



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Paper de les cèl·lules progenitores hepàtiques en l'hepatitis alcohòlica i la regeneració hepàtica

Daniel Rodrigo Torres

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

PAPER DE LES CÈL·LULES PROGENITORES HEPÀTIQUES EN L'HEPATITIS ALCOHÒLICA I LA REGENERACIÓ HEPÀTICA

Presentada per

DANIEL RODRIGO TORRES

Per a optar al títol de Doctor en Biomedicina

Tesi realitzada sota la direcció del **Dr. Pau Sancho Bru** en el Laboratori de Fibrosi Hepàtica de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS),
Barcelona

Daniel Rodrigo Torres

Doctorand

Dr. Pau Sancho Bru

Director

Dr. Joan Clària Enrich

Tutor

Programa de Doctorat en Biomedicina

2016

"Quan més aprenc, més em dono compte quant no sé"

Frase atribuïda a Albert Einstein

"Veure molt, patir molt i estudiar molt, són els tres pilars de l'aprenentatge"

Benjamin Disraeli

2-AAF	2-acetilaminoflurà
ABIC	Age, serum Bilirubin, INR, and serum Creatinine
ACLF	Acute-on-Chronic Liver Failure (Fallida hepàtica aguda sobre dany crònic)
AFP	Alfa-fetoproteïna
ALB	Albúmina
ALD	Alcoholic Liver Disease (Malaltia hepàtica per consum d'alcohol)
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ALF	Acute Liver Failure (Fallida hepàtica aguda)
APAP	Acetaminophen
β-GAL	Beta-galactosidasa
BAC	Cromosoma bacterià artificial
BDL	Lligadura del conducte biliar
BMOL	Bipotential Mouse Oval Liver
BMP	Bone morphometric protein
BrdU	Bromodeoxyuridina
CART	Classification And Regression Tree
CEB	Cèl·lules de l'epiteli biliar
CCl₄	Tetraclorur de carboni
CEH	Cèl·lules estrellades hepàtiques
CD	Cluster of differentiation
CDE	Dieta deficient en colina i suplementada amb etionina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPH	Cèl·lules progenitores hepàtiques
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DDC	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
DLK-1	Delta Like homolog-1
ECM	Matriu extracel·lular

Abreviacions

EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Transició Epiteli Mesènquima
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FAH	Fumaryl Acetoacetate Hydrolase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOX1	Forkhead Box I1
HA	Hepatitis alcohòlica
HGF	Hepatocyte Growth Factor
Hh	Hedgehog
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HPx	Hepatectomia parcial
HVB	Hepatitis per virus B
HVC	Hepatitis per virus C
IFN	Interferó
IL	Interleuquina
JAK	Janus Kinase
KRT	Keratina
LacZ	Lactose Operon Z
LCM	Laser Capture Microdissection
LGR5	Leucine-Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5
LoxP	Locus X-over P1
LPS	Lipopolisacàrid
LT-β	Lymphotoxin beta
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MELD	Model for Endstage Liver Disease

MIC1-1C3	Macrophage Inhibitory Cytokine-1-1C3
MPO	Mieloperoxidasa
NAFLD	Malaltia hepàtica per fetge gras no alcohòlic
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NF-kB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OPN	Osteopontina
OSM	Oncostatina M
OV-6	Oval Cell Marker-6
PBC	Cirrosi Biliar Primària
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PROM1	Prominin 1
PSC	Colangitis Esclerosant Primària
RD	Reacció ductular
RNAseq	Seqüenciació de l'RNA
ROS	Espècies reactives d'oxigen
SCA-1	Stem Cells Antigen-1
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor-1 α
SOX9	Sex Determining Region Y-Box 9
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STM	Septe Transvers Mesenquimal
TGF-β	Transforming growth factor beta
THY-1	Thy-1 cell surface antigen
TNF	Tumor Necrosis Factor
TROP2	Tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2)
TTR	Transtiretina

Abreviaciones

TWEAK	TNF-like weak induction of apoptosis
uPA	Urokinase-type Plasminogen
YFP	Yellow Fluorescent Protein

INTRODUCCIÓ

1. Malaltia hepàtica per consum d'alcohol

1.1 Hepatitis alcohòlica	3
--------------------------	---

1.1.1 Característiques histològiques de l'hepatitis alcohòlica	4
--	---

2. Les cèl·lules progenitores hepàtiques (CPH)

2.1 Desenvolupament embrionari del fetge	8
--	---

2.2 Funcions i arquitectura del fetge	8
---------------------------------------	---

2.2.1 Homeòstasi cel·lular en el fetge normal	12
---	----

2.2.2 Regeneració del fetge en situacions de dany	15
---	----

2.3 Definició de cèl·lula progenitora hepàtica: història, localització i funcions	18
---	----

2.3.1 Aïllament de les cèl·lules progenitores hepàtiques	20
--	----

2.3.2 Caracterització de les cèl·lules progenitores hepàtiques	24
--	----

2.3.2.1 Hepatocyte nuclear factor-1-beta (HNF1 β)	28
--	----

2.3.3 Bipotencialitat de les CPH: estudis in vitro i generació de línies cel·lulars	30
---	----

2.3.4 Mecanismes de regulació de les cèl·lules progenitores hepàtiques	33
--	----

2.3.4.1 Factors implicats en l'activació de les CPH	37
---	----

2.3.4.2 Factors implicats en la proliferació de CPH	38
---	----

2.3.4.3 Factors implicats en la migració de les CPH	41
---	----

2.3.4.4 Factors implicats en la diferenciació de les CPH	43
--	----

2.3.5 El nínxol hepàtic de les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques	44
---	----

2.3.5.1 Interacció CPH-cèl·lules estrellades i miofibroblasts	45
---	----

2.3.5.2 Interacció CPH-matriu extracel·lular	46
--	----

2.3.5.3 Interacció CPH-cèl·lules de Kupffer	47
---	----

2.3.5.4 Interacció cèl·lules progenitores hepàtiques- altres tipus	49
cel·lulars: paper de les cèl·lules inflammatòries	
2.3.6 Medicina regenerativa i possibles usos terapèutics de les cèl·lules	50
mare/progenitores hepàtiques	
3. Paper de les cèl·lules progenitores hepàtiques en la regeneració del fetge	53
3.1 Models animals de regeneració hepàtica	53
3.1.1 Model clàssic de regeneració hepàtica per hepatectomia parcial	53
3.1.2 Models animals d'inducció de les CPH	55
3.1.3 Estudi de la participació de les CPH <i>in vivo</i> : tècnica del lineage tracing	59
3.2 Les cèl·lules progenitores hepàtiques en les malalties hepàtiques humanes	66
OBJECTIUS	75
RESULTATS	
Resum dels resultats de l'article 1	79
Article 1: "Liver Progenitor Cell Markers Correlate With Liver Damage And Predict Short-Term Mortality in Patients With Alcoholic Hepatitis"	82
Resum dels resultats de l'article 2	101
Article 2: "The Biliary Epithelium Gives Rise to Liver Progenitor Cells"	105
Estudi 3: "Les cèl·lules de la reacció ductular presenten un perfil inflamatori i participen en el dany i el reclutament de neutròfils en la malaltia hepàtica crònica"	127
	133
DISCUSSIÓ	147
CONCLUSIONS	159
BIBLIOGRAFIA	163
AGRAÏMENTS	179

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES

Figura 1. Espectre de la malaltia hepàtica per consum d'alcohol i principals factors de risc	4
Figura 2. Primeres etapes en el desenvolupament del fetge	9
Figura 3. Factors de transcripció i senyals implicades en la segregació del llinatge d'hepatòcits i de colangiòcits	11
Figura 4. Etapes de formació dels ductes biliars a partir de la placa ductal	12
Figura 5. Estructura tridimensional d'un lobulett hepàtic	13
Figura 6. Estructura anatòmica del lobulett d'hepàtic	14
Figura 7. Resposta del fetge davant d'un dany agut o lleu i davant d'un dany fulminant o d'un dany crònic	19
Figura 8. Esdeveniments de senyalització durant la resposta de les cèl·lules ovals/progenitores hepàtiques	38
Figura 9. Interaccions entre les CPH i les diferents poblacions cel·lulars presents en el nínxol hepàtic	49
Figura 10. Esquema dels principals tipus cel·lulars implicats davant d'un dany	54
Figura 11. Esquema del funcionament de la tecnologia Cre-LoxP	61
Figura 12. Mecanismes cel·lulars potencials descrits actualment en la regeneració hepàtica	66
Figura 13. Procés d'activació i diferenciació de les CPH cap a hepatòcits i colangiòcits	67
 Taula 1. Principals marcadors descrits en les cèl·lules progenitores hepàtiques	 29
Taula 2. Selecció de les principals línies cel·lulars descrites de CPH	34
Taula 3. Principals models de regeneració hepàtica on s'indueix una resposta de CPH	58

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA HEPÀTICA PER CONSUM D'ALCOHOL

La malaltia hepàtica per consum d'alcohol (en anglès, Alcoholic Liver Disease (ALD)) és una de les principals causes de malaltia hepàtica crònica en el món amb una alta morbiditat i mortalitat. Segons dades de l'any 2004, el consum d'alcohol excessiu va ser la causa del 3,8% del total de morts i el motiu del 41,6% dels transplantaments hepàtics realitzats entre 1996 i 2005 (Altamirano et al. 2011; Gao et al. 2011a).

L'ALD es manifesta com un ampli ventall de desordres, des d'una simple esteatosi (acumulació anormal de greix) asimptomàtica, fins a formes més severes de dany hepàtic, entre les quals s'inclouen l'esteatohepatitis (acúmul de greix causant inflamació i dany), la fibrosi progressiva (producció desregulada de matriu extracel·lular que porta a una acumulació en el fetge), l'hepatitis alcohòlica (HA) i la cirrosi (etapa final de la fibrosi, del dany crònic persistent), que poden desencadenar l'aparició d'un carcinoma hepatocel·lular (Tome et al. 2004) (Figura 1). A més, el consum d'alcohol a llarg termini té efectes sinèrgics sobre d'altres patologies com les hepatitis per virus B (HVB) i C (HVC), en la malaltia hepàtica per fetge gras no alcohòlic (NAFLD) i desordres genètics com l'hemocromatosis, podent desencadenar una progressió accelerada de malalties hepàtiques (Gao et al. 2011a). A més, pot provocar desordres no relacionats amb el fetge com infeccions, episodis cardiovasculars, a més de malalties en el sistema nerviós, pàncrees i fetge (Gao et al. 2011b).

És important remarcar que actualment, només un 35% dels pacients amb un consum excessiu d'alcohol desenvolupen una ALD severa, indicant que hi ha molts factors involucrats, molts dels quals s'han identificat. Entre aquests factors trobem el sexe, l'obesitat, l'hàbit de fumar, factors de la dieta i alguns factors genètics. El fet de desenvolupar una ALD severa, com per exemple una cirrosi, comporta una sèrie de complicacions tals com ascitis, sagnat per varius esofàgiques, fallida renal, infeccions bacterianes o carcinoma hepatocel·lular (Lucey et al. 2009).

Com s'ha dit, pacients amb ALD i un consum excessiu d'alcohol poden patir episodis d'HA; en força casos l'HA porta a complicacions severes relacionades amb fallida hepàtica i hipertensió portal, les quals tenen una mortalitat a llarg termini molt alta (Gao et al. 2011a). Per evitar aquests episodis, la millor teràpia contra l'HA és aconseguir que el pacient presenti abstinència per alcohol, ja que a part d'aconseguir evitar una lesió persistent en un fetge cada cop més danyat, és un dels requisits per a què el malalt pugui entrar en la llista de transplantaments. No obstant, s'han buscat teràpies farmacològiques alternatives per a tractar

la malaltia, però s'han mostrat inefectives i no milloren la supervivència del pacient (Altamirano et al. 2011). Només el tractament amb corticoesteroids, establert fa uns 40 anys, ha permès allargar la supervivència d'aquests pacients amb HA, tot i que aproximadament la meitat dels pacients tractats no responen a aquesta teràpia. Pocs avenços hi ha hagut en trobar noves teràpies en l'ALD, ja que és difícil realitzar *trials* clínics en pacients amb addicció a l'alcohol i no hi ha un interès per part de les farmacèutiques en comparació a altres malalties hepàtiques com l'hepatitis per virus B i C (Altamirano et al. 2011). A més, a dia d'avui no hi ha un model experimental acceptat de fases avançades d'ALD que reproduïx totes les característiques de la malaltia. Recentment, s'ha descrit un model que reproduïx moltes de les particularitats i que pot servir per a entendre millor la patogènia d'aquesta malaltia; però encara s'ha de demostrar la seva reproduïbilitat (Altamirano et al. 2011; Bertola et al. 2013).

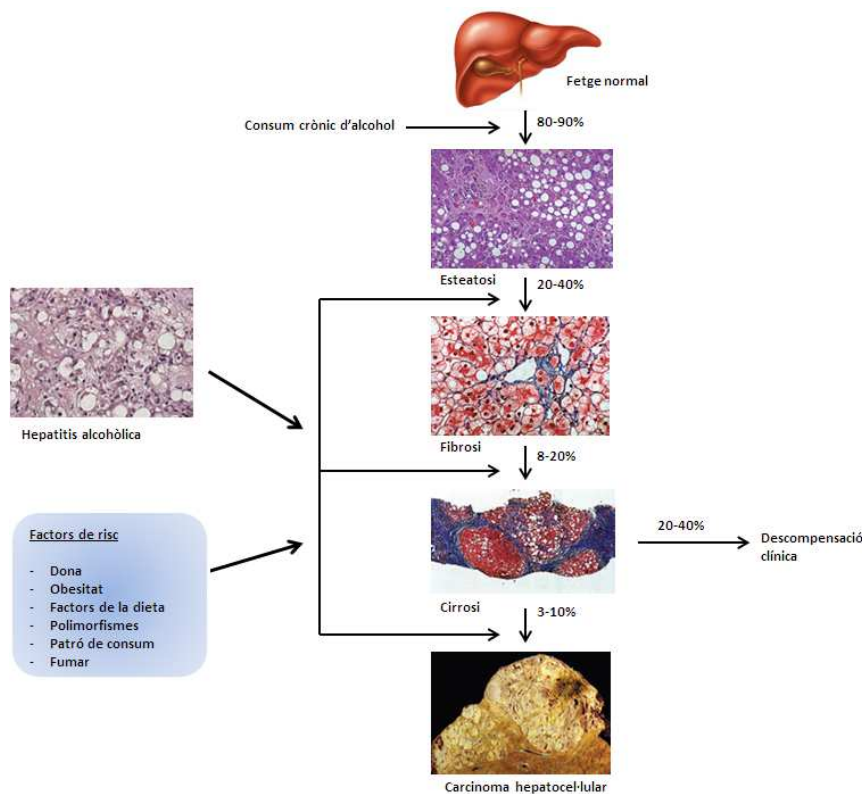


Figura 1. Espectre de la malaltia hepàtica per consum d'alcohol i principals factors de risc. Els percentatges indiquen els malalts que progressen d'un estadi a l'altre. Adaptat de Gao et al. 2011 i Altamirano et al. 2011.

1.1 Hepatitis alcohòlica

En pacients amb ALD poden succeir episodis d'HA. L'HA és una síndrome caracteritzada per icterícia, febre i fallida hepàtica que succeeix després de dècades de consum alt d'alcohol

(Lucey et al. 2009). La prevalença d'aquesta malaltia se situa entre el 10% i el 35% dels bevedors actius i inclou un ampli espectre de la malaltia, que va des d'un dany lleu fins a un dany sever que pot causar la mort (Gao et al. 2011a). L'HA es desenvolupa en pacients amb esteatosis i s'associa amb la fibrosi progressiva i la cirrosi.

1.1.1 Característiques histològiques de l'hepatitis alcohòlica

Histològicament, l'HA es caracteritza per presentar les següents característiques:

1. Profund dany hepatocel·lular.

La metabolització de l'etanol, principalment a acetaldehid en les mitocondries, comporta processos que generen espècies reactives d'oxigen (ROS) i causen la peroxidació de lípids, la depleció del glutatió mitocondrial i la depleció de la S-adenosilmetionina. Totes aquestes accions comporten un dany inicial als hepatòcits i els sensibilitzen a posteriors danys que puguin patir. Els hepatòcits es caracteritzen per presentar "ballooning" centrilobular, és a dir, un inflament de la cèl·lula acompanyada d'un increment de mida, causada per l'hepatotoxicitat de l'etanol i d'altres mecanismes. També es caracteritzen per presentar els cossos de Mallory, que són incusions eosinofíliques amorfes formades per filaments intermedis danyats dins dels hepatòcits (Lucey et al. 2009; Gao et al. 2011a).

2. Colèstasi.

És la retenció d'àcids biliars que produeixen pruritus, especialment en els ductes biliars, produint canvis en la regió periportal.

3. Esteatosis hepatocitària.

És l'acumulació de greix (principalment triglicèrids, fosfolípids i ésters de colesterol) en els hepatòcits. L'etanol actuaria regulant factors de transcripció del metabolisme lipídic; estimularia la lipogènesi i inhibiria l'oxidació d'àcids greixos en la lipòlisi (Gao et al. 2011a).

4. Fibrosi.

La fibrosi hepàtica és una conseqüència de reparació a dany que es dona en moltes malalties hepàtiques cròniques. Es caracteritza per una producció excessiva de col·lagen i altres proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM) i la seva acumulació, conseqüència d'una deficient degradació de la ECM; per tant, hi ha una deficiència del balanç producció-degradació de ECM. Les cèl·lules estrellades hepàtiques (CEH) activades són la principal

font de proteïnes de la ECM, juntament amb els miofibroblasts portals. El dany hepatocel·lular causat per l'alcohol fa augmentar els nivells de citoquines, quimiocines i components de la immunitat innata, induint l'activació de les CEH i la fibrogènesi (Gao et al. 2011a). En la malaltia hepàtica per alcohol i en la HA s'observa tant fibrosi intrasinusoidal (en l'espai entre les cèl·lules endotelials i els hepatòcits), com fibrosi periportal, presentant un patró de distribució hexagonal en els diferents lobulats hepàtics. La fibrosi pot derivar a un estat de cirrosi, que es dona quan el procés de cicatrització de les ferides que porta a l'acumulació de ECM comporta la disrupció de l'arquitectura hepàtica normal i una disfunció hepàtica (Lucey et al. 2009).

5. Infiltrat de cèl·lules inflamatòries.

Una de les característiques de l'HA és l'activació de la immunitat innata i la infiltració de cèl·lules inflamatòries en les zones de dany hepàtic. Aquesta infiltració es dona principalment per neutròfils i es considera una característica destacada de la HA. S'ha observat com factors com l'acetaldehid, el tumor necrosis factor alpha (TNF- α) o el lipopolisacàrid (LPS), derivat de les bacteries de l'intestí que es transloquen al fetge, estimulen la producció de quimiocines i citoquines en els pacients amb AH. Quimiocines de la família CXC com CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10, juntament amb d'altres quimiocines com CCL20, CCL2 o la interleuquina IL-17 es troben up-regulades en aquests pacients (Colmenero et al. 2007; Dominguez et al. 2009; Lemmers et al. 2009; Affo et al. 2014). S'ha descrit que algunes d'elles (IL-8, CXCL1 o IL-17) promouen el reclutament de neutròfils durant la progressió de la HA (Dominguez et al. 2009; Lemmers et al. 2009).

6. Presència de cèl·lules progenitores hepàtiques (reacció ductular)

En situacions de dany hepàtic crònic com l'ALD, tal com es comentarà més endavant en aquesta tesi, la proliferació queda compromesa i les cèl·lules progenitores hepàtiques (CPH) proliferen i es diferencien a colangiòcits i hepatòcits. A més, s'ha vist que el nombre de CPH correlaciona amb la severitat de la malaltia (Lowes et al. 1999; Roskams et al. 2003). Recentment, en el context de la HA, en el primer estudi d'aquesta tesi doctoral es va descriure per primer cop la presència d'aquestes CPH en pacients amb HA i un augment de la severitat de la malaltia en major presència d'aquestes cèl·lules (Sancho-Bru et al. 2012). Aquesta presència de les CPH en pacients amb HA s'ha confirmat posteriorment en dos estudis (Dubuquoy et al. 2015; Lanthier et al. 2015).

Finalment, usant algunes d'aquestes característiques histològiques explicades, s'ha publicat recentment un estudi multicèntric dut a terme pel nostre grup on s'ha desenvolupat un nou *score* o sistema de puntuació histològic per predir la supervivència a 90 dies dels pacients amb HA. Basat en quatre paràmetres com són: el grau de fibrosis, el grau d'infiltració de neutròfils, però també per característiques no confirmades en la HA fins ara com el tipus de bilirubinostasis (retenció d'àcids biliars) i la presència de megamitocòndries. Mitjançant aquest *score*, es va determinar que la presència de ponts de fibra o de la cirrosi, i la presència de bilirubinostasi eren predictors associats a un mal pronòstic; en canvi, la presència d'un infiltrat de neutròfils i de megamitocòndries s'associa a un millor pronòstic (Altamirano et al. 2014).

2. LES CÈL·LULES PROGENITORES HEPÀTIQUES (CPH)

En l'hepatitis alcohòlica i en d'altres patologies hepàtiques, s'ha descrit la presència de les cèl·lules progenitores hepàtiques (CPH). No obstant, el seu origen, la seva localització, les seves característiques i els seus mecanismes de regulació han estat objecte d'estudi durant els últims anys. En els següents apartats es parlarà sobre els punts esmentats abans.

2.1 Desenvolupament embrionari del fetge

L'estudi del desenvolupament del fetge en la seva etapa embrionària ha estat de gran importància per tal d'entendre conceptes sobre la morfogènesi d'altres òrgans i per tal d'entendre la regeneració hepàtica. Entendre els mecanismes fonamentals que controlen l'hepatogènesi i la diferenciació de les cèl·lules epitelials ha estat essencial per a crear protocols de diferenciació de cèl·lules mare cap a cèl·lules hepàtiques amb una funció concreta.

L'organogènesi del fetge comença aproximadament al dia embrionari 8.0 (e8.0) en ratolins (a les 3 setmanes de gestació en humans) a partir de l'endoderm (Zorn 2008; Gordillo et al. 2015). La capa germinal endodèrmica és un dels 3 fulls germinals que es formen durant la gastrulació (etapa prèvia a l'organogènesi) (Lemaigre 2009). Tot i que els dos tipus principals cel·lulars hepàtics com són els hepatòcits i les cèl·lules de l'epiteli biliar (CEB) (també anomenats colangiòcits) deriven de l'endoderm, altres tipus cel·lulars presents en el fetge adult com les cèl·lules estromals, les cèl·lules estrellades, les cèl·lules de Kupffer o els vasos sanguinis tenen origen mesodèrmic (Zorn 2008).

En la primera etapa es forma el patró de l'endoderm; les cèl·lules de l'endoderm formen un tub intestinal primitiu el qual es subdivideix en tres regions (anterior, mitjana i posterior) i adopta un patró específic a partir de l'activitat gradual de factors de senyalització secretats pel mesoderm com Wnt, Fibroblast growth factor (FGF) i BMP (Bone morphometric protein). De la regió anterior s'originaran òrgans com la tiroides, el fetge, els pulmons i el pàncrees (Gordillo et al. 2015). A continuació, sobre el dia e8.25-e8.5 en ratolins es dona l'etapa d'especificació, en la qual ja es detecta l'expressió d'albumina (Alb), transtiretina (TTR), alfa-fetoproteïna (Afp) i hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4α) (induïda des del cor en desenvolupament mitjançant senyals FGF i des del septe transvers mensequimal (STM) a través de BMP) en la regió endodèrmica anterior localitzada a prop del cor en desenvolupament (Zorn 2008; Snykers et al. 2009; Tanaka et al. 2011). En aquesta etapa les

cèl·lules de l'endoderm queden compromeses a un destí de diferenciació específic (hepàtic) i a un programa genètic determinat a causa d'aquestes senyals, bloquejant d'altres com el pancreàtic (Zaret et al. 2008; Lemaigre 2009).

A dia e8.5- e9.0 (dies 23-26 en humans), el domini ventral de la regió anterior adjacent al mesoderm cardíac i el STM s'engruixeix ja que les cèl·lules passen de formar una monocapa de cèl·lules epitelials cuboïdals a una multicapa de cèl·lules pseudoestratificades anomenades hepatoblasts; d'aquesta manera es forma el diverticle hepàtic (Bort et al. 2006).

Entre els dies e9.0-e9.5 (dies 26-32 en humans), la capa basal rica en laminina que envolta l'endoderm hepàtic es trenca, i els hepatoblasts es deslaminen, proliferen i migren cap a l'estroma envaint el STM per a formar el brot naixent del fetge (liver Bud). Es creu que els hepatoblasts deuen seguir un procés de transició epiteli-mesènquima (EMT) perdent la morfologia epitelial i reduint l'expressió d'E-Cadherina per tal de poder migrar (Lemaigre 2009). Alguns factors de transcripció són necessaris per a aquest procés, com Hhex i Gata. D'altres, com Prox1 i Onecut-1 i 2, controlen la migració dels hepatoblasts mitjançant la regulació de l'expressió de proteïnes de la matriu extracel·lular i enzims que remodelen la matriu com les metal·loproteinases, les quals permeten la degradació de la làmina basal) (Margagliotti et al. 2007). Les senyals provinents de les cèl·lules endotelials primitives que es troben a dia e9.0 entre l'epiteli hepàtic i la STM també són necessàries per aquest procés (Zorn 2008). En la Figura 2 es representen les primeres etapes del desenvolupament embrionari del fetge en les quals es formen el diverticle hepàtic en primer lloc i més endavant el brot hepàtic.

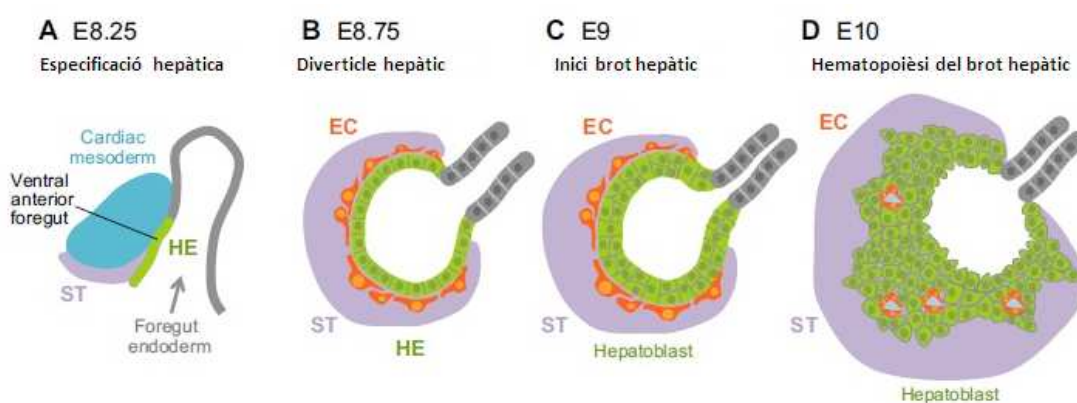


Figura 2. Primeres etapes en el desenvolupament del fetge. Aquestes etapes comprenen des de l'especificació hepàtica fins a l'establiment del fetge com a òrgan hematopoietic principal. HE, Diverticle hepàtic; ST, septe transvers mesenquimal; EC, cèl·lules endotelials. Adaptat de Gordillo et al. 2015

Entre els dies e9.5-e.15 (dies 31 a 56 en humans), el brot del fetge pateix un creixement important i es converteix en el principal lloc d'hematopoiesi, ja que les cèl·lules endotelials es fusionen al voltant d'espais presents en el STM. Aquestes cèl·lules creen vesícules que es fusionen per formar vasos sanguinis, permetent la invasió de cèl·lules hematopoiètiques en el fetge en creixement, el qual queda vascularitzat (Zaret 2002). L'expansió dels hepatoblasts està regulada per interaccions en el STM amb les cèl·lules endotelials del voltant i per senyals paracrines del mesènquima hepàtic (com les provinents de les cèl·lules estrellades), així com per gens que actuen intrínsecament en els hepatoblasts. Entre els factors de creixement secretats pel STM i el mesènquima que regulen la proliferació i supervivència dels hepatoblasts destaquen FGF, BMP, Wnt, hepatocyte growth factor (HGF) i transforming growth factor beta (TGF- β). A més a més, s'han descrit una sèrie de gens que codificarien per reguladors implicats en el creixement del brot com c-jun, Jumonji, Foxm1b, Tbx3 i components de senyalització com K-ras i Raf-1.

Sobre el dia e12.5-e13 (dies 56-58 de gestació en humans) comença la fase de diferenciació dels hepatoblasts bipotencials cap a hepatòcits i colangiòcits. Com els hepatoblasts tenen la capacitat de donar lloc a aquests dos tipus cel·lulars, se'ls considera cèl·lules mare/progenitores embrionàries (Tanaka et al. 2011). Els hepatoblasts inicialment expressen marcadors d'hepatòcits madurs com HNF4a i albúmina, marcadors de CEB com la keratina 19 (Krt19 o Ck19) i gens de fetge fetal com Afp. Aquells hepatoblasts en contacte amb el mesènquima i la vena portal comencen a adoptar un destí d'epiteli biliar i formen a dia e14 una fila al voltant del mesènquima periportal, generant una monocapa contínua de cèl·lules que s'anomena placa ductal; és una anella de cèl·lules al voltant dels vasos sanguinis (Crawford 2002; Lemaigre 2010). Més endavant, aquesta monocapa es torna en una bicapa de precursors biliars cuboïdals que augmenten l'expressió de Krt19 i disminueixen l'expressió de gens hepatocitaris (Zorn 2008; Gordillo et al. 2015). Els hepatoblasts del parènquima que no estan en contacte amb les venes portals s'aniran diferenciant gradualment a hepatòcits madurs.

Sobre del dia e17 (dotzena setmana de gestació en humans) i fins el període perinatal, estructures luminals són detectades en llocs específics de la placa ductal; aquestes estructures, anomenades estructures ductals primitives, donaran lloc als futurs ductes biliars. Les estructures ductals primitives són asimètricament transitòries, formades en el lumen per cèl·lules precursoras biliars de la placa ductal, mentre que al costat parenquimal del lumen trobem cèl·lules amb característiques semblants a hepatoblasts que es diferenciaran a colangiòcits i adquiriran una simetria radial formant els ductes intrahepàtics, mentre van sent envoltats pel mesènquima periportal (Zorn 2008; Lemaigre 2009). Estudis recents en ratolí han

vist que les cèl·lules ductals de la bicapa presenten una proliferació limitada només per expandir l'arbre biliar i que les cèl·lules que no formen els ductes biliars no pateixen apoptosi (Carpentier et al. 2011). Aquesta proliferació es dona principalment després de néixer, fins que els ductes assoleixen la maduresa total. En el mateix estudi, diuen que els colangiòcits derivats de la placa ductal formarien tant els ductes biliars interlobulars, els ductulets biliars com els canals de Hering, on trobaríem les cèl·lules ovals/cèl·lules progenitores hepàtiques, que també derivarien de la placa ductal (Carpentier et al. 2011). Tots aquests processos de tubulogènesi, apoptosi i proliferació s'engloben en el què s'anomena remodelació de la placa ductal (Lemaigre 2003).

Cal remarcar però que mentre l'arbre biliar intrahepàtic, format per una xarxa de ductes biliars, deriva del brot hepàtic, els ductes extrahepàtics (vesícula biliar i ductes biliars comú i cístic) es desenvolupa directament com un brot del diverticle hepàtic que emergeix de l'intestí primitiu (Lemaigre 2010). En quant als hepatòcits, a dia e17 comencen a adoptar la seva forma cuboïdal i deixen de ser una cèl·lula que ajuda a la funció hematopoiètica per passar a ser una cèl·lula dedicada al metabolisme (Zaret 2002).

La diferenciació dels hepatoblasts als dos llinatges principals hepàtics està regulat per factors com TGF- β , Notch, Wnt, BMP i FGF, així com una sèrie de factors de transcripció necessaris per a la diferenciació cap a hepatòcits (Hnf1 α , Prox1, HNF4 α i C/EBP α) o cap a colangiòcits (Hhex, Hnf1 β i Sox9) (Gordillo et al. 2015). En la Figura 3 es mostra un esquema dels factors de transcripció i senyals que governen la diferenciació cap al llinatge d'hepatòcits i de colangiòcits.

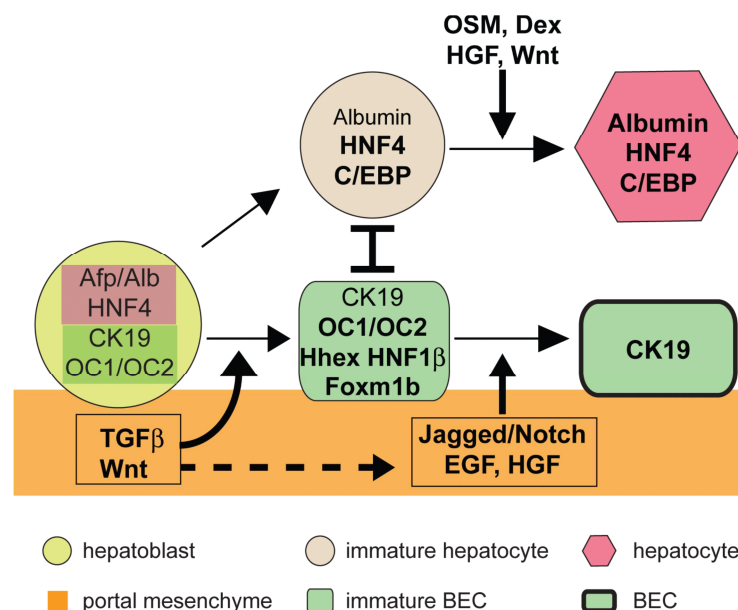


Figura 3. Factors de transcripció i senyals implicades en la segregació del llinatge d'hepatòcits i de colangiòcits.

Extret de Zorn et al. 2008.

Finalment, és important remarcar que el fetge no acaba de ser completament madur fins després del naixement, quan els hepatòcits ja són completament funcionals i s'ha format tota la xarxa biliar connectada entre ella, és a dir, els ductes intrahepàtics i extrahepàtics (Crawford 2002; Zorn 2008). En la Figura 4 podem observar les darreres etapes de formació dels ductes hepàtics en etapa embrionària i en l'etapa perinatal.

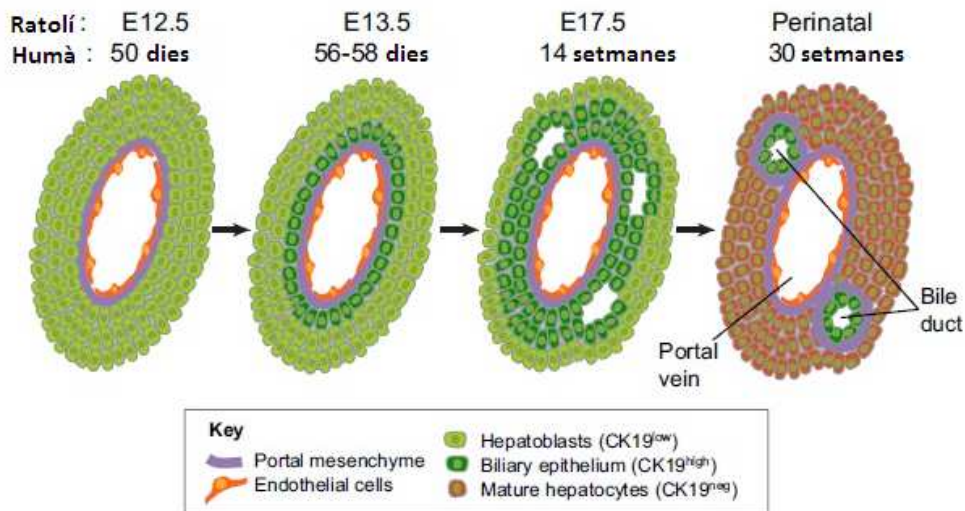


Figura 4. Etapes de formació dels ductes biliars a partir de la placa ductal. Aquesta formació s'inicia a dia e12.5 i no acaba fins a l'etapa perinatal. Els hepatoblasts que es localitzen més allunyats de la vena porta donaran als hepatòcits madurs. Adaptat de Gordillo et al. 2015.

2.2 Funcions i arquitectura del fetge

El fetge és l'òrgan central en l'homeòstasi, a més de realitzar un ampli ventall de funcions relacionades amb el metabolisme, l'emmagatzematge de glicogen, la detoxificació de fàrmacs, el balanç de fluids i electròlits, la producció de diverses proteïnes sèriques i la secreció de bilis. A causa del seu paper essencial en l'homeòstasi, les malalties hepàtiques com l'hepatitis, la fibrosi i la cirrosi sovint acaben en una morbiditat i mortalitat important (Miyajima et al. 2014; Stanger 2015). Les funcions del fetge són realitzades principalment per les dues poblacions de cèl·lules epitelials parenquimals que hi trobem presents: els hepatòcits i les cèl·lules de l'epiteli biliar (també conegudes com colangiòcits).

El fetge representa aproximadament el 2% del pes corporal en humans i el 5% en ratolins. A nivell estructural, està format per diversos lòbuls separats entre ells en els quals microscòpicament podem distingir com cada un d'ells està format per unitats funcionals primàries anomenades lobulets, on es realitza l'activitat del fetge. Els lobulets són hexagonals i

consisteixen en fileres d'hepatòcits que formen una làmina/placa, i tots ells són rodejats per capilars sinusoidals que s'estenen cap a la vena central. En cada una de les cantonades dels lobulets hi ha la tríada portal, que consisteix en una vena portal petita, una branca de l'artèria hepàtica i un ducte biliar (Duncan et al. 2009; Tanaka et al. 2011), tal com podem veure en la Figura 5. El fetge és un òrgan particular ja que és l'únic que rep dos subministraments aferents de sang: un d'ells és a través de la vena porta, que porta aproximadament dos terços de la sang total que arriba al fetge i que transporta nutrients i hormones provinents dels intestins, del pàncrees i de la melsa. L'altre terç de la sang prové de l'artèria hepàtica, que aporta sang oxigenada. La sang provinent de la vena i de l'artèria es barregen al filtrar-se al llarg de la sèrie de capilars sinusoidals que desemboquen prop de les branques d'una vena central eferent, per on sortirà la sang del fetge (Grompe 2009; Tanaka et al. 2011; Stanger 2015). En els ductes biliars, el tercer component de la tríada portal, és per on fluïria la bilis secretada pels hepatòcits tal com explicarem més endavant.

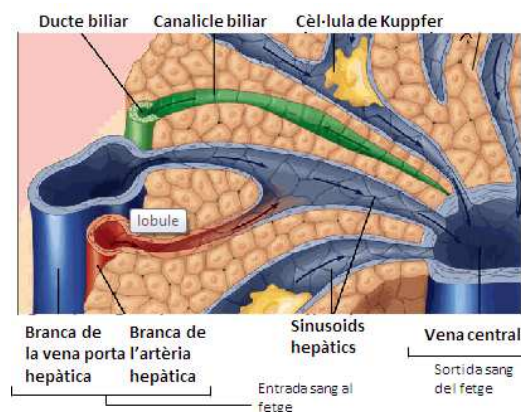


Figura 5. Estructura tridimensional d'un lobulett hepàtic. Modificat de <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/L/liver.html>

Els hepatòcits constitueixen aproximadament el 60% del total de cèl·lules hepàtiques i aproximadament el 80% de la massa hepàtica. Són cèl·lules que formen cordes o fileres hepàtiques i que bidimensionalment es veuen orientades formant una placa hepàtica des de la zona portal a la zona de la vena central. La massa hepatocitària conforma el que s'anomena parènquima hepàtic. Els hepatòcits són cèl·lules epitelials altament polaritzades que produeixen productes importants com l'albúmina, factors de coagulació i altres proteïnes sèriques. La seva superfície basolateral està encarada a les cèl·lules endotelials fenestrades del sinusoid, que gràcies a la seva fenestració permeten el contacte directe i el traspàs de substàncies entre la sang i la superfície de l'hepatòcit en l'espai que queda entre la paret del sinusoid i les làmines d'hepatòcits, anomenat espai de Disse. A més, en la zona apical dels

hepatòcits es formen canals estrets que els envolten anomenats canalicles biliars i que es formen a causa d'unions estretes entre hepatòcits adjacents. És en els canalicles on els hepatòcits secreten un component sintetitzat per ells que juga un paper fonamental en el metabolisme: els àcids biliars. Els àcids biliars, productes amfipàtics del metabolisme del colesterol, es combinen amb el colesterol i la bilirrubina en els canalicles per formar la bilis, essencial per a absorbir nutrients en l'intestí, així com per eliminar el colesterol i el coure (Duncan et al. 2009; Grompe 2009; Tanaka et al. 2011; Stanger 2015). La bilis és drenada pels canalicles cap al ducte biliar de la tríada portal, que està format per cèl·lules epitelials especialitzades anomenades colangiòcits. La connexió entre els canalicles biliars i els ductes biliars es realitza mitjançant el canal de Hering, una regió especialitzada estratègicament situada a la interfase entre el lobule i la tríada portal (Libbrecht et al. 2002; Roskams et al. 2003; Saxena et al. 2004), tal com podem veure en la Figura 6. És en els canals de Hering on es trobaria el nínxol de les cèl·lules progenitores del fetge, basat en anàlisis histològics en rates i al fet que sempre emergeixen de l'àrea periportal (Paku et al. 2001). La bilis, un cop en els ductes biliars, drena cap a l'intestí prim a través de l'arbre biliar (ducte comú) o cap el ducte cístic per emmagatzemar-se temporalment en la vesícula biliar; en l'intestí és on s'emulsionen els greixos de la dieta. Els àcids biliars seran reabsorbits per l'intestí i retornaran al fetge, tancant el circuit enterohepàtic de reciclatge. A diferència de la sang, que es mou en direcció portal-centrilobular, la bilis es mou direcció centrilobular-portal (Grompe 2009; Stanger 2015).

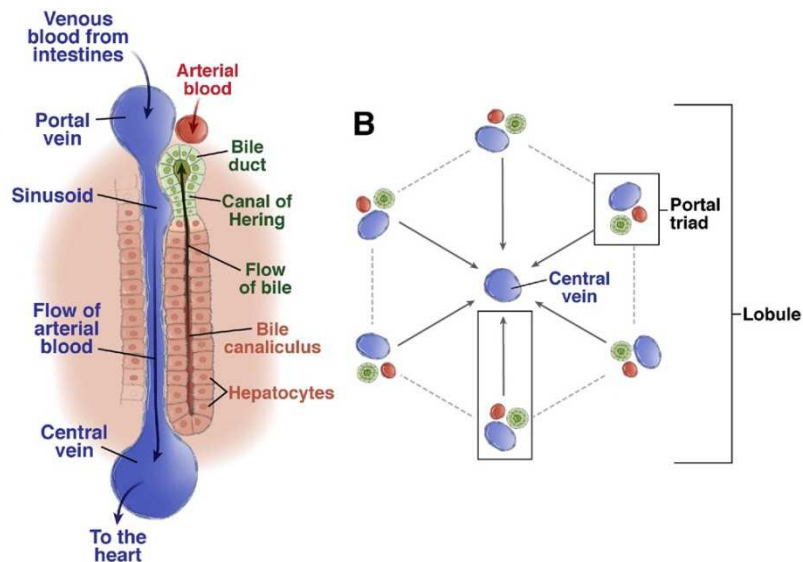


Figura 6. Estructura anatómica del lobule hepàtic. Podem veure la tríada portal composta per la vena porta, una branca de l'arteria hepàtica i el ducte biliar. Prop del ducte biliar observem la localització dels canals de Hering, nínxol de les cèl·lules progenitores hepàtiques. Extret de Duncan et al. 2009.

A part de produir àcids biliars, els hepatòcits tenen altres funcions metabòliques com la síntesi de glutamina, la formació d'urea i la gluconeogènesi. A més, contenen una sèrie d'enzims detoxificants (enzims P450) que reconeixen i modifiquen una sèrie de substàncies per tal d'eliminar-les per bilis o orina. No obstant, tot i tenir tots els hepatòcits una aparença semblant, la seva funció (marcat pel patró d'expressió gènica i les activitats bioquímiques) no és idèntica i realitzen una funció o altra segons la seva localització física; és el que s'anomena zonificació metabòlica. Es diu que la zonificació està sota control de la via de Wnt (Yang et al. 2014). Així, trobem tres regions diferents d'hepatòcits: la zona 1, amb hepatòcits propers als tractes (tríades) portals (hepatòcits periportals), que s'encarreguen de la gluconeogènesi, la producció d'urea a l'expressar enzims del cicle de la urea i la β -oxidació d'àcids grassos; la zona 2, que conté hepatòcits entre els tractes portals i les venes centrals; i la zona 3, on trobem els hepatòcits propers a les venes centrals (hepatòcits pericentrals) que s'encarreguen de la glicòlisis i expressen glutamina sintetasa per a eliminar nitrogen i produir glutamina.

Després dels hepatòcits, l'altre tipus cel·lular important involucrat en el fetge són els colangiòcits, que són cèl·lules petites cuboïdals que formen tant els ductes biliars intrahepàtics, que es troben dins el fetge, com els ductes biliars extrahepàtics, més grans i que es fusionen amb l'intestí. Els colangiòcits són menys actius metabòlicament que els hepatòcits però realitzen algunes funcions com la síntesi de bicarbonats.

Finalment, remarcar que el fetge conté altres tipus cel·lulars d'origen no epitelial i no endodèrmic que realitzen una sèrie de funcions importants. Aquestes cèl·lules s'engloben sota el nom de cèl·lules no parenquimals, entre les quals destaquen les cèl·lules estrellades hepàtiques (CEH) (també anomenades cèl·lules de Ito). Aquestes cèl·lules representen el 5-10% del total de cèl·lules hepàtiques i s'encarreguen d'emmagatzemar vitamina A, a més de sintetitzar proteïnes de la matriu extracel·lular i factors de creixement hepàtics importants en la regeneració hepàtica. Altres tipus cel·lulars que trobem són: els miofibroblasts portals, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules de Kupffer, que són els macròfags hepàtics i que s'encarreguen de la fagocitosi de debris cel·lulars i de components de la matriu extracel·lular i d'alliberar factors inflamatoris (Vestentoft 2014).

2.2.1 Homeòstasi cel·lular en el fetge normal

A diferència de teixits amb un turnover o renovació cel·lular alta (completa en menys de dues setmanes), com poden ser la pell, l'intestí (epiteli intestinal) o la sang (sistema hematopoiètic), el fetge té un ratio de renovació força baix, d'almenys un any per a ser completa (Dolle et al. 2010). Els teixits mantenen la seva homeòstasi cel·lular principalment

per dos mecanismes: per replicació de cèl·lules ja existents i per la diferenciació de cèl·lules mare/progenitores. En els teixits amb una renovació cel·lular alta, les cèl·lules diferenciades i especialitzades tenen una esperança de vida curta i la seva contínua renovació no és possible sense un compartiment de cèl·lules mare que mantinguin la integritat estructural i funcional del teixit, com en el cas de la pell (Miyajima et al. 2014). En el fetge, en canvi, amb una taxa de renovació baixa en una situació fisiològica, la visió més acceptada és que les cèl·lules diferenciades madures com són els hepatòcits i els colangiòcits, tot i tenir un *turnover* (reemplaçament) limitat, podrien regenerar per si mateixes la seva població en resposta a un dany hepàtic per tal de reestablir i mantenir l'homeòstasi del fetge. El paper que jugarien les cèl·lules mare o progenitores hepàtiques en una situació d'homeòstasi no està clara encara, tal com es discutirà en diferents punts d'aquesta tesi doctoral; la visió més acceptada és que aquesta població estaria en quiescència i no seria necessària la seva participació en el *turnover* diari, tot i haver algun estudi a favor de la seva implicació com a mecanisme principal de formació de noves cèl·lules en l'homeòstasi del fetge (Furuyama et al. 2011).

Pel què fa als hepatòcits, en absència de dany, menys d'un 1-2% d'hepatòcits (1 de cada 20.000-40.000) estan en el cicle de divisió cel·lular. La resta es mantenen en un estat quiescent, fent que la renovació sigui contínua però relativament lenta; tenen una esperança de vida de 200-300 dies (Duncan et al. 2009; Stanger 2015). No obstant, aquests hepatòcits retenen la capacitat extraordinària d'entrar de nou en el cicle cel·lular en qualsevol moment, tot i que la seva capacitat de replicar-se decau amb el pas del temps. Per explicar els mecanismes pels quals es donaria aquest turnover hepatocitari, han aparegut diferents hipòtesis, la més coneguda de les quals és l'anomenada "streaming liver hypothesis". Aquesta hipòtesi, proposada el 1985 per Zajicek et al., defensa que el turnover hepatocitari normal s'assemblaria a la regeneració intestinal; els hepatòcits periportals tindrien un potencial replicatiu augmentat respecte a la resta d'hepatòcits i anirien generant hepatòcits joves, que naixerien a la zona portal i anirien migrant cap a la vena central, on moririen; en el temps, tots els hepatòcits que formarien el lobulec hepàtic derivarien d'aquesta població periportal (Zajicek et al. 1985). A més, el diferent patró d'expressió gènica present entre els hepatòcits periportals i pericentrals s'explicaria pel procés de maduració durant la migració; representaria una progressió de llinatge típica. Per tant, en aquest procés, els hepatòcits actuarien com a cèl·lules mare facultatives. Aquesta hipòtesi ha estat recolzada per varis estudis en humans i ratolins (Fellous et al. 2009; Furuyama et al. 2011; Wang et al. 2015). En humans, Fellous et al. van observar àrees d'hepatòcits que presentaven mutacions mitocondrials que s'originaven en

àrees periportals i s'estenien a regions pericentrals, suggerint un patró de diferenciació/moviment d'hepatòcits (Fellous et al. 2009).

En ratolins, Furuyama et al. usant un sistema de seguiment de llinatge cel·lular induïble per tamoxifè en ratolins, van mostrar que en un període comprès entre poques setmanes i varis mesos, les cèl·lules marcades Sox9 positives s'expandien al voltant dels lobulets hepàtics en una direcció portal cap a central, ocupant la quasi totalitat del fetge. Suggestiria, per tant, que la hipòtesi anterior és correcta, i que la massa del parènquima hepàtic en lloc de derivar d'hepatòcits periportals derivaria del petit compartiment biliar, a partir de cèl·lules amb característiques de cèl·lules mare (Furuyama et al. 2011).

No obstant, la majoria d'estudis existents anirien en contra de la hipòtesi proposada per Zecijek et al. En un primer estudi, es van transplantar en un fetge hepatòcits on s'ha induït prèviament l'expressió de β -galactosidasa amb un vector retroviral i es va veure que aquests hepatòcits es mantenen en la mateixa localització durant més d'un any (Bralet et al. 1994). Aquests resultats van ser recolzats per un estudi de seguiment de llinatge cel·lular, en el qual, amb marcatge radioactiu, es mostrava que no hi havia evidències d'un moviment per part dels hepatòcits en una situació d'homeòstasi (Magami et al. 2002). A més a més, un altre punt de la hipòtesi el qual defensa que hi ha un patró d'expressió gènica diferent i un gradient de diferenciació ha estat rebutjat recentment en un estudi. En ell, revertint la direcció del flux sanguini en el fetge, s'inverteix el perfil d'expressió gènica dels hepatòcits. La zonificació, per tant, s'explicaria per una regulació gènica induïda per metabòlits (Thurman et al. 1985) i hi hauria hepatòcits madurs tant en l'àrea periportal com en l'àrea pericentral. Tots aquests estudis no creuen l'existència d'un compartiment principal proliferatiu i serien els hepatòcits en proliferació, distribuïts de manera aleatòria en el parènquima hepàtic, els quals s'encarregarien del turnover hepatocitari, sense actuació de les cèl·lules mare/progenitores.

Finalment, en els darrers temps s'ha estudiat si els hepatòcits generats en homeòstasi provenen de poblacions no hepatocitàries, com serien les CEB (incloent les cèl·lules mare/progenitores del fetge). En estudis recents de seguiment de llinatge on es manté el marcatge en la progènie, es van marcar la pràctica totalitat dels hepatòcits i es va veure que aquests no perdien el marcatge, significat que els hepatòcits no provenen de les CEB (Malato et al. 2011). L'estratègia contrària, marcant les CEB, van arribar a la mateixa conclusió; no van trobar hepatòcits derivats de CEB (Carpentier et al. 2011; Espanol-Suner et al. 2012), en contra del què s'havia dit amb anterioritat (Furuyama et al. 2011).

En conclusió, les evidències actuals donen suport a la divisió in situ d'hepatòcits i de cèl·lules de l'epiteli biliar com a mecanisme primari per a la generació d'elles mateixes en el turnover hepatocitari normal. En aquesta situació, les cèl·lules mare/progenitores del fetge no participarien.

2.2.2 Regeneració del fetge en situacions de dany

Quan el fetge respon a situacions de dany moderat per agents químics que provoquen la pèrdua de cèl·lules, o a una hepatectomia parcial (HPx), on es perd part de la massa hepàtica per l'extracció quirúrgica de varis lòbuls, la situació és reestablerta per la replicació d'hepatòcits i colangiòcits, tal com succeeix en una situació d'homeòstasi. Aquest fet mostra la gran capacitat del fetge per a regenerar-se. No obstant, la HPx és un model en el qual no hi ha dany del teixit hepàtic que queda i se'l considera un model "net" per a estudiar els mecanismes de regeneració. Això és degut principalment a què no presenta semblances respecte a situacions patològiques observades en malalties hepàtiques humanes, en les quals s'observa mort hepatocitària i una inducció de la resposta fibrogènica i inflamatòria (Itoh et al. 2014).

En algunes d'aquestes condicions patològiques cròniques humanes, com en l'hepatitis crònica o en les malalties hepàtiques per alcohol o fetge gras, així com en casos de fallida hepàtica aguda i en models animals de dany hepàtic crònic com l'administració de D-galactosamina, 2-acetilaminoflurà (2-AAF) o les dietes CDE (dieta deficient en colina i suplementada amb etionina) i DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine), la proliferació dels colangiòcits i sobretot, dels hepatòcits queda bloquejada i compromesa. Algunes d'aquestes cèl·lules, fins i tot, entren en senescència, quedant reprimida la seva capacitat regenerativa (Theise et al. 1999; Santoni-Rugiu et al. 2005; Itoh et al. 2014). En aquest punt, un segon mecanisme de regeneració apareixeria en resposta a aquest dany crònic i extensiu, a diferència del què succeïa en resposta a un dany agut: una població de cèl·lules epitelials immadures amb un fenotip intermedi entre hepatòcits i colangiòcits, basat en la seva morfologia i l'expressió de marcadors. Aquestes cèl·lules són conegudes sota el nom de cèl·lules progenitores hepàtiques, i tenen la capacitat de diferenciar-se a hepatòcits i colangiòcits; en aquest tipus de dany crònic emergeixen i s'activen causant la seva expansió. En casos de fallida hepàtica aguda, s'ha vist que la pèrdua de més del 50% del total d'hepatòcits, sumat a una activitat proliferativa d'hepatòcits desencadena la presència de cèl·lules progenitores hepàtiques durant la primera setmana i l'aparició d'hepatòcits en un estadi intermig de diferenciació després de dues setmanes (Katoonizadeh et al. 2006). En la Figura 7

es pot veure un resum del què succeiria en una situació de dany agut en comparació a un dany fulminant o a un dany crònic.

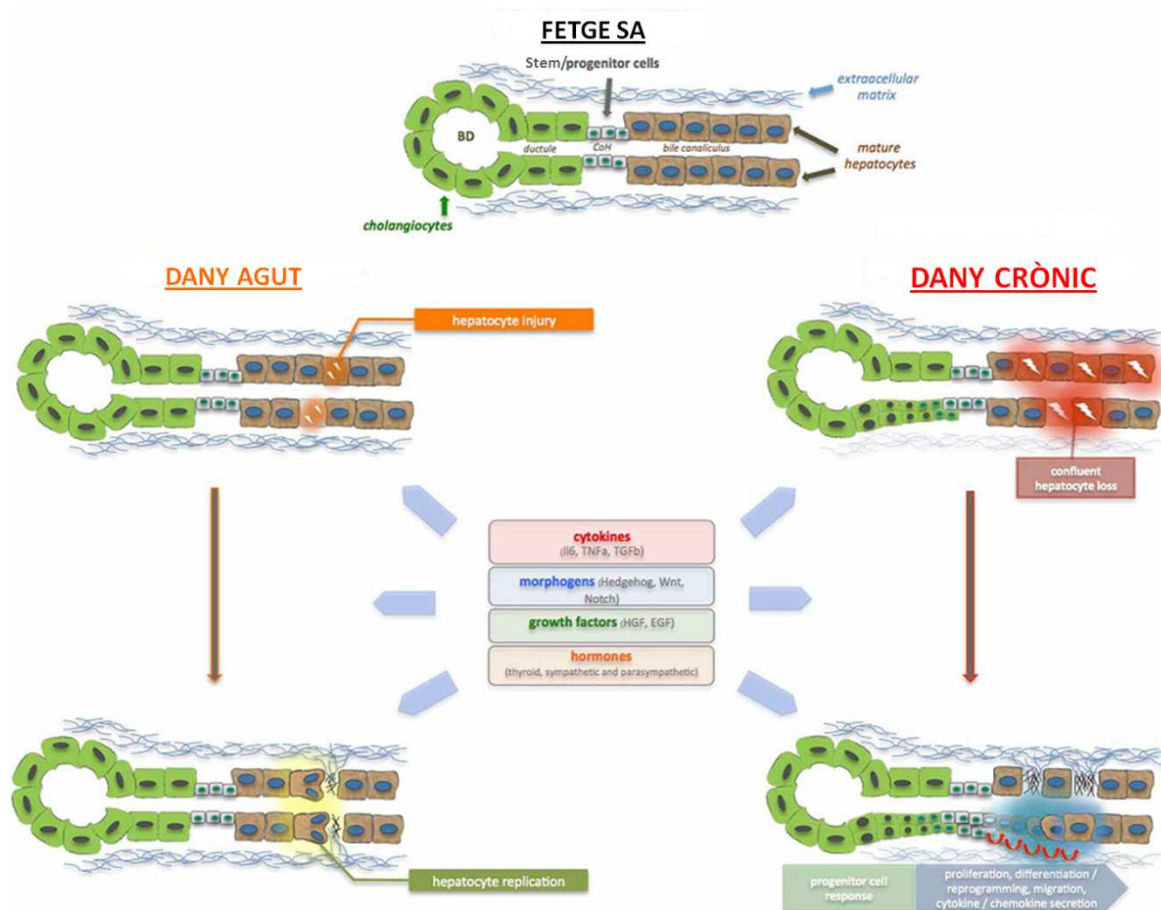


Figura 7. Resposta del fetge davant d'un dany agut o lleu i davant d'un dany fulminant o d'un dany crònic. En situació de dany fulminant o de dany crònic, les cèl·lules progenitores hepàtiques s'activarien i participarien en el procés de regeneració. Modificat de Best et al. 2015.

Es creu que les CPH contribuirien a la regeneració gràcies al seu potencial de diferenciació i jugarien un paper en resistir als efectes del dany en les malalties hepàtiques (Dorrell et al. 2005; Greenbaum et al. 2011a). El fenomen d'expansió d'aquestes cèl·lules, que no s'observa normalment en un fetge sa, se'l coneix sota el nom de reacció ductular (RD) i s'inicia en les àrees portals, des d'on s'expandeix cap a la zona central. Estudis histològics han demostrat que la RD és la hiperproliferació de ductes biliars (serien ductulets reactius) formats per una població heterogènia de poblacions cel·lulars entre les quals estarien les CPH i cèl·lules intermitges en transició que estan en el camí de diferenciar-se cap a hepatòcits o colàngiòcits

(Evarts et al. 1996; Libbrecht et al. 2000a; Behari et al. 2010). És important dir que el grau d'expansió de les cèl·lules progenitores i de la RD correlaciona amb la severitat de la malaltia hepàtica i amb el grau de fibrosi i inflamació (Lowes et al. 1999; Libbrecht et al. 2000b; Roskams et al. 2003).

Remarcar que, tot i que hi hagi l'aparició de les cèl·lules progenitores amb capacitat de diferenciació i regeneració, tant el model de regeneració per hepatòcits com per cèl·lules progenitores no són exclusius; en alguns models de dany s'ha observat la presència tant de cèl·lules progenitores hepàtiques com d'hepatòcits en replicació (Dolle et al. 2010).

2.3 Definició de cèl·lula progenitora hepàtica: història, localització i funcions

Les cèl·lules mare es classifiquen en tres grans grups segons la seva potencialitat: 1) totipotents, presents en el zigot i amb capacitat de donar tots els tipus de cèl·lules diferenciades; 2) multipotents, presents en els embrions, que originen els tres fulls germinals i 3) unipotents, presents en els diferents teixits, on donen un sol llinatge cel·lular diferenciat especialitzat quan ho requereix l'òrgan on es troben. Les cèl·lules mare es defineixen per una sèrie de característiques concretes com són: 1) l'autorenovació (capacitat de patir nombrosos cicles de divisió cel·lular mantenint un estat indiferenciat), 2) la capacitat de diferenciació a cèl·lules especialitzades i 3) la capacitat de contribució en la reconstitució funcional del teixit a llarg termini (Bird et al. 2008). Les cèl·lules mare que es troben en un teixit poden patir dos tipus de divisió: simètrica, en la qual donen dues cèl·lules filles amb característiques de cèl·lula mare, o asimètrica, en la qual donen una cèl·lula mare filla però també una cèl·lula filla diferenciada. Aquestes cèl·lules filles diferenciades se les coneixen com cèl·lules progenitores o cèl·lules amplificades de trànsit, ja que es divideixen ràpidament per a donar cèl·lules encara més diferenciades que aniran a reemplaçar cèl·lules danyades o en senescència del teixit (Vestentoft 2014). Aquestes cèl·lules progenitores presenten un potencial d'autorenovació menor a les cèl·lules mare. A més, presenten una vida mitja més curta que les cèl·lules mare i són reemplaçades regularment per aquestes per a generar noves cèl·lules progenitores (Quante et al. 2009).

Com ja s'ha dit, en òrgans adults amb un turnover cel·lular ràpid és evident la presència de les cèl·lules mare i la importància en proveir l'òrgan de cèl·lules diferenciades noves des del compartiment on resideixen les cèl·lules mares. En canvi, en el fetge, tot i que en etapa fetal es consideren els hepatoblasts com la població de cèl·lules mare del fetge a causa del seu potencial de diferenciació cap a hepatòcits i colangiòcits, en adults la presència i la

naturalitat de les cèl·lules mare o progenitores hepàtiques segueix sent controvertit (Itoh et al. 2014). Com s'ha explicat anteriorment, es creu que en moltes situacions de regeneració hepàtica, aquest procés no depèn de l'actuació de cèl·lules mare o progenitores, sinó per la mitosi de cèl·lules madures com els hepatòcits o els colangiòcits, que actuarien com a cèl·lules mare facultatives (Quante et al. 2009; Michalopoulos 2014). Només en algunes situacions de dany crònic les cèl·lules progenitores/mare hepàtiques tindrien un paper actiu.

