

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

TESI DI LAUREA

**COLANGITE BILIARE PRIMITIVA: DIAGNOSI E NUOVI  
APPROCCI DIAGNOSTICO-TERAPEUTICI**

RELATORE: Chiar.ma dott.ssa Genny Orso

Laureanda: Chiara Vianelli

Matricola n°: 1198882

**ANNO ACCADEMICO: 2023/2024**





# INDICE

<b>CAPITOLO 1: PATOFISIOLOGIA</b> .....	6
1.2 SINTOMATOLOGIA.....	7
1.3 GENETICA ED EPIGENETICA.....	10
1.4 MECCANISMI PATOFISIOLOGICI.....	14
1.5 EPIDEMIOLOGIA.....	18
<b>CAPITOLO 2: DIAGNOSI</b> .....	21
2.1 TEST SIEROLOGICI.....	22
2.2 BIOPSIA AL FEGATO.....	23
2.3 RUOLO DELL'IMAGING DIAGNOSTICO.....	24
<b>CAPITOLO 3: MANIFESTAZIONI INTRA ED EXTRAEPATICHE DELLA COLANGITE BILIARE PRIMITIVA</b> .....	25
3.1 MANIFESTAZIONI INTRAEPATICHE.....	25
3.1.1 CARCINOMA EPATOCELLULARE.....	26
3.1.2 TRAPIANTO DEL FEGATO.....	27
3.2 MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE.....	28
3.2.1 OSTEOPOROSI.....	28
3.2.2 IPERLIPIDEMIA.....	29
3.2.3 VARICI E SINDROME DI SJÖRGEN.....	30
<b>CAPITOLO 4: TRATTAMENTI FARMACOLOGICI</b> .....	31
4.1 TRATTAMENTI DI PRIMA LINEA.....	31
4.1.1 ACIDO URSODESOSSICOLICO.....	31
4.2 TRATTAMENTI DI SECONDA LINEA.....	36
4.2.1 ACIDO OBETICOLICO.....	36
4.2.2 AGONISTI DEI RECETTORI ATTIVATI DA PROLIFERATORI PEROSSISOMIALI (PPAR)...	40
<b>CAPITOLO 5: CORRELAZIONE TRA CELIACHIA E COLANGITE BILIARE PRIMITIVA</b> .....	47
<b>CAPITOLO 6: STUDI CLINICI</b> .....	49
<b>CONCLUSIONI</b> .....	51
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	53

## INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

Figura 1: Significato clinico del prurito nella CBP (Fonte: realizzata con Biorender) .....	8
Figura 2: Scala analogica visiva del prurito (Fonte: realizzata con Biorender) .....	9
Figura 3: Relazione tra HLA e CBP <sup>15</sup> .....	11
Figura 4: Meccanismo fisiopatologico della CBP <sup>32</sup> .....	15
Figura 5: Incidenza e prevalenza globale della CBP <sup>44</sup> .....	18
Figura 6: Confronto dell'informazione demografica tra il dataset dell'ISTAT e dell'LPD <sup>45</sup> .....	19
Figura 7: Criteri per stabilire una diagnosi di colangite biliare primitiva (Fonte: realizzata con Biorender) .....	24
Figura 8: Struttura dell'acido ursodesossicolico (UDCA) <sup>194</sup> .....	31
Figura 9: Meccanismo molecolare dell'acido obeticolico <sup>135</sup> .....	37
Figura 10: Isoforme e siti d'azione dei PPAR <sup>166</sup> .....	40
Figura 11: Struttura chimica dei fibrati <sup>166</sup> .....	42
Figura 12: Struttura chimica dei non-fibrati <sup>166</sup> .....	44
 Tabella 1: Schema riassuntivo degli studi clinici (informazioni tratte da <a href="http://clinicaltrials.gov">clinicaltrials.gov</a> ) .....	49

## **CAPITOLO 1: PATOFISIOLOGIA**

### **1.1 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE**

La colangite biliare primitiva (CBP), precedentemente conosciuta come cirrosi biliare primitiva, è una patologia autoimmune, rara e colestatica che colpisce il fegato e che può evolvere, nel peggiore dei casi, in cirrosi e carcinoma epatocellulare. È un disturbo che colpisce prevalentemente le donne di mezza età ed è caratterizzato da una progressiva infiammazione dei dotti biliari intraepatici di piccola e media dimensione, i quali vengono gradualmente distrutti.

Il cambiamento del nome della patologia da “cirrosi biliare primitiva” a “colangite biliare primitiva” è dovuto al fatto che la maggior parte dei pazienti non va incontro a cirrosi e, quindi, gli studiosi hanno cercato in questo modo di mettere in evidenza e rappresentare accuratamente le caratteristiche istologiche della colangite e della colestasi.<sup>1</sup>

La colangite biliare primitiva si manifesta a seguito di un'alterazione del sistema immunitario che porta i linfociti-T ad attaccare le cellule epiteliali dei dotti biliari: questa situazione genera un accumulo di infiltrati infiammatori, che potrebbero eventualmente causare colestasi e fibrosi.<sup>2</sup>

Si distinguono, in particolare, due forme di colangite biliare primitiva: quella positiva agli anticorpi anti-mitochondriali (AMA-pos CBP), ovvero un disturbo autoimmune in cui degli anticorpi monoclonali vengono prodotti contro degli epitopi presenti nelle membrane mitochondriali delle cellule epiteliali biliari, portando ad una progressiva colangite biliare non suppurativa; oppure la colangite biliare primitiva negativa agli anticorpi anti-mitochondriali (AMA-neg CBP), che si manifesta nel 5% dei pazienti.<sup>3</sup>

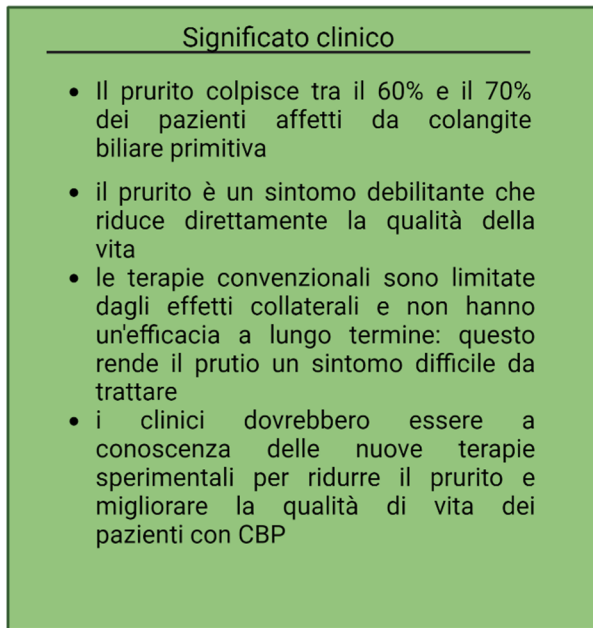
## 1.2 SINTOMATOLOGIA

A causa della sua natura cumulativa, la colangite biliare primitiva può manifestarsi con diversi gradi di gravità: potremmo avere dei pazienti sia asintomatici che affetti da colestasi o cirrosi biliare, che possono causare una malattia epatica allo stadio terminale.

Più del 50-60% degli individui colpiti da questa epatopatia non presenta sintomi al momento della diagnosi, ma hanno solamente una funzione alterata del fegato. La stanchezza rappresenta uno dei sintomi più comuni e colpisce circa l'80% delle persone con CBP: nonostante ciò, non è stata dimostrata alcuna correlazione tra la comparsa di questo determinato sintomo e la gravità della patologia.<sup>4,5</sup>

Nel 20% dei casi questi pazienti presentano anche dei disturbi della tiroide e possono essere affetti, a loro volta, da altri disturbi reumatologici ed autoimmuni.<sup>2</sup>

Uno dei segni più comuni della CBP è dato dal prurito (60-70% dei casi), il quale può insorgere in un qualsiasi momento della malattia e può intaccare la qualità della vita. Il prurito stesso può causare affaticamento, disturbi del sonno, depressione e pensieri suicidi; questo sintomo tende a peggiorare durante la notte, con il calore e durante la gravidanza.<sup>6</sup> La patogenesi del prurito, nel caso della colangite biliare primitiva, è piuttosto variegata e si è visto come gli acidi biliari giochino un ruolo importante nella mediazione di tale sintomo: l'uptake degli acidi biliari nell'ileo è incrementato nell'ambiente colestatico; questi acidi vengono riportati al fegato attraverso il sistema della vena portale e fungono da pruritogeni.<sup>7</sup> I neuroni sensoriali associati con il prurito presentano un recettore della membrana plasmatica, TGR5, il quale viene attivato dagli acidi biliari stessi e potrebbe svolgere un ruolo importante nel prurito colestatico. Un altro meccanismo proposto coinvolge l'acido lisofosfatidico e la via dell'autotaxina: i livelli del primo, un pruritogeno, aumentano in presenza di epatopatie colestatiche, mentre quelli del secondo sono associati con l'intensità del prurito stesso.<sup>8,9</sup>



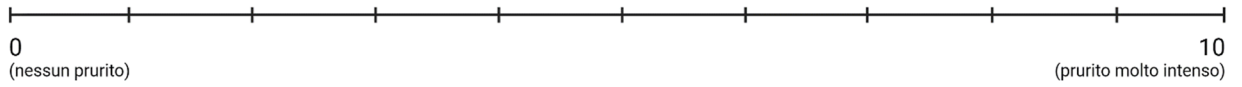
*Figura 1: Significato clinico del prurito nella CBP (Fonte: realizzata con Biorender)*

Come trattato in precedenza, circa il 70% dei pazienti affetti da colangite biliare primitiva, ad un certo punto della patologia, viene colpito dal prurito e in circa il 75% dei casi questo precede la diagnosi di malattia (Figura 1).<sup>10</sup> Il prurito è un sintomo tipico anche di altri disturbi come l'insufficienza renale, la psoriasi e la dermatite atopica per cui, inizialmente, bisognerà individuare la causa di tale caratteristica clinica.

Il prurito è un sintomo soggettivo e si è cercato di monitorarlo per poter migliorare la sintomatologia individuale dei pazienti. Questo viene misurato tramite delle scale graduate (scale graduate numeriche e la scala del prurito 5-D) o semplicemente attraverso dei questionari (come PBC-40 e PBC-27 che valutano principalmente la qualità della vita), che permettono di ottenere uno scenario clinico piuttosto completo. Il metodo più utilizzato rimane quello della scala analogica visiva che permette di valutare l'intensità del prurito attribuendo un valore che varia da 1 a 10 (0 = assenza di prurito; 1-3 = prurito lieve; 4-6 = prurito moderato; 7-8 = prurito intenso; 9-10 = prurito molto intenso) (Figura 2). L'approccio terapeutico per tenere sotto controllo il prurito viene però personalizzato.<sup>11</sup>



Si prega di valutare l'intensità del proprio prurito indicando un punto sulla linea.



*Figura 2: Scala analogica visiva del prurito (Fonte: realizzata con Biorender)*

Vi sono poi altri sintomi che vengono riscontrati frequentemente nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva, tra cui iperpigmentazione, xerosi e xantoma. Circa il 10% degli individui può presentare artrite reumatoide concomitante. Nelle fasi finali della CBP possono insorgere dei sintomi tipici dell'ipertensione portale, soprattutto in chi presenta fibrosi. <sup>2,12</sup>

### 1.3 GENETICA ED EPIGENETICA

Come spiegato precedentemente la colangite biliare primitiva è una malattia cronica, autoimmune e progressiva che colpisce prevalentemente le donne. La causa della malattia rimane ancora oggi pressoché sconosciuta, ma potrebbe essere innescata, così come altre malattie autoimmuni, da fattori genetici ed ambientali; si pensa, infatti, che i fattori genetici svolgano un ruolo fondamentale nella manifestazione della patologia, in quanto si è vista una comparsa maggiore della stessa nei gemelli omozigoti rispetto ai dizigoti e sono stati identificati dei raggruppamenti familiari di pazienti affetti da CBP in diverse famiglie.<sup>13</sup> Si presume, quindi, che la CBP sia una malattia multifattoriale poligenica causata da fattori scatenanti di tipo allelico e di tipo ambientale negli individui suscettibili da un punto di vista genetico.<sup>14,15,16</sup>

La colangite biliare primitiva potrebbe essere dovuta ad un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP: Single Nucleotide Polymorphism), ovvero un tipo di modificazione genetica nel quale un determinato gene presenta, in individui diversi, variazioni di sequenza che frequentemente sono a carico di una singola base della catena polinucleotidica. L'ipotesi più accreditata tra i vari SNPs individuati, è quella dell'antigene leucocitario umano (HLA: Human Leukocyte Antigens): il complesso HLA nella posizione cromosomica 6p21 contiene i geni maggiormente colpiti da polimorfismi del genoma umano; si è visto, inoltre, che i geni HLA svolgono un ruolo fondamentale in diverse malattie infettive ed autoimmuni.<sup>17</sup> I prodotti tipici dei geni HLA di classe I (A, B e C) e di classe II (DR, DQ e DP) comprendono delle glicoproteine della superficie cellulare coinvolte nel legame e nella presentazione alle cellule-T dei peptidi self o non-self: le molecole di classe I vengono riconosciute dalle cellule-T CD8<sup>+</sup> citotossiche le quali presentano peptidi endogeni, mentre quelle di classe II vengono riconosciute dalle cellule-T CD4<sup>+</sup> helper che presentano dei peptidi processati dai patogeni esogeni.<sup>15</sup>

**Table 1** HLA haplotype associations with PBC

Study	Year	Population	PBC patients	Controls	HLA allele	OR (95% CI)	p-value
<b>Susceptibility</b>							
Donaldson et al. [47]	2006	UK	412	236	DRB1*08:01-DQA1*04*01-DQB1*04:02	2.90 (1.45–5.82)	0.0027
		Italian	80	95	DRB1*08:01-DQA1*04*01-DQB1*04:02	3.41 (1.36–8.52)	0.0086
Umemura et al. [50]	2012	Japanese	229	523	DRB1*08:03-DQB1*06:01	2.22 (1.53–3.20)	0.000025
					DRB1*04:05-DQB1*04:01	1.38 (1.02–1.87)	0.044
Zhao et al. [51]	2014	Chinese	145	500	DRB1*08:03-DQB1*06:01	3.17 (1.91–5.23)	<0.0001
					DRB1*07:01-DQB1*02:02	1.85 (1.20–2.83)	0.005
Clemente et al. [52]	2017	Sardinian	20	89	DRB1*03:01-DQB1*02:01	3.02 (1.51–6.05)	<0.05
Yasunami et al. [53]	2017	Japanese	1199	1193	DRB1*08:03-DQB1*06:01	1.77 (1.43–2.18)	$7.82 \times 10^{-8}$
					DRB1*14:05-DQB1*04:01	1.49 (1.24–1.79)	$0.144 \times 10^{-5}$
<b>Protective</b>							
Donaldson et al. [47]	2006	Italian	21	46	DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01	0.47 (0.27–0.83)	0.086
		Italian	3	12	DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03	0.28 (0.08–0.95)	0.0041
Umemura et al. [50]	2012	Japanese	229	523	DRB1*13:02-DQB1*06:04	0.27 (0.12–0.60)	0.00093
					DRB1*11:01-DQB1*03:01	0.37 (0.15–0.88)	0.03
Zhao et al. [51]	2014	Chinese	145	500	DRB1*12:02-DQB1*03:01	0.43 (0.22–0.86)	0.015
Yasunami et al. [53]	2017	Japanese	1199	1193	DRB1*13:02-DQB1*06:04	0.19 (0.13–0.27)	$1.84 \times 10^{-22}$
					DRB1*14:03-DQB1*03:01	0.21 (0.09–0.49)	$5.1 \times 10^{-5}$
					not (DRB1*14:03)-DQB1*03:01	0.54 (0.43–0.68)	$8.54 \times 10^{-8}$

OR odds ratio, CI confidence interval

### Figura 3: Relazione tra HLA e CBP <sup>15</sup>

Gli studi inizialmente effettuati avevano correlato il gruppo allelico DRB\*08:01 con il rischio di malattia, ma la popolazione reclutata per questo studio risultava essere troppo piccola. Di recente alcuni studi svolti su un campione più ampio di pazienti italiani affetti da CBP, hanno confermato l'associazione tra gli alleli di HLA-DR B1\*08 e B1\*02 e il rischio di sviluppare la patologia e hanno evidenziato anche un possibile effetto protettivo da parte di B1\*11 e B1\*13.<sup>15,18,19</sup> Gli studi inizialmente effettuati avevano correlato il gruppo allelico DRB\*08:01 con il rischio di malattia, ma la popolazione reclutata per questo studio risultava essere troppo piccola. Di recente alcuni studi svolti su un campione più ampio di pazienti italiani affetti da CBP, hanno confermato l'associazione tra gli alleli di HLA-DR B1\*08 e B1\*02 e il rischio di sviluppare la patologia e hanno evidenziato anche un possibile effetto protettivo da parte di B1\*11 e B1\*13 (Figura 3).<sup>15,18,19</sup>

Tra i geni HLA legati al rischio di sviluppare la CBP abbiamo diversi geni legati all'attivazione delle cellule-T CD4<sup>+</sup> e soprattutto con la via di segnalazione di IL-12-JAK-STAT4 (JAK: Janus Kinase; STAT4: traduttore di segnale ed attivatore della trascrizione 4), la quale promuove la polarizzazione della cellula-T Th1. IL-12 è una molecola eterodimerica costituita da due subunità, ovvero p35 e p40, codificate rispettivamente

dai geni IL12A e IL12B; il recettore di IL-12 viene a sua volta codificato da due geni: IL12RB1 (gene umano per il recettore per l'interleuchina 12, subunità beta 1), il quale risulta essere espresso costitutivamente e IL12RB2 (gene umano per il recettore per l'interleuchina 12, subunità beta 2), il quale va incontro ad up-regulation da parte dell'interferone- $\gamma$  (INF $\gamma$ ).<sup>20</sup>

Sono stati poi correlati al rischio di sviluppare la malattia ulteriori loci in cui si trovano i geni su cui agiscono le cellule-B e loci contenenti due ligandi per il recettore TNF.

