



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de la plasticidad celular en la enfermedad hepática crónica: Reacción ductular y reprogramación de los hepatocitos

Beatriz Aguilar Bravo

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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD CELULAR EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA: REACCIÓN DUCTULAR Y REPROGRAMACIÓN DE LOS HEPATOCITOS

Memoria de la tesis doctoral presentada por:

Beatriz Aguilar Bravo

Para obtener el título de doctora por la Universitat de Barcelona

Trabajo realizado bajo la supervisión de:

Director: Dr. Pau Sancho Bru, IDIBAPS

Tutor: Dr. Pere Ginès Gibert, Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Septiembre 2022



Nosotros, Dr. Pau Sancho Bru y Dr. Pere Ginès Gibert, director y tutor, respectivamente, de la tesis doctoral de Beatriz Aguilar Bravo, dan el visto bueno a la presentación de esta tesis doctoral bajo el título de:

Estudio de la plasticidad celular en la enfermedad hepática crónica: reacción ductular y reprogramación de los hepatocitos

**SANCHO
BRU PAU -
38150118
H**

Firmado digitalmente por
SANCHO BRU PAU -
38150118H
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-3815011
8H, givenName=PAU,
sn=SANCHO BRU,
cn=SANCHO BRU PAU -
38150118H
Fecha: 2022.06.30 17:26:15
+02'00'

**PERE GINES
GIBERT /
num:08142
480**

Firmado
digitalmente por
PERE GINES GIBERT /
num:08142480
Fecha: 2022.07.01
09:46:15 +02'00'

**AGUILAR
BRAVO,
BEATRIZ
(AUTENTICACI
ÓN)**

Firmado
digitalmente por
AGUILAR BRAVO,
BEATRIZ
(AUTENTICACIÓN)
Fecha: 2022.07.01
10:22:46 +02'00'

Se dice pronto, pero ya son 7 años los que han pasado desde aquel Septiembre de 2015 que llegué al laboratorio. Parece que fue ayer cuando me entrevisté con Pau, y después de 2 entrevistas y a pesar de no verme muy convencida de trabajar con ratones, decidió darme la oportunidad de empezar mi doctorado. Muchas gracias Pau por confiar en mí, por enseñarme a pensar científicamente y por permitirme vivir esta experiencia, ya que, a pesar de los altibajos, lo volvería a repetir.

Me gustaría agradecer a la gente del laboratorio, a la que podría llamar “mi familia” aquí en Barcelona. Tener un buen ambiente de trabajo es fundamental, pero encontrar a tus amigos allí es una suerte. Cuando llegué al laboratorio prácticamente no conocía a nadie en Barcelona, y enseguida los chicos del lab me hicieron sentir como en casa. Me gustaría empezar por mi Juliet, sin lugar a dudas mi pilar fundamental desde el inicio hasta el final, ¡Qué haría yo sin ti hija!! Doy gracias por haberte encontrado y por formar parte de mi vida. Gracias por tu apoyo todos estos años. En septiembre lo celebraremos por todo lo alto, y ya sabes, you are my croque forever! Delia, elevaste mi motivación al 200% con el mote de “Cheerly” y como no, me encanta que a día de hoy me lo sigas diciendo. Gracias por tu apoyo siempre que lo he necesitado y por nuestras charlas psicológicas. ¡Mar, en realidad tu eres la Cheerly original! gracias por tu ayuda en mi comienzo de la tesis y espero que siempre sigas viendo la parte positiva aun cuando parece imposible. A Cris, que, aunque compartimos poco tiempo en el lab, fue lo suficiente para cogerte mucho cariño. A Dani, gracias por ser mi mentor, gracias por tu paciencia y por haberme ayudado a desenvolverme en el lab. Y por supuesto, ahora toca el turno de mis chicas, las que llegaron al lab unos años más tarde pero que en poco tiempo se convirtieron en indispensables. Silvi, me encantó tenerte como estudiante de máster, con tu curiosidad, tu esfuerzo y tus ganas de aprender llegarás muy lejos, créetelo! Gracias por ayudarme siempre con una sonrisa. ¡Celia, tus “buenos días bellas flores” por la mañana alegran a cualquiera! Gracias por la alegría que desprendes, y ya sabes, ve organizando el viaje a Graná, que estamos deseosas! Y para acabar, Reich, de ti he aprendido muchas cosas, la comida de foodtropa, los podcast de Cristina Mitre, la ropa de Bimani y seguro que me dejó algo jijij. Pero aparte de todo esto, gracias Reich por tu apoyo siempre que lo he necesitado, y cuando quieras repetimos paddle surf, ya sabes, he encontrado mi deporte!