La possible presència de cèl·lules mare/progenitores hepàtiques va ser observada per primer cop el 1937, quan es van descriure unes cèl·lules amb forma oval en rates tractades amb l'azoderivat carcinogènic "Butter Yellow" (Kinosita 1937). El 1956, Farber va introduir el concepte de cèl·lula oval per aquesta població, després d'observar en rates unes cèl·lules ovoides petites en comparació a hepatòcits amb un citoplasma escàs basofílic i un ratio nucli/citoplasma elevat després de tractar-les amb agents carcinogènics (Farber 1956). Aquestes cèl·lules ovals, d'uns 10 µm de diàmetre, proliferen en la regió periportal hepàtica i a mesura que progressa el dany hepàtic, s'expandeixen transitòriament i s'infiltraen en el parènquima al llarg del canalicle biliar entre les cordes hepàtiques (Farber 1956). Més tard, es va mostrar la proliferació d'aquestes cèl·lules en les zones ductulars, que donaven lloc a hepatòcits i nous ductes biliars interlobulars en ratolins tractats amb una dieta rica en metionina i suplementada amb bentonita (Wilson et al. 1958). Aquest estudi suggerí per primer cop la presència d'un compartiment reservori de cèl·lules progenitores bipotencials o cèl·lules mare en el fetge.

Moltes incògnites en torn a l'origen, la identitat, les característiques i la funció que realitzen aquestes cèl·lules han anat apareixent al llarg dels anys a mesura que s'ha anat ampliant el coneixement que es té sobre elles. Per exemple, els models emprats en rata per induir aquestes cèl·lules són diferents quan a mecanisme de dany i fenotip observats als de ratolins i cada cop més es creu que les cèl·lules obtingudes en els diferents models no són exactament les mateixes. Per tant, sota el nom de cèl·lula oval s'estan classificant diferents subtipus cel·lulars de diferents espècies amb diferent potencialitat provinents de diferents danys hepàtics, i no es té clar que puguin ser comparables. El mateix succeiria en humans, on tot i presentar una similitud considerable, presenten una sèrie de propietats i expressió de marcadors diferents i per això s'ha suggerit no usar el terme cèl·lula oval en humans (Roskams et al. 2004). En resum, s'ha suggerit que les cèl·lules ovals, que també han rebut altres noms com hepatòcits ductulars, cèl·lules hepatobiliars intermitges (emprat en humans) o cèl·lules ductulars atípiques, se les anomenin tal com es fa en humans, és a dir, cèl·lules progenitores del fetge (en anglès, anomenades liver progenitor cells (LPC)), englobant totes les poblacions

suposades de cèl·lules mare/progenitores que s'observen en el fetge sense importar espècie o model animal (Gerber et al. 1983; Factor et al. 1994; Preisegger et al. 1999; Jensen et al. 2004; Zhou et al. 2007; Miyajima et al. 2014). És més, encara hi ha dubte si són la mateixa població les cèl·lules mare residents que hi serien en un fetge normal, les cèl·lules mare/progenitores facultatives presents en un fetge danyat, la cèl·lula d'origen d'aquestes cèl·lules facultatives, i les cèl·lules descrites com a cèl·lules mare potencials definides *in vitro*.

Una altra controvèrsia que existeix al voltant d'aquestes cèl·lules és si serien realment cèl·lules mare del fetge o si per contra les cèl·lules que veiem són progenitores que provenen d'una cèl·lula mare. Per tant, no està clara la nomenclatura per definir-les. Alguns investigadors les consideren cèl·lules mare; d'altres, les consideren com a cèl·lules mare facultatives, és a dir, actuarien com a cèl·lula mare quan és necessari i que són identificades només en condicions de dany. D'altres consideren que són progenitores activades (ja que tenen un potencial limitat per diferenciar-se a hepatòcits i colanigòcits) en situacions de dany i les quals tenen origen en una cèl·lula mare del fetge present en un fetge sa (Cantz et al. 2008; Itoh et al. 2014).

S'ha arribat al consens d'anomenar-les cèl·lules progenitores hepàtiques, tot i que no és un terme del tot correcte ja que per definir-les com a progenitores implicaria que provenen d'una cèl·lula mare pròpia del fetge i aquesta població no s'ha identificat en el fetge ni per microscòpia com un element histològic corrent en els lòbuls hepàtics, ni per tècniques de dissociació tissular. Si de veritat existissin es trobarien en un número molt petit i encara no se sap com actuen en una situació fisiològica (Michalopoulos 2014). Les cèl·lules progenitores hepàtiques, o les anomenades cèl·lules ovals en animals, per tant, serien totes les cèl·lules proliferants amb un fenotip mixt hepatobiliar (expressen marcadors d'hepatòcits i colangiòcits) observades en ratolins, rates i humans presents en els canals de Hering.

Aquestes CPH serien una població de progenitores/mare facultatives que estarien absents en un fetge sa i que emergirien només en situacions específiques de dany activant-se i proliferant (a partir de cèl·lules mare que estarien quiescents en el arbre biliar d'un fetge normal i s'activarien en situacions de dany). Aquesta activació es donaria principalment quan els hepatòcits madurs, en trobar-se en senescència o arrest cel·lular a causa de toxines com l'alcohol, així com els colangiòcits, no poden restaurar la seva pròpia població i no són capaços de reparar i regenerar el fetge danyat (Golding et al. 1996; Kaur et al. 2015). Aquestes cèl·lules amplificades de trànsit o progenitores tenen capacitat bipotencial i poden diferenciar-se a

hepatòcits i colangiòcits, i contribuirien a la formació de noves cèl·lules d'ambdós tipus cel·lulars (Tirnitz-Parker et al. 2007).

En humans, existeixen dues visions de com anirien evolucionant les CPH fins a diferenciar-se cap a hepatòcits i colangiòcits. Alguns autors afirmen que el fetge està comprès per un llinatge d'estadis estables intermitjos de maduració de cèl·lules mare. Cada estadi és una entitat diferent que té una mida i un patró d'expressió gènica distingible amb els altres. Aquests estadis s'inicien amb les cèl·lules mare, seguit per hepatoblasts (estadi 2) i cèl·lules progenitores compromeses a un destí colangiocític i hepatocític (estadi 3); els hepatòcits correspondrien al darrer estadi, el vuitè; el de colangiòcits encara no s'ha definit (Turner et al. 2011). En canvi, la majoria de grups creuen que la generació d'hepatòcits i colangiòcits a partir de cèl·lules CPH primitives és una diferenciació progressiva en què les mateixes CPH van variant el seu fenotip, madurant, i canviant els marcadors que expressen (Libbrecht et al. 2002).

Els canals de Hering, on es creu que localitzarien les CPH, són les branques més petites i perifèriques de l'arbre biliar intrahepàtic que connectarien el sistema canalicular de la bilis amb els ductes biliars interlobulars (Roskams et al. 2004). És una unitat tubular que es considera la zona transicional entre els hepatòcits que, envoltant els canalicles, drenen la bilis cap als ductes intrahepàtics interlobulars formats per colangiòcits, que es troben a l'altra banda (Yanger et al. 2011). Es creu que les CPH representarien restes de la placa ductal embrionària generada a partir d'hepatoblasts, i que aquesta placa observada en etapa fetal i neonatal es convertiria en els canals de Hering observats en etapa adulta (Zhang et al. 2008).

Finalment, remarcar que tot i que la visió general i acceptada és que les CPH venen d'un precursor d'origen intrahepàtic situat en el canal de Hering, alguns estudis suggereixen que altres tipus de cèl·lules madures donen lloc a CPH. Així, els hepatòcits, a través d'un procés de reprogramació i/o transdiferenciació, o les CEH o els miofibroblasts, mitjançant un procés de transició mesènquima-epiteli, podrien ser capaces d'actuar com a CPH per a contribuir a la regeneració hepàtica (Yang et al. 2008; Yanger et al. 2013; Kordes et al. 2014; Swiderska-Syn et al. 2014). No obstant, els estudis recolzant el paper de les CEH i miofibroblasts com a precursors de CPH s'han posat en dubte (Mederacke et al. 2013). D'altres estudis han suggerit un origen extra-hepàtic de les CPH, concretament, en les glàndules peribiliars de l'arbre biliar extrahepàtic (Cardinale et al. 2011) o a partir de cèl·lules derivades del moll de l'os (Petersen et al. 1999; Sell 2001), tot i que aquest últim origen també ha estat posat en dubte.

2.3.1 Aïllament de les cèl·lules progenitores hepàtiques

Per tal d'entendre millor la fisiologia i el rol que tenen les cèl·lules progenitores hepàtiques és imprescindible el seu aïllament. Aquestes cèl·lules, tot i representar un percentatge molt baix del total de cèl·lules hepàtiques, poden ser aïllades emprant algunes de les seves propietats com poden ser la seva mida, la seva densitat, l'antigenicitat, i les seves funcions. Tot i que els primers intents d'aïllar CPH es basaven en l'elutriació per separar físicament les cèl·lules d'interès segons la seva densitat i mida (Overturf et al. 1999), actualment l'aïllament es basa aprofitant el reconeixement de molècules (o activitats) que estan sobreexpressades en les cèl·lules progenitores. Els marcadors sobreexpressats en la pràctica totalitat són marcadors de superfície cel·lular. Les dues metodologies més emprades actualment són el MACS (Magnetic activated cell sorting) i el FACS (Fluorescence-activated cell sorting): amb elles podem separar i obtenir poblacions enriquides de CPH gràcies a la combinació d'anticossos que detecten marcadors de cèl·lules progenitores. Molts d'aquests marcadors s'han descrit per primer cop en estudis histològics, no obstant, en el fetge, trobem el problema que no existeix un marcador específic per a identificar aquestes cèl·lules, ja que els comparteixen majoritàriament amb els colangiòcits.

Per tal de demostrar que les cèl·lules posseeixen propietats i activitat de progenitores, cal que les poblacions obtingudes puguin dividir-se i diferenciar-se a varis llinatges (bipotencialitat). En un dels primers estudis realitzats mitjançant la tècnica de FACS, es van obtenir "cèl·lules epitelials formadores de colònies" a partir de fetges fetals de ratolí. Aquesta població multipotent, caracteritzada per ser c-kit⁻, CD45⁻, c-met⁺, Ter119⁻ i CD49f^{+/baix}, tenia una gran capacitat proliferativa i tenien capacitat *in vitro* de diferenciar-se a hepatòcits i colangiòcits (Suzuki et al. 2002). Malgrat tot, en les condicions de cultiu on creixien les cèl·lules fetals no podien formar-se colònies a partir de cèl·lules obtingudes en fetges adults i va ser necessari canviar les condicions de cultiu per obtenir colònies a partir de fetges de ratolí adult. Aquestes cèl·lules es van separar per citometria de flux mitjançant el marcador general de cèl·lules mare CD133 (anomenat també prominina-1 (PROM1)), i no presentaven ni CD45 ni Ter119. Aproximadament un 1% de les cèl·lules CD133⁺, CD45⁻, Ter119⁻ obtingudes de ratolins tractats amb la dieta DDC s'expandien i eren capaces de formar colònies grans *in vitro*; si eren aïllades d'un ratolí sa només formaven colònies petites (Suzuki et al. 2008). En humans, també s'han observat cèl·lules que expressen tant EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) com CD133 (Cluster of differentiation 133) capaces de formar colònies. El què és important és que com a molt un 0,1% de les cèl·lules EpCAM positives formaven colònies, indicant que només una subpoblació petita tenia activitat progenitora. La majoria de cèl·lules dels ductes biliars

són positives per aquests marcadors, i és improbable que totes siguin progenitores (Zhang et al. 2008). Això, sumat als resultats obtinguts en ratolins, és una mostra més que les cèl·lules progenitores són un subconjunt de la població de cèl·lules ductals (Duncan et al. 2009).

A mesura que s'ha anat ampliant el coneixement que es té sobre les CPH, nombrosos estudis han anat perfeccionant les tècniques d'aïllament i de cultiu de cèl·lules progenitores hepàtiques en ratolí, rata i humà per tal de poder caracteritzar-les millor. En ratolí, inicialment es van aïllar cèl·lules bipotencials d'embrions de ratolins, obtingudes al plantar les cèl·lules dissociades en unes condicions de cultiu concretes. Al cap d'unes setmanes, mentre els diferents tipus cel·lulars degeneraven, apareixien colònies de cèl·lules les quals tenien capacitat bipotencial per a diferenciar-se a hepatòcits i colangiòcits (Strick-Marchand et al. 2004). Aquestes cèl·lules han servit en estudis posteriors per a identificar nous marcadors (Ochsner et al. 2007).

Estudis posteriors han aïllat poblacions amb característiques de progenitores en fetges adults sans mitjançant propietats d'aquestes cèl·lules. Així, mitjançant la capacitat d'agregació cel·lular que tenen aquestes cèl·lules, es va poder aïllar una població que creixia i madurava cap al llinatge hepatocitari, indicant que eren progenitores (Azuma et al. 2003). La gran majoria d'estudis, però, s'han basat en la citometria de flux per aïllar. Alguns s'han basat en l'activitat aldehyde dehydrogenase (ALDH), característica observada en força tipus de cèl·lules progenitores, per obtenir tant de fetges sans de ratolí, com de mostres humanes, cèl·lules enriquides en marcadors de cèl·lules mare com EpCAM, CD133, Krt19 i Sox9 ((Sex Determining Region Y)-Box9) que es diferenciï cap a hepatòcits *in vitro* (Dolle et al. 2012). D'altres estudis, simplement s'han basat en un o més marcadors per a aïllar-les. Així, Kamiya et al. van trobar cèl·lules progenitores en la població CD13⁺, CD49f⁺, CD133⁺ obtinguda de fetges postnatsals sans (Kamiya et al. 2009). Després de dany hepàtic per dieta DDC, també s'ha obtingut cèl·lules CD133⁺, CD45⁻ amb capacitat bipotencial (Rountree et al. 2007).

Alguns estudis, en canvi, han separat poblacions de progenitores en les dues situacions, tant en fetge sa com en fetges danyats per dieta DDC. Mitjançant la separació de cèl·lules per positivitat per EpCAM en les dues condicions, es va veure que les cèl·lules obtingudes a partir d'un fetge danyat presentaven major proliferació que les d'un fetge sa. Les cèl·lules obtingudes a partir de fetge danyat formen colònies *in vitro* i poden donar tant hepatòcits com colangiòcits. No obstant, observen només petites diferències en la formació de colònies i en el patró d'expressió de marcadors de superfície entre les cèl·lules de fetge sa i de fetge danyat, indicant que les cèl·lules altament proliferatives que s'observen en major

nombre en la dieta DDC són cèl·lules progenitores i no cèl·lules mare (Okabe et al. 2009). En un altre estudi es van separar cèl·lules progenitores bipotencials $CD45^-/CD11b^-/CD31^-/MIC1-1C3^+/CD133^+/CD26^-$, tant de fetge sa com de fetge tractat amb dieta DDC (Dorrell et al. 2011). Aquest estudi destaca per obtenir per primer cop cèl·lules de fetges sans i de fetges amb dany on s'ha activat una resposta de cèl·lules ovals que tenen capacitat clonogènica, és a dir, amb capacitat de formar colònies a partir d'una sola cèl·lula *in vitro*. Van observar com aquestes cèl·lules expressaven Sox9, marcador àmpliament descrit en cèl·lules del ducte biliar i que participa en la regulació del desenvolupament. A continuació, van emprar un ratolí de seguiment de llinatge Sox9creERT2-R26RYFP i van veure que les cèl·lules que proliferaven en dany per DDC (es tractava d'una proliferació de ductes biliars) eren la progènie de les cèl·lules Sox9 positives (Dorrell et al. 2011).

Recentment, han aparegut dos estudis que aïllen cèl·lules mare/progenitores hepàtiques mitjançant l'ús de marcadors que tenen la particularitat de no expressar-se en un fetge sa i només s'expressen en situació de dany, tal com s'explicarà més endavant. En un d'ells, usen un ratolí transgènic Foxl1-Cre; RosaYFP i aïllen gràcies a la proteïna fluorescent YFP, les cèl·lules bipotencials clonogèniques Foxl1 (Forkhead Box l1) positives que només s'observen en situacions de dany hepàtic com la DDC; aquestes cèl·lules presenten capacitat d'expandir-se i diferenciar-se *in vitro* (Shin et al. 2011). L'altre estudi, emprant un ratolí Lgr5-IRES-creERT2, Rosa26-lacZ i observen *in vivo* com les cèl·lules Lgr5 (Leucine-Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5) positives donen lloc a hepatòcits i colangiòcits. Un cop aïllades de ratolins tractats amb tetraclorur de carboni, s'expandeixen clonalment i formen *in vitro* grups de cèl·lules organitzades de forma semblant a un òrgan anomenats organoids. Els organoids mantenen força característiques de l'arquitectura epitelial original, adoptant una forma semblant a la del conducte cístic i poden *in vitro* formar hepatòcits funcionals (Huch et al. 2013). El principal problema d'aquests dos marcadors és que no poden identificar la població de la qual provenen al no expressar-se en un fetge sa.

En rates, els procediments emprats per aïllar cèl·lules considerades com a progenitores no difereixen gaire dels emprats en ratolí. S'han aïllat tant a partir de rates sanes (mitjançant unes condicions de cultiu concretes i sense l'ús de la citometria de flux) com a partir de rates que han patit HPx en combinació amb 2-AAF, o injecció de D-galactosamina per tal d'induir les CPH. S'han aïllat tant amb marcadors per citometria de flux (Yovchev et al. 2007; Sahin et al. 2008) com per centrifugacions per gradient de densitat (He et al. 2003). En un estudi a partir de rates sanes, observen que les cèl·lules obtingudes per cultiu són bipotencials i expressen tant marcadors hematopoètics (CD45, CD34 i Thy-1) com marcadors endodermals/hepàtics

(TTR, HNF3 β i c-met). No obstant, no expressaven marcadors descrits en progenitores com Oval cell marker-6 (OV-6), KRT7, KRT19 i AFP (Sahin et al. 2008). En els estudis en rates amb dany, van aïllar CPH mitjançant un gradient de densitat o per positivitat per EpCAM gràcies a la citometria de flux i van identificar nous marcadors de superfície entre els quals destaquen proteïnes d'unions estretes, integrines, cadherines, receptors, canals de membrana i molècules d'adhesió cel·lular. Aquesta identificació ha permès crear noves eines per a aïllar aquestes cèl·lules. A més, mencionen que les cèl·lules progenitores tindrien un fenotip mixt epitelial/mesenquimal, a l'expressar marcadors de mesenquimals com vimentina (Yovchev et al. 2007; Yovchev et al. 2008).

Finalment, mencionar que també s'han pogut aïllar poblacions de progenitores en humans. De tots els estudis publicats, destacar-ne dos. En l'estudi d'Herrera et al. les aïllaven deixant que formessin colònies i així van obtenir una població pluripotent semblant a les cèl·lules ovals de ratolí però que presentaven l'expressió de marcadors de mesenquimals però no d'hematopoiètiques. Sorprenentment, aquestes cèl·lules no presentaven alguns marcadors de cèl·lules mare/progenitores com la KRT19 (Herrera et al. 2006). En canvi, en un altre estudi, van emprar un marcador ja utilitzat en ratolí i rata com és EpCAM, per tal d'aïllar i cultivar cèl·lules a través d'immunoselecció magnètica a partir de fetges de fetus i de donants adults. Van observar com en fetges fetals la població de cèl·lules EpCAM (considerades com hepatoblasts en la seva majoria) és molt més elevada respecte a donants adults (considerades com cèl·lules mare; menys d'un 0,1% del total són hepatoblasts). La caracterització de les dues poblacions cel·lulars va permetre trobar diferències en el seu fenotip, destacant l'absència de l'expressió d'AFP, albúmina i ICAM-1 en les cèl·lules provinents d'adults. Aquestes cèl·lules mare adultes presenten capacitat bipotencial i poden autorenovar-se (Schmelzer et al. 2006; Schmelzer et al. 2007) .

Remarcar que EpCAM és un dels marcadors més emprats per aïllar CPH en humans, prova d'això és la seva utilització en estudis posteriors en què s'han aïllat progenitores de fetges sans (Huch et al. 2015), fetges cirròtics amb atresia biliar (Yamazaki et al. 2012), així com per establir una línia de progenitores estable no maligna EpCAM positiva/CD133 negativa (Hao et al. 2013). Tot i identificar nous marcadors de les CPH, encara no es disposa d'un marcador específic que permeti separar aquestes cèl·lules dels colangiòcits. El més plausible és que s'estiguin aïllant diferents subpoblacions cel·lulars, o progenitores amb diferents graus de maduració, d'aquí la importància d'identificar algun marcador únic per a separar-les. Finalment, el fet que molts estudis hagin definit les CPH i moltes de les seves característiques

en cultiu no explicaria com es comportarien sota condicions fisiològiques. A més, pel sol fet de fer-les créixer en cultiu o pels efectes dels factors de creixement que s'utilitzen per a cultivar-les, pot fer que adoptin propietats adquirides de nou i tinguin propietats de cèl·lula mare/progenitores que no tindrien *in vivo*.

2.3.2 Caracterització de les cèl·lules progenitores hepàtiques

Per tal de buscar l'origen de les cèl·lules progenitores hepàtiques, així com definir quines vies funcionals estan implicades en la seva regulació i la seva participació en processos de regeneració, ha estat important la caracterització d'aquestes cèl·lules. Aquesta caracterització s'ha donat principalment mitjançant dos procediments: a través d'estudis immunohistològics i a partir de l'aïllament de cèl·lules progenitores, descrit en profunditat en l'apartat anterior. En els últims anys, l'aparició de tècniques noves com el microarray o la microdissecció i catapulta per pressió (en anglès laser capture microdissection o LCM; permet seleccionar i analitzar cèl·lules o àrees d'interès obtingudes a partir de talls histològics) ha permès descobrir nous gens que podrien ser d'interès per a trobar marcadors nous i que poguessin jugar un paper en la seva regulació/funció.

A partir de l'anàlisi de l'expressió de marcadors de les CPH, s'ha suggerit que les cèl·lules progenitores constitueixen una població de cèl·lules heterogènia, trobant des de cèl·lules amb un fenotip immadur fins a cèl·lules compromeses amb un fenotip intermig. Nombrosos són els marcadors que s'han descrit i associat a les CPH, no obstant, la majoria d'aquests marcadors no són únics i exclusius per aquesta població i s'ha vist com la seva expressió és compartida amb colangiòcits i/o hepatòcits, i fins i tot amb els hepatoblasts embrionaris. Com ja hem dit anteriorment, tot i haver marcadors associats a CPH que s'han descrit en d'altres òrgans on sí s'ha localitzat una població de cèl·lules mare, falta trobar marcadors per identificar les CPH més immadures. El fet de no trobar marcadors exclusius fins avui suggereix la característica d'una progressiva diferenciació de les progenitores en la qual van variant els seus marcadors d'expressió i la seva morfologia, i reflectiria l'heterogeneïtat fenotípica d'aquesta població (Dorrell et al. 2005; Bird et al. 2008). A més, el fenotip varia segons la malaltia hepàtica i la severitat de la malaltia (Kaur et al. 2015). Per tant, a partir de les tècniques d'aïllament actuals no és possible obtenir una població de CPH pura. Tot i així, s'han emprat nombrosos antígens per tal d'identificar poblacions enriquides amb cèl·lules amb característiques de progenitores tant en fetge sa com en fetge danyat.

En base als nombrosos estudis de caracterització, les cèl·lules progenitores es caracteritzen per presentar un fenotip de transició entre hepatòcits i cèl·lules biliars: coexpressen marcadors de l'epiteli biliar com keratina 7 i 19 (KRT7 i KRT19) i marcadors d'hepatòcits com albúmina, KRT8 i KRT18, a més d'expressar marcadors associats a cèl·lules mare com c-kit (Fujio et al. 1994), CD34 (Baumann et al. 1999), Sca-1 (Stem cells antigen-1) (Petersen et al. 2003), CD133 (Rountree et al. 2007), EpCAM (Okabe et al. 2009) Sox9 i NCAM (Neural cell adhesion molecule), entre d'altres (Yovchev et al. 2007; Kaur et al. 2015). Alguns d'aquests marcadors, com CD34, Sca-1, Thy-1 (Thy-1 Cell Surface Antigen) o CD133 són compartits amb cèl·lules hematopoietiques (Dolle et al. 2010). Tot i ser cèl·lules epitelials, les CPH també poden mostrar característiques de mesenquimals, dependent del seu estat d'activació (per exemple, per tenir capacitat de migrar). Això queda reflectit amb l'expressió de certs marcadors com CD29 (o integrina $\beta 1$) o CD44 (receptor de l'àcid hialurònic), proteïnes involucrades en interaccions cèl·lula-matriu i crítiques per a la migració cel·lular (Darwiche et al. 2010). En la Taula 1 es pot veure un petit resum d'alguns dels marcadors descrits en les CPH, identificats a partir de nombrosos estudis realitzats en diverses espècies: en humans (Roskams et al. 1998; Herrera et al. 2006; Schmelzer et al. 2007), en rata (Yovchev et al. 2007; Yovchev et al. 2008) i en ratolí (Okabe et al. 2009; Dorrell et al. 2011; Shin et al. 2011). Aquests estudis han permès ampliar de manera considerable el número de marcadors coneguts sobre les CPH.

Marcador	Ratolí	Rata	Humà
A6	x		
AFP		x	x
Alb	x		x
Dlk-1	x	x	
c-kit		x	x
CD24	x		
CD29		x	x
CD34		x	
CD44	x	x	x
CD133/PROM1	x	x	x
Claudin-3			x
E-cadherin	x		
EpCAM	x	x	x
Foxl1	x		
FN14	x	x	x
Glypican-3		x	
HNF4 α		x	
ICAM1			x
KRT7	x	x	x
KRT8			x
KRT18			x
KRT19	x	x	x
Lgr5	x		
MPK		x	
NCAM			x
OPN	x		
OV6		x	x
Sca1	x		
SOX9	x		

Taula 1. Principals marcadors descrits en les cèl·lules progenitores hepàtiques. Modificat de Kruitwagen et al. 2014.

En els darrers anys, múltiples estudis han descrit nous marcadors per a caracteritzar-les. *In vivo*, el marcador més acceptat i emprat per les progenitores és A6, que identifica cèl·lules de la reacció ductular, i marca també hepatòcits de nova formació, tot i no saber quin epítot és (Preisegger et al. 1999). No obstant, ens trobem amb el problema que aquest marcador només es troba present en ratolí i no permet identificar les progenitores ni en rata ni en humans. El mateix succeeix amb altres marcadors com AFP o OV-6, els quals són presents en les progenitores de rata i d'humà, però no en les de ratolí; o Dlk1 (delta-like homolog 1), (Roskams et al. 1998; Jensen et al. 2004; Tanimizu et al. 2004; Jernes et al. 2007) que es troba en rates però no en ratolí. Aquest fet demostra que les cèl·lules progenitores de ratolí difereixen en el perfil d'expressió gènica respecte a les d'humans i rata (Duncan et al. 2009).

Finalment, remarcar que altres estudis s'han centrat en obtenir nous marcadors que permetin separar entre les diferents subpoblacions presents en la resposta de CPH en ratolí. En ells, es van identificar un panell de nous anticossos monoclonals, incloent MIC1-1C3 (macrophage inhibitory cytokine-1-1C3), que permeten discernir entre les cèl·lules ovals ductals i les ovals periductals (Dorrell et al. 2011). D'altres estudis en ratolins han identificat marcadors que no s'expressarien en les CEB en un fetge sa i presentarien la particularitat que només s'expressen en les cèl·lules amplificades de trànsit o progenitores que apareixen després d'un dany. D'entre aquests marcadors, destaquen Foxl1, LGR5 o TACSTD2/TROP2 (Tumor-associated calcium signal transducer 2), que segons els autors de l'estudi permet separar les cèl·lules ovals de ratolí dels colangiòcits normals (Okabe et al. 2009; Sackett et al. 2009; Huch et al. 2013).

2.3.2.1 Hepatocyte nuclear factor-1-beta (HNF1 β)

Un dels factors presents en les cèl·lules de l'epiteli biliar és l'hepatocyte nuclear factor-1-beta (HNF1 β). HNF1 β és un factor de transcripció homeobox codificat pel gen *HNF1B*, localitzat al cromosoma 17, que pot actuar o bé com a homodímer o bé com a heterodímer amb HNF1 α (Edghill et al. 2006; Kato et al. 2009). Pertany a la família dels factors nuclears hepatocitaris, que són reguladors transcripcionals claus en el desenvolupament embrionari i fetal del fetge, així com en la diferenciació del sistema biliar. En concret, s'ha vist la participació de HNF1 β en la regulació funcional i transcripcional no només en el fetge, especialment en el sistema biliar, sinó en d'altres òrgans com els ronyons, el sistema urogenital i les cèl·lules β del pàncrees (Kotalova et al. 2015).

Com s'ha dit, HNF1 β juga un paper clau en l'organogènesi dels embrions en mamífers i en peix zebra (Coffinier et al. 1999; Sun et al. 2001). En el pàncrees, la seva expressió està restringida als ductes embrionaris i a les cèl·lules ductals adultes (De Vas et al. 2015). Mitjançant la tècnica de seguiment de llinatge s'ha observat que les cèl·lules HNF1 β embrionàries dels ductes epitelials pancreàtics són precursoras dels llinatges ductal i endocrí del pàncrees, però no de l'acinar (Solar et al. 2009).

En el fetge, HNF1 β s'expressa en el diverticle i en el brot hepàtic, així com en la vesícula biliar embrionària i en els ductes biliars intrahepàtics. A més a més, co-regula la morfogènesi del sistema biliar i la seva expressió es manté en el fetge adult (Kotalova et al. 2015). S'ha vist que és imprescindible en la diferenciació epitelial de l'endoderm, i la seva inactivació causa la mort embrionària en la fase de gastrulació (Barbacci et al. 1999; Coffinier et al. 1999). En embrions deficients en HNF1 β , la formació del brot és defectiva i no es dona l'engruiximent de l'endoderm hepàtic i l'expressió de certs gens hepàtics, per tant, seria indispensable per a l'inici del desenvolupament del fetge: seria necessari per a l'especificació cap a fetge i per a la formació del brot (Lokmane et al. 2008).

Mitjançant la inactivació específica de HNF1 β en hepatòcits i en ductes biliars gràcies al sistema Cre/LoxP, es va veure que ratolins sense HNF1 β presentaven icterícia, donat que mostraven anomalies en la vesícula biliar i en els ductes biliars intrahepàtics. D'altra banda, també s'observà una reducció important en el número dels ductes biliars intrahepàtics més petits, segurament causat per errors en l'organització de les estructures ductals durant l'organogènesi. Finalment, van veure una displàsia en l'epiteli dels ductes biliars hepàtics més grans. Tot plegat, demostrà que HNF1 β juga un paper essencial en la diferenciació dels ductes biliars intrahepàtics, en la formació d'un sistema biliar funcional, així com tenir un possible paper en la regulació de característiques fonamentals de l'epiteli com el creixement en monocapa, en la proliferació i en la diferenciació d'algunes cèl·lules epitelials (Coffinier et al. 2002).

En un altre estudi, mitjançant la inactivació d'un altre factor nuclear hepatocitari com és HNF6, van veure que tant HNF6 com HNF1 β s'expressaven en les CEB que formen les plaques ductals i que l'expressió d'HNF6 era necessària per a l'expressió de HNF1 β en les CEB durant la formació de la placa ductal i fins al final de la gestació. Conclouen que la via HNF6 $\rightarrow$ HNF1 β controlaria la formació de la placa ductal i el desenvolupament del ducte biliar intrahepàtic (Clotman et al. 2002). Aquests dos gens estarien sota el control de C/EBP α , que indueix la seva expressió i dirigiria la diferenciació cap al llinatge biliar (Yamasaki et al. 2006)

En el fetge adult, HNF1 β s'expressa en nivells elevats en el nucli de les CEB i és un dels marcadors més emprats per a identificar-les. En situacions de dany, com és en el cas en rata per acció de 2-AAF, en la qual s'indueix una resposta mitogènica en cèl·lules ductals, l'expressió de HNF1 β augmenta en aquestes cèl·lules i es veu la seva expressió tant en CEB com en cèl·lules ovals, suggerint que la família dels HNF1 tenen un paper important en l'activació de les cèl·lules ovals (Nagy et al. 1994; Bisgaard et al. 1996). Mitjançant un ratolí HNF1bCreERT2, es va veure que les estructures ductulars periportals derivaven de cèl·lules HNF1 β ; aquestes cèl·lules són les que donarien lloc a la reacció ductular (Jeliazkova et al. 2013; Rodrigo-Torres et al. 2014). A més a més, s'ha vist que HNF1 β regula l'expressió de gens associats a cèl·lules mare/progenitores com l'osteopontina (OPN), Sox9, CD24 i CD44 (Senkel et al. 2005; Akasaka et al. 2013; Yu et al. 2015). Finalment, s'ha observat que només introduint Hnf1 β , juntament amb Foxa3, a cèl·lules fibroblàstiques embrionàries de ratolí, poden ser reprogramades i donar lloc a cèl·lules semblants a hepatoblasts (anomenades pels autors cèl·lules mare hepàtiques), amb capacitat bipotencial per a donar hepatòcits i colangiòcits (Yu et al. 2013). Tot plegat, suggereix que HNF1 β podria jugar un paper en la regulació de les cèl·lules mare/progenitores del fetge.

Tot i que en fetges normals de rates s'ha descrit l'expressió de HNF1 β en els nuclis de les cèl·lules biliars però no en el d'hepatòcits (Limaye et al. 2010), s'han observat resultats diferents tant en ratolí, on s'ha vist expressió d'HNF1 β en hepatòcits periportals en adult (Coffinier et al. 2002; Yamasaki et al. 2006), com en fetges normals humans (Isse et al. 2013). Mitjançant marcatge múltiple i tècniques d'imatges d'alta resolució, es van identificar en els fetges humans, a part de les cèl·lules biliars HNF1 β^{alt} /KRT19 $^+$ /HNF4 α^{baix} i cèl·lules en el canal de Hering HNF1 β^{alt} /KRT19 $^{\text{dèbil}}$ /HNF4 α^{baix} , dues subpoblacions d'hepatòcits periportals a tocar del ducte biliar que podrien derivar de les cèl·lules del canal de Hering i que expressarien HNF1 β , tot i ser hepatòcits; una amb el nucli més ovalat HNF1 β^{baix} /KRT19 $^-$ /HNF4 α^{alt} i l'altre amb el nucli arrodonit com si foren hepatòcits madurs que serien també HNF1 β^{baix} /KRT19 $^-$ /HNF4 α^{alt} (Isse et al. 2013).

El fet que HNF1 β tingui un paper essencial en la formació de l'arbre biliar fa que possibles mutacions o delecions d'aquest gen provoqui malalties o conseqüències importants, tal com s'ha vist en ratolins en etapa embrionària. En humans, delecions o mutacions heterozigòtiques en HNF1 β provoca quists renals o síndrome diabètic (Roelandt et al. 2012). En el fetge, mutacions heterozigòtiques de HNF1 β poden resultar en malformacions de la placa ductal i en colèstasi (Raynaud et al. 2011). Aquesta colèstasi podria estar causada per la manca de cilis primaris normals en colangiòcits (Roelandt et al. 2012). A més a més, en una

colangiopatia colestàstica com és la síndrome Alagille, provocada per un desordre genètic de la via de Notch, i caracteritzat per l'absència de cèl·lules reactives ductulars i per presentar menor fibrosi, les cèl·lules hepatobiliars no expressen HNF1 β . Aquesta manca de HNF1 β provoca que s'acumulin cèl·lules hepatobiliars però hi hagi una manca de cèl·lules reactives dels ductes biliars intrahepàtics; la manca de HNF1 β provoca que les cèl·lules hepatobiliars siguin incapaces de canviar a un fenotip biliar (Fabris et al. 2007).

Finalment, un estudi recent ha demostrat que l'expressió de HNF1 β s'ha associat amb el risc de tenir carcinoma hepatocel·lular, en particular un subtipus que canvia a un fenotip de colangiocarcinoma intrahepàtic quan reapareix i que presenta pitjor prognosi. Aquest subtipus de càncer presenta HNF1 β , i correlaciona positivament amb l'expressió de marcadors biliars/cèl·lula progenitora intratumoralment. Segons els autors, HNF1 β podria ser un marcador útil per a la predicció del pronòstic quan hi ha recurrència de carcinoma hepatocel·lular (Yu et al. 2015).

2.3.3 Bipotencialitat de les CPH: estudis *in vitro* i generació de línies cel·lulars

Tal com hem explicat abans, les CPH, que expressen tant marcadors de colangiòcits com d'hepatòcits, són bipotencials ja que poden diferenciar-se tant a hepatòcits com a colangiòcits. Aquesta bipotencialitat es va suggerir inicialment en estudis immunohistològics, però no va ser fins l'aparició d'estudis *in vitro* quan es va demostrar aquesta capacitat de donar cèl·lules semblants a colangiòcits i a hepatòcits (ja que tot i mostrar algunes característiques d'hepatòcits madurs, no ho són del tot i no estan ben caracteritzats). Per al desenvolupament dels estudis *in vitro*, va caldre l'aïllament de CPH mitjançant diverses tècniques que s'han anat perfeccionant (explicades de forma extensa anteriorment) així com millores en les condicions/medi de cultiu mitjançant l'addició de diferents factors de creixement/ citoquines per tal de mantenir-les en un estat "indiferenciat" *in vitro*. Des de l'estudi inicial en el qual es van emprar cèl·lules amb capacitat per donar colangiòcits i hepatòcits (Lazaro et al. 1998), vàries línies cel·lulars amb propietats de cèl·lules progenitores procedents de diferents espècies han estat descrites. S'han aïllat tant de fetge embrionari com adult, de fetges sans o fetges danyats. Aquestes línies han permès estudiar la implicació de noves molècules i vies implicades en el creixement i la diferenciació d'aquestes cèl·lules; amb l'objectiu últim de trobar una font cel·lular per a generar grans quantitats d'hepatòcits *in vitro* per a transplants terapèutics. A continuació es farà una breu descripció de les línies cel·lulars més emprades per a estudis *in vitro*, recopilades en la Taula 2.

Les primeres cèl·lules per descriure la bipotencialitat de les cèl·lules progenitores hepàtiques van ser les línies cel·lulars (liver epithelial) LE/2 i LE/6, obtingudes de rates tractades amb dieta CDE durant 2 i 6 setmanes, respectivament. Són cèl·lules petites immadures no tumorigèniques que després de 4 setmanes en un cultiu tridimensional adopten espontàniament morfologia hepatocitària, sota la presència d'una capa de cèl·lules mesenquimals (Lazaro et al. 1998). En ratolins, la línia cel·lular més emprada és la BMOL (Bipotent mouse oval liver), obtinguda a partir de ratolins adults tractats amb dieta CDE mitjançant el mètode "plate and wait" (plantar i esperar) (Tirnitz-Parker et al. 2007). Aquesta línia expressa marcadors colangiocítics i de cèl·lules progenitores, a més de marcadors hepatocitaris. Mitjançant variacions en el medi de cultiu, les BMOL poden diferenciar-se a hepatòcits (Tirnitz-Parker et al. 2007).

NOM	ORIGEN	FENOTIP	REFERÈNCIA
LE/2 i LE/6	Rata	KRT8+, KRT18+, ALB+, KRT19-, DDPIV-, GGT-	Lazaro et al. 1998
LDPC	Rata	HNF-3 β +, CD45+, CD34+, CXCR4+, TTR+, ALB-, KRT18-, KRT19-, OV6-	Sahin et al. 2008
BMOL	Ratolí	A6+, MPK+, KRT19+, Transferrina+, E-CAD+	Tirnitz-Parker et al. 2007
BAML	Ratolí	KRT19+, A6+, α 6-integrina+	Fougere-Deschatrette et al. 2006
BMEL	Embrions de ratolí	HNF-1 α +, HNF4+, GATA4+, KRT18+, KRT8+, KRT7+, KRT19+, CD34+, ALB-, Thy-1-	Strick-Marchand et al. 2002
HLSC	Humà	CD29+, CD44+, CD90+, KRT8+, KRT18+, ALB+, AFP+, CD34-, CD45-, CD133-, KRT19-	Herrera et al. 2006
Cèl·lules EpCAM+	Humà	EpCAM+, KRT18+, KRT19+, CD44+, CD133+, NCAM+, Claudina-3+	Schmelzer et al. 2007
HepaRG	Humà	CYP3A4+, KRT18+, KRT19+, NCAM+, CD49a+, HNF4+, HNF1+	Cerec et al. 2007

Taula 2. Selecció de les principals línies cel·lulars descrites de cèl·lules progenitores hepàtiques.

En humans, la línia més emprada és l'anomenada HepaRG, que prové d'un hepatocarcinoma d'un pacient infectat amb el virus de la hepatitis C i, tot i que presenta una morfologia hepatocitària, poden patir un procés de transdiferenciació i adoptar característiques semblants a les cèl·lules bipotencials progenitores hepàtiques en quan a capacitat de diferenciació a colangiòcits i hepatòcits (Gripon et al. 2002; Cerec et al. 2007).

Totes aquestes línies cel·lulars han estat obtingudes després d'induir un dany hepàtic i per tant, la rellevància com una font de cèl·lules trasplantables no està del tot clara. Per tant,

tindrien una major rellevància clínica aquelles aïllades a partir d'un fetge fetal o de fetges sans de rosegador o d'humà (Sancho-Bru et al. 2009).

La línia en rata més emprada per a estudis i la única que compleix els criteris per a ser considerada una línia de cèl·lula mare hepàtica veritable és la línia WB-F344, que prové de rates adultes sanes (Tsao et al. 1984). Es creu que venen del canal de Hering, i s'ha demostrat que es poden mantenir *in vitro* indefinidament, però només tenen la capacitat de diferenciar-se a hepatòcits, sense formar tumors, després de ser transplantades. Destacar també la població cel·lular amb característiques de CPH anomenada LDPC (Liver-derived progenitor cells), aïllada a partir de fetges de rates adultes sanes i que poden diferenciar-se a hepatòcits madurs (expressen urea i albúmina) i a colangiòcits (Sahin et al. 2008).

En ratolins, estudis procedents del mateix grup van aïllar cèl·lules tant de fetges sans adults (anomenades BAML (Bipotent Adult Mouse Liver)) com d'embrions (les BMEL (Bipotent Mouse Embryonic Liver)), capaces de generar hepatòcits i colangiòcits no només *in vitro*, sinó també *in vivo* (tot i no haver-se demostrat que no són tumorigèniques) (Strick-Marchand et al. 2002; Strick-Marchand et al. 2004; Fougere-Deschatrette et al. 2006). Les cèl·lules BMEL es van aïllar mitjançant la tècnica de "plate and wait" anomenada abans, que es caracteritza per plantar tota la fracció cel·lular obtinguda i cultivar-la amb un medi determinat i esperar uns 2-3 mesos. Durant aquest temps la majoria de cèl·lules es desenganxen i moren, mentre que apareixen colònies de cèl·lules proliferants que tenen la capacitat bipotencial.

En humans, a partir de fetges sans i sota unes condicions de cultiu astringents que afavoreixen el creixement de certes poblacions es va obtenir una població de cèl·lules progenitores pluripotents, les HLSC (Human Liver Stem Cells), que es diferencien a hepatòcits *in vitro* i contribueixen a la regeneració del fetge en ratolins immunodeprimits. No obstant, aquestes cèl·lules no expressen ni KRT19 ni CD133, descartant que sigui una població de cèl·lules ovals (Herrera et al. 2006).

Les línies i poblacions cel·lulars obtingudes tant de fetges sans com de fetges danyats explicades fins ara han estat obtingudes seguint diversos processos. Així, s'han obtingut a partir d'una manipulació i creixement extensiu *in vitro*, a partir d'una població cel·lular enriquida per hepatòcits mitjançant un gradient de Percoll o a partir de cèl·lules no fraccionades. Aquest fet fa que l'origen d'aquestes cèl·lules sigui ambigu i no es pugui saber amb certesa d'on provenen, és a dir, si són una cèl·lula progenitora o si les característiques adoptades són producte del temps d'estar en cultiu (Okabe et al. 2009).

Com a conseqüència, i per evitar aquests efectes d'un cultiu perllongat en el temps, la tècnica de citometria de flux va esdevenir la tècnica de referència per aïllar d'una forma més ràpida i, sobretot, obtenir poblacions de cèl·lules progenitores més pures i precises. No obstant, cal tenir present la limitació permanent de no tenir un marcador específic per a separar els colangiòcits de les CPH.

Així, s'ha descrit la bipotencialitat de diverses poblacions cel·lulars aïllades a partir de marcadors descrits per progenitores. En fetges fetals i adults, a partir de la positivitat per EpCAM (Schmelzer et al. 2007), es van aïllar cèl·lules descrites com a cèl·lules mare/progenitores hepàtiques multipotents, les quals eren expandides a partir d'un medi definit lliure de sèrum amb els components essencials perquè només creixen cèl·lules mare i no les cèl·lules madures (Kubota et al. 2000). Segons els factors de creixement afegits en aquest medi aquestes cèl·lules es poden diferenciar cap a hepatòcits, colangiòcits o cèl·lules pancreàtiques (Cardinale et al. 2011). A partir de fetges de ratolins danyats crònicament i emprant diversos marcadors, s'han aïllat les cèl·lules d'aquests fetges prospectivament i s'ha analitzat la seva clonalitat *in vitro* (les poblacions obtingudes es generen a partir d'una sola cèl·lula) i la seva diferenciació a colangiòcits i hepatòcits (Suzuki et al. 2008; Okabe et al. 2009; Dorrell et al. 2011; Shin et al. 2011). D'aquestes cèl·lules no s'han generat línies cel·lulars a dia d'avui.

Tot i així, seguim amb el problema que els assajos que demostren la bipotencialitat es realitzen *in vitro* i no reflecteix amb exactitud el què succeeix *in vivo*, i els resultats obtinguts per tant s'han d'interpretar amb cautela. L'ideal és realitzar aquests estudis *in vivo* tal com explicarem més endavant, per veure el què succeeix en una situació fisiològica on participen totes les interaccions entre cèl·lules i amb la matriu extracel·lular. No obstant, els experiments *in vitro* poden ajudar a desenvolupar mètodes que permetin una diferenciació de les CPH cap a hepatòcits i colangiòcits i la maduració de les cèl·lules obtingudes.

Finalment, remarcar que en els últims anys, els estudis *in vitro* han donat un pas endavant a l'aconseguir passar de tenir les cèl·lules en un cultiu bidimensional a un cultiu tridimensional, mantenint les cèl·lules en cultiu i amb la capacitat de formar estructures funcionals (organoids) amb una arquitectura semblant a la que trobaríem en el fetge. El primer estudi de cultiu en tres dimensions es va fer combinant les cèl·lules amb una matriu (Matrigel) i amb diferents factors com HGF, FGF i EGF (Epidermal growth factor) (Takase et al. 2013). Aquest estudi va ser seguit per un altre on s'aïllaven cèl·lules Lgr5 positives de ratolins tractades amb tetraclorur de carboni o de fetges sans. Aquestes cèl·lules s'expandeixen sota

unes condicions de cultiu determinades i s'organitzen entre elles formant estructures tridimensionals que recorden un ducte cístic. Aquestes estructures estan composades per una monocapa epitelial ductal KRT19 positiva i per un compartiment pseudoestratificat que expressa marcadors ductals com KRT7 i KRT19, a més d'hepatocitaris com TTR o HNF4 α . Aquestes cèl·lules es poden diferenciar i adoptar característiques d'hepatòcits funcionals *in vitro* i poden perllongar la vida mitja d'un ratolí danyat quan se les transplanta (Huch et al. 2013). Suplementant el medi amb una sèrie de factors, s'ha aconseguit expandir cèl·lules EpCAM positives de fetges sans d'adults i generar també en humans cultius d'organoids (Huch et al. 2015).

2.3.4 Mecanismes de regulació de les cèl·lules progenitores hepàtiques

La presència de cèl·lules progenitores hepàtiques en el parènquima hepàtic ha estat àmpliament descrita en situacions de dany crònic, però els mecanismes pels quals aquestes cèl·lules proliferen en tal situació està poc entès. La resposta de les cèl·lules progenitores davant d'un dany es considera multifactorial i es pot dividir en quatre fases: activació, proliferació, migració i diferenciació (Duncan et al. 2009).

El procés de regeneració després d'un dany està orquestrat per una complexa comunicació creuada (crosstalk) entre diferents tipus cel·lulars en la qual participen citoquines, mitògens i factors de creixement durant l'activació de les CPH (Best et al. 2015). Aquests factors poden actuar de forma directa sobre les cèl·lules progenitores proliferants o de forma indirecta a través de senyalització en cèl·lules no epitelials, i aquestes, a continuació, actuen sobre les cèl·lules progenitores i/o la seva descendència. Entre les cèl·lules presents durant l'activació de les CPH trobem cèl·lules epitelials, cèl·lules hematopoietiques i cèl·lules mesenquimals, que es trobarien prop de les progenitores (formant el nínxol) i que actuarien directament o indirectament sobre les CPH o les seves cèl·lules precursors (Duncan et al. 2009; Itoh et al. 2014). No obstant, no està clar en molts casos quines cèl·lules envien senyals a les CPH i quines reben senyals moleculars importants per part d'elles.

Per a identificar aquells factors involucrats en els diferents passos de la resposta de les progenitores s'han necessitat tant estudis genètics en ratolins com estudis *in vitro* amb diferents línies de CPH. A continuació, s'explicaran els principals mecanismes implicats en cada una de les quatre fases que conformen la resposta de les CPH, recopilats de manera notòria en diverses revisions (Erker et al. 2007; Bird et al. 2008) i resumits en la Figura 8.

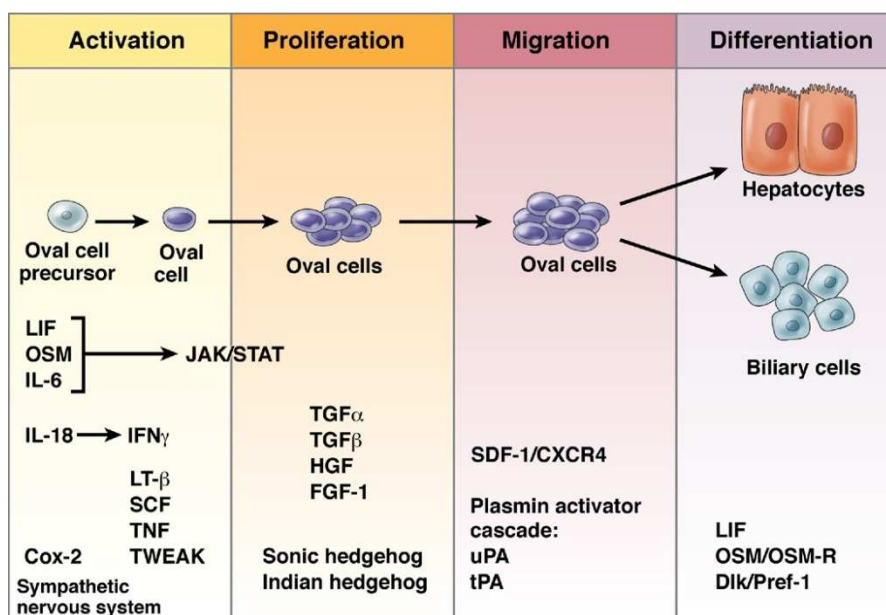


Figura 8. Esdeveniments de senyalització durant la resposta de les cèl·lules ovals/ progenitores hepàtiques. Extret de Duncan et al. 2009.

2.3.4.1 Factors implicats en l'activació de les CPH

Tal com hem mencionat abans, les cèl·lules progenitores derivarien d'una cèl·lula precursora que es troba en quiescència en una situació d'homeòstasi hepàtica. Després d'un dany, aquestes cèl·lules s'activarien i donarien com a descendència cèl·lules progenitores. El procés d'activació estaria regulat per senyals extracel·lulars, principalment per citokines inflammatòries i alguns factors de creixement, descrits a continuació. Aquest fet tindria la seva consistència ja que en els processos de dany hepàtic crònic l'activació de les CPH va acompanyat d'una resposta inflammatòria (Miyajima et al. 2014). Aquestes citokines actuarien a través d'una sèrie de vies de senyalització, jugant un paper fonamental en aquesta fase inicial.

Les primeres citokines descrites per la seva participació en l'activació de les cèl·lules progenitores pertanyen a la superfamília de TNF, que inclou TNF α , TWEAK (TNF-like weak induction of apoptosis) i LT- β (Lymphotoxin beta). TNF α està sobre-regulat en ratolins durant la resposta de les cèl·lules progenitores (ovals) en el model de dieta CDE (Akhurst et al. 2005; Knight et al. 2005a). La implicació de TNF α ha estat observada en un ratolí knockout pel seu receptor TNFR1, el qual té una resposta de cèl·lules ovals afectada i disminuïda, fet que no succeeix si un altre receptor de TNF α , TNFR2, no és present (Knight et al. 2000). TNF α activaria en cèl·lules inflammatòries TNFR1 per a alliberar citokines a través de la via de NF- κ B (Nuclear

Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), provocant que les cèl·lules ovals rebin diverses senyals, a més d'un efecte autocrí d'alliberar TNF- α i estimular també les cèl·lules inflammatòries a alliberar més citokines. En conjunt, és suggerit que TNF α és necessari per una òptima resposta de CPH. TWEAK, expressat en limfòcits T i macròfags, entre d'altres, es troba sobre-regulat tant en models de ratolí de dany hepàtic com en certes malalties humanes hepàtiques, i s'ha demostrat el seu efecte pro-proliferatiu en les CPH a través dels seu receptor Fn14 (Jakubowski et al. 2005). TWEAK actuaria activant NF-kB, el qual s'ha vist que és pro-proliferatiu en cèl·lules ovals (Kirillova et al. 1999; Tirnitz-Parker et al. 2010). L'efecte mitogènic de TWEAK s'ha demostrat en ratolins normals tractats amb un anticòs monoclonal contra TWEAK, tractats amb DDC o en ratolins deficients en Fn14 sotmesos a dieta DDC o dieta CDE. En tots ells es mostra una reducció significativa de la reacció oval (Kirillova et al. 1999; Jakubowski et al. 2005; Tirnitz-Parker et al. 2010). En canvi, en ratolins on es sobreexpressa TWEAK en hepatòcits o l'expressió de TWEAK per part de macròfags derivats de cèl·lules del moll de l'os injectats en ratolins provoquen una inducció de CPH (Kirillova et al. 1999; Bird et al. 2013). Pel què fa LT- β , la seva expressió està augmentada durant l'activació de les cèl·lules ovals en rossegadors i durant malalties hepàtiques cròniques humanes. LT- β s'expressa tant en hepatòcits com en cèl·lules inflammatòries, així com també en CPH durant la regeneració hepàtica induïda per hepatitis crònica (Lowes et al. 2003). La seva participació s'ha vist en l'activació de les CPH en models knockouts per LT- β com pel seu receptor LT- β R, on es veu una alteració parcial de la resposta de cèl·lules progenitores (Akhurst et al. 2005).

L'altra família de citokines implicades en l'activació és la família de la IL-6, que inclou leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatina M (OSM) o la IL-6. LIF s'ha vist sobre-regulat en la reacció de cèl·lules ovals en rata, així com el seu receptor LIFR β , suggerint un paper en l'activació. En canvi, en la proliferació no està clar el seu efecte (Omori et al. 1996). OSM és produïda i secretada per les cèl·lules de Kuppfer, recalcant el possible paper d'aquests macròfags en l'activació de les cèl·lules ovals. L'expressió de OSM s'ha vist sobre-regulada en la reacció oval en models murins com la dieta CDE (Matthews et al. 2005) i s'ha descrit que promou la diferenciació cap a hepatòcits en una línia de cèl·lules ovals de rata (Okaya et al. 2005). OSM actua via dos receptors, OSMR- β i LIFR β ; OSMR- β s'ha vist descrit en cèl·lules ovals aïllades de ratolins (Matthews et al. 2005) i LIFR β està sobreexpressat en pacients cirròtics, concretament en les cèl·lules ductulars de l'epiteli biliar que són positives també per KRT7, proliferating cell nuclear antigen (pCNA) i LIF (Znoyko et al. 2005), suggerint que OSM actua principalment per aquest receptor en l'activació de les cèl·lules ovals. La darrera citokina d'aquesta família implicada, IL-6, absent en ratolins sans, està augmentada en ratolins tractats

amb dieta CDE així com en malalties hepàtiques agudes i cròniques. En ratolins deficients en IL-6, però, tenen una reducció en el nombre de cèl·lules ovals quan són tractats amb la mateixa dieta (Knight et al. 2000; Yeoh et al. 2007). *In vitro*, línies de cèl·lules ovals tractades amb IL-6 tenen una major proliferació i migració (Matthews et al. 2004; Yeoh et al. 2007). Aquests estudis indiquen el paper de IL-6 tant en l'activació com en la proliferació de les cèl·lules ovals.

Una altra citocina que juga un paper important en l'activació és l'interferó- γ (IFN- γ). La seva secreció només es dona en limfòcits T i en cèl·lules NK (natural killer cells), i és activada per efecte de la IL-18, que es troba ràpidament augmentada en ratolins tractats amb dieta CDE (Knight et al. 2005a). L'expressió de IFN- γ s'ha vist en la reacció oval (Bisgaard et al. 1999) i la seva importància en l'activació de les CPH s'ha demostrat en ratolins deficients en IFN- γ , els quals tenen una resposta oval atenuada. En canvi, la regeneració hepàtica que es dona en un model de HPx està augmentada, o reduïda si es dona IFN- γ previ a la HPx (Sun et al. 2004; Akhurst et al. 2005; Brooling et al. 2005). Aquest fet indica que l'expressió augmentada d'IFN- γ és específica de l'activació de CPH i no de la regeneració independent de cèl·lules progenitores (Erker et al. 2007). *In vitro*, s'ha vist que la proliferació d'una línia de cèl·lules ovals varia en donar-li IFN- γ , i que IFN- γ , en conjunció amb TNF- α i LPS, provoquen l'arrest en el cicle cel·lular en hepatòcits en cultiu, mentre que activen el creixement de les cèl·lules ovals (Brooling et al. 2005). No obstant, resultats contradictoris han estat publicats recentment a l'actuar IFN- γ com a inhibidor de la proliferació de les cèl·lules ovals en pacients amb hepatitis B i en el model per dieta DDC (Feng et al. 2012).

Tant les citocines de la família de la IL-6 com IFN- γ actuen a través de la via de senyalització gp130, que activa les vies JAK/STAT (Janus Kinase/ signal transductor and activator of transcription) i ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Bird et al. 2008). En models knock-in on la via de senyalització STAT3 està hiperactiva, hi ha un augment del nombre de cèl·lules ovals mentre que si es dona el mateix per ERK, es bloqueja la proliferació d'aquestes cèl·lules (Yeoh et al. 2007). Aquests resultats suggereixen que gp130 és un element clau en l'activació i expansió de les cèl·lules progenitores hepàtiques.

A part de les citocines ja mencionades, trobaríem altres factors els quals s'ha suggerit que també participarien en el procés d'activació, destacant SCF (Stem Cell Factor), COX-2 (Ciclooxigenasa-2), el sistema nerviós parasimpàtic (Erker et al. 2007), integrina $\alpha\text{v}\beta_6$, connective tissue growth factor (CTGF) (Pi et al. 2015b) i ADAMTS7, una proteasa que actua sobre CTGF i que la seva absència comporta una activació major de les CPH i major fibrosi en ratolins tractats amb DDC (Pi et al. 2015a).

Recentment, s'han publicat estudis on la participació de factors de creixement en l'activació de les cèl·lules progenitores hepàtiques també és important, com són FGF7, HGF i EGF. FGF7 ha suscitat força interès, ja que com també TWEAK, és capaç d'induir *de novo* l'activació de CPH; en el cas de FGF7, que prové de les cèl·lules mesenquimals Thy-1, és indispensable la seva presència. L'expressió forçada de qualsevol dels dos factors en un fetge normal desencadena la inducció i expansió de cèl·lules amb característiques de CPH, tot i no haver dany (Jakubowski et al. 2005; Takase et al. 2013). En ratolins amb sobreexpressió de FGF7 tractats amb dieta DDC, el dany hepatocitari i els problemes colestats disminueixen, suggerint que FGF7 juga un paper en la regeneració d'hepatòcits i colangiócits via activació de les CPH. En ratolins deficientes en FGF7 es veu una disminució marcada de l'expansió de CPH després del dany per dieta DDC (Jakubowski et al. 2005; Takase et al. 2013). Respecte a HGF, s'ha observat el seu paper en l'activació, migració i en la diferenciació de les CPH. S'ha vist que la resposta de les CPH és significativament menor després d'un dany crònic per dieta DDC i la seva capacitat de migració està alterada si el receptor de HGF, c-met, està deletat condicionalment (Ishikawa et al. 2012).

Finalment, s'han descrit recentment vies implicades en l'activació de les CPH, les quals es mostren a continuació; la via de senyalització Hedgehog (Hh) és una d'elles. S'ha descrit que Hh participaria en l'activació de les CPH, en concret en la malaltia del fetge gras per alcohol (alcoholic fatty liver disease). Tant en humans com en ratolins, on l'esteatohepatitis alcohòlica va acompanyada per la inducció en la zona portal de cèl·lules ductulars immadures, hi ha una sobre-regulació dels membres de la família Hedgehog (Sonic hedgehog (Shh) i Indian Hedgehog (Ihh)) i l'expressió de gens diana de Hedgehog en aquests ductes en proliferació, així com en els miofibroblasts que trobem al voltant (Jung et al. 2008).

2.3.4.2 Factors implicats en la proliferació de les CPH

Entre els factors implicats en la proliferació trobem bàsicament varis factors de creixement com HGF o FGF-1, el qual s'expressa en les CPH, en els hepatòcits i en les cèl·lules estrellades (Lowes et al. 2003). HGF juga també un paper en l'activació i diferenciació, a part d'actuar durant la proliferació de les CPH i en la regeneració hepàtica. HGF s'expressa en les cèl·lules estrellades que es troben al voltant de les cèl·lules ovals, que expressen només el receptor, c-met. En aquestes condicions, HGF jugaria un paper paracrí en les cèl·lules ovals enviant una senyal de proliferació (Imai et al. 1996). En el model de rata 2-AAF/HPx,

l'administració del gen de HGF mitjançant un adenovirus provoca una proliferació més ràpida de les cèl·lules ovals (Shiota et al. 2000).

La via Hh també jugaria un paper en la proliferació, ja que inhibidors de la via poden alterar-la (Fleig et al. 2007), i en la supervivència, observat tant *in vitro* a través del paper del seu receptor Patched, expressat en les CPH (Sicklick et al. 2006) com *in vivo*, on inhibint la via Hh hi ha una menor resposta de CPH i una menor supervivència en ratolins sotmesos a una HPx del 70% (Ochoa et al. 2010).

