( $1,8 \times 10^{-4}$  mol/L), insulina (5  $\mu\text{g/ml}$ ), transferrina (5  $\mu\text{g/ml}$ ), triiodotironina ( $2 \times 10^{-9}$  mol/L), idrocortisone ( $1,1 \times 10^{-6}$  mol/L), EGF ( $1,64 \times 10^{-6}$  mol/L), epinefrina ( $5,5 \times 10^{-6}$  mol/L), siero fetale bovino al 10%, 100 U/ml di penicillina e 100  $\mu\text{g/ml}$  di streptomicina. L'altra linea immortalizzata umana che abbiamo usato è stata la linea cellulare di colangiocarcinoma Mz-ChA-1 (da colecisti umana)<sup>47</sup> gentilmente concessa dal Dr. G. Fitz (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX). Queste cellule sono state mantenute a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% nel CMRL 1066 al 10%, con aggiunta di siero fetale bovino al 10%, 100 U/ml di penicillina e 100  $\mu\text{g/ml}$  di streptomicina e L-glutammina (20 nM).

#### *Melatonina e proliferazione delle linee cellulari*

Innanzitutto abbiamo testato in tutte e tre le linee cellulari la presenza della melatonina e dei suoi recettori attraverso real-time PCR e immunofluorescenza. In aggiunta a questo, abbiamo anche valutato la diversa presenza del messaggio dei recettori MT1 e MT2 tramite real-time PCR come precedentemente visto. Le diverse cellule sono state seminate su un vetrino coprioggetto in un 6-well plate (500.000 cellule per well) e fatte aderire per tutta la notte. Successivamente, i vetrini coprioggetto sono stati trasferiti in un nuovo 6-well plate contenente PBS freddo. Trascorsi 5 minuti sono stati lavati per 3 volte con PBST (PBS con 0,2% di Triton X) e incubati per 1 ora in BSA al 4% in PBS. Quando la soluzione bloccante è stata rimossa, i vetrini coprioggetto sono stati incubati a 4°C con l'anticorpo primario anti-MT1 e MT2 (gli stessi usati per l'immunoistochimica) diluito in BSA 1%. Il giorno successivo le cellule sono state lavate 3 volte con PBST

prima di essere incubate con l'appropriato anticorpo secondario legato a Cy3 (Jackson Immunochemicals, West Grove, PA; 1:50) per 2 ore in camera oscura. Dopo di che, i vetrini sono stati lavati con PBST, per poi essere montati su regolari vetrini con 4,6-diamino-2-phenilindole (DAPI) come contrastante nucleare (Molecular Probes, Eugene, OR). Le immagini sono state acquisite usando un microscopio confocale Olympus IX-71. La proliferazione dopo stimolazione con melatonina  $10^{-11}$  M è stata valutata tramite un kit colorimetrico che evidenzia il numero di cellule biologicamente attive (MTS assay, Cell Titer 96AQueous; Promega Corp., Madison, WI) e il numero di cellule è stato valutato mediante assorbanza a 490 nm. Di seguito alla tripsinizzazione, le cellule sono state seminate in un 96-well plate (10.000 per well) per un volume finale di 200  $\mu$ l di medium e fatte aderire overnight. Successivamente all'adesione, è stato cambiato il medium con uno privo di siero al fine di "affamare" le cellule, dopo 24 ore i plates sono stati stimolati con siero bovino (BSA) al 0,2% o melatonina con concentrazione di  $10^{-11}$  M a 37°C per 48 ore, prima di valutare la crescita cellulare tramite 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) saggio di proliferazione. In esperimenti separati, le stesse cellule sono state incubate con BSA 0,2% o melatonina  $10^{-11}$  M per 48 ore in assenza o presenza di una preincubazione di 1 ora con 4-P-PDOT (MT2 antagonista) o luzindolo (10  $\mu$ M)<sup>81,82</sup>, prima di verificare la proliferazione tramite immunoblots per valutare l'espressione del PCNA, uno dei marker di proliferazione cellulare più utilizzati.

*Overespressione di AANAT nei grandi colangiociti di topo e nella linea cellulare di colangiocarcinoma*

Il ruolo di AANAT nella proliferazione delle LMC e di Mz-ChA-1 è stato dimostrato tramite subcloni in cui abbiamo aumentato l'espressione di questo enzima. Tali nuove linee cellulari sono state stabilite usando AANAT cDNA clone vector da OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD) per l'AANAT che conferiscono anche la resistenza alla geneticina, per la selezione di cellule stabilmente trasfettate. Il clone selezionato con il più alto grado di espressione di AANAT (chiamato LMC-AANAT) e (AANAT overexpression nel caso della linea di CCA) è stato fatto proliferare insieme al controllo non trasfettato con plasmidi (chiamato MCL-puro o control vector) per poter eseguire immunoblots per PCNA ed MTS come precedentemente descritto.

*Analisi statistica*

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  standard error (ES). L'analisi statistica è stata effettuata mediante il t-test quando sono stati analizzati due gruppi, e l'ANOVA quando sono stati analizzati più di due gruppi. Un p-value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

*I colangiociti esprimono i recettori MT1 e MT2 della melatonina, CLOCK, BMAL1, CRY1, PER1 e AANAT*

Lo studio immunoistochimico sulle sezioni di fegato ha messo in evidenza che i dotti biliari di ratto normale sono debolmente positivi per MT1 (ma non per MT2), invece una forte positività per entrambe i recettori MT1 e MT2 è stata osservata in seguito a BDL (Figura 1A). CLOCK e BMAL1 non sembrano espressi nei dotti biliari di ratti normali, tuttavia, la loro espressione è stata rilevata nei dotti biliari in seguito a legatura dei dotti biliari (Figura 1B). I colangiociti di ratto normale esprimono PER1 e CRY1, la cui espressione aumenta debolmente nei dotti biliari di ratto BDL (immagini non mostrate). L'analisi effettuata tramite real-time PCR conferma l'aumento dell'espressione di PER1, BMAL1, CRY1, e CLOCK nel BDL rispetto al normale ma mostra anche la diminuzione dell'espressione di questi mRNA in colangiociti di ratti normali e BDL trattati in vivo con la melatonina rispetto ai colangiociti di controllo<sup>93</sup>. L'espressione del mRNA di MT1 e MT2 risulta aumentata nel BDL rispetto ai colangiociti normali e diminuita nei colangiociti di ratti BDL trattati in vivo con la melatonina rispetto ai colangiociti di controllo<sup>93</sup>. Lo studio immunoistochimico sulle sezioni di fegato ha mostrato che AANAT è espresso dai colangiociti sia nel ratto normale che nel BDL (Figura 2 e Figura 3). L'espressione di AANAT aumenta nei dotti biliari dei ratti BDL se paragonata ai ratti normali, e nei ratti BDL trattati con melatonina se paragonati ai ratti BDL (Figura 2). Gli epatociti di ratto normale sono negativi per AANAT, invece nel ratto BDL alcuni epatociti mostrano una lieve positività per AANAT (Figura 2 e Figura 3). L'espressione di AANAT diminuisce nel fegato di ratto normale e BDL trattati con AANAT Vivo-Morpholino se paragonata ai controlli

(*Figura 3*). Anche l'espressione della CK-19 aumenta nel normale e nel BDL in seguito al trattamento con AANAT Vivo-Morpholino se paragonata ai controlli (immagini non mostrate). Inoltre, tramite l'immunoistochimica abbiamo dimostrato l'aumento dell'espressione di AANAT e della melatonina e la diminuzione dell'espressione dei recettori MT1 e MT2 nei CCA provenienti dai nude mice trattati con melatonina se paragonati al gruppo controllo<sup>94</sup>.

*Effetti della melatonina e della down-regolazione di AANAT sulla proliferazione e sulla apoptosi colangiocitaria*

La somministrazione di melatonina determina la diminuzione della massa biliare (IBDM) nei ratti BDL (*Figura 4 e Tabella 2*) e della percentuale di colangiociti PCNA positivi se paragonata ai ratti controllo (*Tabella 2*). L'inibizione dell'iperplasia colangiocitaria determinata dalla melatonina nei ratti BDL è stata associata all'aumento della apoptosi; la melatonina non ha effetti sul fegato di ratto normale (*Tabella 2*).