AGRADECIMIENTOS

A las nuevas incorporaciones, Silvia, aunque llegaste hace poco, es como si ya te conociera por todo lo que Delia ha hablado de ti. Gracias por haberme escuchado cuando lo necesitaba. A Laura, Paula, Laura, Laia y Xenia, gracias por haberme ayudado en los últimos momentos de la tesis.

Además, me gustaría agradecer a la gente de los otros grupos, a Marta, Mireia y Roger, gracias por las alegrías que nos habéis dado al otro lado, se os echa de menos chicos, ¡y Marta y Mireia, gracias por escuchar mis penas de último momento! A Jose, gracias por haber compartido conmigo tantos buenos momentos en el lab, de viajes, ¡y las largas noches de fiesta! A Josep, quien nos diría que seríamos compis de piso? Gracias por nuestros momentos viendo “Cuéntame”, fueron geniales. Y por último a Alba, Aida y Elisa. Alba, muchas gracias por escucharme, y por supuesto, gracias por ser mi personal graphic designer (¿qué bien suena no?), tendré una portada ideal gracias a ti. Y Aida, gracias por estar ahí, por ser siempre un apoyo y por hacer los peluches más bonitos del mundo a mis sobris. Elisa, espero que sigas siempre igual de alegre y que sigas transmitiendo esa actitud tan positiva.

¡Y Pepa, no me olvido de ti eh! Eres la mejor lab manager, no sé qué sería del laboratorio sin ti! Gracias por cuidarnos tanto siempre, y por tu sabiduría! El laboratorio no sería lo mismo sin ti.

Además, me gustaría agradecer a mi amiga Elena, Helen, nos conocemos desde bien pequeñas, y siempre hemos estado ahí la una para la otra, gracias por tu apoyo, y por nuestras largas conversaciones. ¡Tenemos pendiente un finde de playita! A mi amiga Marina, los primeros años en Barcelona no hubieran sido lo mismo sin ti! A mis compis de piso, Ana y Paula, muchas gracias por haber hecho que la convivencia fuera tan fácil. Gracias también a mis amigas de la uni, y a mis amigas de Herrera, por los momentos que hemos vivido juntas y los que aún nos quedan por vivir.

Tengo que agradecer a María, mi profe de pilates, podré parecer una exagerada, pero descubrir pilates con ella en la pandemia me ha cambiado la vida. Y gracias a mis compis espartanos, nos es fácil conectar a través de una pantalla y creo que nosotros lo hemos conseguido.

AGRADECIMIENTOS

¡Y a mi otra María, que suerte haberte encontrado! Muchas gracias por tu ayuda, por tu paciencia y por haberme enseñado a entender las cosas desde otro punto de vista.

Por último, tengo que agradecer a las personas más importantes de mi vida, mi familia, y por supuesto, a Mikel. A mis padres, gracias por vuestro apoyo y amor incondicional en todos los momentos de mi vida, sin vuestra ayuda no podría haber llegado donde estoy hoy. A mis hermanas, soy tan afortunada de teneros como hermanas, pero sobre todo como amigas, no me puedo imaginar la vida sin vosotras, sois un pilar fundamental para mí y espero que lo seáis siempre. A mis cuñados y a mis hermanas, gracias por darme los mejores sobris del mundo. Y por último a Mikel, gracias por llegar a mi vida para quedarte, gracias por tu apoyo día a día, y por estar siempre a mi lado. ¡Os quiero muchísimo a todos!