Respecte a TGF- β , el paper que juga en la regeneració és oposat en els hepatòcits i en la proliferació de les cèl·lules ovals segons la situació en la qual es troba el fetge. TGF- β és conegut per limitar la regeneració inhibint la proliferació dels hepatòcits (Fausto et al. 2006). En un primer estudi, es va veure que sobreexpressant TGF- β *in vivo* en les cèl·lules albúmina positives (hepatòcits), la resposta de cèl·lules ovals era molt menor després d'induir dany en els ratolins a través de dieta DDC, suggerint que TGF- β impedeix la resposta de les CPH. No obstant, algunes CPH expressen albúmina i podria ser que l'efecte de TGF- β fos directe en la seva proliferació (Preisegger et al. 1999). El possible paper de TGF- β va ser estudiat posteriorment comparant l'efecte de supressió de TGF- β en línies d'hepatòcits i de cèl·lules ovals. Així, Nguyen et al. van observar que les CPH responien menys a la supressió i podien proliferar en presència de TGF- β . *In vivo*, van veure que phospho-Smad2, que es troba downstream de TGF- β , estava reduït en cèl·lules ovals de rates sotmeses a dieta CDE i presentaven major marcatge per Ki67 (un marcador de proliferació) en comparació als hepatòcits. Els hepatòcits, contràriament, tenien una menor taxa de proliferació. Aquests resultats explicarien com les cèl·lules ovals poden mantenir-se en quiescència quan el procés de regeneració no les requereix, i en canvi, proliferarien i es diferenciarien ràpidament quan els hepatòcits no es poden dividir (Nguyen et al. 2007). Aquest efecte oposat sobre els hepatòcits i les CPH, com també es veu en TWEAK, podria explicar com els mecanismes de regulació transfereixen la regeneració d'un compartiment a l'altre.

En els últims anys s'han descrit un bon nombre de noves molècules i vies que regulen l'expansió de les CPH entre les quals destaquem EGF (Kitade et al. 2013), MERLIN (Benhamouche et al. 2010), PPAR- γ (Knight et al. 2005b), galectin-3 (Hsieh et al. 2015), IL-22 (Weng et al. 2013) i OPN (Coombes et al. 2015; Wang et al. 2015). Destacar el paper d'OPN en l'activació i en la contribució de la reacció ductular a l'estimular la proliferació de les CPH i la seva migració. Al mateix temps redueix la capacitat proliferativa dels hepatòcits i juga un paper

important en modular l'activació dels miofibroblasts que interactuen amb les CPH (Strazzabosco et al. 2014; Coombes et al. 2015; Wang et al. 2015).

Finalment, s'ha descrit que interferó- α (IFN- α), a diferència d'altres citoquines que actuen per la via STAT3, redueix la proliferació i augmenta l'apoptosi no només en línies de cèl·lules ovals sinó també *in vivo* (Lim et al. 2006), tot i que no està clar el mecanisme mitjançant el qual actua.

2.3.4.3 Factors implicats en la migració de les CPH

Fins a l'actualitat, poques molècules han estat descrites pel seu paper en el fenomen de migració de les CPH. Una d'elles és la SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1 α), que a part d'estar implicada en la proliferació també ho està en la migració de les cèl·lules ovals. Mentre que el seu receptor, CXCR4, s'expressa en les cèl·lules ovals, hi ha controvèrsia en si SDF-1 és produïda pels hepatòcits o per les cèl·lules ovals. Dades d'un estudi indiquen que SDF-1 actua de forma paracrina i autocrina per activar la migració, demostrat per assajos de quimiotaxis *in vitro*, en els quals les cèl·lules ovals migren al llarg d'un gradient de SDF-1 (Hatch et al. 2002).

Els altres factors implicats en la migració juguen un paper important en el remodelatge de la matriu extracel·lular. Tal com hem dit, les CPH s'activen i prolifereixen després d'un dany, per tant, si prolifereixen en la zona periportal, s'han de moure cap al teixit que les rodeja, diferenciar-se i modificar l'espai per tal que les noves cèl·lules puguin residir i migrar. Aquest procés implica un extens remodelatge de la matriu extracel·lular (Erker et al. 2007). En conseqüència, hi ha una unió entre la proliferació de les CPH i canvis en la matriu extracel·lular. Una via implicada en aquest procés és la cascada activadora del plasminogen i proteolítica de plasmina. En aquesta cascada hi ha implicada diverses proteïnes entre les quals trobem la urokinase-type plasminogen (uPA), tissue-type plasminogen activator (tPA), uPA receptor (uPAR) i el plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Hi ha evidències que conclouen que aquesta cascada està involucrada en la regeneració hepàtica i en l'activació de les CPH: l'expressió d'uPA incrementa amb la proliferació de les CPH. Si es dona uPA a rates després de ser tractades amb 2-AAF, hi ha un augment del creixement de cèl·lules en les regions periportals (Bisgaard et al. 1999). A part de regular la infiltració de CPH proliferants i el remodelatge del fetge durant la regeneració, aquest sistema influeix en l'activitat de factors de creixement implicats en l'activació de les CPH com HGF o TGF- α .

2.3.4.4 Factors implicats en la diferenciació de les CPH

El darrer pas de la resposta de les CPH a un dany sostingut és el procés de diferenciació cap als dos llinatges principals del fetge: els hepatòcits i colangiòcits. Tot i que encara falta saber el mecanisme i les senyals que determinen cap a quin llinatge es diferencien, algunes citokines, factors de creixement i vies de senyalització han estat estudiades pel seu paper en aquest pas. Alguns d'ells ja s'ha vist la seva implicació en d'altres etapes de la resposta de les CPH com és el cas de LIF i OSM. En el cas de OSM, ha estat descrit per promoure la diferenciació en línies de cèl·lules ovals (Bird et al. 2008).

Un estudi recent ha demostrat que EGF i HGF estan implicats en el procés de diferenciació cap a colangiòcits. Mentre que el receptor de HGF, c-met, és un inductor de la diferenciació cap a hepatòcits activant les vies de senyalització AKT i STAT, el receptor d'EGF, EGFR, expressat en les CPH, indueix selectivament NOTCH1 per promoure l'especificació cap a colangiòcits i la formació de ductes, mentre que suprimeix simultàniament la diferenciació cap a hepatòcits. Si s'infraregula NOTCH1 per la pèrdua d'EGFR, i no per canvis en el nínxol de les cèl·lules progenitores, les CPH passarien de diferenciar-se a colangiòcits a diferenciar-se a hepatòcits (Kitade et al. 2013).

El paper de Notch en la diferenciació a colangiòcits, proposat en estudis histològics en humans (Spee et al. 2010), s'ha confirmat en un estudi recent en el qual el nínxol de les cèl·lules hepàtiques juga un paper fonamental. L'expressió de Jagged 1 (un lligand de Notch) en fibroblasts periportals veïns promou la via de Notch en les CPH i aquestes queden determinades a seguir la diferenciació cap al llinatge biliar en ratolins sotmesos a una dieta DDC, en la qual es dona regeneració biliar. En canvi, en la dieta CDE, on principalment hi hauria regeneració hepatocitària, els macròfags fagociten el debris hepatocitari i indueix l'expressió d'una altra via, la de Wnt. Aquest fet provoca la senyalització canònica de Wnt en les CPH veïnes, que mantenen l'expressió de Numb a través de β -catenina, determinant la promoció de seguir la diferenciació cap a hepatòcits (Boulter et al. 2013).

2.3.5 El nínxol hepàtic de les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques

Com ja hem descrit amb anterioritat, el nínxol hepàtic on es trobarien les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques es situa en adults en els canals de Hering; en l'etapa fetal i neonatal aquestes cèl·lules es concentrarien en la placa ductal. Un nínxol de cèl·lules mare (stem cell niche) es defineix com el microambient cel·lular i extracel·lular que envolta i dona suport a les cèl·lules mare, contribuint a què aquestes cèl·lules puguin autorenovar-se. A més, ajuda a mantenir un balanç entre la seva autorenovació i la seva maduració/ diferenciació en aquelles situacions que ho requereixin (Moore et al. 2006). Aquest microambient consisteix en cèl·lules veïnes, components de la matriu extracel·lular i citoquines i factors de creixement solubles que influencien i s'adapten en les diferents situacions específiques del fetge, tant en dany com en homeòstasi (Fuchs et al. 2004; Duncan et al. 2009; Kruitwagen et al. 2014).

Estudis tant en animals com en humans han posat de manifest la localització del nínxol hepàtic en els canals de Hering. Així, en ratolins, realitzant un assaig de retenció de marcatge per part de les cèl·lules, van proposar quatre possibles nínxols de les cèl·lules progenitores hepàtiques, un dels quals és en el canal de Hering (Kuwahara et al. 2008), a part de ser-hi en ductes biliars intralobulars, en les cèl·lules mononuclears periductals (definides com “null cells”) i en els hepatòcits peribiliars (Kuwahara et al. 2008). No obstant, el mateix grup ja va proposar que els hepatòcits peribiliars serien un subcompartiment del veritable compartiment/nínxol situat en el canal de Hering (Theise et al. 2013). En humans, mitjançant una reconstrucció tridimensional d'un fetge humà i d'un fetge amb dany per acetaminophen (APAP), es va suggerir que el microambient de les cèl·lules progenitores estaria a la interfase entre el sistema canalicular d'hepatòcits i l'arbre biliar: el canal de Hering. A més, afirmen que la reacció ductular que es veu en fetges danyats tindria el seu origen en les cèl·lules presents en aquest nínxol (Theise et al. 1999).

El nínxol per a les cèl·lules mare té varies funcions tals com el manteniment de la quiescència o proveir de les senyals de proliferació o diferenciació quan són requerides per tal de donar lloc a CPH destinades a produir llinatges cel·lulars madurs (Darwiche et al. 2010). En el nínxol hepàtic, aquestes senyals provindrien tant de la matriu extracel·lular com de diferents tipus cel·lulars com els miofibroblasts, les cèl·lules estrellades, les cèl·lules de Kupffer, les cèl·lules endotelials, els hepatòcits, els colangiòcits i les cèl·lules inflamàtores (limfòcits T, NK i NKT). Aquest nínxol canviaria entre el que existeix durant una situació fisiològica i el que trobem després d'induir una resposta de cèl·lules progenitores, en el qual canviaria el fenotip de les CPH per tal d'afavorir la seva proliferació. A continuació, es descriuran els estudis més

rellevants sobre la comunicació creuada (crosstalk) entre les CPH i les diferents cèl·lules, així com de les CPH amb la matriu extracel·lular, la majoria dels quals s'han realitzat en models murins de dany hepàtic. En canvi, poc s'ha estudiat sobre el nínxol en un fetge sa.

2.3.5.1 Interacció CPH- cèl·lules estrellades hepàtiques i miofibroblasts

Les cèl·lules estrellades hepàtiques (CEH) i els miofibroblasts estan associats amb les CPH durant la regeneració hepàtica alliberant factors de creixement, quimiocines i citoquines que influencien considerablement en la supervivència, la proliferació, la migració al llarg del parènquima escortant les CPH i la diferenciació d'aquestes. Les CEH activades serveixen com a font clau de producció de TGF- α , HGF, acidic fibroblast growth factor (aFGF) i TNFs, que són secretats durant la progressió del dany; per tant, les HSC juguen un paper essencial en la proliferació de les CPH. D'altres factors com el platelet-derived growth factor (PDGF- β), TGF- β , i Shh són expressats per les CPH i activa les CEH portals donant lloc a una fibrogènesi en aquella zona (Kaur et al. 2015). Un altre factor, LT- β , seria expressat per les CPH i tindria el seu efecte en les CEH, que expressen el seu receptor. Així, es crearia un circuit paracrí entre les dues poblacions regulant l'expansió de CPH, de CEH i de leucòcits necessaris per a reparar un dany i regenerar el teixit durant un dany crònic (Ruddell et al. 2009). Per tant, la comunicació entre els dos tipus cel·lulars sembla ser bidireccional gràcies a una localització propera dins el fetge (Knight et al. 2007a; Knight et al. 2007b).

Estudis *in vitro* on es cocultivaven CPH amb CEH suggerien que les CEH indueixen la diferenciació de les CPH a hepatòcits (Nagai et al. 2002). *In vivo*, estudis on s'inhibia l'activació de les CEH donant L-cisteïna en la dieta s'associava amb una disminució significativa de la resposta de CPH en rates amb 2-AAF/PH, demostrant la importància de les CEH com a cèl·lules de suport de les CPH (Pintilie et al. 2010). Un altre estudi *in vivo* de gran rellevància ja esmentat anteriorment ha permès identificar que el destí de les CPH bipotencials a diferenciar-se a hepatòcits o colangiòcits està influenciat per canvis específics en el nínxol de les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques. En ell, remarquen el paper que tenen els miofibroblasts periportals sobre la diferenciació de les CPH a colangiòcits a través de promoure l'activació de la via Notch a través del lligand Jagged 1 en un model de dany colangiocitari (Boulter et al. 2013). Aquesta participació dels miofibroblasts activats en la diferenciació cap a colangiòcits madurs ja va ser suggerida en un article previ en què els miofibroblasts acompanyarien durant tot el procés de maduració als diferents llinatges de cèl·lules mare/progenitores i farien el procés de maduració conjuntament (Turner et al. 2011).

2.3.5.2 Interacció CEH- matriu extracel·lular

A part de la producció d'aquests factors esmentats i d'altres un cop activades, les CEH participen en d'altres processos com la fibrosi i el remodelatge de la matriu extracel·lular (ECM), a través de l'expressió de metalloproteinases de la matriu i inhibidors de les metalloproteinases, així com produint components de la ECM (Darwiche et al. 2010). La ECM, compresa per la membrana basal i la matriu intersticial, es pot definir com un material molecular complex que envolta les cèl·lules afectant la morfologia, el creixement i la supervivència de les cèl·lules mare (Vestentoft 2014). En rates, s'ha vist que el nínxol hepàtic en una situació de dany està envoltat per una ECM formada per col·lagen I, col·lagen IV, laminina, nidogen 1 i agrin (Vestentoft et al. 2013). S'ha descrit que la ECM per si sola, juntament amb el seu remodelatge, juga un paper significatiu i està connectat amb la resposta de les CPH, tot i que encara no se sap amb certesa la seva funció (Van Hul et al. 2009). A més, s'ha vist que tant les CEH com els miofibroblasts acompanyen íntimament a les CPH durant la seva invasió al parènquima; ho fan gràcies a què les CEH trenquen la làmina basal de la ECM per formar contacte directe amb les CPH (Paku et al. 2001). En un estudi en ratolins tractats amb dieta CDE, s'ha vist que l'activació de miofibroblasts, juntament amb una major acumulació i deposició de ECM en l'àrea periportal, segurament aportada per les CEH i els miofibroblasts, és un requisit previ per a l'expansió, migració i ancoratge de les CPH. S'ha vist que en aquest model, a més, com la ECM, rica en col·lagen I, es va dipositant en una direcció portovenosa, proporcionant el nínxol per a què les CPH envaeixin el parènquima. En resum, les CPH necessiten de la matriu extracel·lular, on queden incrustades, per tal de poder diferenciar-se i contribuir a la regeneració del fetge danyat (Van Hul et al. 2009). Aquesta influència de la ECM en les CPH s'ha vist també en estudis en rates (Pintilie et al. 2010) i en ratolins (Espanol-Suner et al. 2012). En l'estudi amb ratolins, veuen com administrant iloprost, que redueix la producció de CTGF, provoca una reducció del contingut de col·lagen i laminina en la dieta CDE. Aquesta modificació i reducció de la ECM s'associa a un major número d'hepatòcits derivats de CPH i un menor número de CPH, suggerint una major diferenciació (Espanol-Suner et al. 2012). No obstant, s'ha vist que l'iloprost també té efectes en les CEH (Kawada et al. 1992) i podria ser que aquesta substància afecti més en la senyalització cèl·lula-cèl·lula que generant canvis en la matriu (Williams et al. 2014).

La ECM està composta per vàries proteïnes, entre elles, la laminina, que permet mantenir les CPH en un fenotip indiferenciat i és necessària per la seva proliferació *in vitro* i *in vivo* (Lorenzini et al. 2010; Kallis et al. 2011; Elsegood et al. 2015). Una altra proteïna com és el col·lagen també juga un paper, ja que s'ha vist que en ratolins on persisteix el col·lagen I al

presentar una resistència a la seva degradació, hi ha una menor proliferació d'hepatòcits, una reducció de CPH i una menor deposició de laminina (Kallis et al. 2011).

2.3.5.3 Interacció CEH- cèl·lules de Kupffer

A part de les CEH, els macròfags també poden remodelar la matriu extracel·lular. Com ja s'ha descrit, els macròfags secreten citoquines que influencien en la resposta de les CPH tals com TWEAK (Bird et al. 2013). A més, les cèl·lules de Kupffer o macròfags hepàtics tenen un paper en la migració de les CPH. En ratolins on s'han deplecionat els macròfags mitjançant clodronat i sotmesos posteriorment a dieta CDE, es va observar com la migració de les CPH a través del parènquima estava significativament disminuïda. En canvi, no veien efectes en la seva proliferació (Van Hul et al. 2011), tot i que estudis posteriors sí que els han observat (Boulter et al. 2013; Elsegood et al. 2015). Aquests resultats van ser corroborats en un altre estudi que, a més a més, mostraven la implicació de les cèl·lules de Kupffer en l'inici de la diferenciació de les CPH cap a hepatòcits (Boulter et al. 2013). Van observar com els macròfags, en un model de dany hepatocitari, fagocitaven debris biològics, desencadenant l'expressió de Wnt3a en macròfags i secretant-lo. Wnt3a activa la via canònica Wnt/ β -catenina i fa expressar Numb a les CPH. L'expressió de Numb provoca la supressió de les dianes transcripcionals de la via de Notch, incloent gens associats a colangiòcits com HNF1 β o HNF6. Per tant, les CPH són destinades a seguir la diferenciació cap a hepatòcits, tal com s'ha vist també en peix zebra (Boulter et al. 2013; Huang et al. 2014). Per tant, la via de Wnt, juntament amb la via de Notch descrita abans per acció dels miofibroblasts, i la via de Hh, juguen un paper clau en la diferenciació en el nínxol hepàtic tal com es mostra en la Figura 9, però també en el nínxol de cèl·lules mare d'altres òrgans (Darwiche et al. 2010).

Finalment, remarcar que les CPH també produeixen substàncies que afecten els macròfags, com les quimiocines CCL2 i CX₃CL1, que atrauen a macròfags infiltrants i augmenten la seva població en la dieta CDE. Aquests macròfags produirien TNF- α que influiria en la resposta de les CPH (Viebahn et al. 2010). Un estudi recent del mateix grup suggereix que no serien les cèl·lules de Kupffer residents sinó els macròfags infiltrants derivats de monòcits els que produirien el TNF- α . TNF- α activaria la proliferació no només de les CPH sinó també de les cèl·lules de Kupffer (Elsegood et al. 2015). A més, la depleció de cèl·lules de Kupffer per clodronat faria disminuir la proliferació de les CPH.

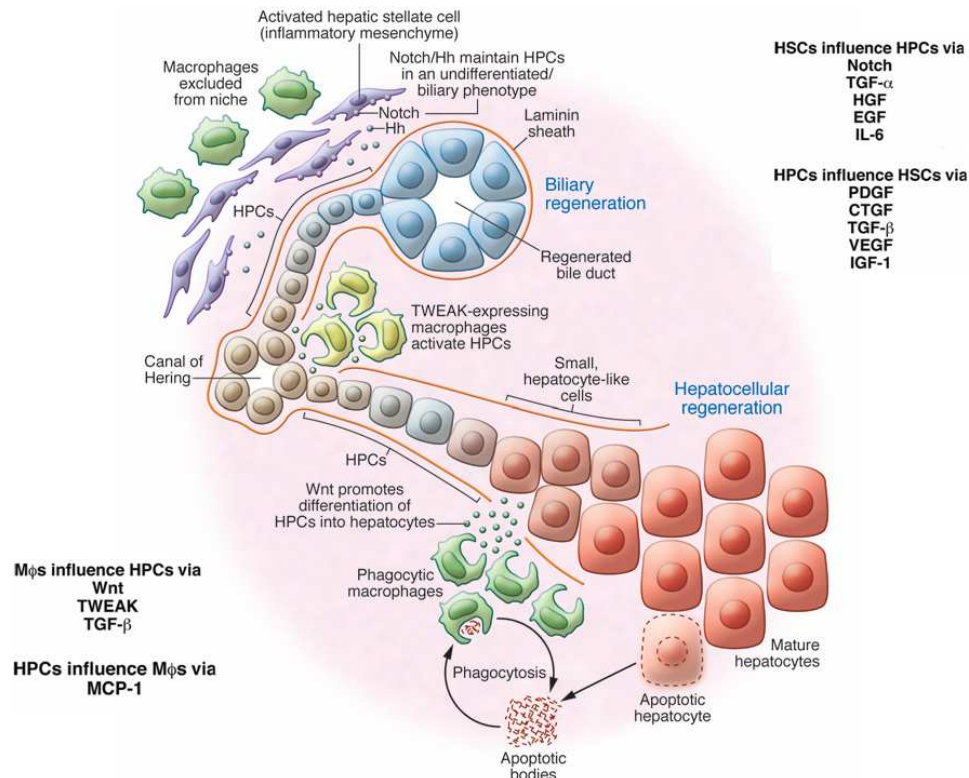


Figura 9. Interaccions entre les CPH i les diferents poblacions presents en el nínxol hepàtic. Les poblacions al voltant del nínxol determinarien la seva diferenciació cap a hepatòcits o colangiòcits. HPCs, cèl·lules progenitores hepàtiques; Mφs, macròfags. HSC, cèl·lules estrellades hepàtiques. Adaptat de Boulter et al. 2013 i Forbes et al. 2013.

2.3.5.4 Interacció cèl·lules progenitores hepàtiques- altres tipus cel·lulars: paper de les cèl·lules inflammatòries

De la resta de cèl·lules presents en el nínxol hepàtic com són els hepatòcits, els colangiòcits madurs i les cèl·lules endotelials existeix poca informació sobre la seva influència sobre les CPH. Només dels limfòcits T i NK existeixen alguns estudis mostrant el seu efecte sobre les CPH, mitjançant la producció de citokines i quimiocines CPH com TWEAK (produït pels limfòcits T) o IL-22 (produïda tant pels limfòcits T com NK) (Jakubowski et al. 2005; Weng et al. 2013). Tot i que la resposta de CPH s'ha associat a un major nombre de limfòcits T-CD8 positius, però no de cèl·lules NK, el seu paper no seria essencial per a muntar la resposta de progenitores (Viebahn et al. 2010). El seu paper s'ha estudiat també en ratolins deficients en limfòcits T. Es va veure que tant en aquests ratolins com en ratolins tractats amb un anticòs deplecionant de les cèl·lules NK hi havia una menor resposta de cèl·lules ovals després de ser sotmesos a dieta CDE, mostrant el paper important d'aquestes dues poblacions en l'expansió de les cèl·lules ovals. A més, observen que els limfòcits produeixen citokines proinflamatòries Th1 com IFN-γ i TNF-α que són mitogèniques per a les cèl·lules ovals. En

conclusió, aquest estudi mostra que l'expansió de les CPH juntament amb la inflamació són necessàries per a la reparació hepàtica i la supervivència (Strick-Marchand et al. 2008).

Finalment, mencionar que no existeixen estudis respecte a la possible interacció de les CPH amb una altra població inflamatòria com són els neutròfils. Tot i que s'ha descrit tant en humans (Gadd et al. 2014) com en un model ratolí per DDC (Fickert et al. 2007) la presència de neutròfils al voltant de la reacció ductular, no s'ha estudiat com participarien sobre les CPH i quin efecte generaria la seva depleció o deficiència.

2.3.6 Medicina regenerativa i possibles usos terapèutics de les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques

Una de les característiques per a definir les cèl·lules mare és la seva capacitat per a repoblar un òrgan i restaurar la seva funció. Actualment, més de 17.000 persones estan en la llista d'espera per a rebre un transplantament hepàtic, la majoria a causa de cirrosi hepàtica. En el 2005, només un terç de la gent en llista d'espera van rebre un transplantament de fetge (Walkup et al. 2006). Davant d'aquest increment de persones que necessiten un transplantament i davant la impossibilitat de satisfer tal demanda, s'ha pensat en el transplantament de cèl·lules o teràpia cel·lular com a alternativa a la manca de fetges idonis per tal procés. En el fetge, l'habilitat de repoblar-lo es refereix principalment a l'habilitat de reemplaçar els hepatòcits a través de cèl·lules ja transplantades, ja que fins fa relativament poc, no havia cap estudi on es repoblava eficientment el sistema biliar (Grompe 2009).

Els primers intents de repoblació del fetge es van fer amb hepatòcits, aprofitant la ja descrita gran capacitat que tenen per a regenerar el fetge en situacions de dany o de pèrdua de massa hepàtica. En humans, les malalties ideals per a ser tractades per teràpia cel·lular són les malalties genètiques com la malaltia de Wilson (acumulació de coure), el síndrome de Crigler-Najjar (manca de conjugació de la bilis) o la tirosinèmia (Alison et al. 2009). No obstant, tot i aconseguir un efecte temporal positiu a curt o mig-llarg termini segons la malaltia (Fox et al. 1998; Muraca et al. 2002; Horslen et al. 2003; Dhawan et al. 2004; Stephenne et al. 2006) i tenir un èxit més o menys acceptable, ens tornem a trobar amb un problema com és l'obtenció d'hepatòcits. Per a aconseguir hepatòcits humans, es necessiten fetges de donants i actualment n'hi ha un dèficit; a més, fins a l'actualitat, s'ha vist una limitada capacitat de repoblació quan s'empelten. A més, hi ha un problema en el seu cultiu, ja que no es poden mantenir molts dies i expandir-los per a incrementar el nombre, i quan són emmagatzemats i

descongelats per al seu ús pateixen dany fàcilment. És en aquest context en el qual les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques s'han erigit com a una possible alternativa gràcies a la seva bipotencialitat.

La gran majoria d'estudis usant les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques s'han realitzat en models animals ja emprats amb èxit per a transplantar hepatòcits (Overturf et al. 1999; Weglarz et al. 2000; Azuma et al. 2007). Altres estudis han optat per emprar cèl·lules mare hepàtiques d'origen fetal (hepatoblasts) per a transplantar-les en ratolins o en rates tractades amb retrorsina (per a bloquejar la replicació dels hepatòcits) prèviament a un dany per tal d'augmentar la capacitat de repoblació (Dabeva et al. 2000; Sandhu et al. 2001; Strick-Marchand et al. 2004; Nierhoff et al. 2005; Oertel et al. 2008). No obstant, en tots els models emprats hi ha un denominador comú: les cèl·lules transplantades tenen una avantatge selectiva respecte als hepatòcits endògens per tal d'afavorir l'empelt (engraftment) dins l'òrgan i la seva repoblació. Aquest avantatge, ja sigui per una deficiència genètica o bé per estar immunocompromesos, permet a les cèl·lules establir-se sense ser atacades pel sistema immunitari. Des del primer estudi on cèl·lules ovals aïllades i transplantades generaven cèl·lules que recorden a hepatòcits en rates receptores amb dany (Faris et al. 1989), han aparegut estudis tant en rata com en ratolí on es demostra la capacitat d'aquestes cèl·lules a generar nous hepatòcits en animals receptors amb diverses patologies/dany (Dabeva et al. 1997; Yasui et al. 1997; Li et al. 2006). En alguns d'aquests estudis suggereixen que donen lloc tant a hepatòcits com a CEB (Fougere-Deschatrette et al. 2006; Yovchev et al. 2008; Lu et al. 2015). La majoria d'aquests estudis van observar però, com la repoblació era baixa (Coleman et al. 1997; Yasui et al. 1997; Dabeva et al. 2000), i no va ser fins l'estudi de Wang et al. on aquesta repoblació era alta. En aquest estudi, van aïllar cèl·lules ovals de ratolins fumaryl acetoacetate hydrolase (FAH+/+) tractats amb DDC. A part de demostrar que aquestes CPH no provenien del moll de l'òs, van observar com aquestes cèl·lules tenien una gran capacitat de repoblació en ratolins tractats amb dieta DDC FAH/- deficientes, en els quals els hepatòcits estan compromesos al no tenir la via de la tirosina. En aquest model, les cèl·lules obtingudes reestablien la funció d'aquests ratolins metabòlicament compromesos (Wang et al. 2003). No obstant, la població de cèl·lules ovals no era del tot pura. En un estudi posterior usant els mateixos ratolins i sotmesos a la mateixa dieta, obtenien una població més pura de cèl·lules ovals (cèl·lules clonals CD133 positives) i observaven els resultats anteriors: una gran capacitat de generar hepatòcits madurs i repoblar el fetge (Suzuki et al. 2008). Finalment, en un ratolí on els hepatòcits no tenen la capacitat de replicar, s'ha demostrat que les CPH aïllades i transplantades tenen una elevada capacitat no només de donar hepatòcits sinó també de

donar cèl·lules biliars *in vivo* (Lu et al. 2015). Aquest fet obre noves portes a l'ús de CPH en teràpia cel·lular.

A diferència dels models murins, en humans no es dona un avantatge selectiu per tal que les cèl·lules s'empel·lin i puguin repoblar i regenerar el fetge. S'ha vist que les CPH tenen l'avantatge de ser més petites que els hepatòcits, que a causa de la gran mida, poden quedar retinguts en els sinusoids hepàtics i no realitzar la seva funció. No obstant, poc coneixement hi ha sobre quines senyals/ambient necessiten per a què quedin mantingudes durant un període llarg en el fetge (Sancho-Bru et al. 2009). En els pocs estudis utilitzant cèl·lules d'origen humà, ja siguin emprant CPH ((Schmelzer et al. 2007; Wang et al. 2011) o hepatoblasts (Mahieu-Caputo et al. 2004; Schmelzer et al. 2007; Wang et al. 2011), també s'utilitzen els models esmentats abans on les cèl·lules transplantades tenen un avantatge selectiu per a demostrar la seva capacitat de repoblació.

En resum, tot i haver estudis on es demostra la capacitat de les CPH o dels hepatoblasts per tal de repoblar el fetge, calen una sèrie de condicions prèvies per a què es doni el repoblament. Aquestes condicions són que les cèl·lules tinguin un avantatge envers a les cèl·lules pròpies del fetge o la necessitat de preservar una bona arquitectura del fetge com a prerequisit per a poder facilitar la regeneració en les malalties hepàtiques (Best et al. 2015). A més, cal trobar un protocol que permeti estandaritzar el seu aïllament, el seu manteniment *in vitro* i la seva expansió i diferenciació *in vitro*. Cal també, a més, veure la seva possible contribució a la carcinogènesi abans de poder ser traslladats els procediments en pacients amb diferents etiologies hepàtiques (Soto-Gutierrez et al. 2009). Per tal de poder ser emprades en assajos clínics en pacients, cal primer investigar com aconseguir que les cèl·lules transplantades puguin ser capaces de tenir un major empelt i de regenerar un fetge sense tenir cap avantatge respecte als hepatòcits preexistents, o com evitar que pateixin un alt grau d'apoptosi quan són transplantades, la qual cosa no s'ha assolit encara (Sancho-Bru et al. 2009). A dia d'avui, però, hi ha un estudi en fase clínica a la Índia emprant cèl·lules EpCAM positives derivades de fetges fetals que s'empel·len en un 20-30% en pacients a l'injectar-se via l'arteria hepàtica. Tot i que encara els resultats no han estat publicats, resultats preliminars indicarien que aquestes cèl·lules necessiten de 2 a 3 mesos per a mostrar efectivitat després del transplantament. S'ha vist, però, millores en els paràmetres bioquímics dels pacients cirròtics descompensats tractats amb aquestes cèl·lules (Lanzoni et al. 2013).

3. PAPER DE LES CÈL·LULES PROGENITORES HEPÀTIQUES EN LA REGENERACIÓ DEL FETGE

3.1 Models animals de regeneració hepàtica

Força models s'han descrit per tal de poder estudiar el paper de les CPH en la regeneració hepàtica. En els següents apartats s'explicaran els models més emprats per estudiar aquestes cèl·lules, així com les tècniques que han permès estudiar el seu paper i contribució en la generació d'altres poblacions cel·lulars, en especial els hepatòcits, en situacions d'homeòstasi i en dany hepàtic crònic.

3.1.1 Model clàssic de regeneració hepàtica per hepatectomia parcial

Tal com s'ha explicat amb anterioritat, la característica distintiva del fetge és la seva alta capacitat de regeneració. Aquesta capacitat ha quedat demostrada quan varis lòbuls específics del fetge (tres dels cinc lòbuls), aproximadament dues terceres parts del fetge de rata o ratolí, s'extreuen quirúrgicament i el fetge recupera la seva massa original en 7 dies; és el procediment conegut com hepatectomia parcial (HPx) (Michalopoulos 2007; Miyaoka et al. 2012). Aquest procediment, descrit per primer cop per Higgins i Anderson el 1931, és considerat el model ideal per a estudiar la regeneració hepàtica a causa de la seva simplicitat i reproductibilitat (Higgins et al. 1931; Tirnitz-Parker et al. 2012). No obstant, aquesta tècnica no causa cap dany o lesió en els dos lòbuls que queden, i la regeneració del fetge que es dona és en realitat una recuperació de la massa hepàtica mitjançant un procés de creixement compensatori, sense que els lòbuls extrets tornin a créixer. Aquesta crescuda es dona principalment per onades de creixement en la mida dels hepatòcits (hipertròfia) i una proliferació dels hepatòcits restants per augmentar el seu nombre (hiperplàsia) (Alison et al. 2009; Stanger 2015). Aparentment, no hi ha contribució de cap població de cèl·lules mare (Michalopoulos et al. 1997; Miyajima et al. 2014). Tot i que en humans la HPx també es dona en certes situacions, com per exemple en resseccions hepàtiques per carcinoma o metàstasi, aquest procediment no recapitula fidelment les situacions patològiques que ens trobem en moltes malalties hepàtiques humanes com en hepatitis virals cròniques o en malalties hepàtiques per consum d'alcohol. Aquestes malalties involucren la mort o disminució de l'activitat replicativa hepatocitària i una inducció de processos inflamatoris i fibrogènics (Fausto 2004; Miyajima et al. 2014), a part d'una reacció ductular que no s'observa en fetges sans com a conseqüència de la disminució de l'activitat replicativa dels hepatòcits. Per tant, tot i que la HPx és un bon model per entendre els mecanismes que controlen la regeneració hepàtica, s'han desenvolupat diferents models animals que sí impliquen un dany hepàtic mitjançant toxines com el tetraclorur de carboni (CCl₄) o per procediments quirúrgics com la

l·ligadura del conducte biliar. Aquests models, juntament amb d'altres que s'explicaran més endavant on sí veiem la presència de CPH, s'utilitzen per entendre com es dona la regeneració hepàtica quan hi ha un dany en les situacions patològiques humanes.

En la HPx, així com en models de dany agut per CCl_4 i en la situació fisiològica prèviament esmentada, la regeneració hepàtica es dona principalment pels hepatòcits, a diferència dels models de dany crònic amb regeneració, on les CPH hi participarien (veure Figura 10).

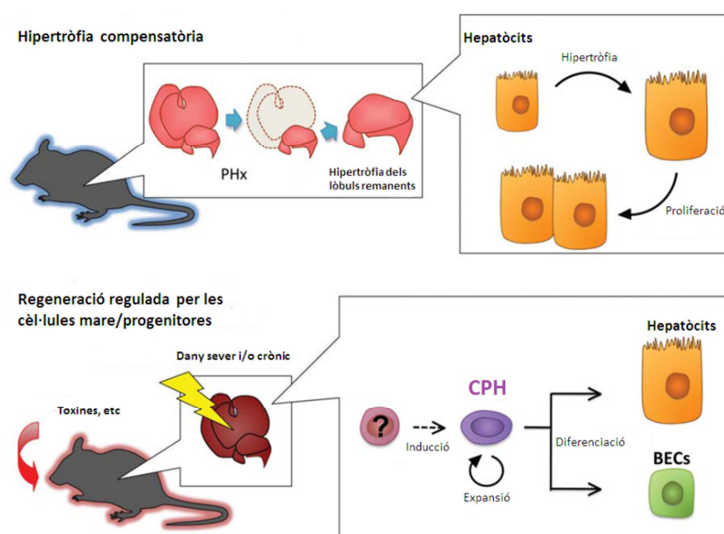


Figura 10. Principals tipus cel·lulars implicats davant d'un dany hepàtic. Mentre que en el model de HPx els hepatòcits són les cèl·lules encarregades de la regeneració, en els models de dany hepàtic crònic o sever, un altre tipus cel·lular, les CPH, es diferenciarien per donar lloc a hepatòcits i colangiòcits. Adaptat de Itoh et al. 2014.

En resposta a la HPx, tots els hepatòcits, que estan en quiescència, entren en fase de cicle cel·lular (basat en estudis d'incorporació de nucleòtids radiomarcats) (Bucher et al. 1964), en resposta a una sèrie de factors de creixement i pateixen una ronda de síntesi de DNA (a les 24 hores en rates i a les 36 hores en ratolins) per a generar un 60% dels hepatòcits que s'han perdut (Michalopoulos 2007; Alison et al. 2009). Estudis recents en ratolí afirmen que només un 50% dels hepatòcits entren en la fase de replicació i que prèviament a aquesta síntesi de DNA i replicació els hepatòcits pateixen un increment de la seva mida (hipertròfia) (Miyaoaka et al. 2012). A continuació, un petit percentatge d'hepatòcits pateixen una segona ronda de replicació per tal de reestablir la massa hepatocitària original. Aquesta resposta regenerativa s'inicia en la regió periportal i avança cap a la regió centrilobular, com una onada de mitosi contínua de les cèl·lules (Rabes 1977). Per tal de mantenir la comunicació cel·lular correcta, els altres tipus cel·lulars (colangiòcits, cèl·lules de Kupffer, cèl·lules estrellades hepàtiques i

cèl·lules endotelials) també proliferen, una mica més tard (12 hores després) de quan ho farien els hepatòcits (Santoni-Rugiu et al. 2005). Probablement, moltes de les senyals per a què els altres tipus cel·lulars proliferin provenen dels hepatòcits (Tirnitz-Parker et al. 2012). Així, la proliferació de les CEB succeiria una mica més tard que la dels hepatòcits, tenint el seu pic de replicació a les 48 hores; la de les cèl·lules endotelials començaria als 2-3 dies i acabaria als 4-5 dies després de la HPx. La massa hepàtica és reestablerta als 5-7 dies de realitzar la HPx en rosegadors i a les 3 setmanes en humans (Michalopoulos 2007), tot i que la mida dels lòbuls és major i les làmines d'hepatòcits són el doble en quan a mida respecte a una de normal (Michalopoulos et al. 1997). Segons un estudi, segueix havent una reorganització lenta lobular durant varies setmanes després de la HPx (Wagenaar et al. 1993).

Respecte com s'inicia el procés de regeneració després d'una HPx, alguns factors de creixement i citoquines han estat identificats. Els més importants són HGF, IL-6, TNF- α , TGF- α i EGF, a part d'hormones no peptídiques, la norepinefrina i la triiodotironina (Grompe 2009). D'altres també s'han descrit recentment, com els àcids biliars, la insulina, la serotonina o la via de Wnt/ β -catenina (Kang et al. 2012). En canvi, poc es coneix sobre els mecanismes pels quals els hepatòcits i la regeneració hepàtica s'aturen quan ja s'ha reestablert la massa hepàtica. Es creu que seria una barreja de senyals exògenes (endocrines, paracrines o autocrines) les que regularien el procés; entre elles trobaríem el TGF- β , regulant la replicació dels hepatòcits, o la via Hippo/YAP, regulant la mida global del fetge (Duncan et al. 2009).

En definitiva, tot i que els hepatòcits tenen una alta capacitat replicativa (Rhim et al. 1994; Overturf et al. 1997), en el dany hepàtic crònic perden aquesta capacitat replicativa i és quan proliferarien les CPH. Destacar que moltes de les vies i factors activats que governen la regeneració hepàtica en la HPx s'han descrit, tant en el procés de formació de l'epiteli biliar en embrions (Strazzabosco et al. 2012), com també en l'activació i proliferació de les CPH tal com ja s'ha explicat, algunes de les quals amb efectes contraris. Aquest fet pot ser un dels motius pel qual el fetge deixi de tenir com a mecanisme de regeneració principal els hepatòcits i iniciï la regeneració a través de les cèl·lules progenitores del fetge.

3.1.2 Models animals d'inducció de les CPH

El desenvolupament de models animals ha estat necessari per tal de caracteritzar les cèl·lules ovals, així com induir la seva activació i proliferació i veure la seva participació en la regeneració del fetge. La majoria dels models que indueixen la proliferació de les CPH van ser desenvolupats per tal d'estudiar el procés d'hepatocarcinogènesi, combinant un estímul mitòtic que produeixi dany i que provoqui una pèrdua de la massa hepàtica funcional (induit

per un agent químic), amb una manipulació que danyi crònicament els hepatòcits o els bloquegi la seva capacitat de divisió per tal que no puguin contribuir a la regeneració hepàtica (Tirnitz-Parker et al. 2012).

En el primer estudi en què es van descobrir les cèl·lules ovals el 1956, es van usar la DL-etionina o el carcinogènic 2-AAF en rates; Farber observà unes estructures pseudoductulars composades per cèl·lules petites properes a les àrees portals (Farber 1956). Més endavant, el model d'inducció de cèl·lules ovals es va perfeccionar i es va posar a punt el protocol més establert i fiable actualment per induir les cèl·lules ovals, el model 2-AAF/HPx. En aquest model, el 2-AAF bloqueja la proliferació i l'entrada al cicle cel·lular dels hepatòcits a dosis no carcinogèniques, mentre s'indueix un estímul fort de creixement de la massa hepàtica a través de la HPx. Com a resultat, es forma una reacció ductular i les CPH s'activen ja que no disposen dels enzims CYP necessaris per al metabolisme de la 2-AAF i no es bloqueja la seva proliferació (Evarts et al. 1987; Alison et al. 1996). Amb aquests models inicials es van fer varis estudis histològics de caracterització de les cèl·lules ovals, en molts dels quals es suggeria la seva capacitat bipotencial de diferenciació cap a hepatòcits i colangiòcits. No obstant, per a demostrar la seva bipotencialitat *in vivo* calia sistemes genètics de seguiment de llinatge (lineage tracing) i, malauradament, en rates aquests sistemes no existeixen. A més a més, el sistema 2-AAF/PH no funciona en ratolí ja que l'enzim N-sulfotransferasa, encarregat de generar sals sulfatades en la forma activa de l'AAF, no és present en ratolins. Al no generar-se les sals, l'AAF no es pot metabolitzar i no migra al nucli dels hepatòcits, on genera adductes de DNA (unió d'un fragment de DNA de manera covalent a un agent químic) causant el dany en els hepatòcits (Michalopoulos 2014). Per tant, el carcinogen no induceix en ratolí l'expansió de les CPH. Tot plegat, va fer la necessitat de buscar protocols alternatius en ratolins que induïssin aquesta activació i proliferació de les cèl·lules progenitores hepàtiques.

S'han buscat models alternatius, resumits en la Taula 3, alguns d'ells mimetitzant els emprats a rata i adequant-los a ratolí, com la combinació de Dipin i HPx per mimetitzar el model 2-AAF/HPx (Factor et al. 1994), o l'administració només d'un agent hepatotòxic que causi necrosi i bloquegi en part la seva proliferació com és l'acetaminophen (APAP) (Kofman et al. 2005), semblant al model de D-galactosamina en rates (Lemire et al. 1991). Aquests models en ratolí han sigut descrits com inductors de la proliferació de cèl·lules ovals, però actualment els models més emprats per induir les cèl·lules ovals o CPH en ratolins són models de dany hepàtic crònic com són la dieta suplementada amb 0,1% de 3,5-diethoxycarbonil-1,4-dihydrocollidine (DDC) (Preisegger et al. 1999) i la dieta deficient en colina i suplementada amb DL-etionina (CDE) (Akhurst et al. 2001).

L'hepatotoxina DDC indueix dany en el fetge i causa l'expansió/proliferació atípica ductular i l'acúmul de cèl·lules progenitores hepàtiques (Thompson et al. 2010). És un model que s'ha emprat per a l'estudi dels mecanismes d'activació i proliferació de les CPH, així com també s'ha establert com a un bon model per a estudiar la formació de cossos de Mallory (Hanada et al. 2008), associats a malalties com l'esteatohepatitis o malalties cròniques colestàtiques. Sobretot però, s'ha descrit la DDC com a model de colangitis esclerosant primària i fibrosi biliar, ja que la dieta DDC indueix a les CEB a presentar un fenotip reactiu (donant lloc a la reacció ductular). Aquest dany observat va acompanyat del següent fenotip: a) sobreexpressió de citoquines proinflamàtores i profibrògeniques, b) augment dels marcadors sèrics de dany hepàtic i de colèstasi, c) obstrucció dels ductes biliars per un augment de la secreció i la formació de taps de porfirina biliar, d) infiltrat de neutròfils al voltant dels ductes interlobulars, e) fibrosis periductal i f) desenvolupament de fibrosis periportal i septes porta-porta (Fickert et al. 2007; Thompson et al. 2010). Tot i que en primer lloc s'origina un dany biliar, aquesta lesió va seguida d'un dany hepatocitari; no obstant, mitjançant un anàlisi histològic es veu com tot i haver necrosi i apoptosi en els hepatòcits, es veuen tant cèl·lules del ducte biliar com hepatòcits marcats pel marcador de proliferació BrdU, suggerint que no es bloqueja completament la proliferació dels hepatòcits (Preisegger et al. 1999; Wang et al. 2003). Per tant, en aquest model la regeneració del fetge es dona tant per hepatòcits com per CPH (Tirnitz-Parker et al. 2012).

L'altra model més emprat com a inductor de les CPH és la dieta CDE. La dieta CDE també indueix la reacció i expansió de les cèl·lules ovals, però a diferència de la dieta DDC, la indueix de manera efectiva tant en rates com en ratolins (Jelnes et al. 2007). A diferència de la DDC, la dieta CDE indueix fetge gras i a vegades s'usa com a model de NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) (Itoh et al. 2014). Tot i així, en els primers estudis en rates s'usava com a dieta d'hepatocarcinogènesi, però es va observar que a més a més hi havia una proliferació massiva de cèl·lules progenitores hepàtiques AFP positives. Per aquesta raó, es va voler usar en models de ratolí genèticament modificats, però causava gran mortalitat en ratolins (Tirnitz-Parker et al. 2012) i per això es va modificar el protocol donant una dieta deficient en colina suplementada amb 0,165% de DL-etionina en l'aigua de beguda (Akhurst et al. 2001). Aquesta dieta no és considerada com a dieta inductora de dany i regeneració biliar com la dieta DDC, sinó que s'ha suggerit que indueix un dany hepatotòxic significatiu. Aquest dany s'ha vist per una fallida de la funció dels hepatòcits (disminució de l'expressió d'albumina) (Van Hul et al. 2009) al no poder exportar els triglicèrids i causar esteatosi, inflamació i per un efecte en la divisió dels hepatòcits al causar un arrest mitòtic transitori (Shin et al. 2015). Aquest arrest s'ha

suggerit a l'observar menys d'un 5% d'hepatòcits proliferatius Ki67 positius (Knight et al. 2007a). Tot plegat, fa que la dieta CDE s'associï a un model de dany hepatocitari i de regeneració del parènquima hepàtic (Boulter et al. 2013), que provoca en ratolins, a part de la proliferació de CPH, la proliferació de cèl·lules inflamatòries com leucòcits i l'expressió de citoquines proinflamatòries com TNF- α i IL-1 β (Knight et al. 2005a).

Tot i que tots aquests models indueixen la proliferació de les CPH, els diferents estudis realitzats fins ara descriuen diferències fenotípiques i mecanístiques en les CPH entre els diferents models (Miyajima et al. 2014). No queda clar si les CPH presenten característiques comunes ja que s'expandeixen a partir de diferents tipus de dany i, a més a més, les rates i els ratolins responen diferent al mateix tipus d'insult (Jelnes et al. 2007). Tot plegat, sumat a la manca de bons marcadors per a caracteritzar-les i aïllar-les, suggereix que les cèl·lules induïdes no són exactament les mateixes i fa difícil la comparació entre els diferents estudis/models realitzats fins ara (Dolle et al. 2010).

Espècie	Substància química/Manipulació
Ratolí	Dipin
	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)
	Phenobarbital + cocaïna + HPx
	Dieta deficient en colina + DL-ethionine (CDE)
	Dieta rica en greix + etanol
Rata	2-Acetilaminoflurà (AAF)
	Dietilnitrosamina (DEN)
	Model Solt-Farber
	DEN + AAF+ HPx
	Model Solt-Farber modificat
	AAF + HPx
	Dieta deficient en colina + DL-ethionine (CDE)
	D-galactosamina + HPx
	Retrosina + HPx

Taula 3. Principals models de regeneració hepàtica on s'indueix una resposta de CPH. Adaptada de Grompe et al. 2012.

3.1.3 Estudi de la participació de les CPH *in vivo*: tècnica del lineage tracing

Tot i la descripció de l'existència de les cèl·lules progenitores hepàtiques per part de Farber, la seva participació en la regeneració hepàtica resultava desconeguda. Per tal de poder avaluar la contribució de les CPH *in vivo* a la formació de nous hepatòcits i colangiòcits, calia desenvolupar tècniques de marcatge que identifiquessin i marquessin les CPH i la seva progènie. Aquestes tècniques de marcatge desenvolupades es basen en què la cèl·lula d'interès quedi marcada distintivament de forma permanent i no es perdi al transmetre's a la seva descendència. D'aquesta manera, es pot identificar les cèl·lules de la descendència que provenguin d'aquesta cèl·lula marcada inicialment (Boulter et al. 2013).

Els primers estudis es basaven en la retenció del marcatge d'anàlegs de DNA (anomenats label-retaining cell assays). Aquests anàlegs de DNA, com són la bromodeoxyuridina (BrdU) o la timidina tritiada (3H-timidina) són incorporats per les cèl·lules quan entren en la fase S de divisió (Snippert et al. 2011) i són distribuïts a les cèl·lules filles quan es divideixen. És una tècnica que s'utilitzava en òrgans amb un turnover cel·lular ràpid, però en el fetge, on les CPH es troben en quiescència en un fetge sa i els hepatòcits tenen un turnover molt lent, calia un dany inicial al fetge que promogués la proliferació de les CPH i la incorporació del marcatge en una situació de regeneració hepàtica (Kuwahara et al. 2008). Així, Tatematsu et al. van estudiar el paper de les CPH en rates sotmeses a 2-AAF i HPx (Tatematsu et al. 1984). Moltes CPH i pocs hepatòcits (per efecte del 2-AAF) van quedar marcats en el moment de donar-li's 3H-timidina. Aquest baix marcatge d'hepatòcits al llarg del temps els va portar a la hipòtesi que els hepatòcits no provenien de les cèl·lules progenitores. En canvi, un altre estudi va arribar a la conclusió contrària, ja que van observar marcatge de timidina inicialment en CPH i al cap d'un temps, també en hepatòcits, suggerint que els hepatòcits provenien de les cèl·lules progenitores hepàtiques (Evarts et al. 1987).

En ratolins, el model emprat va ser el de dues injeccions subletals d'acetaminophen (APAP) (anomenat pels autors assaig pulse and chase). La primera injecció serveix per a provocar un dany i que les CPH deixin d'estar en quiescència i proliferin, incorporant la BrdU administrada al mateix moment. La segona dosi provoca la divisió de les CPH i el marcatge queda diluït paulatinament al repartir-lo entre les seves cèl·lules filles (Kuwahara et al. 2008; Michalopoulos 2014). Com ja s'ha comentat prèviament, mitjançant aquesta aproximació, Kuwahara et al. van suggerir quatre possibles nínxols intrahepàtics de les cèl·lules progenitores hepàtiques basats en la localització de cèl·lules marcades amb BrdU (Kuwahara et al. 2008).

Cal dir, però, que la tècnica de label-retaining cell assay presenta una sèrie d'inconvenients: d'una banda, s'ha vist que usant en rates tant BrdU com 3H-timidina, no es pot veure la progènie a llarg termini ja que el marcatge és indetectable al cap de 3 divisions cel·lulars (Evarts et al. 1989). D'altra banda, el marcatge no és específic d'un tipus cel·lular únic i no és suficient per identificar les cèl·lules mare d'un teixit, a part que l'exposició perllongada a aquests marcadors provoca efectes potencials sobre el destí de la cèl·lula (Snippert et al. 2011; Lemaigre 2015). Aquests inconvenients s'han de sumar a un altre: els hepatòcits tenen un turnover lent que fa difícil aplicar assajos de marcatge de llarga durada per identificar les cèl·lules progenitores *in vivo* en un fetge adult (Miyajima et al. 2014).

Per tant, van sorgir d'altres tècniques per a resoldre la necessitat de seguir *in vivo* les CPH. Una d'elles va ser la de seguir mutacions gèniques (p.ex, mutacions mitocondrials (Fellous et al. 2009), la qual però no és versàtil i no permet determinar la cèl·lula d'origen amb seguretat (Lin et al. 2010). Una altra tècnica altament emprada va ser la de generar fetges quimeres (fetge compost per dues o més poblacions de cèl·lules genèticament diferents). Destaquen dos estudis: en un d'ells es van injectar hepatòcits dipeptidylpeptidasa (DPP)-IV positius en rates DPP-IV negatives i es va veure com cèl·lules DPP-IV positives es trobaven en l'epiteli biliar dels fetges receptors, suggerint que els hepatòcits podien donar lloc a cèl·lules biliars (Laconi et al. 1998; Michalopoulos et al. 2005). En l'altre estudi, cèl·lules ovals de fetge de ratolins FAH positius eren capaces de generar hepatòcits i repoblar fetges FAH deficients (Wang et al. 2003). No obstant, s'ha suggerit la possibilitat que la purificació i reimplantació d'aquestes cèl·lules poden afectar les seves propietats de diferenciació (Lemaigre 2015).

Tot plegat, va promoure la necessitat de trobar una tècnica que no necessités una purificació prèvia de cèl·lules i amb un marcatge persistent al llarg del temps i de forma específica. És en aquest context en el qual es van desenvolupar eines genètiques en ratolins basades en la recombinació, la més important va ser la de seguiment de llinatge genètic (genetic lineage tracing) mitjançant l'aplicació del sistema Cre/loxP. En aquest sistema, el ratolí porta dos transgens: 1) Un cassette d'expressió gènica de la recombinasa Cre que està sota control d'un promotor d'un gen específic per a un tipus cel·lular i 2) un al·lel d'un gen reporter floxejat per seqüències locus X-over P1 (loxP). El cassette d'expressió gènica pot ser creat per transgènesi convencional, per transgènesi d'un cromosoma bacterià artificial (BAC) o per knock-in en un locus endogen d'un tipus cel·lular amb un gen marcador específic. L'expressió del gen reporter és activada per la recombinació provocada per Cre (el gen reporter més emprat és ROSA2r, en el qual un gene cassette loxP-STOP-loxP-YFP o LacZ (Lactose Operon Z) és knockejat dins del locus expressat ubicuament ROSA26 (Kawaguchi 2013)).

En el cas que es vulgui fer aquest marcatge de manera temporal, Cre es pot fusionar amb el domini mutat d'unió al lligand del receptor d'estrogen (CreER), que és sensible al tamoxifè però no a l'estrogen, fent que l'activitat de Cre sigui induïble per tamoxifè. Si una cèl·lula presenta els dos transgens i és exposada a l'administració de tamoxifè, CreER es dirigeix al nucli i elimina/disrupta el cassette STOP flanquejat per seqüències loxP. D'aquesta manera, s'indueix la transcripció irreversible en el locus ROSA26 del gen reporter i marca de manera permanent les cèl·lules gràcies al gen reporter, tal com es veu en la Figura 11. A causa que el tamoxifè té una vida mitja limitada, només les cèl·lules que expressen el gen específic i, en conseqüència, Cre, durant el període de temps en el qual el tamoxifè és actiu, quedaran marcades (Greenbaum 2011b). Com la recombinació es dona a nivell de DNA genòmic, el marcatge és heretat per les cèl·lules descendents de la cèl·lula marcada sense importar quin sigui el seu destí/funció dins el fetge (Kawaguchi 2013; Lemaigre 2015).

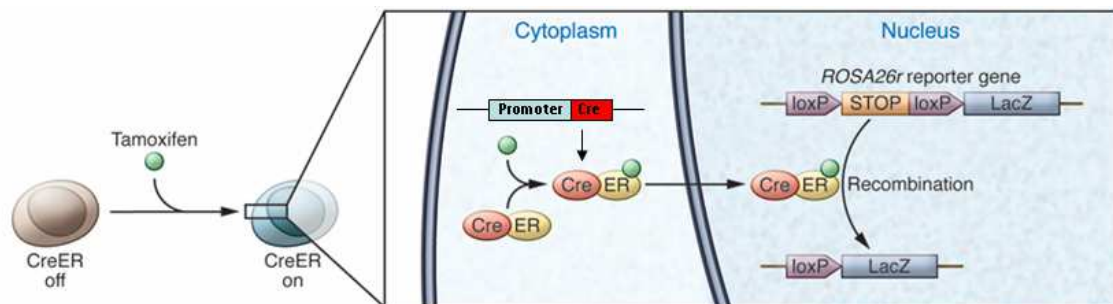


Figura 11. Esquema del funcionament de la tecnologia Cre-LoxP. Aquesta tecnologia permet el marcatge permanent de les cèl·lules d'interès que expressen un gen determinat i la seva progènie gràcies a l'expressió d'un gen reporter (en l'esquema, LacZ). Adaptat de Kawaguchi et al. 2013.

El primer estudi que emprava aquesta tecnologia expressava de manera permanent Cre sota el promotor de Foxl1, un marcador considerat de cèl·lula progenitora adulta ja que no s'expressa en un fetge sa però s'indueix la seva expressió en situacions de dany. En aquest estudi, van observar com en ratolins Foxl1-Cre, després d'induir dany mitjançant la dieta DDC o la lligadura del conducte biliar (BDL), la progènie de les cèl·lules Foxl1 positives estava conformada no només per CEB (positives pel marcador de colangiòcits KRT19 i per β -gal, producte del gen reporter LacZ) sinó també per la presència d'hepatòcits (doble positives pel marcador d'hepatòcits madurs HNF4 i per β -gal). Aquest percentatge d'hepatòcits generats a partir de cèl·lules Foxl1 positives era força baix (menys d'un 0,5% del total d'hepatòcits), però demostrava la bipotencialitat de les cèl·lules Foxl1 positives ja que donaven lloc tant a colangiòcits com a hepatòcits (Sackett et al. 2009). Aquest mateix grup usant el mateix ratolí han vist que en el model de CDE també contribueixen i mostren com bloquejant la gran majoria d'hepatòcits i colangiòcits, les cèl·lules Foxl1 positives són indispensables per a

recuperar-se del dany (Shin et al. 2015). Els estudis posteriors que pretenien avaluar la contribució de les CPH a la neogènesi d'hepatòcits van aprofitar la tecnologia d'induir la Cre de forma temporal per investigar el paper d'aquestes cèl·lules. No obstant, els resultats obtinguts en aquests estudis posteriors van ser contradictoris i no van permetre discernir quina de les teories existents sobre el turnover hepatocitari és la correcta (veure Figura 12).

En l'estudi de Furuyama et al. s'emprava Sox9 com a marcador específic de colangiòcits i cèl·lules progenitores hepàtiques. Usant un ratolí Sox9-IRES-CreERT2 knock-in, els autors van veure que sota condicions d'homeòstasi, les cèl·lules Sox9 positives es diferenciaven a colangiòcits i hepatòcits, i aquests hepatòcits marcats per X-gal (provinent de cèl·lules Sox9 positives) s'estenen des de la zona periportal cap a regions pericentrals (Miyajima et al. 2014). Al cap de 6 mesos, aquests hepatòcits marcats representaven un 60% dels hepatòcits totals i aquest percentatge augmentava amb el temps fins al 80-90% al cap de 12 mesos (Furuyama et al. 2011). A més, veien contribució de les cèl·lules Sox9 positives a la població hepatocitària de manera notable en models com el de BDL o el dany agut per CCl₄. En canvi, la contribució era baixa en la dieta DDC, en HPx i en dany agut per APAP. En resum, durant la vida d'un ratolí, el reemplaçament d'hepatòcits, especialment en una situació d'homeòstasi, es donaria per hepatòcits derivats de CEB Sox9 positives i donaria suport a la teoria ja esmentada anomenada "streaming liver hypothesis" proposada el 1985 per Zajicek, en la qual explica la regeneració lenta i constant dels hepatòcits (Zajicek et al. 1985; Michalopoulos 2014; Gehart et al. 2015). Altres estudis reforçarien la idea que una població de cèl·lules que no són CPH són les responsables de l'aportació constant d'hepatòcits en situacions d'homeòstasi. En un primer estudi, cèl·lules albúmina negatives (no s'inclouen a les CPH) generarien nous hepatòcits tant en situació basal, com en models de dany per dieta CDE, podent arribar a reemplaçar una part important del parènquima hepàtic i contribuir al manteniment de l'homeòstasi cel·lular (Iverson et al. 2011). En un altre estudi, la població cel·lular responsable de subministrar nous hepatòcits de manera contínua en una situació d'homeòstasi no es trobaria en la zona periportal sinó en la regió pericentral; serien hepatòcits Axin2 positius (Wang et al. 2015). No s'ha determinat però, quin paper juguen en una situació de dany.

Força estudis recents, entre els quals s'inclou l'estudi dos d'aquesta tesi doctoral (Sackett et al. 2009; Dorrell et al. 2011; Malato et al. 2011; Espanol-Suner et al. 2012; Huch et al. 2013; Rodrigo-Torres et al. 2014; Jors et al. 2015; Lu et al. 2015; Shin et al. 2015) recolzarien una altra hipòtesi. En aquests estudis, es defensa que en situació d'homeòstasi, les CPH no participen en la regeneració de nous hepatòcits. En situacions de dany, tot i que les CPH tenen

la capacitat de diferenciar-se a hepatòcits, només contribuïrien en determinades situacions, i de forma mínima. En la majoria de situacions seria el parènquima, compostat per hepatòcits madurs, la font principal de generació de nous hepatòcits; s'encarregarien del seu propi manteniment.

Usant el mateix marcador descrit abans, Sox9, però generant el constructe d'expressió gènica mitjançant un BAC, es va observar com en ratolins Sox9-CreERT2 marcats a nivell embrionari, les cèl·lules Sox9 positives donaven lloc a colangiòcits i a hepatòcits periportals al llarg del temps, però no contribuïen de manera significativa a nous hepatòcits. Arriben a la conclusió que les cèl·lules ovals que proliferen en les dietes DDC i CDE provenen de la progènie de la placa ductal embrionària, i és improbable que derivin d'hepatòcits periportals ni de ductes interlobulars (Carpentier et al. 2011). A més, proven que a nivell adult, el tamoxifè induïx l'expressió ectòpica de Sox9 en hepatòcits, fet que podria explicar els resultats obtinguts abans per l'estudi de Furuyama et al., o en el de Dorrell et al, on emprant el mateix ratolí Sox9-CreERT2 determinen que hi ha una presència d'hepatòcits derivats de cèl·lules progenitores Sox9 positives en la dieta DDC (Dorrell et al. 2011). No obstant, un estudi emprant el mateix ratolí, indica que no serien les CPH Sox9 positives, sinó aquests hepatòcits periportals híbrids Sox9 positius que expressen també marcadors de cèl·lules biliars com s'ha vist en altres estudis (Carpentier et al. 2011; Isse et al. 2013), els encarregats de regenerar el fetge en situacions de dany crònic, podent repoblar el parènquima sencer (Font-Burgada et al. 2015).