Nelle sezioni di fegato di ratto normale e BDL trattati con AANAT Vivo-Morpholino si assiste all'aumento della percentuale di colangiociti PCNA positivi e all'aumento della massa biliare se paragonata ai ratti di controllo (*Figura 5 A-B*). Non sono stati osservati cambiamenti nell'apoptosi biliare tra ratti normali e BDL trattati con AANAT Vivo-Morpholino e ratti normali trattati con mismatch Morpholino. Un simile grado di infiammazione portale è stato osservato in ratti normali e BDL trattati con AANAT Vivo-Morpholino e ratti controllo.

Inoltre per quanto riguarda il CCA, in seguito a trattamento con melatonina si assiste ad una significativa diminuzione delle dimensioni del tumore indotto nei nude mice se paragonati al gruppo

di controllo<sup>94</sup>.

L'esame istologico delle sezioni di tumore, mostra l'aumento della necrosi nelle sezioni provenienti dai tumori di topi trattati con melatonina se paragonate con le sezioni provenienti dal gruppo di controllo<sup>94</sup>. Abbiamo inoltre dimostrato la diminuzione della proliferazione del CCA tramite PCNA, e l'aumento della apoptosi tramite Tunel nelle sezioni di tumore provenienti dai topi trattati con melatonina se paragonate ai topo controllo<sup>94</sup>.

*Tabella 2. Studio morfometrico di colangiociti positivi per PCNA, CK19 e TUNEL.*

| <b>Gruppi</b>                    | <b>Colangiociti PCNA-positivi (%)</b> | <b>IBDM (%)</b>                | <b>Colangiociti positivi al TUNEL (%)</b> |
|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| <b>Ratti normali</b>             | 8.161 ± 0,766                         | 0.26 ± 0.06                    | VN  |
| <b>Ratti normali +melatonina</b> | 6.120 ± 0,280                         | 0.23 ± 0.01                    | VN  |
| <b>Ratti BDL</b>                 | 48.537 ± 1.626                        | 3.957 ± 0.411                  | 5.813 ± 0.201                             |
| <b>Ratti BDL + melatonina</b>    | 40.954 ± 0.733 <sup>&amp;</sup>       | 1.998 ± 0.161 <sup>&amp;</sup> | 7.334 ± 0.196 <sup>&amp;</sup>            |

*I dati sono espressi come media ± ES. VN= virtualmente negativo.  
& = p<0.01 vs il corrispondente BDL*



### *Effetto della melatonina sui livelli intracitoplasmatici di cAMP.*

Nei ratti BDL trattati con melatonina, i livelli basali di cAMP sono ridotti rispetto ai corrispondenti valori dei ratti BDL di controllo<sup>93</sup>. Come atteso la secretina aumenta i livelli di cAMP nei grandi colangiociti di ratti BDL, ma non aumenta i livelli di cAMP nei grandi colangiociti di ratti BDL trattati con melatonina per una settimana<sup>93</sup>. Inoltre nei grandi colangiociti di ratti BDL trattati con melatonina si ha la ridotta fosforilazione di PKA paragonata al gruppo di controllo<sup>93</sup>.

### *Valutazione dei livelli sierici di melatonina, transaminasi e bilirubina totale*

I nostri studi hanno dimostrato che i livelli sierici di melatonina aumentano in seguito a BDL e dopo la somministrazione di melatonina sia nei ratti normali che BDL<sup>83</sup>. I livelli sierici di melatonina inoltre aumentano nei ratti normali e BDL trattati con AANAT Vivo-Morpholino rispetto al gruppo di controllo trattato con mismatch Morpholino (*Tabella 3*)<sup>93</sup>.

Sebbene l'espressione colangiocitaria di AANAT diminuisca nei ratti trattati con AANAT Vivo-Morpholino (*Figura 3*), l'aumento dei valori sierici di melatonina è probabilmente dovuto all'aumentata espressione di AANAT (e susseguente aumento della secrezione di melatonina) nella ghiandola pineale e nel piccolo intestino nei quali anche è espresso AANAT<sup>84,85</sup>.

I livelli sierici di transaminasi aumentano nei ratti BDL e diminuiscono sia nel normale che nel BDL in seguito a trattamento con melatonina (*Tabella 3*). Anche nei ratti BDL trattati con AANAT Vivo-Morpholino si assiste alla diminuzione dei valori sierici di transaminasi e di bilirubina totale, confermando il miglioramento della colestasi in seguito alla down-regolazione di AANAT, probabilmente dovuto

all'aumento dei valori sierici di melatonina. Suggestendo quindi l'esistenza di un pathway paracrino.

*Tabella 3. Livelli sierici di melatonina, delle transaminasi e della bilirubina totale.*

| Parametri                                    | Ratti normali + mismatch Morpholino | Ratti normali + AANAT Vivo-Morpholino | Ratti BDL + mismatch Morpholino    | Ratti BDL + AANAT Vivo-Morpholino    |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Livelli sierici di melatonina (pg/ml)</b> | 70.9 ± 1.1<br>(n = 5)               | 77.6 ± 2.9 <sup>a</sup><br>(n = 5)    | 97.5 ± 2.8 <sup>b</sup><br>(n = 5) | 174.1 ± 11.7 <sup>c</sup><br>(n = 5) |
| <b>SGPT (Units/L)</b>                        | 62.6 ± 7.7<br>(n = 6)               | 70 ± 1.25<br>(n = 6)                  | 194.4 ± 17<br>(n = 6)              | 121.2 ± 19*<br>(n = 6)               |
| <b>SGOT (Units/L)</b>                        | 129 ± 7<br>(n = 6)                  | 148 ± 5.1<br>(n = 6)                  | 614.5 ± 68.3<br>(n = 6)            | 312 ± 52*<br>(n = 6)                 |
| <b>ALP (Units/L)</b>                         | 203 ± 6.6<br>(n = 6)                | 202.8 ± 8<br>(n = 6)                  | 395 ± 9.8<br>(n = 6)               | 343.2 ± 18.7*<br>(n = 6)             |
| <b>Bilirubina totale (mg/L)</b>              | < 0.1<br>(n = 6)                    | < 0.1<br>(n = 6)                      | 8.7 ± 0.5<br>(n = 6)               | 7.5 ± 0.6*<br>(n = 6)                |

*I dati sono espressi come media ± ES.<sup>a</sup>p<0.05 vs. il corrispondente valore del normale trattato con mismatch Morpholino. <sup>b</sup>p<0.05 vs. il corrispondente valore del normale trattato con mismatch Morpholino. <sup>c</sup>p<0.05 vs. tutti gli altri gruppi. \*p<0.05 vs. il corrispondente valore del BDL trattato con mismatch Morpholino.*

#### *Espressione di melatonina, MT1, MT2 e AANAT nelle biopsie umane*

Nella PBC si assiste all'aumento dell'espressione da parte dei colangiociti sia di AANAT che della melatonina, così come l'espressione dei recettori MT1 e MT2 risulta essere aumentata nella PBC se paragonata al fegato umano normale (Figura 6). L'espressione immunoistochimica di AANAT e della melatonina diminuisce significativamente nelle biopsie di CCA se paragonata ai controlli (Figura 7). L'espressione dei recettori MT1 e MT2 è significativamente maggiore nelle biopsie di pazienti con CCA se paragonata al fegato umano normale (Figura 7).

### ***Studio in vitro:***

*Le linee cellulari esaminate esprimono i recettori MT1 e MT2 della melatonina e AANAT*

Tutte e tre le linee cellulari analizzate e studiate: LMC,H69 e Mz-ChA-1 esprimono i recettori MT1 e MT2 e l'enzima AANAT<sup>93,94</sup>.

### *Effetto della melatonina sulla proliferazione dei grandi colangiociti*

Il trattamento con melatonina determina la diminuzione dei valori intracitoplasmatici di cAMP, diminuzione che è prevenuta dal Luzindolo (antagonista di entrambe i recettori MT1 e MT2), ma non dal 4-P-PDOT (specifico antagonista del recettore MT2)<sup>93</sup> dimostrando che gli effetti inibitori della melatonina sulla proliferazione colangiocitaria sono mediati dal recettore MT1. La melatonina diminuisce inoltre l'espressione del gene e quindi di conseguenza della proteina del PCNA e la fosforilazione di PKA, diminuzione che ancora una volta è prevenuta dal Luzindolo ma non dal 4-P-PDOT<sup>93</sup>.