L'epigenetica rappresenta invece lo studio di tutte quelle modificazioni ereditabili che portano a variazioni nell'espressione genica, ma che non sono legate ad alterazioni nella sequenza del DNA. Delle specifiche osservazioni riguardanti l'epigenetica potrebbero spiegare alcuni aspetti poco chiari riguardanti la malattia come, per esempio, la predominanza femminile. Una delle osservazioni più importanti riguardava il fatto che percentuali maggiori di monosomia del cromosoma X nei leucociti periferici si osservavano preferibilmente nei pazienti affetti da CBP rispetto a quelli colpiti da epatite C o controlli sani (dopo aver effettuato una suddivisione per età, la quale si correla alla monosomia). Delle osservazioni simili sono state riscontrate anche in altre malattie autoimmuni e si è visto che l'autoimmunità risulta essere più comune nei pazienti con monosomia X costitutiva;<sup>21,22</sup> inoltre, è stata rilevata un'aumentata perdita del cromosoma Y negli uomini colpiti da CBP.<sup>23</sup>

Nelle donne sane, un cromosoma X omologo viene inattivato dall'eterocromatina, dalla metilazione del DNA, dalla riduzione dell'acetilazione dell'istone ed altri meccanismi che conducono al silenziamento genico; nella colangite biliare primitiva, invece, è stato dimostrato che vi è una perdita preferenziale delle cellule con monosomia X.<sup>24</sup>

Un'altra osservazione epigenetica particolarmente interessante riguarda il ruolo di CD40-CD40L (CD40 ligando), una proteina espressa soprattutto nei linfociti T attivati e appartenente alla famiglia TNF, nelle interazioni delle cellule T e B: è stata individuata una ridotta metilazione nelle regioni promotori di CD40L tra i pazienti affetti da CBP rispetto ai controlli.<sup>24</sup> Due studi hanno riportato l'espressione di microRNA nella CBP e sono stati svolti su un topo con una deficienza per la proteina scambiatrice di anioni 2 (AE2).<sup>25</sup> In un gruppo, l'ibridazione in situ in sezioni epatiche, ha evidenziato un up-

regulated micro-RNA 506 nei dotti biliari intraepatici dei fegati con CBP <sup>26</sup>; un secondo gruppo ha dimostrato una down-regulation di miR-122a e miR-26a e una up-regulation di miR-328 e miR-299-5p. Tutti questi microRNA sono coinvolti nei meccanismi chiave della patogenesi della CBP, compresa l'apoptosi e la risposta allo stress ossidativo e, per questo motivo, richiedono ulteriori studi. <sup>27</sup>

L'epigenetica potrebbe avere anche un ruolo importante nella comparsa dei sintomi, nell'evoluzione della malattia e nella risposta alla terapia con l'acido ursodesossicolico. Degli studi caso-controllo hanno, inoltre, identificato l'esposizione ad alcuni fattori tra le possibili cause della CBP, tra cui un'infezione del tratto urinario ed il fumo di sigaretta; non si è però ancora riusciti a stabilire come essi siano coinvolti nell'insorgenza di tale patologia dal punto di vista molecolare. <sup>15,20,28</sup>

#### 1.4 MECCANISMI PATOFISIOLOGICI

La colangite biliare primitiva (CBP) è una malattia caratterizzata da colangite destrutturante non suppurativa (CDNS) associata ad una distruzione selettiva dei piccoli dotti biliari intraepatici ad opera delle cellule infiammatorie, in particolare linfociti e cellule plasmatiche. La comparsa di autoanticorpi anti-mitochondriali (AMA) e un'elevata concentrazione sierica di IgM (Immunoglobuline M) sono tipiche del siero dei pazienti affetti da CBP. Il meccanismo attraverso cui questi anticorpi producano il danno epatico rimane ancora oggi sconosciuto.<sup>29</sup>

I dotti epatici di piccole dimensioni rappresentano il target specifico della CBP: in particolare, le cellule infiammatorie invadono l'epitelio, causando l'interruzione dello stesso e irregolarità del lume duttale. Le cellule epiteliali biliari, di conseguenza, vanno incontro a frammentazione e spariscono; successivamente i linfociti, gli eosinofili e le cellule plasmatiche invadono i punti in cui si trovano i dotti biliari danneggiati.<sup>30</sup>

Le cellule biliari epiteliali nella CBP esprimono varie tipologie di fattori co-stimolatori e di molecole di adesione come, per esempio, quelle di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), le quali potrebbero esprimere dei possibili target. Le cellule epiteliali biliari esprimono diversi tipi di citochine e chemochine, come il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- $\alpha$ ) e l'interleuchina-6 (IL-6) e, inoltre, possiedono diversi recettori per delle citochine che agiscono contro l'IL-4 (Interleuchina 4), l'IL-6, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , le quali avranno sia un effetto autocrino che paracrino (Figura 4).<sup>1,31</sup>

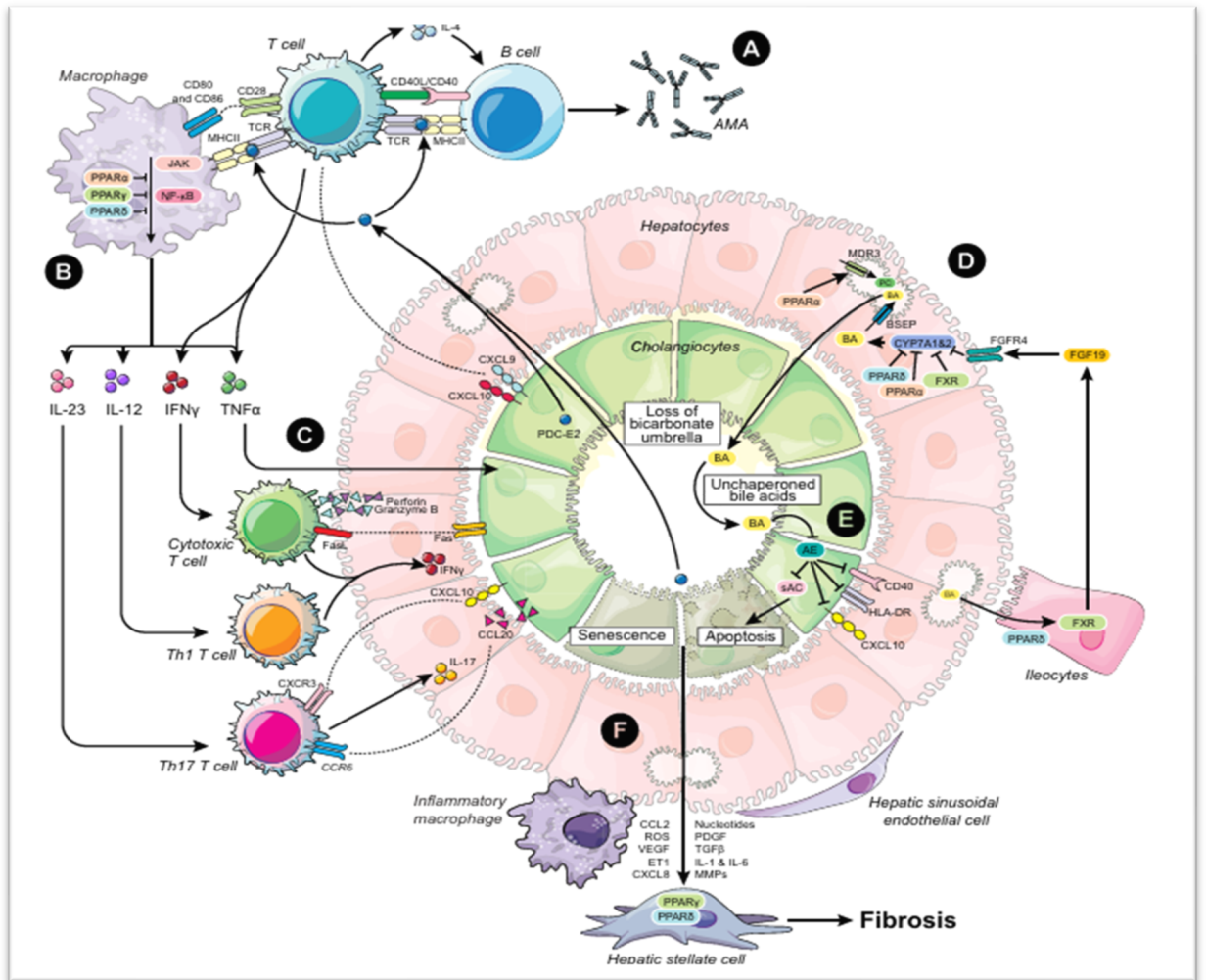


Figura 4: Meccanismo fisiopatologico della CBP<sup>32</sup>

Attraverso diversi studi, si è visto che i tipi cellulari maggiormente coinvolti nella colangite biliare primitiva sono i linfociti CD4<sup>+</sup> e i CD8<sup>+</sup>: i primi regolano l'autoimmunità attorno ai dotti biliari nella CBP, i secondi sono prevalentemente dei linfociti T citotossici e agiscono sui target tramite la via perforina/granzima.<sup>32,33</sup>

Negli stadi iniziali della malattia abbiamo una prevalenza di citochine Th-1 ma, con il progredire della stessa, compaiono sia IL-12/Th-1 che IL-23/Th-17; negli stadi finali della CBP la maggior parte delle cellule Th-1 si trasforma in cellule Th-17. Nelle triadi portalì dei pazienti affetti da questa patologia si osservano spesso dei follicoli linfatici, i quali vengono considerati nelle analisi immunohistochemiche degli organi linfatici terziari.<sup>34</sup>

Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse ipotesi in merito al meccanismo patogenetico alla base del danno ai dotti biliari, che si verifica nel corso della colangite biliare primitiva. Una prima teoria avanzata, riguardante la distruzione selettiva delle

cellule epiteliali biliari, è data dal fatto che, la subunità E2 del complesso della piruvato deidrogenasi (PDC), viene generalmente espressa nella membrana mitocondriale interna; in presenza della malattia ciò non accade e, quindi, questa si trova sulla superficie delle cellule epiteliali biliari. Sia la PDC-E2 che la sua forma mutante e le varianti tessuto-specifiche potrebbero causare tale fenomeno.<sup>35</sup>

Un'altra ipotesi è data dall'instaurarsi di una reazione immunitaria contro gli antigeni estrinseci che sono localizzati sull'epitelio biliare: questo meccanismo, detto mimetismo molecolare, viene utilizzato per cercare di spiegare la mancata tolleranza verso gli antigeni mitocondriali.

Degli studi epidemiologici hanno dimostrato che gli agenti infettivi potrebbero in alcuni casi aggravare la malattia: in particolare *Escherichia coli* e *Novosphingobium aromaticivorans* sono stati quelli maggiormente associati a tale problema.<sup>1,36</sup>

Diversi agenti chimici, tra cui farmaci e detergenti casalinghi, hanno dimostrato di poter agire con il meccanismo di mimetismo molecolare nei confronti del PDC-E2; tra questi abbiamo il "2-octynoic acid" che viene utilizzato in molti profumi, rossetti ed aromi alimentari. Questo acido è in grado di modificare *in vivo* il PDC-E2 e, gli studi su topi immunizzati con esso, hanno dato un modello animale con CBP che presentava una colangite autoimmune, tipici anticorpi anti-mitocondriali e un elevato numero di cellule linfoidi a livello epatico, caratterizzate da un maggior numero di linfociti CD8<sup>+</sup>. Attraverso l'utilizzo della tecnica nano-PALDI (nano-particle-assisted laser desorption/ionization) e l'imaging con spettrometria di massa (IMS) nei modelli di topi con CBP indotta, gli studiosi sono riusciti ad osservare il fatto che l'acido tendeva a localizzarsi a livello dell'area portale del fegato con un'infiltrazione marcata delle cellule infiammatorie; si è visto poi che vi erano anche delle tracce nella bile e questo ha fatto sospettare che il "2-octynoic acid" si depositasse proprio nelle cellule epiteliali biliari.<sup>37</sup>

L'attivazione della risposta immunitaria innata sembra essere un altro evento chiave della colangite biliare primitiva, soprattutto nella fase iniziale della malattia; questo avvenimento causerebbe il danno autoimmune delle piccole cellule intraepatiche dei dotti biliari. Le cellule epiteliali biliari, infatti, possiedono un sistema di immunità innata, formato dalla famiglia dei Toll-like receptor (TLR), i quali riconoscono i PAMPs (Pathogen



Associated Molecular Patterns); nella CBP una maggior responsività ai PAMPs è associata alla patogenesi della colangiopatia. Le risposte immunitarie innate a livello biliare inducono la produzione di frattalkina, nota anche come chemochina ligando 1, causando la migrazione delle cellule infiammatorie, tra cui anche le cellule Natural Killer.

38,39

I dotti biliari, compresi quelli di piccole dimensioni, in seguito al danno andranno incontro a senescenza, la quale associata ad un'autofagia non controllata, potrebbe condurre ad un'espressione anormale degli antigeni mitocondriali e successiva patogenesi autoimmune della malattia. Le cellule epiteliali nella CBP sono esposte ad un maggior stress ossidativo che potrebbe favorire la senescenza cellulare e causare il danno a livello epatico. <sup>1</sup>

## 1.5 EPIDEMIOLOGIA

La colangite biliare primitiva è una malattia autoimmune che colpisce persone di tutte le etnie e di entrambi i sessi. Inizialmente si pensava che questa patologia colpisse prevalentemente le donne di mezza età con un rapporto, rispetto all'uomo, di 10:1<sup>40</sup>; nonostante la malattia presenti comunque una prevalenza femminile, si è visto che colpisce anche gli uomini, con un rapporto donna-uomo di circa 4-6:1<sup>41</sup>. Negli uomini questa epatopatia viene diagnosticata in età avanzata e viene anche associata ad una minor risposta alla terapia con acido ursodesossicolico e ad una maggior comparsa di cirrosi.