¡Muchas gracias a todos por haber hecho de estos años una experiencia inolvidable!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS	1
ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS	7
INTRODUCCIÓN.....	11
1. ARQUITECTURA Y FUNCIÓN DEL HÍGADO.....	13
1.1. <i>Enfermedad hepática por alcohol</i>	15
1.1.1. Hepatitis alcohólica	17
1.1.1.1. Daño hepatocelular	18
1.1.1.2. Esteatosis.....	18
1.1.1.3. Fibrosis	18
1.1.1.4. Infiltración de neutrófilos.....	19
1.1.1.5. Proliferación del ducto biliar (reacción ductular)	19
2. REGENERACIÓN HEPÁTICA DE LAS CÉLULAS EPITELIALES.....	20
2.1. <i>Hepatectomía parcial</i>	20
2.2. <i>Proliferación de los hepatocitos</i>	21
2.2.1 Zonación replicativa.....	22
2.3. <i>Proliferación de las células epiteliales del conducto biliar</i>	23
2.3.1. Origen de las CPH	24
2.3.2. Caracterización de las CPH	26
2.3.3. Mecanismos de regulación de las CPH	28
2.3.3.1. Proliferación de las CPH	28
2.3.3.2. Migración de las CPH.....	29
2.3.3.3. Diferenciación de las CPH.....	30
2.3.4. Interacción de las CPH y el microambiente hepático.....	30
2.3.4.1. CPH y fibrosis.....	31
2.3.4.2. Interacción entre las CPH y la ECM	32
2.3.4.3. Interacción entre las CPH y las células inmunes	32
2.3.4.4. CPH y angiogénesis.....	33
2.3.5. Las CPH en las enfermedades hepáticas	34
3. REGENERACIÓN HEPÁTICA EN DAÑO CRÓNICO: PLASTICIDAD CELULAR	37

3.1.	<i>Plasticidad de los hepatocitos</i>	38
3.1.1.	Mecanismos moleculares que regulan la plasticidad de los hepatocitos	39
3.2.	<i>Plasticidad de las BEC</i>	40
3.2.1.	Mecanismos moleculares que regulan la plasticidad de las BEC	43
3.3.	<i>Plasticidad de las células epiteliales en la enfermedad hepática</i>	44
3.3.1.	Mecanismos moleculares que regulan la plasticidad en la enfermedad hepática	46
4.	ORGANOIDES PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA	47
4.1.	<i>Origen y conceptos básicos de los organoides</i>	47
4.2.	<i>Organoides derivados de tejido adulto</i>	49
4.3.	<i>Organoides y medicina regenerativa</i>	51
5.	VÍA DE SEÑALIZACIÓN CXCR4	52
5.1.	<i>Cxcr4 y sus ligandos</i>	52
5.2.	<i>Cxcr4 y la enfermedad hepática</i>	52
5.2.1.	Papel de la vía CXCL12-CXCR4 en el daño agudo y la regeneración hepática	53
5.2.2.	Papel de la vía CXCL12-CXCR4 en la activación de las CEH y la fibrosis hepática	54
5.2.3.	Papel de la vía CXCL12-CXCR4 en la carcinogénesis.....	55
	HIPÓTESIS	57
	OBJETIVOS	61
	MATERIAL Y MÉTODOS	65
1.	PACIENTES	67
1.1.	<i>Pacientes de los cuales se obtuvo muestra para microdissección por captura láser</i>	67
1.2.	<i>Pacientes de los cuales se obtuvo biopsia hepática</i>	68
2.	AISLAMIENTO DE POBLACIONES MEDIANTE MICRODISECCIÓN POR CAPTURA LÁSER	72
2.1.	<i>Procesamiento de la muestra</i>	72
2.2.	<i>Microdissección por captura láser</i>	73
2.3.	<i>Procesamiento del RNA y secuenciación de las muestras aisladas por LCM</i>	74