### *Effetto della overespressione di AANAT nei grandi colangiociti di topo e nella linea cellulare di colangiocarcinoma*

Nelle cellule LMC-AANAT si assiste all'aumento dell'espressione di AANAT e all'aumento della secrezione di melatonina (immagini non mostrate). Nei colangiociti che overesprimono AANAT, vi è ridotta proliferazione biliare come mostrato dagli immunoblots per PCNA e dal test MTS (immagini non mostrate). Anche nelle cellule Mz-ChA-1 che overesprimono AANAT si assiste alla riduzione della proliferazione<sup>94</sup>, e alla riduzione dell'espressione di MT1 e MT2 se paragonate al gruppo di controllo<sup>94</sup>.

## DISCUSSIONE

I principali risultati di questo studio, volto a chiarire il ruolo della melatonina nella proliferazione e sopravvivenza dei dotti biliari in corso di colestasi sperimentale e umana, hanno messo in evidenza che: i colangiociti esprimono gli enzimi implicati nella sintesi della melatonina, i recettori MT1 e MT2 e i Clock genes; il trattamento in vivo con melatonina determina una parziale inibizione nella proliferazione dell'epitelio biliare in particolare dopo BDL, inoltre la ridotta espressione di AANAT tramite il Morpholino in ratti normali e BDL induce un parziale aumento della proliferazione e dell'espressione di PCNA. La stimolazione in vitro dei colangiociti di topo riduce la crescita colangiocitaria, diminuzione che è prevenuta dal Luzindolo ma non da 4P-PDOT. Anche l'overespressione in vitro di AANAT determina la diminuzione della crescita colangiocitaria e dei livelli intracellulari di cAMP dovuti alla maggiore produzione da parte dei colangiociti di melatonina e quindi molto probabilmente all'azione autocrina di questa sui colangiociti. Nei nude mice iniettati con linee cellulari di colangiocarcinoma si assiste alla diminuzione della massa tumorale in seguito al trattamento con melatonina. L'overespressione di AANAT nelle cellule Mz-Cha-1 determina la riduzione della proliferazione. Nella PBC si assiste all'aumento dell'espressione da parte dei colangiociti sia di AANAT che della melatonina se paragonato al normale. Così come l'espressione del recettore MT1 e MT2 risulta essere aumentata nella PBC se paragonata al normale. L'espressione di AANAT e della melatonina è ridotta nel colangiocarcinoma, mentre aumentata è l'espressione dei recettori MT1 e MT2. Dal momento che il modello di ratto BDL mima le tipiche caratteristiche delle colangiopatie umane<sup>86</sup>, esso è

comunemente utilizzato per la valutazione dei meccanismi che regolano la crescita e il danno colangiocitario<sup>21,25,48</sup>. Le colangiopatie condividono alcune caratteristiche come il danno ai colangiociti e la proliferazione dei dotti residui (meccanismo compensatorio di riparazione per garantire l'omeostasi dell'albero biliare)<sup>18</sup>, ma esse evolvono comunque verso la duttopenia che rappresenta lo stadio finale di questo tipo di patologie<sup>18</sup>. Nel nostro studio abbiamo evidenziato per la prima volta la presenza dei recettori della melatonina nell'epitelio dell'albero biliare. Uno studio recente ha dimostrato che la melatonina attenua il danno causato da agenti scolicidi sui dotti biliari alludendo alla presenza dei recettori della melatonina nei colangiociti.

La ragione per cui i recettori della melatonina sono up-regolati nei colangiociti proliferanti di ratto BDL può essere dovuta a meccanismi compensatori. La riduzione dell'espressione dei due recettori MT1 e MT2 in seguito al trattamento con melatonina è invece probabilmente dovuto alla desensibilizzazione di questi recettori come suggerito da altri studi<sup>87</sup>. La validità del nostro modello è supportata dal fatto che, in seguito a somministrazione cronica di melatonina, i livelli sierici di questo ormone aumentano se paragonati ai livelli sierici dei ratti BDL di controllo.

I livelli sierici di melatonina nei ratti normali sono simili a quelli identificati in altri studi<sup>88</sup> e, in accordo con precedenti scoperte (es. nella cirrosi epatica)<sup>89</sup> aumenta in seguito a BDL. La scoperta che la somministrazione di melatonina a ratti normali e BDL aumenti i suoi livelli circolanti è supportata da studi compiuti sia su ratti che sull'uomo<sup>49,90</sup>. Diversi studi supportano l'effetto inibitorio della melatonina sulla mitosi cellulare. Per esempio è stato visto che la melatonina inibisce la crescita iperplastica della mucosa gastrica nei

ratti<sup>50</sup>. Il fatto che la somministrazione in vivo di melatonina riduca i livelli sierici di transaminasi e di bilirubina (osservati nei ratti BDL) è supportata da precedenti studi<sup>51</sup>.

Questi risultati suggeriscono il ruolo protettivo della melatonina sull'epitelio biliare come dimostrato dal fatto che la melatonina migliora lo stress ossidativo nei ratti colestatici<sup>52</sup>. Abbiamo dimostrato che l'inibizione della iperplasia biliare da parte della melatonina è associata alla riduzione dei livelli basali e secretina-stimolati del cAMP, della secrezione biliare e della fosforilazione di PKA, regolatori della proliferazione dei grandi colangiociti<sup>25,28,53</sup>.

Abbiamo effettuato esperimenti in vitro nei grandi colangiociti per dimostrare che la melatonina svolge i suoi effetti attraverso la diretta interazione con lo specifico recettore MT1 down-regolando i livelli intracitoplasmatici di cAMP e l'espressione dei Clock genes. Il concetto che MT1 sia il recettore predominante nel modulare gli effetti inibitori della melatonina sull'iperplasia biliare è supportato da studi condotti su altre cellule<sup>54,55</sup>. Questi risultati introducono un importante concetto secondo cui i farmaci diretti verso MT1 potrebbero essere importanti nel trattamento delle colangiopatie. Recenti studi hanno inoltre dimostrato il ruolo del ritmo circadiano<sup>57</sup> e dell'ormone circadiano chiave, la melatonina, nella carcinogenesi<sup>58,59</sup>.

Diversi lavori hanno dimostrato l'importanza della melatonina nella patogenesi delle malattie epatiche e nel danno epatico, infatti, diverse sono le patologie epatiche in cui la sintesi della melatonina, il suo rilascio e quindi il ritmo circadiano risultano alterati.

Un anormale ritmo circadiano è stato riscontrato in pazienti con cirrosi epatica e correlato con la severità dell'insufficienza epatica<sup>60</sup>. L'aritmia del rilascio di melatonina scompare in seguito a trapianto di fegato<sup>61</sup>. Inoltre è stato visto che la melatonina ha azione protettiva

attenuando lo stress ossidativo e l'apoptosi in modelli animali di cirrosi e fibrosi epatica<sup>61-63</sup>.

La melatonina regola l'espressione dei Clock genes. I Clock genes influenzano la down-regolazione della proliferazione cellulare e la disregolazione del ciclo cellulare durante la carcinogenesi<sup>64</sup>. Infatti topi che mancano del gene per PER1 e PER2 e CRY1 e CRY2 sono deficienti nella regolazione del ciclo cellulare, e i topi mutanti per PER2 sviluppano più facilmente il cancro<sup>64</sup>. Diversi studi hanno dimostrato che i Clock genes regolano la mitosi cellulare e che la melatonina regola la proliferazione cellulare tramite cambiamenti nell'espressione dei Clock genes<sup>65</sup>. Supportando questi studi, abbiamo dimostrato che l'inibizione della melatonina sull'iperplasia biliare è associata con la down-regolazione di PER1, CLOCK, BMAL1 e CRY1. I nostri studi suggeriscono quindi che i Clock genes svolgono un ruolo importante nei meccanismi che regolano la proliferazione cellulare e la patogenesi delle malattie epatiche. Sono comunque necessari ulteriori approfondimenti per delucidare il ruolo svolto da ciascuno dei Clock gene nella regolazione della proliferazione colangiocitaria.