Altres marcadors de cèl·lules de l'epiteli biliar/CPH s'han emprat per evitar el problema d'expressió ectòpica en hepatòcits i veure la contribució real de les CPH. En un estudi del mateix grup que Carpentier et al, però estudiant la contribució en teixit adult, es va utilitzar un altre marcador de colangiòcits i CPH com OPN. Amb el sistema OPN-CreERT2, van confirmar els resultats obtinguts anteriorment ja que no van veure contribució, o contribució pràcticament nul·la, de cèl·lules OPN positives a nous hepatòcits, tant en homeòstasi com en la majoria de models realitzats (HPx, DDC, i dany per CCl₄ agut i crònic). Només en el model CDE van observar una petita contribució (0,78%) d'hepatòcits d'origen OPN positiu, que augmentava fins al 2,45% si permetien la recuperació del fetge després del dany induït per CDE (Espanol-Suner et al. 2012). Altres estudis també han observat una contribució nul·la en homeòstasi, però mínima o insignificant en situació de dany. Aquesta participació es veia especialment en el model on s'indueix dany per CDE i es permet posteriorment la recuperació del dany, emprant altres ratolins transgènics com Krt19-CreERT (Lu et al. 2015), o HNF1b-CreER (Jors et al. 2015). En l'estudi emprant HNF1b com a marcador, en dieta CDE 3 setmanes es veia com

només un 0,13% dels hepatòcits eren positius per HNF4- α i pel gen reporter i aquest percentatge, augmentava a 2,12% després de les dues setmanes de recuperació. Finalment, un altre estudi usant un marcador absent en fetges normals però present en situacions de dany en CPH activades com és Lgr5, van observar com les cèl·lules Lgr5 positives en ratolins Lgr5-IRES-creERT2 també contribuïen de manera mínima en la formació de nous hepatòcits en dany agut per CCl₄ i en la dieta DDC (Huch et al. 2013).

Aquests resultats on es veu una contribució mínima estan en concordança amb estudis que usaven una estratègia complementària. En aquests estudis, l'expressió de Cre es dona única i específicament en hepatòcits mitjançant un vector viral adenoassociat (AAV) sota el promotor de la transtiretina (TTR) (AAV8-Ttr-Cre) en ratolins Rosa26R-YFP, gen específic en hepatòcits; d'aquesta manera l'expressió de Cre es dona única i específicament en hepatòcits. Amb aquesta estratègia van observar com, després de 6 mesos, tots els hepatòcits quedaven marcats, significant que tots tenien origen hepatocitari i no hi havia contribució de les CPH en un fetge normal. En situació de dany, només veien, a diferència dels resultats de Furuyama et al., en els models de dany crònic per CCl₄ i HPx aproximadament un 1,4% d'hepatòcits negatius pel reporter EYFP, suggerint que provindrien de les CPH. En els altres models (BDL, DDC i dany agut per CCl₄) la contribució de nous hepatòcits per part d'altres tipus cel·lulars que no foren hepatòcits era nul·la (Malato et al. 2011).

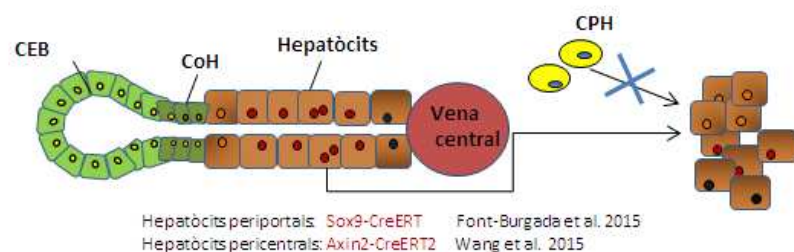
Donat que aquests estudis suggereixen que les CPH/cèl·lules de l'epiteli biliar tenen la capacitat de donar nous hepatòcits, a causa de la seva bipotencialitat, estudis recents han avaluat el possible origen en aquestes cèl·lules en la formació de càncer, en concret, del carcinoma hepatocel·lular. Tots els estudis, emprant ratolins de seguiment de llinatge diferents, han arribat a la conclusió que ni les cèl·lules CPH, ni tampoc els hepatòcits híbrids periportals, originen el carcinoma hepatocel·lular sinó que són els hepatòcits (Font-Burgada et al. 2015; Jors et al. 2015; Mu et al. 2015).

Finalment, estudis recents amb la tècnica de seguiment de llinatge recolzen una tercera línia sobre el paper de les CPH, en la qual es posa en dubte la participació/activitat de les CPH en les situacions de dany, i recolzarien que els hepatòcits són les úniques cèl·lules amb capacitat de generar nous hepatòcits (Schaub et al. 2014; Yanger et al. 2014; Tarlow et al. 2014a). Així, en un primer estudi, emprant un ratolí transgènic Sox9CreERT2 on es marca la seva descendència amb diferents gens reporters per veure la capacitat d'un sola cèl·lula a donar hepatòcits (clonalitat), no van observar hepatòcits derivats clonalment de CPH ni en homeòstasi ni en diverses situacions de dany, entre els quals el model on s'ha vist major

contribució de CPH a hepatòcits (dieta CDE més un període de recuperació) (Tarlow et al. 2014a). A més, emprant el vector AAV8-TTR-Cre que marca tots els hepatòcits observen com són els hepatòcits els únics que es divideixen en els models d'inducció de CPH. En un altre estudi, emprant el mateix vector AAV8-TTR-Cre o emprant un ratolí Krt19-Cre, veuen un petit percentatge d'hepatòcits sense marcatge en el model de CDE amb dany i recuperació, però en contradicció al què van publicar prèviament (Malato et al. 2011), associen aquest petit percentatge no a la contribució de cèl·lules no parenquimals sinó a un problema en l'eficiència de marcatge que no és del 100% (Schaub et al. 2014). Finalment, en un altre estudi usant el ratolí Krt19-Cre i un ratolí al qual s'administra el vector per a marcar hepatòcits AAV8-TBG-Cre, van observar idèntics resultats en homeòstasi i en diferents models de dany com CCl₄, CDE i DDC (Yanger et al. 2014). A més, tampoc veuen contribució a hepatòcits si les CPH són marcades després d'induir un dany hepàtic, on suposadament aquestes cèl·lules s'haurien expandit.

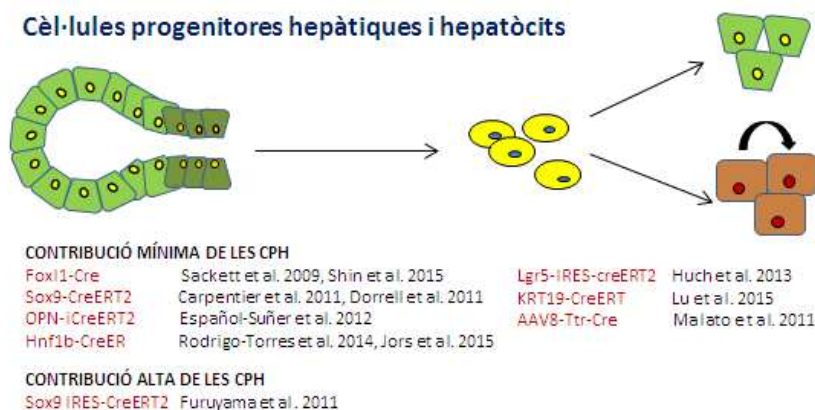
Tot i que s'ha descrit que les CEB donen lloc a noves CEB, així com a la RD en situacions de dany, estudis mitjançant la tècnica de seguiment de llinatge han proposat que els hepatòcits també tenen la capacitat de generar CEB per un procés de transdiferenciació en certs tipus de dany hepàtic (Yanger et al. 2013; Sekiya et al. 2014; Tanimizu et al. 2014; Tarlow et al. 2014b) i/o modulant vies de senyalització claus en el desenvolupament com Notch (Jeliazkova et al. 2013; Yanger et al. 2013) i Hippo/YAP (Yimlamai et al. 2014). Fins i tot, les CEB derivades d'hepatòcits podrien tornar a diferenciar-se a hepatòcits *in vivo* (Tarlow et al. 2014b).

Homèostasi i dany hepàtic agut

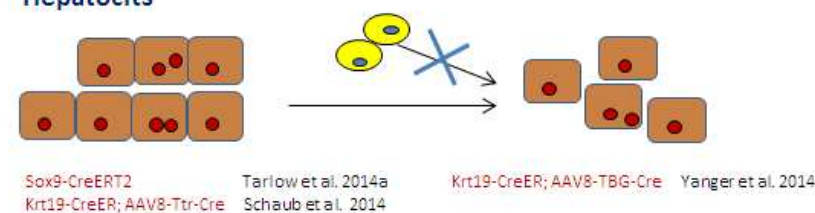


Dany hepàtic crònic

A Cèl·lules progenitores hepàtiques i hepatòcits



B Hepatòcits



C Transdiferenciació



Figura 12. Mecanismes cel·lulars potencials descrits actualment en la regeneració hepàtica. En lletra vermella, ratolí transgènic de seguiment de llinatge emprat en cada estudi. CEB: cèl·lules de l'epiteli biliar; CoH: canal de Hering; CPH: cèl·lules progenitores hepàtiques.

3.2 Les cèl·lules progenitores hepàtiques en les malalties hepàtiques humanes

Donat que la majoria de malalties hepàtiques humanes estan caracteritzades per un cert grau de dany, que comporta la pèrdua d'hepatòcits i una regeneració cada cop menor d'hepatòcits i CEB, no és d'estranyar l'activació de les CPH en varies d'aquestes condicions

(Gaudio et al. 2009). L'activació de les CPH en humans es caracteritza per l'aparició i proliferació de ductulets reactius, que com ja s'ha dit, és un fenomen que se'l coneix amb el nom de reacció ductular (RD) i és una resposta reparativa al dany hepatobiliar que es produeix. La RD està formada per la proliferació de ductulets, però també per una "reacció", una lesió reactiva composta per cèl·lules inflamatòries, l'estroma i altres estructures (totes elles formarien el nínxol per aquests nous ductulets). La RD és anàloga morfològicament i immunohistoquímicament a la resposta de les cèl·lules ovals vista en rosegadors. La RD és definida com una reacció amb origen i fenotip ductular, observada tant en la malaltia hepàtica aguda com crònica. Aquesta reacció podria sorgir de: 1) la proliferació de colangiòcits preexistents; 2) cèl·lules progenitores hepàtiques i 3) metaplàsia biliar d'hepatòcits (Roskams et al. 2004), tot i que es creu que la gran majoria deriva del compartiment de les CPH (Fabris et al. 2007).

En humans, la RD està composta des de CPH indiferenciades immadures amb un fenotip mixt, fins a CPH ja predeterminades a seguir cap al llinatge hepatocitari o colangiocític a través de varies etapes de diferenciació i maduració (Zhou et al. 2007). La diferenciació cap a hepatòcits succeeix a través de cèl·lules intermitges hepatobiliars, mentre que la diferenciació cap al llinatge biliar porta a la formació de ductulets reactius (Roskams et al. 2004), tal com es mostra en la Figura 13.

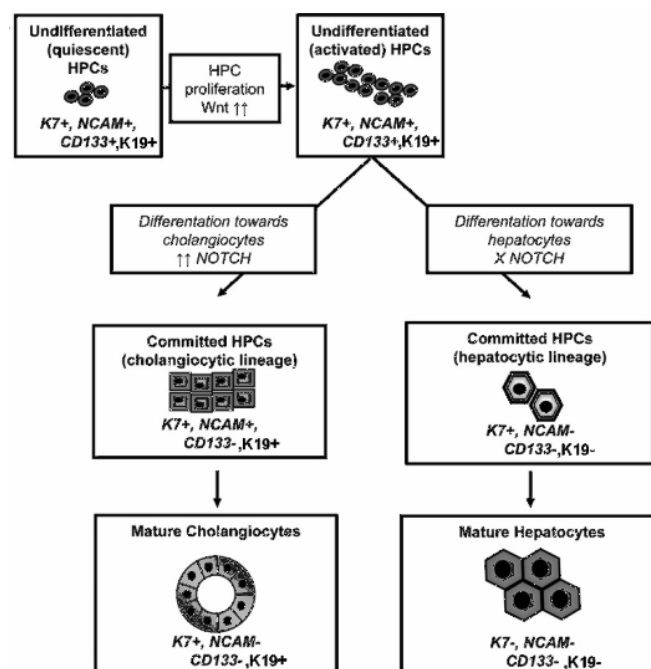


Figura 13. Procés d'activació i diferenciació de les CPH cap a hepatòcits i colangiòcits. Extret d'Spee et al. 2010.

En les malalties hepàtiques cròniques, la presència de RD està relacionada amb la senescència i l'arrest proliferatiu dels hepatòcits (Weng et al. 2015), ja que al ser un dany perllongat durant anys i dècades, la proliferació d'aquestes cèl·lules es va disminuint fins a exhaurir-se (Bird et al. 2008). En etapes més severes de la malaltia com és la cirrosi s'observa una gran presència de RD (Zhou et al. 2007). En canvi, en el dany hepàtic agut, també es veuen CPH després d'una necrosi massiva aguda. En aquesta situació, es veu regeneració tant de CPH com de replicació d'hepatòcits. En un estudi amb pacients amb fallida hepàtica aguda, es va establir que una pèrdua del 50% d'hepatòcits és el llindar per a què hi hagi una activació extensiva de CPH a causa d'una disminució proliferativa d'hepatòcits (Katoonizadeh et al. 2006). Tot plegat, la presència de les CPH i la reacció ductular ha generat interès en nombrosos estudis per tal d'investigar el paper encara desconegut que podrien jugar aquestes cèl·lules en la progressió de la malaltia i en la resolució del dany. A continuació es mostren els estudis realitzats en les diferents patologies i la implicació de les CPH en elles:

1. Fallida hepàtica aguda (acute liver failure (ALF)) i aguda sobre un dany previ crònic (acute-on-chronic liver failure (ACLF))

Alguns estudis han descrit la presència d'una RD considerable en pacients amb ALF (Katoonizadeh et al. 2006; Dechene et al. 2010) i ACLF (Katoonizadeh et al. 2010; Rastogi et al. 2011). En els pacients amb ALF, s'ha vist una sobreexpressió de marcadors associats a les CPH, a més d'una relació entre la pèrdua de parènquima hepàtic i el grau de necrosi amb una activació de les cèl·lules estrellades hepàtiques i una major proliferació de CPH (Dechene et al. 2010; Nissim et al. 2012). En l'ALF, també es va veure que el nombre de CPH, d'hepatòcits proliferants i la pèrdua d'hepatòcits correlaciona amb paràmetres clínics de deficiència hepàtica com MELD (Model for endstage liver disease). A més, es va veure que els pacients que sobreviuen presentaven una menor pèrdua de massa hepatocitària, menys CPH i un major nombre d'hepatòcits proliferants. Finalment, van determinar que l'activació i l'expansió de les CPH es dona durant la primera setmana del curs de la malaltia i que la diferenciació cap a hepatòcits madurs necessita com a mínim de 7 dies (Katoonizadeh et al. 2006), sent una velocitat baixa per a reestablir la massa i funció hepatocitària en ACLF (Weng et al. 2015). En aquesta malaltia, s'ha vist que els pacients amb un mal resultat (outcome) tenen una major proliferació ductular i una major degeneració d'hepatòcits (Rastogi et al. 2011).

2. Malalties hepàtiques cròniques

Tal com s'ha dit, estudis en els quals s'avaluen varies patologies cròniques hepàtiques s'ha observat una correlació entre la severitat de la malaltia i un augment en el nombre de

CPH (Lowes et al. 1999; Tan et al. 2002), així com necrosi hepàtica submassiva en les malalties on s'ha estudiat. Dins d'aquest grup trobem malalties causades per infeccions virals (hepatitis per virus B o C), per abús d'alcohol (malaltia per consum d'alcohol), malalties genètiques (hemocromatosis), per cirrosi (cirrosi biliar primària (PBC) o cirrosi associada a colangitis esclerosant primària (PSC)) o per malalties autoimmunes (hepatitis autoimmune), entre d'altres.

a) Hepatitis per virus B (HVB) i per virus C (HVC)

Tant en HVB (Libbrecht et al. 2000b; Fotiadu et al. 2004; Yoon et al. 2011; Weng et al. 2013) com en HVC (Libbrecht et al. 2000b; Fotiadu et al. 2004; Clouston et al. 2005; Delladetsima et al. 2010; Yoon et al. 2011), diversos estudis han demostrat la correlació entre el grau de la malaltia i la presència de CPH, així com la correlació amb la severitat de la inflamació, l'estadi de l'hepatitis i el grau de fibrosi. En HVC, s'ha suggerit que la RD dona peu a la fibrosi (Clouston et al. 2005). A més, s'ha suggerit que existeix la diferenciació de les CPH en els estadis més tardans de les hepatitis (Fotiadu et al. 2004; Yoon et al. 2011), basat en evidències en què mitjançant el marcador de CPH EpCAM observen la presència d'hepatòcits de nova generació que són positius per aquest marcador. Aquesta expressió correlaciona amb l'aparició de la reacció ductular proliferant i aquests hepatòcits EpCAM es situen a la perifèria de cordes de cèl·lules hepatobiliars de la reacció ductular KRT19 positives. Així, aquests estudis suggereixen que aquests hepatòcits tenen origen en les CPH a través d'una cèl·lula intermitja hepatobiliar (Yoon et al. 2011), com també s'ha suggerit en d'altres malalties cròniques com la PBC, PSC o en malaltia per consum d'alcohol (Falkowski et al. 2003).

b) Esteatohepatitis alcohòlica (ASH) i NAFLD

Tant en ASH com en NAFLD s'ha vist una major RD a mesura que progressa la malaltia, així com una menor replicació d'hepatòcits i un augment de l'arrest cel·lular per estrès oxidatiu (Roskams et al. 2003; Richardson et al. 2007; Nobili et al. 2012). En NAFLD pediàtric, s'ha suggerit la participació de les CPH en la secreció de molècules implicades en la senyalització d'adipoquines. Aquestes molècules s'associen a una major severitat de la malaltia, suggerint la seva participació en el procés d'esteatosi o acúmul de greix (Nobili et al. 2012). En aquesta situació, una major presència d'hepatòcits intermedis provinents de les CPH s'associa a un major ballooning (dipòsits de greix) hepatocitari. Aquesta RD vista en NAFLD s'associa a fibrosi i a una inflamació portal, on emergeixen les CPH (Gadd et al. 2014; Carotti et al. 2015). Avaluant quines són les cèl·lules inflamatòries que envolten la RD i que podrien influir en la seva progressió, es va observar que sobretot macròfags i limfòcits T CD8 positius eren les

poblacions més presents al voltant de la RD, tot i haver també neutròfils, limfòcits B i limfòcits T CD4 positius (Gadd et al. 2014).

c) Malaltia hepàtica per consum d'alcohol (ALD)

En l'ALD s'ha vist la presència de CPH i com l'alcohol promou l'expansió de les CPH (Roskams et al. 2003; Jung et al. 2008) i correlaciona amb la severitat de la malaltia (Lowes et al. 1999). En aquesta malaltia, la via Hh jugaria un paper important en les CPH i la seva expressió correlacionaria amb la predicció de la mortalitat (Jung et al. 2008). En canvi, en el context de la hepatitis alcohòlica (HA) no hi havia cap estudi. No obstant, posteriors al primer estudi d'aquesta tesi doctoral (Sancho-Bru et al. 2012), on es descriu per primer cop la presència de CPH en pacients amb HA, han aparegut dos estudis confirmant que les CPH tenen un paper en l'HA (Dubuquoy et al. 2015; Lanthier et al. 2015). En un d'ells, observen com hi ha un descens de la proliferació hepàtica i una menor presència de citoquines involucrades en la regeneració hepàtica com TNF- α i IL-6. A més, veuen que les CPH només donen CEB i suggereixen que no són capaces de generar hepatòcits, basant-se en la composició de la matriu extracel·lular (Dubuquoy et al. 2015). En l'altre estudi, també correlacionen la major presència de CPH amb la severitat de la malaltia. Observen a més, com els pacients que responen favorablement al tractament per corticoesteroids i presenten un millor pronòstic tenen una major expansió de macròfags i una major proliferació tant de CPH com d'hepatòcits (Lanthier et al. 2015).

d) Altres malalties

La RD és un fet comú en quasi totes les malalties hepàtiques cròniques. A part de les malalties esmentades abans, també s'ha observat en colangiopaties com la PBC i la PSC la presència d'una RD (Crosby et al. 1998), així com en l'atrèsia biliar (Fabris et al. 2007), on els ductes biliars no es desenvolupen correctament, i en malalties hereditàries com l'hematocromatosis (Wood et al. 2014). En l'hematocromatosis, l'acúmul excessiu de ferro que es dona en els hepatòcits causa la proliferació de CPH i una major fibrosi (Wood et al. 2014). En canvi, en una malaltia hepàtica com és la síndrome d'Alagille, no s'observa reacció ductular però sí un gran acúmul d'hepatòcits intermedis (Fabris et al. 2007).

e) Cèl·lules progenitores hepàtiques i càncer

Les CPH apareixen en patologies amb una predisposició a desenvolupar càncer. A més, aquestes cèl·lules creixen en un ambient amb molts factors de creixement, molècules inflammatòries i espècies reactives d'oxigen. Sumat a les característiques de les CPH de capacitat

d'autorenovació i potencial migratori, ha fet pensar en les CPH com una diana plausible de transformació cap a un fenotip cancerígen (Tirnitz-Parker et al. 2012; Kruitwagen et al. 2014). Així, s'ha descrit les CPH com a possible origen tant del carcinoma hepatocel·lular com del colangiocarcinoma, i l'expressió de marcadors de CPH en aquests tipus de càncer s'ha descrit com un indicador de pronòstic negatiu (Kruitwagen et al. 2014).

OBJECTIUS

Les cèl·lules progenitores hepàtiques es caracteritzen per la seva proliferació en situacions de dany hepàtic crònic, quan la replicació dels hepatòcits està compromesa. La seva presència s'ha descrit en nombroses malalties hepàtiques i es correlaciona amb la severitat del dany, però el seu paper en l'HA és desconegut. S'ha descrit que aquestes cèl·lules tenen la capacitat bipotencial *in vitro*, però la seva contribució real *in vivo* a la generació de nous hepatòcits en homeòstasi i en situacions de dany hepàtic no és clara i segueix sense haver un consens sobre la seva participació en aquestes situacions.

Per tot plegat, l'objectiu global d'aquesta tesi doctoral és, en primer lloc, avaluar la presència i el paper de les de CPH en el context de l'HA humana. En segon lloc, es pretén avaluar el grau de contribució que tenen les CPH en la regeneració hepàtica en un fetge sa i en un context de dany hepàtic.

Específicament, els objectius principals dins de cada estudi són els següents:

1. **Investigar el paper de les cèl·lules progenitores hepàtiques en l'hepatitis alcohòlica**
 - 1.1 Avaluar la presència de CPH en pacients amb HA i amb altres malalties hepàtiques.
 - 1.2 Analitzar la possible correlació entre l'expressió dels marcadors de CPH amb paràmetres clínics de la HA i amb marcadors (*scores*) de pronòstic clínic.
 - 1.3 Avaluar el grau d'expressió dels marcadors de les CPH com a bon marcador per al pronòstic de la mortalitat i la determinació de la supervivència a curt termini en pacients amb HA.
2. **Avaluar la contribució de les cèl·lules progenitores hepàtiques en el fetge**
 - 2.1 Determinar l'expressió de HNF1 β en un fetge humà sa i en pacients amb cirrosi.
 - 2.2 Avaluar la contribució de les cèl·lules HNF1 β positives a la renovació hepatocitària durant l'homeòstasi cel·lular del fetge.
 - 2.3 Determinar la contribució de les cèl·lules HNF1 β positives en models de dany crònic.
 - 2.4 Entendre els mecanismes que regulen una diferent contribució de les CPH a hepatòcits segons el tipus de dany que pateixen.

3. Avaluar el perfil inflamatori de les cèl·lules progenitores hepàtiques i el reclutament dels neutròfils en l'hepatitis alcohòlica

- 3.1 Comparar el perfil d'expressió gènica de les CPH aïllades de ratolí amb les cèl·lules de la RD de pacients amb HA.
- 3.2 Avaluar la localització dels neutròfils i la RD en fetges humans i de ratolins.
- 3.3 Observar l'efecte del bloqueig de la via inflamatòria NF-kB en la progressió de la RD *in vivo*.
- 3.4 Estudiar l'efecte dels neutròfils sobre les CPH mitjançant el cocultiu *in vitro*.

RESULTATS

RESUM DELS RESULTATS DE L'ARTICLE 1

“Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis”

“Els marcadors de les cèl·lules progenitores hepàtiques correlacionen amb el dany hepàtic i prediuen la mortalitat a curt termini en pacients amb hepatitis alcohòlica”

Sancho-Bru P. et al. Hepatology. 2012 Jun;55(6):1931-41

L'hepatitis alcohòlica és un esdeveniment agut, caracteritzat per fibrosi, dany hepatocel·lular i una resposta inflamatòria, que es dona en el 20% dels pacients amb una malaltia crònica per consum d'alcohol. En moltes malalties hepàtiques on hi ha una dany massiu o crònic, els hepatòcits queden compromesos proliferativament i les cèl·lules progenitores hepàtiques que es troben en els canals de Hering proliferen i donen lloc a la reacció ductular. No obstant, se sap poc sobre la contribució real de les CPH en la recuperació de la funció hepàtica i no hi ha estudis funcionals que hagin descrit la dinàmica, la progressió i l'expansió de les CPH en el curs de les malalties hepàtiques, entre elles l'HA. En aquest estudi, resumit a continuació, s'ha descrit per primer cop, emprant biòpsies i talls histològics de pacients amb HA, la presència d'una important reacció ductular i una proliferació extensa de CPH. A més, hem descrit que l'expressió de marcadors de CPH correlaciona amb la severitat de la malaltia i que són bons marcadors de pronòstic de la mortalitat a curt termini en pacients amb HA.

Expressió de marcadors de CPH en pacients amb HA

Mitjançant l'anàlisi d'un microarray publicat anteriorment pel nostre grup (Affo et al. 2013), on es van incloure mRNA de fetge de 15 pacients amb HA i 7 mostres controls, hem observat com gens relacionats amb les CPH i a la reacció ductular com *KRT7*, *TROP2*, *EpCAM*, *SOX9*, *PROM1* i *KRT19* estan sobre-regulats en els pacients amb HA. Aquesta sobre-regulació demostra que la població CPH està enriquida en el fetge d'aquests pacients.

D'aquests gens sobre-regulats, vam seleccionar *KRT7*, *PROM1* i *EpCAM* com a gens representatius de la reacció ductular i es va mirar la seva expressió en una cohort més gran de pacients amb HA (n=59). L'expressió d'aquests tres gens va sortir significativament més elevada ($p < 0,05$) quan ho vam comparar amb pacients amb altres malalties hepàtiques amb

diferent etiologia com cirrosi induïda pel virus de l'hepatitis C (n=16) i hepatitis C crònica (n=14), a més de fragments de teixit normal (n=12).

Factors que influeixen la supervivència dels pacients: paper de les cèl·lules progenitores hepàtiques

A continuació, vam comparar l'expressió de *KRT7*, *PROM1* i *EpCAM* en els pacients amb HA que van morir durant els 90 primers dies després de la seva admissió (n=16), respecte als que van sobreviure. Vam veure que tant per *KRT7* i *PROM1*, però no per *EpCAM*, la seva expressió estava més elevada en els pacients morts. A més, vam observar que l'expressió de *KRT7* correlacionava positivament amb *scores* de pronòstic clínic com MELD ($p=0,006$) i Maddrey's discriminant function ($p=0,004$). Tots aquests resultats demostren que l'HA es caracteritza per una reacció ductular important i que el dany hepàtic pot ser un desencadenant important d'aquesta reacció.

Per a determinar que l'expressió de marcadors de CPH són bons marcadors pronòstic de mortalitat en aquests pacients, vam fer un anàlisi univariat que ens va permetre identificar, entre d'altres, els nivells sèrics de bilirubina, els nivells de creatinina, el MELD i l'ABIC (Age, serum Bilirubin, INR, and serum Creatinine) *score*, així com l'expressió de dos d'ells, *PROM1* i *KRT7*, estaven associats amb la mortalitat a 90 dies. En l'anàlisi de regressió multivariada, l'expressió de *PROM1* i *KRT7* eren dels millors predictors independents de la mortalitat a 90 dies, juntament amb els *scores* MELD i ABIC.

A més a més, per a avaluar les interaccions entre els marcadors de CPH i la seva associació directa amb la supervivència a curt termini en pacients amb HA, vam generar un arbre CART (classification and regression tree) amb una gran utilitat, definit per una àrea sota la corba (AUROC) de 0,73. Amb el model CART, hem definit tres subpoblacions de pacients amb diferent prognosi a curt termini basat en l'expressió de *KRT7* i *EpCAM*, considerat pel model CART com les variables per a generar el millor arbre per a classificar. D'aquesta manera, s'ha definit una població amb un alt risc de mortalitat (89%) i una expressió de *KRT7* alta ($2^{\Delta\Delta CT}$ de *KRT7* $\geq 12,9$); una població amb un risc de mortalitat intermedi (33%) amb una expressió de *KRT7* entre 12,9 i 3,5 i d'*EpCAM* $\leq 2,95$; i una població que presenta dos subgrups (una amb expressió de *KRT7* $<12,9$ i *EpCAM* $> 2,95$, i l'altra amb una expressió d'*EpCAM* $\leq 2,95$ i *KRT7* $\leq 3,5$), que presenten un risc de mortalitat baix (del 0% i del 10%, respectivament).

Expressió proteica de marcadors de CPH i la seva correlació amb l'expressió gènica

Finalment, es va voler analitzar si l'expressió gènica de *KRT7* i *EpCAM*, les variables més rellevants per a subdividir les poblacions de pacients amb HA basades en la seva prognosi a curt termini, correlacionava amb l'expressió proteica i la reacció ductular en pacients amb HA. Per avaluar l'expressió proteica, es va realitzar una immunohistoquímica d'EpCAM i de KRT7, i vam identificar tres poblacions diferents positives per EpCAM o KRT7 segons la seva morfologia i localització. Així, vam identificar cèl·lules de la reacció ductular doble positives per EpCAM i KRT7, una població d'hepatòcits madurs EpCAM positius que coexpressen un antigen mitocondrial específic d'hepatòcits (HEP PAR-1), i finalment una població d'hepatòcits immadurs KRT7 positius que coexpressen HEP PAR-1. Per a reflectir l'heterogeneïtat de les poblacions, vam desenvolupar un *score* per a cada gen per avaluar la contribució d'aquestes poblacions a la RD. L'*score* es basa en la presència d'estructures ductulars, cèl·lules aïllades en el parènquima i cèl·lules hepatobiliars intermèdies per a determinar el resultat de l'*score*. Així, vam veure com l'*score* per a KRT7 correlacionava positivament amb l'expressió de KRT7 ($r=0,63$; $P=0,003$) i l'*score* d'EpCAM també correlacionava amb l'expressió gènica d'EpCAM ($r=0,88$; $P<0,001$).

Liver Progenitor Cell Markers Correlate With Liver Damage and Predict Short-term Mortality in Patients With Alcoholic Hepatitis

Pau Sancho-Bru,¹ José Altamirano,¹ Daniel Rodrigo-Torres,¹ Mar Coll,¹ Cristina Millán,¹ Juan José Lozano,¹ Rosa Miquel,² Vicente Arroyo,¹ Juan Caballería,¹ Pere Ginès,¹ and Ramon Bataller¹

Alcoholic hepatitis (AH) is a severe condition developed in patients with underlying alcoholic liver disease. Ductular reaction has been associated with chronic alcohol consumption but there is no information regarding the extent of liver progenitor cell (LPC) proliferation in AH. The aim of this study was to investigate LPC markers in AH and its correlation with disease severity. Fifty-nine patients with clinical and histological diagnosis of AH were included in the study. LPC markers were assessed by real-time polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry. Standard logistic regression analysis and classification and regression trees (CART) analysis were used for statistical analysis. A microarray analysis showed an up-regulation of LPC markers in patients with AH. Real-time PCR demonstrated that *epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)*, *Prominin-1*, and *Keratin7* were significantly increased in patients with AH compared with normal livers ($P \leq 0.01$), chronic hepatitis C ($P \leq 0.01$), and HCV-induced cirrhosis ($P \leq 0.01$). Immunohistochemistry scores generated for Keratin7 and EpCAM demonstrated a good correlation with gene expression. *Keratin7* gene expression correlated with liver failure as assessed by model for endstage liver disease score ($r = 0.41$, $P = 0.006$) and Maddrey's discriminant function ($r = 0.43$, $P = 0.004$). Moreover, *Keratin7* (OR1.14, $P = 0.004$) and *Prominin-1* (OR1.14, $P = 0.002$), but not *EpCAM* (OR1.16, $P = 0.06$), were identified as independent predictors of 90-day mortality. CART analysis generated an algorithm based on the combination of *Keratin7* and *EpCAM* gene expression that stratified three groups of patients with high, intermediate, and low short-term mortality (89%, 33%, and 6%, respectively; area under the receiver operating curve 0.73, 95% confidence interval 0.60-0.87). *Keratin7* expression provided additional discrimination potential to the age, bilirubin, international normalization ratio, creatinine (ABIC) score. **Conclusion:** LPC markers correlate positively with severity of liver disease and short-term mortality in AH patients. This study suggests that LPC proliferation may be an important feature of AH pathophysiology. (HEPATOLOGY 2012;55:1931-1941)

Alcoholic liver disease is a major cause of endstage liver disease. It ranges from fatty liver disease to steatohepatitis, cirrhosis, and eventually hepatocellular carcinoma.^{1,2} Alcoholic hepatitis (AH) is an acute event in chronic alcoholic liver disease that develops in up to 20% of patients with heavy alcohol intake.³ In its severe forms, AH leads to liver failure and a high short-term mortality rate. AH is

characterized by significant hepatocellular damage, megamitochondria, hepatocyte arrest, inflammatory response, and rapid progression of fibrosis.⁴ We recently developed the ABIC (Age, Bilirubin, International normalization ratio (INR), and Creatinine) score, which allows a prognostic stratification based on analytical parameters into patients with low, intermediate, and high risk of death at 90 days and 1 year.⁵ The

Abbreviations: ABIC, age, bilirubin, international normalization ratio, creatinine; AH, alcoholic hepatitis; CART, classification and regression tree; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; HCV, hepatitis C virus; KRT, keratin; LPC, liver progenitor cells; PROM1, prominin-1.

From the ¹Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ²Pathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

Received July 21, 2011; accepted January 18, 2012.

Supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI080237, FIS PS09/01164 and FIS PI080126, to R.B., J.C., and P.G., respectively). P.S.-B. received a grant from Ministerio de Ciencia e Innovación, Juan de la Cierva (JCI-2009-03849) and Instituto de Salud Carlos III, Miguel Servet (CP11/00071). D.R.-T. received a grant from the Ministerio de Educación, FPU program. J.A. received a grant from Fundación Banco Bilbao Vizcaya Argentaria.

pathogenesis of AH is poorly understood and current therapies are not fully effective. Thus, there is a clear need to better understand the pathogenesis of AH in order to identify new targets for therapy and develop new therapeutic strategies for these patients.

Liver damage from any etiology induces mature hepatocytes to proliferate in order to replace the damaged tissue, allowing the recovery of liver function without any involvement of liver progenitor cells (LPCs).^{6,7} However, when there is either massive liver injury or chronic liver damage that compromise the proliferative capacity of hepatocytes, progenitor cells within the Canal of Hering start to proliferate, giving rise to what is known as ductular reaction.⁶⁻⁸ Little is known about the real contribution of LPC in the recovery of liver function in liver diseases. Immunohistochemistry studies performed in damaged human livers have shown that ductular reaction comprises a heterogeneous population of proliferating cells, ranging from cells expressing stem cell markers with an immature phenotype, to more committed cells with an intermediate phenotype, expressing progenitor cell markers but also characteristics of both immature hepatocytes and cholangiocytes.⁹⁻¹² KRT7 is a well-known marker of ductular reaction in liver disease and it is typically expressed in LPC but also in intermediate hepatobiliary cells.^{13,14} Prominin-1 (PROM1) has been described in progenitor cells from the liver and other organs and is considered a marker for hepatic cancer stem cells.^{15,16} Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is expressed in LPC and it has been used to isolate progenitor cells from human samples.^{17,18} Moreover, EpCAM is also expressed in newly generated hepatocytes derived from progenitor cells in the regenerating liver.¹⁹ *In vitro* studies with isolated LPC from human liver samples have demonstrated that LPC can differentiate into hepatocytes and cholangiocytes, exerting functions of mature cells.^{17,20,21} However, there are no functional studies that investigated the dynamics, progression, and outcome of progenitor cell expansion during the course of liver disease, including AH.

Ductular reaction is known to be present in most chronic liver diseases but it seems especially important in acute-on-chronic events.^{22,23} Moreover, factors such

as fibrosis and inflammation are known to promote LPC expansion. Advanced alcoholic liver disease is characterized by an important ductular reaction due to the underlying liver injury but also to the effect of alcohol in promoting LPC proliferation.^{24,25} Moreover, the extent of ductular reaction correlates with the severity of liver disease.^{23,24} AH is characterized by an impairment in cell proliferation together with a massive liver damage and inflammatory response, which are key factors influencing the progression of progenitor cells. However, there is no information on the extent of ductular reaction in AH and its correlation with the severity of liver disease. In the present article we describe that in AH there is an important ductular reaction and extensive proliferation of progenitor cells. Moreover, progenitor cell markers correlate with liver disease and are good prognostic markers for short-term mortality in patients with AH.

Patients and Methods

Patients and Interventions. This study was performed with samples collected from a cohort of 69 consecutive patients admitted to the Liver Unit of the Hospital Clinic, Barcelona, from 2007 to 2010, with clinical and analytical criteria of AH. Ten patients were excluded from the study: 8 patients who did not fulfill all diagnostic criteria of AH and 2 patients with documented hepatocellular carcinoma. Finally, 59 patients with biopsy-proven AH were included. Liver biopsies were obtained by transjugular approach in all cases within 48 hours of admission and before starting treatment with corticosteroids, if indicated. Patients were managed following international guidelines and the clinical protocols approved in the Liver Unit of the hospital.²⁶⁻²⁸ Healthy patient characteristics are depicted in Supporting Fig. 1. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic and all patients included in this study gave written informed consent.

Microarray Data Normalization. Markers of LPCs up-regulated in the AH microarray were identified and summarized. The microarray previously performed comprised data from 22 samples: 15 AH and 7 healthy samples.²⁹ Information regarding microarray analysis can be found in the Supporting Material.

Address reprint requests to: Pau Sancho-Bru, Ph.D., Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Suñer (IDIBAPS), C/ Roselló, 153, Planta 3, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: psancho@clinic.ub.es; fax: +34 93 3129406.

Copyright © 2012 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.25614

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Hepatic Gene Expression Analysis. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to assess the expression of selected genes in liver human samples. Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Five hundred nanograms of RNA were retrotranscribed using a high-capacity complementary DNA reverse-transcription kit (Applied Biosystems) and complementary DNA (cDNA) were then amplified using Taqman Technology (Applied Biosystems) in a final PCR volume of 10 μ L using a 7900 HT instrument (Applied Biosystems). The Assay-on-Demand probes and primers for the quantification of 18s, *EpCam*, *PROM1*, and *Keratin (KRT)7* (Ref seq: Hs99999901_s1, Hs00158980_m1, Hs01009259_m1 and Hs00559840_m1) were obtained from Applied Biosystems. Results were normalized to 18s rRNA expression (housekeeping gene) and gene expression values were calculated based on the $\Delta\Delta C_t$ method using a pool of liver RNA as internal reference. The results are expressed as $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$.

Histological Analysis and Development of KRT7 and PROM-1 Score. Three μ m of paraffin-embedded liver sections were incubated with mouse antihuman KRT7 (1:50, DakoCytomation, Glostrup, Denmark, M7018) for 1 hour at room temperature and monoclonal mouse antihuman EpCAM (1:100, DakoCytomation, M0804) for 2 hours at room temperature. After washing in phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated with secondary goat antimouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (DAKO EnVision System-HRP, K4007) for 30 minutes at room temperature. 3,3' Diaminobenzidine (DAB, Dako) was used as a chromogen and sections were counterstained with hematoxylin. As negative controls, all specimens were incubated with primary antibody omission under identical conditions. Dual immunofluorescent staining was performed as serial stainings with EpCAM, KRT7, and the hepatocyte marker clone OCH1e5 (M7158) (Dako) (see Supporting Material). Semiquantitative assessment of inflammation and fibrosis was performed by author R.M. on hematoxylin and eosin staining and trichomic staining, respectively. Quantification of fibrosis was performed by morphometric quantification of trichomic stained area (see Supporting Material).

To assess the degree of expression of KRT7 and EpCAM, we developed a semiquantitative score based on the nomenclature and analysis of ductular reaction described.^{9,10} Staining for KRT7 was quantified according to three parameters from 0-3: ductular structures, isolated cells within the parenchyma, and intermediate hepatobiliary cells. Staining for EpCAM was quantified

Table 1. Baseline Demographic, Clinical and Biochemical Characteristics of Patients with Alcoholic Hepatitis

	Study Cohort (n=59)
Age (years)	51 (46-55)
Male (%)	41 (70)
Alcohol Intake (g/day)	100 (80-120)
Corticoids (%)	24 (41)
Biochemical parameters	
Hematocrit (%)	29 (19-35)
Leukocytes $\times 10^9/L$	8.0 (6.3-11.1)
Platelets $\times 10^9/L$	65 (32-134)
Serum creatinine (mg/dL)	0.8 (0.6-1.0)
Serum albumin (g/dL)	25 (23-31)
Serum bilirubin (mg/dL)	10 (4.2-18.3)
International normalized ratio	1.6 (1.3-1.9)
AST (U/L)	132 (86-182)
ALT (U/L)	54 (34-75)
GGT (U/L)	317 (116-923)
Clinical Scores	
Maddrey's discriminant function	57 (33-77)
MELD score	29 (16-24)
ABIC score	7.65 (6.95-8.47)
ABIC class (%)	
A (<6.71)	12 (20)
B (6.71-8.99)	40 (68)
C (>9)	7 (12)
Cirrhosis (yes/no)	(42/17)
Fibrosis (F1/F2/F3-F4) n=57	(3/12/42)
Inflammation (mild/severe) n=57	(41/16)

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; MELD, model for end-stage liver disease; ABIC, age, bilirubin, INR, creatinine score.

according to three parameters from 0-3: ductular structures, interphase cells, and hepatobiliary cells.

Statistical Analysis. Continuous variables were described as mean (95% confidence interval [CI]) or median (interquartile range). Categorical variables were described by means and percentages. Comparisons between groups were performed using Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test, depending on variable distribution. Differences between categorical variables were assessed by the chi-square test or Fisher's exact test, when necessary. Correlations between variables were evaluated using Spearman's *rho* or Pearson's *r*, when appropriate. The main endpoint was death from any cause at 90 days. A two-sided *P* < 0.05 was required for statistical significance. The potential role of LPC markers in the short-term prognosis of patients with AH was evaluated by univariate analysis, multivariate logistic regression analysis. A classification and regression tree (CART) analysis was performed to evaluate the interaction of LPC markers with short-term prognosis of AH patients (see Supporting Material).

Results

Patient Characteristics. The baseline clinical, demographic, and biochemical characteristics of the study

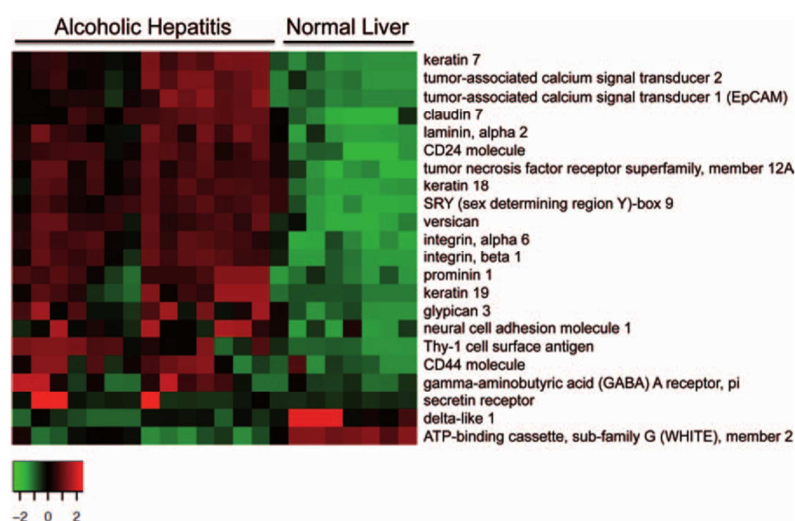


Fig. 1. Heatmap showing hierarchical clustering using expression profiles of the selected genes. Distances are measured using Pearson correlation. Results are expressed as a matrix view of gene expression data where rows represent genes and columns represent hybridized samples. The intensity of each color denotes the standardized ratio between each value and the average expression of each gene across all samples. Red pixels correspond to an increased abundance of mRNA in the indicated liver biopsy sample, whereas green pixels indicate decreased mRNA levels.

cohort are depicted in Table 1. The median alcohol consumption was 100 g/day (range, 80-120). Twenty-four patients (41%) were treated with corticosteroids. During hospitalization, 30 patients (51%) developed at least one clinical complication. These complications included bacterial infections (36%), hepatic encephalopathy (21%), in-hospital renal dysfunction (20%), and gastrointestinal bleeding (7%). The overall 90-day mortality rate was 27% (16 out of 59 patients). The main causes of death at 90 day were sepsis (7 out of 16) and multiorgan failure (9 out of 16).

Expression of LPC Markers in Patients With AH. Previous studies have shown that alcoholic liver disease is characterized by an important ductular reaction and LPC expansion.^{24,25} Thus, we evaluated the hepatic expression of genes typically expressed in LPC in patients with AH and healthy subjects. Microarray analysis demonstrated an up-regulation of genes related to LPC and ductular reaction in AH samples. These genes include *KRT7*, *SOX9*, *EpCAM*, *KRT19*, *PROM1*, *CD44*, and others. Although some of these genes are not exclusively expressed in LPC, the marked up-regulation of a significant number of genes typically expressed in isolated LPS suggest that this cell population may be enriched in patients with AH. The results shown in Fig. 1 are a subset of genes selected from the microarray previously described.²⁹ Full microarray data are deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; access. no. GSE28619).

Detailed Analysis of Selected LPC Markers in Patients With AH and Other Liver Diseases. *KRT7*,

PROM1, and *EpCAM* were selected for further analysis as representative genes described in ductular reaction. Expression of these genes was evaluated by real-time PCR in the whole series of patients with AH ($n = 59$), in comparison with the expression in tissue from patients with hepatitis C virus (HCV)-induced cirrhosis (HCV-CH) ($n = 16$), chronic hepatitis C (HCV) ($n = 14$), and fragments of normal tissue ($n = 12$). Gene expression of all three genes was significantly higher in patients with AH compared with HCV-induced liver disease, and normal livers (Fig. 2a-c). Moreover, although *KRT7*, *PROM1*, and *EpCAM* are expressed in different cell populations in the ductular reaction, there was a significant correlation among the expression of these markers (data not shown). We next investigated if *KRT7*, *PROM1*, and *EpCAM* were differentially expressed in patients with AH according to their survival rate. *KRT7* and *PROM1* expression was higher in patients who died within 90 days after admission ($n = 16$) compared with those who survived ($n = 43$) (Fig. 2d-f). There was no difference in *EpCAM* expression between patients with different survival rates (Fig. 2f). To further assess if the expression of LPC markers was associated with disease severity, we evaluated the correlation of gene expression of LPC markers with clinical prognostic scores. As shown in Fig. 2, we found a positive correlation of *KRT7*, but not *PROM1* and *EpCAM* gene expression with the model for endstage liver disease (MELD) and Maddrey's discriminant function (Fig. 2g,h), suggesting that liver damage may promote a ductular reaction

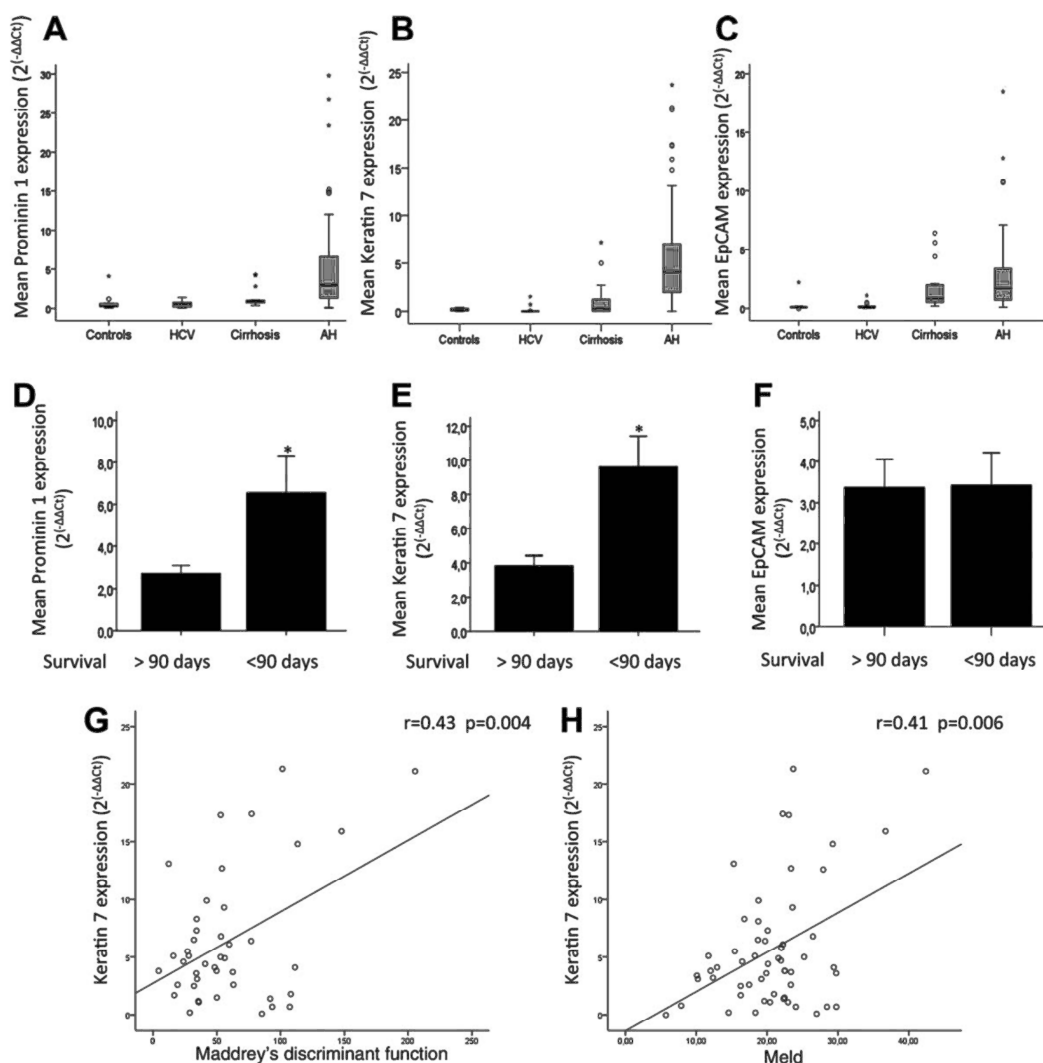


Fig. 2. Gene expression analysis of liver progenitor cell markers in liver diseases. Quantitative gene expression analysis of PROM-1 (A), KRT7 (B), and EpCAM (C) in normal livers, HCV-induced hepatitis, HCV-induced cirrhosis (cirrhosis), and AH. Expression of PROM-1 (D), KRT7 (E), and EpCAM (F) in patients with short-term survival <90 days and >90 days. Gene expression values are shown as 2^{-ΔΔCt} value. Correlation of KRT7 expression value with Maddrey's discriminant function (G) and MELD (H).

that not necessarily correlates with the expansion of more immature progenitor cell markers. These results demonstrate that AH is characterized by an important ductular reaction and that the liver damage may be an important trigger of this event.

Factors Influencing Patient Survival: Role of Progenitor Cell Markers. KRT7, PROM1, and EpCAM were found to be up-regulated in patients with poor survival rates. Thus, we evaluated if these genes are good prognostic markers of mortality in patients with AH. The univariate analysis identified serum bilirubin levels, INR, serum creatinine levels, ABIC score, and MELD at admission and KRT7 and PROM-1 expres-

sion in liver tissue associated with 90-day mortality. However, age, EpCAM, and fibrosis quantification were not associated with mortality. In the multivariate regression analysis the ABIC score, MELD, KRT7, and PROM-1 were the best independent predictors of 90-day mortality (Table 2).

In order to assess if LPC markers are surrogate markers for fibrosis and inflammation, we evaluated liver fibrosis and infiltrating polymorphonuclear cells and its association with LPC markers and mortality. As shown in Supporting Fig. 2, fibrosis stage had a low but positive correlation with KRT7 and EpCAM expression. Moreover, morphometric quantification of

Table 2. Factors Influencing mortality in Univariate and Multivariate Logistic Regression in Patients with Alcoholic Hepatitis

Univariate Logistic Regression	OR	CI 95%	p
At admission			
Serum bilirubin	1.07	1.01-1.14	0.02
INR	1.98	1.11-3.53	0.03
Serum creatinine	2.19	0.86-5.58	0.09
Age	1.07	0.98-1.18	0.12
ABIC score	2.85	1.84-4.43	<0.001
MELD	1.18	1.09-1.27	<0.001
Fibrosis quantification	1.03	0.95-1.12	0.43
Gene expression			
KRT7	1.18	1.08-1.28	0.001
Prominin-1	1.17	1.08-1.27	0.001
EpCam	1.09	0.93-1.28	0.26
Multivariate Logistic Regression	OR	CI 95%	p
ABIC score	1.75	1.00-3.06	0.04
KRT7	1.14	1.04-1.24	0.004
ABIC score	1.94	1.20-3.12	0.006
Prominin-1	1.14	1.05-1.24	0.002
ABIC score	2.25	1.36-3.71	0.001
EpCam	1.16	0.98-1.36	0.06
MELD	1.19	1.01-1.41	0.03
KRT7	1.22	1.04-1.42	0.01
MELD	1.23	1.06-1.43	0.006
Prominin-1	1.14	0.99-1.30	0.06
MELD	1.21	1.05-1.39	0.006
EpCam	1.19	0.95-1.49	0.12

INR, international normalized ratio; KRT7, keratin 7; EpCam, epithelial cell adhesion molecule; ABIC, age, bilirubin, INR, creatinine score.

fibrosis also had a positive correlation with expression of *KRT7* ($r = 0.28$ $P = 0.048$) and *PROM-1* ($r = 0.3$ $P = 0.031$) but not *EpCAM* ($r = 0.21$ $P = 0.119$). However, fibrosis was not found to be an independent

predictor of mortality with an area under the receiver operating curve (AUROC) of 0.59 (95% CI: 0.41-0.75) and was unable to stratify patients based on the outcome. The degree of inflammation did not positively correlate with LPC markers (Supporting Fig. 2) nor with mortality.

In order to assess the interactions among LPC markers and their direct association with short-term survival of patients with AH, we fitted a CART model. The best decision tree (Gini's index 0.35) was constructed with the interaction of two LPC markers, *KRT7* and *EpCAM* (Fig. 3). The generated tree identified three subpopulations with different short-term prognosis (expressed as $2^{(-\Delta\Delta CT)}$): a high-risk mortality group characterized with high *KRT7* expression ($KRT7 \geq 12.9$), with a 90-day mortality of 89%; a group with an intermediate mortality risk ($KRT7$ between 12.9 and 3.5 and $EpCAM \leq 2.95$), with a 90-day mortality of 33%; and a low-risk mortality group ($KRT7 < 12.9$ and $EpCAM > 2.95$) and ($EpCAM \leq 2.95$ and $KRT7 \leq 3.5$) with a 90-day mortality of 0% and 10%, respectively. Importantly, this CART model showed good usefulness estimated by an AUROC of 0.73 (95% CI: 0.60-0.87).

Finally, we investigated if LPC markers provide additional discrimination potential within patients classified by the ABIC score as with intermediate mortality risk (ABIC score 6.71-8.99 or ABIC B) which show a mortality rate of 30%. The AUROC for 90-day mortality using *KRT7* was 0.76 (95% CI: 0.60-0.88) (Supporting Fig. 3). We chose a cutoff value of 6.4 with a sensitivity of 60% and a specificity of 83%.

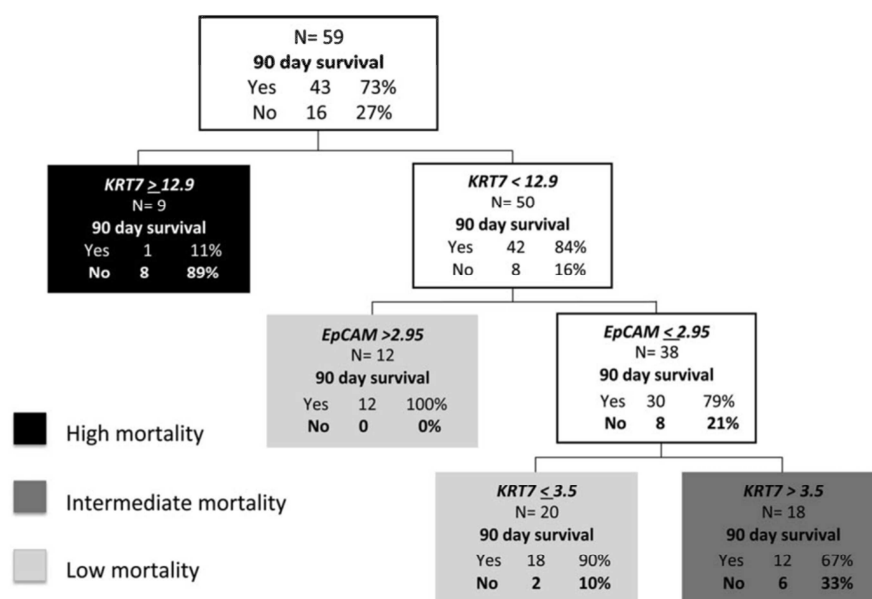
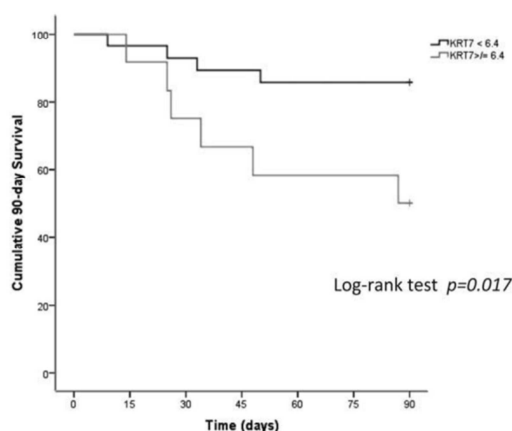


Fig. 3. Prognostic model of 90-day mortality in patients with AH generated by CART. The CART tree stratified three groups of patients with different mortality rates according to progenitor cell markers expression. Gene expression values are shown as $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ value. A high-risk group (15% of the patients with 89% mortality) with $KRT7 \geq 12.9$ value, an intermediate risk group (30% of patients with 33% of mortality) with $3.5 \leq KRT7 \leq 12.9$, and $EpCAM \leq 2.95$ value, and a low-risk group (54% of patients with 6% of mortality) with $KRT7 < 12.9$ and $EpCAM > 2.95$ and a second group with $EpCAM < 2.95$ and $KRT7 \leq 3.5$.



At Risk	n=40	day 0	day 15	day 30	day 45	day 60	day 75	day 90
Low KRT7		28	27	26	25	24	24	24
High KRT7		12	11	9	8	7	7	6

Fig. 4. Three-month survival probability of patients with moderate ABIC score according to hepatic gene expression of *Keratin7*. Kaplan-Meier curve showing the 3-month probability of survival in patients with alcoholic hepatitis and ABIC B score according to hepatic gene expression of *Keratin7* (*KRT7*).

Interestingly, using this cutoff value, we found that *KRT7* expression accurately discriminated patients with different short-term survival rates among the group of patients with an ABIC B (86% versus 50% survival in patients with *KRT7* < 6.4 and *KRT7* ≥ 6.4, respectively; $P = 0.026$, Fig. 4).

Protein Expression of Progenitor Markers: Correlation Between Immunohistochemistry and Gene Expression. CART analysis identified *KRT7* and *EpCAM* expression as the most relevant variables to subdivide the population of patients with AH into subpopulations with different outcomes. To assess if real-time PCR gene expression correlated with protein expression and ductular reaction cells in AH samples, we performed an immunohistochemistry analysis of *KRT7* and *EpCAM*. As described previously, we identified three main different cell populations positive for *KRT7* or *EpCAM* according to their morphology and localization in the liver. To reflect this heterogeneity we developed a score (see Patients and Methods) to quantify the contribution of these different populations within the ductular reaction. As shown in Fig. 5, the *KRT7* score positively correlated with *KRT7* gene expression ($r = 0.63$; $P = 0.003$) (Fig. 5g). The *EpCAM* score also showed a positive correlation with *EpCAM* gene expression ($r = 0.88$; $P < 0.001$) (Fig. 5h).

To evaluate if LPC markers reflect different progenitor cell populations or different differentiation states, we performed a dual staining for LPC markers together

with a hepatocyte marker. As shown in Fig. 6 there is almost a complete overlay of *EpCAM* and *KRT7* staining in cells of the ductular reaction, suggesting that both markers may be identifying the same cell population. Dual staining for *EpCAM* and hepatocyte marker has shown that cells with a membranous staining of *EpCAM* coexpress hepatocyte-specific mitochondrial antigen, suggesting that differentiation of *EpCAM*-positive cells occurs during an episode of AH. Likewise, *KRT7*-positive cells showing an immature hepatocyte morphology coexpressed hepatocyte markers.

Discussion

The present study describes the expression of progenitor cell markers in patients with AH and identifies them as prognostic markers predicting short-term mortality. Gene expression analysis showed an important up-regulation of progenitor cell markers in patients with AH. A further analysis of three well-known LPC markers, *KRT7*, *PROM1*, and *EpCAM*, in a cohort of patients with AH allowed us the possibility of stratifying patients into three groups according to their survival rate. Moreover, the combination of *KRT7* expression with the ABIC score discriminated patients with intermediate ABIC values and poorly defined survival rates and stratified them according to mortality.