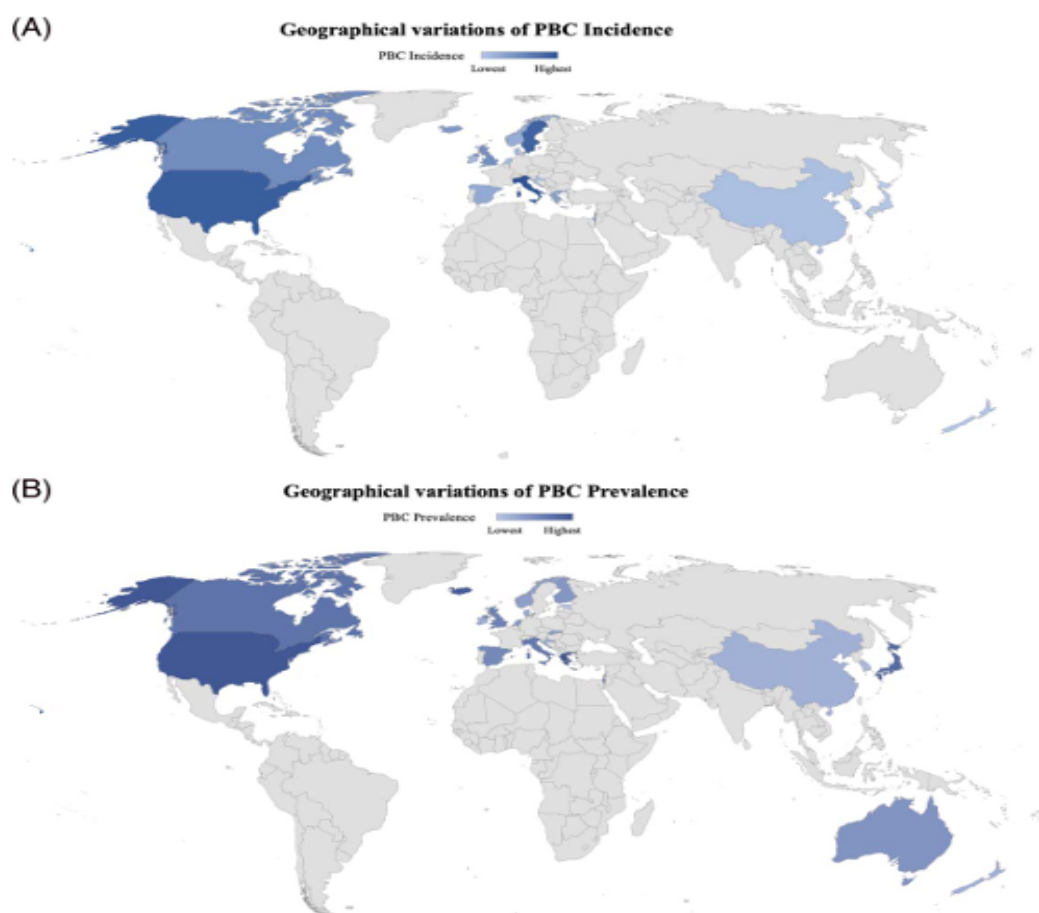
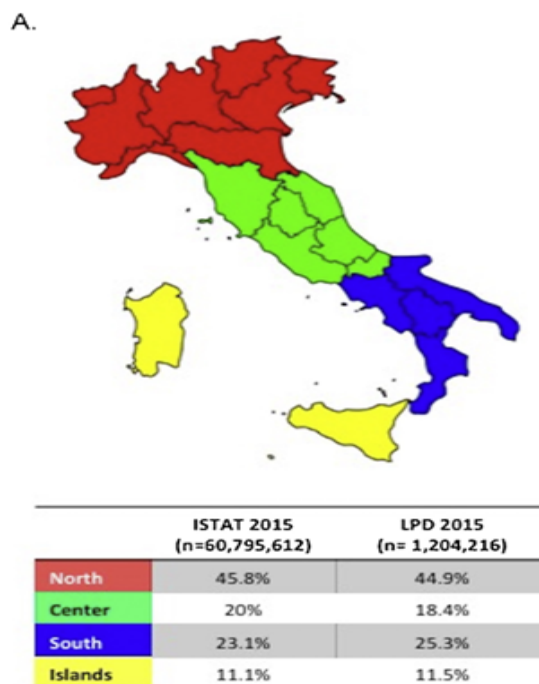


Figura 5: Incidenza e prevalenza globale della CBP <sup>44</sup>

È stato evidenziato che l'incidenza e la prevalenza della CBP aumentano con l'avanzare dell'età, con un picco attorno ai 60-79 anni; questa patologia, infatti, viene diagnosticata prevalentemente negli individui di mezza età (tra i 40 e i 60 anni) e risulta essere rara nelle persone al di sotto dei 25 anni. <sup>42</sup>

Diversi studi hanno dimostrato che l'incidenza della CBP risulta essere maggiore nel Nord America (2,5 per 100.000 persone) rispetto all'Europa (1,86 per 100.000 persone) e minore in Asia (0,84 per 100.000 persone). Anche la prevalenza risulta essere la più elevata nel Nord America (21,81 per 100.000 persone).<sup>43</sup> Non si hanno dati riguardanti l'incidenza e la prevalenza in Africa, nell'America Centrale e del Sud e nell'Antartica a causa dei pochi studi effettuati in tali luoghi. Come si può notare dalla *Figura 5*, abbiamo delle differenze epidemiologiche all'interno dei continenti stessi: per quanto riguarda l'Europa, per esempio, nei paesi dell'Est abbiamo un'incidenza e una prevalenza minore; nel nord del Regno Unito troviamo una maggior incidenza della CBP rispetto al sud.<sup>2,44</sup>

Come illustrato in precedenza, l'insorgenza della colangite biliare primitiva può essere legata alla suscettibilità genetica, ma anche ai fattori ambientali: si vede, infatti, che questa risulta essere maggiormente diffusa nelle aree industrializzate ed inquinate e nei fumatori (Figura 6).



*Figura 6: Confronto dell'informazione demografica tra il dataset dell'ISTAT e dell'LPD*<sup>45</sup>

Per quanto riguarda l'Italia, tra gennaio 2014 e dicembre 2015, è stato condotto uno studio raccogliendo i dati delle cartelle cliniche mediche ottenuti dal QuintilesIMSTM Longitudinal Patient Databases (LPD®), che rappresenta anche il database su cui si basa il rapporto OsMed (Osservatorio Nazionale sull'Impiego dei Medicinali) che viene

pubblicato annualmente dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco). Per verificare che il campione considerato con LPD fosse rappresentativo dell'intera popolazione italiana, le caratteristiche dei pazienti sono state confrontate con i dati più recenti dell'ISTAT (Istituto Nazionale di Statistica).

Lo studio ha coinvolto più di un milione di persone di età superiore ai 14 anni e, tra queste, 412 hanno ricevuto una nuova diagnosi di CBP (nel 2014-2015); la prevalenza nella popolazione italiana è stata calcolata come 27,90 per 100.000 abitanti e l'incidenza come 5,31 per 100.000 abitanti/all'anno.<sup>45</sup>

Tramite questa indagine sono state evidenziate anche le comorbidità che sono insorte più frequentemente nella popolazione considerata con LPD affetta da colangite biliare primitiva: si sono manifestate, in particolare, osteoporosi, artrite reumatoide, diabete di tipo 2 ed ipotiroidismo/malattia di Hashimoto.

## **CAPITOLO 2: DIAGNOSI**

Nel momento in cui non viene effettuata una diagnosi di colangite biliare primitiva e, di conseguenza, non viene stabilita una terapia, un numero piuttosto consistente di pazienti sviluppa insufficienza epatica, trapianto del fegato o morte entro 10 anni. Si è visto, infatti, che solamente il 17,4% delle persone non presenta sintomi per i 10 anni successivi alla diagnosi;<sup>46</sup> in altri pazienti la malattia, invece, tende a progredire velocemente con modificazioni istologiche ogni 2 anni.<sup>47</sup> Inoltre più del 30%<sup>48</sup> dei malati da CBP può andare incontro ad una forma severa e progressiva della patologia, che si manifesta con insufficienza e fibrosi epatica precoce. Per questi motivi una diagnosi tempestiva della malattia risulta essere essenziale.

Sono stati identificati tre scenari principali che possono supportare la diagnosi di colangite biliare primitiva:

- Scenario numero 1: aumento cronico della fosfatasi alcalina (ALP), AMA positiva, in assenza di altre malattie a carico del fegato o malattie sistemiche;
- Scenario numero 2: aumento cronico della fosfatasi alcalina, AMA e ANA negativa (anticorpi antinucleari), con una biopsia del fegato che identifica la presenza di colangite distruttiva e la distruzione dei dotti biliari interlobulari;
- Scenario numero 3: aumento cronico della fosfatasi alcalina, AMA negativa, ma positiva a test su ANA specifici della PBC (sp-100, gp-210).

## 2.1 TEST SIEROLOGICI

Nei pazienti in cui vengono rilevati dei livelli sierologici elevati di AST (aspartato amino transferasi), ALT (alanina amino transferasi), ALP (fosfatasi alcalina) e un aumento della bilirubina totale (con o senza sintomi tipici della CBP), viene sospettata la presenza della malattia. Dal punto di vista clinico, ad un elevato valore di ALP si associa generalmente un incremento anche della GGT (gamma-glutamil transferasi) e della bilirubina coniugata.<sup>4</sup>

Negli individui affetti da colangite biliare primitiva si osservano spesso delle concentrazioni elevate di immunoglobuline, soprattutto di immunoglobuline M (IgM): queste però non vengono considerate come elemento fondamentale nella diagnosi di tale patologia.<sup>49</sup>

Con l'avanzare della malattia si potrebbe osservare iperbilirubinemia e un suo valore significativamente più elevato indica la presenza di uno stadio avanzato della CBP.

Come abbiamo potuto illustrare precedentemente, spesso nella colangite biliare primitiva viene riscontrata una positività agli anticorpi antimitocondriali (AMA), ma l'individuazione di questo singolo valore nel sangue, in assenza di colestasi, non è sufficiente per poter confermare la diagnosi di CBP: uno studio ha rilevato che solamente in un soggetto su sei AMA positivo, con valori normali di ALP, è stata sviluppata la malattia entro 5 anni.<sup>50</sup> Altri anticorpi associati alla CBP sono gli anticorpi antinucleari (ANA), i quali risultano essere presenti in circa il 50% dei pazienti: gli anti-gp210 (anti-glicoproteina 210) e gli anti-sp100, vengono indicati come altamente specifici per la colangite biliare primitiva e sono sufficienti per confermare la diagnosi.<sup>50-52</sup>

## 2.2 BIOPSIA AL FEGATO

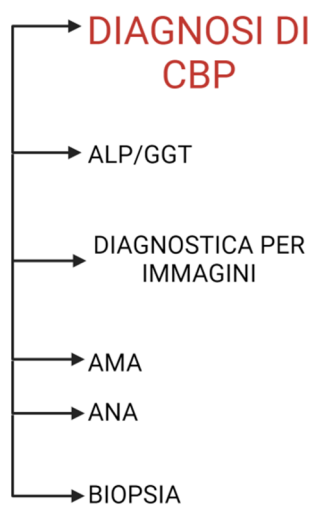
La maggior parte dei pazienti affetti da colangite biliare primitiva non necessita di biopsia al fegato, motivo per cui la diagnosi viene effettuata sulla base di test clinici e di laboratorio.

La biopsia al fegato viene richiesta nel momento in cui la diagnosi di CBP sia incerta o quando si sospetta la presenza di un'altra patologia epatica, come la steatoepatite alcolica o l'epatite autoimmune (AIH): in quest'ultimo caso la biopsia diventa necessaria.

L'individuazione di modificazioni istologiche a seguito di questo esame, come la presenza di colangite non-suppurativa e la distruzione dei dotti biliari di piccole e medie dimensioni, indica la presenza di CBP;<sup>53</sup> in particolare la distruzione dei dotti biliari potrebbe condurre nel tempo a fibrosi ed eventualmente a cirrosi.

### 2.3 RUOLO DELL'IMAGING DIAGNOSTICO

L'imaging diagnostico, o diagnostica per immagini, non viene ad oggi utilizzato per individuare la presenza della CBP: in particolare l'ecografia addominale viene fortemente raccomandata per poter escludere tutte le altre cause di colestasi come, per esempio, l'ostruzione biliare extraepatica; sia la risonanza magnetica che l'elastografia transiente (TE), conosciuta anche come Fibroscan, vengono sfruttate per stabilire il grado di fibrosi nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva (Figura 7).<sup>4,51,52</sup>



*Figura 7: Criteri per stabilire una diagnosi di colangite biliare primitiva (Fonte: realizzata con Biorender)*



### **CAPITOLO 3: MANIFESTAZIONI INTRA ED EXTRAEPATICHE DELLA COLANGITE BILIARE PRIMITIVA**

#### **3.1 MANIFESTAZIONI INTRAEPATICHE**

La colangite biliare primitiva progredisce lentamente e può sfociare in cirrosi o portare ad altre complicanze la cui gravità può variare molto tra i pazienti.

Degli studi recenti hanno dimostrato che, nella maggior parte dei casi, viene effettuata una diagnosi tempestiva della malattia e solamente nel 15% degli individui viene diagnosticata ad uno stadio avanzato.<sup>54,55</sup> Ciononostante, l'incidenza di cirrosi dopo 10 anni dalla comparsa della patologia risulta essere di circa il 40%<sup>56</sup> e, per questo motivo, i pazienti affetti dalla CBP sono a rischio di sviluppare nel tempo delle problematiche associate alla cirrosi, tra cui ascite od encefalopatia epatica.

Le complicanze legate al fegato si verificano principalmente nei pazienti con cirrosi, mentre il sanguinamento dalle varici esofagee può manifestarsi occasionalmente in quelli senza cirrosi. A differenza di altre patologie epatiche potrebbe svilupparsi, nei soggetti con CBP pre-cirrotica, l'ipertensione portale<sup>57</sup>: in questo caso gli individui riescono a sopravvivere per diversi anni anche senza subire un trapianto al fegato, ma dovranno essere comunque monitorati.<sup>58</sup>

### 3.1.1 CARCINOMA EPATOCELLULARE

A differenza dei pazienti senza cirrosi, quelli affetti da colangite biliare primitiva presentano un maggior rischio di sviluppare il carcinoma epatocellulare (CEC o HCC) nel momento in cui si instaura la cirrosi: l'incidenza di HCC risulta essere di circa 0,36 per 100 persone/anno e si verifica maggiormente negli uomini e in presenza, a seguito di biopsia, di uno stadio istologico avanzato.<sup>59</sup> Uno studio giapponese ha dimostrato, inoltre, che gli uomini affetti da CBP potrebbero avere un maggior rischio di sviluppare HCC anche in assenza di cirrosi.<sup>60</sup>

Uno studio multicentrico effettuato in Europa e Nord America, basato sull'osservazione prolungata di 4565 pazienti con CBP, ha rilevato un tasso di incidenza di HCC di 3,4 casi ogni 1000 pazienti/anno.<sup>61</sup> Questo studio, in particolare, ha evidenziato come fattore di rischio il sesso maschile, ma anche la mancata risposta alla terapia con acido ursodesossicolico (UDCA): sarà quindi fondamentale monitorare la possibile comparsa di carcinoma epatocellulare, effettuando un'ecografia ogni 6 mesi, soprattutto in pazienti con cirrosi e negli uomini che non rispondono a tale trattamento.<sup>62</sup>

### 3.1.2 TRAPIANTO DEL FEGATO

Il trapianto del fegato, ad oggi, non è più una pratica molto diffusa nonostante la prevalenza di CBP sia aumentata negli ultimi anni. Questo tipo di operazione deve essere presa in considerazione se si sono manifestate delle complicanze legate alla cirrosi, se i valori di bilirubina risultano essere superiori a 50-85  $\mu\text{mol/L}$  o 3-5 mg/dL<sup>63</sup> e nei pazienti che presentano un prurito intrattabile e refrattario alle terapie.<sup>64,65</sup>

In seguito al trapianto del fegato permangono alcuni sintomi, come la stanchezza<sup>66,67</sup>, e possiamo avere un aumento del rischio di sviluppare osteoporosi e altri disturbi autoimmuni, tra cui malattie della tiroide<sup>65,68</sup>. Si rileva, inoltre, la ricomparsa della colangite biliare primitiva nel 20% dei pazienti<sup>69,70</sup> e in questi casi non è consigliato effettuare una biopsia per diagnosticarla tempestivamente; il trattamento con UDCA abbassa i livelli degli enzimi epatici e potrebbe anche ridurre l'incidenza della ricomparsa della malattia<sup>71</sup>, ma i dati ottenuti non sono sufficienti per raccomandarne l'utilizzo nei pazienti post-trapiantati.