Come detto, diversi studi hanno dimostrato che ridotti livelli di melatonina determinano una più alta incidenza di sviluppare tumori della mammella, della prostata, dell'endometrio e del colon retto<sup>66,67</sup>, mostrando una relazione inversa tra la secrezione della melatonina e il tasso di crescita tumorale<sup>91</sup>.

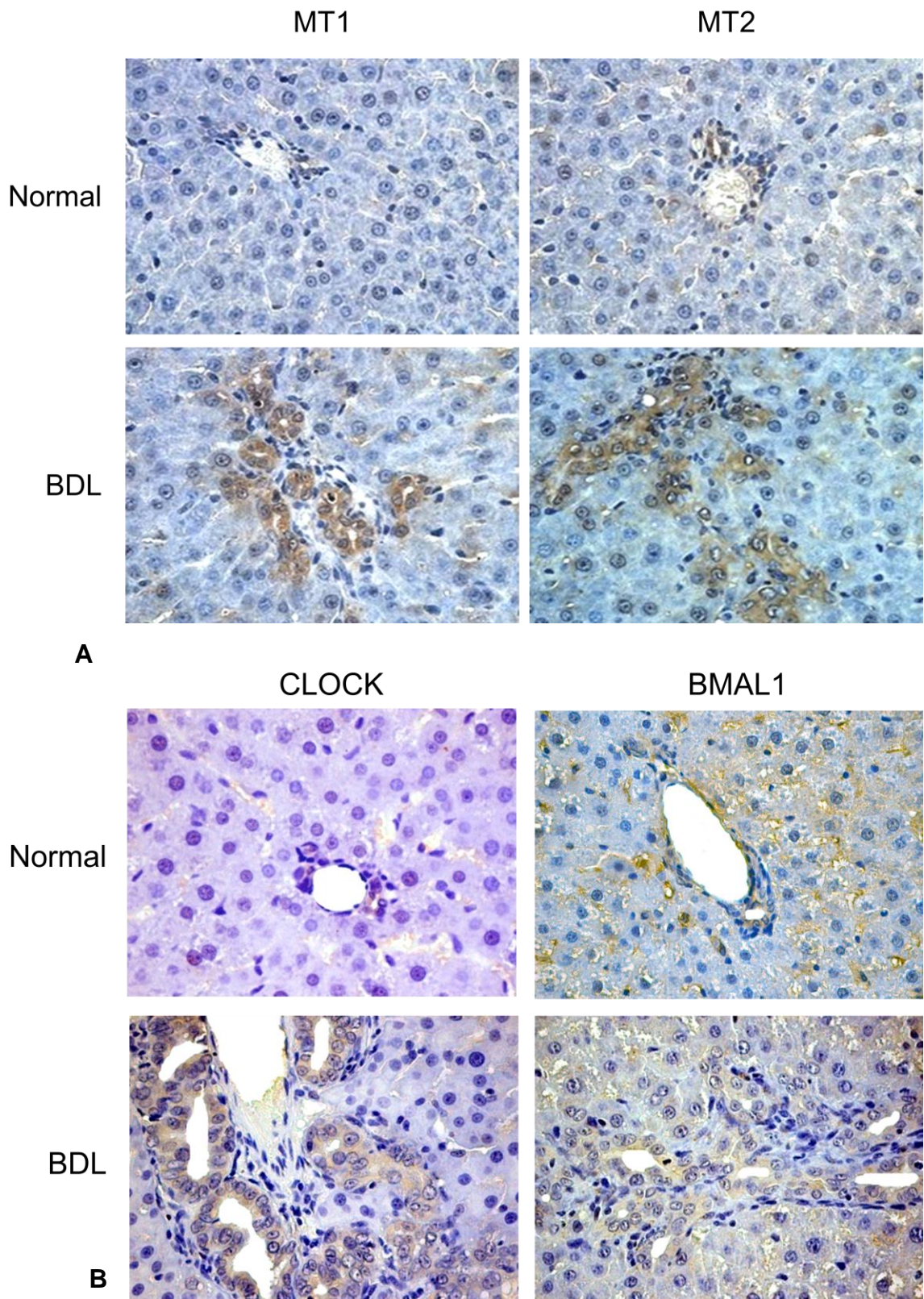
Pertanto, l'aumento dell'espressione di MT1 e MT2 osservato nel CCA è probabilmente dovuto ad un meccanismo di compensazione attuato per ritardare la progressione della crescita cellulare in presenza della ridotta espressione di AANAT e della secrezione di melatonina. Questo concetto è supportato da diversi studi<sup>51,92</sup>.

In accordo con i nostri risultati, un recente studio ha dimostrato che il recettore MT1 è up-regolato nel tumore della mammella; e che l'azione inibente della melatonina sulla crescita tumorale è associata con la riduzione dell'espressione di MT1<sup>92</sup>, probabilmente dovuta alla desensibilizzazione di quest'ultimo, come suggerito da precedenti studi<sup>63</sup>. Alla luce di ciò, è possibile proporre che il loop autocrino (AANAT → melatonina → MT1) svolga un ruolo importante nella progressione del CCA.

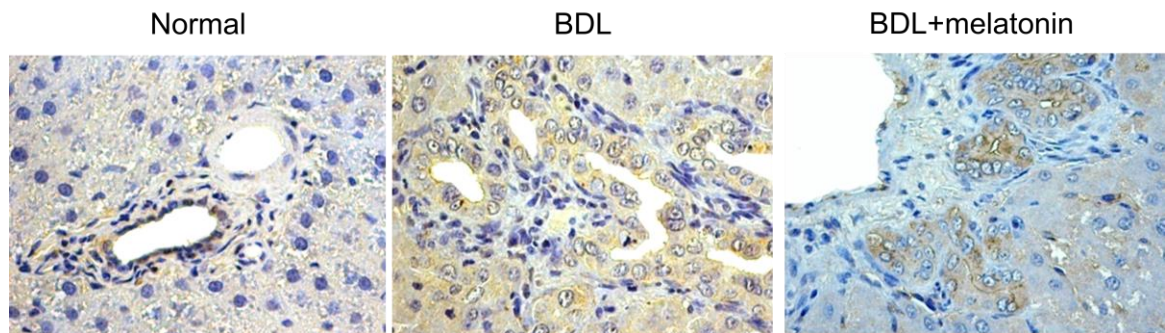
In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti si dimostra che, in condizioni sperimentali e nell'uomo, la melatonina agendo sul pathway del cAMP, svolge un ruolo importante nella regolazione della proliferazione dell'epitelio biliare del fegato in corso di Cirrosi Biliare Primitiva e di colangiocarcinoma.