LPC proliferate during the course of chronic liver disease. This proliferation is particularly important in alcoholic liver disease, probably because AH causes profound hepatocellular damage and impairment of hepatocyte proliferation but also because alcohol triggers progenitor cell expansion.²⁴ However, little is known about the extent of progenitor cell proliferation and its role in acute-on-chronic liver failure. Our results are in accordance with previous reports describing an important ductular reaction in patients with alcoholic liver disease.^{23,24} Here we show that a broad number of LPC markers are overexpressed in patients with AH, as assessed by microarray analysis. Moreover, we demonstrate that progenitor cell markers are overexpressed in patients with AH compared with HCV-induced cirrhosis, suggesting that acute-on-chronic injury may favor progenitor cell expansion. However, the group of patients with HCV-induced cirrhosis had a better liver function than the AH group, so it is plausible that LPC expansion is not a unique feature of AH. Further studies are required to determine if LPC proliferation is increased in AH compared with other etiologies of chronic liver disease.

The main innovative approach of this study is the use of CART as an alternative regression analysis

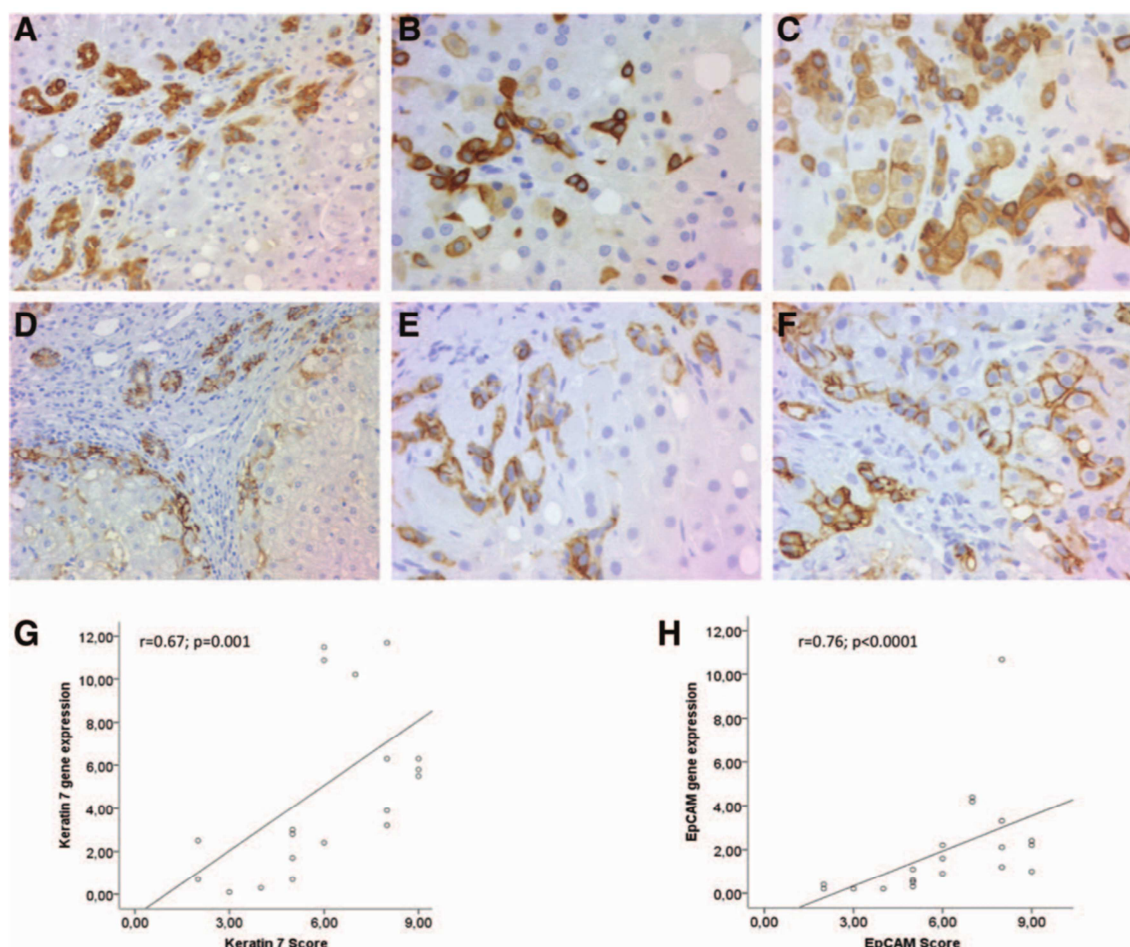


Fig. 5. Immunohistochemistry analysis of liver progenitor cell markers. Representative pictures of KRT7 staining (A-C) showing biliary structures (A) (magnification $\times 20$), isolated cells within the parenchyma (B) (magnification $\times 40$), intermediate hepatobiliary cells (C) (magnification $\times 40$). Representative pictures of EpCAM staining (D-F) demonstrating the presence of ductular structures (D) (magnification $\times 20$), cells at the interphase (E) (magnification $\times 40$), hepatobiliary cells (F) (magnification $\times 40$). Correlation of KRT7 expression value ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) with KRT7 score (G). Correlation of EpCAM expression value ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) with EpCAM score (H).

method to evaluate progenitor cells marker interactions as indicators of poor prognosis in patients with AH. The rationale behind the application of CART in this study was twofold. First, traditional logistic regression methods can be very useful in ranking the variables with statistical significance, but they contain modest information about the impact of the identified variables.³⁰ The elucidation of risk subgroups seems unwieldy with a traditional linear regression analysis and even if estimates for incidences are calculated for all combinations of parameters, the results still refer only to estimates. Conversely, the results of CART analysis come naturally as risk groups that are based on observed incidences and the impact of the identified parameters, providing a graphical representation in the form of a decision tree. Second, in contrast to

logistic regression, CART considers not only the overall sample of patients, but also, in subsequent steps, relevant subgroups and is therefore better positioned to probe for interactions. Thus, the main benefit of CART is that it can accurately stratify prognostic subgroups based on simple combinations of variables given in semiautomatic driven software.

Several scoring systems have been developed for the prognosis assessment of patients with AH.³⁰⁻³³ Those scores are based on noninvasive parameters and are reliable tools to estimate the severity and prognosis of these patients. However, it is unknown which mechanisms contribute to worsen the prognosis of patients with AH. Gene and protein expression of LPC markers are of limited applicability as prognostic score tools in clinical practice; thus, our aim was not to

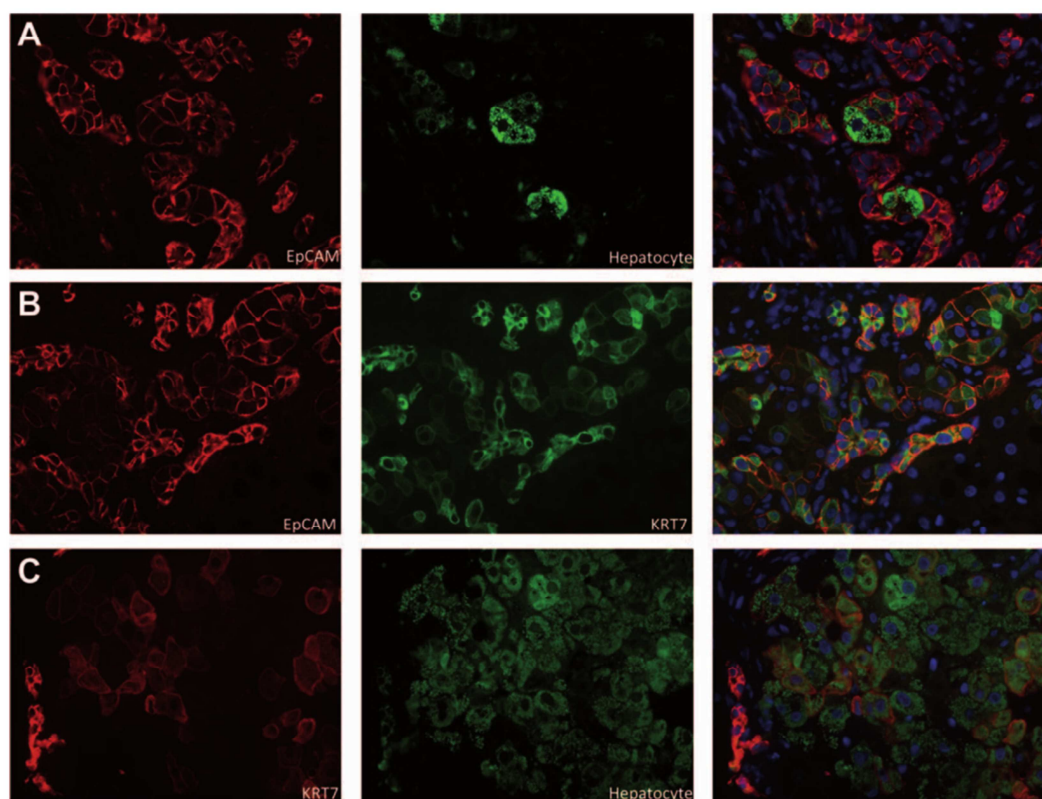


Fig. 6. Dual immunostaining of LPC markers. (A) Representative pictures of dual immunofluorescent staining of EpCAM, hepatocyte marker, and merge picture (magnification $\times 40$). (B) Representative pictures of dual immunofluorescent staining of EpCAM, KRT7, and merge picture (magnification $\times 40$). (C) Representative pictures of dual immunofluorescent staining of KRT7, hepatocyte marker, and merge picture (magnification $\times 40$).

develop a clinically relevant prognostic score but to identify relevant pathophysiological mechanisms influencing the outcome in AH. We propose a simple CART model (Fig. 3) based on the combination of two LPC markers that show the importance of LPC expansion in AH and allows an accurate discrimination of three prognostic groups of patients with different mortality. First, a low-risk group with an excellent overall 90-day survival of 94%, for whom aggressive therapeutic measures may not be needed. The moderate expression of LPC markers observed in these patients probably reflects low inflammatory damage and moderate hepatocyte loss combined with an active regeneration process. Second, a high-risk group of patients with 89% mortality at 90 days. These patients with the highest KRT7 expression and poor prognosis have prominent inflammatory and necrotic damage with severe impairment of hepatocyte regeneration capacity. And third, patients with intermediate prognosis (33% mortality at 90 days) for which aggressive therapeutic approaches are required.

It is especially relevant that *KRT7* expression accurately predicts the 90-day mortality of patients with intermediate mortality as assessed by a moderate ABIC score. This finding may have potential clinical implications because the mortality of moderate ABIC is similar to that observed in the general AH patient population. By using *KRT7* expression we were able to stratify patients with an intermediate ABIC score in those having a low mortality rate (14%) and high mortality (50%). Future studies should assess KRT7 expression in a higher number of patients with moderate ABIC scores to validate these results. The possibility to identify those patients at higher risk may be useful for optimizing patient management and therapeutic decision-making. Moreover, these observations suggest that liver regeneration and LPC expansion may be an important factor influencing short-term prognosis in AH. Ductular reaction is frequently associated with fibrosis and inflammation in chronic liver disease and may be key factors promoting LPC expansion in AH. Although we show that fibrosis correlates with LPC

markers, fibrosis and inflammation are not independent predictors of bad prognosis, and for that reason are not adequate parameters to stratify AH patients according to mortality. It has been previously shown that fibrosis and inflammation trigger LPC expansion, but our results suggest that LPC markers would not be surrogate markers for fibrosis because KRT7, PROM-1, and EpCAM are independent prognostic factors of mortality in our cohort of patients.

The gene expression and immunohistochemistry results clearly demonstrate that there is an important expansion of KRT7-positive hepatobiliary cells in AH. It is assumed that LPC proliferate to overcome the impaired regenerative potential of a chronically damaged liver in order to restore normal liver function. Although our results clearly demonstrate an important LPC expansion, it does not lead to improved liver function, because patients with an increased number of immature hepatobiliary cells show the highest mortality rate. This observation raises the question of whether the presence of KRT7 cells correlates with more extensively damaged liver, therefore showing a higher mortality, or whether LPC proliferation has a detrimental impact on liver function. AH is a condition with a florid proinflammatory milieu, with expression of chemokines from CXC and CCL families, growth factors, and other mediators with unknown effects on LPC proliferation, differentiation, or three-dimensional organization. The possibility that in AH there is an induction of LPC proliferation but a deficient differentiation to mature hepatocytes deserves further investigation. In chronic liver disease EpCAM-positive hepatobiliary cells derive from LPC that give rise to new hepatocytes generated independently from the exhausted mature hepatocyte pool.¹⁹ The presence of a number of EpCAM-positive hepatobiliary cells in patients with AH suggests that newly generated hepatocytes are being created. The results obtained with the dual staining of LPC markers suggest that differentiation of EpCAM- and KRT7-positive cells is not completely abrogated in AH. However, the major population of EpCAM-positive cells in samples from AH patients are small, immature cells, and only a small fraction of cells are intermediate hepatobiliary cells with an immature hepatocyte morphology. Unfortunately, the contribution of EpCAM- or KRT7-positive cells to the reconstitution of the liver parenchyma in liver regeneration and disease is not known, so from our results it is not possible to envision if the contribution of LPC may be sufficient to maintain liver function in AH patients. It is important to notice that, as observed in the CART analysis, high *EpCAM*

expression in patients with intermediate *KRT7* expression identify a group of patients with a low mortality rate, suggesting a beneficial effect of EpCAM-positive cells on liver function. Whether EpCAM-positive cells contribute sufficiently to liver regeneration to maintain liver function in AH deserves further investigation.

In summary, we provide evidence that ductular reaction is a key event in AH and that LPC expansion parallels disease severity in this acute-on-chronic condition. The exploitation of a decision tree model as an alternative approach to classical regression models identified the most relevant LPC markers as prognostic markers in patients with AH. Our results suggest that LPC markers may provide additive value to clinical prognostic scores to discriminate patients with different mortality rates. This study shows a significant cellular response in AH and provides evidence for their utilization in a histological score. Moreover, the correlation of LPC markers with mortality suggest that understanding the mechanisms governing LPC proliferation and differentiation in liver disease may facilitate the design of new therapeutic approaches aimed at promoting liver regeneration in AH.

Acknowledgment: This work was performed at the Centre Esther Koplowitz. We thank Dr. Salvador Augustin for advice on statistical analysis.

References

1. Elphick DA, Dube AK, McFarlane E, Jones J, Gleeson D. Spectrum of liver histology in presumed decompensated alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:780-788.
2. Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995;346:987-990.
3. Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *HEPATOLOGY* 1997; 25:108-111.
4. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758-2769.
5. Dominguez M, Rincon D, Abruñales JG, Miquel R, Colmenero J, Bellot P, et al. A new scoring system for prognostic stratification of patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008;103: 2747-2756.
6. Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 2009;137:466-481.
7. Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008;322:1490-1494.
8. Roskams T, Katoonizadeh A, Komuta M. Hepatic progenitor cells: an update. *Clin Liver Dis* 2010;14:705-718.
9. Eleazar JA, Memeo L, Jhang JS, Mansukhani MM, Chin S, Park SM, et al. Progenitor cell expansion: an important source of hepatocyte regeneration in chronic hepatitis. *J Hepatol* 2004;41:983-991.
10. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *HEPATOLOGY* 2004;39:1739-1745.

11. Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *HEPATOLOGY* 2011;53:1035-1045.
12. Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *HEPATOLOGY* 2008;48:1598-1607.
13. Bateman AC, Hubscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology* 2010;56:415-425.
14. Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol* 2000;192:373-378.
15. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;132:2542-2556.
16. Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, Oshima N, Kiyonari H, Nakauchi H, et al. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *HEPATOLOGY* 2008;48:1964-1978.
17. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007;204:1973-1987.
18. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009;136:1012-1024.
19. Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytioglou P, Yoo JE, Park YN, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *HEPATOLOGY* 2011;53:964-973.
20. Duret C, Gerbal-Chaloin S, Ramos J, Fabre JM, Jacquet E, Navarro F, et al. Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver. *Stem Cells* 2007;25:1779-1790.
21. Sancho-Bru P, Najimi M, Caruso M, Pawelyn K, Cantz T, Forbes SJ, et al. Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardize the process from bench to bedside? *Gut* 2009;58:594-603.
22. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003;23:385-396.
23. Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999;154:537-541.
24. Jung Y, Brown KD, Witek RP, Omenetti A, Yang L, Vandongen M, et al. Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans. *Gastroenterology* 2008;134:1532-1543.
25. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003;163:1301-1311.
26. Ginès P, Lenz K, Möller S, Moore K, Moreau R, Merkel C, et al. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:397-417.
27. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey W. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2007;46:922-938.
28. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *HEPATOLOGY* 2009;49:2087-2107.
29. Dominguez LJ, del Castillo AL, Miquel R, Colmenero J, Moreno M, Garcia-Pagan JC, et al. Identification of Fn14, a TNF receptor superfamily member, as a therapeutic target in patients with alcoholic hepatitis. *HEPATOLOGY* 2009;50:600A-705A.
30. Muller R, Mockel M. Logistic regression and CART in the analysis of multimarker studies. *Clin Chim Acta* 2008;394:1-6.
31. Dunn W, Jamil LH, Brown LS, Wiesner RH, Kim WR, Menon KV, et al. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *HEPATOLOGY* 2005;41:353-358.
32. Forrest EH, Evans CD, Stewart S, Phillips M, Oo YH, McAvoy NC, et al. Analysis of factors predictive of mortality in alcoholic hepatitis and derivation and validation of the Glasgow alcoholic hepatitis score. *Gut* 2005;54:1174-1179.
33. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL Jr, Mezey E, White RI Jr. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193-199.

SUPPORTING METHODS

Microarray data normalization

Samples were normalized using the guanidine-cytosine content-adjusted robust multiarray algorithm, which computes expression values from probe-intensity values incorporating probe-sequence information (Wu et al. 2004). Next, we employed a conservative probe-filtering step excluding those probes not reaching a log₂ expression value of 5 in at least 1 sample, which resulted in the selection of a total of 19,152 probes out of the original 54,675, set. Differential expression was assessed by using linear models and empirical Bayes moderated t-statistics using LIMMA R-package software (Smyth 2005). Two group comparisons and determinations of false discovery rates (FDR computation using *Benjamini-Hochberg* procedure) were performed and FDR values ≤ 0.05 were deemed potentially significant and selected for further study. All computations and plots (as heatmaps) were done using R software (Smyth 2005).

Histological analysis and development of KRT7 and PROM-1 score

Dual immunofluorescent staining was performed as serial stainings with EpCAM, KRT7 and the hepatocyte marker clone OCH1e5 (DAKO). Goat anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen) and goat anti-mouse CY3 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) were used as secondary antibodies. To perform the dual staining, sections were stained with the first primary and secondary antibody. Before performing the second immunostaining, the first complex was stripped by incubating sections for two hours with Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Alcobendas, Spain) followed by overnight incubation with 0.2M Glycine buffer PH:2.5. After stripping, sections were incubated with the second primary and secondary antibodies. As negative controls, all specimens were incubated with primary antibody omission under identical conditions.

Fibrosis quantification

Fibrosis stage was evaluated according to portal fibrosis, expansive fibrosis and bridging fibrosis/cirrhosis (bridging fibrosis and cirrhosis were evaluate together since the size of the sample did not allowed a successful discrimination). The degree of fibrosis was estimated by measuring the percentage of the area stained with tricomic staining. Positive stained area was quantified by a morphometric analysis. Twelve images were obtained with an optic microscope (Nikon Eclipse E600, Nikon Corporation, Japan) at magnification of x20 and analyzed with an image-analysis system (AnalySIS, Soft-Imaging System, Munster, Germany). The positive area was the sum of the area of all positive pixels.

Development of KRT7 and PROM-1 score

Staining for KRT7 was quantified according to 3 parameters punctuated from 0-3 (maximum score = 9): Ductular structures: 0-occasional, 1- proliferation of ductular structures within the portal tract, 2- proliferation of ductular structures within the portal tract and in the interphase between portal tract and parenchyma, 3- ductular reaction intermixed with hepatocyte plates; Isolated cells within the parenchyma: 0- absence, 1- occasional, 2- more than 3 cells per field, 3- apparent presence of cells in the parenchyma; Intermediate hepatobiliary Cells: 0- absence, 1- isolated cells, 2- group of cells, 3- major cell type in some areas of the sample. Staining for EpCAM was quantified according to 3 parameters punctuated from 0-3 (maximum score = 9): Ductular structures: 0- absence, 1- presence of occasional proliferative ductules, 2- apparent proliferation of positive ductular structures, 3- continuous ductular structures occupying most area of the portal tract; Interphase Cells (cells with positive cytoplasm staining at the interphase between the parenchyma and portal tract): 0- absence, 1- occasional, 2- groups of cells lining at the interphase, 3- continuous structures at the interphase intermixed within the parenchyma; Hepatobiliary cells with positive membrane staining: 0- absence, 1- occasional cells, 2- small groups of cells, 3- presence of group of cells covering extensive areas of the parenchyma. The scores where created and evaluated by PSB and RM and externally validated by MC to assess the inter-observer agreement.

Univariate analysis, multivariate analysis and classification and regression tree analysis

In order to assess the potential role of progenitor cells markers in the short-term prognosis of patients with AH, we first performed an exploratory logistic univariate analysis. The p-values for the univariate tests were not corrected for multiple testing, because those tests were considered as exploratory. We also performed a multivariate logistic regression analysis (odds ratio -OR-). The results determined those variables independently associated with the main outcome (after adjusting for the contributions of other variables). Given the small number of death events, to avoid over-fitting, we included only two variables in the multivariate analysis. The SPSS statistical package (SPSS Inc., version 15.0, Chicago, IL) was used for these calculations. To evaluate the interaction of progenitor cells markers over the short-term prognosis of AH patients a classification and regression tree (CART) analysis was performed. We used the CART Pro v6.0 software (Salford systems, San Diego, CA), based on the original Breinman's code. Briefly, the method allows the construction of inductive decision trees through strictly binary splitting. This algorithm divides each parent node into two homogeneous child nodes by applying yes/no answers at each decision node. The basic tree-generating or "learning" process consists of 1) selecting the most discriminative variable according to an impurity function to partition the data, 2) repeating this partition until child nodes are considered pure enough to be terminal and 3) pruning the resulting tree to avoid overfitting and redundancy. In our study, sensitivity analysis was based on the Gini index, and 10-fold cross validation was performed to assess internal validity. Misclassification costs were set at 1.0. The number of patients in terminal nodes was set to a minimum of 5 and no specific splitters were forced for root or children nodes. Cut-off points for continuous and categorical variables were automatically generated by the model based on statistical cost assumptions. Optimal trees were then selected according to their relative misclassification costs, predictive accuracy and clinical relevance. Third, for prognostic individual testing of every single progenitor cell marker a comparative risk analysis was done using the proposed cut-off

generated by the CART, and a comparison of the Kaplan-Meier method with the log-rank test was performed.

References

1. Wu Z, Irizarri RA, Gentleman R, Murillo FM, Spencer F. A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc.* 2004;99:909-17.
2. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor* Edited by: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W New York: Springer. 2005:397-420.

Clinical & Analytical Characteristics of health controls included in the array		
Gender (%)	Controls*	
	Male	4 (57)
	Female	3 (43)
Age (years)		51 (43-68)
AST (U/L)		33 (27-63)
ALT (U/L)		35 (22-71)
Bilirubin (mg/dL)		0.6 (0.4-0.8)
γGT (U/L)		47 (13-130)
Albumin (mg/dl)		37 (32-42)
Leukocytes (x10⁶)		6.9 (4.7-9.7)
Platelets (x10⁶)		188 (170-219)
INR		1.1 (1.0-1.2)
Creatinine (mg/dl)		0.9 (0.7-1.7)
MELD		5 (2-10)

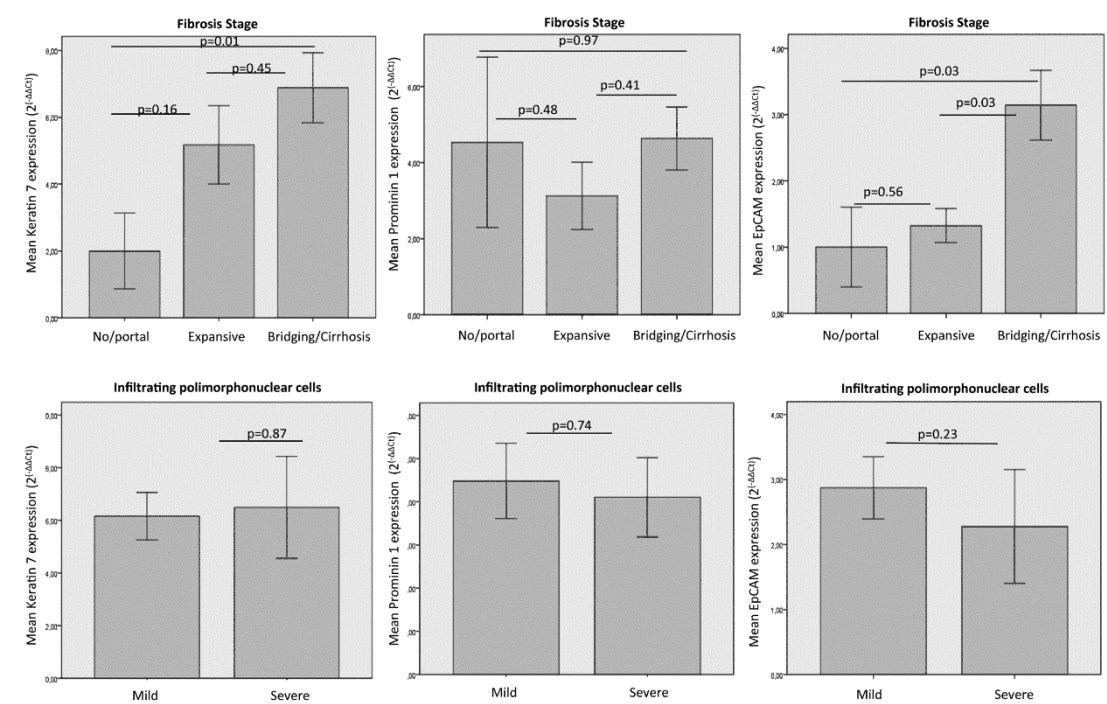
Numeric data is represented in median (interquartile range [IQR] 25-75).

MELD: Model for End Stage Liver Disease; INR: International Normalized Ratio;
AST: Aspartate- Aminotransferase; ALT: Alanin-Aminotrasnferase.

* Liver samples of patient's with liver metastases from colorectal carcinoma except 1 who was affected by primary hyperoxaluria.

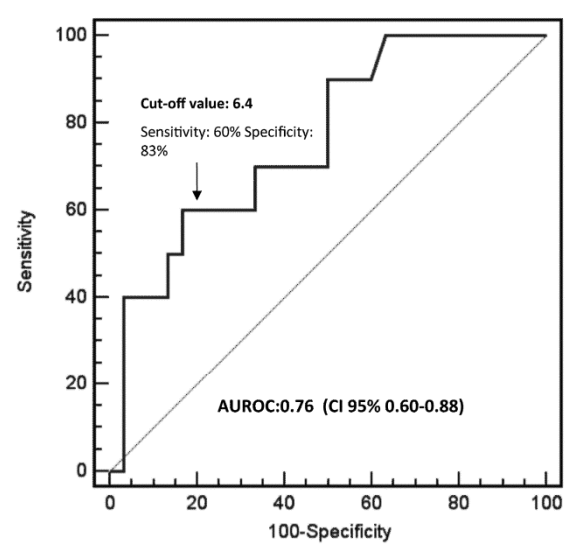
Supplementary Figure 1. Clinical and analytical characteristics of healthy controls included in the microarray analysis.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2. Correlation of fibrosis stage and degree of inflammation with liver progenitor cell markers. Mean gene expression analysis of Keratin 7 (a), Prominin 1 (b) and EpCAM (c) according to semiquantitative analysis of liver fibrosis stage. Mean gene expression analysis of Keratin 7 (a), Prominin 1 (b) and EpCAM (c) according to histological quantification of infiltrating polymorphonuclear cells.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3. Receiver-operating characteristic curve (ROC) for 90-day mortality using KRT7 in patients with ABIC B alcoholic hepatitis.

Supplementary Figure 3

RESUM DELS RESULTATS DE L'ARTICLE 2

“The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells”

“L'epiteli biliar dóna lloc a les cèl·lules progenitores hepàtiques”

Rodrigo-Torres D. et al. Hepatology. 2014 Oct;60(4):1367-77

A l'estudi 1, hem observat com l'expressió dels marcadors de CPH en pacients amb HA correlaciona amb el dany hepàtic i prediu la mortalitat a curt termini d'aquests pacients. No obstant, no sabem si l'expansió de CPH és un marcador de dany hepàtic o un intent incomplet de regenerar el fetge danyat. Tot i que en l'estudi 1 i en d'altres (Isse et al. 2013) s'ha observat la presència d'hepatòcits EpCAM positius, suggerint el seu origen en les CPH, les tècniques actuals no permeten en mostres humanes determinar la procedència d'un tipus cel·lular. És per aquest motiu que en l'estudi 2 hem emprat un ratolí transgènic que permet fer un seguiment de llinatge cel·lular de les cèl·lules HNF1 β positives i la seva progènie. Amb aquest ratolí hem avaluat la contribució de l'epiteli biliar a la població de CPH i a la generació d'hepatòcits en l'homeòstasi cel·lular, durant la regeneració hepàtica i en models de dany agut i crònic. Només en un model de dany crònic hem pogut observar com les CPH donen lloc a nous hepatòcits, però en un nombre baix, suggerint que les CPH no participen en la regeneració del fetge en la majoria de danys, i quan ho realitzen, ho fan de manera mínima. Els hepatòcits serien en aquests casos el mecanisme principal de regeneració.

Expressió de HNF1 β en fetges humans normals i cirròtics

Per tal d'observar la idoneïtat de HNF1 β com a marcador per a fer un estudi de seguiment de llinatge, vam investigar primer el seu patró d'expressió en teixit hepàtic humà. En fetges sans, vam veure per immunohistoquímica com l'expressió de HNF1 β estava restringida als ductes biliars. En canvi, en fetges cirròtics per consum d'alcohol, vam veure com l'expressió de HNF1 β no només era present en els ductes biliars sinó també en la reacció ductular, que també expressa EpCAM. Mitjançant doble marcatge de HNF1 β amb HEP PAR-1 o EpCAM, vam veure que HNF1 β no s'expressava ni en hepatòcits madurs ni en hepatòcits immadurs de nova formació, respectivament, suggerint que els hepatòcits immadurs perden l'expressió de marcadors de cèl·lules biliars com HNF1 β mentre que mantenen marcadors de CPH com EpCAM.

L'expressió de la recombinasa Cre per efecte del tamoxifè és específica en ratolins Hnf1 β CreER/ROSA26R

Vist que HNF1 β s'expressava en la RD de pacients cirròtics per alcohol, vam usar un ratolí transgènic Hnf1 β CreER/ROSA26R^{YFP/LacZ} per a estudiar la contribució de les cèl·lules HNF1 β i la seva progènie. En primer lloc, vam avaluar l'especificitat de l'expressió de Cre a les 16 hores de tractar els ratolins amb tamoxifè. Mitjançant immunohistoquímica, hem vist com l'expressió de Cre està restringida a les CEB, que són positives per HNF1 β i pel gen reporter YFP. Vam veure com el tamoxifè no induïa l'expressió de Cre o HNF1 β en hepatòcits HNF4 α positius, indicant que HNF1 β només s'expressa específicament en les CEB i que el ratolí Hnf1 β CreER/ROSA26R^{YFP/LacZ} és un ratolí idoni per a avaluar el destí de les CEB HNF1 β positives.

Contribució de les cèl·lules HNF1 β ⁺ a la renovació d'hepatòcits durant l'homeòstasi cel·lular i en dany agut

Per tal d'avaluar el paper de les cèl·lules HNF1 β ⁺ en una situació d'homeòstasi en el fetge, es van tractar els ratolins Hnf1 β CreER/ROSA26R^{LacZ} amb tamoxifè i es van sacrificar al cap de 2 mesos. Mitjançant doble marcatge amb el marcador de cèl·lules biliars KRT19 i beta-galactosidasa (β -GAL), proteïna producte del gen reporter LacZ, vam observar com colocalitzaven en les CEB, però, en canvi, no hi havia colocalització entre HNF4 α i β -GAL, demostrant que les cèl·lules HNF1 β positives donen lloc a cèl·lules biliars però no contribueixen a la renovació fisiològica d'hepatòcits. Emprant un altre gen reporter, la Yellow Fluorescent Protein (YFP); es van observar els mateixos resultats en dos models de dany agut com són l'administració de CCl₄ i APAP.

Contribució de les cèl·lules HNF1 β ⁺ a la regeneració hepàtica

A continuació es va avaluar la contribució de les CEB HNF1 β ⁺ en un model de regeneració hepàtica com és la HPx. Es van realitzar dos grups d'estudi: un grup sacrificat als 7 dies després de l'operació, quan encara el fetge està en procés de remodelació, i un a 28 dies, quan el fetge ja s'ha regenerat completament. Mitjançant immunohistoquímica no vam veure la formació d'hepatòcits amb origen en les cèl·lules HNF1 β ⁺ al no trobar hepatòcits marcats amb YFP ni a 7 ni a 28 dies després de l'hepatectomia parcial; només es van observar hepatòcits aïllats de forma esporàdica en els ratolins sacrificats als 7 dies després de HPx. Per a avaluar els canvis que es donen durant el procés de regeneració en aquest model, es va mirar l'expressió gènica de marcadors de CEB com *Krt7*, *EpCAM*, *CD133*, *Trop2* i *Krt19*. Vam observar com l'expressió d'aquests marcadors augmenta significativament als 7 dies comparat amb els

valors que s'expressen en el fetge a dia 0, mentre que als 28 dies els valors tornen a nivells basals ($p < 0,05$). Aquests resultats suggereixen que el procés regeneratiu va acompanyat per una reducció de cèl·lules amb un fenotip de CPH.

Contribució de les cèl·lules HNF1 β ⁺ en models de dany hepàtic crònic

Els darrers models d'aquest estudi van ser els models de dany crònic per dietes DDC i CDE. En aquests models, hi ha una clara expansió de les CPH i una RD destacable, demostrada tant per immunohistoquímica, mitjançant doble marcatge amb EpCAM i HNF1 β , com per expressió gènica, on mitjançant PCR a temps real vam veure un augment significatiu de marcadors de CPH. Respecte a la contribució de les CPH a la generació de nous hepatòcits, vam trobar diferències entre els dos models. Mentre que en la dieta DDC, on s'indueix un dany colangiocític, no vam observar hepatòcits derivats de cèl·lules HNF1 β (no hi havia colocalització HNF4 α / β GAL) ni després de 4 setmanes de tractament ni després d'estar sota dieta 4 setmanes i permetent la seva recuperació durant 2 setmanes amb una dieta normal. En canvi, en la dieta CDE, caracteritzada per un dany més hepatocitari, vam observar una petita població d'hepatòcits periportals HNF4 α /YFP positius (0,22% del total d'hepatòcits) a les 3 setmanes de tractament. Si els ratolins estaven amb dieta normal durant 2 setmanes per a recuperar-se del dany per dieta CDE, aquest percentatge augmentava fins al 1,86% del total. Aquests resultats mostren com, en determinats danys, almenys una fracció de cèl·lules HNF1 β ⁺ són CPH bipotencials amb capacitat de donar colangiòcits i hepatòcits.

Expressió de marcadors de CPH en cèl·lules YFP⁺

Finalment vam determinar si les cèl·lules HNF1 β ⁺ expressen marcadors de CPH. A més, vam voler avaluar les diferències en el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules YFP⁺ de ratolins tractats amb dietes DDC i CDE que permetin explicar la diferent contribució a la generació d'hepatòcits en els dos models. Per aquestes raons vam aïllar cèl·lules YFP⁺ de ratolins tractats només amb tamoxifè (n=2), ratolins sotmesos a dieta DDC (n=3) i ratolins sotmesos a dieta CDE (n=3) i el RNA extret d'aquestes cèl·lules va ser emprat per a realitzar un microarray, les dades del qual han estat dipositades en el NCBI's Gene Expression Omnibus (GSE51389) (Figura 2.1).

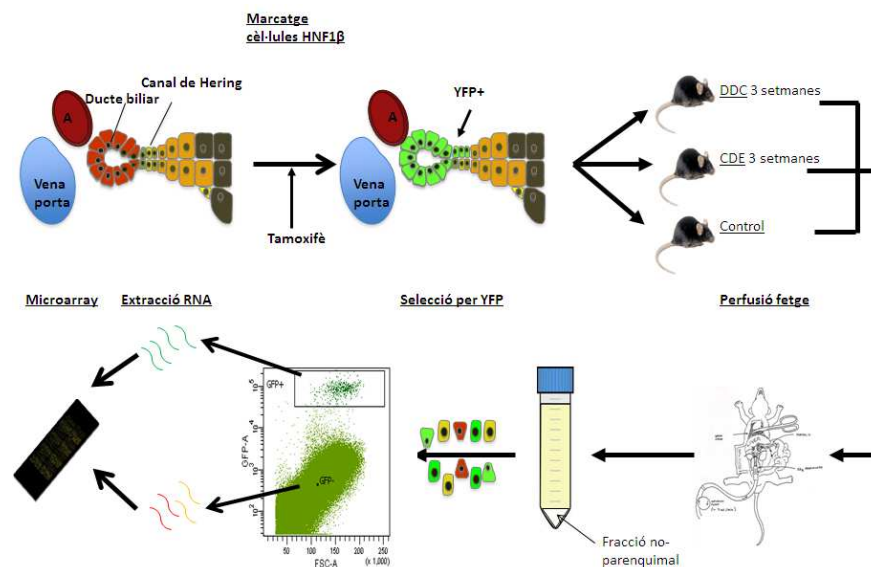


Figura 2.1. Esquema dels passos a seguir per a l'obtenció de l'RNA necessari per a la realització del microarray.

L'anàlisi genòmic de les dades obtingudes en el microarray van mostrar que les cèl·lules YFP⁺ obtingudes de fetges sans i danyats expressaven marcadors descrits en CPH com *Sox9*, *Prom1*, *Krt7*, *EpCAM* o *Trop2*, però també gens expressats en hepatòcits com *Krt18* i *Hnf4α*, i en colangiòcits com *Hnf1β*, *Muc1* i *Krt19*, demostrant el fenotip mixt de les cèl·lules HNF1β⁺. La comparació entre els perfils d'expressió gènica de les cèl·lules YFP⁺ de ratolins DDC i CDE respecte les cèl·lules YFP⁺ de ratolins només tractats amb tamoxifè van mostrar que ambdues poblacions presenten un enriquiment de gens relacionats amb el cicle cel·lular i la proliferació. No obstant, les dues poblacions presenten diferències en les vies sobrerrepresentades. Per una banda, el tractament amb dieta CDE incrementa factors de transcripció i gens relacionats amb apoptosi i una infra-regulació de gens involucrats en les unions cel·lulars, i en les vies Notch1, GSK3 o Wnt. Per l'altra banda, les cèl·lules YFP⁺ obtingudes de ratolins tractats amb dieta DDC presenten una sobre-regulació de gens relacionats amb l'estrès, el manteniment del telòmer, la via d'integrines i les vies d'inflamació, mentre que presenten una infra-regulació de gens relacionats amb la síntesi i metabolisme de lípids, així com la senyalització per PPAR en comparació amb les YFP⁺ dels ratolins sense dany. Tots aquests resultats confirmen que la població HNF1β⁺ està enriquida en CPH i hem obtingut informació sobre quines vies poden ser les responsables de les diferències de les cèl·lules HNF1β⁺ en la generació d'hepatòcits en les dues dietes.

The Biliary Epithelium Gives Rise to Liver Progenitor Cells

Daniel Rodrigo-Torres,¹ Silvia Affò,¹ Mar Coll,¹ Oriol Morales-Ibanez,¹ Cristina Millán,¹ Delia Blaya,¹ Anna Alvarez-Guaita,² Carles Rentero,² Juan José Lozano,¹ Miguel Angel Maestro,³ Myriam Solar,³ Vicente Arroyo,¹ Joan Caballería,¹ Leo A. van Grunsven,⁴ Carlos Enrich,² Pere Ginès,^{1,5} Ramon Bataller,^{1,6} and Pau Sancho-Bru¹

Severe liver diseases are characterized by expansion of liver progenitor cells (LPC), which correlates with disease severity. However, the origin and role of LPC in liver physiology and in hepatic injury remains a contentious topic. We found that ductular reaction cells in human cirrhotic livers express hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B (HNF1 β). However, HNF1 β expression was not present in newly generated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)-positive hepatocytes. In order to investigate the role of HNF1 β -expressing cells we used a tamoxifen-inducible Hnf1 β CreER/R26R^{Yfp/LacZ} mouse to lineage-trace Hnf1 β ⁺ biliary duct cells and to assess their contribution to LPC expansion and hepatocyte generation. Lineage tracing demonstrated no contribution of HNF1 β ⁺ cells to hepatocytes during liver homeostasis in healthy mice or after loss of liver mass. After acute acetaminophen or carbon tetrachloride injury no contribution of HNF1 β ⁺ cells to hepatocyte was detected. We next assessed the contribution of Hnf1 β ⁺-derived cells following two liver injury models with LPC expansion, a diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin (DDC)-diet and a choline-deficient ethionine-supplemented (CDE)-diet. The contribution of Hnf1 β ⁺ cells to liver regeneration was dependent on the liver injury model. While no contribution was observed after DDC-diet treatment, mice fed with a CDE-diet showed a small population of hepatocytes derived from Hnf1 β ⁺ cells that were expanded to 1.86% of total hepatocytes after injury recovery. Genome-wide expression profile of Hnf1 β ⁺-derived cells from the DDC and CDE models indicated that no contribution of LPC to hepatocytes was associated with LPC expression of genes related to telomere maintenance, inflammation, and chemokine signaling pathways. **Conclusion:** HNF1 β ⁺ biliary duct cells are the origin of LPC. HNF1 β ⁺ cells do not contribute to hepatocyte turnover in the healthy liver, but after certain liver injury, they can differentiate to hepatocytes contributing to liver regeneration. (HEPATOLOGY 2014;60:1367-1377)

Liver injury from any etiology induces mature liver cells to proliferate in order to replace the damaged tissue, allowing the recovery of the parenchymal function. In most situations, this process takes place without a clear involvement of liver progenitor cells (LPCs).^{1,2} LPC expansion has been

Abbreviations: APAP, acetaminophen; β -GAL, beta galactosidase; CCl₄, carbon tetrachloride; CD133 (PROM1), prominin-1; CDE, choline-deficient, ethionine-supplemented; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; HEP PAR-1, hepatocyte paraffin-1; HNF1 β , hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4 alpha; Krt, keratin; LPC, liver progenitor cells; PH, partial hepatectomy; SOX9, sex determining region Y-box 9; TROP2, tumor-associated calcium signal transducer 2; YFP, yellow fluorescent protein.

From the ¹Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ²Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Genomic Programming of Beta Cells Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain; ⁴Liver Cell Biology Lab, Department of Cell Biology, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium; ⁵Instituto Reina Sofía por la Investigación Nefrológica (IRSIN, FRIAT); ⁶Division of Gastroenterology and Hepatology, Departments of Medicine and Nutrition, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA.

Received April 23, 2013; accepted February 18, 2014.

Supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI041538, FIS PI12/01274, FIS PS09/01164 and FIS PI080126 to Dr. Bataller, Dr. Arroyo, Dr. Caballería and Dr. Ginès, respectively) and from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAA)(1U01AA021908-01 [33490]) to Pau Sancho-Bru. Dr. Sancho-Bru is funded by Instituto de Salud Carlos III, Miguel Servet (CP11/00071) and co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Europeo (FEDER), Unión Europea, "Una manera de hacer Europa". D. Rodrigo-Torres received a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, FPU program. S. Affò received a grant from IDIBAPS.

described in several liver diseases, and correlates with the degree of liver injury.^{3,4} We have recently shown that in alcoholic hepatitis LPC markers correlate with liver injury and predict short-term mortality.³ This observation raises the question whether LPC expansion is a marker of liver injury or an incomplete attempt to regenerate the damaged liver. Moreover, it highlights the need for identifying the pattern of liver injury that favors LPC contribution to liver regeneration.

Ductular reaction constitutes a heterogeneous population of proliferating cells ranging from cells expressing stem cell markers with an immature phenotype, to more committed cells with an intermediate hepatobiliary phenotype.⁵⁻⁸ One of the most widely investigated markers is epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), which is expressed in ductular reaction cells but also in newly generated hepatocytes, suggesting that EpCAM-positive hepatocytes may derive from progenitor cells.^{2,9,10} Several studies have shown the capacity of LPC to differentiate *in vitro* to hepatocyte-like and cholangiocyte-like cells.¹⁰⁻¹³ However, the role of LPC in liver diseases is not well understood and whether LPCs derive from the biliary compartment and how they contribute to liver homeostasis and repair is still controversial. Moreover, it is largely unknown how the environment within the injured liver influences LPC differentiation.^{3,14,15}

Genetic lineage-tracing has become a gold standard to evaluate the contribution of any given cell type to cells that arise during organ development, tissue homeostasis or disease. Recent studies aimed at evaluating the contribution of LPC to liver regeneration using this strategy have yielded disparate results. Using a sex-determining region Y-box 9 (SOX9) lineage-tracing model, Furuyama et al.¹⁶ showed an important contribution of SOX9 progeny to hepatocyte regeneration, supporting a model of liver homeostasis and regeneration based on a permanent supply of liver cells from LPC. By contrast, other recent studies showed that SOX9-positive embryonic ductal epithelium cells and osteopontin-labeled adult liver cells have the potential to give rise to transit-amplifying progenitor cells and mature hepatocytes, although to a much lesser extent.^{17,18} Moreover, lineage-tracing studies of markers not expressed in intact liver but in ductular reaction cells have shown the potential of LPC to dif-

ferentiate to hepatocytes and cholangiocytes.^{13,19,20} In summary, there are conflicting evidences concerning the possible contribution of biliary duct cells and LPC to hepatocyte regeneration in response to liver injury.

Hepatocyte nuclear factor (HNF)1 β is a homeobox transcription factor that plays a pivotal role during organogenesis and regulates gene expression in the adult liver and other epithelial organs.²¹⁻²³ In liver development, HNF1 β is involved in the hepatobiliary specification of hepatoblasts to cholangiocytes, and it is strongly expressed throughout the embryonic and adult biliary epithelium.²¹⁻²⁴ However, little is known about the expression of HNF1 β during liver injury and regeneration, and particularly its expression in LPC.

In this study we traced HNF1 β ⁺ cells to assess the contribution of the biliary epithelium to LPC and hepatocytes during healthy liver homeostasis, liver regeneration, and in animal models of acute and repeated liver injury. We show that under physiological conditions, hepatocytes do not derive from HNF1 β ⁺ cells. Only after liver injury do adult HNF1 β ⁺ cells give rise to the expansion of cells with an LPC phenotype and to periportal hepatocytes. However, the population of HNF1 β ⁺ cell-derived hepatocytes is small under these experimental conditions, suggesting that LPC do not substantially contribute to liver parenchymal regeneration under most liver injury insults.

Materials and Methods

Human Biopsies and Samples. Liver tissue samples were obtained from fragments of normal tissue surrounding colon metastasis collected at the moment of liver resection or from explants from liver transplantation due to alcohol-induced liver cirrhosis. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona and all patients included in this study gave written informed consent.

Animal Protocols. Hnf1bCreER transgenic mice were generated and genotyped as previously described.²⁵ Mice were crossed with mice bearing Cre-inducible Rosa26R reporters *LacZ* (β -galactosidase [β -GAL] or yellow fluorescent protein [YFP]). To induce Cre-recombination, 12 to 24-week-old mice were treated with three tamoxifen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Address reprint requests to: Pau Sancho-Bru, Ph.D., Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) C/ Roselló, 149-153, Planta 3, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: psancho@clinic.ub.es.

Copyright © 2014 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.27078

Potential conflict of interest: Nothing to report.

doses (20 mg, 20 mg, and 10 mg) by gavage over 1 week. Tamoxifen was dissolved at 100 mg/mL in 0.9% NaCl and 10% ethanol absolute in order to facilitate sonication. All animal models of liver injury were started 1 week after the last tamoxifen treatment. Two control groups were used for each experimental setting: mice treated with tamoxifen without liver injury, and mice with liver injury but without tamoxifen treatment.

The animal models of liver injury used in this study were: acute acetaminophen (APAP) (Sigma-Aldrich); acute carbon tetrachloride injection (CCl₄, Sigma-Aldrich); two-thirds partial hepatectomy (PH); 0.1% 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin (DDC) diet²⁶ (Sigma-Aldrich); choline-deficient (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) ethionine-supplemented (0.15% in water, Sigma-Aldrich) (CDE) diet,²⁷ and chronic CCl₄ administration. All experimental models are described in the Supporting Material.

All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the University of Barcelona and were conducted in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Histochemical Procedures and Immunostaining. The staining procedure is described in the Supporting Material.

Isolation of YFP⁺ Cells. YFP⁺ cells were obtained by liver perfusion method followed by flow cytometry cell sorting from uninjured mice (n = 3), and from mice treated with a DDC (n = 3) or CDE diet (n = 3) for 3 weeks. A detailed procedure of isolation and following RNA extraction and gene expression analysis are described in the Supporting Material.

Statistical Analysis. Continuous variables were described as means ($\pm$ standard error) and were compared using the Student *t* test. All statistical analyses were performed using SPSS v. 14.0 for Windows (Chicago, IL).

Results

Expression of HNF1 β in Normal and Cirrhotic Human Livers. We first investigated the expression pattern of HNF1 β in human liver tissue. HNF1 β expression was restricted to biliary duct cells in healthy livers (Fig. 1A). Immunostaining of liver samples from patients with advanced alcoholic liver disease showed that ductular reaction cells were positive for HNF1 β (Fig. 1B), whereas HNF1 β was not expressed in mature hepatocytes as assessed by double staining of HEP PAR-1 and HNF1 β (Fig. 1C,D). To further determine HNF1 β expression in immature hepatocytes, we performed a double staining of HNF1 β and

EpCAM in healthy and alcohol-induced cirrhotic livers. Double-positive HNF1 β /EpCAM cells were detected in the biliary epithelia from healthy tissue and in ductular reaction cells from cirrhotic tissue (Fig. 1E,F). Importantly, EpCAM-positive hepatocytes did not show HNF1 β expression (Fig. 1F) suggesting that immature hepatocytes lost the expression of biliary markers such as HNF1 β , while still retaining the LPC marker EpCAM.

Tamoxifen Induction of Cre-Recombinase in Hnf1 β CreER/R26R Mice. In order to assess the specificity of Cre expression in HNF1 β ⁺ biliary cells, Hnf1 β CreER/R26R^{Yfp/LacZ} mice were treated with tamoxifen and analyzed for Cre expression. The expression of Cre was assessed 16 hours posttamoxifen administration since Cre is transiently located in the nucleus for only 6–36 hours (Supporting Fig. 1A). Immunostaining analysis showed Cre expression restricted to the bile duct cells and colocalized with YFP expression (Supporting Fig. 1B). Importantly, Cre recombinase expression was restricted to HNF1 β ⁺ cells, with an 88.47 $\pm$ 4.5% of HNF1 β ⁺ cells also positive for Cre (Supporting Fig. 1C). Moreover, a 98.35 $\pm$ 0.4% of HNF1 β ⁺ cells also showed expression of SOX9 (Supporting Fig. 1D). Cre expression colocalized with KRT19 and A6²⁶ (Supporting Fig. 1E,F). An overdose of tamoxifen is known to generate liver damage that could induce ectopic expression of HNF1 β and the reporter. Tamoxifen treatment induced a mild increase in aspartate transaminase levels (AST) 42 $\pm$ 5.2 U/L versus 95.4 $\pm$ 30.2 U/L and alanine transaminase levels (ALT) 36 $\pm$ 16.9 U/L versus 76.4 $\pm$ 28.8 U/L. However, immunostaining results demonstrate that tamoxifen did not induce the expression of HNF1 β or CRE in HNF4 α ⁺ hepatocytes (Supporting Fig. 1G,H). Induction of reporter gene YFP or β -GAL showed a labeling efficiency of 28.7 $\pm$ 10% as assessed by KRT19/YFP or KRT19/ β -GAL. These results indicate that the Hnf1 β CreER/R26R^{Yfp/LacZ} model can be used to trace the fate of HNF1 β ⁺ biliary duct cells.

Contribution of HNF1 β ⁺ Cells to Hepatocyte Turnover During Normal Liver Homeostasis. To evaluate the contribution of HNF1 β ⁺ cells in a situation of normal liver homeostasis, mice were treated with tamoxifen and sacrificed 2 months later. We assessed the phenotype of the cellular progeny of HNF1 β ⁺ cells by performing double staining with the reporter gene β -GAL and cell lineage markers HNF4 α and KRT19. As shown in Supporting Fig. 2, we failed to find any hepatocytes that stained with the reporter marker, indicating that HNF1 β ⁺ cells give rise to biliary cells but do not contribute to physiological hepatocyte turnover.

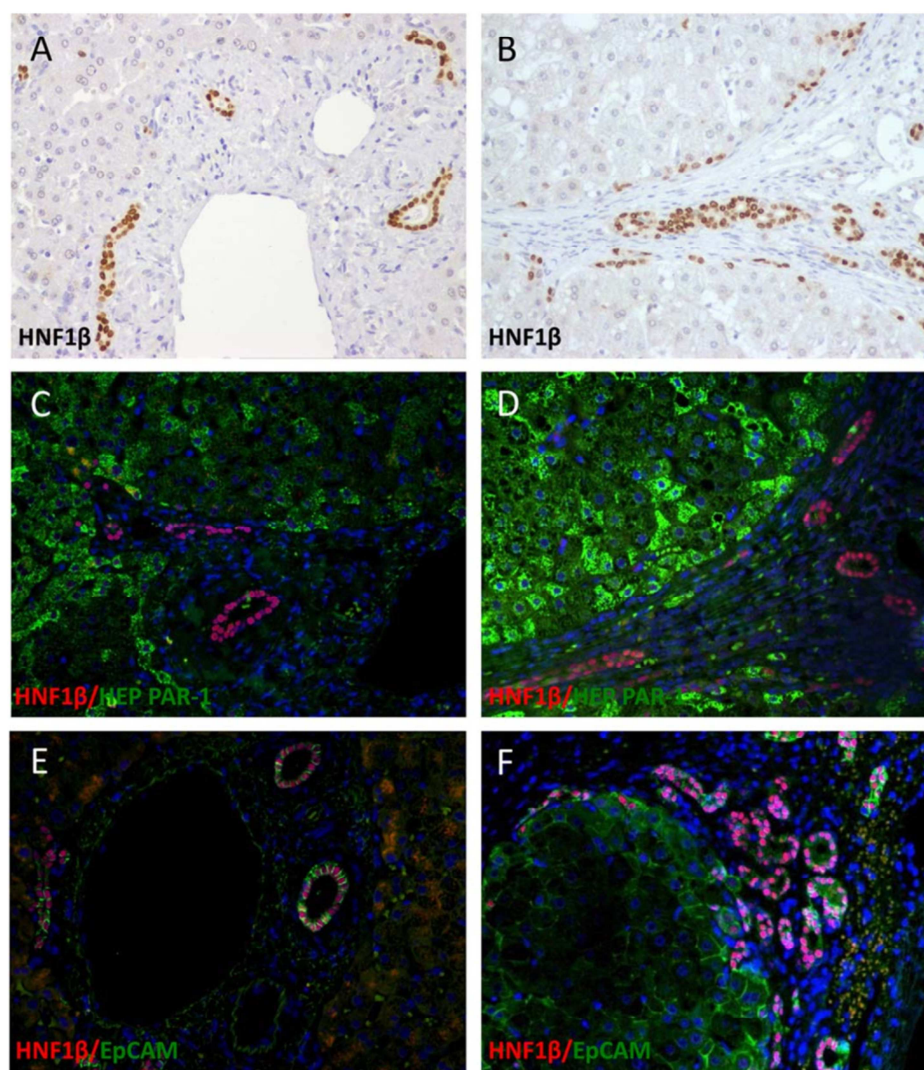


Fig. 1. HNF1 β is expressed in biliary cells and in ductular reaction cells in healthy and diseased human liver. Representative images in healthy liver of (A) HNF1 β immunostaining; (C) double immunostaining for HNF1 β and hepatocyte marker HEP PAR-1; and (E) double immunostaining for HNF1 β and EpCAM. Representative pictures in cirrhotic liver of (B) HNF1 β immunostaining; (D) double immunostaining for HNF1 β and HEP PAR-1; and (F) double immunostaining for HNF1 β and EpCAM. Nuclei counterstaining was performed with DAPI (blue) (magnification $\times 200$ and $\times 400$).

Contribution of HNF1 β ⁺ Cells to Liver Regeneration. To trace the fate of HNF1 β ⁺ cells in a model of liver regeneration, we performed a two-thirds PH in Hnf1 β CreER^{YFP} mice (Fig. 2A). Before PH, expression of YFP was restricted to the biliary epithelia as shown by KRT19/YFP and HNF4 α /YFP staining (Fig. 2B). At 7 days after surgery mice showed a ductular reaction with HNF1 β ⁺ cells restricted to bile ducts (Fig. 2C). Sporadic single hepatocytes located in periportal areas were positive for HNF4 α and the reporter gene YFP (Fig. 2C). We also evaluated the contribution of HNF1 β ⁺ cells in mice at 28 days after surgery to

allow the complete regeneration of the liver (Fig. 2D). No contribution of HNF1 β ⁺ cells to hepatocytes was detected at 28 days after surgery, demonstrating that the biliary epithelium does not make a significant contribution to hepatocyte regeneration after PH.

Gene expression of *Krt7*, *EpCAM*, *CD133*, *Trop2*, and *Krt19*^{9,28} was also evaluated in mice with PH at time 0 (excised liver), 7 days, and 28 days after surgery. As shown in Fig. 2E, gene expression of LPC markers was increased at 7 days compared to time 0 and returned to basal levels at 28 days. These results suggest that resolution of the liver regenerative process

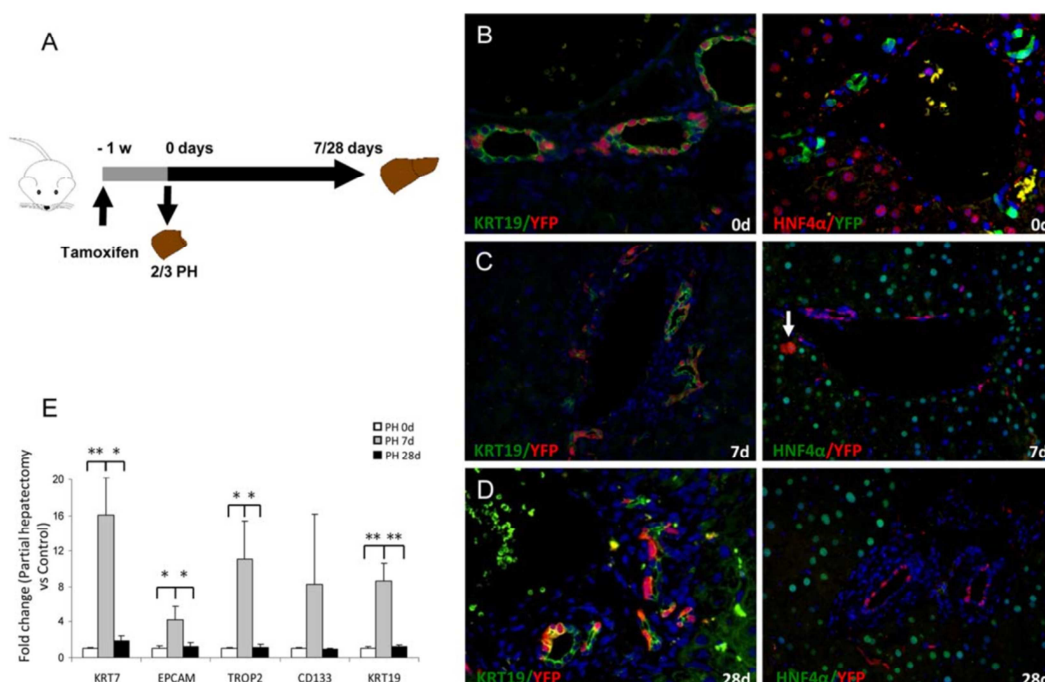


Fig. 2. HNF1 β ⁺ cells do not contribute to liver regeneration after partial hepatectomy. (A) Scheme of experimental design. Double immunostaining with YFP and KRT19 (magnification $\times 200$) or HNF4 α (magnification $\times 400$) were performed at different timepoints: (B) Liver excised during PH (0d); (C) 7 days after PH (7d); and (D) 28 days after PH (28d). Few hepatocytes were double stained with HNF4 α /YFP (white arrow). (E) *Krt7*, *EpCAM*, *Trop2*, *CD133* and *Krt19* gene expression in mice with partial hepatectomy (PH) at 7 days (PH 7d) ($n = 4$) or 28 days after surgery (PH 28d) ($n = 4$) compared to control liver (PH 0d) ($n = 4$) ($*P < 0.05$; $**P < 0.005$). Nuclei counterstaining was performed with DAPI (blue) (magnification $\times 200$ and $\times 400$). d, days; w, weeks before or after tamoxifen administration; PH, partial hepatectomy.

is accompanied with a reduction of cells with an LPC phenotype.

Fate of HNF1 β ⁺ Cells in Acute Liver Injury. In order to evaluate the proliferation and contribution of HNF1 β ⁺ cells after acute liver injury, we used two well-known models of acute damage, acute APAP and acute CCl₄ administration (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B-D,F-H, dual staining of KRT19/YFP, SOX9/YFP, and A6/YFP showed a mild induction of LPC expansion. Moreover, no duct-derived hepatocyte generation was observed based on dual staining of HNF4 α /YFP (Fig. 3E,I).

Contribution of Hnf1 β ⁺ Cells to Chronically Damaged Livers. LPC expansion is associated with liver damage compromising hepatocyte proliferative capacity. To determine the contribution of HNF1 β ⁺ cells to LPC expansion and hepatocyte regeneration, we performed three different types of chronic liver injury: a DDC diet, which induces cholangiocytic injury, as well as chronic CCl₄ treatment and a CDE diet, both known for their hepatocyte toxic effect.

We first investigated the progeny of HNF1 β ⁺ cells in a DDC diet model, which typically stimulates progenitor cell proliferation (Fig. 4A). As expected, after 4

weeks of DDC diet an important ductular reaction was observed accompanied by a significant increase in *Krt7*, *CD133*, and *Trop2* messenger RNA (mRNA) expression, but not in *EpCAM* and *Krt19* (Fig. 4B). Double immunostaining with LPC marker A6 or biliary markers SOX9 or KRT19 together with the reporter gene β -GAL, and also EpCAM/HNF1 β staining demonstrated that the ductular reaction was derived from HNF1 β ⁺ cells (Fig. 4C-G). However, no contribution of HNF1 β ⁺ cell progeny to hepatocytes was observed (Fig. 4H). We then explored if a DDC injury-recovery model enhanced the contribution of HNF1 β ⁺ cells to new hepatocytes. The replacement of the DDC diet (4 weeks) for standard chow (2 weeks) (DDC 4+2w) reduced the expression of LPC genes significantly (Fig. 4B), and double staining with HNF4 α and β -GAL did not show any contribution of HNF1 β ⁺ cells to hepatocyte generation (Supporting Fig. 3A-C).