## 3.2 MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE

### 3.2.1 OSTEOPOROSI

Nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva l'osteoporosi rappresenta una delle complicanze più comuni: tra i fattori di rischio principali per la sua insorgenza troviamo una colestasi severa, uno stadio istologico avanzato e, nelle donne, la menopausa.<sup>72,73</sup>

Per poter prevenire la comparsa di osteoporosi e per trattarla, le linee guida raccomandano di seguire una nutrizione corretta ed evitare altri fattori di rischio, tra cui il fumo di sigaretta. In assenza di precedenti episodi di calcoli renali, si possono utilizzare degli integratori di calcio e vitamina D, soprattutto negli individui che stanno assumendo determinati farmaci, come le resine sequestranti gli acidi biliari, che riducono l'assorbimento intestinale di tale vitamina: nonostante questi tipi di supplementi vengano spesso consigliati, non vi sono dati sufficienti che supportino il loro utilizzo.<sup>74</sup>

Il trattamento farmacologico viene suggerito nei pazienti che presentano un rischio maggiore di andare incontro a fratture e, generalmente, vengono prescritti gli stessi farmaci usati nella cura dell'osteoporosi post-menopausa. Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia dei bifosfonati, tra cui alendronato (assunzione settimanale) ed ibandronato (assunzione mensile), nell'aumentare la massa ossea nei pazienti con CBP; in presenza di varici esofagee dovranno essere prese in considerazione altre classi di farmaci, in quanto l'assunzione dei bifosfonati per via orale aumenta il rischio di gastriti ed esofagiti.<sup>75</sup>

### 3.2.2 IPERLIPIDEMIA

L'insorgenza dell'iperlipidemia risulta essere molto comune nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva: inizialmente si rilevano dei valori elevati di VLDL (Very Low Density Lipoprotein), di LDL (Low Density Lipoprotein) e significativamente elevati di HDL (High Density Lipoprotein). Con l'evolversi della patologia i livelli di LDL possono aumentare ulteriormente, possibilmente a causa di una ridotta funzionalità da parte del recettore per le LDL, mentre quelli di HDL tendono a diminuire.<sup>76,77</sup> Negli individui con CBP avanzata l'aumento del colesterolo potrebbe essere attribuito ad un incremento dei livelli della lipoproteina X, una lipoproteina a bassa densità anormale ricca in colesterolo libero e fosfolipidi, che inibisce la normale ossidazione delle LDL, riducendo il rischio di aterosclerosi.<sup>78</sup>

I pazienti con iperlipidemia associata alla colangite biliare primitiva non vengono solitamente trattati, tranne nel caso in cui siano presenti altri fattori di rischio cardiovascolari.<sup>51</sup>

### 3.2.3 VARICI E SINDROME DI SJÖRGEN

I pazienti affetti da CBP potrebbero sviluppare, come conseguenza della cirrosi biliare, ipertensione portale,<sup>79,80</sup> dovuta soprattutto ad una prognosi non adeguata. A differenza di altre patologie epatiche nella colangite biliare primitiva l'ipertensione portale può svilupparsi nello stadio iniziale o pre-cirrotico della malattia in associazione con iperplasia nodulare rigenerativa, anche se questa possibilità è piuttosto rara.<sup>81</sup> Tra le conseguenze principali dell'ipertensione portale abbiamo la comparsa di varici: la gestione delle varici gastroesofagee e di quelle emorragiche nei pazienti con CBP può essere effettuata seguendo le linee guida Baveno-VI, che indicano i beta-bloccanti non selettivi come trattamento negli individui con varici esofagee di grandi dimensioni.<sup>82</sup>

La sindrome di Sjörger (sindrome secca immuno-mediata) è caratterizzata da occhi e bocca secca, secchezza vaginale, un aumento della frequenza di candidosi orale ed altri sintomi, come mialgia, stanchezza e vasculiti. Per trattare questo disturbo si possono utilizzare delle lacrime artificiali, per gli occhi secchi, o preparazioni di saliva artificiale, per la bocca secca; risulta essere piuttosto efficace l'utilizzo della pilocarpina, un agonista colinergico, che può essere usato anche nei pazienti refrattari al trattamento con le lacrime artificiali.<sup>4,53</sup>

## CAPITOLO 4: TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

### 4.1 TRATTAMENTI DI PRIMA LINEA

#### 4.1.1 ACIDO URISODESSICOLICO

L'acido ursodesossicolico (UDCA) è un acido biliare diidrossi idrofilico presente a livello fisiologico, che è stato caratterizzato per la prima volta nella bile dell'orso nero asiatico<sup>83</sup> ed è presente nell'uomo ad una concentrazione pari al 3% degli acidi biliari totali.<sup>84</sup>

L'acido ursodesossicolico è un acido 3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanoico (Figura 8) e si forma a partire dall'epimerizzazione-7b dell'acido chenodesossicolico, un acido biliare primario, nell'intestino ad opera dei batteri intestinali. Gli acidi biliari sono degli acidi steroidei che emulsionano i lipidi intestinali e derivano dall'ossidazione del colesterolo mediata dal citocromo P450.<sup>83-86</sup>

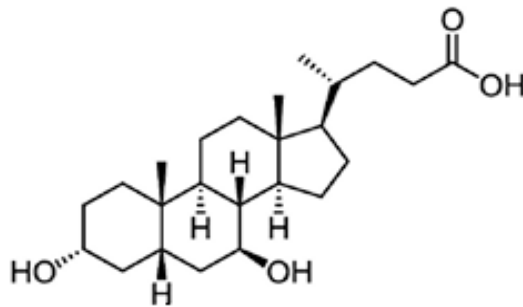


Figura 8: Struttura dell'acido ursodesossicolico (UDCA)<sup>194</sup>

È stato approvato per la prima volta dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della colangite biliare primitiva e per la dissoluzione dei calcoli biliari di colesterolo. È stato dimostrato che l'UDCA è in grado di aumentare il flusso biliare, di cambiare l'indice di idrofobicità del pool di acidi biliari e, inoltre, ha degli effetti immunosoppressivi.<sup>87,88</sup>

Nonostante stiano emergendo nuovi farmaci, l'acido ursodesossicolico rimane il trattamento di prima linea riconosciuto universalmente per la CBP<sup>51,53</sup>: la sua raccomandazione è dovuta alla sua efficacia a lungo termine, al suo ottimo profilo di sicurezza e al suo prezzo ridotto. È stato evidenziato che questo medicinale porta ad una riduzione delle aminotransferasi, della fosfatasi alcalina e della bilirubina sierica, indipendentemente dalla progressione istologica della

patologia; rimane ancora aperto il dibattito per quanto riguarda la sua efficacia in termini di incremento della sopravvivenza e di bisogno di ricorrere al trapianto del fegato.<sup>89</sup> Gli studi hanno mostrato che l'UDCA però non rappresenta una terapia curativa della colangite biliare primitiva e non blocca l'avanzamento della malattia.<sup>90-92</sup> È stato messo in luce che due pazienti asintomatici su tre traggono beneficio dall'utilizzo di UDCA<sup>93</sup> e che la sopravvivenza media attesa per i pazienti asintomatici con CBP è stata di 10 e 16 anni in due grandi coorti seguite per un periodo di 24 anni,<sup>94,95</sup> mentre la sopravvivenza media dei pazienti sintomatici è stata di circa 7 anni.<sup>95,96</sup>

Una revisione sistematica di 16 studi clinici randomizzati che confrontavano l'utilizzo dell'UDCA nella CBP e il placebo o il non intervento, ha dimostrato che tale farmaco non ha effetti significativi sulla mortalità o sul trapianto di fegato: è stato provato, invece, che l'UDCA non incrementa il prurito, la stanchezza e la pressione portale. L'utilizzo di questo medicinale è stato spesso associato ad eventi avversi tra cui, soprattutto, l'aumento del peso corporeo;<sup>89,91,97</sup> il rischio di sviluppare il carcinoma epatocellulare nei pazienti con CBP che non rispondono all'acido ursodesossicolico aumenta nel corso del tempo, con un'incidenza dopo 10 e 15 anni rispettivamente del 9% e del 20%.<sup>98</sup>

Ad una dose giornaliera di 13-15 mg/kg<sup>99,100</sup> l'acido ursodesossicolico ha fallito nel controllo della progressione istologica a livello epatico e dei sintomi; ad una dose più elevata, 28-30 mg/kg/die, ha portato ad un aumento della mortalità e della necessità di ricevere un trapianto del fegato.<sup>101</sup>

L'utilizzo dell'UDCA nei pazienti pediatrici non è stato approvato: la sua efficacia e sicurezza nei bambini, infatti, non è mai stata stabilita.

Circa il 90% della dose terapeutica di acido ursodesossicolico viene assorbita nell'intestino tenue a seguito della somministrazione orale. Nella bile l'UDCA è concentrato nella cistifellea e viene poi espulso nel duodeno; solamente una piccola parte del farmaco è presente nella circolazione sistemica, mentre nel plasma lo ritroviamo legato alle proteine e solo una quantità ridotta viene escreta nelle urine.<sup>102</sup> L'UDCA viene generalmente ossidato e ridotto a carbonio-7



portando alla formazione dell'acido 7-ketolitocolico od acido litocolico. Quest'ultimo causa dei danni colestatici a livello epatico e può causare morte per insufficienza epatica nei pazienti con solfatazione compromessa; inoltre induce la rottura del filamento di DNA, promuove la trasformazione cellulare e può portare a lesione segmentale del dotto biliare. Circa il 41% dell'acido ursodesossicolico, durante un'incubazione *in vitro* della durata di 2 ore, viene deidrossilato in posizione 7 portando alla formazione di acido litocolico;<sup>103</sup> *in vivo* questo accade per quasi il 100% dell'UDCA in 12-24 ore.<sup>104,105</sup> L'UDCA ha dimostrato di avere un'emivita piuttosto lunga, compresa tra 3.5 e 5.8 giorni.<sup>106</sup>

Questo farmaco, inoltre, risulta essere anti-apoptotico:<sup>107,108</sup> l'apoptosi rappresenta il meccanismo principale che porta alla rimozione delle cellule danneggiate, mantiene l'omeostasi cellulare e fa sparire i miofibroblasti epatici.<sup>109,110</sup> L'UDCA inibisce l'apoptosi attraverso il silenziamento di p53 (Proteina tumorale 53), l'inibizione della ciclina D1<sup>111</sup> e mediante il meccanismo indipendente delle caspasi.<sup>112</sup> L'arresto dell'apoptosi delle cellule danneggiate si verifica anche indirettamente tramite il blocco dell'apoptosi indotta dall'acido desossicolico (DCA): l'UDCA sopprime la capacità di legarsi al DNA del fattore di trascrizione AP-1 (Activator Protein-1), portando ad una down-regulation delle chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK) e delle attività della chinasi Raf-1 stimulate dall'esposizione al DCA.<sup>113</sup> L'UDCA modifica anche l'acetilazione degli istoni e induce sia la differenziazione che la senescenza,<sup>114</sup> interferisce con la up-regulation della citocheratina 8 (CK8) epato-protettiva<sup>115</sup> e, infine, inibisce una naturale cascata di eventi che conduce ad una rigenerazione delle cellule danneggiate.

L'acido ursodesossicolico inibisce anche il coenzima-A: in particolare blocca i passaggi dipendenti da tale coenzima nella degradazione del colesterolo.<sup>116</sup> Questo farmaco blocca anche la risposta cellulare a stimoli citotossici diventando un potente inibitore dell'adenosinmonofosfato ciclico (AMPC): quest'ultimo è un secondo messaggero della trasduzione del segnale intracellulare ed è coinvolto nell'attivazione delle protein chinasi, regola gli effetti del glucagone e dell'adrenalina, il passaggio del calcio attraverso i canali ionici e il metabolismo

del glicogeno e di altri carboidrati e lipidi. In particolare, l'UDCA inibisce la sintesi di AMPc indotta dal glucagone mediata dalla protein-chinasi C (PKC).<sup>117,118</sup>

Come abbiamo citato in precedenza, l'acido ursodesossicolico inibisce l'induzione e la stabilizzazione dell'oncosoppressore p53, che risulta essere fondamentale per l'eliminazione delle cellule danneggiate per proteggere l'organismo dalle trasformazioni maligne.<sup>119,120</sup> L'espressione di p53 e della proteina pro-apoptotica Bax negli epatociti viene up-regolata dall'acido desossicolico: tale espressione, però, viene a sua volta inibita dall'UDCA. Si pensa, quindi, che questo medicinale possa promuovere la formazione di tumori dato che inibisce questo oncosoppressore. L'UDCA, inoltre, inibisce la degradazione del fattore nucleare kappa B (Nf-kB),<sup>112</sup> un complesso proteico che controlla la trascrizione del DNA e gioca un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria all'infezione e nelle trasformazioni maligne.<sup>121</sup> Ciononostante, la capacità trascrizionale dell'UDCA, la sua interferenza con la protein chinasi C in diverse linee cellulari e l'inibizione diretta della proliferazione dei colangiociti potrebbero garantire un ruolo futuro nel trattamento delle malattie maligne; ad oggi però sono necessari ulteriori studi per poter definire il ruolo clinico di questo farmaco.<sup>122,123</sup>

È stato dimostrato che l'UDCA può agire sulle cellule della microglia: inibisce direttamente la produzione di ossido nitrico da parte di queste cellule e questo effetto dura fino a 48 ore.<sup>124,125</sup> La soppressione della microglia da parte del medicinale e l'elevata penetrazione di sangue nella barriera cerebrale, potrebbe avere un ruolo nell'insorgenza dell'Alzheimer e della sclerosi laterale amiotrofica. Le cellule della microglia rappresentano un tipo di cellule della glia: sono la principale fonte di citochine prodotte durante l'infiammazione a carico del sistema nervoso centrale (SNC) e sono responsabili della neuroprotezione e della difesa immunitaria.<sup>126,127</sup>

L'acido ursodesossicolico risulta essere genotossico: questo, infatti, porta alla produzione di micronuclei nei linfociti presenti nel sangue a livello periferico e rappresentano un biomarcatore del danno a carico dei cromosomi.<sup>128</sup> Una dose elevata di UDCA, inoltre, potenzia la frammentazione del DNA indotta da TNF- $\alpha$

(Fattore di Necrosi Tumorale alpha), mentre questo non si verifica con una concentrazione bassa o intermedia dello stesso farmaco.<sup>129</sup> Degli studi hanno evidenziato il fatto che l'acido ursodesossicolico causava atrofia epatica, con diverse aree focali di necrosi ed epatotossicità nei topi trattati con griseofulvina, ma questo non si verificava in quelli trattati esclusivamente con griseofulvina.<sup>130</sup>

Infine, gli effetti collaterali dell'acido ursodesossicolico sono legati alle sue proprietà: causa immunosoppressione e conseguente febbre, faringite, otite, broncopneumopatia, formazione di ascessi, bronchiti e diarrea ricorrente. Un utilizzo prolungato di UDCA viene spesso associato con l'insorgenza di nefriti tubulo interstiziali, vasculiti leucocitoclastiche, rash cutanei, trombocitopenia, tosse e malattie interstiziali dei polmoni. Il suo utilizzo è legato anche a complicazioni epatiche come prurito, colangite, ascite, aumento della colestasi, ipertensione portale ed insufficienza epatica. Tra le altre reazioni avverse possiamo ritrovare convulsioni, nausea, vomito, disturbi del sonno, diabete e tumore al seno.<sup>101,131</sup>

## 4.2 TRATTAMENTI DI SECONDA LINEA

### 4.2.1 ACIDO OBETICOLICO

Nonostante l'acido ursodesossicolico porti ad un miglioramento a lungo termine della sopravvivenza, vi è circa un 30-40% dei pazienti che non risponde a tale trattamento e che presenta, quindi, un maggior rischio di progressione della malattia, di dover ricorrere al trapianto del fegato e una maggior mortalità.<sup>132</sup>

Uno studio su una grande coorte nel Regno Unito ha associato la diagnosi in giovane età e il sesso maschile con una ridotta possibilità di risposta biochimica alla terapia con UDCA<sup>133</sup> e, allo stesso modo, un grande studio multicentrico con follow-up a lungo termine, ha dimostrato che i giovani pazienti affetti da CBP (di età inferiore ai 45 anni) rispondono meno all'UDCA rispetto alle persone più anziane (di età superiore ai 65 anni).<sup>134</sup> Ad oggi il meccanismo biologico che sottintende questa osservazione clinica nei non-rispondenti alla terapia di prima linea non è ancora stato completamente compreso.

Per questo motivo è stato proposto un trattamento di seconda linea per poter superare le limitazioni che erano state osservate nell'acido ursodesossicolico: l'utilizzo dell'acido obeticolico rappresenta l'unica terapia sostitutiva raccomandata per i pazienti intolleranti all'UDCA o in quelli in cui non si sono osservati dei benefici nei primi 12 mesi di trattamento con l'UDCA.<sup>135</sup>

L'acido obeticolico (OCA) è un derivato sintetico dell'acido chenodesossicolico ed è un agonista del recettore nucleare Farnesoide X (FXR)<sup>136</sup>, un recettore nucleare espresso principalmente nel fegato e nell'intestino, che governa una serie complessa di vie di segnalazione legate all'omeostasi degli acidi biliari (Figura 9). Degli studi farmacologici in vitro hanno dimostrato che l'OCA agisce come agonista di FXR con una potenza 100 volte superiore rispetto a quella degli acidi biliari endogeni.<sup>137</sup>

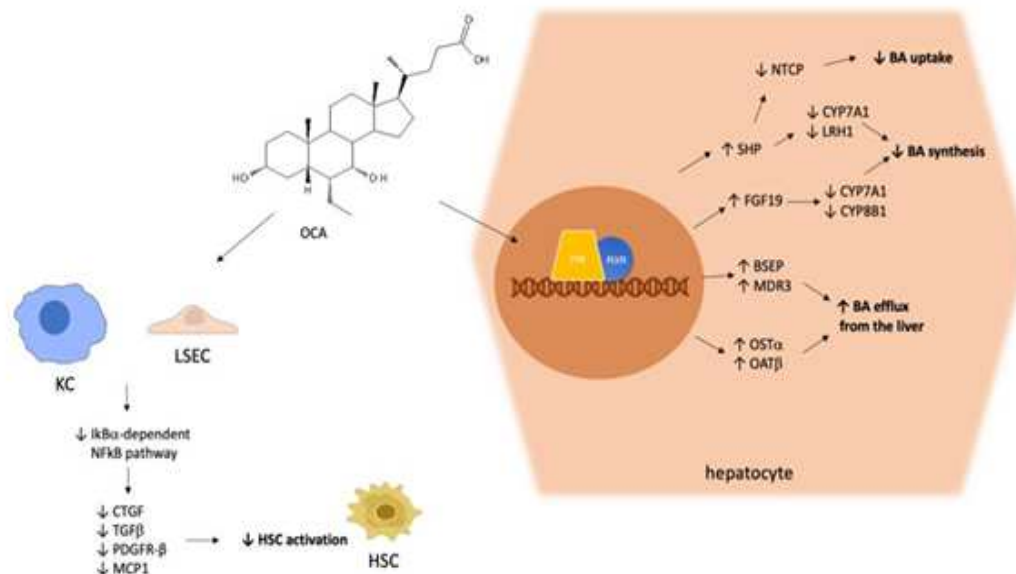


Figura 9: Meccanismo molecolare dell'acido obeticoico<sup>135</sup>

Gli acidi biliari vengono sintetizzati nel fegato a partire dal colesterolo epatico e vengono poi secreti nell'intestino per favorire la digestione e l'assorbimento di nutrienti, soprattutto lipidi e vitamine liposolubili.<sup>138</sup> Dopo la loro secrezione, circa il 95% degli acidi biliari viene riassorbito dall'ileo terminale ed entra nella circolazione enteroepatica.<sup>135</sup> Essendo degli agonisti di FXR, gli stessi acidi biliari partecipano alla loro sintesi e secrezione attraverso la modulazione dell'attivazione di FXR. Nella CBP associata a colestasi, la circolazione enteroepatica degli acidi biliari non è regolare e causa infiammazione e danno a livello epatico.