3.	MODELOS ANIMALES.....	76
3.1.	Modelo experimental de inhibición del reclutamiento de neutrófilos	76
3.2.	Modelo de sobreexpresión de Cxcr4	77
3.3.	Modelo de inhibición farmacológica de CXCR4.....	77
4.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA: HISTOLOGÍA Y ELISAS.....	79
4.1.	Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de muestras parafinadas	79
4.2.	Inmunofluorescencia en organoides	79
4.3.	Inmunofluorescencia en tejido hepático humano mediante "CLEARING" .	80
4.4.	Cuantificación de las células de la reacción ductular y hepatobiliares en biopsias de pacientes con ALD	80
4.5.	Detección de CXCL5 y TROP2 en suero de pacientes.....	82
5.	CULTIVOS CELULARES	83
5.1.	Generación de organoides de muestras hepáticas de pacientes con cirrosis..	83
5.1.1.	Descongelación y pase de organoides.....	85
5.2.	Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica humana	85
5.3.	Aislamiento de hepatocitos de ratón	86
6.	ENSAYOS IN VITRO	88
6.1.	Respuesta de organoides a mediadores inflamatorios.....	88
6.2.	Ensayo de migración de neutrófilos	88
6.3.	Co-cultivo indirecto de organoides y neutrófilos.....	89
6.4.	Ensayos in vitro con hepatocitos primarios.....	89
7.	EXTRACCIÓN DE RNA, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA.....	90
7.1.	Extracción de RNA	90
7.2.	Retrotranscripción.....	90
7.3.	PCR cuantitativa	90
7.4.	Array de muestras hepáticas procedentes de pacientes con ALD y de organoides derivados de tejido cirrótico.....	92
8.	ANÁLISIS COMPUTACIONALES.....	93
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94
	RESULTADOS	95

<u>OBJETIVO 1:</u> LAS CÉLULAS DE LA REACCIÓN DUCTULAR PRESENTAN UN PERFIL INFLAMATORIO Y RECLUTAN NEUTRÓFILOS EN LA HEPATITIS ALCOHÓLICA.....	97
<u>OBJETIVO 2:</u> EL PERFIL DE LAS CÉLULAS HEPATOBILIARES EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA POR ALCOHOL IDENTIFICA CXCR4 COMO IMPULSOR DE LA REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	121
DISCUSIÓN	145
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO	185

LISTA DE ABREVIATURAS



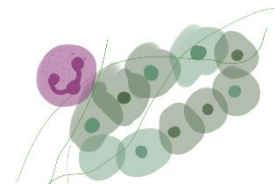
ABIC	Age Billirubin INR Creatinin
AFP	Alpha fetoprotein
AH	Alcohol-related hepatitis
ALD	Alcohol-related liver disease
ALF	Acute liver failure
ALT	Alanina aminotransferasa
ASH	Alcohol related steatohepatitis
AST	Aspartato aminotransferasa
AXIN2	Axis Inhibition Protein 2
BDL	Bile duct ligation
BEC	Biliary epithelial cell
CCA	Cholangiocarcinoma
CCL4	Carbon tetrachloride
CDE	Choline-deficient, ethionine-supplemented
CEH	Células estrelladas hepáticas
CH	Cirrhosis
CPH	Células progenitoras hepáticas
CXC-L	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR	CXC chemokine receptor
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine
DEG	Differentially enriched genes
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extracelullar matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ESRP2	Epithelial splicing regulatory protein 2
FGF	Fibroblast growth factor
GGT	Gamma-glutamyl transferasa
GO	Gene Ontologies

LISTA DE ABREVIATURAS

GSEA	Gene set enrichment analysis
HB	Hepatobiliar
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HGF	Hepatocyte Growth Factor Receptor
HH	Hedgehog
HNF4α	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha
INF	Interferon
IL	Interleucina
INR	International Normalized Ratio
IPA	Ingenuity pathway analysis
IR	Isquemia-reperfusión
KC	Kupffer Cells
KRT	Cytokeratin
LCM	Laser capture microdissection
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LGR	Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor
LTB	Linfotoxin β
LPS	Lipopolisacárido
LSEC	Liver sinusoidal endotelial cells
LXR	Liver X receptor
MC	Medio condicionado
MCD	Methionine choline- deficient
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MMP	Metaloproteinasa de matriz
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NES	Normalized enrichment score
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OPN	Osteopontin
PA	Phosphatase Alcaline

PH	Partial hepatectomy
PBC	Primary biliary cirrosis
PSC	Primary sclerosing colangitis
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RD	Reacción ductular
RNA	Ribonucleic Acid
RSPO-1	R-spondin-1 precursor
SDF1-α	Stromal cell- derived factor-1 alpha
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SLIT2-ROBO1	Slit2-Roundabout 1
SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9
TAA	Thioacetamide
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TROP2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
YAP	Yes1 Associated Transcriptional Regulator

ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS



Tesis en formato clásico con un artículo anexo.