Next, we assessed the contribution of Hnf1 β ⁺ cells in mice treated chronically with CCl₄, which induces hepatocyte damage and liver fibrosis upon chronic treatment. After 8 weeks of CCl₄ treatment, mice presented bridging fibrosis with marked deposition of

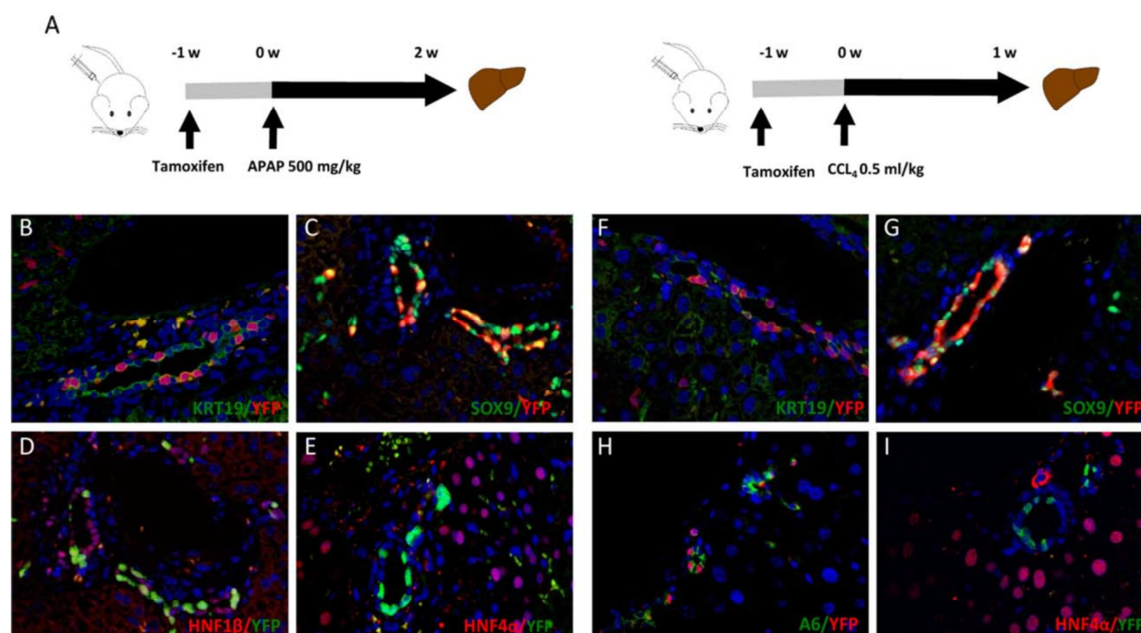


Fig. 3. HNF1 β ⁺ cells do not contribute to hepatocyte regeneration in acute injury models. (A) Scheme of APAP and CCl₄ single injection experimental design. Representative pictures of double staining with YFP and (B,F) KRT19, (C,G) SOX9, (D) HNF1 β , (E,I) HNF4 α , or (H) A6. HNF1 β ⁺ cells did not contribute to hepatocyte population after injury damage induced by (B-E) APAP administration or (F-I) CCl₄ single injection. Nuclei counterstaining was performed with DAPI (blue) (magnification $\times$ 400). w, weeks before or after tamoxifen administration.

extracellular matrix and areas of hepatocyte necrosis and inflammation (Supporting Fig. 3D-G). Although some expansion of LPC was noted as assessed by KRT19 staining, only sporadic single cells with double staining for HNF4 α and β -GAL were observed (Supporting Fig. 3E,F and data not shown). Although CCl₄ induces hepatocyte damage, it did not compromise hepatocyte replication as shown by Ki-67 staining (Supporting Fig. 4). Thus, we next investigated the contribution of HNF1 β ⁺ cells to hepatocytes in a CDE model which presents hepatocyte damage, decreased hepatocyte proliferation, and LPC expansion (Fig. 5A; Supporting Fig. 4). This LPC expansion was confirmed by an increase of LPC markers *Krt7*, *EpCAM*, *CD133*, and *Krt19* after 3 weeks of CDE treatment, as shown in Fig. 5B. Moreover, there was a clear expansion of LPC derived from HNF1 β ⁺ cells as shown by A6 (not shown), SOX9, and KRT19 double staining with YFP and EpCAM/HNF1 β costaining (Fig. 5C). A 38.96% of KRT19⁺ cells coexpressed YFP. In addition, in this model we were able to identify a population of YFP⁺ hepatocytes in the periportal area as assessed by HNF4 α /YFP staining (Fig. 5C). However, the number of HNF4 α /YFP⁺ hepatocytes in this model was low (0.22% of total hepatocytes). We next explored if a CDE injury-recovery model enhanced the number of HNF1 β -derived hepatocytes.

Mice treated for 3 weeks with a CDE diet followed by 2 extra weeks with standard chow (CDE 3+2w), showed a strong ductular reaction, with cells coexpressing SOX9/YFP, EpCAM/HNF1 β , and 53.84% KRT19/YFP double-positive cells (Fig. 5D). Moreover, this animal model had a reduced hepatocyte proliferation as assessed by Ki-67 staining and p21 expression (Supporting Fig. 4). Importantly, we identified a double-positive population of HNF4 α /YFP hepatocytes representing 1.86% of the total hepatocyte population. Moreover, YFP⁺ hepatocytes were negative for HNF1 β (Fig. 5D). These results indicate that at least a fraction of HNF1 β ⁺ cells are bipotential LPC with the capacity to give rise to cholangiocytes and hepatocytes.

Expression of LPC Markers in YFP⁺ Cells. In order to determine if HNF1 β ⁺ cells express LPC markers, YFP⁺ cells were isolated from uninjured mice and mice exposed to DDC and CDE diet. Genome-wide analysis showed that YFP⁺ cells from healthy and damaged livers expressed well-described LPC markers (Table 1). Moreover, they showed a mixed phenotype expressing genes typically expressed in hepatocytes such as *HNF4 α* , *Krt18*, *Onecut1*, and *Onecut2*, *Foxa2*, and in cholangiocytes, *Hnf1 β* , *Muc1*, and *Krt19* (Table 1). Real-time polymerase chain reaction (PCR) of *CD133*, *EpCAM*, *Trop2*, *CD24*, *Hnf1 β* , *Sox9*, and *Krt19* was performed to validate the gene

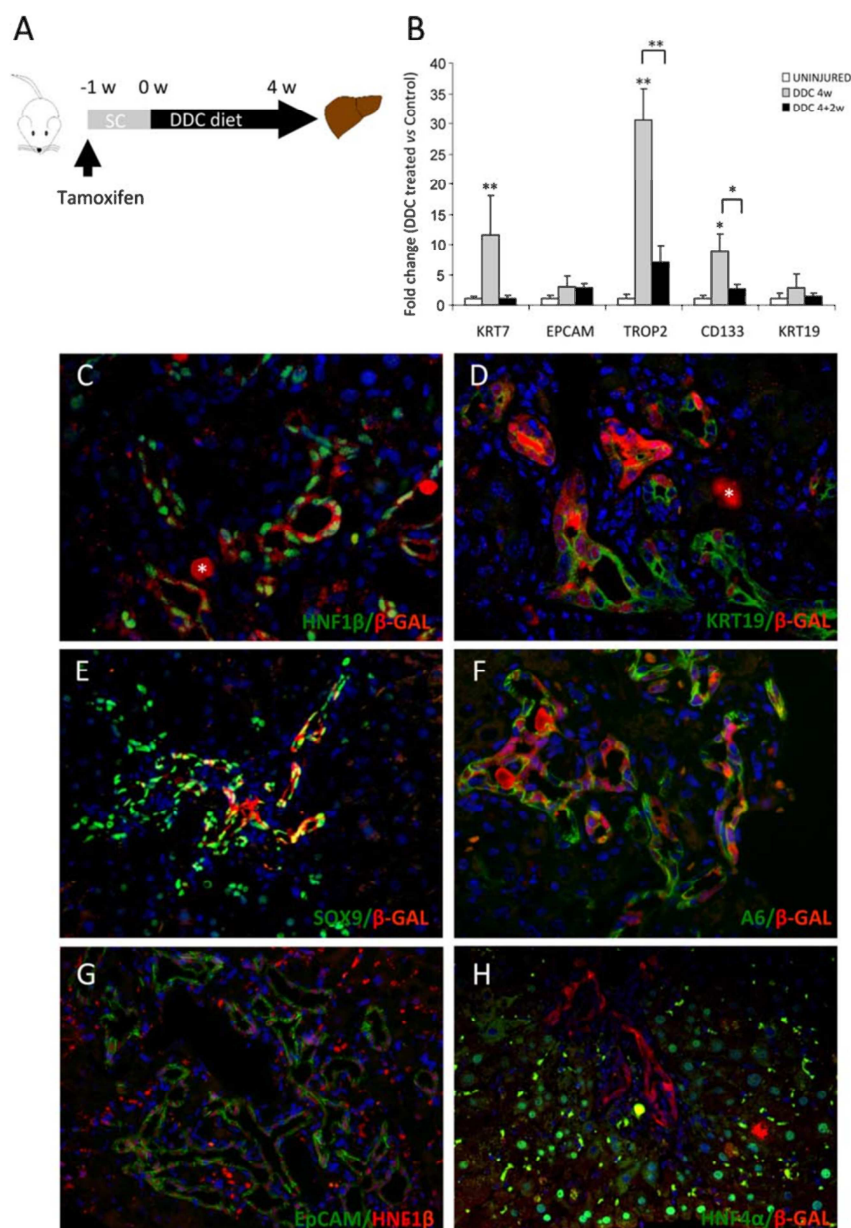


Fig. 4. HNF1 β ⁺ cells generate the ductular reaction but not hepatocytes in mice treated with a DDC diet. (A) Scheme of DDC diet experimental design. (B) *Krt7*, *EpCAM*, *Trop2*, *CD133*, and *Krt19* gene expression in mice treated with a DDC diet for 4 weeks (n = 5) (DDC 4w) and DDC diet for 4 weeks plus standard chow for 2 weeks (DDC 4+2w) (n = 5) compared to uninjured mice liver (n = 4) (*P < 0.05, **P < 0.005). Representative images of double staining of β -GAL and (C) HNF1 β , (D) KRT19, (E) SOX9, (F) A6, and (H) HNF4 α , and (G) EpCAM/HNF1 β in mice treated for 4 weeks with a DDC diet. Asterisks mark bile deposits. w, weeks before or after DDC feeding; SC, standard chow; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin. Nuclei counterstaining was performed with DAPI (blue) (magnification $\times 200$ and $\times 400$).

expression profile in DDC-YFP⁺ cells (data not shown). In order to investigate differences in gene expression profile in YFP⁺ cells from DDC and CDE-treated animals that could explain the differences in their contribution to hepatocyte generation, gene expression profiles were compared to YFP⁺ cells obtained from uninjured livers. As shown in Fig. 6, a Venn diagram showed that 280 genes were differentially expressed in CDE-derived YFP⁺ cells and 673 were found deregulated in DDC-derived YFP⁺ cells as compared with YFP⁺ cells from uninjured mice. We

next performed a functional analysis of those genes differentially expressed in DDC and CDE-derived YFP⁺ cells (Fig. 6; Supporting Fig. 5 and Supporting Tables 4 and 5). Canonical pathways overrepresented in both DDC and CDE-derived YFP⁺ cells showed an enrichment of up-regulated genes related to cell cycle, proliferation, p53 pathway, and cycle checkpoints. Interestingly, YFP⁺ cells from CDE and DDC diets showed important differences in terms of pathways overrepresented. On the one hand, as shown in Supporting Table 4, CDE treatment enhanced the

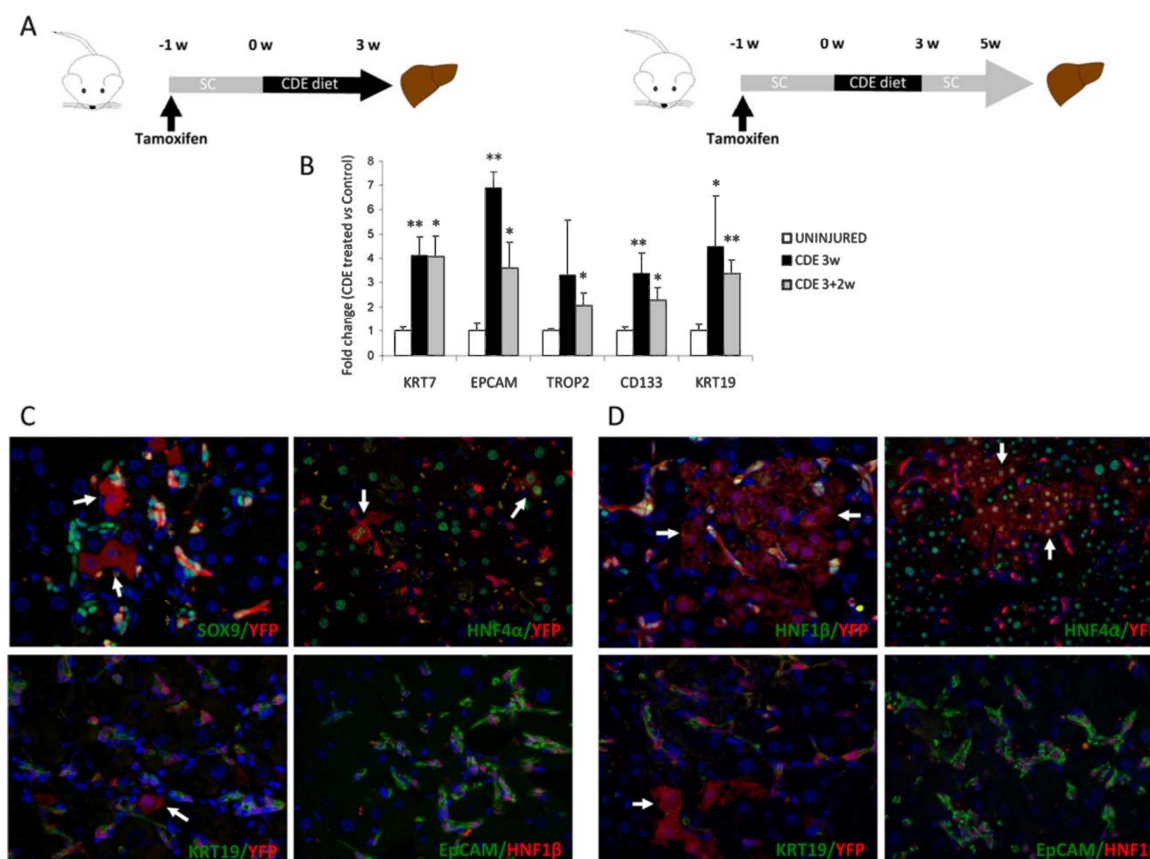


Fig. 5. HNF1 β ⁺ cells contribute to ductular reaction and hepatocyte regeneration in mice treated with a CDE diet. (A) Scheme of CDE diet experimental designs. (B) *Krt7*, *EpCAM*, *Trop2*, *CD133*, and *Krt19* gene expression in mice treated with a CDE diet for 3 weeks (CDE 3w) (n = 3) and CDE injury-recovery model (CDE 3+2w) (n = 5) compared to uninjured mice liver (n = 4); (**P* < 0.05; ***P* < 0.005). (C) Representative images of double staining of YFP and SOX9, HNF4 α , KRT19, and EpCAM/HNF1 β in mice treated for 3 weeks with a CDE diet. HNF1 β -derived hepatocytes are indicated with white arrows. (D) Representative images of double staining of YFP and SOX9, HNF4 α , KRT19, and EpCAM in mice treated for 3 weeks with a CDE diet and 2 weeks with standard chow (CDE 3+2w). Nuclei counterstaining was performed with DAPI (blue) (magnification $\times 200$ and $\times 400$). w, weeks after or before CDE feeding; SC, standard chow; CDE, choline-deficient ethionine-supplemented.

expression of transcription factors and genes related to apoptosis and down-regulate genes involved in cell junction, cell-cell communication, Notch1, GSK3, or Wnt signaling pathway. On the other hand, gene set enrichment analysis of DDC YFP⁺ cells showed the up-regulation of genes related to telomere maintenance, inflammatory pathways, stress, and integrin pathways, and the down-regulation of genes related to lipid metabolism and synthesis, insulin-like growth factor or peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) signaling (Supporting Fig. 5 and Supporting Tables 4 and 5). These results confirmed that HNF1 β -derived cell population is enriched with LPC and provides information regarding which pathways may be responsible for the differences in contri-

bution of HNF1 β -derived cell to hepatocyte generation.

Discussion

The present study investigated the contribution of HNF1 β ⁺ cells from the biliary epithelium to liver regeneration. Importantly, we provide evidence that Hnf1 β is expressed in cells forming the ductular reaction and expanded LPC in human diseases and in animal models of liver injury. We demonstrate that the HNF1 β ⁺ cell population express markers of LPC but does not contribute to normal parenchymal homeostasis; however, under liver injury, HNF1 β ⁺ cells expand and can give rise to hepatocytes. Nevertheless, our results suggest that the

Table 1. Expression of Progenitor Markers in YFP⁺ Cells

Symbol	Gene Name	Fold Change		
		CDE	DDC	CTRL
Hnf1b	HNF1 homeobox B	42.9	41.8	46.0
Sox9	SRY-box containing gene 9	37.5	36.4	38.0
Cldn7	claudin 7	28.6	27.1	29.5
Muc1	mucin 1, transmembrane	16.7	26.9	26.5
Krt19	keratin 19	21.0	24.5	26.0
Prom1	prominin 1	16.5	16.9	21.3
Krt8	keratin 8	19.2	25.2	20.8
Spp1	secreted phosphoprotein 1	21.1	22.2	20.1
Cldn3	claudin 3	17.2	20.5	19.5
Krt18	keratin 18	19.1	21.6	19.2
Onecut1	one cut domain, family member 1	18.0	18.0	17.0
Cdh1	cadherin 1	14.1	14.4	15.8
Onecut2	one cut domain, family member 2	17.9	16.5	15.8
Sox4	SRY-box containing gene 4	12.6	15.9	14.8
Krt7	keratin 7	11.4	17.4	14.6
Epcam	epithelial cell adhesion molecule	14.6	15.1	13.5
Foxa1	forkhead box A1	14.1	11.7	12.0
Foxa3	forkhead box A3	9.3	5.6	7.9
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	9.9	7.1	7.6
Cd24a	CD24a antigen	7.2	8.0	6.9
Foxa2	forkhead box A2	5.2	5.1	5.5
Hnf4a	hepatic nuclear factor 4, alpha	3.8	4.6	5.5
Tacstd2	tumor-associated calcium signal transducer 2	4.1	10.0	4.8
Ncam1	neural cell adhesion molecule 1	1.5	2.3	4.6

CDE, choline-deficient, ethionine-supplemented treated mice; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin treated mice; CTRL, uninjured mice.

contribution of HNF1 β ⁺ cells to newly generated hepatocytes is low under most liver injury models.

The main drawback of lineage tracing studies is the specificity of induction of the driving promoter. Regarding this point, the Hnf1 β CreER^{YFP/LacZ} mouse is an excellent tool to lineage trace ductular cells due to the specific expression of Hnf1 β -Cre in the biliary tree cells and a complete absence of expression in other cell types.²⁵ We carefully analyzed the expression of HNF1 β , Cre-recombinase and the reporter genes YFP and β -GAL in intact livers and also after tamoxifen induction in order to show that recombination was taking place exclusively in biliary cells and not in periportal hepatocytes. This issue is particularly important in experimental settings where a low number of newly generated hepatocytes is expected.

Little is known about the role of HNF1 β in liver injury and resolution.²⁹ Recent studies showed that HNF1 β participates in biliary tree formation, and HNF1 β human deficiency is associated with ciliary defects in cholangiocytes.^{23,24,29,30} Here we demonstrate that HNF1 β is expressed in progenitor cells, suggesting that it may also play a role in the maintenance of the hepatobiliary cell phenotype. Interestingly, HNF1 β is expressed in human ductular reaction cells showing EpCAM expression but not in EpCAM-positive hepatocytes, suggesting that HNF1 β expres-

sion in LPC may be lost upon differentiation. In this study we attempted to confirm this hypothesis by lineage tracing HNF1 β ⁺ cells.

The origin of LPC and its contribution to normal liver homeostasis and repair is still debated. Histological analyses have shown them in the vicinity of bile ducts^{6,31}; thus, it has been suggested that LPC derive from the biliary compartment and participate in the generation of new cholangiocytes and hepatocytes. This hypothesis has been explored in recent studies of

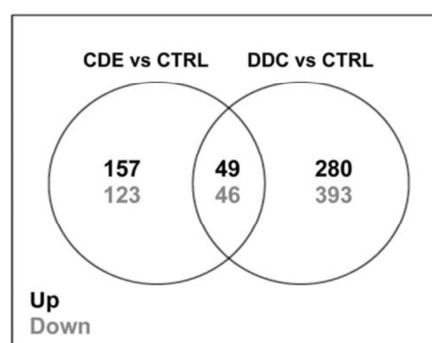


Fig. 6. Venn diagram showing overlap of significantly regulated genes considering YFP⁺ cells isolated from CDE- and DDC-treated mice versus uninjured mice (CTRL). Genes were found regulated (fold-change <1.5 and >1.5 and moderated $P < 0.05$) after assessing significance using the LIMMA package.

lineage tracing with SOX9 transcription factor and osteopontin. However, these important studies have yielded opposite results, partially due to reexpression of SOX9 after tamoxifen induction^{16,17} and the use of nonendogenous artificial promoters.¹⁸ Moreover, osteopontin is shown to be expressed in cell types other than progenitor cells (e.g., hepatic stellate cells³² and inflammatory cells³³). This could be an important limitation of this study, since recent studies suggest that hepatic stellate cells can act as progenitor cells in the injured liver.^{34,35} By performing a lineage tracing based on HNF1 β , a specific marker of cells from the biliary compartment, our study clearly demonstrates that during liver injury HNF1 β ⁺ biliary duct cells give rise to LPC, which have the potential to generate hepatocytes. However, hepatocyte generation may only occur under specific injury conditions and not as a default mechanism during liver homeostasis.

It is difficult to estimate the net contribution of HNF1 β -derived hepatocytes to liver regeneration since the number of newly generated hepatocytes varies depending on the specific liver injury model or regenerative stimulus. Moreover, the labeling of HNF1 β cells is not complete, so we may be underestimating the number of generated hepatocytes. Our results do not support the continuous nature of hepatocyte supply from the biliary compartment to liver parenchyma homeostasis and regeneration and is in line with the studies showing a modest contribution of LPC to hepatocyte regeneration only after specific liver damage.^{17,18} However, it is plausible that repeated cycles of injury-recovery or prolonged animal models of liver injury may show an increased significant level of contribution of LPC to liver regeneration. In this context, advanced chronic human diseases, which develop after prolonged periods of time (i.e., years), are characterized by a strong hepatocyte arrest accompanied with a continuous and prolonged liver injury and inflammation.³⁶ Differences in the type, duration, and severity of liver injury between experimental models and human diseases may also suggest that the contribution of LPC to liver regeneration in human chronic diseases may exceed the extent observed in animal models.

An important finding of our study is that gene expression levels of LPC markers does not correlate with LPC contribution to liver regeneration. The gene expression profile of total liver and HNF1 β -derived YFP⁺ cells showed an enrichment of hepatobiliary and LPC markers, demonstrating that all animal models analyzed do induce LPC expansion. However, HNF1 β -derived hepatocytes were observed only in the CDE animal model, and especially in the CDE injury-

recovery model, suggesting that the liver injury milieu may influence the LPC differentiation capacity. Moreover, our study provides the first transcriptomic profile of mouse LPC comparing isolated cells from the two more widely used models of LPC expansion (i.e., DDC and CDE models). This analysis yielded important mechanistic data, since functional genome-wide analysis of YFP⁺ cells isolated from both animal models showed important differences in a number of pathways that may influence LPC differentiation. In that sense, YFP⁺ cells from DDC mice show an enrichment of genes related to inflammatory response, response to stress, telomerase maintenance, or cell cycle checkpoints that may be preventing HNF1 β ⁺ cells from differentiating. Further studies will need to evaluate which may be the involvement of these pathways in LPC expansion and differentiation.

LPC expansion and contribution to liver regeneration may have an important impact on liver disease since the degree of LPC activation correlates with survival in severe human liver disease such as alcoholic hepatitis.³ This observation suggests that in chronic liver diseases LPC expansion may be an uncontrolled response to injury that fails to effectively yield mature functioning hepatocytes. The data reported here provide important basic information regarding the adult biliary compartment as the origin of LPC. Although the lineage-tracing results shown here demonstrate that the biliary compartment may not play a role during normal liver homeostasis, it is clear that biliary cells give rise to an expanding LPC population with the potential to generate hepatocytes. Understanding the LPC contribution to hepatocyte generation is essential to better understand the mechanisms of liver regeneration and may have important implications for the development of new therapeutic strategies directed to enhance LPC expansion and differentiation aiming at favoring liver injury resolution.

Acknowledgment: This work was performed in Centre Esther Koplowitz. The authors thank Dr. Jorge Ferrer for kindly providing the Hnf1 β CreER mice and for scientific advice. We also thank Vanessa Grau for excellent technical support. We are indebted to the Citomics Unit and Genomics Unit of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for technical help. The TROMA-III antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA. A6 antibody was a kind gift from Valentina M. Factor.

References

- Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 2009;137:466-481.
- Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytioglou P, Yoo JE, Park YN, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *HEPATOLOGY* 2011;53:964-973.
- Sancho-Bru P, Altamirano J, Rodrigo-Torres D, Coll M, Millan C, Jose Lozano J, et al. Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *HEPATOLOGY* 2012;55:1931-1941.
- Guy CD, Suzuki A, Zdanowicz M, Abdelmalek MF, Burchette J, Unalp A, et al. Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *HEPATOLOGY* 2012;55:1711-1721.
- Turner R, Lozano O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *HEPATOLOGY* 2011;53:1035-1045.
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *HEPATOLOGY* 2004;39:1739-1745.
- Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *HEPATOLOGY* 2008;48:1598-1607.
- Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *HEPATOLOGY* 2011;54:1853-1863.
- Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 2009;136:1951-1960.
- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007;204:1973-1987.
- Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, et al. Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver. *HEPATOLOGY* 2003;37:1385-1394.
- Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, Oshima N, Kiyonari H, Nakauchi H, et al. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *HEPATOLOGY* 2008;48:1964-1978.
- Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, et al. In vitro expansion of single Lgr5(+) liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013;494:247-250.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* 2012;18:572-579.
- Jung Y, Brown KD, Witek RP, Omenetti A, Yang L, Vandongen M, et al. Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans. *Gastroenterology* 2008;134:1532-1543.
- Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011;43:34-41.
- Carpentier R, Suner RE, van Hul N, Kopp JL, Beaudry JB, Cordi S, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology* 2011;141:1432-1438, 1438 e1431-1434.
- Espanol-Suner R, Carpentier R, Van Hul N, Legry V, Achouri Y, Cordi S, et al. Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1564-1575 e1567.
- Shin S, Walton G, Aoki R, Brondell K, Schug J, Fox A, et al. Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential. *Genes Dev* 2011;25:1185-1192.
- Sackett SD, Li Z, Hurtt R, Gao Y, Wells RG, Brondell K, et al. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *HEPATOLOGY* 2009;49:920-929.
- Coffinier C, Gresh L, Fiette L, Tronche F, Schutz G, Babinet C, et al. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 2002;129:1829-1838.
- Lokmane L, Haumaitre C, Garcia-Villalba P, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Cereghini S. Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* 2008;135:2777-2786.
- Yamasaki H, Sada A, Iwata T, Niwa T, Tomizawa M, Xanthopoulos KG, et al. Suppression of C/EBPalpha expression in periportal hepatoblasts may stimulate biliary cell differentiation through increased Hnf6 and Hnf1b expression. *Development* 2006;133:4233-4243.
- Isse K, Lesniak A, Grama K, Maier J, Specht S, Castillo-Rama M, et al. Preexisting epithelial diversity in normal human livers: A tissue-tethered cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells. *HEPATOLOGY* 2013;57:1632-1643.
- Solar M, Cardalda C, Houbracken I, Martin M, Maestros MA, De Medts N, et al. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* 2009;17:849-860.
- Preisegger KH, Factor VM, Fuchsichler A, Stumptner C, Denk H, Thorgeirsson SS. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab Invest* 1999;79:103-109.
- Akhurst B, Croager EJ, Farley-Roche CA, Ong JK, Dumble ML, Knight B, et al. A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *HEPATOLOGY* 2001;34:519-522.
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *HEPATOLOGY* 2007;45:139-149.
- Raynaud P, Tate J, Callens C, Cordi S, Vandersmissen P, Carpentier R, et al. A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. *HEPATOLOGY* 2011;53:1959-1966.
- Roelandt P, Antoniou A, Libbrecht L, Van Steenberghe W, Laleman W, Verslype C, et al. HNF1B deficiency causes ciliary defects in human cholangiocytes. *HEPATOLOGY* 2012;56:1178-1181.
- Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, et al. Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 2003;39:357-364.
- Morales-Ibanez O, Dominguez M, Ki SH, Marcos M, Chaves JF, Nguyen-Khac E, et al. Human and experimental evidence supporting a role for osteopontin in alcoholic hepatitis. *HEPATOLOGY* 2013;58:1742-1756.
- Ueda T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. *Pathol Int* 2011;61:265-280.
- Michelotti GA, Xie G, Swiderska M, Choi SS, Karaca G, Kruger L, et al. Smoothed is a master regulator of adult liver repair. *J Clin Invest* 2013;123:2380-2394.
- Yang L, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi S, Vandongen HM, et al. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells* 2008;26:2104-2113.
- Katoonizadeh A, Nevens F, Verslype C, Pirenne J, Roskams T. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int* 2006;26:1225-1233.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Acute liver damage models. Acute acetaminophen (APAP) (Sigma-Aldrich) treatment was performed in 5 female mice fasted for 8 hours with free access to water before APAP injection. Mice received intraperitoneally a single dose of 500 mg/kg body weight APAP diluted in DPBS (Biological Industries, Israel) and were sacrificed 2 weeks after the injection. Acute carbon tetrachloride (CCl₄) (Sigma-Aldrich) treatment was performed in 5 male mice with a single intraperitoneally injection of CCl₄ at 0.5 ml/kg, 10% diluted in olive oil (Sigma- Aldrich). Control mice received the equivalent amount of olive oil. Mice were sacrificed 1 week after the injection.

Regeneration model. To study liver regeneration in liver mice partial hepatectomy (PH) was performed, in which the medial and lateral lobules of the liver, representing approximately two thirds of the organ, were surgically removed following the method described by Higgins and Anderson in 1931. Following mice anesthesia with 3% isoflurane (Abbott laboratories, Madrid, Spain), a 0.5 cm midline incision was performed. The upper abdomen was compressed to exteriorize the liver, and the medial and lateral lobules were tied and resected. The abdomen was sutured, and analgesia (Buprenorphine 0.1 mg/Kg, every 12h during 2 days) (Reckitt Benckiser Healthcare, United Kingdom) was supplied intraperitoneally. Restoration of the original liver mass was done in around 10 days (in rodents) by hyperplasia of the remaining liver tissue. Liver was collected 7 days (n=5) or 28 days (n=4) after the surgery.

Chronic liver damage models. Male mice (n=3) were fed with a standard rodent chow diet containing 0.1% 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin (DDC) (Sigma-Aldrich) for 4 weeks (DDC 4w). In order to evaluate the possible contribution of oval cells in liver recovery, male mice (n=3) were fed with standard chow diet (Harlan, Barcelona, Spain) for two weeks after DDC diet (DDC 4+2w). Control animals were

fed with standard chow. Male mice (n=3) were treated with choline-deficient (MP Biomedicals, Santa Ana, CA), ethionine-supplemented (0.15% in water, Sigma-Aldrich) (CDE) diet for three weeks (n=3) (CDE 3w). Participation of liver progenitor cells in liver recovery after injury was evaluated by feeding mice (n=3) with CDE diet for three weeks followed by two weeks with standard chow (CDE 3+2w). Control animals were fed with only standard chow (n=4). Chronic CCl₄ administration was given to 5 male mice at a dose of 0.5 ml/kg body weight (diluted 1:4 in corn oil (Sigma-Aldrich)) twice a week for 8 weeks. Control mice received the equivalent amount of corn oil. Livers were collected 4 days after the last injection.

Histochemical procedures and immunostaining. Double immunofluorescence staining was performed in three µm paraffin-embedded sections. Sections were deparaffinized and incubated in Target Retrieval Solution, Citrate pH6 (DAKO, Glostrup, Denmark) heated in a pressure cooker for 20 minutes or were rehydrated and antigen retrieved with EnVision Flex Target Retrieval Solution Low pH (DAKO) in a DAKO PT Link. Sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C and secondary antibodies for 1 hour at room temperature. The list of primary and secondary antibodies used is given in Supplementary Tables 1 and 2. Samples were mounted with Mounting Medium for Fluorescence with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) to ensure nuclear staining. Single staining with mouse anti-human HNF1β and rabbit anti-mouse Ki67 were performed as previously described (1).

Collagen content in CCl₄ chronic injury was assessed by Sirius Red staining of liver sections as previously described (2)(Sancho-Bru et al. 2007).

For frozen sections, liver samples were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C, washed in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)(Biological Industries),

equilibrated in 20% sucrose at 4°C and embedded into Optimum Cutting Temperature compound (Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands). Livers were cut into five µm thick sections and incubated in citrate buffer (pH=6) for 20 minutes before the addition of the primary antibody. Immunofluorescence staining was analyzed with a Nikon Eclipse E600. Images were processed with Cell^F software (Olympus Soft Imaging, Münster, Germany).

Colocalization studies. HNF1β⁺/CRE⁺ and HNF1β⁺/SOX9⁺ percentages were counted from at least two different lobules in 5 mice sacrificed 16 hours after the last tamoxifen administration. Fifteen random pictures for each mouse at magnification x400 were taken and percentage was obtained based on the ratio between HNF1β⁺/CRE⁺ or HNF1β⁺/SOX9⁺ and total HNF1β⁺ cells. A minimum of 300 HNF1β⁺ cells per animal were counted. Efficiency of mice models was obtaining counting a minimum of 300 keratin (KRT)19⁺ cells separately from YFP⁺ or β-GAL⁺ cells from at least two lobules in each sample. Efficiency was calculated based on the ratio between double positive cells and KRT19⁺ cells. Contribution to hepatocyte population in the CDE diet model and CDE injury-recovery model was estimated based on the percentage between HNF4α⁺/YFP⁺ hepatocytes and total hepatocyte population. Twenty-five random pictures at magnification x400 from at least two different lobules for each mouse were taken to calculate the percentage. For Ki67⁺ cells counting, fifteen random pictures at magnification x400 were taken in chronic CCl₄ model, CDE diet and CDE injury-recovery model and Ki67⁺ hepatocytes were counted.

Isolation of YFP⁺ cells. YFP⁺ cells were obtained by liver perfusion method and flow cytometry cell sorting from uninjured mice (n=3), mice treated with DDC diet (n=3) and CDE diet (n=3) for 3 weeks. Livers were perfused with EGTA solution (NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄H₂O 0.64 mM, Na₂HPO₄ 0.85 mM, HEPES 1mM,

NaHCO₃ 4.17 mM, EGTA 0.5 mM and glucose 5mM, pH= 7.4) at a flow rate of 5ml/min until liver gets pale. After that, the liver was perfused with collagenase solution (NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄H₂O 0.64mM, Na₂HPO₄ 0.85 mM , HEPES 1 mM, NaHCO₃ 4.17 mM and CaCl₂·2H₂O 3.8 mM, pH=7.4) containing Collagenase A 0.5 g/L (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) at a flow rate of 5 mL/min for 11 minutes. The digested liver was minced in Petri dish with ice cold 1x Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biological Industries) and filtered through 70-µm cell strainer (BD Biosciences, Erembodegen, Belgium). The undigested liver was re-digested with collagenase solution containing 0.5 g/L Collagenase A, 0.5 g/L Pronase and 50 mg/L DNase I (Roche Diagnostics GmbH) and stirred for 30 minutes at 37°C before liver homogenates were filtered using a 70-µm cell strainer. After slow centrifugations at 100g for 2 minutes the supernatant was centrifuged at 300g for 5 minutes and the pellet containing non-parenchymal cells were sorted on a FACS Aria (BD Biosciences). YFP⁺ gate was established based on wild type mice. Dead cells were excluded by Live/Dead cell stain kit (Life Technologies, Eugene, Oregon) and YFP⁺ cells were collected in RLT buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

RNA extraction and gene expression analysis

RNA from sorted cells was obtained using the RNeasy Micro Kit (Qiagen). RNA from whole liver samples was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was retrotranscribed using a high-capacity complementary DNA reverse-transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and amplified using Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies) in a 7900 HT instrument (Applied Biosystems). Results were normalized to GAPDH expression and gene expression values were calculated based on the $\Delta\Delta C_t$ method using a pool of mice liver RNA as internal reference. The results are expressed

as fold change. The list of primers used for PCR is included in Supplementary Table 3. Micro-array hybridization and analysis were performed as described in Supplementary Material. Full microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GSE51389).

Micro-array hybridization and analysis. RNA samples were amplified using Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN). Amplification was started with 3 ng of total RNA, using a DNA/RNA chimeric primer (SPIA primers), DNA polymerase and RNase H in an isothermal assay, producing microgram quantities of cDNA. cDNA was therefore labeled and fragmented using Encore Biotin Module (NuGEN) , hybridized to Affymetrix GeneChip Mouse 2.0ST. Arrays were washed and stained using GeneChip Fluidic Station 450 Dx (Affymetrix) and scanned with Affymetrix GeneChip Scanner. Affymetrix gene expression data were normalized using the robust multiarray algorithm (3) using a custom probe set definition that mapped probes to 24792 Entrez Gene Ids (mogene20st_Mn_ENTREZG) (4).

For the detection of differentially expressed genes, a linear model was fitted to the data and empirical Bayes moderated t-statistics were calculated using the LIMMA package from Bioconductor. Adjustment of p-values was done by the determination of false discovery rates (FDR) using Benjamini-Hochberg procedure (5). Genes representing a change of 1.5-fold or greater and moderated p-value <0.05 were considered as differential expressed.

Functional analysis was analyzed using the R/Bioconductor package *gostats*. Only probes that could be associated with a unique EntrezGene were used. In cases where genes were targeted by multiple probes, genes were selected if at least one probe was significantly differentially expressed. The hypergeometric distribution was used to evaluate the probability of randomly observing the enrichment for each GO term (6).

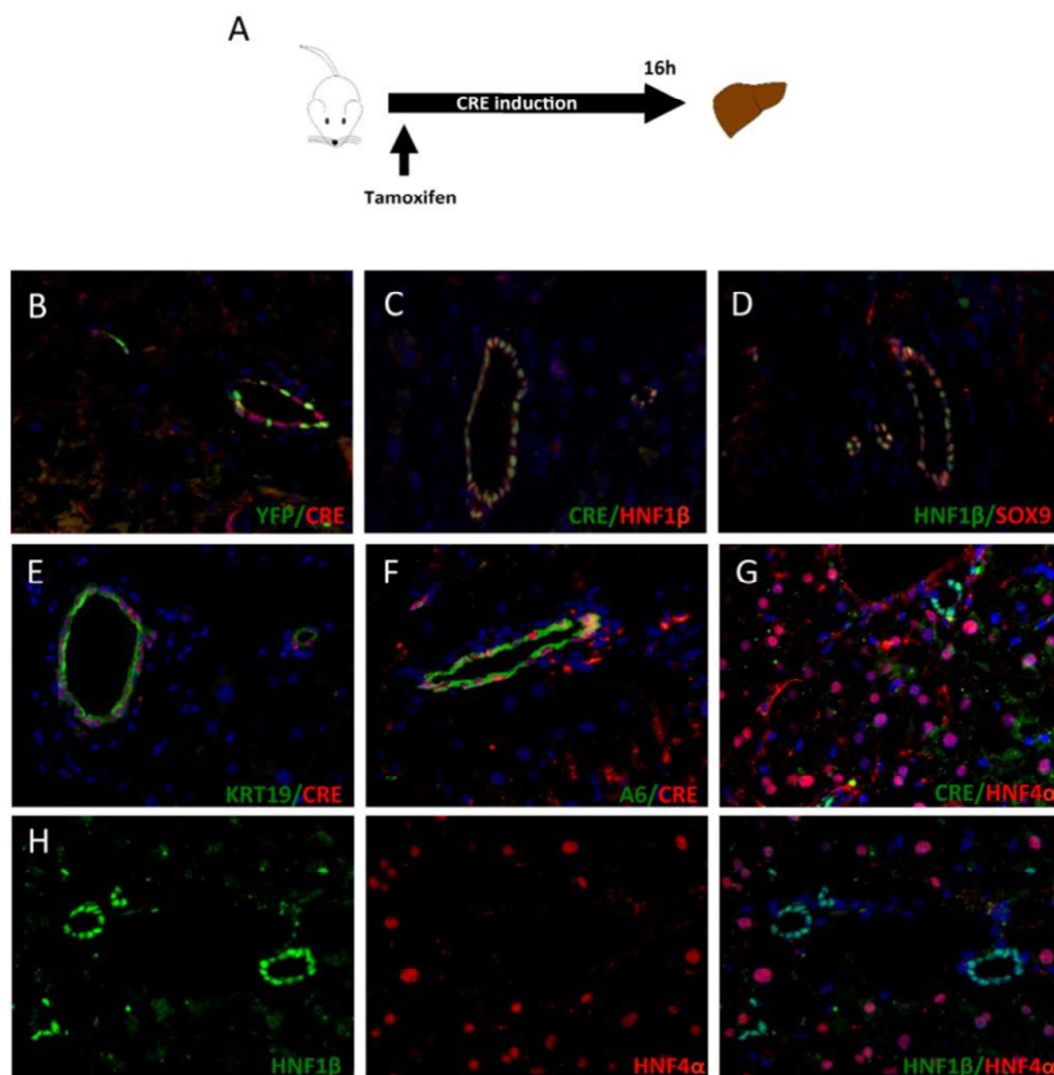
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was employed to identify biological pathways significantly associated (7). For the current analysis gene sets were extracted from the canonical pathways (c2.cp) subset of Molecular Signature Database (MSigDB v.4-0). T-statistics rank obtained from LIMMA was used and a weighted scoring scheme with 1000 permutations on gene sets. Only gene sets with more than 15 genes were included in the analysis.

Western-blot assay. Western-blot analysis and quantification were performed as previously described (Morales-Ibanez et al. 2013).

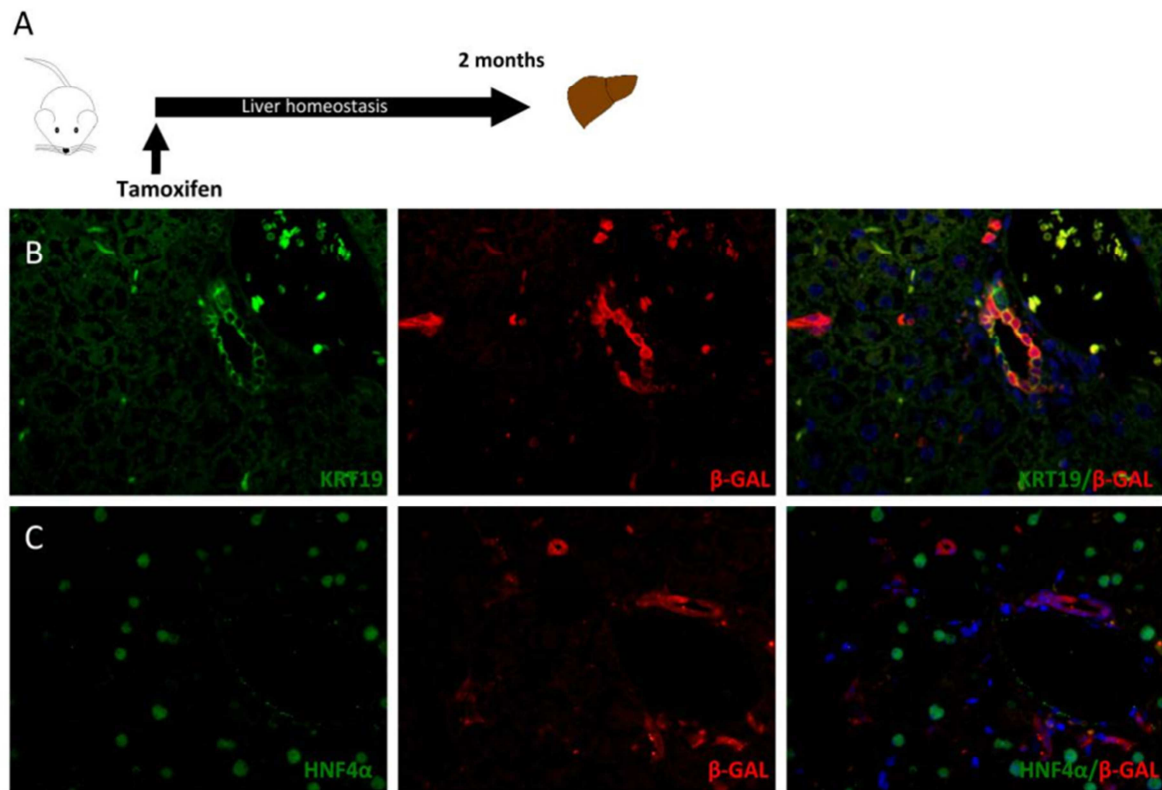
References

1. Sancho-Bru P, Altamirano J, Rodrigo-Torres D, Coll M, Millan C, Jose Lozano J, Miquel R, et al. Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2012; 55:1931-1941.
2. Sancho-Bru P, Bataller R, Fernandez-Varo G, Moreno M, Ramalho LN, Colmenero J, et al. Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. *Gastroenterology* 2007; 133:2019-2028.
3. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data *Nucleic Acids Research* . 2003 31:e15
4. Dai M, Wang P, Boyd AD, Kostov G, Athey B, Jones EG et al. Evolving Gene/Transcript Definitions Significantly Alter the Interpretation of GeneChip Data. *Nucleic Acid Research* 2005; 33:e17.

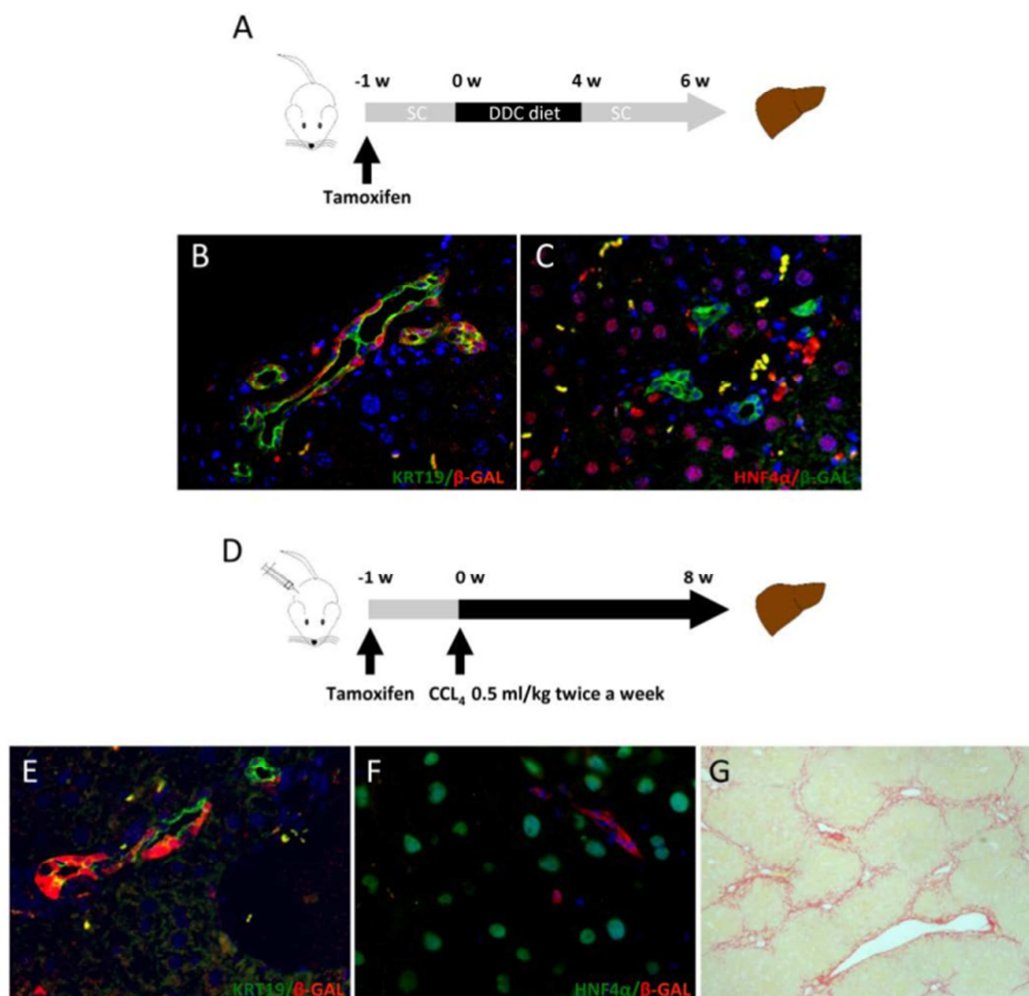
5. Smyth, G. K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds), Springer, New York, pages 397-420.
6. Falcon S, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GOterm association. *Bioinformatics* 2007; 23:257-8.
7. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert, BL, Gillette MA et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2005; 102:15545-15550.
8. Morales-Ibanez O, Domínguez M, Ki SH, Marcos M, Chaves JF, Nguyen-Khac E et al. Human and experimental evidence supporting a role for osteopontin in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2013;58:1742-1756.
9. Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherk C, Schütz G. Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* 1999;285:175-182.



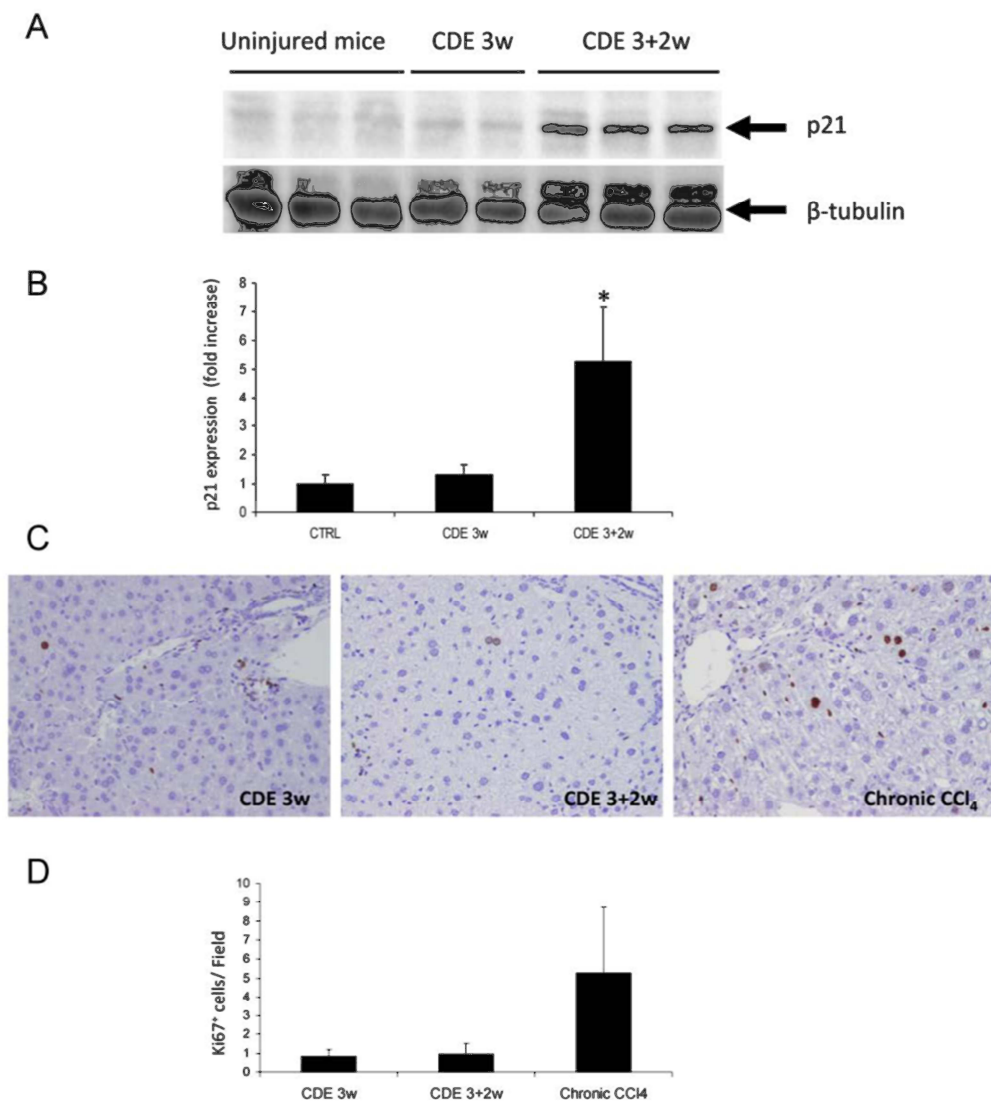
Supplementary Figure 1. Tamoxifen induce Cre-recombinase expression in biliary epithelia. (A) Scheme of Cre experimental design. Representative double staining in bile ducts of (B) Cre and reporter gene YFP after 16h of induction (C) HNF1β and Cre (D) and HNF1β and SOX9. Cre expression was restricted to biliary epithelia as it is shown by dual staining of Cre and (E) biliary marker KRT19, (F) LPC marker A6, or (G) hepatocyte marker HNF4α. (H) Double staining of HNF1β and HNF4α showed no re-expression of HNF1β in hepatocytes after tamoxifen treatment. Cre antibody showed a faint non-specific background. Nuclei counterstaining was performed with DAPI (Blue). (Magnification x400). h, hours after tamoxifen administration.



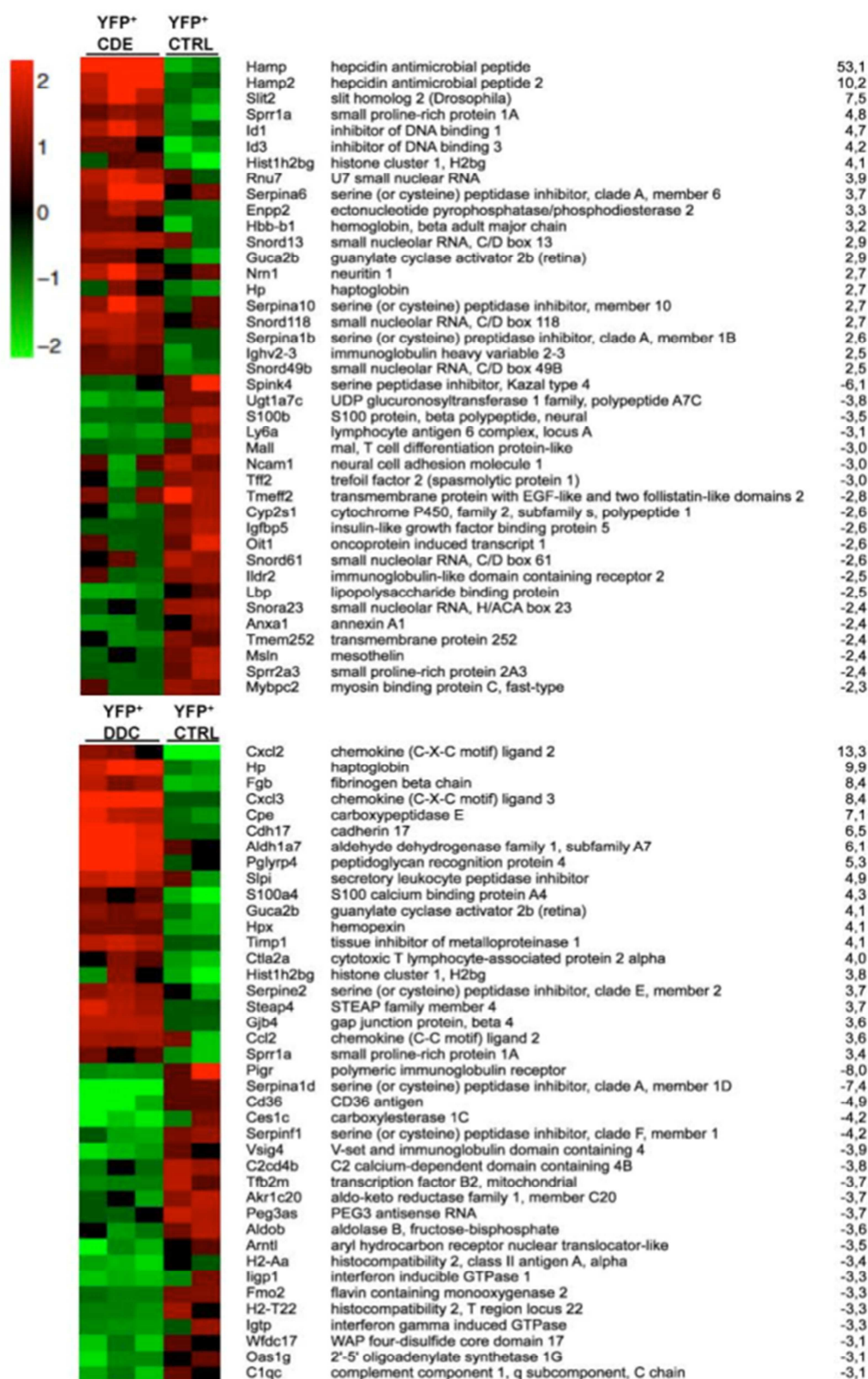
Supplementary Figure 2. HNF1 β cells are restricted to biliary tree after 2 months of tamoxifen induction. (A) Scheme of liver homeostasis experimental design. Representative double stainings of reporter gene β -GAL and (B) KRT19 or (C) HNF4 α . No contribution of HNF1 β cells to liver parenchyma can be observed in normal tissue homeostasis. Nuclei counterstaining was performed with DAPI (Blue). (Magnification x400).



Supplementary Figure 3. Immunostaining for biliary and hepatocyte markers in mice treated with DDC diet with a period of recovery and chronic CCl₄ injection. (A) Scheme of DDC experimental design. Representative pictures of double staining of β-GAL and (B) KRT19 or (C) HNF4α in mice treated with DDC diet for 4 weeks followed by 2 weeks of standard chow (SC) treatment. (D) Scheme of chronic CCl₄ experimental design. Representative pictures of double staining of β-GAL and (E) KRT19 or (F) HNF4α, and (G) Sirius Red staining in mice treated with chronic CCl₄. Nuclei counterstaining was performed with DAPI (Blue). (w; weeks) (Magnification x400)



Supplementary Figure 4. Proliferative capacity of hepatocytes in CDE treated mice. (A) Western-blot analysis of p21 in liver tissue of uninjured and CDE treated mice. (B) Densitometry quantification of p21 expression. (C) Representative pictures of Ki-67 staining in CCl₄ and CDE treated mice. (Magnification 200x) (D) Quantification of the number of Ki-67 positive cells per field. * p<0.05



Supplementary Figure 5. Heatmap of 20 most up-regulated and down-regulated genes in CDE-derived YFP⁺ cells and DDC-derived YFP⁺ cells compared with YFP⁺ cells isolated from uninjured mice. CDE, choline-deficient, ethionine-supplemented treated mice; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin treated mice; CTRL, Uninjured mice.

Primary antibody	Species	Supplier	Dilution	Catalog number
A6	Rat	A kind gift from Valentina M. Factor	1/200	
β -GAL	Rabbit	Invitrogen	1/400	A11132
	Chicken	Abcam	1/500	Ab9361
β -tubulin (WB)	Rabbit	Santa Cruz	1/500	Sc-9104
CRE	Rabbit	Kellendonk et al. (9)	1/2000	
GFP	Goat	Abcam	1/200	Ab6673
	Rabbit	Invitrogen	1/400	A6455
Ki67	Rabbit	Abcam	1/50	Ab16667
KRT19	Rat	Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)	1/100	
EpCAM	Mouse	DakoCytomation	1/100	M0804
	Rat	BD Pharmingen	1/200	552370
HEP PAR-1 (clone OcH1e5)	Mouse	DakoCytomation	Ready to use	IR624
HNF1 β	Rabbit	Santa Cruz	1/400	Sc-22840
	Goat	Santa Cruz	1/50	Sc-7411
	Rabbit	Sigma	1/50	HPA002083
HNF4 α	Goat	Santa Cruz	1/100	Sc-6556
p21 (WB)	Rabbit	Santa Cruz	1/1000	Sc-397
SOX9	Rabbit	Millipore Merck	1/500	AB5535

Supplementary table 1. List of primary antibodies used for double staining experiments. WB, Western blot.

Secondary antibody	Conjugate	Species	Supplier	Dilution
Rabbit IgG	Alexa 488	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1/200
Rabbit IgG	Cy3	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1/200
Rat IgG	Alexa 488	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1/200
Goat IgG	Alexa 555	Donkey	Life Technologies	1/500
Goat IgG	Cy3	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1/200
Goat IgG	Alexa 488	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1/200
Chicken IgG	Cy3	Donkey	Jackson ImmunoResearch	1/500
Mouse IgG	Alexa 488	Goat	Life Technologies	1/1000

Supplementary table 2. List of secondary antibodies used for double staining experiments.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
GAPDH	5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3'	5'- GGATGCAGGGATGATGTTCT- 3'
HNF1β	5'-CATTCTGCCCTGTTACACTC- 3'	5'- CTTTCCAGAGTTCAGTCAACA-3'
KRT7	5'-GGGATGACCTCCGCAACACC-3'	5'-CTCCAGCAGCTTGCGGTAGG- 3'
KRT19	5'-ACCCTCCCAGATTACAACC-3'	5'- CAAGGCGTGTCTGTCTCAA -3'
EpCAM	5'-AGGGGCGATCCAGAACAACG -3'	5'-ATGGTCGTAGGGGCTTTCTC - 3'
PROM-1	5'-GGAAAGCCACGGTGCTCTT- 3'	5'-ACTTGCCAGCTTGATAGCAA- 3'
SOX9	5'-CAAGACTCTGGGCAAGCTCTG-3'	5'- TCCGCTTGTCCGTTCTTCAC - 3'
CD24	5'-CTACCCACGCAGATTTACTG- 3'	5'- ATATGGTAACAGCCAATTCGA-3'
TROP2	5'-AGCCCACCATTAGATAGAG- 3'	5'- TCCAGGTAGTAGATGAGCGT- 3'

Supplementary table 3. List of primers used for gene expression analysis.