L'acido obeticoico esercita sia un'azione antinfiammatoria che anti-fibrotica attraverso l'attivazione mirata delle cellule endoteliali sinusoidali epatiche e delle cellule di Kupffer: in particolare, riduce la produzione delle citochine infiammatorie e delle chemochine mediante queste cellule sinusoidali, che a loro volta attivano le cellule epatiche stellate.<sup>139</sup> Il meccanismo antinfiammatorio è legato all'inibizione della via di segnalazione di NF-κB tramite una up-regulation del suo inibitore IκBα. L'acido obeticoico presenta un meccanismo d'azione complesso che possiamo riassumere con una serie di azioni:

- a) La regolazione del trasporto degli acidi biliari;
- b) La riduzione dell'infiammazione;
- c) La modulazione delle vie cellulari che scatenano la fibrogenesi.<sup>140</sup>

Attraverso l'induzione di una via di segnalazione che modula l'attività del fattore di crescita dei fibroblasti 19 (FGF-19), l'OCA conferisce una maggior protezione a livello epatico rispetto all'UDCA ed induce l'espressione e la secrezione degli ormoni gastrointestinali, come FGF-19.<sup>141</sup> Questo ormone viene assorbito e secreto dagli enterociti nel sangue portale e raggiunge il fegato mediante il sistema portale.

L'acido obeticolico è stato valutato come monoterapia in uno studio di fase II nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva, con lo scopo di dare loro beneficio in assenza del trattamento con acido ursodesossicolico.<sup>142</sup> In seguito alla randomizzazione, 23 pazienti sono stati trattati con il placebo e gli altri con due dosi diverse di OCA (20 pazienti con 10 mg e altri 16 con 50 mg) per 3 mesi e poi sono stati seguiti per 6 anni. L'end-point primario dello studio riguardava la riduzione della fosfatasi alcalina (ALP) misurata come differenza percentuale rispetto al valore iniziale: la terapia con entrambi i dosaggi di OCA ha portato ad una riduzione significativa della ALP rispetto al placebo; inoltre, l'OCA ha ridotto anche il valore di altri parametri plasmatici, come la bilirubina coniugata, le immunoglobuline e AST. L'effetto collaterale più comune è stato il prurito, che è stato registrato nel 15% dei pazienti trattati con 10 mg di OCA e nel 38% dei pazienti trattati con 50 mg.<sup>142</sup>

La prima approvazione per l'acido obeticolico è stata ottenuta a seguito dei risultati di uno studio di fase III che ha arruolato 216 pazienti ed ha dimostrato che circa il 59% dei non-rispondenti all'acido ursodesossicolico ha trovato beneficio dopo un anno di trattamento combinato di OCA e UDCA; questi soggetti hanno raggiunto l'obiettivo dello studio, che era stato fissato ad una riduzione della ALP di 1.67 volte rispetto al limite massimo del range normale.<sup>143</sup> Successivamente lo studio è passato attraverso un'ulteriore fase in cui 193 dei pazienti arruolati sono stati trattati solamente con OCA<sup>144</sup>: i risultati hanno rilevato che la terapia con acido obeticolico è stata ben tollerata e che questo farmaco ha mantenuto i propri effetti nel corso del tempo; in seguito, è stato evidenziato che l'OCA ha indotto una riduzione significativa della bilirubina, soprattutto per gli individui con un valore di partenza elevato di bilirubina diretta.<sup>145</sup> Anche in questo caso gli effetti collaterali più evidenti sono stati il prurito e la stanchezza, che sono stati registrati rispettivamente nel 77% e nel 33% dei pazienti.<sup>145</sup> Come conseguenza dell'alterazione del metabolismo lipidico, dovuto ad altre vie di

segnalazione molecolare innescate dall'attivazione di FXR, è stato individuato un aumento dei livelli sierici totali di lipidi e una piccola diminuzione delle lipoproteine ad alta densità (HDL) nei pazienti con CBP trattati con OCA, ma questi effetti non sono stati correlati ad un incremento del rischio cardiovascolare a lungo termine. Ad oggi, l'OCA è disponibile negli Stati Uniti in compresse con un dosaggio di 5 o 10 mg: generalmente la terapia per chi soffre di CBP inizia con una dose iniziale di 5 mg una volta al giorno; per chi presenta una cirrosi ad uno stadio avanzato, la dose iniziale è di 5 mg una volta a settimana, che può essere aumentata fino ad un massimo di 10 mg due volte a settimana se il farmaco è ben tollerato.<sup>135,145</sup>

#### 4.2.2 AGONISTI DEI RECETTORI ATTIVATI DA PROLIFERATORI PEROSSISOMIALI (PPAR)

I recettori attivati da proliferatori perossisomiali (PPAR) sono dei recettori nucleari che sono stati identificati per la prima volta e clonati nel 1990 e presentano un ruolo chiave nella regolazione della trascrizione dei geni coinvolti nell'infiammazione, nella carcinogenesi e nelle vie metaboliche<sup>146</sup>: per questi motivi sono stati considerati dei target molecolari fondamentali per le malattie colestatiche del fegato, come la CBP.

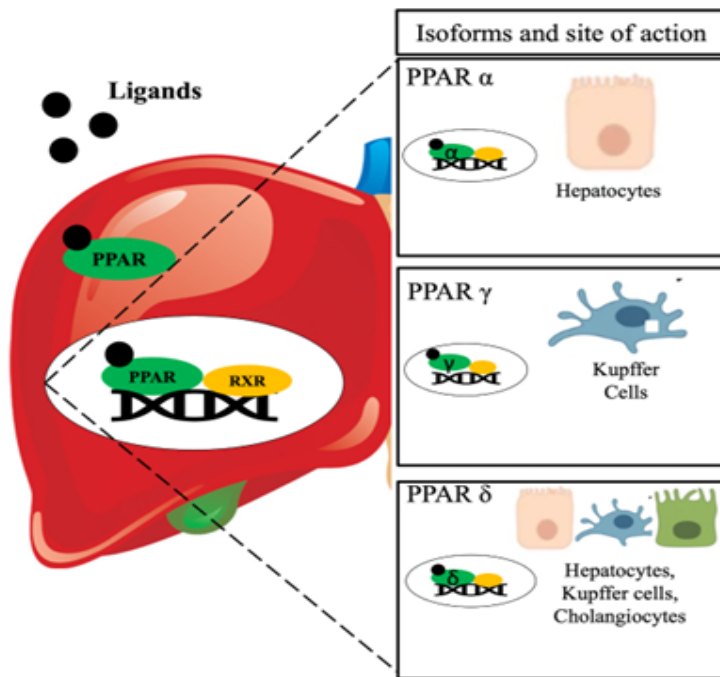


Figura 10: Isoforme e siti d'azione dei PPAR<sup>166</sup>

Un agonista dei PPAR generalmente è costituito da un acido carbossilico in testa, una coda lipofila e un linker. A seguito del legame con i loro ligandi, i PPAR formano un eterodimero con il recettore retinoide X (RXR) ed interagiscono con specifiche sequenze di DNA. Esistono tre isotopi di PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ), ognuno caratterizzato da specifiche distribuzioni tissutali ed azioni.<sup>147</sup> (Figura 10)

PPAR $\alpha$  è espresso soprattutto nei tessuti con un elevato tasso di ossidazione di acidi grassi, tra cui fegato, cuore, rene, tessuto adiposo bruno e muscolo scheletrico. Negli epatociti PPAR $\alpha$  regola la trascrizione dei geni coinvolti nella produzione di glucosio, nella  $\beta$ -ossidazione, nell'omeostasi degli acidi biliari e nel trasporto lipidico.<sup>148</sup> L'attivazione epatica dei PPAR $\alpha$  causa un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi e dell'eliminazione dei trigliceridi dal plasma, portando ad elevati livelli di HDL.<sup>149</sup> Inoltre,



nei modelli murini con aterosclerosi e steatoepatite non alcolica (NASH), questi recettori hanno inibito l'espressione e la durata d'azione delle citochine pro-infiammatorie e delle chemochine, tramite la repressione delle vie di segnale della proteina attivatrice 1 (AP1) e NF- $\kappa$ B,<sup>150</sup> riducendo sia i processi infiammatori acuti che cronici. Infine, i ligandi dei PPAR $\alpha$  modulano il metabolismo degli acidi biliari attraverso quattro vie principali:

1. Inibizione della sintesi degli acidi biliari tramite la down-regulation dell'espressione del CYP7A1 e del CYP27A1;<sup>151</sup>
2. Aumento della secrezione di acidi biliari mediante la up-regulation dell'espressione dei geni BSEP (Bile Salt Export Pump) e MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2);
3. Riduzione della tossicità degli acidi biliari dovuta all'attivazione e all'induzione del gene della proteina di resistenza multifarmaco 3 (MDR3), ABCB4 (ATP binding cassette subfamily 4), che porta ad un maggior inserimento della proteina all'interno della membrana canalicolare degli epatociti;<sup>152</sup>
4. Detossificazione degli acidi biliari grazie ad una up-regulation di CYP3A4, della uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasi (UGT) 2B4, 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, e della sulfotransferasi 2A1 (SULT2A1).<sup>153,154</sup>

Gli agonisti dei PPAR $\alpha$  sembrano essere molto promettenti per il trattamento delle malattie colestatiche del fegato, come la CBP.

PPAR $\gamma$  presenta tre isoforme diverse ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 e  $\gamma$ 3) ognuna delle quali presenta una localizzazione tissutale differente, ma la stessa specificità nel legame con il DNA; l'isoforma  $\gamma$ 1 è ubiquitaria, la  $\gamma$ 3 è espressa nel fegato in quantità molto ridotte, mentre la  $\gamma$ 2 si trova in grandi quantità nel tessuto adiposo dove svolge una serie di funzioni legate all'adipogenesi e al metabolismo del glucosio. Nei macrofagi epatici, i PPAR $\gamma$  esercitano un'attività immunomodulatoria con proprietà antinfiammatorie come i PPAR $\alpha$ , anche se maggiormente limitata alle cellule di Kupffer<sup>148,155</sup> ed interferiscono negativamente con NF- $\kappa$ B, sopprimendo la produzione di TNF- $\alpha$  e dell'interleuchina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Inoltre, l'attivazione negli epatociti dei PPAR $\gamma$  è steatogena e si osserva tipicamente nei soggetti con NASH anche quando non sono obesi.<sup>156</sup>

Infine, abbiamo i PPAR $\beta/\delta$  che sono più ubiquitari e si trovano prevalentemente nel muscolo scheletrico, nel cuore, nel tessuto adiposo e nel fegato, dove sono localizzati negli epatociti, nei colangiociti, nelle cellule epatiche stellate e nelle cellule di Kupffer.<sup>156</sup> L'attivazione di questi recettori nelle cellule di Kupffer porta ad un miglioramento dell'infiammazione e previene la carcinogenesi a livello epatico: hanno anche un effetto antinfiammatorio attraverso la via mediata da BCL6 (B-cell lymphoma 6) e giocano un ruolo importante nella regolazione del trasporto e dell'assorbimento della bile, con un conseguente effetto terapeutico.<sup>157</sup>

I fibrati (Figura 11) sono degli agonisti sintetici dei PPAR che sono stati identificati come molecole che portano ad una riduzione dei lipidi e sono stati autorizzati negli Stati Uniti ed in altri paesi per il trattamento dell'ipertrigliceridemia e dell'ipercolesterolemia. Questa classe di farmaci è stata notata per i suoi effetti protettivi nei confronti della tossicità biliare e ha dimostrato di ridurre i livelli di fosfatasi alcalina.<sup>158</sup> Per questi motivi i fibrati sono stati precedentemente presi in considerazione nel trattamento delle malattie epatiche colestatiche e sono ad oggi suggeriti nei pazienti con una risposta inadeguata all'acido ursodesossicolico, sia nelle linee guida americane che europee per il trattamento della CBP.<sup>51,159</sup> Ciononostante, sono state riportate diverse problematiche riguardanti l'utilizzo dei fibrati nelle patologie colestatiche a causa della loro potenziale epatotossicità.

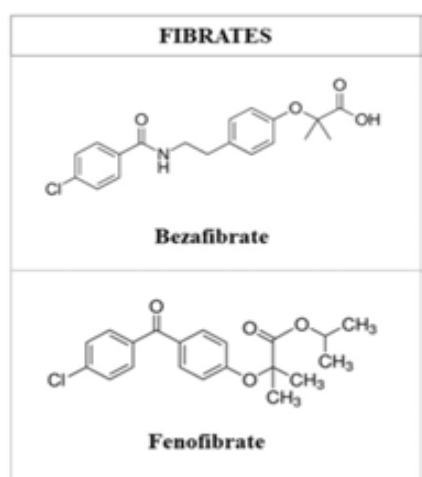


Figura 11: Struttura chimica dei fibrati <sup>166</sup>

Il Bezafibrato (BZF) è stato valutato per la prima volta nel trattamento della colangite biliare primitiva nel 1999 in uno studio condotto da Iwasaki et al.<sup>160</sup> ed è stato introdotto presto come trattamento di seconda linea in Giappone, grazie alla sua efficacia biochimica emersa da diversi studi. Dopo la somministrazione orale di Bezafibrato 400 mg/die in 11 pazienti con CBP pre-cirrotici per 12-21 mesi, gli studiosi osservarono una normalizzazione dei livelli di ALP in tutti i pazienti trattati e una diminuzione significativa delle Immunoglobuline M (IgM) in circa la metà del gruppo.<sup>160</sup> Dei risultati incoraggianti sono arrivati dallo studio BEZURSO (Bezafibrato in combinazione con acido ursodesossicolico nella CBP), uno studio francese di fase III, in doppio cieco, controllato con placebo e randomizzato, in cui 100 pazienti affetti da CBP non-cirrotici con inadeguata risposta all'UDCA sono stati trattati casualmente con BZF 400 mg/die o placebo in associazione ad UDCA per 24 mesi.<sup>161</sup> Il 31% dei pazienti trattati con BZF ha raggiunto l'endpoint primario, ovvero la normalizzazione della ALP, delle aminotransferasi, dell'albumina sierica, della bilirubina totale sierica e un indice di protrombina normale. Allo stesso tempo, i pazienti che presentavano un'ipertensione portale o dei livelli elevati di partenza di ALP, hanno dimostrato una maggior difficoltà nel raggiungere tale obiettivo. Nello studio sono state riportate 424 reazioni avverse, che non differivano in maniera significativa tra i due gruppi, e allo stesso modo non variava molto l'incidenza di complicazioni legate al fegato.<sup>161</sup> Recentemente Soret et al.<sup>162</sup>, hanno pubblicato dei risultati promettenti riguardanti il loro studio retrospettivo multicentrico che ha coinvolto 58 pazienti con risposta inadeguata alle terapie di prima e di seconda linea: in questo studio è stata valutata la combinazione di UDCA, OCA e fibrati rispetto alla terapia doppia con OCA ed UDCA. Metà dei pazienti ha ricevuto OCA come farmaco di seconda linea e i fibrati come terza linea (gruppo OCA-Fibrati), l'altra metà ha ricevuto la sequenza inversa (gruppo Fibrati-OCA), per una durata complessiva di 11 mesi. In entrambi i casi si è osservato non solo una diminuzione maggiore della ALP rispetto al regime doppio, ma anche una diminuzione significativa dei livelli di GGT (gamma glutamiltransferasi), aminotransferasi e bilirubina totale.<sup>162</sup>