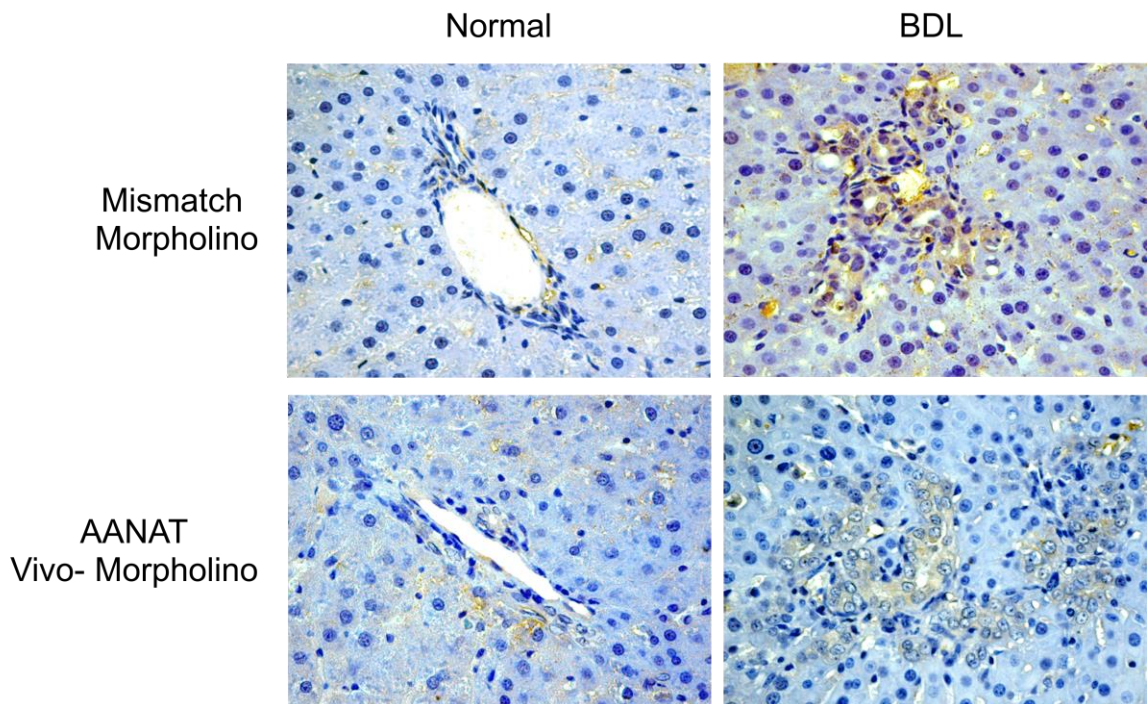
# ICONOGRAFIA



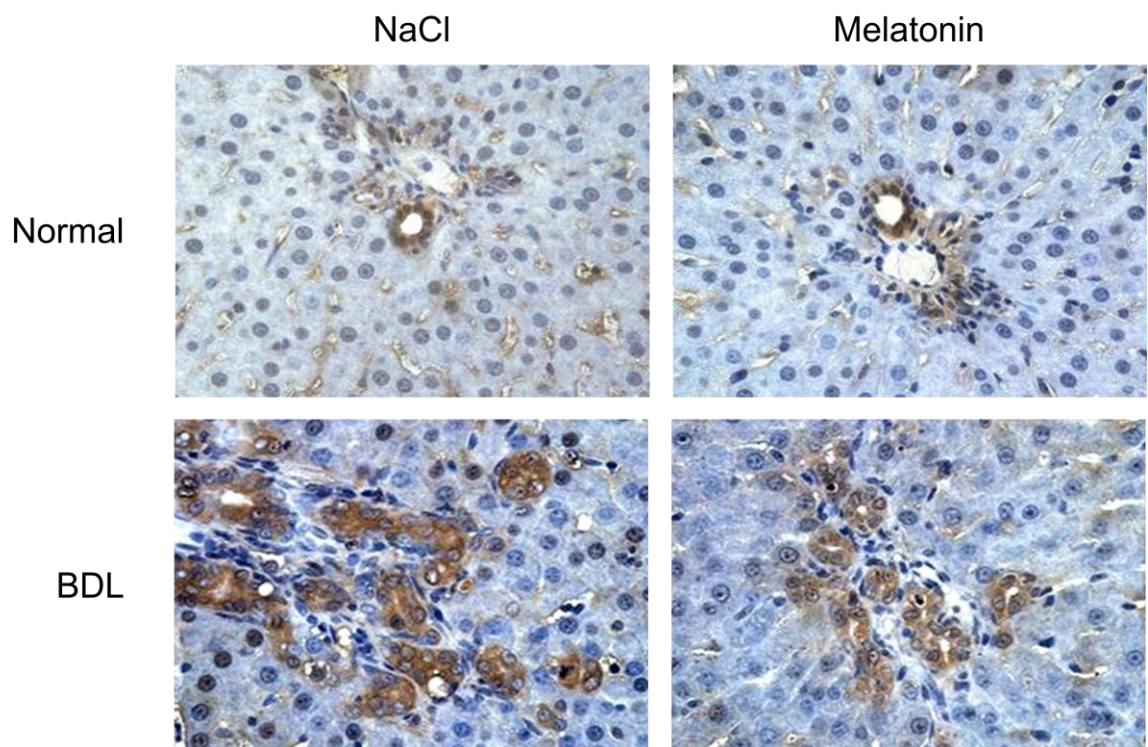
**Figura 1.A** Immunoistochimica per MT1 e MT2 in fegato di ratto normale e BDL. I colangiociti risultano essere maggiormente positivi per MT1 e MT2 in seguito a BDL. O.M 20x. **B:** Immunoistochimica per CLOCK e BMAL1 in sezioni di fegato di ratto normale e BDL. L'immunoreattività per i Clock genes risulta maggiore in seguito a BDL. O.M 20X.



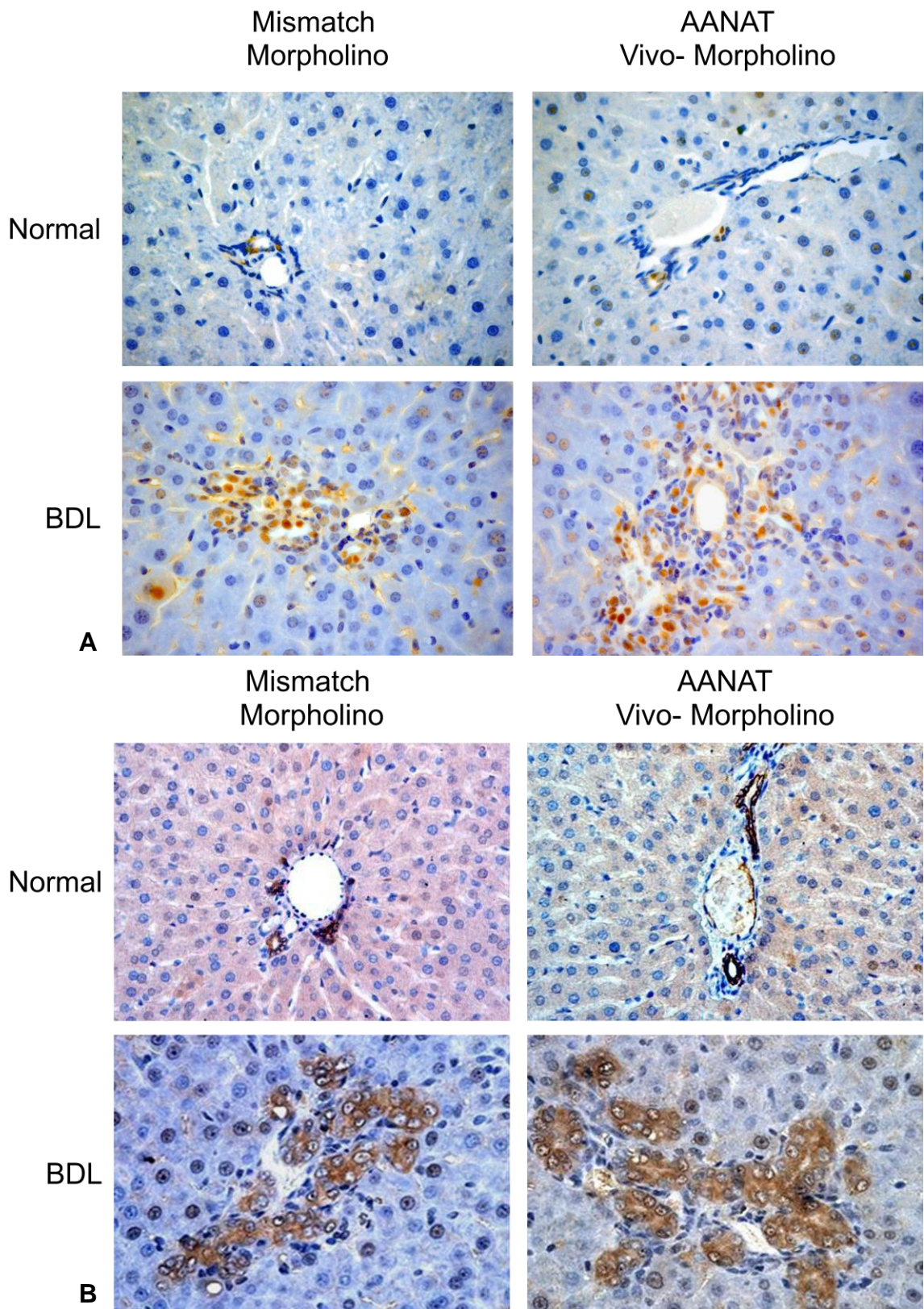
**Figura 2.** Immunoistochimica per AANAT in fegato di ratto. I colangiociti esprimono AANAT, e la sua espressione aumenta in seguito a BDL e a trattamento con melatonina. O.M 40X.