Supplementary Table 4. Canonical Pathways enriched in CDE vs Uninjured YFP⁺ cells

GENESET	CDE vs UNINJURED	SIZE	NOMINAL pVALUE	FDR pVALUE
REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	UP	107	<0.001	0.046
REACTOME_TRANSLATION	UP	112	<0.001	0.051
REACTOME_G1_S_TRANSITION	UP	99	<0.001	0.047
REACTOME_P53_DEPENDENT_G1_DNA_DAMAGE_RESPONSE	UP	50	<0.001	0.048
REACTOME_DNA_REPAIR	UP	102	<0.001	0.043
KEGG_BASAL_TRANSCRIPTION_FACTORS	UP	33	0.002	0.052
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	UP	86	<0.001	0.056
KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	UP	91	<0.001	0.056
REACTOME_G2_M_CHECKPOINTS	UP	40	0.002	0.061
REACTOME_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT	UP	58	<0.001	0.060
REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE _EXON_JUNCTION_COMPLEX	UP	78	<0.001	0.058
REACTOME_M_G1_TRANSITION	UP	73	<0.001	0.067
REACTOME_MITOTIC_G1_G1_S_PHASES	UP	123	<0.001	0.074
KEGG_RNA_DEGRADATION	UP	57	0.005	0.075
REACTOME_P53_INDEPENDENT_G1_S_DNA_DAMAGE_CHECKPOI NT	UP	45	<0.001	0.076
KEGG_PROPANOATE_METABOLISM	UP	30	0.008	0.074
REACTOME_TRAF6_MEDIATED_IRF7_ACTIVATION	UP	20	0.008	0.076
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	UP	296	<0.001	0.075
REACTOME_ER_PHAGOSOME_PATHWAY	UP	52	0.009	0.081
REACTOME_CYCLIN_E_ASSOCIATED_EVENTS_DURING_G1_S_TRA NSITION_	UP	59	0.004	0.086
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	UP	61	0.006	0.085
KEGG_PROTEASOME	UP	42	0.009	0.097
REACTOME_APOPTOSIS	UP	132	0.009	0.171
REACTOME_CELL_JUNCTION_ORGANIZATION	DOWN	75	<0.001	0.190
KEGG_GLYCEROPHOSPHOLIPID_METABOLISM	DOWN	73	<0.001	0.126
REACTOME_TIGHT_JUNCTION_INTERACTIONS	DOWN	29	0.006	0.121
PID_LKB1_PATHWAY	DOWN	45	0.004	0.204
REACTOME_CELL_CELL_COMMUNICATION	DOWN	113	<0.001	0.179
BIOCARTA_MYOSIN_PATHWAY	DOWN	31	0.006	0.158
PID_A6B1_A6B4_INTEGRIN_PATHWAY	DOWN	44	<0.001	0.172
PID_LYSOPHOSPHOLIPID_PATHWAY	DOWN	64	<0.001	0.156
KEGG_TIGHT_JUNCTION	DOWN	125	<0.001	0.151
REACTOME_ACTIVATED_NOTCH1_TRANSMITS_SIGNAL_TO_THE_ NUCLEUS	DOWN	25	0.002	0.148
PID_ARF6_PATHWAY	DOWN	34	0.007	0.153
BIOCARTA_GSK3_PATHWAY	DOWN	27	0.002	0.164
PID_ECADHERIN_NASCENTAJ_PATHWAY	DOWN	37	0.002	0.167
PID_ECADHERIN_STABILIZATION_PATHWAY	DOWN	41	0.008	0.213
PID_RHOA_REG_PATHWAY	DOWN	45	0.004	0.209
PID_P38ALPHABETADOWNSTREAMPATHWAY	DOWN	38	0.007	0.206
WNT_SIGNALING	DOWN	88	0.007	0.214
PID_ENDOTHELINPATHWAY	DOWN	62	0.002	0.216
KEGG_ADHERENS_JUNCTION	DOWN	70	0.008	0.290
REACTOME_GPCR_LIGAND_BINDING	DOWN	361	<0.001	0.288

Supplementary Table 5. Canonical Pathways enriched in DDC vs Uninjured YFP⁺ cells				
GENESET	DDC vs UNINJURED	SIZE	NOMINAL pVALUE	FDR pVALUE
REACTOME_TELOMERE_MAINTENANCE	UP	50	<0.001	<0.001
PID_INTEGRIN1_PATHWAY	UP	66	<0.001	0.002
BIOCARTA_NO2IL12_PATHWAY	UP	17	<0.001	0.003
REACTOME_CELL_CYCLE	UP	363	<0.001	0.007
SA_MMP_CYTOKINE_CONNECTION	UP	15	<0.001	0.008
KEGG_DNA_REPLICATION	UP	34	<0.001	0.012
BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY	UP	18	0.002	0.021
PID_PLK1_PATHWAY	UP	45	<0.001	0.022
PID_AURORA_B_PATHWAY	UP	38	<0.001	0.023
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	UP	61	<0.001	0.023
REACTOME_CHEMOKINE_RECEPTORS_BIND_CHEMOKINES	UP	43	<0.001	0.022
REACTOME_G2_M_CHECKPOINTS	UP	40	<0.001	0.028
REACTOME_MITOTIC_M_M_G1_PHASES	UP	159	<0.001	0.028
PID_FOXM1PATHWAY	UP	38	<0.001	0.030
REACTOME_G1_S_TRANSITION	UP	99	<0.001	0.047
PID_INTEGRIN2_PATHWAY	UP	28	<0.001	0.046
PID_IL23PATHWAY	UP	37	0.005	0.046
BIOCARTA_STRESS_PATHWAY	UP	25	0.007	0.047
REACTOME_KINESINS	UP	23	0.002	0.056
BIOCARTA_IL1R_PATHWAY	UP	33	0.008	0.057
ST_TUMOR_NECROSIS_FACTOR_PATHWAY	UP	29	0.008	0.061
REACTOME_IL_2_SIGNALING	UP	39	0.003	0.058
REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	UP	107	<0.001	0.074
KEGG_CELL_CYCLE	UP	121	0.003	0.073
REACTOME_EXTENSION_OF_TELOMERES	UP	26	0.007	0.074
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	UP	89	0.003	0.073
PID_EPHRINBREVPATHWAY	UP	29	0.002	0.075
BIOCARTA_NTHI_PATHWAY	UP	23	0.005	0.075
PID_INTEGRIN3_PATHWAY	UP	41	0.002	0.104
REACTOME_AMYLOIDS	UP	54	0.005	0.151
REACTOME_CHOLESTEROL_BIOSYNTHESIS	DOWN	20	<0.001	0.002
REACTOME_PPARA_ACTIVATES_GENE_EXPRESSION	DOWN	103	<0.001	0.002
REACTOME_METABOLISM_OF_LIPIDS_AND_LIPOPROTEINS	DOWN	454	<0.001	0.041
REACTOME_TRIGLYCERIDE_BIOSYNTHESIS	DOWN	38	<0.001	0.053
REACTOME_FATTY_ACYL_COA_BIOSYNTHESIS	DOWN	18	0.005	0.052
BIOCARTA_IGF1_PATHWAY	DOWN	20	0.005	0.058
REACTOME_INTERFERON_ALPHA_BETA_SIGNALING	DOWN	46	0.003	0.056
REACTOME_TCA_CYCLE_AND_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT	DOWN	104	<0.001	0.059
KEGG_FATTY_ACID_METABOLISM	DOWN	36	0.003	0.076
KEGG_DRUG_METABOLISM_CYTOCHROME_P450	DOWN	55	0.003	0.084
KEGG_PEROXISOME	DOWN	77	0.002	0.084
REACTOME_BIOLOGICAL_OXIDATIONS	DOWN	116	0.003	0.110
REACTOME_RESPIRATORY_ELECTRON_TRANSPORT_AT_P_SYNTHESIS_BY_CHEMIOSMOTIC_COUPLING_AND_H				
EAT_PRODUCTION_BY_UNCOUPLING_PROTEINS	DOWN	69	0.003	0.148
KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	DOWN	66	0.005	0.207
REACTOME_GENERIC_TRANSCRIPTION_PATHWAY	DOWN	213	0.001	0.307

Estudi 3

“Les cèl·lules de la reacció ductular presenten un perfil inflamatori i participen en el dany i el reclutament de neutròfils en la malaltia hepàtica crònica”

Introducció

La capacitat de les CPH de diferenciar-se a hepatòcits *in vivo* en models de dany hepàtic crònic ha estat objecte de força estudis gràcies a la tècnica de seguiment de llinatge, però amb resultats contradictoris. Mentre que alguns estudis suggereixen una gran participació d'aquestes cèl·lules en situacions d'homeòstasi cel·lular i de dany hepàtic, d'altres suggereixen que la contribució d'aquestes cèl·lules és mínima i es limita a certs danys hepàtics. Darrerament, alguns estudis han suggerit que les CPH no participen en la formació de nous hepatòcits en els models murins existents. No obstant, en els models de ratolí on s'ha avaluat aquesta contribució, la capacitat replicativa dels hepatòcits no està compromesa en la seva pràctica totalitat (situació on es suggereix que les CPH participarien de forma més activa a la diferenciació cap a hepatòcits) i no reflecteixen la situació que es donaria en humans.

En les malalties hepàtiques humanes cròniques, caracteritzades per un dany extensiu durant un període de varis anys, els hepatòcits exhaureixen la seva capacitat proliferativa i les CPH emergeixen. En aquestes patologies, s'ha descrit la capacitat de diferenciació de les CPH basada en evidències histològiques per la presència de cèl·lules hepatobiliars amb un fenotip mixt i per hepatòcits immadurs que expressen marcadors de CPH com EpCAM, suggerint un possible origen d'aquestes cèl·lules en les CPH. No obstant, no existeixen tècniques moleculars i genètiques que permetin demostrar amb seguretat l'origen i procedència d'aquestes cèl·lules en humans.

La inflamació i el reclutament de cèl·lules inflamatòries, principalment neutròfils, és una de les característiques histològiques per a definir un episodi de HA en pacients amb ALD. En aquests pacients, hem vist anteriorment com hi ha un augment significatiu de quimiocines de la família CXC que participen en el reclutament de neutròfils. A més, en vàries malalties hepàtiques cròniques, s'ha vist la correlació entre la presència d'inflamació i l'expansió de les CPH. En ratolins, s'ha descrit que citokines proinflamatòries com TNF α o TWEAK, produïdes per les cèl·lules del nínxol hepàtic, estan implicades en l'activació de les CPH. Aquestes cèl·lules que conformen el nínxol de les cèl·lules mare/progenitores hepàtiques, entre les quals trobem

les cèl·lules de Kupffer i els miofibroblasts portals, no només actuen produint senyals que influeixen sobre el procés d'activació de les CPH sinó també en la diferenciació cap a hepatòcits o colangiòcits. En canvi, poc se sap si els neutròfils actuen en aquest nínxol i si tenen un efecte sobre les CPH.

En un estudi previ del nostre grup, s'ha observat que el perfil d'expressió gènica de les CPH és diferent segons el tipus de dany i s'ha suggerit que aquest perfil influeix en la seva diferenciació o no a hepatòcits. En aquelles CPH que no contribueixen, hi ha una representació significativa de gens implicats en vies que participen en la inflamació, entre els quals es troben citokines i quimiocines proinflamàtories. Poc se sap, però, sobre la capacitat de les cèl·lules CPH de reclutar cèl·lules en el seu nínxol, i de l'expressió per part d'elles de gens proinflamatoris i quimiocines implicades en la inflamació i la progressió de la reacció ductular en les malalties cròniques.

L'objectiu d'aquest estudi és investigar el perfil inflamatori de les CPH en ratolins i en humans amb HA i estudiar el paper que juguen els neutròfils en la progressió de la reacció ductular.

Materials i mètodes

Aïllament de les cèl·lules YFP⁺ i realització del microarray

L'aïllament de les cèl·lules YFP⁺ de ratolins tractats amb tamoxifè i sotmesos a dieta DDC o dieta CDE durant 3 setmanes, així com l'extracció del RNA i la posterior realització i anàlisi del microarray ha estat descrit amb anterioritat (Rodrigo-Torres et al. 2014).

RNAseq a partir de mostres obtingudes per LCM

Seccions de 8 µM de teixits parafinats de fetge procedents de pacients amb HA ja caracteritzats amb anterioritat van ser utilitzades per a la realització de la microdissecció per làser (Dubuquoy et al. 2015). De forma breu, les mostres, un cop processades en condicions lliures de RNases (RNase free), van ser tenyides durant 10 minuts per a l'anticòs KRT7 a una concentració 1:50 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, M7018) i durant 15 minuts per al revelatge amb l'anticòs secundari (anticòs conjugat amb peroxidasa EnVision goat anti-mouse; DAKO; K4006). Les zones de reacció ductular KRT7⁺ i les zones de fibra i d'hepatòcits KRT7⁻ van ser microdissectades gràcies al Microdissector Leica LMD6000 i recol·lectades separatament en les tapes de tubs de 0,5 mL. L'extracció de l'RNA d'aquestes àrees microdissectades es va

fer seguint les indicacions de la casa comercial emprant el kit Arcturus® Paradise® Plus RNA Extraction and Isolation Kit (Life Technologies) per a la seva seqüenciació, un cop avaluada la seva concentració mitjançant Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Alemanya).

Per a l'anàlisi de la seqüenciació de l'RNA (RNAseq), es van usar entre 1 i 10 ng de RNA total de les mostres microdissectades. De cada mostra, es va crear una llibreria genòmica utilitzant el Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression kit (Life Technologies, ref. A26325) i la guia MAN0010743 (Revision A.0). Un cop identificades les lectures de cada mostra, cada una de les llibreries va ser purificada i amplificada. A continuació, es van generar les lectures de les seqüències amb el programa Torrent Suite v4.6. i es van eliminar les lectures de baixa qualitat.

Generació del ratolí Hnf1 β CreER/NEMO

Ratolins Hnf1 β CreER van ser creuats amb ratolins B6(Cg)-Ikbkg^{tm1.1Mpa}/Flmg (altrament anomenats NEMO) obtinguts del repositori European Mouse Mutant Archive (EMMA). Els ratolins Hnf1 β CreER/NEMO mascles van ser tractats amb tamoxifè (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolt en corn oil (Sigma-Aldrich) a una concentració de 30 mg/mL i injectat intraperitonealment durant 3 dies consecutius a una dosi de 100 mg/kg pes corporal. Després d'un període d'una setmana per permetre l'eliminació del tamoxifè de l'organisme, els ratolins van ser tractats durant 3 setmanes amb una dieta que conté 0,1% de 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) (Sigma-Aldrich).

Obtenció de neutròfils derivats del moll de l'os i cocultiu amb les cèl·lules BMOL

Els neutròfils van ser aïllats a partir del moll de l'os de ratolins C57/Bl6 mascles tal com s'ha descrit prèviament (Moles et al. 2014). Breument, el moll de l'os va ser extret de la tibia i del fèmur amb una xeringa que contenia Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) suplementat amb 0,5% de sèrum fetal boví (FBS) (HBSS-F) (Biological Industries, Israel). Un cop disgregat el moll de l'os, es va passar el contingut per un colador de 100 μ M (BD Biosciences, NJ, USA) i es va centrifugar a 400g durant 5 minuts. Posteriorment, el pellet es va resuspendre en 1 mL de HBSS-F i se li va afegir 10 mL de 0,2% de clorur de sodi (NaCl) durant 30 segons per a evitar l'activació dels neutròfils i per a lisar els eritròcits, i a continuació es va reestablir l'osmolaritat afegint 10 mL de 1,6% de NaCl. Un cop centrifugat el tub 5 minuts a 400g, es va crear un gradient de 5 mL de Percoll® (Sigma-Aldrich) al 62,5% i es va carregar a sobre les cèl·lules resuspeses en 5mL de HBSS-F. Es va centrifugar 30 minuts a 1000 g a temperatura ambient sense fre i vam recollir el pellet, on es troben els neutròfils. Un cop netejat dues vegades

resuspenent-los amb HBSS-F i centrifugant a 400g 5 minuts, es va plantar el pellet en pouets amb un medi RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementat amb 10% FBS (Biological Industries).

Per a realitzar els estudis de cocultius, els neutròfils van ser cultivats amb una línia cel·lular de cèl·lules progenitores hepàtiques immortalitzada i ben descrita anomenada BMOL (Bipotent Murine Oval Liver) (Tirnitz-Parker et al. 2007). Els neutròfils, un cop aïllats, van ser cultivats en presència de les cèl·lules BMOL quasi confluents en plaques de 12 pouets (TPP, Suïssa) en el medi per a neutròfils descrit abans. Després d'estar en cocultiu durant tota la nit, alguns dels pouets van ser tractats amb LPS 100 ng/mL durant 6 hores i es va recol·lectar el RNA.

Extracció de RNA cel·lular i de teixit

Segons si l'RNA a extreure procedia de cèl·lules o de teixit, vam emprar una diferent estratègia tal com s'ha descrit prèviament (Rodrigo-Torres et al. 2014). Aquest RNA va ser retrotranscrit, i els nivells de mRNA van ser determinats mitjançant una PCR quantitativa a temps real en un termociclador ABI 7900 HT (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) mitjançant sondes comercials (Applied Biosystems) per a CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CCL2, CCL20, EpCAM, HNF1 β , PROM1, KRT7 i KRT19.

Immunohistoquímica

Seccions de 3 μ M de teixits inclosos en parafina de pacients amb HA i/o de ratolins tractats amb dieta DDC o CDE van ser desparafinades i processades tal com s'ha descrit prèviament per a fer les tincions de KRT7, mieloperoxidasa (MPO) i F4/80 (Sancho-Bru et al. 2012; Affo et al. 2014).

Resultats

Comparació dels perfils d'expressió gènica de les cèl·lules YFP⁺ obtingudes de ratolins DDC (YFP⁺-DDC) i de ratolins CDE (YFP⁺-CDE)

A partir de les dades d'expressió obtingudes d'un microarray prèviament descrit (GSE51389), vam veure com les cèl·lules YFP⁺-DDC presentaven una sobre-regulació de gens implicats en vies inflammatòries en comparació amb les cèl·lules YFP⁺ obtingudes de ratolins sense dany (YFP⁺-SA). Per a confirmar el perfil inflamatori d'aquestes cèl·lules, es van seleccionar quimiocines de la família CXC descrites pel seu paper en el reclutament de cèl·lules inflammatòries, així com quimiocines proinflammatòries de la família CC. Tal com es mostra en la Taula 3.1, vam observar una sobre-regulació significativa de moltes d'aquestes quimiocines en les cèl·lules YFP⁺-DDC en comparació amb les cèl·lules YFP⁺-CDE. De fet, algunes d'aquestes quimiocines com CXCL2 i CXCL3 es trobaven entre els gens diferencialment més expressats. Aquests resultats van ser confirmats en mostres de fetge total, on vam veure un augment significatiu de l'expressió d'aquestes quimiocines en ratolins tractats amb dieta DDC respecte a ratolins tractats amb dieta CDE i amb dieta control (Figura 3.1). Per a demostrar que les cèl·lules YFP⁺-DDC presenten un enriquiment en l'expressió d'aquestes quimiocines respecte a altres poblacions cel·lulars, es va comparar l'expressió gènica en les cèl·lules YFP⁺-DDC respecte a una fracció YFP⁻ de cèl·lules no parenquimals mitjançant PCR a temps real. Tal com es mostra en la Figura 3.2, vam veure com les cèl·lules YFP⁺ presentaven una sobre-regulació significativa tant de gens de CPH (*Krt7*, *Krt19*, *EpCAM*, *Prom-1* i *Hnf1b*) com de quimiocines (*Cxcl1*, *Cxcl3*, *Ccl20*) en comparació amb la fracció YFP⁻ ($p < 0,05$). En conjunt, aquests resultats determinen que les cèl·lules YFP⁺-DDC presenten un perfil molt més inflamatori que les YFP⁺-CDE i aquest perfil podria ser una possible característica d'aquestes cèl·lules que determina que no es diferenciïn a hepatòcits en una situació de dany produït per la dieta DDC.

Gen	fc_DDC_CDE	fc_DDC_SA
Ccl2	2,9	3,58
Ccl20	2,32	2,83
Ccl7	3,17	3,14
Cxcl1	2,53	3,07
Cxcl2	8,93	13,29
Cxcl3	8,25	8,38
Cxcl5	5,12	2,46

Taula 3.1. Canvis en l'expressió (expressat en fold change (fc)) de les principals quimiocines reclutadores de cèl·lules inflammatòries en les cèl·lules YFP⁺-DDC (DDC) en comparació amb les cèl·lules YFP⁺-CDE (CDE) i les cèl·lules YFP⁺-SA (SA). Totes elles presenten un canvi d'expressió significatiu en les dues comparacions ($p < 0,05$).

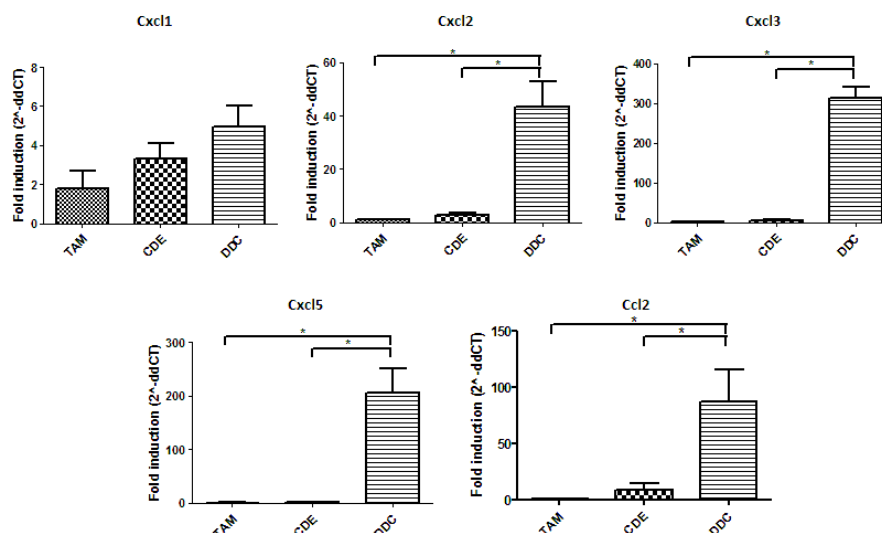


Figura 3.1. Expressió en teixit total de quimiocines reclutadores de neutròfils en ratolins sans (TAM) i en models d'inducció de les CPH (dietes DDC i CDE). Els resultats s'expressen per inducció gènica respecte el control. * p<0,05.

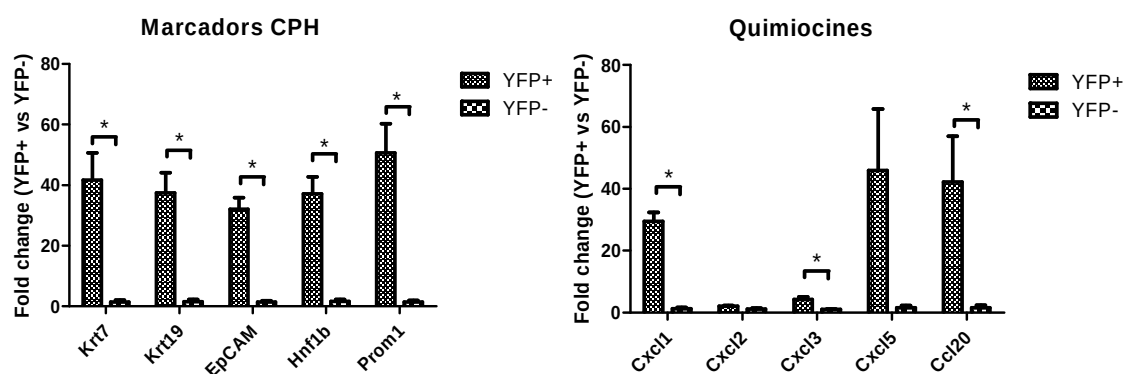


Figura 3.2. Expressió dels gens de CPH i de les principals quimiocines de la família CXCL en cèl·lules YFP+ aïllades de ratolins tractats amb DDC respecte a una fracció YFP- obtinguda de ratolins sans. * p<0,05.

Un cop vist que les CPH produeixen varies quimiocines implicades en el reclutament de poblacions inflamatòries, vam voler avaluar si existien diferències entre les cèl·lules inflamatòries presents al voltant de la reacció ductular en els models DDC i CDE. Mitjançant immunohistoquímica, vam observar que mentre que els macròfags (marcats per F4/80) mostraven un patró de localització semblant entre les dues dietes, els neutròfils (marcats per MPO) presentaven un patró diferent. Mentre que en la dieta CDE no vam trobar pràcticament neutròfils al llarg del parènquima, la dieta DDC presentava un nombre elevat de neutròfils, especialment al voltant de la reacció ductular (Figura 3.3). Aquests resultats estarien en concordància en el fet que les quimiocines sobrerregulades CXCL1, CXCL2, CXCL3 i CXCL5 expressades per les CPH estan àmpliament descrites pel seu paper en el reclutament de neutròfils en diferents situacions de dany.

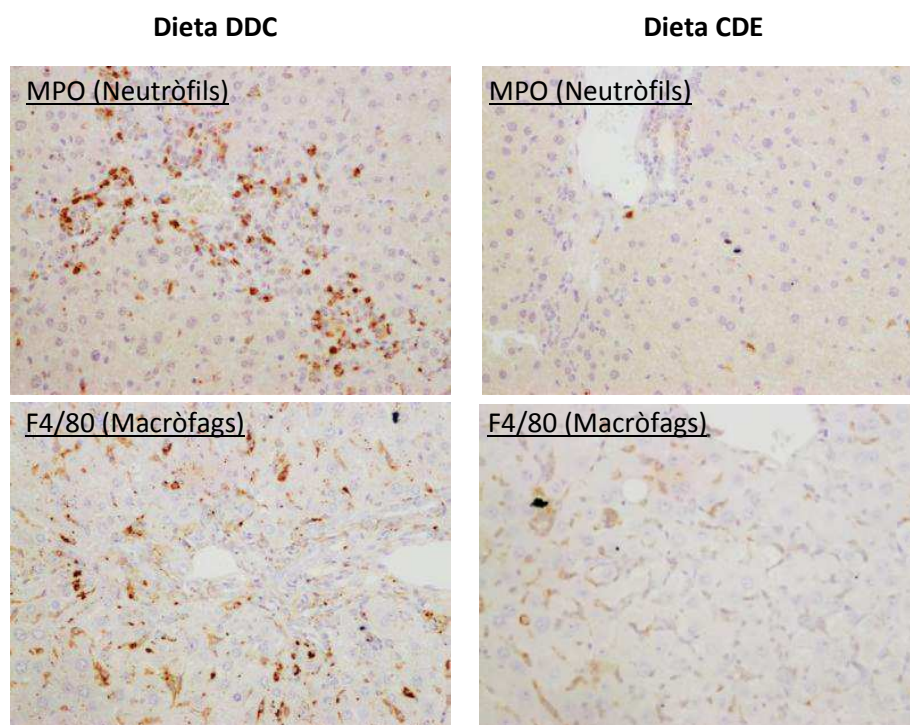


Figura 3.3. Presència de neutròfils (marcats amb MPO) i macròfags (marcats amb F4/80) prop de la reacció ductular en les dietes DDC i CDE.

Transcriptoma de la reacció ductular de fetge de pacients amb HA

La sobre-regulació de quimiocines de la família CXC ha estat observada prèviament en el nostre grup en pacients amb HA. A més, s'ha descrit que en aquests pacients la principal cèl·lula inflammatòria present en l'infiltrat inflamatori són els neutròfils. Per investigar si les cèl·lules de la reacció ductular són una de les principals cèl·lules productores de quimiocines atraients de neutròfils, es van tnyir amb KRT7 talls histològics de parafina de pacients amb HA descrits prèviament i es van aïllar les cèl·lules de la reacció ductular KRT7⁺ gràcies al mètode de la microdissecció (Laser Capture Microdissector) (Figura 3.4). Mitjançant la seqüenciació de l'RNA (RNA sequencing), vam confirmar que les cèl·lules KRT7⁺ de la reacció ductular presentaven un fenotip de CPH, al tenir una sobre-regulació significativa de marcadors com *KRT7*, *EpCAM*, *HNF1B*, *KRT19*, *PROM1*, *SOX9* i *TACSTD2* en la fracció KRT7⁺ (n=6) en comparació a la fracció KRT7⁻ (n=6) o la fracció total (n=4) (Figura 3.5) ($p < 0,05$). A més, també vam veure un augment significatiu de les quimiocines CXCL2, CXCL5, CXCL6 i CXCL8, suggerint que les cèl·lules de la RD humana també mostren un perfil inflamatori. Mitjançant un anàlisi d'enriquiment gènic (Gene set enrichment analysis), en el qual es calculen el nombre de gens sobre-regulats compartits entre dues poblacions, vam voler veure si els gens sobre-regulats de la població YFP⁺-DDC o el de les YFP⁺-CDE, quan es comparen entre elles, presenten major

semblança amb la reacció ductular humana. Tal com s'observa en la Figura 3.6A, les cèl·lules YFP⁺-DDC presenten un perfil més semblant i un major nombre de gens en comú amb la reacció ductular humana que les cèl·lules YFP⁺-CDE, suggerint que el model DDC, tot i no presentar totes les característiques definides per la HA, seria un bon model per a l'estudi de la RD en l'HA. A més, tal com podem observar en la Figura 3.6B, la reacció ductular en pacients amb HA presenta una acumulació de neutròfils prop de les cèl·lules ductulars vist per doble immunohistoquímica per KRT7 i el marcador de neutròfils mieloperoxidasa (MPO).

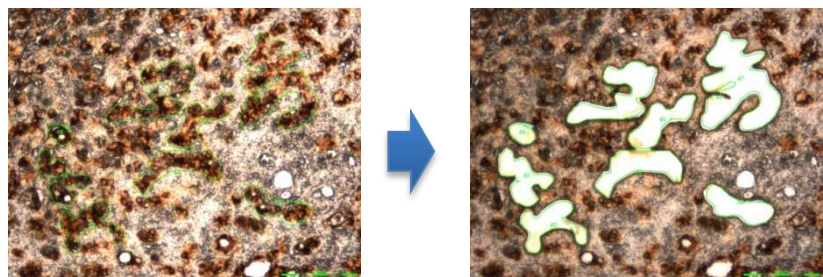


Figura 3.4. Procés de microdissecció de les zones seleccionades KRT7 positives corresponents a cèl·lules de la reacció ductular.

refseq_mrna	Gen	fc_POS_NEG	fc_POS_TOTAL	refseq_mrna	Gen	fc_POS_NEG	fc_POS_TOTAL
NM_002354	EPCAM	43,41	2,49	NM_001511	CXCL1	2,18	1,36
NM_000458	HNF1B	25,09	3,05	NM_002089	CXCL2	2,31	1,13
NM_002276	KRT19	23,22	3,03	NM_002090	CXCL3	1,59	-1,01
NM_015515	KRT23	3,82	1,76	NM_002994	CXCL5	4,55	1,62
NM_005556	KRT7	265,96	3,77	NM_002993	CXCL6	4,40	1,60
NM_006017	PROM1	140,64	3,44	NM_000584	CXCL8	3,84	1,70
NM_000346	SOX9	6,64	2,00	NM_002982	CCL2	-2,00	-1,62
NM_002353	TACSTD2	14,20	2,91	NM_004591	CCL20	-1,29	-1,13

Figura 3.5. Canvis en l'expressió (expressat en fold change (Fc)) dels marcadors de CPH (taula de l'esquerra) i de quimiocines atraients de neutròfils (taula de la dreta) en les mostres KRT7⁺ (POS) en comparació a les mostres KRT7⁻ (NEG) i a una fracció total representativa de les mostres (TOTAL). En negreta, els gens amb un canvi d'expressió significatiu en la fracció positiva respecte a la fracció negativa (p<0,05).

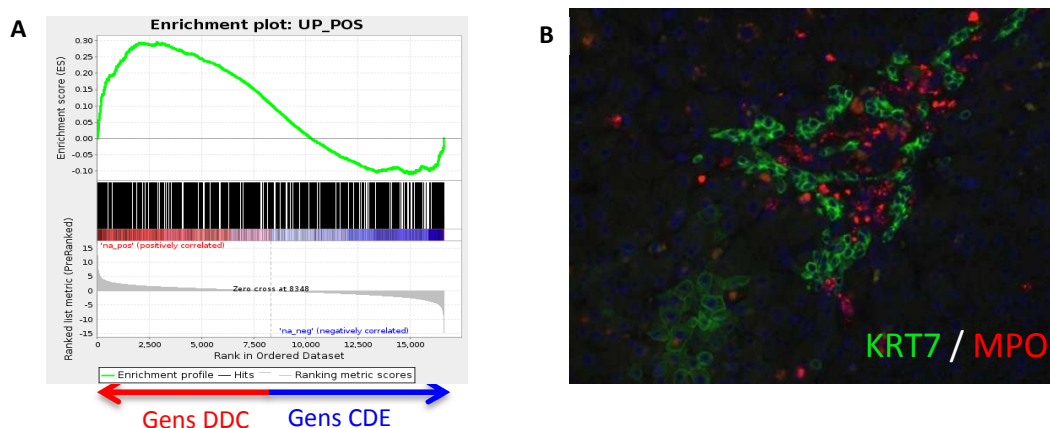
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Figura 3.6. A) GSEA on es mostra que les cèl·lules YFP⁺-DDC comparteixen més gens en comú amb la RD humana que les cèl·lules YFP⁺-CDE. **B)** Marcatge de la reacció ductular mitjançant KRT7 en pacients amb HA. Podem observar com al voltant de la RD trobem una població de neutròfils MPO positiva.

El bloqueig del perfil inflamatori de les CPH resulta en un menor dany i una menor inflamació

Per a observar quin efecte tenen les CEB en la inflamació, vam creuar ratolins Hnf1 β CreER amb ratolins NEMO (B6(Cg)-Ikkbg^{tm1.1Mpa}/Flmg). Els ratolins NEMO presenten una deleció de la subunitat reguladora IKK γ /NEMO, que forma part del complex IKK. El complex IKK està involucrat en l'activació de la via de NF- κ B i, per tant, en els ratolins Hnf1 β CreER/NEMO la via NF- κ B estarà inactiva específicament i de manera condicional en les CEB HNF1 β ⁺ gràcies al sistema Cre/LoxP. Després de tractar els ratolins Hnf1 β CreER/NEMO 3 setmanes amb dieta DDC, vam observar un menor dany hepàtic al presentar els ratolins Hnf1 β CreER/NEMO (n=3) una disminució significativa en els valors de la AST (aspartat transaminasa) i la LDH (lactat deshidrogenasa) en comparació amb ratolins tractats amb dieta DDC sense la inactivació de NEMO (WT) (n=3) (p<0,05) (Figura 3.7A). A més, aquests ratolins presentaven nivells més baixos de PA (fosfatasa alcalina), suggerint un menor dany colangiocitari en aquests ratolins. Per a confirmar una menor inflamació en aquests ratolins, vam analitzar per PCR els nivells gènics de diverses quimiocines i vam veure com els ratolins Hnf1 β CreER/NEMO presentaven una menor expressió significativa de quimiocines proinflamatòries com *Ccl2* i *Ccl20* (p<0,05) (Figura 3.7B). Aquests resultats suggereixen que l'expansió de les CPH contribueix en el dany i la inflamació hepàtica. En canvi, els marcadors de CPH no presentaven variacions en els nivells d'expressió gènica (Figura 3.7C), suggerint que el perfil inflamatori no afecta a la proliferació d'aquestes cèl·lules.

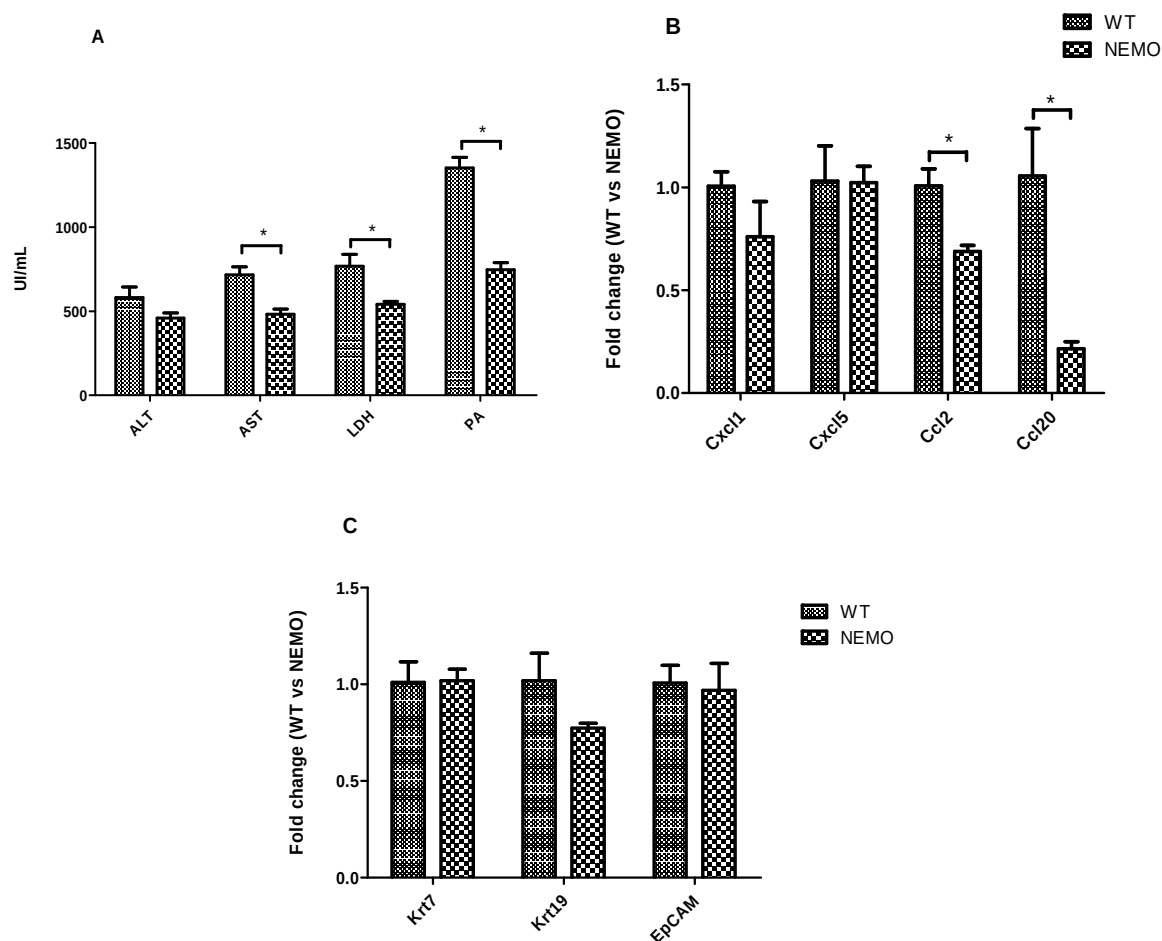


Figura 3.7. A) Nivells sèrics de ALT, AST, LDH i PA en els ratolins NEMO respecte als ratolins WT. B) Canvis d'expressió de les quimiocines *Cxcl1*, *Cxcl5*, *Ccl2* i *Ccl20* i de C) marcadors de CPH en els ratolins NEMO respecte als WT. * $p < 0,05$.

El cocultiu de CPH i neutròfils desencadena un perfil més inflamatori en les cèl·lules CPH

Finalment, per a veure la interacció entre les CPH i els neutròfils, vam realitzar cocultius mitjançant neutròfils aïllats del moll de l'os amb la línia cel·lular de CPH BMOL. Com es pot observar en la Figura 3.8, l'estimulació de les BMOL amb LPS indueix un augment significatiu de les quimiocines *Cxcl1*, *Cxcl5*, *Ccl2* i *Ccl20* ($p < 0,05$). Quan s'estimulen amb LPS les BMOL i els neutròfils cocultivats, les cèl·lules BMOL expressen nivells més elevats de les quimiocines analitzades en comparació a quan les BMOL no estan cultivades en presència dels neutròfils. Aquests resultats suggereixen que la presència de neutròfils activats provoca que les cèl·lules CPH tinguin un perfil més inflamatori, segurament per a realitzar un major reclutament de neutròfils.

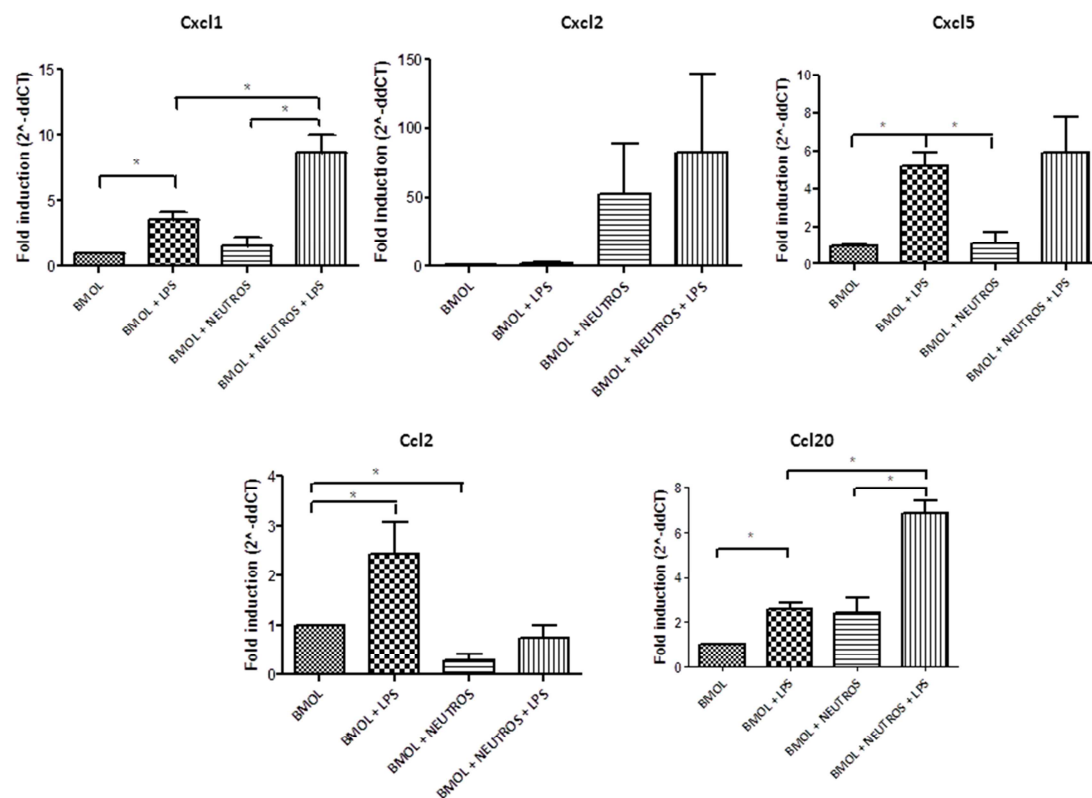


Figura 3.8. Expressió de les quimiocines *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Ccl2* i *Ccl20* en cèl·lules BMOL sense tractar (BMOL) o estimulades amb LPS 100 ng/mL durant 6 hores (BMOL + LPS), cocultivades amb neutròfils (BMOL + NEUTROS) i cocultivades amb neutròfils i estimulades amb LPS 100 ng/mL 6 hores (BMOL + NEUTROS + LPS). * $p < 0,05$.

DISCUSSIÓ

En la present tesi doctoral s'ha estudiat el paper de les CPH en la regeneració hepàtica mitjançant una aproximació translacional. En humans, en una malaltia hepàtica crònica com és l'HA hem descrit per primer cop la presència de les CPH a més d'una important RD. A més, hem identificat als marcadors de CPH com a marcadors de pronòstic per a predir la mortalitat a curt termini dels pacients amb HA. En ratolins, hem avaluat la contribució que tenen les CPH a la generació d'hepatòcits en la regeneració hepàtica que es dona durant un dany hepàtic crònic. Hem observat com el grau de contribució de les CPH és nul en una situació d'homeòstasi parenquimal, però en determinades situacions de dany, aquestes cèl·lules s'expandeixen i donen lloc a hepatòcits. No obstant, aquesta contribució de les CPH a la generació de nous hepatòcits és mínima, recolzant que la generació de nous hepatòcits es dona principalment per part dels propis hepatòcits. Finalment, hem avaluat el perfil d'expressió de les CPH en ratolins i humans, identificant un perfil inflamatori i el possible paper d'aquestes cèl·lules en el reclutament de neutròfils.

La gran capacitat regenerativa del fetge és una característica única. Generalment són els hepatòcits, principal tipus cel·lular del fetge, els encarregats de realitzar aquest procés regeneratiu. Aquestes cèl·lules actuen en situacions on es requereix el reemplaçament de cèl·lules del parènquima, com pot ser durant l'homeòstasi cel·lular en una situació fisiològica o quan el fetge ha rebut un dany puntual per insults tòxics com toxines, alcohol o fàrmacs. Força factors que activen aquestes vies o tenen un efecte directe en els hepatòcits provenen d'altres tipus cel·lulars presents en el fetge com són els macròfags o les cèl·lules endotelials, mostrant la necessitat d'interaccions cèl·lula-cèl·lula per a dur-se a terme aquest procés.

Quan el dany és sostingut durant un període de temps important, s'ha descrit la presència les CPH, que emergeixen de les zones periportals del fetge i que actuarien com a font de nous hepatòcits en aquelles situacions on els hepatòcits tenen una capacitat replicativa exhaurida. No obstant, el paper que tenen aquestes cèl·lules i quan actuarien segueix sent controvertit. Fins i tot es dubta de la seva existència, ja que no s'ha pogut provar de forma irrefutable la seva presència al no existir cap marcador que les permeti discriminar de la població de cèl·lules biliars o colangiòcits.

Tot i així, la possible presència i potencial descrit per a les CPH ha generat força interès a nivell terapèutic de cara a la seva possible aplicabilitat en tractaments basats en la teràpia cel·lular. Actualment, hi ha una alta demanda i una gran llista d'espera de pacients per a poder ser transplantats i cada cop més hi ha un dèficit de donants. Per aquesta raó, s'ha vist les CPH com una possible alternativa al transplantament del fetge, però cal primer entendre com

actuen *in vivo*; per què s'activen, en quines situacions s'expandeixen aquestes cèl·lules en situacions de dany hepàtic crònic, i quines són les senyals que governen la seva diferenciació cap a hepatòcits. Per tal d'aprofundir en el coneixement que es té sobre les CPH, nombrosos estudis s'han realitzat tant en humans com en animals. En humans, diferents estudis han intentat d'aclarir l'origen d'aquestes cèl·lules i la seva implicació en les diferents patologies hepàtiques; en animals, s'han desenvolupat models experimentals on s'indueixen l'activació de les CPH per tal d'estudiar els mecanismes cel·lulars i moleculars que estan implicats en la seva activació i expansió.

En humans, s'ha observat, basat en estudis histològics, com en vàries malalties hepàtiques humanes cròniques causades per virus o per consum d'alcohol hi ha la presència i expansió d'una important reacció ductular (on trobaríem presents les CPH) (Lowes et al. 1999; Roskams et al. 2003; Clouston et al. 2005). En aquestes patologies s'ha observat com una major presència de CPH correlaciona amb un major dany i una major severitat de la malaltia. És en aquestes situacions de dany extrem on els hepatòcits no podrien dur a terme la seva funció regenerativa i per això emergirien les CPH.

No obstant, dins de les malalties hepàtiques per consum d'alcohol trobem l'hepatitis alcohòlica, la qual té una prevalença notòria entre els pacients amb ALD i una mortalitat important. L'HA és una malaltia que presenta una sèrie de característiques, entre les quals destaca la presència de fibrosi i un infiltrat inflamatori important (particularment de neutròfils). Aquestes característiques han estat descrites en d'altres malalties hepàtiques on s'han correlacionat amb el grau d'expansió de les CPH (Libbrecht et al. 2000b; Clouston et al. 2005; Gadd et al. 2014). Tot i així, la presència d'una RD en l'HA no havia estat descrita fins ara. Per aquesta raó, en aquesta tesi doctoral vam avaluar la presència de CPH en aquesta malaltia i investigar quin paper podien desenvolupar en una situació on el dany hepàtic pot arribar a ser molt alt.

Per tal d'identificar la presència de CPH en l'HA, ens hem basat en tres aproximacions per a demostrar que hi ha una expansió de la RD en aquests pacients. En primer lloc, hem observat un augment significatiu en l'expressió de marcadors de HA a partir d'un anàlisi transcriptòmic realitzat prèviament en el nostre laboratori (Affo et al. 2013). Aquest microarray s'ha realitzat a partir de biòpsies obtingudes de pacients amb paràmetres tant clínics, com analítics i histològics de pacients amb HA severa i ha permès identificar noves dianes potencialment terapèutiques en el tractament de l'HA. Entre aquestes dianes identificades trobem molècules descrites per la seva expressió en les CPH com osteopontina

(Opn) (Morales-Ibanez et al. 2013) o Fn14, receptor de TWEAK, el qual s'ha descrit per la seva gran importància en l'activació i proliferació de les CPH (Jakubowski et al. 2005; Affo et al. 2013). La sobre-regulació de gens de CPH vista pel nostre grup ha estat confirmada en un estudi posterior usant una cohort de pacients diferent (Lanthier et al. 2015).

En segon lloc, la sobre-regulació de marcadors associats a CPH s'ha confirmat mitjançant PCR a temps real a partir de RNA obtingut de biòpsies d'una cohort més gran de pacients amb HA. Així, l'augment en l'expressió de tres marcadors com són KRT7, PROM1 i EpCAM en aquests pacients en comparació no només amb mostres control, sinó també amb altres malalties hepàtiques cròniques com és la cirrosi induïda per virus C, suggereix que en l'HA, una malaltia caracteritzada per un dany agut sobre crònic, hi ha una expansió de les CPH, tal com es veia en altres malalties hepàtiques cròniques.

Una de les troballes més remarcables d'aquest estudi ha estat que l'expressió de marcadors de CPH són bons marcadors pronòstics per a predir la mortalitat a curt termini dels pacients amb HA. De fet, el grau d'expressió dels marcadors de CPH KRT7 i EpCAM ens ha permès estratificar els pacients en tres grups segons la seva taxa de supervivència. Aquesta estratificació ha estat possible gràcies a un sistema innovatiu com és el CART, un mètode d'anàlisi de regressió que avalua la interacció entre les diferents variables; en aquest cas, els marcadors de CPH com a indicadors d'una mala prognosi en els pacients amb HA. Tal com hem dit, el mètode CART ens ha permès observar tres grups de pacients: un grup amb una alta taxa de supervivència els quals no requeririen mesures terapèutiques agressives. En aquests pacients hem observat una moderada expressió de marcadors de CPH, segurament acompanyada per una baixa inflamació i una pèrdua de la massa hepàtica petita que combina amb una alta capacitat regenerativa del fetge. El segon grup de pacients presenta un alt risc de mortalitat a 90 dies. Es caracteritzen per tenir nivells màxims de KRT7 i una inflamació considerable amb zones de necrosi; en aquests pacients la capacitat de regeneració hepatocitària està alterada. Finalment, trobem un grup de pacients amb una prognosi intermèdia els quals també necessiten teràpia agressiva per a tractar la malaltia. Cal remarcar que tot i que l'expressió gènica de marcadors de CPH permet la discriminació dels pacients segons la seva taxa de mortalitat, a nivell clínic té molt poca aplicabilitat mentre no es trobin biomarcadors no invasius de CPH. Mentrestant, els *scores* de pronòstic clínic com ABIC o MELD segueixen sent els més utilitzats. No obstant, poden servir com a complements idonis d'aquests *scores*, ja que el nostre estudi ha permès observar que l'expressió de KRT7 permet discriminar els pacients amb un ABIC *score* intermedi segons si tenen una alta o baixa taxa de

mortalitat. Aquestes observacions en conjunt suggereixen que tant la capacitat de regeneració hepàtica com l'expansió de les CPH poden ser factors importants en la prognosi a curt termini de l'HA.

En tercer lloc, hem confirmat la presència de CPH proliferants i d'una important reacció ductular a nivell histològic. Aquesta proliferació és de gran importància ja que en l'HA hi ha un dany hepatocel·lular important i un desajust en la proliferació d'hepatòcits, però a més s'ha vist que l'alcohol desencadena l'expansió de les CPH (Jung et al. 2008).

Aquesta capacitat proliferativa de les CPH pot jugar un paper important en una situació de dany extens, on pot ser necessària per al fetge per a poder-se regenerar. En estadis avançats de cirrosi, els hepatòcits disminueixen la seva proliferació mentre que augmenta la proliferació de les cèl·lules de la RD en comparació amb estadis inicials (Falkowski et al. 2003). Per tant, en aquesta situació de dany crònic, s'ha d'estudiar i entendre els mecanismes que desencadenen que aquestes cèl·lules puguin expandir-se i diferenciar-se a hepatòcits. Una major proliferació sembla que desencadena una major capacitat de regeneració. S'ha vist que en pacients amb HA, els pacients que milloren al cap de 3 mesos de ser ingressats, segons el *score* pronòstic MELD, presenten un major nombre no només de CPH proliferants sinó també d'hepatòcits que proliferen (Lanthier et al. 2015). A més, els pacients que moren al cap de 90 dies presenten una menor proliferació d'aquestes dues poblacions. En aquest context, s'ha d'estimular per tant la regeneració per a millorar la funcionalitat del fetge, però també s'ha de tenir en compte també les cèl·lules que acompanyen a les CPH, així com també la reparació del teixit i la inflamació acompanyant (Dubuquoy et al. 2015). En els pacients que presenten una millora de les funcions hepàtiques, la proliferació d'hepatòcits i de CPH va acompanyada d'una major presència de macròfags, que sintetitzen factors com TWEAK, ja descrit per jugar un paper clau en l'expansió de les CPH.

En d'altres malalties hepàtiques s'ha vist que hi ha d'altres factors que afecten a la proliferació de CPH i els quals són característics de l'HA com el grau de fibrosi i la inflamació. Tot i que hem vist que l'expansió de CPH correlaciona amb el grau de fibrosi, tant la inflamació com la fibrosi no són marcadors de mal pronòstic i no ens permeten estratificar els pacients segons la seva mortalitat. Recentment, però, basat en observacions en humans i ratolins s'ha postulat que, tant cèl·lules inflamatòries com els macròfags, així com elements de la matriu extracel·lular que es dipositen en aquests pacients com la laminina, no només estan implicats en l'expansió de les CPH sinó que determinen la diferenciació cap a hepatòcits o colangiòcits (Espanol-Suner et al. 2012; Boulter et al. 2013; Dubuquoy et al. 2015; Lanthier et al. 2015).

Un punt a tenir en compte és que tot i que hem observat una important expansió de CPH no significa una millora en la funció hepàtica, ja que els pacients amb major taxa de mortalitat presenten una expressió de KRT7 molt elevada i la presència d'un major nombre de cèl·lules KRT7 positives amb un fenotip hepatobiliar immadur. Aquesta evidència porta a pensar que l'expansió de les CPH tingui un efecte negatiu en la funció hepàtica. Però també pot ser que el fet que hi hagi més cèl·lules KRT7 positives corelaciona amb el fet que el fetge ja està extensivament danyat i per això mostren una alta mortalitat; el fetge es troba davant d'una situació de dany extrem i les CPH només s'expandirien en aquesta situació terminal, en un intent final del fetge per a regenerar.

El fet que mitjançant l'anàlisi immunohistològic haguem observat hepatòcits recentment generats que expressen marcadors de CPH com EpCAM ens porta a pensar que la diferenciació de les CPH a hepatòcits pot no estar bloquejada en l'HA. Aquests hepatòcits vindrien de cèl·lules hepatobiliars intermèdies que deriven de les CPH, i les quals generarien nous hepatòcits a partir d'una població independent als hepatòcits madurs (Yoon et al. 2011). No obstant, el nostre estudi juntament amb estudis posteriors suggereixen que la diferenciació cap a hepatòcits madurs és deficient i inefectiva per a regenerar el fetge en l'HA, i que la majoria de la població EpCAM positiva correspon a cèl·lules immadures petites com són les CPH. Només unes poques cèl·lules EpCAM tenen un fenotip d'hepatòcit immadur. En canvi, la població KRT7 present correspon majoritàriament a una acumulació ineficient de cèl·lules intermèdies que presenten un fenotip biliar (Sancho-Bru et al. 2012; Dubuquoy et al. 2015).

L'observació de la presència d'hepatòcits EpCAM positius en pacients amb HA suggereix que aquestes cèl·lules provenen de CPH. En pacients amb cirrosi, s'ha observat que EpCAM marca petites fileres d'hepatòcits en proliferació recentment generats que poden arribar a constituir prop del 70% d'hepatòcits. Aquests hepatòcits derivarien de colangiòcits distals amb propietats de CPH, ja que en quan hi ha malalties hepàtiques amb dany biliar no es formen aquestes agrupacions hepatocitàries (Stueck et al. 2015). No obstant, a dia d'avui no hi ha tècniques que es puguin aplicar en humans que permetin determinar amb certesa l'origen cel·lular d'una població. Per tant, pot ser que realment aquests hepatòcits tinguin el seu origen en les CPH, però també pot ser que aquestes cèl·lules expressin EpCAM *de novo* com a conseqüència d'una resposta davant d'un dany produït per exemple per alcohol, que fa que hi hagi una alteració en el seu fenotip. Per aquesta raó, es va necessitar realitzar els estudis en animals per a investigar sobre l'origen d'aquests hepatòcits, però sobretot, per avaluar la contribució real de les CPH en situacions de regeneració hepàtica per dany hepàtic crònic a la

generació de nous hepatòcits. Part d'aquesta tesi doctoral s'ha focalitzat en aportar evidències sobre el rol de les CEB en diferents situacions, ja que els primers estudis publicats sobre aquesta qüestió aportaven resultats contradictoris.

Mitjançant el ratolí $Hnf1bCreER/R26R^{Yfp/LacZ}$, ja utilitzat prèviament en estudis de seguiment de llinatge cel·lular en pàncrees (Solar et al. 2009), hem avaluat el paper de les cèl·lules $Hnf1\beta$ i la seva progènie tant en situacions d'homeòstasi cel·lular com en models de regeneració hepàtica per HPx, o en dany hepàtic crònic. $HNF1\beta$ és un gen àmpliament descrit per la seva expressió en les CEB i per aquest motiu és un bon gen candidat per a ser escollit per al marcatge de les CEB i la seva progènie en la tècnica de seguiment de llinatge. Per assegurar-nos que aquest ratolí pot ser de gran utilitat, vam avaluar tant en humans com en ratolins que l'expressió de $HNF1\beta$ es restringís específicament a les CEB i no en altres poblacions cel·lulars. L'elecció d'un marcador (i per tant, del seu promotor) que s'expressi inespecíficament és la principal limitació que es pot donar en els estudis de seguiment de llinatge, ja que poden portar a interpretacions errònies dels resultats si s'expressa en varis tipus cel·lulars. De fet, els resultats contradictoris obtinguts en els primers estudis poden ser explicats per aquest motiu, ja que l'administració de tamoxifè indueix l'expressió ectòpica de $SOX9$ i el seu gen reporter en hepatòcits periportals (Carpentier et al. 2011; Furuyama et al. 2011), d'aquí que s'expliqui el gran nombre d'hepatòcits marcats (Furuyama et al. 2011). Per a OPN s'ha descrit la seva expressió en altres tipus cel·lulars hepàtics com les cèl·lules estrellades, els hepatòcits o en cèl·lules inflammatòries (Uede 2011; Morales-Ibanez et al. 2013; Yanger et al. 2014).

En canvi, $HNF1\beta$ sí que ha estat un marcador idoni per a avaluar la contribució a la generació d'hepatòcits, tot i la ja mencionada limitació que tenen tots els marcadors emprats de marcar no només les CPH sinó també els colangiòcits. Hem vist que tant en humans com en ratolins s'expressa únicament en les CEB i, per primer cop, hem descrit que les cèl·lules de la reacció ductular en pacients amb cirrosi induïda per alcohol també expressen $HNF1\beta$. En canvi, $HNF1\beta$ no s'expressa ni en els hepatòcits madurs ni en els hepatòcits positius per EpCAM. Aquest resultat difereix de l'observat prèviament en fetge adult sa, on s'ha observat la presència d'hepatòcits periportals que expressen $HNF1\beta$ en nivells baixos (Isse et al. 2013). Mitjançant l'anàlisi de l'expressió del gen reporter en els ratolins $Hnf1bCreER/R26R^{Yfp/LacZ}$ tractats amb tamoxifè hem pogut corroborar que en el nostre ratolí només s'expressa en CEB i no en hepatòcits periportals. Aquesta observació demostra que el ratolí emprat en aquesta tesi és una bona eina per a fer seguiment de llinatge de les cèl·lules ductulars.

Gràcies a l'anàlisi histològic de fetges de ratolins on no s'ha induït un dany (situació d'homeòstasi cel·lular), hem aportat evidències que les CEB no generen hepatòcits nous en una situació fisiològica. Aquests resultats confirmen estudis anteriors (Carpentier et al. 2011; Malato et al. 2011; Espanol-Suner et al. 2012) que defensen que els hepatòcits són les cèl·lules encarregades de reemplaçar els hepatòcits danyats i contradiuen el corrent que defensa que les CPH s'encarreguen de la regeneració de nous hepatòcits en l'homeòstasi (Furuyama et al. 2011). Força estudis de seguiment de llinatge s'han realitzat a posteriori del nostre estudi, marcant tant les CEB com els hepatòcits i han arribat a la mateixa conclusió sobre el paper de les CPH en homeòstasi cel·lular; no contribueixen al manteniment de la població hepatocitària (Yanger et al. 2014; Tarlow et al. 2014a; Jors et al. 2015).

En canvi, en les situacions de regeneració hepàtica en models de dany hepàtic crònic hi ha diversitat d'opinions sobre el paper de les CPH entre els diferents estudis de seguiment de llinatge. En el nostre estudi, hem realitzat varis models de dany hepàtic per veure com contribueixen en diferents situacions. Així, hem realitzat tant models de dany agut, com models clàssics de regeneració hepàtica per HPx i models inductors de l'expansió de CPH. Hem observat com les CEB tenen la capacitat de diferenciar-se cap a hepatòcits, però aquesta contribució és mínima i només es dóna en un model de dany hepàtic com és la dieta CDE, suggerint que el tipus de dany determina la diferenciació o no de les CPH cap a hepatòcits. Així, hem demostrat que les CEB donen lloc a CPH i que, tot i que tenen el potencial de diferenciar-se a hepatòcits, només es diferencien en unes condicions de dany específiques i contribuint en un percentatge baix. Per tant, les cèl·lules responsables de la generació d'hepatòcits tant en homeòstasi com en models de dany hepàtic crònic són els propis hepatòcits. En resum, el nostre estudi ha permès aclarir la controvèrsia sobre la contribució real de les CEB gràcies a un ratolí de seguiment de llinatge específic per a aquestes cèl·lules.

Com hem dit, hem aportat evidències que les CPH tenen capacitat de generar hepatòcits, però només en certes condicions de dany. A posteriori, alguns estudis han corroborat aquesta poca contribució de les CPH (Jors et al. 2015; Lu et al. 2015; Shin et al. 2015), fins i tot, els nostres resultats han estat reproduïts per un altre grup emprant el mateix ratolí transgènic i amb els mateixos models analitzats (Jors et al. 2015). No obstant, han aparegut estudis que afirmen que les CPH no contribueixen a hepatòcits sota cap condició i que només els hepatòcits donen lloc a hepatòcits, posant en dubte la presència de les CPH en ratolins adults (Grompe 2014). En algun cas, s'ha suggerit que a part dels hepatòcits les cèl·lules estrellades hepàtiques poden donar lloc a hepatòcits (Yang et al. 2008; Michelotti et

al. 2013; Swiderska-Syn et al. 2014), però recentment ha estat posat en dubte per varis estudis (Mederacke et al. 2013; Schaub et al. 2014). En un d'ells afirmen que el marcador emprat per a fer el seguiment de llinatge on es veu contribució no és específic de les cèl·lules estrellades i que s'expressa també en colangiòcits (Mederacke et al. 2013). El fet important és que tots aquests estudis arriben a la conclusió que les CPH, en els diferents models de dany hepàtic crònic existents, no tenen una participació important en la generació d'hepatòcits.