Il Fenofibrato, invece, risulta essere dieci volte più specifico per l'isoforma  $\alpha$  rispetto alla  $\gamma$  e, a differenza del Bezafibrato, è attualmente disponibile negli Stati Uniti dove è stato approvato per il trattamento della dislipidemia. Il meccanismo d'azione prevede una

riduzione della tossicità degli acidi biliari primari e secondari nel siero e una up-regulation dell'espressione della MDR3 umana. Diversi studi hanno confermato gli effetti positivi del Fenofibrato associato all'UDCA per il miglioramento dei marcatori biochimici della CBP.<sup>163,164</sup> Lo studio monocentrico retrospettivo di dimensioni maggiori<sup>165</sup> ha coinvolto 120 soggetti affetti da CBP con una risposta inadeguata all'UDCA: 49 di questi hanno ricevuto Fenofibrato per un periodo medio di 11 mesi e 74 hanno proseguito con la monoterapia con UDCA. Questo studio ha evidenziato alcune problematiche: innanzitutto, la risposta biochimica non è stata così significativa prendendo in considerazione diverse tipologie di analisi e poi è stato provato che la bilirubina è aumentata più velocemente nei pazienti trattati con Fenofibrato, confermando che questo farmaco deve essere aggiunto con molta cautela nelle fasi avanzate della malattia epatica.<sup>159</sup> Si ricorda che 7 pazienti (22%) trattati con tale farmaco hanno interrotto la terapia precocemente a causa degli effetti collaterali (dolore addominale, mialgia, emicrania, angioedema e prurito) e uno di loro ha avuto un aumento severo delle aminotransferasi.<sup>165</sup>

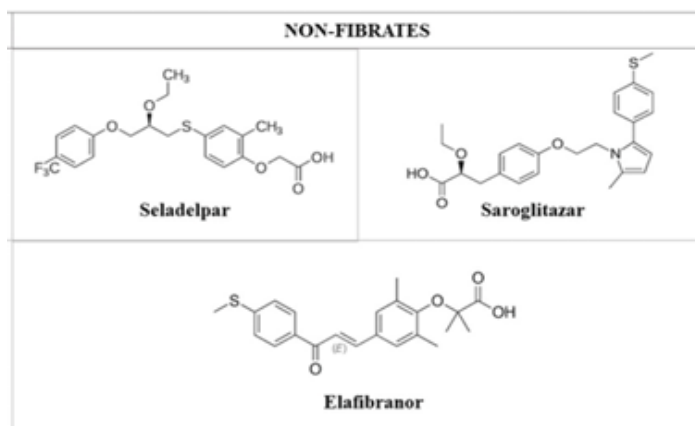


Figura 12: Struttura chimica dei non-fibrati<sup>166</sup>

Oltre ai fibrati, vi sono altri ligandi dei PPAR che sono ad oggi in studio per il trattamento della CBP, ovvero i non-fibrati (Figura 12).

Il Seladelpar è un agonista di PPAR $\delta$  che presenta delle proprietà antinfiammatorie e coleretiche, queste ultime dovute ad un coinvolgimento nella down-regulation della sintesi degli acidi biliari e nella modulazione del loro trasporto e metabolismo. È stato testato per la prima volta in uno studio di fase II che ha coinvolto 70 pazienti con CBP non-rispondenti all'UDCA a cui è stato somministrato casualmente Seladelpar, con un

dosaggio di 50 mg/die o di 200 mg/die, o il placebo.<sup>167</sup> Nonostante tutti i pazienti che hanno terminato le 12 settimane di studio abbiano avuto una normalizzazione dei livelli di ALP, 3 pazienti hanno dovuto interrompere prematuramente il trattamento a causa di un aumento asintomatico delle aminotransferasi. È stato effettuato poi un altro studio di fase II<sup>168</sup> della durata di un anno: 119 pazienti hanno ricevuto una dose giornaliera di 2 mg, 5 mg o 10 mg di Seladelpar, con un possibile aumento della dose fino a 10 mg dopo 12 settimane in base alla risposta biochimica e, dopo 12 mesi, nessun paziente ha mantenuto il dosaggio di 2 mg/die. La riduzione della ALP del 15% e la normalizzazione della bilirubina totale, sono state raggiunte dal 53% dei pazienti che hanno ricevuto un dosaggio di 5/10 mg e dal 69% di quelli che hanno assunto 10 mg di Seladelpar.<sup>168</sup> Quattro pazienti hanno interrotto il trattamento a causa degli effetti collaterali, come aumento delle aminotransferasi e bruciore di stomaco. Dopo un anno di studi questo farmaco ha dimostrato di essere sicuro e ben tollerato e il 98% della coorte è stata arruolata per uno studio in follow-up a lungo termine. Attualmente si stanno svolgendo ulteriori studi clinici per valutare l'effettiva efficacia e sicurezza di Seladelpar.

Elafibranor è un agonista di PPAR $\alpha/\delta$  ed è stato testato inizialmente nei pazienti affetti da NASH<sup>169</sup> e nei modelli murini di NAFLD/NASH (steatosi epatica/steatoepatite non alcolica) con fibrosi epatica; nei roditori tale farmaco ha avuto un effetto protettivo contro la steatosi, infiammazione e fibrosi, attraverso un meccanismo di inibizione dell'espressione dei geni delle citochine proinfiammatorie (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e profibrotiche.<sup>170</sup> A seguito di questi effetti, Elafibranor venne proposto per la valutazione nella CBP ed è attualmente in fase di studio in diversi trial clinici con un dosaggio moderato/elevato (80-120 mg/die) in modo tale da raggiungere i benefici terapeutici. Nel 2021 sono stati pubblicati i risultati di uno studio di fase II<sup>171</sup> che ha coinvolto 45 pazienti non-rispondenti all'UDCA che sono stati trattati casualmente con un dosaggio di Elafibranor di 80 mg o 120 mg o con placebo per 12 settimane. L'obiettivo primario di riduzione dei livelli di ALP è stato raggiunto da entrambi i gruppi trattati con il farmaco, ma nessuno dei pazienti è riuscito a normalizzare tale valore alla fine del trattamento. Lo studio ha riportato anche una diminuzione consistente dei livelli di GGT, IgM e della proteina C reattiva nei gruppi di pazienti trattati con Elafibranor rispetto al placebo. È stata poi valutata la sicurezza del medicinale: non è stata osservata la morte dei pazienti

trattati con 80 mg di Elafibranor o con placebo e non sono stati osservati effetti collaterali gravi, mentre due pazienti trattati con 120 mg di Elafibranor hanno avuto almeno una reazione avversa. Sono stati riportati altri effetti collaterali di media/elevata intensità come emicrania, stanchezza, nausea, diarrea e un aumento reversibile della creatinina nel gruppo che ha ricevuto Elafibranor 120 mg.<sup>171</sup>

Saroglitazar è un nuovo ligando dei PPAR che presenta una doppia attività agonistica: è prevalentemente un attivatore di PPAR $\alpha$ , ma esercita anche un'azione agonista su PPAR $\gamma$ . È stato approvato al di fuori degli Stati Uniti per il trattamento dell'ipertrigliceridemia nei pazienti diabetici non controllati da statine,<sup>172</sup> dislipidemia diabetica e nella NASH. Per il suo meccanismo d'azione, Saroglitazar è attualmente in fase di studio per la CBP. Dei risultati promettenti sono stati riportati in uno studio di fase II in cui 37 pazienti sono stati casualmente trattati con 4 mg/die o 2 mg/die di Saroglitazar o con placebo;<sup>173</sup> il raggiungimento dell'endpoint primario, ovvero la riduzione di ALP dopo 16 settimane di terapia, è stato osservato nei gruppi di pazienti trattati, con una riduzione percentuale del 50% rispetto al 4% del placebo. Sono stati riportati diversi effetti collaterali, tra cui un aumento asintomatico delle aminotransferasi soprattutto nei pazienti che hanno ricevuto il dosaggio più elevato e, tale incremento, non è stato associato ad un conseguente aumento dei marcatori di colestasi.<sup>173</sup>

## **CAPITOLO 5: CORRELAZIONE TRA CELIACHIA E COLANGITE BILIARE PRIMITIVA**

La celiachia è un disturbo cronico autoimmune caratterizzato da una reazione immunitaria dell'organismo a seguito dell'assunzione di glutine negli individui geneticamente predisposti. I sintomi tipici di tale malattia sono anemia, diarrea, stanchezza, perdita di peso e dolore addominale.<sup>174</sup> La celiachia viene considerata da sempre come una diagnosi differenziale per la sindrome da malassorbimento e dell'anemia da deficienza da ferro e, negli ultimi anni, i ricercatori stanno studiando la possibile correlazione tra la celiachia e le malattie epatiche.<sup>175</sup>

La diagnosi sierologica di celiachia è basata sulla presenza di diversi anticorpi, tra cui gli anticorpi antigliadina (AGA), immunoglobulina A (IgA) e immunoglobulina G (IgG), gli anticorpi anti-endomisio (anti-EmA), gli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (anti-tTG) e gli anticorpi antigliadina deaminata (anti-DPG). Gli anticorpi AGA non vengono più raccomandati per la diagnosi nella popolazione adulta a causa dei suoi bassi livelli di sensibilità e specificità.<sup>176,177</sup>

Il primo caso di celiachia nei pazienti con colangite biliare primitiva è stato pubblicato nel 1978<sup>178</sup>: quattro pazienti hanno presentato sintomi caratteristici della celiachia e un miglioramento clinico seguendo una dieta priva di glutine. Da questo momento in poi sono stati riportati diversi casi di co-presenza delle due malattie<sup>179</sup> e anche la manifestazione di altri disordini associati con esse, tra cui una deficienza sierica di IgA, sindrome di Sjögren o infezione da *Helicobacter pylori*.

Nel 1998, Kingham e Parker hanno studiato la prevalenza relativa della celiachia e della colangite biliare primitiva nel Regno Unito<sup>180</sup>: uno studio della durata di 12 anni su una popolazione stabile di 250.000 individui ha rilevato una prevalenza relativa di CBP nel 3% di 143 pazienti celiaci e una prevalenza relativa di celiachia nel 6% di 67 pazienti con CBP.<sup>180</sup> In Irlanda, Dickey et al.<sup>181</sup>, hanno evidenziato che la prevalenza di celiachia nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva era almeno 10 volte maggiore rispetto alla popolazione generale. Sorensen et al.<sup>182</sup>, hanno riportato un elevato rischio di sviluppare la CBP nelle persone celiache; tale rischio è risultato simile in due valutazioni indipendenti che hanno avuto luogo in due ospedali differenti: è stato trovato un tasso di incidenza del 27,6 in Danimarca e del 25,1 in Svezia. Dei risultati diversi, invece, sono

stati pubblicati in Svezia<sup>183</sup>, Italia<sup>184,185</sup> e Grecia<sup>186</sup>, dove i ricercatori hanno fallito nel dimostrare una maggior predisposizione a sviluppare la celiachia nei pazienti con CBP.

Secondo uno studio<sup>187,188</sup>, il 26,7% delle persone affette da colangite biliare primitiva ha manifestato positività alla tTG a seguito dei test ELISA, ma una vera associazione tra CBP e celiachia è stata dimostrata solamente nel 2% dei pazienti che ha riportato una positività agli EmA e ha mostrato dei segni istologici indicativi della celiachia. Floreani et al.<sup>188</sup> hanno scoperto un'elevata prevalenza di falsi positivi e hanno suggerito che questi risultati potevano essere attribuiti al tipo di substrato utilizzato per l'analisi degli anticorpi anti-tTG: i pazienti che presentano una positività a questa indagine dovranno poi essere confermati con il test EmA.<sup>187,188</sup>

Abenavoli et al.<sup>189</sup> hanno riportato un caso di associazione tra celiachia, colangite biliare primitiva ed infezione da H. pylori in cui un breve periodo di dieta gluten-free associata ad una terapia di eradicazione dell'infezione e un trattamento con acido ursodesossicolico ha portato ad un miglioramento istologico e sierologico della CBP. In aggiunta un ulteriore studio<sup>190</sup> ha dimostrato dei miglioramenti biochimici seguendo una terapia con acido ursodesossicolico e una dieta priva di glutine: è importante evidenziare il fatto che i miglioramenti a livello epatico sono principalmente dovuti al trattamento farmaceutico e non alla dieta. È stato dimostrato, inoltre, che i pazienti che presentano questi due disturbi condividono diverse condizioni cliniche come perdita di peso, malassorbimento, steatorrea, malattia delle ossa e livelli elevati della fosfatasi alcalina.<sup>178,179,191</sup>

Nonostante non sia stata dimostrata un'effettiva connessione tra la colangite biliare primitiva e la celiachia, lo screening per rilevare quest'ultima nei pazienti con CBP è fortemente consigliato, in quanto una dieta gluten-free potrebbe prevenire lo sviluppo di altre malattie autoimmuni ed intestinali.<sup>192,193</sup>



## CAPITOLO 6: STUDI CLINICI

Nel corso degli ultimi anni si stanno sviluppando numerosi studi volti ad approfondire la sicurezza e l'efficacia dei farmaci utilizzati nel trattamento della colangite biliare primitiva, soprattutto nei pazienti intolleranti alla terapia di prima linea con l'acido ursodesossicolico. Nella tabella sottostante (Tabella 1) sono stati selezionati degli studi attualmente in fase di reclutamento che hanno il compito di analizzare alcuni aspetti dei trattamenti di seconda linea approvati per la CBP, in particolare appartenenti alla classe dei fibrati e dei non fibrati.

ID DELLO STUDIO CLINICO	STATO DELLO STUDIO	TIPO DI STUDIO	TRATTAMENTO	DATA INIZIO	DATA FINE (PRESUNTA)
<b>NCT06447168</b>	Reclutamento	Osservazionale	Elafibranor	<i>Stimata il</i> 30/11/2024	2029
<b>NCT06383403</b>	Reclutamento	Interventistico, fase III	Elafibranor	09/07/2024	2026
<b>NCT06247735</b>	Reclutamento	Interventistico, fase II	Pemafibrato	07/02/2024	2026
<b>NCT06174402</b>	Reclutamento	Interventistico, fase II e fase III	Fenofibrato	21/08/2023	2025
<b>NCT06051617</b>	Reclutamento	Interventistico, fase III	Seladelpar	07/09/2023	2029
<b>NCT05050136</b>	Reclutamento	Interventistico, fase II	Volixibat	22/09/2021	2025

Tabella 1: Schema riassuntivo degli studi clinici (informazioni tratte da [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov))

- Lo studio **NCT06447168**, che si svolgerà negli Stati Uniti, si pone come obiettivo principale quello di osservare l'efficacia, sicurezza e tollerabilità del farmaco Elafibranor (80 mg/die) nei pazienti con colangite biliare primitiva che stanno ricevendo tale trattamento nel real world setting. Lo studio è di tipo prospettico, non interventistico, di fase IV e multicentrico e si stima un arruolamento di 424 persone; inizierà presumibilmente il 30 novembre 2024 e terminerà il 15 luglio 2029 (data stimata).

- Lo studio **NCT06383403**, con sede negli Stati Uniti, è suddiviso in tre periodi: una fase di screening (fino ad 8 settimane) per verificare se i pazienti possono partecipare allo studio; un periodo di trattamento (fino a 52 settimane) in cui gli individui selezionati verranno suddivisi in base ai loro livelli di fosfatasi alcalina e trattati con il farmaco Elafibranor o con il placebo; una fase di follow-up, di 4 settimane, in cui verrà monitorata la salute dei pazienti. Lo studio clinico è iniziato il 9 luglio 2024 e terminerà verso la fine del 2026; si stima che verranno reclutate 72 persone con diagnosi positiva di CBP ed intolleranza alla terapia con acido ursodesossicolico.
- Lo studio **NCT06247735** è uno studio di fase II randomizzato, controllato con placebo, in cui viene valutata l'efficacia e la sicurezza di due dosi di Pemafibrato (K-808) nei pazienti con risposta inadeguata alla terapia con acido ursodesossicolico e/o obeticolico. Questo clinical trial si svolge negli Stati Uniti e verranno arruolate circa 45 persone; ha avuto inizio il 7 febbraio 2024 e verrà completato l'8 aprile del 2026 (data stimata).
- L'obiettivo principale dello studio cinese **NCT06174402** è quello di valutare l'effetto del Fenofibrato, in combinazione con l'acido ursodesossicolico, sui livelli sierici di fosfatasi alcalina nei pazienti con CBP. Si stima che verranno arruolate 184 persone e che lo studio terminerà presumibilmente il 31 dicembre 2025.
- Lo studio statunitense **NCT06051617** si occupa di valutare gli effetti di Seladelpar sui risultati clinici dei pazienti affetti da colangite biliare primitiva con cirrosi compensata. È uno studio di tipo interventistico di fase III, controllato con placebo, che stima di reclutare 192 pazienti e che ha avuto inizio nel settembre 2023 (terminerà teoricamente nel luglio 2029).
- Lo scopo dello studio clinico **NCT05050136**, che ha avuto inizio il 22 settembre 2021, è quello di approfondire le conoscenze mediche riguardanti l'utilizzo del farmaco Volixibat nel trattamento del prurito colestatico nei pazienti con colangite biliare primitiva e di valutare il possibile impatto di tale terapia sulla progressione della malattia. Questo studio stima di arruolare 180 pazienti e di terminare le sperimentazioni nel dicembre del 2025.