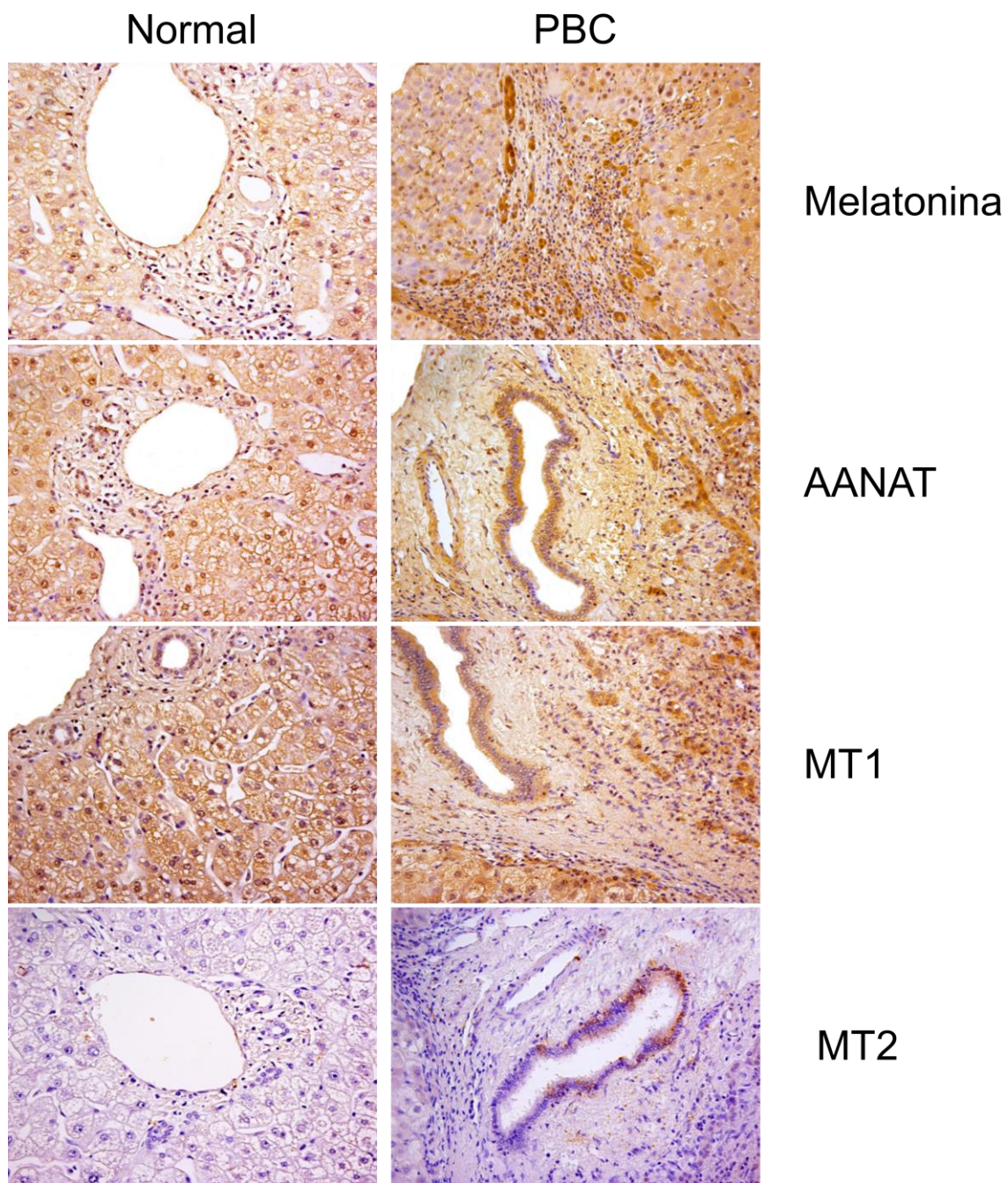
**Figura 3.** Immunoistochimica per AANAT in fegato di ratto. I colangiociti esprimono AANAT. L'espressione di AANAT diminuisce nel fegato di ratto normale e BDL trattato con AANAT Vivo-Morpholino. O.M 20X.



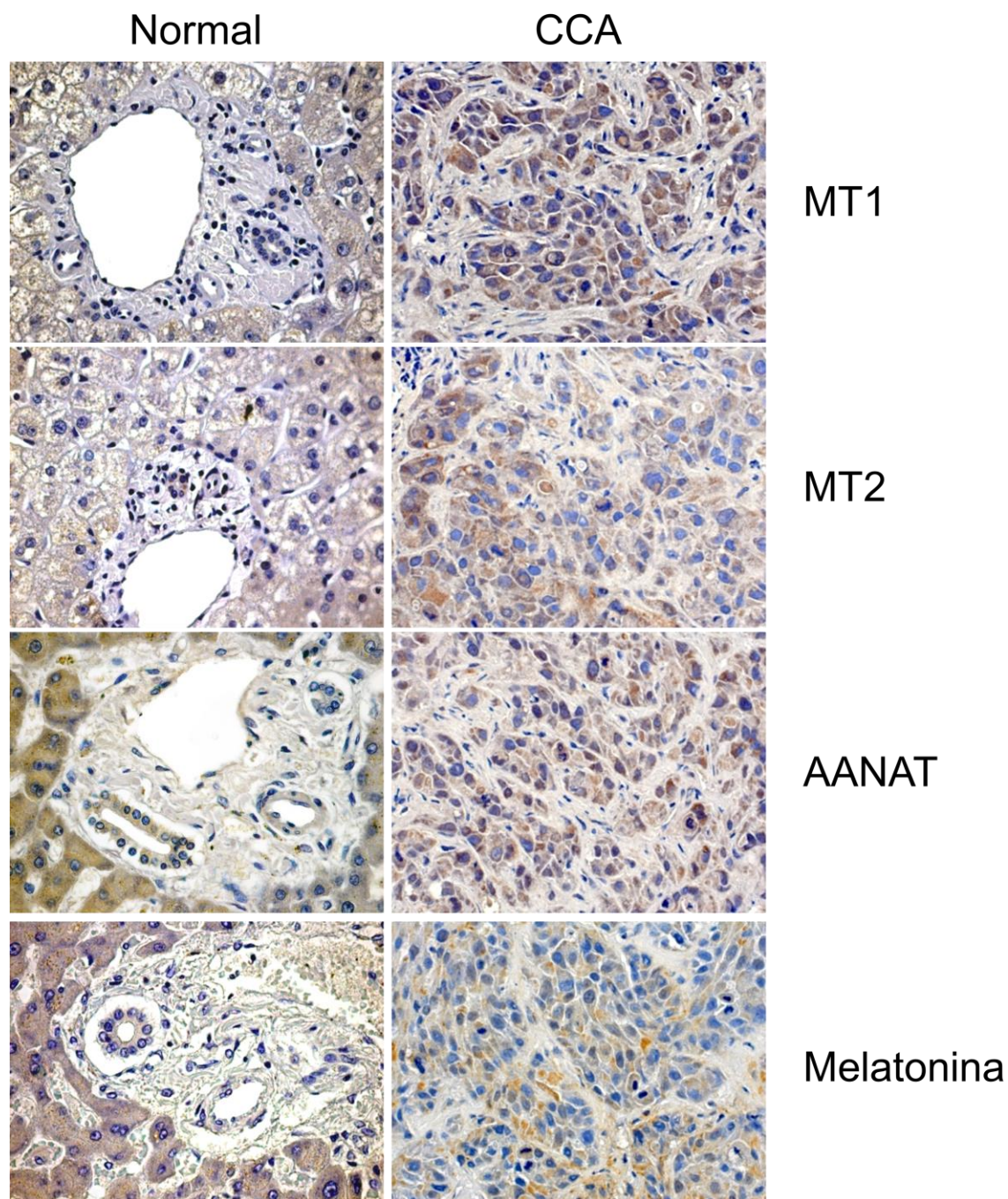
**Figura 4.** Immunoistochimica per CK19. Nei ratti BDL la massa biliare diminuisce in seguito a trattamento con melatonina se paragonata ai ratti trattati con veicolo. O.M 20x.