Les diferències observades quant a contribució mínima o nul·la entre els diferents estudis de llinatge poden ser degudes a varis factors. En primer lloc, l'eficiència de marcatge de la població per acció del tamoxifè no és del 100%. De fet, en el nostre estudi teníem una eficiència del 30%-50% de cèl·lules HNF1 β positives marcades i per tant, hem subestimat el nombre de d'hepatòcits que es poden generar a partir de cèl·lules HNF1 β . No obstant, no creiem que la contribució augmenti significativament. En canvi, en d'altres estudis on no es creu que hi hagi contribució de les CPH, s'han emprat ratolins amb una eficiència baixa del 10% (Schaub et al. 2014), i per tant, s'està obviat una població de CPH i àrees d'hepatòcits derivats d'aquestes cèl·lules molt important, podent portar a conclusions errònies. En segon lloc, i més important encara, és la diversitat de models emprats per a realitzar dany crònic i les variacions que es donen entre els diferents protocols, com la durada del tractament o el percentatge de l'etionina en la dieta CDE. Tot i haver força models de dany hepàtic crònic, sembla que cap inhibeix completament la replicació de tots els hepatòcits i el més important, els danys realitzats potser no són suficients per desencadenar l'activació i diferenciació de les CPH. Cal, per tant, trobar un model on la replicació estigui completament inhibida, com el ratolí descrit recentment on s'indueix apoptosi, necrosi i senescència d'un 98% d'hepatòcits, tot i que no s'ha avaluat encara la contribució de les CPH en aquest model (Lu et al. 2015). En aquest ratolí sí que s'ha observat que CPH transplantades en ells poden contribuir significativament a la restauració del parènquima hepàtic regenerant hepatòcits i colangiòcits. Per aquests autors cal que, a part d'inhibir-se la replicació d'hepatòcits cal que entrin en senescència per a què les CPH es diferenciïn a hepatòcits. En altres animals com en peix zebra, situacions de dany extrem on els hepatòcits són ostensiblement deplecionats perinatalment, les CEB són les encarregades de generar els hepatòcits en embrió i pressuposen que també succeeix en adult (Choi et al. 2014; He et al. 2014). Per tant, futurs estudis s'han de realitzar amb un ratolí transgènic que tingui una eficiència de marcatge propera al 100% i trobar un bon model on es confirmi la inhibició pràcticament total de la replicació hepatòcits per a determinar el grau concret de contribució de les CPH.

En humans, tot i no disposar d'eines genètiques per a saber l'origen d'una població cel·lular, alguns autors creuen que la contribució que tenen les CPH a la generació d'hepatòcits en patologies com la cirrosi és força elevada. Varis estudis creuen que són les encarregades de generar més del 50% del parènquima hepatocitari al presentar els hepatòcits característiques/expressió de marcadors propis de CPH (Yoon et al. 2011; Stueck et al. 2015). Nosaltres, en el context de l'HA no creiem que sigui tant elevada, fet que torna a fer pensar que el grau i el tipus de dany, però també el microambient (nínxol) en el qual s'activen les CPH influeixen en el percentatge de CPH diferenciades.

El fet que observem tals diferències en la contribució entre la patologia humana i els models animals es pot explicar pel fet que en les patologies cròniques humanes el dany es dona durant un període de temps molt llarg (anys), i es caracteritza per un arrest hepatocitari elevat i un dany i una inflamació contínua. Aquests motius podrien explicar la major contribució en humans. Cal, per tant, a part de trobar un ambient que afavoreixi la diferenciació de les CPH, models que reproduïxin la patologia humana. Actualment, els models animals tenen una durada de temps menor i els danys que es donen no reproduïxen totes les característiques patofisiològiques que observem en humans amb HA, només representen una fracció del tipus de dany que es pot donar en un humà al llarg de la patologia. A més, les formes de dany més comunes en humans no s'han reproduït en ratolí, com l'HA o la toxicitat crònica que porta a cirrosi (Stanger 2015).

La controvèrsia generada sobre el paper de les CPH ens ha portat a pensar els motius pels quals en els dos models d'inducció de les CPH hi ha diferències en la contribució per part de les CPH a formar nous hepatòcits. Per aquest motiu, hem aprofundit en el coneixement sobre possibles mecanismes i vies que poden influenciar en la diferenciació de les CPH gràcies a la realització del primer perfil transcriptòmic que compara les cèl·lules CPH aïllades d'aquests models. L'anàlisi transcriptòmic de les cèl·lules YFP⁺ aïllades ens ha confirmat que aquestes cèl·lules presenten un enriquiment de marcadors de CPH, però també de gens associats a colangiòcits i a hepatòcits, suggerint que tenen un fenotip hepatobiliar i que tant la dieta CDE com la dieta DDC indueixen l'expansió de CPH. L'anàlisi funcional ha mostrat que en les cèl·lules obtingudes de la dieta DDC hi ha un enriquiment de gens relacionats amb la resposta a l'estrés, el manteniment de la telomerasa i sobretot, la resposta inflamatòria; són vies que poden estar prevenint les cèl·lules HNF1 β positives de diferenciar-se a hepatòcits i, per tant, cal ser estudiades.

La realització d'aquest anàlisi del perfil de l'expressió gènica de les cèl·lules CPH ha obert qüestions que s'estan avaluant i que poden ser rellevants per a desenvolupar noves estratègies terapèutiques que estimulin l'expansió de les CPH i la seva diferenciació. En primer lloc, hem vist que la dieta DDC pot ser un bon model per a reproduir la RD que s'observa en HA, ja que hem vist com les cèl·lules de la RD obtingudes d'aquest model són les que presenten un major nombre de gens en comú amb les cèl·lules de la RD de pacients amb HA. En segon lloc, estem analitzant l'efecte que té que les cèl·lules CPH presentin un perfil inflamatori sobre el dany i la seva diferenciació. En vàries malalties hepàtiques, ja hem dit que la inflamació correlaciona amb el grau de RD. Tant en les cèl·lules CPH aïllades de la dieta DDC com les obtingudes a partir de pacients amb HA, no només presenten l'expressió de quimiocines proinflamàtòries com s'ha descrit prèviament en humans (O'Hara et al. 2013), sinó també l'expressió de quimiocines descrites per al seu paper en el reclutament de poblacions inflamatòries, en especial de neutròfils. A remarcar que en l'HA, estudis previs del nostre laboratori mostraven que els pacients amb HA presentaven una sobre-regulació de quimiocines de la família CXC, però no s'havia suggerit les CPH com a productores d'aquestes quimiocines quimioattractants (Dominguez et al. 2009). Aquesta nova observació obre qüestions sobre l'efecte que tenen les CPH en la progressió del dany al reclutar cèl·lules inflamatòries, però també quin efecte poden tenir els neutròfils reclutats en la diferenciació de les CPH cap a hepatòcits. Ja s'ha descrit que altres poblacions cel·lulars presents en el fetge com els macròfags o els miofibroblasts juguen un paper en la seva diferenciació cap a hepatòcits o colangiòcits, respectivament. En canvi, sobre l'efecte dels neutròfils, principal cèl·lula inflamatòria reclutada en l'HA i de la qual no es té clar si juguen un paper favorable o desfavorable en la resolució del dany i la inflamació, no s'han presentat estudis que els involucrin en l'expansió i la diferenciació de les CPH.

En resum, les cèl·lules progenitores hepàtiques són presents en l'hepatitis alcohòlica i tenen la capacitat de diferenciar-se a hepatòcits *in vivo* durant la regeneració hepàtica, tot i que de forma mínima i només en certes condicions de dany. L'estudi del nínxol hepàtic on s'expandeixen les CPH permetrà la identificació de vies de senyalització, factors i tipus cel·lulars que influeixen en la diferenciació de les CPH, i obre noves vies per a entendre els mecanismes que governen la seva diferenciació. El disseny d'estratègies per a afavorir una major diferenciació de les cèl·lules progenitores hepàtiques en situacions de dany hepàtic crònic extens és necessari per a induir una regeneració efectiva del fetge. A la pràctica, pot representar que les cèl·lules progenitores hepàtiques puguin ser considerades com a candidates diana per a la teràpia regenerativa.

CONCLUSIONS

D'acord amb els resultats obtinguts en els diferents estudis que conformen aquesta tesi doctoral, les principals conclusions que es poden extreure són les següents:

1. L'hepatitis alcohòlica es caracteritza per la presència de cèl·lules progenitores hepàtiques i l'expansió de la reacció ductular.
2. Una major expressió de marcadors de les cèl·lules progenitores hepàtiques s'associa amb un major grau i severitat de la malaltia en pacients amb hepatitis alcohòlica.
3. L'expressió dels marcadors de les cèl·lules progenitores hepàtiques són bons marcadors predictors de la mortalitat a curt termini dels pacients amb hepatitis alcohòlica i permet classificar els pacients en subpoblacions amb diferent prognosi.
4. Les cèl·lules de l'epiteli biliar expressen HNF1 β i són l'origen de les cèl·lules progenitores hepàtiques presents en la reacció ductular de pacients cirròtics per alcohol i en models experimentals de dany hepàtic.
5. Les cèl·lules de l'epiteli biliar HNF1 β positives no contribueixen al reemplaçament hepatocitari en una situació fisiològica d'homeòstasi cel·lular, ni en models de dany hepàtic agut ni en la regeneració hepàtica clàssica després d'una hepatectomia parcial.
6. Les cèl·lules HNF1 β positives tenen la capacitat de diferenciar-se a hepatòcits però la seva contribució és mínima i només en certs tipus de dany hepàtic crònic.
7. El mecanisme principal de generació de nous hepatòcits en un fetge sa i en un fetge danyat crònicament són els propis hepatòcits existents.
8. El tipus de dany hepàtic determina un perfil d'expressió gènica diferent en les cèl·lules progenitores hepàtiques que provoca una diferent contribució a la generació d'hepatòcits davant la regeneració hepàtica.
9. Les cèl·lules de la reacció ductular humana, i de models experimentals on no hi ha diferenciació de cèl·lules progenitores hepàtiques a hepatòcits presenten un perfil inflamatori.

BIBLIOGRAFIA

- Affo, S., et al. (2013). "Transcriptome analysis identifies TNF superfamily receptors as potential therapeutic targets in alcoholic hepatitis." *Gut* **62**(3): 452-60.
- Affo, S., et al. (2014). "CCL20 mediates lipopolysaccharide induced liver injury and is a potential driver of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis." *Gut* **63**(11): 1782-92.
- Akasaka, J., et al. (2013). "Hepatocyte nuclear factor (HNF)-1beta and its physiological importance in endometriosis." *Biomed Rep* **1**(1): 13-17.
- Akhurst, B., et al. (2001). "A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver." *Hepatology* **34**(3): 519-22.
- Akhurst, B., et al. (2005). "Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury." *Hepatology* **41**(2): 327-35.
- Alison, M. R., et al. (1996). "Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells." *Gastroenterology* **110**(4): 1182-90.
- Alison, M. R., et al. (2009). "Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly." *J Pathol* **217**(2): 282-98.
- Altamirano, J. and R. Bataller (2011). "Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**(9): 491-501.
- Altamirano, J., et al. (2014). "A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis." *Gastroenterology* **146**(5): 1231-9 e1-6.
- Azuma, H., et al. (2003). "Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver." *Hepatology* **37**(6): 1385-94.
- Azuma, H., et al. (2007). "Robust expansion of human hepatocytes in Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} mice." *Nat Biotechnol* **25**(8): 903-10.
- Barbacci, E., et al. (1999). "Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification." *Development* **126**(21): 4795-805.
- Baumann, U., et al. (1999). "Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell?" *Hepatology* **30**(1): 112-7.
- Behari, J., et al. (2010). "Liver-specific beta-catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis." *Am J Pathol* **176**(2): 744-53.
- Benhamouche, S., et al. (2010). "Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver." *Genes Dev* **24**(16): 1718-30.
- Bertola, A., et al. (2013). "Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)." *Nat Protoc* **8**(3): 627-37.
- Best, J., et al. (2015). "Role of liver progenitors in liver regeneration." *Hepatobiliary Surg Nutr* **4**(1): 48-58.
- Bird, T. G., et al. (2008). "Activation of stem cells in hepatic diseases." *Cell Tissue Res* **331**(1): 283-300.
- Bird, T. G., et al. (2013). "Bone marrow injection stimulates hepatic ductular reactions in the absence of injury via macrophage-mediated TWEAK signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(16): 6542-7.
- Bisgaard, H. C., et al. (1999). "Modulation of the gene network connected to interferon-gamma in liver regeneration from oval cells." *Am J Pathol* **155**(4): 1075-85.
- Bisgaard, H. C., et al. (1996). "Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens." *Hepatology* **23**(1): 62-70.
- Bort, R., et al. (2006). "Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development." *Dev Biol* **290**(1): 44-56.
- Boulter, L., et al. (2013). "Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice." *J Clin Invest* **123**(5): 1867-73.

- Bralet, M. P., et al. (1994). "Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver." Am J Pathol **144**(5): 896-905.
- Brooling, J. T., et al. (2005). "Differential regulation of rodent hepatocyte and oval cell proliferation by interferon gamma." Hepatology **41**(4): 906-15.
- Bucher, N. L. and M. N. Swaffield (1964). "THE RATE OF INCORPORATION OF LABELED THYMIDINE INTO THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID OF REGENERATING RAT LIVER IN RELATION TO THE AMOUNT OF LIVER EXCISED." Cancer Res **24**: 1611-25.
- Cantz, T., et al. (2008). "Stem cells in liver regeneration and therapy." Cell Tissue Res **331**(1): 271-82.
- Cardinale, V., et al. (2011). "Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets." Hepatology **54**(6): 2159-72.
- Carotti, S., et al. (2015). "Portal inflammation during NAFLD is frequent and associated with the early phases of putative hepatic progenitor cell activation." J Clin Pathol.
- Carpentier, R., et al. (2011). "Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells." Gastroenterology **141**(4): 1432-8, 1438 e1-4.
- Cerec, V., et al. (2007). "Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor." Hepatology **45**(4): 957-67.
- Clotman, F., et al. (2002). "The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract." Development **129**(8): 1819-28.
- Clouston, A. D., et al. (2005). "Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis." Hepatology **41**(4): 809-18.
- Coffinier, C., et al. (2002). "Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta." Development **129**(8): 1829-38.
- Coffinier, C., et al. (1999). "Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation." Development **126**(21): 4785-94.
- Coleman, W. B., et al. (1997). "Evaluation of the differentiation potential of WB-F344 rat liver epithelial stem-like cells in vivo. Differentiation to hepatocytes after transplantation into dipeptidylpeptidase-IV-deficient rat liver." Am J Pathol **151**(2): 353-9.
- Colmenero, J., et al. (2007). "Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity." Gastroenterology **132**(2): 687-97.
- Coombes, J. D., et al. (2015). "Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice." Gut **64**(7): 1120-31.
- Crawford, J. M. (2002). "Development of the intrahepatic biliary tree." Semin Liver Dis **22**(3): 213-26.
- Crosby, H. A., et al. (1998). "Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6." Am J Pathol **152**(3): 771-9.
- Choi, T. Y., et al. (2014). "Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish." Gastroenterology **146**(3): 776-88.
- Dabeva, M. D., et al. (1997). "Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7356-61.
- Dabeva, M. D., et al. (2000). "Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver." Am J Pathol **156**(6): 2017-31.
- Darwiche, H. and B. E. Petersen (2010). "Biology of the adult hepatic progenitor cell: "ghosts in the machine"." Prog Mol Biol Transl Sci **97**: 229-49.
- De Vas, M. G., et al. (2015). "Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors." Development **142**(5): 871-82.
- Dechene, A., et al. (2010). "Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation." Hepatology **52**(3): 1008-16.

- Delladetsima, J., et al. (2010). "Hepatic progenitor cells in chronic hepatitis C: a phenomenon of older age and advanced liver disease." *Virchows Arch* **457**(4): 457-66.
- Dhawan, A., et al. (2004). "Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency." *Transplantation* **78**(12): 1812-4.
- Dolle, L., et al. (2012). "Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity in naive mice." *Hepatology* **55**(2): 540-52.
- Dolle, L., et al. (2010). "The quest for liver progenitor cells: a practical point of view." *J Hepatol* **52**(1): 117-29.
- Dominguez, M., et al. (2009). "Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis." *Gastroenterology* **136**(5): 1639-50.
- Dorrell, C., et al. (2011). "Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice." *Genes Dev* **25**(11): 1193-203.
- Dorrell, C. and M. Grompe (2005). "Liver repair by intra- and extrahepatic progenitors." *Stem Cell Rev* **1**(1): 61-4.
- Dubuquoy, L., et al. (2015). "Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis." *Gut*.
- Duncan, A. W., et al. (2009). "Stem cells and liver regeneration." *Gastroenterology* **137**(2): 466-81.
- Edghill, E. L., et al. (2006). "Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes." *J Med Genet* **43**(1): 84-90.
- Elsegood, C. L., et al. (2015). "Kupffer cell-monocyte communication is essential for initiating murine liver progenitor cell-mediated liver regeneration." *Hepatology* **62**(4): 1272-84.
- Erker, L. and M. Grompe (2007). "Signaling networks in hepatic oval cell activation." *Stem Cell Res* **1**(2): 90-102.
- Espanol-Suner, R., et al. (2012). "Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice." *Gastroenterology* **143**(6): 1564-1575 e7.
- Evarts, R. P., et al. (1996). "Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes: comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers." *Carcinogenesis* **17**(10): 2143-51.
- Evarts, R. P., et al. (1987). "A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver." *Carcinogenesis* **8**(11): 1737-40.
- Evarts, R. P., et al. (1989). "In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes." *Cancer Res* **49**(6): 1541-7.
- Fabris, L., et al. (2007). "Analysis of liver repair mechanisms in Alagille syndrome and biliary atresia reveals a role for notch signaling." *Am J Pathol* **171**(2): 641-53.
- Factor, V. M., et al. (1994). "Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse." *Am J Pathol* **145**(2): 409-22.
- Falkowski, O., et al. (2003). "Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells." *J Hepatol* **39**(3): 357-64.
- Farber, E. (1956). "Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene." *Cancer Res* **16**(2): 142-8.
- Faris, R. A. and D. C. Hixson (1989). "Selective proliferation of chemically altered rat liver epithelial cells following hepatic transplantation." *Transplantation* **48**(1): 87-92.
- Fausto, N. (2004). "Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells." *Hepatology* **39**(6): 1477-87.
- Fausto, N., et al. (2006). "Liver regeneration." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S45-53.
- Fellous, T. G., et al. (2009). "Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver." *Hepatology* **49**(5): 1655-63.

- Feng, D., et al. (2012). "Interleukin-22 promotes proliferation of liver stem/progenitor cells in mice and patients with chronic hepatitis B virus infection." Gastroenterology **143**(1): 188-98 e7.
- Fickert, P., et al. (2007). "A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis." Am J Pathol **171**(2): 525-36.
- Fleig, S. V., et al. (2007). "Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice." Lab Invest **87**(12): 1227-39.
- Font-Burgada, J., et al. (2015). "Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer." Cell **162**(4): 766-79.
- Fotiadu, A., et al. (2004). "Progenitor cell activation in chronic viral hepatitis." Liver Int **24**(3): 268-74.
- Fougere-Deschatrette, C., et al. (2006). "Plasticity of hepatic cell differentiation: bipotential adult mouse liver clonal cell lines competent to differentiate in vitro and in vivo." Stem Cells **24**(9): 2098-109.
- Fox, I. J., et al. (1998). "Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation." N Engl J Med **338**(20): 1422-6.
- Fuchs, E., et al. (2004). "Socializing with the neighbors: stem cells and their niche." Cell **116**(6): 769-78.
- Fujio, K., et al. (1994). "Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat." Lab Invest **70**(4): 511-6.
- Furuyama, K., et al. (2011). "Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine." Nat Genet **43**(1): 34-41.
- Gadd, V. L., et al. (2014). "The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **59**(4): 1393-405.
- Gao, B. and R. Bataller (2011a). "Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets." Gastroenterology **141**(5): 1572-85.
- Gao, B., et al. (2011b). "Innate immunity in alcoholic liver disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(4): G516-25.
- Gaudio, E., et al. (2009). "New insights into liver stem cells." Dig Liver Dis **41**(7): 455-62.
- Gehart, H. and H. Clevers (2015). "Repairing organs: lessons from intestine and liver." Trends Genet **31**(6): 344-51.
- Gerber, M. A., et al. (1983). "Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver." Am J Pathol **110**(1): 70-4.
- Golding, M., et al. (1996). "Reactive biliary epithelium: the product of a pluripotential stem cell compartment?" Hum Pathol **27**(9): 872-84.
- Gordillo, M., et al. (2015). "Orchestrating liver development." Development **142**(12): 2094-108.
- Greenbaum, L. E. (2011b). "The ductal plate: a source of progenitors and hepatocytes in the adult liver." Gastroenterology **141**(4): 1152-5.
- Greenbaum, L. E. and R. G. Wells (2011a). "The role of stem cells in liver repair and fibrosis." Int J Biochem Cell Biol **43**(2): 222-9.
- Gripon, P., et al. (2002). "Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15655-60.
- Grompe, M. (2009). Adult Liver Stem Cells. Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition): 285-298.
- Grompe, M. (2014). "Liver stem cells, where art thou?" Cell Stem Cell **15**(3): 257-8.
- Hanada, S., et al. (2008). "The genetic background modulates susceptibility to mouse liver Mallory-Denk body formation and liver injury." Hepatology **48**(3): 943-52.
- Hao, P. P., et al. (2013). "Isolation of EpCAM(+)/CD133 (-) hepatic progenitor cells." Mol Cells **36**(5): 424-31.

- Hatch, H. M., et al. (2002). "SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats." Cloning Stem Cells **4**(4): 339-51.
- He, J., et al. (2014). "Regeneration of liver after extreme hepatocyte loss occurs mainly via biliary transdifferentiation in zebrafish." Gastroenterology **146**(3): 789-800 e8.
- He, Z. P., et al. (2003). "Differentiation of putative hepatic stem cells derived from adult rats into mature hepatocytes in the presence of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor." Differentiation **71**(4-5): 281-90.
- Herrera, M. B., et al. (2006). "Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver." Stem Cells **24**(12): 2840-50.
- Higgins, G. M. and J. B. Anderson (1931). "Experimental pathology of the liver, 1: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal." Arch Pathol **12**: 186-202.
- Horslen, S. P., et al. (2003). "Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder." Pediatrics **111**(6 Pt 1): 1262-7.
- Hsieh, W. C., et al. (2015). "Galectin-3 regulates hepatic progenitor cell expansion during liver injury." Gut **64**(2): 312-21.
- Huang, M., et al. (2014). "Antagonistic interaction between Wnt and Notch activity modulates the regenerative capacity of a zebrafish fibrotic liver model." Hepatology **60**(5): 1753-66.
- Huch, M., et al. (2013). "In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration." Nature **494**(7436): 247-50.
- Huch, M., et al. (2015). "Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver." Cell **160**(1-2): 299-312.
- Imai, T., et al. (1996). "Expression of hepatocyte growth factor and c-met mRNAs during rat chemically induced hepatocarcinogenesis." Carcinogenesis **17**(1): 19-24.
- Ishikawa, T., et al. (2012). "Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice." Hepatology **55**(4): 1215-26.
- Isse, K., et al. (2013). "Preexisting epithelial diversity in normal human livers: a tissue-tethered cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells." Hepatology **57**(4): 1632-43.
- Itoh, T. and A. Miyajima (2014). "Liver regeneration by stem/progenitor cells." Hepatology **59**(4): 1617-26.
- Iverson, S. V., et al. (2011). "Contributions of new hepatocyte lineages to liver growth, maintenance, and regeneration in mice." Hepatology **54**(2): 655-63.
- Jakubowski, A., et al. (2005). "TWEAK induces liver progenitor cell proliferation." J Clin Invest **115**(9): 2330-40.
- Jeliazkova, P., et al. (2013). "Canonical Notch2 signaling determines biliary cell fates of embryonic hepatoblasts and adult hepatocytes independent of Hes1." Hepatology **57**(6): 2469-79.
- Jelnes, P., et al. (2007). "Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration." Hepatology **45**(6): 1462-70.
- Jensen, C. H., et al. (2004). "Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1." Am J Pathol **164**(4): 1347-59.
- Jors, S., et al. (2015). "Lineage fate of ductular reactions in liver injury and carcinogenesis." J Clin Invest **125**(6): 2445-57.
- Jung, Y., et al. (2008). "Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans." Gastroenterology **134**(5): 1532-43.
- Kallis, Y. N., et al. (2011). "Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response." Gut **60**(4): 525-33.
- Kamiya, A., et al. (2009). "Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice." Gastroenterology **137**(3): 1114-26, 1126 e1-14.

- Kang, L. I., et al. (2012). "Signals and cells involved in regulating liver regeneration." Cells **1**(4): 1261-92.
- Kato, N. and T. Motoyama (2009). "Hepatocyte nuclear factor-1beta(HNF-1beta) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis." Histol Histopathol **24**(11): 1479-86.
- Katoonizadeh, A., et al. (2010). "Early features of acute-on-chronic alcoholic liver failure: a prospective cohort study." Gut **59**(11): 1561-9.
- Katoonizadeh, A., et al. (2006). "Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study." Liver Int **26**(10): 1225-33.
- Kaur, S., et al. (2015). "Hepatic Progenitor Cells in Action: Liver Regeneration or Fibrosis?" Am J Pathol **185**(9): 2342-50.
- Kawada, N., et al. (1992). "Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells." Biochem J **285 (Pt 2)**: 367-71.
- Kawaguchi, Y. (2013). "Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors." J Clin Invest **123**(5): 1881-6.
- Kinosita, R. (1937). "Studies on the cancerogenic chemical substances." Transactions of the Japanese Society for Pathology **27**: 665-727.
- Kirillova, I., et al. (1999). "Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation." Cell Growth Differ **10**(12): 819-28.
- Kitade, M., et al. (2013). "Specific fate decisions in adult hepatic progenitor cells driven by MET and EGFR signaling." Genes Dev **27**(15): 1706-17.
- Knight, B., et al. (2007a). "Attenuated liver progenitor (oval) cell and fibrogenic responses to the choline deficient, ethionine supplemented diet in the BALB/c inbred strain of mice." J Hepatol **46**(1): 134-41.
- Knight, B., et al. (2007b). "Interferon-gamma exacerbates liver damage, the hepatic progenitor cell response and fibrosis in a mouse model of chronic liver injury." J Hepatol **47**(6): 826-33.
- Knight, B., et al. (2005a). "Liver inflammation and cytokine production, but not acute phase protein synthesis, accompany the adult liver progenitor (oval) cell response to chronic liver injury." Immunol Cell Biol **83**(4): 364-74.
- Knight, B., et al. (2005b). "Inhibition of adult liver progenitor (oval) cell growth and viability by an agonist of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) family member gamma, but not alpha or delta." Carcinogenesis **26**(10): 1782-92.
- Knight, B., et al. (2000). "Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice." J Exp Med **192**(12): 1809-18.
- Kofman, A. V., et al. (2005). "Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury." Hepatology **41**(6): 1252-61.
- Kordes, C., et al. (2014). "Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration." J Clin Invest **124**(12): 5503-15.
- Kotalova, R., et al. (2015). "Hepatic phenotypes of HNF1B gene mutations: a case of neonatal cholestasis requiring portoenterostomy and literature review." World J Gastroenterol **21**(8): 2550-7.
- Kruitwagen, H. S., et al. (2014). "Hepatic progenitor cells in canine and feline medicine: potential for regenerative strategies." BMC Vet Res **10**: 137.
- Kubota, H. and L. M. Reid (2000). "Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12132-7.
- Kuwahara, R., et al. (2008). "The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay." Hepatology **47**(6): 1994-2002.
- Laconi, E., et al. (1998). "Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine." Am J Pathol **153**(1): 319-29.

- Lanthier, N., et al. (2015). "Hepatic cell proliferation plays a pivotal role in the prognosis of alcoholic hepatitis." *J Hepatol* **63**(3): 609-21.
- Lanzoni, G., et al. (2013). "Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas." *Stem Cells* **31**(10): 2047-60.
- Lazaro, C. A., et al. (1998). "Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture." *Cancer Res* **58**(23): 5514-22.
- Lemaigre, F. P. (2003). "Development of the biliary tract." *Mech Dev* **120**(1): 81-7.
- Lemaigre, F. P. (2009). "Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies." *Gastroenterology* **137**(1): 62-79.
- Lemaigre, F. P. (2010). "Molecular mechanisms of biliary development." *Prog Mol Biol Transl Sci* **97**: 103-26.
- Lemaigre, F. P. (2015). "Determining the fate of hepatic cells by lineage tracing: facts and pitfalls." *Hepatology* **61**(6): 2100-3.
- Lemire, J. M., et al. (1991). "Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine." *Am J Pathol* **139**(3): 535-52.
- Lemmers, A., et al. (2009). "The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease." *Hepatology* **49**(2): 646-57.
- Li, W. L., et al. (2006). "Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse." *Stem Cells* **24**(2): 322-32.
- Libbrecht, L., et al. (2000a). "The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells." *J Hepatol* **33**(1): 76-84.
- Libbrecht, L., et al. (2000b). "Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate?" *J Pathol* **192**(3): 373-8.
- Libbrecht, L. and T. Roskams (2002). "Hepatic progenitor cells in human liver diseases." *Semin Cell Dev Biol* **13**(6): 389-96.
- Lim, R., et al. (2006). "Antiproliferative effects of interferon alpha on hepatic progenitor cells in vitro and in vivo." *Hepatology* **43**(5): 1074-83.
- Limaye, P. B., et al. (2010). "Expression of hepatocytic- and biliary-specific transcription factors in regenerating bile ducts during hepatocyte-to-biliary epithelial cell transdifferentiation." *Comp Hepatol* **9**: 9.
- Lin, W. R., et al. (2010). "The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis." *Hepatology* **51**(3): 1017-26.
- Lokmane, L., et al. (2008). "Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification." *Development* **135**(16): 2777-86.
- Lorenzini, S., et al. (2010). "Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver." *Gut* **59**(5): 645-54.
- Lowes, K. N., et al. (1999). "Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity." *Am J Pathol* **154**(2): 537-41.
- Lowes, K. N., et al. (2003). "Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors." *J Gastroenterol Hepatol* **18**(1): 4-12.
- Lu, W. Y., et al. (2015). "Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity." *Nat Cell Biol* **17**(8): 971-83.
- Lucey, M. R., et al. (2009). "Alcoholic hepatitis." *N Engl J Med* **360**(26): 2758-69.
- Magami, Y., et al. (2002). "Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver." *Liver* **22**(5): 419-25.
- Mahieu-Caputo, D., et al. (2004). "Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts." *Hum Gene Ther* **15**(12): 1219-28.
- Malato, Y., et al. (2011). "Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration." *J Clin Invest* **121**(12): 4850-60.
- Margagliotti, S., et al. (2007). "The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration." *Dev Biol* **311**(2): 579-89.

- Matthews, V. B., et al. (2004). "Direct effects of interleukin-6 on liver progenitor oval cells in culture." Wound Repair Regen **12**(6): 650-6.
- Matthews, V. B., et al. (2005). "Oncostatin M induces an acute phase response but does not modulate the growth or maturation-status of liver progenitor (oval) cells in culture." Exp Cell Res **306**(1): 252-63.
- Mederacke, I., et al. (2013). "Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology." Nat Commun **4**: 2823.
- Michalopoulos, G. K. (2007). "Liver regeneration." J Cell Physiol **213**(2): 286-300.
- Michalopoulos, G. K. (2014). "The liver is a peculiar organ when it comes to stem cells." Am J Pathol **184**(5): 1263-7.
- Michalopoulos, G. K., et al. (2005). "Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury." Hepatology **41**(3): 535-44.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-6.
- Michelotti, G. A., et al. (2013). "Smoothed is a master regulator of adult liver repair." J Clin Invest **123**(6): 2380-94.
- Miyajima, A., et al. (2014). "Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming." Cell Stem Cell **14**(5): 561-74.
- Miyaoka, Y., et al. (2012). "Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration." Curr Biol **22**(13): 1166-75.
- Moles, A., et al. (2014). "A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse." J Hepatol **60**(4): 782-91.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-5.
- Morales-Ibanez, O., et al. (2013). "Human and experimental evidence supporting a role for osteopontin in alcoholic hepatitis." Hepatology **58**: 1742-1756.
- Morales-Ibanez, O., et al. (2013). "Human and experimental evidence supporting a role for osteopontin in alcoholic hepatitis." Hepatology **58**(5): 1742-56.
- Mu, X., et al. (2015). "Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment." J Clin Invest **125**(10): 3891-903.
- Muraca, M., et al. (2002). "Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a." Lancet **359**(9303): 317-8.
- Nagai, H., et al. (2002). "Differentiation of liver epithelial (stem-like) cells into hepatocytes induced by coculture with hepatic stellate cells." Biochem Biophys Res Commun **293**(5): 1420-5.
- Nagy, P., et al. (1994). "Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation." J Cell Biol **126**(1): 223-33.
- Nguyen, L. N., et al. (2007). "Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation." Hepatology **45**(1): 31-41.
- Nierhoff, D., et al. (2005). "Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity." Hepatology **42**(1): 130-9.
- Nissim, O., et al. (2012). "Liver regeneration signature in hepatitis B virus (HBV)-associated acute liver failure identified by gene expression profiling." PLoS One **7**(11): e49611.
- Nobili, V., et al. (2012). "Hepatic progenitor cells activation, fibrosis, and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **56**(6): 2142-53.
- O'Hara, S. P., et al. (2013). "The dynamic biliary epithelia: molecules, pathways, and disease." J Hepatol **58**(3): 575-82.
- Ochoa, B., et al. (2010). "Hedgehog signaling is critical for normal liver regeneration after partial hepatectomy in mice." Hepatology **51**(5): 1712-23.
- Ochsner, S. A., et al. (2007). "Transcriptional profiling of bipotential embryonic liver cells to identify liver progenitor cell surface markers." Stem Cells **25**(10): 2476-87.

- Oertel, M., et al. (2008). "Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver." *Gastroenterology* **134**(3): 823-32.
- Okabe, M., et al. (2009). "Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver." *Development* **136**(11): 1951-60.
- Okaya, A., et al. (2005). "Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes." *Am J Pathol* **166**(3): 709-19.
- Omori, N., et al. (1996). "Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor during liver regeneration in the adult rat." *Lab Invest* **75**(1): 15-24.
- Overturf, K., et al. (1999). "The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion." *Am J Pathol* **155**(6): 2135-43.
- Overturf, K., et al. (1997). "Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes." *Am J Pathol* **151**(5): 1273-80.
- Paku, S., et al. (2001). "Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver." *Am J Pathol* **158**(4): 1313-23.
- Petersen, B. E., et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." *Science* **284**(5417): 1168-70.
- Petersen, B. E., et al. (2003). "Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers." *Hepatology* **37**(3): 632-40.
- Pi, L., et al. (2015a). "A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motif 7: a new protease for connective tissue growth factor in hepatic progenitor/oval cell niche." *Am J Pathol* **185**(6): 1552-63.
- Pi, L., et al. (2015b). "Connective tissue growth factor and integrin alphavbeta6: a new pair of regulators critical for ductular reaction and biliary fibrosis in mice." *Hepatology* **61**(2): 678-91.
- Pintilie, D. G., et al. (2010). "Hepatic stellate cells' involvement in progenitor-mediated liver regeneration." *Lab Invest* **90**(8): 1199-208.
- Preisegger, K. H., et al. (1999). "Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease." *Lab Invest* **79**(2): 103-9.
- Quante, M. and T. C. Wang (2009). "Stem cells in gastroenterology and hepatology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**(12): 724-37.
- Rabes, H. M. (1977). "Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver." *Ciba Found Symp*(55): 31-53.
- Rastogi, A., et al. (2011). "Liver histology as predictor of outcome in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF)." *Virchows Arch* **459**(2): 121-7.
- Raynaud, P., et al. (2011). "A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis." *Hepatology* **53**(6): 1959-66.
- Rhim, J. A., et al. (1994). "Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation." *Science* **263**(5150): 1149-52.
- Richardson, M. M., et al. (2007). "Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction." *Gastroenterology* **133**(1): 80-90.
- Rodrigo-Torres, D., et al. (2014). "The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells." *Hepatology* **60**(4): 1367-77.
- Roelandt, P., et al. (2012). "HNF1B deficiency causes ciliary defects in human cholangiocytes." *Hepatology* **56**(3): 1178-81.
- Roskams, T., et al. (1998). "Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man." *J Hepatol* **29**(3): 455-63.
- Roskams, T., et al. (2003). "Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease." *Am J Pathol* **163**(4): 1301-11.
- Roskams, T. A., et al. (2003). "Progenitor cells in diseased human liver." *Semin Liver Dis* **23**(4): 385-96.

- Roskams, T. A., et al. (2004). "Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers." *Hepatology* **39**(6): 1739-45.
- Rountree, C. B., et al. (2007). "A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential." *Stem Cells* **25**(10): 2419-29.
- Ruddell, R. G., et al. (2009). "Lymphotoxin-beta receptor signaling regulates hepatic stellate cell function and wound healing in a murine model of chronic liver injury." *Hepatology* **49**(1): 227-39.
- Sackett, S. D., et al. (2009). "Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice." *Hepatology* **49**(3): 920-9.
- Sahin, M. B., et al. (2008). "Isolation and characterization of a novel population of progenitor cells from unmanipulated rat liver." *Liver Transpl* **14**(3): 333-45.
- Sancho-Bru, P., et al. (2012). "Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis." *Hepatology* **55**(6): 1931-41.
- Sancho-Bru, P., et al. (2007). "Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury." *Gastroenterology* **133**(6): 2019-28.
- Sancho-Bru, P., et al. (2009). "Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside?" *Gut* **58**(4): 594-603.
- Sandhu, J. S., et al. (2001). "Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells." *Am J Pathol* **159**(4): 1323-34.
- Santoni-Rugiu, E., et al. (2005). "Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion." *APMIS* **113**(11-12): 876-902.
- Saxena, R. and N. Theise (2004). "Canals of Hering: recent insights and current knowledge." *Semin Liver Dis* **24**(1): 43-8.
- Schaub, J. R., et al. (2014). "Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury." *Cell Rep* **8**(4): 933-9.
- Schmelzer, E., et al. (2006). "The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors." *Stem Cells* **24**(8): 1852-8.
- Schmelzer, E., et al. (2007). "Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors." *J Exp Med* **204**(8): 1973-87.
- Sekiya, S. and A. Suzuki (2014). "Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver." *Am J Pathol* **184**(5): 1468-78.
- Sell, S. (2001). "Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells." *Hepatology* **33**(3): 738-50.
- Senkel, S., et al. (2005). "Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line." *Biochim Biophys Acta* **1731**(3): 179-90.
- Shin, S., et al. (2015). "Ablation of Foxl1-Cre-labeled hepatic progenitor cells and their descendants impairs recovery of mice from liver injury." *Gastroenterology* **148**(1): 192-202 e3.
- Shin, S., et al. (2011). "Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential." *Genes Dev* **25**(11): 1185-92.
- Shiota, G., et al. (2000). "In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats." *FEBS Lett* **470**(3): 325-30.
- Sicklick, J. K., et al. (2006). "Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(5): G859-70.
- Smyth, G. K. (2005). "Limma: linear models for microarray data." In *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. Edited by: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W. New York: Springer: 397-420.
- Snippert, H. J. and H. Clevers (2011). "Tracking adult stem cells." *EMBO Rep* **12**(2): 113-22.

- Snykers, S., et al. (2009). "In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art." *Stem Cells* **27**(3): 577-605.
- Solar, M., et al. (2009). "Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth." *Dev Cell* **17**(6): 849-60.
- Soto-Gutierrez, A., et al. (2009). "Stem cells for liver repopulation." *Curr Opin Organ Transplant* **14**(6): 667-73.
- Spee, B., et al. (2010). "Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling." *Gut* **59**(2): 247-57.
- Stanger, B. Z. (2015). "Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver." *Annu Rev Physiol* **77**: 179-200.
- Stephenne, X., et al. (2006). "Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency." *Gastroenterology* **130**(4): 1317-23.
- Strazzabosco, M. and L. Fabris (2012). "Development of the bile ducts: essentials for the clinical hepatologist." *J Hepatol* **56**(5): 1159-70.
- Strazzabosco, M., et al. (2014). "Osteopontin: a new player in regulating hepatic ductular reaction and hepatic progenitor cell responses during chronic liver injury." *Gut* **63**(11): 1693-4.
- Strick-Marchand, H., et al. (2008). "Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration." *J Immunol* **181**(4): 2764-71.
- Strick-Marchand, H., et al. (2004). "Bipotent mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8360-5.
- Strick-Marchand, H. and M. C. Weiss (2002). "Inducible differentiation and morphogenesis of bipotent liver cell lines from wild-type mouse embryos." *Hepatology* **36**(4 Pt 1): 794-804.
- Stueck, A. E. and I. R. Wanless (2015). "Hepatocyte buds derived from progenitor cells repopulate regions of parenchymal extinction in human cirrhosis." *Hepatology* **61**(5): 1696-707.
- Sun, R. and B. Gao (2004). "Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma)." *Gastroenterology* **127**(5): 1525-39.
- Sun, Z. and N. Hopkins (2001). "vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain." *Genes Dev* **15**(23): 3217-29.
- Suzuki, A., et al. (2008). "Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver." *Hepatology* **48**(6): 1964-78.
- Suzuki, A., et al. (2002). "Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver." *J Cell Biol* **156**(1): 173-84.
- Swiderska-Syn, M., et al. (2014). "Myofibroblastic cells function as progenitors to regenerate murine livers after partial hepatectomy." *Gut* **63**(8): 1333-44.
- Takase, H. M., et al. (2013). "FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration." *Genes Dev* **27**(2): 169-81.
- Tan, J., et al. (2002). "Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases." *Liver* **22**(5): 365-73.
- Tanaka, M., et al. (2011). "Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms." *J Biochem* **149**(3): 231-9.
- Tanimizu, N., et al. (2014). "Sry HMG box protein 9-positive (Sox9+) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM-) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration." *J Biol Chem* **289**(11): 7589-98.
- Tanimizu, N., et al. (2004). "Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver." *Gene Expr Patterns* **5**(2): 209-18.

- Tarlow, B. D., et al. (2014a). "Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury." Hepatology **60**(1): 278-89.
- Tarlow, B. D., et al. (2014b). "Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes." Cell Stem Cell **15**(5): 605-18.
- Tatematsu, M., et al. (1984). "Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy." Am J Pathol **114**(3): 418-30.
- Theise, N. D., et al. (2013). "Low hepatocyte repopulation from stem cells: a matter of hepatobiliary linkage not massive production." Gastroenterology **145**(1): 253-4.
- Theise, N. D., et al. (1999). "The canals of Hering and hepatic stem cells in humans." Hepatology **30**(6): 1425-33.
- Thompson, M. D., et al. (2010). "Disparate cellular basis of improved liver repair in beta-catenin-overexpressing mice after long-term exposure to 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine." Am J Pathol **177**(4): 1812-22.
- Thurman, R. G. and F. C. Kauffman (1985). "Sublobular compartmentation of pharmacologic events (SCOPE): metabolic fluxes in periportal and pericentral regions of the liver lobule." Hepatology **5**(1): 144-51.
- Tirnitz-Parker, J. E., et al. (2007). "Isolation, culture and immortalisation of hepatic oval cells from adult mice fed a choline-deficient, ethionine-supplemented diet." Int J Biochem Cell Biol **39**(12): 2226-39.
- Tirnitz-Parker, J. E., et al. (2010). "Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells." Hepatology **52**(1): 291-302.
- Tirnitz-Parker, J. E., et al. (2012). Liver Progenitor Cells, Cancer Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma. Liver Regeneration. Baptista P. (Ed), InTech.
- Tome, S. and M. R. Lucey (2004). "Review article: current management of alcoholic liver disease." Aliment Pharmacol Ther **19**(7): 707-14.
- Tsao, M. S., et al. (1984). "A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells." Exp Cell Res **154**(1): 38-52.
- Turner, R., et al. (2011). "Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology." Hepatology **53**(3): 1035-45.
- Uede, T. (2011). "Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases." Pathol Int **61**(5): 265-80.
- Van Hul, N., et al. (2011). "Kupffer cells influence parenchymal invasion and phenotypic orientation, but not the proliferation, of liver progenitor cells in a murine model of liver injury." Am J Pathol **179**(4): 1839-50.
- Van Hul, N. K., et al. (2009). "Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury." Hepatology **49**(5): 1625-35.
- Vestentoft, P. S. (2014). Adult Hepatic Progenitor Cells. Adult Stem Cell Niches. Wislet-Gendebien S. (Ed.), InTech.
- Vestentoft, P. S., et al. (2013). "Molecular constituents of the extracellular matrix in rat liver mounting a hepatic progenitor cell response for tissue repair." Fibrogenesis Tissue Repair **6**(1): 21.
- Viebahn, C. S., et al. (2010). "Invading macrophages play a major role in the liver progenitor cell response to chronic liver injury." J Hepatol **53**(3): 500-7.
- Wagenaar, G. T., et al. (1993). "Distribution and activity of glutamine synthase and carbamoylphosphate synthase upon enlargement of the liver lobule by repeated partial hepatectomies." J Hepatol **17**(3): 397-407.
- Walkup, M. H. and D. A. Gerber (2006). "Hepatic stem cells: in search of." Stem Cells **24**(8): 1833-40.
- Wang, B., et al. (2015). "Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver." Nature **524**(7564): 180-5.

- Wang, X., et al. (2003). "The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11881-8.
- Wang, X., et al. (2015). "Osteopontin induces ductular reaction contributing to liver fibrosis." Gut **63**(11): 1805-18.
- Wang, Y., et al. (2011). "Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds." Hepatology **53**(1): 293-305.
- Weglarz, T. C., et al. (2000). "Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes." Am J Pathol **157**(6): 1963-74.
- Weng, H. L., et al. (2015). "Two sides of one coin: massive hepatic necrosis and progenitor cell-mediated regeneration in acute liver failure." Front Physiol **6**: 178.
- Weng, H. L., et al. (2013). "IFN-gamma inhibits liver progenitor cell proliferation in HBV-infected patients and in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine diet-fed mice." J Hepatol **59**(4): 738-45.
- Wilson, J. W. and E. H. Leduc (1958). "Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury." J Pathol Bacteriol **76**(2): 441-9.
- Williams, M. J., et al. (2014). "Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion." Gastroenterology **146**(2): 349-56.
- Wood, M. J., et al. (2014). "Ductular reaction in hereditary hemochromatosis: the link between hepatocyte senescence and fibrosis progression." Hepatology **59**(3): 848-57.
- Wu, Z., et al. (2004). "A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays." J. Am. Stat. Assoc **99**: 909-917.
- Yamasaki, H., et al. (2006). "Suppression of C/EBPalpha expression in periportal hepatoblasts may stimulate biliary cell differentiation through increased Hnf6 and Hnf1b expression." Development **133**(21): 4233-43.
- Yamazaki, T., et al. (2012). "Isolation of Hepatic Progenitor Cells From Human Liver With Cirrhosis Secondary to Biliary Atresia Using EpCAM or Thy-1 Markers." Cell Medicine **3**: 121-126.
- Yang, J., et al. (2014). "beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: a Wnt-Wnt situation!" Hepatology **60**(3): 964-76.
- Yang, L., et al. (2008). "Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers." Stem Cells **26**(8): 2104-13.
- Yanger, K., et al. (2014). "Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation." Cell Stem Cell **15**(3): 340-9.
- Yanger, K. and B. Z. Stanger (2011). "Facultative stem cells in liver and pancreas: fact and fancy." Dev Dyn **240**(3): 521-9.
- Yanger, K., et al. (2013). "Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration." Genes Dev **27**(7): 719-24.
- Yasui, O., et al. (1997). "Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver." Hepatology **25**(2): 329-34.
- Yeoh, G. C., et al. (2007). "Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation." Hepatology **45**(2): 486-94.
- Yimlamai, D., et al. (2014). "Hippo pathway activity influences liver cell fate." Cell **157**(6): 1324-38.
- Yoon, S. M., et al. (2011). "Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans." Hepatology **53**(3): 964-73.
- Yovchev, M. I., et al. (2007). "Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver." Hepatology **45**(1): 139-49.
- Yovchev, M. I., et al. (2008). "Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver." Hepatology **47**(2): 636-47.
- Yu, B., et al. (2013). "Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors." Cell Stem Cell **13**(3): 328-40.

- Yu, D. D., et al. (2015). "Overexpression Of Hepatocyte Nuclear Factor-1beta Predicting Poor Prognosis Is Associated With Biliary Phenotype In Patients With Hepatocellular Carcinoma." Sci Rep **5**: 13319.
- Zajicek, G., et al. (1985). "The streaming liver." Liver **5**(6): 293-300.
- Zaret, K. S. (2002). "Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis." Nat Rev Genet **3**(7): 499-512.
- Zaret, K. S. and M. Grompe (2008). "Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas." Science **322**(5907): 1490-4.
- Zhang, L., et al. (2008). "The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration." Hepatology **48**(5): 1598-607.
- Zhou, H., et al. (2007). "Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver." Hepatology **45**(3): 716-24.
- Znoyko, I., et al. (2005). "Expression of oncostatin M and its receptors in normal and cirrhotic human liver." J Hepatol **43**(5): 893-900.
- Zorn, A. M. (2008). "Liver development."

AGRAÏMENTS

No puc tancar aquesta tesi doctoral, un capítol extens i important que ha format part de la meua vida durant els darrers 5 anys, sense els particulars agraïments. Aquesta tesi doctoral ha estat un camí emocionant però difícil, ple de grans d'alegries i felicitat, però també amb algun moment de tristesa i de frustració. Finalment el somni s'ha complert i ja s'acaba. És complicat expressar amb poques línies l'agraïment que sento per a totes aquelles persones que heu aportat els vostres granets de sorra necessaris perquè aquest camí hagi arribat a bon port. Una tesi doctoral no és possible amb el treball i esforç d'una sola persona, és un acúmul de cops de mà, no només de la gent que treballa amb tu dia a dia, sinó d'aquelles persones que amb un sol gest, o amb unes paraules d'ànim en un dia puntual, en un instant clau, t'ajuden a seguir endavant en els moments més difícils i poder assolir la tan desitjada meta, com és acabar la tesi doctoral.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al meu director de tesi, el Pau, per guiar-me en aquest camí durant aquests anys, en els bons però sobretot en els moments dolents, quan un perd l'esperança de tirar tot endavant. Gràcies per ajudar-me a resoldre els dubtes i les centenars de preguntes que m'han sorgit pel cap durant la tesi, per haver-me transmès amb paciència els teus coneixements i per introduir-me en l'apassionant i desconegut món de les cèl·lules progenitores del fetge. No seria just no tenir present al Ramón, la persona que va confiar en mi per a iniciar aquesta etapa en el laboratori. Tot i que s'hagin separat professionalment els nostres camins, agraeixo la teua sinceritat d'aquests anys i tota l'ajuda rebuda quan era necessària i que m'ha obert moltes portes en aquest camp. I sobretot, em quedo amb la teua particular manera de viure i la passió per transmetre la ciència, que m'ha fet estimar el món de la investigació i voler seguir durant uns quants anys més.

També voldria mencionar i agrair al Dr. Joan Caballeria i al Dr. Pere Ginès, per ajudar-me amb la seva saviesa i experiència en el món de les malalties hepàtiques, a entendre des d'una vessant més clínica els estudis que he realitzat aquests anys. El vostre extens coneixement en la matèria m'ha aportat molt i m'ha permès aprendre molt de vosaltres.

No puc oblidar-me de l'experiència tan enriquidora a nivell científic i personal de treballar en un altre país durant una estada força curta. Aquesta estada no hauria estat fructífera sense l'ajuda de la Dra. Lola Reid, que em va mostrar el seu apreci i la seva passió per la ciència, i em va acollir amb els braços oberts a Chapel Hill. Thank you for making my stay such a great experience and for sharing your wide knowledge about liver progenitor cells at any time. I també vull mencionar a la Gemma per ajudar-me tan amable i desinteressadament en el meu

periple a Carolina del Nord abans, durant i després de l'aventura americana, i fer el dia a dia més divertit i entretingut.

I ara tocar parlar de la gent del laboratori, amb qui he viscut el dia a dia, que han vist com anava donant cada un dels passos per assolir aquesta meta. Alguns heu estat des de l'inici compartint aquesta etapa, d'altres la vam iniciar junts però ja no sou en el laboratori, i d'altres us heu incorporat al llarg d'aquests anys a formar part aquesta gran família que hem construït. Gràcies per ser-hi cada dia per ajudar-me amb el què calés, per aportar positivisme i alegria en els moments necessaris. I també per suportar estoicament les esbrincades varies que us he pogut deixar anar, el mal d'humor en els dies que un està enfadat i el pessimisme quan les coses no sortien. Personalment, m'agradaria dedicar-vos unes paraules d'agraïment a tots i a cadascun de vosaltres, i començo per la Karyn i l'Anne, que, tot i estar poc temps pel nostre laboratori, van venir des de terres holandeses i van ser de gran suport no només en la part experimental, sinó m'han permès conèixer una nova cultura i a millorar el meu nivell d'anglès, cosa important en aquest món. Thank you Karyn for being a nice person and thanks for your kindness. També agrair al Jose, por toda la ayuda que me has brindado estos años y por transmitirme la pasión que tienes por aprender nuevas cosas del mundillo del hígado y enseñármelas. Tampoc podia faltar la Valeria, la Vale. Grazie mille por ser como eres y por compartir buenos momentos conmigo tanto dentro como fuera del lab; Ah! Y por enseñarme Italiano!

Evidentment, no podien faltar els meus companys inseparables des de l'inici d'aquest viatge, l'Uri i la Silvia. Vam començar aquest camí tots tres junts i sabeu que des que vau acabar les vostres tesis, el laboratori no ha estat el mateix per mi. Uri, gràcies per oferir-me aquesta espontaneïtat que et caracteritza, per aportar el bon humor i les ganes de fer-me riure amb les teves oriolades, i per totes les vivències compartides que guardaré d'aquests anys i que reviuré allà on continuï treballant. Silvia, qué decir que no sepas, que gracias por todo, por todas nuestras conversaciones larguíisimas sobre ciencia y sobre la vida hasta altas horas de la tarde y que tanto echo de menos. Gracias por todos tus consejos y por ser esa persona que uno necesita a su lado. Y ya sabes, los gossips siempre son importantes, no como enseñarme todas las palabrotas en italiano. I què hauria fet sense la nostra mama dins del laboratori, la Cristina Millán. Cris, tantes hores compartides en les jornades maratonianes en el microscopi, mirant si per fi ens funcionava els anticossos, han estat més que suficients per adonar-me de la gran que persona que ets. No et puc agrair suficient amb aquestes línies tot el què m'has aportat i m'has ajudat: per donar-me els consells adients en el moment just, per saber escoltar totes les històries que t'explico i per aguantar totes les rialles que fem de les teves vivències i

quan et diem que ets una mica iaia; mil gràcies!! I si parlo de la Cris, no em puc oblidar a les companyes de "palique" i de lloquisme, la Delia i la Mar. A ti Delia, per revolucionar, en el sentit positiu, el laboratori desde tu llegada desde tierras murcianas. Gracias por tu locura, por tu simpatía, y por estar allí cuando es necesario. Aunque digas que soy un pitufo gruñón, gracias por las horas compartidas dentro del lab, por las "discusiones" memorables dignas de marido y mujer que hemos vivido, pero sobretudo por los grandes momentos que me has brindado fuera del trabajo. I què dir de tu Mar, l'altre "torre bessona" del laboratori. Gràcies per la teva dolçor, pel teu carinyo, per la teva bondat i per ajudar-me amb paciència amb les meves coses del lab. I sobretot, per aguantar ser el blanc de les rialles amb els teus carrot cakes, les teves "piscines" i les teves representacions magnífiques amb les mans per descriure com són les coses. I recorda, queda pendent que faci de cangur del Roger.

I no puc deixar-me de la resta de gent del laboratori que s'ha anat incorporant en aquests últims anys de la tesi. A ti Luis, por aportar tu salero sevillano estos años. Gracias por las charlas compartidas y por confiar en mi para ayudarte en tus experimentos. A la Isa, per aportar la teva bogeria i la teva espontaneïtat que tant ens agrada, i si, també pel teu estrès i les teves carreres pels passadissos que tant ens ha fet riure. A la Marta, per ser tan dolça i per la teva amabilitat que tant ens agrada. Gràcies per ajudar-me quan ho he necessitat i pel teu riure que alegra cada dia. Finalment, no puc deixar-me a les noves incorporacions recents, a les "iogurines" del lab, la Júlia i la Bea. A tu Júlia, l'esportista d'elit del laboratori, per la teva naturalitat, per la teva senzillesa i pels moments únics que ens has brindat explicant les teves aventures, juntament amb els teus moments divertits d'estrès escrivint el teu TFG i de pessimisme innat que tenim realitzant els experiments. I finalment, a la Bea, el nou fitxatge del laboratori. Aunque hace muy poco que te conozco, sé que todo lo que dejo por terminar ha caído en las mejores manos posibles. Muchísimas gracias por tu simpatía, por tu positivismo, por tu forma de ser y por aportar aire fresco en el trabajo. Pero sobretudo, por darme la tranquilidad necesaria para escribir esta tesis, por tus ánimos en los días difíciles y por ocuparte de una manera excelente de los experimentos pendientes estos meses. Espero poder haberte enseñado lo mejor posible y que hayas aprendido lo máximo.

També volia agrair als veïns de la planta 3 del Centre Esther Koplowitz. En especial, a la gent del grup del Dr. Clària: a la Vero, al Jose; a la Bibi, per la seva espontaneïtat i ganes d'explicar-te coses; a l'Aritz, per organitzar les quedades per veure sèries i animar-me les setmanes; a la Cristina, per fer més amè i alegre cada dia amb les nostres "picabaralles" surrealistes i amistoses; a l'Esther, per la seva dolçor, amabilitat i disposició a resoldre qualsevol dubte; i a l'Eva, per la seva ajuda i savis consells sempre que els he necessitat i pels grans moments

viscuts junts fora del laboratori. També agrair l'ajuda experta de la gent del grup del Dr. Bruix i en especial, a l'Anna, per saber escoltar en els moments complicats i aportar l'alegria i el positivisme que la caracteritza. I també no puc deixar de mencionar a les noies de grup del Dr. Panès per la seva ajuda inestimable en els experiments de FACS i a la gent del grup del Dr. Jiménez i a la gent del Dr. Morales. I part d'aquesta tesi doctoral no hauria estat possible sense la Pepa, la millor Lab Manager possible. Gràcies per la teva simpatia i desviure't perquè la nostra investigació sigui cada dia el més fàcil i còmode possible. Agraïxo els esforços que has fet per demanar aquell reactiu que necessitàvem urgentment, per buscar-me la millor solució als problemes que m'han sorgit, però també, per controlar que tot funcioni correctament i estigui tot en ordre i "llimpiat".

Fora del món laboral, volia donar les gràcies als companys de bàsquet de l'equip Gràcia, pels grans moments i les rialles que m'heu donat cada dilluns que m'han permès que agafi les energies necessàries per a treballar en la tesi cada setmana. No puc oblidar als meus amics de la universitat, Àlex, Cristina, Marga, Marta G, Marta M, Mireia, Sergi i Tere, als quals vull agrair que des del primer curs que ens vam conèixer, i ja fa d'això 11 anys!, han estat allà per fer tot més amè i divertit i m'han animat a seguir endavant amb aquesta tesi. També vull donar les gràcies a la Lorena, el Llorenç, i la Sílvia, perquè tot i només veure'ns un cop l'any, segueixen interessant-se i preocupant-se per com en van les coses. En especial vull donar les gràcies a la gent de Vilafranca, Alba, Ariel, Laura, Lola, Marina, Natàlia, Pau i Xescu, pel suport incondicional i pels grans moments compartits en els dinars i sopars fets durant aquests anys. I perquè sinó puc sortir perjudicat, vull agrair en particular a la Conxi per tots els moments compartits, pels esmorzars i les converses infinites abans d'entrar al laboratori, i pels ànims, l'estima i el recolzament que m'has donat a seguir endavant des que ens coneixem, però també per les bronques tan adients quan tocaven. També vull mencionar al Manu i al Jordi, per les quedades anuals i pels ànims i l'interés que mostren sobre els meus avenços 20 anys després d'haver-nos conegut. Per acabar, volia agrair al grup d'amics de batxillerat: Bernat, Dani, Jordi, Marcos, Robert i Sergi, perquè tot i que tantes hores al laboratori ha fet que no us vegi amb tanta assiduitat, m'heu mostrat el vostre recolzament, ajuda i amistat cada cop que ens hem vist. Menció apart volia fer a la Marta i al Pau, per animar-me quan més ho necessitava, per compartir tants bons moments junts i per ajudar-me amb els vostres consells tan necessaris.

Ja per anar acabar aquesta extensa llista d'agraïments, volia donar les gràcies al G8 del Màster. Qui ho diria que en un màster d'un sol any, poguéssim tenir aquesta amistat forta. Sort de les nostres reunions setmanals obligatòries i les múltiples activitats organitzades, sense elles

aquesta tesi hauria estat molt diferent. Per les converses terapèutiques explicant les nostres peripècies i problemes durant la tesi doctoral, i pels grans moments que m'heu fet passar durant aquests anys de tesi, Aida, Anna, Josep, Marina, Miguel, Pablo i Tanit, moltíssimes gràcies!! Ah, i sense oblidar-me dels nous fitxatges del grup: David, Jeu, Ignasi i Marc!

No puc finalitzar tot plegat sense parlar del meu pilar bàsic durant aquests anys, i sense els quals no hauria estat possible realitzar aquesta tesi doctoral: la meva família. Vull agrair al meu germà Xavi i a la meva cunyada Anna, pel suport que m'han donat aquests anys, per l'interès i preocupació perquè tot m'anés bé i per fer-me aquest camí més planer i fàcil. Què dir dels meus pares, no podré agrair prou l'oportunitat i les facilitats que m'heu brindat per poder estudiar la carrera universitària que desitjava i poder realitzar la tesi doctoral, no tothom té aquesta oportunitat. Gràcies per transmetre'm els vostres valors i el vostre coneixement, i criar-me amb tanta estima, passió i atenció. Al meu pare Joan, per la teva comprensió, per transmetre'm la teva passió a aprendre noves coses cada dia i per picar-me la curiositat a entendre el perquè de les coses. A la meva mare Miriam, per ser el suport moral bàsic durant tots aquests anys, per escoltar-me i guiar-me en els moments difícils, per desviure't perquè tot en aquesta vida em vagi pel bon camí. Gràcies als dos per fer-me la persona que sóc ara!

A tots vosaltres, gràcies per tot el què m'heu aportat abans, durant i després d'aquesta tesi!