## **CONCLUSIONI**

Come illustrato precedentemente, la colangite biliare primitiva è una malattia autoimmune rara la cui causa è ancora oggi sconosciuta: per questo motivo si stanno ancora approfondendo gli aspetti legati alla sua patogenesi e alla sua possibile evoluzione nel corso degli anni.

Ad oggi la terapia di prima linea prevista rimane quella con l'acido ursodesossicolico, grazie alla sua efficacia e tollerabilità, nonché ai suoi ridotti effetti collaterali. È stato dimostrato, infatti, che tale medicinale porta ad una riduzione di alcuni valori plasmatici coinvolti nello sviluppo della patologia, ma allo stesso tempo non blocca la progressione istologica di essa.

Negli individui intolleranti o non rispondenti all'UDCA, generalmente, viene somministrato l'acido obeticolico: questo farmaco attualmente non è stato approvato in Europa ed è disponibile negli Stati Uniti dove viene utilizzato con cautela a causa dei possibili effetti collaterali.

I clinical trial attualmente in corso si stanno concentrando, invece, sull'approfondimento della sicurezza e dell'efficacia dei farmaci appartenenti alla classe degli agonisti dei recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (PPAR), per poter valutare un loro utilizzo come trattamento di seconda linea nei soggetti intolleranti all'UDCA.



## BIBLIOGRAFIA

1. Tsuneyama, K., Baba, H., Morimoto, Y., Tsunematsu, T. & Ogawa, H. Primary biliary cholangitis: Its pathological characteristics and immunopathological mechanisms. *Journal of Medical Investigation* vol. 64 Preprint at <https://doi.org/10.2152/jmi.64.7> (2017).
2. Galoosian, A., Hanlon, C., Zhang, J., Holt, E. W. & Yimam, K. K. Clinical updates in primary biliary cholangitis: Trends, epidemiology, diagnostics, and new therapeutic approaches. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.14218/JCTH.2019.00049> (2020).
3. Matli, V. V. K., Dies, D. F., Pandit, S., Wellman, G. & Morris, J. D. Distinction between Mitochondrial Antibody-Positive and -Negative Primary Biliary Cholangitis. *Case Rep Gastroenterol* **17**, (2023).
4. Younossi, Z. M. *et al.* Diagnosis and Management of Primary Biliary Cholangitis. *American Journal of Gastroenterology* vol. 114 48–63 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0390-3> (2019).
5. Carey, E. J., Ali, A. H. & Lindor, K. D. Primary biliary cirrhosis. *The Lancet* vol. 386 1565–1575 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00154-3) (2015).
6. Bowlus, C. L. & Gershwin, M. E. The diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity Reviews* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.041> (2014).
7. Lanzini, A. *et al.* Intestinal absorption of the bile acid analogue 75Se-homocholeic acid-*taurine* is increased in primary biliary cirrhosis, and reverts to normal during ursodeoxycholic acid administration. *Gut* **52**, (2003).
8. Alemi, F. *et al.* The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. *Journal of Clinical Investigation* **123**, (2013).
9. Lieu, T. *et al.* The bile acid receptor TGR5 activates the *trpa1* channel to induce itch in mice. *Gastroenterology* **147**, (2014).
10. Rische, E., Azarm, A. & Bergasa, N. V. Itch in primary biliary cirrhosis: A patients' perspective. *Acta Derm Venereol* **88**, (2008).
11. Trivedi, H. D., Lizaola, B., Tapper, E. B. & Bonder, A. Management of Pruritus in Primary Biliary Cholangitis: A Narrative Review. *American Journal of Medicine* vol. 130 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.01.037> (2017).
12. Lindor, K. D. *et al.* Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* vol. 50 Preprint at <https://doi.org/10.1002/hep.22906> (2009).
13. Selmi, C. *et al.* Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: Genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* **127**, (2004).
14. Jones, D. E. J. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* vol. 39 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00270-8) (2003).
15. Joshita, S., Umemura, T., Tanaka, E. & Ota, M. Genetics and epigenetics in the pathogenesis of primary biliary cholangitis. *Clinical Journal of Gastroenterology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0799-z> (2018).

16. Sarcognato, S. *et al.* Autoimmune biliary diseases: Primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis. *Pathologica* vol. 113 Preprint at <https://doi.org/10.32074/1591-951X-245> (2021).
17. Umemura, T. & Ota, M. Genetic factors affect the etiology, clinical characteristics and outcome of autoimmune hepatitis. *Clinical Journal of Gastroenterology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12328-015-0620-9> (2015).
18. Invernizzi, P. *et al.* Human leukocyte antigen polymorphisms in Italian primary biliary cirrhosis: A multicenter study of 664 patients and 1992 healthy controls. *Hepatology* **48**, (2008).
19. Donaldson, P. T. *et al.* HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: A large-scale study. *Hepatology* **44**, (2006).
20. Webb, G. J., Siminovitch, K. A. & Hirschfield, G. M. The immunogenetics of primary biliary cirrhosis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* vol. 64 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.004> (2015).
21. Invernizzi, P. *et al.* Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis. *Lancet* **363**, (2004).
22. Invernizzi, P. *et al.* X Chromosome Monosomy: A Common Mechanism for Autoimmune Diseases. *The Journal of Immunology* **175**, (2005).
23. Lleo, A. *et al.* Y chromosome loss in male patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* **41**, (2013).
24. Lleo, A. *et al.* Immunoglobulin M levels inversely correlate with CD40 ligand promoter methylation in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **55**, (2012).
25. Salas, J. T. *et al.* Ae2a,b-Deficient Mice Develop Antimitochondrial Antibodies and Other Features Resembling Primary Biliary Cirrhosis. *Gastroenterology* **134**, (2008).
26. Banales, J. M. *et al.* Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **56**, (2012).
27. Padgett, K. A. *et al.* Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression. *J Autoimmun* **32**, (2009).
28. Gershwin, M. E. *et al.* Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: A controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* **42**, (2005).
29. Gershwin, M. E. *et al.* Primary biliary cirrhosis: An orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunological Reviews* vol. 174 Preprint at <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2002.017402.x> (2000).
30. Nakanuma, Y. & Ohta, G. Histometric and serial section observations of the intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **76**, (1979).
31. Harada, K., Isse, K. & Nakanuma, Y. Interferon  $\gamma$  accelerates NF- $\kappa$ B activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligand interaction. *J Clin Pathol* **59**, (2006).

32. Yamada, G. *et al.* Ultrastructural immunocytochemical analysis of lymphocytes infiltrating bile duct epithelia in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **6**, (1986).
33. Harada, K., Ozaki, S., Gershwin, M. E. & Nakanuma, Y. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **26**, (1997).
34. Yang, C. Y. *et al.* IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: Implications for therapy. *Hepatology* **59**, (2014).
35. Tsuneyama, K. *et al.* Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology* **21**, (1995).
36. Wang, J. J. *et al.* Escherichia coli infection induces autoimmune cholangitis and anti-mitochondrial antibodies in non-obese diabetic (NOD).B6 (Idd10/Idd18) mice. *Clin Exp Immunol* **175**, (2014).
37. Amano, K. *et al.* Chemical Xenobiotics and Mitochondrial Autoantigens in Primary Biliary Cirrhosis: Identification of Antibodies against a Common Environmental, Cosmetic, and Food Additive, 2-Octynoic Acid. *The Journal of Immunology* **174**, (2005).
38. Ishibashi, H. & Shimoda, S. Pathogenesis of biliary tract injury in primary biliary cirrhosis. *Japanese Journal of Clinical Immunology* **35**, (2012).
39. Shimoda, S. *et al.* Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **53**, (2011).
40. Chalifoux, S. L., Konyn, P. G., Choi, G. & Saab, S. Extrahepatic manifestations of primary biliary cholangitis. *Gut and Liver* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.5009/gnl16365> (2017).
41. Lu, M. *et al.* Increasing Prevalence of Primary Biliary Cholangitis and Reduced Mortality With Treatment. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **16**, (2018).
42. Trivedi, P. J. & Hirschfield, G. M. Recent advances in clinical practice: Epidemiology of autoimmune liver diseases. *Gut* vol. 70 Preprint at <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322362> (2021).
43. Lv, T. *et al.* Regional variation and temporal trend of primary biliary cholangitis epidemiology: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* **36**, (2021).
44. Trivella, J., John, B. V. & Levy, C. Primary biliary cholangitis: Epidemiology, prognosis, and treatment. *Hepatology Communications* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1097/HC9.000000000000179> (2023).
45. Marzioni, M., Bassanelli, C., Ripellino, C., Urbinati, D. & Alvaro, D. Epidemiology of primary biliary cholangitis in Italy: Evidence from a real-world database. *Digestive and Liver Disease* **51**, (2019).
46. Prince, M., Chetwynd, A., Newman, W., Metcalf, J. V. & James, O. F. W. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: Follow-up for up to 28 years. *Gastroenterology* **123**, (2002).

47. Kumagi, T. & Al-Harthy, N. Natural history and management of primary biliary cirrhosis. *Hepat Med* (2012) doi:10.2147/hmer.s25998.
48. Poupon, R. Primary biliary cirrhosis: A 2010 update. *Journal of Hepatology* vol. 52 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.027> (2010).
49. Trivedi, P. J. & Hirschfield, G. M. Review article: Overlap syndromes and autoimmune liver disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* vol. 36 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05223.x> (2012).
50. Dahlqvist, G. *et al.* Large-scale characterization study of patients with antimitochondrial antibodies but nonestablished primary biliary cholangitis. *Hepatology* **65**, (2017).
51. Hirschfield, G. M. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* **67**, (2017).
52. Laschtowitz, A., de Veer, R. C., Van der Meer, A. J. & Schramm, C. Diagnosis and treatment of primary biliary cholangitis. *United European Gastroenterology Journal* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1177/2050640620919585> (2020).
53. Lindor, K. D., Bowlus, C. L., Boyer, J., Levy, C. & Mayo, M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **69**, (2019).
54. Lammers, W. J. *et al.* Development and Validation of a Scoring System to Predict Outcomes of Patients with Primary Biliary Cirrhosis Receiving Ursodeoxycholic Acid Therapy. *Gastroenterology* **149**, (2015).
55. Trivedi, P. J. *et al.* Optimising risk stratification in primary biliary cirrhosis: AST/platelet ratio index predicts outcome independent of ursodeoxycholic acid response. *J Hepatol* **60**, (2014).
56. Trivedi, P. J. & Hirschfield, G. M. Primary biliary cirrhosis: Renaming primary biliary cirrhosis - Clarity or confusion? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.187> (2015).
57. Boyer, T. D., Kokenes, D. D., Hertzler, G., Kutner, M. H. & Michael Henderson, J. Effect of distal splenorenal shunt on survival of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **20**, (1994).
58. Thornton, J. R., Triger, D. R. & Losowsky, M. S. Variceal bleeding is associated with reduced risk of severe cholestasis in primary biliary cirrhosis. *QJM* **71**, (1989).
59. Cavazza, A. *et al.* Incidence, risk factors, and survival of hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: Comparative analysis from two centers. *Hepatology* **50**, (2009).
60. Harada, K. *et al.* Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. *Hepatology* **57**, (2013).
61. Trivedi, P. J. *et al.* Stratification of hepatocellular carcinoma risk in primary biliary cirrhosis: A multicentre international study. *Gut* **65**, (2016).
62. Llovet, J. M. *et al.* EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **56**, (2012).



63. Shapiro, J. M., Smith, H. & Schaffner, F. Serum bilirubin: A prognostic factor in primary biliary cirrhosis. *Gut* **20**, (1979).
64. Martin, P., Dimartini, A., Feng, S., Brown, R. & Fallon, M. Evaluation for liver transplantation in adults: 2013 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Hepatology* **59**, (2014).
65. Burra, P. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *J Hepatol* **64**, (2016).
66. Carbone, M. *et al.* The effect of liver transplantation on fatigue in patients with primary biliary cirrhosis: A prospective study. *J Hepatol* **59**, (2013).
67. Pells, G. *et al.* The impact of liver transplantation on the phenotype of primary biliary cirrhosis patients in the UK-PBC cohort. *J Hepatol* **59**, (2013).
68. Lucey, M. R. *et al.* Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Liver Transplantation* **19**, (2013).
69. Carbone, M. & Neuberger, J. M. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation. *Journal of Hepatology* vol. 60 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.020> (2014).
70. Silveira, M. G., Talwalkar, J. A., Lindor, K. D. & Wiesner, R. H. Recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *American Journal of Transplantation* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03038.x> (2010).
71. Bosch, A. *et al.* Preventive administration of UDCA after liver transplantation for primary biliary cirrhosis is associated with a lower risk of disease recurrence. *J Hepatol* **63**, (2015).
72. Menon, K. V. N., Angulo, P., Weston, S., Dickson, E. R. & Lindor, K. D. Bone disease in primary biliary cirrhosis: Independent indicators and rate of progression. *J Hepatol* **35**, (2001).
73. Guañabens, N. *et al.* Severity of cholestasis and advanced histological stage but not menopausal status are the major risk factors for osteoporosis in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* **42**, (2005).
74. Guañabens, N. *et al.* Low Bone Mass and Severity of Cholestasis Affect Fracture Risk in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Gastroenterology* **138**, (2010).
75. Guañabens, N. *et al.* Randomized trial comparing monthly ibandronate and weekly alendronate for osteoporosis in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **58**, (2013).
76. Jorgensen, R. A., Lindor, K. D., Sartin, J. S., LaRusso, N. F. & Wiesner, R. H. Serum lipid and fat-soluble vitamin levels in primary sclerosing cholangitis. *J Clin Gastroenterol* **20**, (1995).

77. Fernández, A., Sorokin, A. & Thompson, P. D. Corneal arcus as coronary artery disease risk factor. *Atherosclerosis* vol. 193 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.060> (2007).
78. Jahn, C. E. *et al.* Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis. Association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification. *Gastroenterology* **89**, (1985).
79. Kew, M. C., Varma, R. R., Dos Santos, H. A., Scheuer, P. J. & Sherlock, S. Portal hypertension in primary biliary cirrhosis. *Gut* **12**, (1971).
80. Gores, G. J. *et al.* Prospective evaluation of esophageal varices in primary biliary cirrhosis: Development, natural history, and influence on survival. *Gastroenterology* **96**, (1989).
81. Abraham, S. C., Kamath, P. S., Eghtesad, B., Demetris, A. J. & Krasinskas, A. M. Liver transplantation in precirrhotic biliary tract disease: Portal hypertension is frequently associated with nodular regenerative hyperplasia and obliterative portal venopathy. *American Journal of Surgical Pathology* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213286.65907.ea> (2006).
82. De Franchis, R. *et al.* Expanding consensus in portal hypertension Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *Journal of Hepatology* Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.001> (2015).
83. Hagey, L. R. *et al.* Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: Biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res* **34**, (1993).
84. Hofmann, A. F. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand J Gastroenterol* **29**, (1994).
85. Nie, B. *et al.* Specific bile acids inhibit hepatic fatty acid uptake in mice. *Hepatology* **56**, (2012).
86. Perez, M. J. & Britz, O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* **15**, (2009).
87. Bachrach, W. H. & Hofmann, A. F. Ursodeoxycholic acid in the treatment of cholesterol cholelithiasis - Part I. *Digestive Diseases and Sciences* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.1007/BF01393771> (1982).
88. Leuschner, U., Leuschner, M., Sieratzki, J., Kurtz, W. & Hübner, K. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up - A pilot study. *Dig Dis Sci* **30**, (1985).
89. Gong, Y., Zhi, B. H., Christensen, E. & Glud, C. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* Preprint at <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000551.pub2> (2008).
90. Ramalho, R. M., Viana, R. J. S., Low, W. C., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. Bile acids and apoptosis modulation: an emerging role in experimental Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* **14**, (2008).