**Figura 5.** Immunoistochimica per PCNA (**A**) e (CK19) (**B**) nelle sezioni di fegato dei gruppi di animali selezionati. Nei ratti trattati con AANAT Vivo Morpholino si ha l'aumento della percentuale di colangiociti PCNA positivi e della massa biliare se paragonata ai controlli. O.M. 20X.



**Figura 6.** Immunoistochimica per AANAT, Melatonina, MT1 e MT2 su frammenti di fegato umano normale e di PBC. Nella PBC si assiste all'aumento dell'espressione da parte dei colangiociti sia di AANAT che della melatonina. L'espressione dei recettori MT1 e MT2 risulta essere aumentata nella PBC se paragonata al normale. O.M 20X.



**Figura 7.** Immunoistochimica per AANAT, Melatonina, MT1 e MT2 su frammenti di fegato umano normale e di CCA. L'espressione di AANAT e della melatonina appare ridotta nel CCA se paragonata al normale. L'espressione dei recettori MT1 e MT2 è significativamente maggiore nei campioni di CCA se paragonata al fegato umano normale. O.M. 40X.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anastasi G CS, Carnazza ML, Cinti S, De Caro R, Donato RF, Ferrario VF, Fonzi L, Franzi AT, Gaudio E et al. Trattato di Anatomia Umana, 2006.
2. Carpino F, Gaudio E, Marinozzi G, Melis M, Motta PM. A scanning and transmission electron microscopic study of experimental extrahepatic cholestasis in the rat. *J Submicrosc Cytol* 1981;13:581-98.
3. Tsukada N, Phillips MJ. Bile canalicular contraction is coincident with reorganization of pericanalicular filaments and co-localization of actin and myosin-II. *J Histochem Cytochem* 1993;41:353-63.
4. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004;39:1739-45.
5. Marinozzi G, Gaudio E, Carpino F, Miodonsky A. Architettura normale e modificazioni tridimensionali, in corso di colostasi extraepatica sperimentale, dell'albero biliare intraepatico. *Epatologia* 1983;29:3-10.
6. Andriashvili IA, Adamiia R, Pataridze TK, Tushishvili DG. [Macromolecular organization and biochemical characteristics of the genome of phage FI-1]. *Biokhimiia* 1977;42:470-5.
7. Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 2000;31:555-61.



8. Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, et al. Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* 1996;110:1636-43.
9. Glaser S, Francis H, Demorrow S, et al. Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol* 2006;12:3523-36.
10. Glaser SS, Gaudio E, Rao A, et al. Morphological and functional heterogeneity of the mouse intrahepatic biliary epithelium. *Lab Invest* 2009;89:456-69.
11. Gaudio E, Pannarale L, Franchitto A, Onori P, Marinozzi G. Hepatic microcirculation as a morpho-functional basis for the metabolic zonation in normal and pathological rat liver. *Ital J Anat Embryol* 1995;100 Suppl 1:419-28.
12. Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, et al. Cholangiocytes and blood supply. *World J Gastroenterol* 2006;12:3546-52.
13. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 2006;130:1270-82.
14. Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e7.
15. Marzioni M, Glaser S, Francis H, et al. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005;128:121-37.
16. Francis H, Glaser S, Demorrow S, et al. Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H1 histamine receptor stimulation by activation of the IP3/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C499-513.

17. DeMorrow S, Francis H, Gaudio E, et al. The endocannabinoid anandamide inhibits cholangiocarcinoma growth via activation of the noncanonical Wnt signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1150-8.
18. Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, et al. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology* 2007;132:415-31.
19. Desmet VJ, van Eyken P, Roskams T. Histopathology of vanishing bile duct diseases. *Adv Clin Path* 1998;2:87-99.
20. Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract* 1995;191:513-24.
21. Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest* 1988;81:569-78.
22. Alvaro D, Alpini G, Onori P, et al. Estrogens stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats. *Gastroenterology* 2000;119:1681-91.
23. Popper H, Kent G, Stein R. Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp N Y* 1957;24:551-6.
24. Lesage G, Glaser SS, Gubba S, et al. Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion. *Gastroenterology* 1996;111:1633-44.
25. Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, et al. Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am J Physiol* 1998;274:G767-75.

26. Vacanti JP, Folkman J. Bile duct enlargement by infusion of L-proline: potential significance in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1979;14:814-8.
27. Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990;99:466-77.
28. LeSage GD, Glaser SS, Marucci L, et al. Acute carbon tetrachloride feeding induces damage of large but not small cholangiocytes from BDL rat liver. *Am J Physiol* 1999;276:G1289-301.
29. Desmet VJ. Current problems in diagnosis of biliary disease and cholestasis. *Semin Liver Dis* 1986;6:233-45.
30. Alvaro D, Gigliozzi A, Attili AF. Regulation and deregulation of cholangiocyte proliferation. *J Hepatol* 2000;33:333-40.
31. Joplin R, Hishida T, Tsubouchi H, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor. *J Clin Invest* 1992;90:1284-9.
32. LeSage GD, Benedetti A, Glaser S, et al. Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver. *Hepatology* 1999;29:307-19.
33. Eagon PK, Porter LE, Francavilla A, DiLeo A, Van Thiel DH. Estrogen and androgen receptors in liver: their role in liver disease and regeneration. *Semin Liver Dis* 1985;5:59-69.
34. Alvaro D, Metalli VD, Alpini G, et al. The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis. *J Hepatol* 2005;43:875-83.
35. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.

36. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-81.
37. LeSage EG, Alvaro D, Benedetti A, et al. Cholinergic system modulates growth, apoptosis, and secretion of cholangiocytes from bile duct-ligated rats. *Gastroenterology* 1999;117:191-9.
38. Tietz PS, Alpini G, Pham LD, Larusso NF. Somatostatin inhibits secretin-induced ductal hypercholeresis and exocytosis by cholangiocytes. *Am J Physiol* 1995;269:G110-8.
39. Glaser SS, Rodgers RE, Phinizy JL, et al. Gastrin inhibits secretin-induced ductal secretion by interaction with specific receptors on rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997;273:G1061-70.
40. Glaser S, Benedetti A, Marucci L, et al. Gastrin inhibits cholangiocyte growth in bile duct-ligated rats by interaction with cholecystokinin-B/Gastrin receptors via D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate-, Ca(2+)-, and protein kinase C alpha-dependent mechanisms. *Hepatology* 2000;32:17-25.
41. Alpini G, Glaser S, Robertson W, et al. Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997;273:G518-29.
42. Ishii M, Vroman B, LaRusso NF. Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology* 1989;97:1236-47.
43. Alvaro D, Invernizzi P, Onori P, et al. Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2004;41:905-12.
44. LeSage GD, Alvaro D, Glaser S, et al. Alpha-1 adrenergic receptor agonists modulate ductal secretion of BDL rats via

- Ca(2+)- and PKC-dependent stimulation of cAMP. *Hepatology* 2004;40:1116-27.
45. Francis H, Franchitto A, Ueno Y, et al. H3 histamine receptor agonist inhibits biliary growth of BDL rats by downregulation of the cAMP-dependent PKA/ERK1/2/ELK-1 pathway. *Lab Invest* 2007;87:473-87.
  46. Grubman SA, Perrone RD, Lee DW, et al. Regulation of intracellular pH by immortalized human intrahepatic biliary epithelial cell lines. *Am J Physiol* 1994;266:G1060-70.
  47. Knuth A, Gabbert H, Dippold W, et al. Biliary adenocarcinoma. Characterisation of three new human tumor cell lines. *J Hepatol* 1985;1:579-96.
  48. Glaser S, Lam IP, Franchitto A, et al. Knockout of secretin receptor reduces large cholangiocyte hyperplasia in mice with extrahepatic cholestasis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 2010;52:204-14.
  49. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1824-8.
  50. Akbulut KG, Gonul B, Akbulut H. The role of melatonin on gastric mucosal cell proliferation and telomerase activity in ageing. *J Pineal Res* 2009;47:308-12.
  51. Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. *J Pineal Res* 2003;34:119-26.
  52. Esrefoglu M, Gul M, Emre MH, Polat A, Selimoglu MA. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic

- oxidative stress after common bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:1951-6.
53. Mancinelli R, Franchitto A, Gaudio E, et al. After damage of large bile ducts by gamma-aminobutyric acid, small ducts replenish the biliary tree by amplification of calcium-dependent signaling and de novo acquisition of large cholangiocyte phenotypes. *Am J Pathol* 2010;176:1790-800.
  54. Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burow ME, Hill SM. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Breast Cancer Res* 2010;12:R107.
  55. Peschke E, Muhlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewitz E, Peschke D. Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 2002;33:63-71.
  56. Leong T WP, Lee E, Leong A,. Pathology of cholangiocarcinoma. *Current Diagnostic Pathology ()* , 2007;13:54-64.
  57. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2001-18.
  58. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. *J Hypertens Suppl* 2009;27:S17-20.
  59. Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer* 2009;9:886-96.
  60. Velissaris D, Karanikolas M, Kalogeropoulos A, et al. Pituitary hormone circadian rhythm alterations in cirrhosis patients with

- subclinical hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2008;14:4190-5.
61. Cordoba J, Steindl P, Blei AT. Melatonin arrhythmia is corrected after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1862-3.
  62. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009;15:1452-8.
  63. Hu S, Yin S, Jiang X, Huang D, Shen G. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2009;616:287-92.
  64. Lee S, Donehower LA, Herron AJ, Moore DD, Fu L. Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PLoS One* 2010;5:e10995.
  65. Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* 2009;8:337-46.
  66. Pukkala E, Ojamo M, Rudanko SL, Stevens RG, Verkasalo PK. Does incidence of breast cancer and prostate cancer decrease with increasing degree of visual impairment. *Cancer Causes Control* 2006;17:573-6.
  67. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:825-8.
  68. Alpini G, Ulrich C, Roberts S, et al. Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation. *Am J Physiol* 1997;272:G289-97.

69. Pagliariccio A, Marinozzi M. "Increasing regular donors through a psychological approach which reduces the onset of vasovagal reactions". *Transfus Apher Sci* 2012;47:301-4.
70. Martinelli N, Marinozzi A, Schulze M, et al. Effect of subtalar arthroereisis on the tibiotalar contact characteristics in a cadaveric flatfoot model. *J Biomech* 2012;45:1745-8.
71. Marinozzi M, Carotti A, Sansone E, et al. Pyrazole[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one derivatives as a novel class of Farnesoid X Receptor (FXR) agonists. *Bioorg Med Chem* 2012;20:3429-45.
72. Marinozzi F, Marinozzi A, Bini F, Zuppante F, Pecci R, Bedini R. Variability of morphometric parameters of human trabecular tissue from coxo-arthritis and osteoporotic samples. *Ann Ist Super Sanita* 2012;48:19-25.
73. Longo UG, Loppini M, Berton A, Marinozzi A, Maffulli N, Denaro V. The FIFA 11+ program is effective in preventing injuries in elite male basketball players: a cluster randomized controlled trial. *Am J Sports Med* 2012;40:996-1005.
74. Marinozzi S, Conforti M, Gazzaniga V. [Neo-'hippocratism' in Bernardino Ramazzini]. *Med Secoli* 2011;23:465-93.
75. Longo UG, Berton A, Marinozzi A, Maffulli N, Denaro V. Subscapularis tears. *Med Sport Sci* 2012;57:114-21.
76. Marinozzi A, Longo UG, Cazzato L, Martinelli N, Maffulli N, Denaro V. Bilateral tibial hallux sesamoid agenesis and fibular hallux sesamoid hypoplasia in a patient with bilateral hallux valgus. *J Am Podiatr Med Assoc* 2011;101:452-5.
77. Gioiello A, Venturoni F, Marinozzi M, Natalini B, Pellicciari R. Exploring the synthetic versatility of the Lewis acid induced decomposition reaction of alpha-diazo-beta-hydroxy esters. *The*



- case of ethyl diazo(3-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl)acetate. *J Org Chem* 2011;76:7431-7.
78. Alpini G, Ueno Y, Glaser SS, et al. Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology* 2001;34:868-76.
  79. Francis H, Glaser S, Ueno Y, et al. cAMP stimulates the secretory and proliferative capacity of the rat intrahepatic biliary epithelium through changes in the PKA/Src/MEK/ERK1/2 pathway. *J Hepatol* 2004;41:528-37.
  80. Alpini G, Phinzy JL, Glaser S, et al. Development and characterization of secretin-stimulated secretion of cultured rat cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G1066-73.
  81. Longo UG, Marinozzi A, Cazzato L, Rabitti C, Maffulli N, Denaro V. Tuberculosis of the shoulder. *J Shoulder Elbow Surg* 2011;20:e19-21.
  82. Coppola L, Comitini F, Casucci C, et al. Fungicides degradation in an organic biomixture: impact on microbial diversity. *N Biotechnol* 2011;29:99-106.
  83. Marinozzi S. [Bernardino Ramazzini's influence in medical science in the XVIII century]. *G Ital Med Lav Ergon* 2010;32:34-6.
  84. Montagnani F, Turrisi G, Marinozzi C, Aliberti C, Fiorentini G. Effectiveness and safety of oxaliplatin compared to cisplatin for advanced, unresectable gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastric Cancer* 2011;14:50-5.

85. Ronconi P, Martinelli N, Cancilleri F, Marinozzi A, Marineo G, Denaro V. Hemiarthroplasty and distal oblique first metatarsal osteotomy for hallux rigidus. *Foot Ankle Int* 2011;32:148-52.
86. Marinozzi S. [Leon Sanz p. (edited by), Health institutions at the origin of the welfare systems in Europe. Baranain, EUNSA, 2010]. *Med Secoli* 2011;23:1045-7.
87. Kokkola T, Vaittinen M, Laitinen JT. Inverse agonist exposure enhances ligand binding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. *J Pineal Res* 2007;43:255-62.
88. Huang LT, Tiao MM, Tain YL, Chen CC, Hsieh CS. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res* 2009;65:176-80.
89. Celinski K, Konturek PC, Slomka M, et al. Altered basal and postprandial plasma melatonin, gastrin, ghrelin, leptin and insulin in patients with liver cirrhosis and portal hypertension without and with oral administration of melatonin or tryptophan. *J Pineal Res* 2009;46:408-14.
90. Porkka-Heiskanen T, Laakso ML, Stenberg D, Alila A, Johansson G. Increase in testosterone sensitivity induced by constant light in relation to melatonin injections in rats. *J Reprod Fertil* 1992;96:331-6.
91. Bartsch C, Bartsch H. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:247-64.
92. Lai L, Yuan L, Cheng Q, Dong C, Mao L, Hill SM. Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118:293-305.

93. Renzi A, Glaser S, Demorrow S, Mancinelli R, Meng F, Franchitto A, Venter J, White M, Francis H, Han Y, Alvaro D, Gaudio E, Carpino G, Ueno Y, Onori P, Alpini G. Melatonin inhibits cholangiocyte hyperplasia in cholestatic rats by interaction with MT1 but not MT2 melatonin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Oct;301(4):G634-43. doi: 10.1152/ajpgi.00206.2011. Epub 2011 Jul 14. Erratum in: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Nov;301(5):G943.
94. Han Y, Demorrow S, Invernizzi P, Jing Q, Glaser S, Renzi A, Meng F, Venter J, Bernuzzi F, White M, Francis H, Lleo A, Marzioni M, Onori P, Alvaro D, Torzilli G, Gaudio E, Alpini G. Melatonin exerts by an autocrine loop antiproliferative effects in cholangiocarcinoma: its synthesis is reduced favoring cholangiocarcinoma growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Oct;301(4):G623-33