La tesis consta de 2 estudios y un artículo publicado.

OBJETIVOS:

- **Estudio 1:** Las células de la reacción ductular presentan un perfil inflamatorio y reclutan neutrófilos en la hepatitis alcohólica
- **Estudio 2:** El perfil de las células hepatobiliares en la enfermedad hepática por alcohol identifica a cxcr4 como impulsor de la reprogramación celular

ARTÍCULOS PUBLICADOS:

Aguilar-Bravo B, Rodrigo-Torres D, Ariño S, Coll M, Pose E, Blaya D, Graupera I, Perea L, Vallverdú J, Rubio-Tomás T, Dubuquoy L, Armengol C, Lo Nigro A, Stärkel P, Mathurin P, Bataller R, Caballería J, Lozano JJ, Ginès P, Sancho-Bru P. Ductular Reaction Cells Display an Inflammatory Profile and Recruit Neutrophils in Alcoholic Hepatitis. *Hepatology*. 2019; 69(5):2180-2195. Doi: 10.1002/hep.30472. PMID: PMC9189898. **Factor de impacto:** 17.425 **Quartil:** Q1 **Área:** Gastroenterology and Hepatology

Aguilar-Bravo B, Sancho-Bru P. Laser capture microdissection: techniques and applications in liver diseases. *Hepatology International*. 2019, **13**: 138–147. Doi: 10.1007/s12072-018-9917-3. PMID: 30600479. **Factor de impacto:** 9,029 **Quartil:** Q1 **Área:** Hepatology. **Review**

INTRODUCCIÓN



1. ARQUITECTURA Y FUNCIÓN DEL HÍGADO

El hígado es el órgano central en la homeostasis, pero, además, el hígado realiza un amplio número de funciones relacionadas con el metabolismo, el almacenamiento de glucógeno, la detoxificación de fármacos, el balance de fluidos y electrolitos, la producción de varias proteínas séricas y la secreción de bilis. El hígado representa aproximadamente el 2% del peso en humanos y es uno de los órganos más grande del cuerpo humano. Como se muestra en la **Figura 1B**, la unidad arquitectónica básica del hígado es el lóbulo hepático (Mall, 1906), que presenta una estructura hexagonal, con cada una de sus seis esquinas delimitadas por la presencia de una tríada de vasos portales formada por una vena porta, un conducto biliar y una arteria hepática. Tanto la vena porta como la arteria hepática suministran sangre al lóbulo, que fluye a través de una red de capilares sinusoidales antes de salir del lóbulo a través de la vena central (Si-Tayeb et al., 2010). El hígado es el único órgano que recibe dos suministros de sangre, uno proveniente de la vena porta, que transporta nutrientes y hormonas del intestino, páncreas y bazo, y otro de la arteria hepática, que aporta sangre oxigenada (**Figura 1A**). El conducto biliar, que constituye el tercer componente de la triada portal, transporta la bilis secretada por los hepatocitos.