91. Goulis, J., Leandro, G. & Burroughs, A. K. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Lancet* **354**, (1999).
92. Parés, A. *et al.* Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: Results of a double-blind controlled multicentric trial. *J Hepatol* **32**, (2000).
93. Shi, J. *et al.* Long-term effects of mid-dose ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Gastroenterology* **101**, (2006).
94. Balasubramaniam, K., Grambsch, P. M., Wiesner, R. H., Lindor, K. D. & Dickson, E. R. Diminished survival in asymptomatic primary biliary cirrhosis. A prospective study. *Gastroenterology* **98**, (1990).
95. Mahl, T. C., Shockcor, W. & Boyer, J. L. Primary biliary cirrhosis: survival of a large cohort of symptomatic and asymptomatic patients followed for 24 years. *J Hepatol* **20**, (1994).
96. Dickson, E. R. *et al.* Trial of Penicillamine in Advanced Primary Biliary Cirrhosis. *New England Journal of Medicine* **312**, (1985).
97. Reichen, J. Review: Ursodeoxycholic acid does not reduce risk for mortality or liver transplantation in primary biliary cirrhosis. *ACP J Club* **148**, (2008).
98. Kuiper, E. M. M. *et al.* Relatively high risk for hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis not responding to ursodeoxycholic acid. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **22**, (2010).
99. Lindor, K. D. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. *N Engl J Med* **336**, (1997).
100. Van Hoogstraten, H. J. F. *et al.* Ursodeoxycholic acid therapy for primary sclerosing cholangitis: Results of a 2-year randomized controlled trial to evaluate single versus multiple daily doses. *J Hepatol* **29**, (1998).
101. Lindor, K. D. *et al.* High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **50**, (2009).
102. Schiedermaier, P., Hansen, S., Asdonk, D., Brensing, K. A. & Sauerbruch, T. Effects of ursodeoxycholic acid on splanchnic and systemic hemodynamics. A double-blind, cross-over, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Digestion* **61**, (2000).
103. Fedorowski, T., Salen, G., Tint, G. S. & Mosbach, E. Transformation of Chenodeoxycholic Acid and Ursodeoxycholic Acid by Human Intestinal Bacteria. *Gastroenterology* **77**, (1979).
104. Bazzoli, F., Fromm, H., Sarva, R. P., Sembrat, R. F. & Ceryak, S. Comparative Formation of Lithocholic Acid From Chenodeoxycholic and Ursodeoxycholic Acids in the Colon. *Gastroenterology* **83**, (1982).
105. Thistle, J. L. *et al.* Differing effects of ursodeoxycholic or chenodeoxycholic acid on biliary cholesterol saturation and bile acid metabolism in man - A dose-response study. *Dig Dis Sci* **27**, (1982).

106. Angulo, P. Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. *Current gastroenterology reports* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11894-002-0036-9> (2002).
107. Powell, A. A. *et al.* Resistance to ursodeoxycholic acid-induced growth arrest can also result in resistance to deoxycholic acid-induced apoptosis and increased tumorigenicity. *BMC Cancer* **6**, (2006).
108. Solá, S., Aranha, M. M., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. Game and players: Mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.21775/cimb.009.123> (2007).
109. Guyot, C., Combe, C., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. & Desmoulière, A. Fibrogenic cell fate during fibrotic tissue remodelling observed in rat and human cultured liver slices. *J Hepatol* **46**, (2007).
110. Brenner, D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* vol. 120 Preprint at (2009).
111. Castro, R. E. *et al.* Differential regulation of cyclin D1 and cell death by bile acids in primary rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, (2007).
112. Sola, S. *et al.* Ursodeoxycholic acid modulates E2F-1 and p53 expression through a caspase-independent mechanism in transforming growth factor beta1-induced apoptosis of rat hepatocytes. *J Biol Chem* **278**, (2003).
113. Im, E. & Martinez, J. D. Ursodeoxycholic Acid (UDCA) Can Inhibit Deoxycholic Acid (DCA)-induced Apoptosis via Modulation of EGFR/Raf-1/ERK Signaling in Human Colon Cancer Cells. in *Journal of Nutrition* vol. 134 (2004).
114. Rodrigues, C. M. P., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T. & Steer, C. J. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *Journal of Clinical Investigation* **101**, (1998).
115. Fickert, P. *et al.* Cytokeratins as targets for bile acid-induced toxicity. *American Journal of Pathology* **160**, (2002).
116. Abate, N. *et al.* Effect of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid administration on acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity in human liver. *Italian Journal of Gastroenterology* **26**, (1994).
117. Bouscarel, B., Gettys, T. W., Fromm, H. & Dubner, H. Ursodeoxycholic acid inhibits glucagon-induced cAMP formation in hamster hepatocytes: A role for PKC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **268**, (1995).
118. Peterson, T. C., Slys, G. & Isbrucker, R. The inhibitory effect of ursodeoxycholic acid and pentoxifylline on platelet derived growth factor-stimulated proliferation is distinct from an effect by cyclic AMP. *Immunopharmacology* **39**, (1998).
119. Amaral, J. D., Castro, R. E., Solá, S., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. p53 is a key molecular target of ursodeoxycholic acid in regulating apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **282**, (2007).

120. D. Amaral, J., M. Xavier, J., J. Steer, C. & M.P. Rodrigues, C. Targeting the p53 Pathway of Apoptosis. *Curr Pharm Des* **16**, (2010).
121. Albenzi, B. C. & Mattson, M. P. Evidence for the involvement of TNF and NF- $\kappa$ B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* **35**, (2000).
122. Andersson, Y., Juell, S. & Fodstad,  $\emptyset$ . Downregulation of the antiapoptotic Mcl-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin a immunotoxin. *Int J Cancer* **112**, (2004).
123. Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Holy, J. M. & Wallace, K. B. Role of mitochondrial dysfunction in combined bile acid-induced cytotoxicity: The switch between apoptosis and necrosis. *Toxicological Sciences* **79**, (2004).
124. Joo, S. S., Kang, H. C., Won, T. J. & Lee, D. I. Ursodeoxycholic acid inhibits pro-inflammatory repertoires, IL-1 $\beta$  and nitric oxide in rat microglia. *Arch Pharm Res* **26**, (2003).
125. Seong, S. J., Tae, J. W. & Do, I. L. Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). *Arch Pharm Res* **27**, (2004).
126. Streit, W. J. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* **29**, (2006).
127. Ritter, M. R. *et al.* Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *Journal of Clinical Investigation* **116**, (2006).
128. Fimognari, C., Nüsse, M., Cesari, R., Cantelli-Forti, G. & Hrelia, P. Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **495**, (2001).
129. Tsagarakis, N. J., Drygiannakis, I., Batistakis, A. G., Kolios, G. & Kouroumalis, E. A. A concentration-dependent effect of ursodeoxycholate on apoptosis and caspases activities of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* **640**, (2010).
130. Irifune, H., Tsukazaki, N., Watanabe, M. & Nonaka, S. The influence of ursodesoxycholic acid (URSO) on griseofulvin (GF)-induced protoporphyria. *Nippon Hifuka Gakkai zasshi. The Japanese journal of dermatology* **101**, (1991).
131. Kotb, M. A. Ursodeoxycholic acid in neonatal hepatitis and infantile paucity of intrahepatic bile ducts: Review of a historical cohort. *Dig Dis Sci* **54**, (2009).
132. Selmi, C., Bowlus, C. L., Gershwin, E. & Coppel, R. L. Seminar Primary biliary cirrhosis. *www.thelancet.com* **377**, (2011).
133. Carbone, M. *et al.* Sex and age are determinants of the clinical phenotype of primary biliary cirrhosis and response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* **144**, (2013).
134. Cheung, A. C. *et al.* Effects of Age and Sex of Response to Ursodeoxycholic Acid and Transplant-free Survival in Patients With Primary Biliary Cholangitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **17**, (2019).

135. Floreani, A., Gabbia, D. & De Martin, S. Obeticholic Acid for Primary Biliary Cholangitis. *Biomedicines* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102464> (2022).
136. Beuers, U., Trauner, M., Jansen, P. & Poupon, R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: From UDCA to FXR, PXR and beyond. *Journal of Hepatology* vol. 62 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.023> (2015).
137. Pellicciari, R. *et al.* Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure - Activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *J Med Chem* **47**, (2004).
138. Chiang, J. Y. L. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Research* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.05.001> (2017).
139. Gabbia, D., Cannella, L. & Martin, S. De. The role of oxidative stress in nafld–nash–hcc transition—focus on nadph oxidases. *Biomedicines* **9**, (2021).
140. Modica, S. *et al.* Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology* **142**, (2012).
141. Chapman, R. W. & Lynch, K. D. Obeticholic acid - A new therapy in PBC and NASH. *British Medical Bulletin* vol. 133 Preprint at <https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa006> (2020).
142. Kowdley, K. V. *et al.* A randomized trial of obeticholic acid monotherapy in patients with primary biliary cholangitis. *Hepatology* **67**, (2018).
143. Nevens, F. *et al.* A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *New England Journal of Medicine* **375**, (2016).
144. Trauner, M. *et al.* Long-term efficacy and safety of obeticholic acid for patients with primary biliary cholangitis: 3-year results of an international open-label extension study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **4**, (2019).
145. Parés, A. *et al.* Reduction and stabilization of bilirubin with obeticholic acid treatment in patients with primary biliary cholangitis. *Liver International* **40**, (2020).
146. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, (1990).
147. Dubois, V., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P. & Staels, B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* vol. 127 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI88894> (2017).
148. Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* vol. 62 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039> (2015).
149. Hsueh, W. A. & Law, R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *The American journal of cardiology* vol. 92 Preprint at [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(03\)00610-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(03)00610-6) (2003).

150. Wagner, M., Zollner, G. & Trauner, M. Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology* vol. 53 Preprint at <https://doi.org/10.1002/hep.24148> (2011).
151. Post, S. M. *et al.* Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ -mediated downregulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, (2001).
152. Ghonem, N. S., Assis, D. N. & Boyer, J. L. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* **62**, (2015).
153. Honda, A. *et al.* Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. *Hepatology* **57**, (2013).
154. Li, F., Patterson, A. D., Krausz, K. W., Tanaka, N. & Gonzalez, F. J. Metabolomics reveals an essential role for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in bile acid homeostasis. *J Lipid Res* **53**, (2012).
155. Harada, K., Isse, K., Kamihira, T., Shimoda, S. & Nakanuma, Y. Th1 cytokine-induced downregulation of PPAR $\gamma$  in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **41**, (2005).
156. Wang, Y., Nakajima, T., Gonzalez, F. J. & Tanaka, N. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-null mice. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21062061> (2020).
157. Lee, C. H. *et al.* Transcriptional Repression of Atherogenic Inflammation: Modulation by PPAR $\delta$ . *Science (1979)* **302**, (2003).
158. Effect of Clofibrate on Plasma Levels of Alkaline Phosphatase. *New England Journal of Medicine* **297**, (1977).
159. Lindor, K. D., Bowlus, C. L., Boyer, J., Levy, C. & Mayo, M. Primary biliary cholangitis: 2021 practice guidance update from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* vol. 75 Preprint at <https://doi.org/10.1002/hep.32117> (2022).
160. Iwasaki, S. *et al.* Bezafibrate may have a beneficial effect in pre-cirrhotic primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* **16**, (1999).
161. Corpechot, C. *et al.* A Placebo-Controlled Trial of Bezafibrate in Primary Biliary Cholangitis. *New England Journal of Medicine* **378**, (2018).
162. Soret, P. A. *et al.* Combination of fibrates with obeticholic acid is able to normalise biochemical liver tests in patients with difficult-to-treat primary biliary cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther* **53**, (2021).
163. Grigorian, A. Y., Mardini, H. E., Corpechot, C., Poupon, R. & Levy, C. Fenofibrate is effective adjunctive therapy in the treatment of primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **39**, (2015).
164. Zhang, Y. *et al.* Combination therapy of fenofibrate and ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis who respond incompletely to UDCA monotherapy: A meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* **9**, (2015).

165. Cheung, A. C. *et al.* Combined ursodeoxycholic acid (UDCA) and fenofibrate in primary biliary cholangitis patients with incomplete UDCA response may improve outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* **43**, (2016).
166. Colapietro, F., Gershwin, M. E. & Lleo, A. PPAR agonists for the treatment of primary biliary cholangitis: Old and new tales. *Journal of Translational Autoimmunity* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2023.100188> (2023).
167. Jones, D. *et al.* Seladelpar (MBX-8025), a selective PPAR- $\delta$  agonist, in patients with primary biliary cholangitis with an inadequate response to ursodeoxycholic acid: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2, proof-of-concept study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **2**, (2017).
168. Kowdley, K. V. *et al.* A randomized, placebo-controlled, phase II study of obeticholic acid for primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* **73**, (2020).
169. Ratziu, V. *et al.* Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  and - $\delta$ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **150**, (2016).
170. Staels, B. *et al.* Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **58**, (2013).
171. Schattenberg, J. M. *et al.* A randomized placebo-controlled trial of elafibranor in patients with primary biliary cholangitis and incomplete response to UDCA. *J Hepatol* **74**, (2021).
172. Jani, R. H. *et al.* A multicenter, prospective, randomized, double-blind study to evaluate the safety and efficacy of saroglitazar 2 and 4 mg compared with placebo in type 2 diabetes mellitus patients having hypertriglyceridemia not controlled with atorvastatin therapy (PRESS VI). *Diabetes Technol Ther* **16**, (2014).
173. Vuppalanchi, R. *et al.* Proof-of-concept study to evaluate the safety and efficacy of saroglitazar in patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol* **76**, (2022).
174. Spijkerman, M. *et al.* A large variety of clinical features and concomitant disorders in celiac disease - A cohort study in the Netherlands. *Digestive and Liver Disease* **48**, (2016).
175. Di Sabatino, A. & Corazza, G. R. Coeliac disease. *The Lancet* vol. 373 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60254-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60254-3) (2009).
176. Kelly, C. P., Bai, J. C., Liu, E. & Leffler, D. A. Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* **148**, (2015).
177. Rostom, A., Murray, J. A. & Kagnoff, M. F. American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology* **131**, (2006).
178. Logan, R. F. A., Ferguson, A., Finlayson, N. D. C. & Weir, D. G. PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS AND CÆLIAC DISEASE. An Association? *The Lancet* **311**, (1978).



179. Dibaise, J. K. & Paustian, F. F. Steatorrhea and weight loss in a 72-year-old man: Primary biliary cirrhosis? Celiac disease? Bacterial overgrowth? What else? *American Journal of Gastroenterology* **93**, (1998).
180. Kingham, J. G. C. & Parker, D. R. The association between primary biliary cirrhosis and coeliac disease: A study of relative prevalences. *Gut* **42**, (1998).
181. Dickey, W., McMillan, S. A. & Callender, M. E. High prevalence of celiac spree among patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* **25**, (1997).
182. Sørensen, H. T. *et al.* Risk of primary biliary liver cirrhosis in patients with coeliac disease: Danish and Swedish cohort data. *Gut* **44**, (1999).
183. Sjöberg, K., Lindgren, S. & Eriksson, S. Frequent occurrence of non-specific gliadin antibodies in chronic liver disease: Endomysial but not gliadin antibodies predict coeliac disease in patients with chronic liver diseases. *Scand J Gastroenterol* **32**, (1997).
184. Volta, U. *et al.* Frequency and significance of anti-gliadin and anti-endomysial antibodies in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* **43**, (1998).
185. Bardella, M. T. Screening patients with celiac disease for primary biliary cirrhosis and vice versa. *American Journal of Gastroenterology* **92**, (1997).
186. Chatzicostas, C. *et al.* Primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis are not associated with coeliac disease in Crete. *BMC Gastroenterol* **2**, (2002).
187. Bizzaro, N. *et al.* Low specificity of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Lab Anal* **20**, (2006).
188. Floreani, A. *et al.* Prevalence of coeliac disease in primary biliary cirrhosis and of antimitochondrial antibodies in adult coeliac disease patients in Italy. *Digestive and Liver Disease* **34**, (2002).
189. Abenavoli, L., Arena, V., Giancotti, F., Vecchio, F. M. & Abenavoli, S. Celiac disease, primary biliary cirrhosis and helicobacter pylori infection: one link for three diseases. *International journal of immunopathology and pharmacology* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1177/039463201002300431> (2010).
190. Sedlack, R. E., Smyrk, T. C., Czaja, A. J. & Talwalkar, J. A. Celiac disease-associated autoimmune cholangitis. *American Journal of Gastroenterology* **97**, (2002).
191. Freeman, H. J. Hepatobiliary tract and pancreatic disorders in celiac disease. *Canadian Journal of Gastroenterology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1155/1997/160201> (1997).
192. Antvorskov, J. C., Josefsen, K., Engkilde, K., Funda, D. P. & Buschard, K. Dietary gluten and the development of type 1 diabetes. *Diabetologia* vol. 57 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3265-1> (2014).
193. Cosnes, J. *et al.* Incidence of Autoimmune Diseases in Celiac Disease: Protective Effect of the Gluten-Free Diet. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **6**, (2008).
194. Kotb, M. A. Molecular mechanisms of ursodeoxycholic acid toxicity & side effects: Ursodeoxycholic acid freezes regeneration & induces hibernation mode. *International*