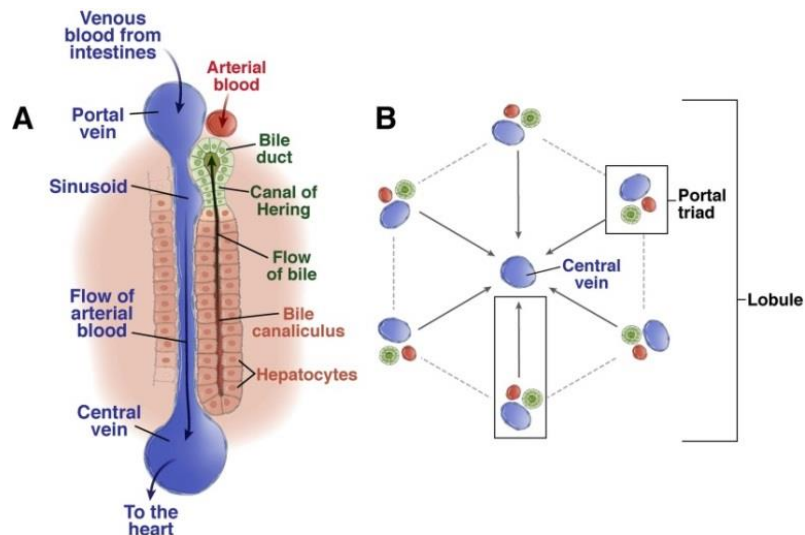


Figura 1. Estructura del lóbulo hepático. (A) La tríada portal está formada por los conductos biliares, la arteria hepática y la vena porta. **(B)** Cada lóbulo hepático consta de una vena central y 6 triadas portales. Imagen extraída de la revisión Duncan *et al*, *Gastroenterology*, 2009.

INTRODUCCIÓN

Los hepatocitos constituyen aproximadamente el 60% del total de las células hepáticas, y aproximadamente el 80% de la masa del hígado. Las hileras de hepatocitos forman la denominada placa hepática, que se extiende desde la zona portal hasta la vena central (**Figura 1A**). La superficie basolateral de los hepatocitos está revestida de endotelio fenestrado facilitando las interacciones entre la sangre y los hepatocitos. El espacio que queda entre la pared del endotelio y las láminas de hepatocitos es el denominado espacio de Disse (Wisse, 1970). Por otro lado, la cara apical de los hepatocitos adyacentes forma el canalículo biliar, a través del cual fluye la bilis para finalmente drenar en el conducto biliar. El conducto biliar está revestido por las células epiteliales denominadas colangiocitos. Los canalículos biliares se conectan con los conductos biliares a través del Canal de Hering, considerado como el nicho de las células progenitoras hepáticas (CPH) (Paku et al., 2001).

Además de la síntesis de ácidos biliares, los hepatocitos realizan la gran mayoría de las funciones metabólicas del hígado, como la síntesis de glutamina, la formación de urea, o la gluconeogénesis. Sin embargo, la función de los hepatocitos no es idéntica entre ellos, si no que depende de su localización, y es lo que se denomina zonación metabólica (Jungermann and Kietzmann, 1996). De esta manera, se distinguen 3 zonas distintas: zona 1; próxima a la triada portal, donde se encuentran los hepatocitos periportales, encargados de la gluconeogénesis y la conversión de amonio en urea; zona 2, donde se sitúan los hepatocitos localizados entre la zona portal y la vena central; y la zona 3, próxima a la vena central, donde se encuentran los hepatocitos denominados pericentrales, que expresan la enzima glutamina sintetasa, y utilizan el amonio para generar glutamina (Moorman et al., 1989).

Junto con los hepatocitos, los colangiocitos constituyen la segunda población de células epiteliales más abundante del hígado. Los colangiocitos recubren los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos y en condiciones fisiológicas contribuyen activamente a la composición final y al volumen de la secreción biliar (Maroni et al., 2015).

Sin embargo, el hígado cuenta también con la importante función del conjunto de células denominadas no parenquimales entre las cuales destacan las células estrelladas hepáticas (CEH), las células de Kupffer (KC, de sus siglas en inglés, Kupffer cells), y las células endoteliales hepáticas (LSECs, del inglés; Liver sinusoidal endothelial cells). Como

se muestra en la **Figura 2**, las CEH se encuentran en el espacio de Disse y representan menos del 10% del total de las células hepáticas. Entre otras funciones, las CEH se encargan de almacenar vitamina A, así como de la remodelación de la matriz extracelular (ECM, de sus siglas en inglés, Extracellular matrix). Las KC son los macrófagos del hígado, y se encuentran en el lumen de los sinusoides hepáticos. Las KC desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune innata ya que su localización les permite fagocitar eficazmente los patógenos que entran desde la circulación portal o arterial. Finalmente, las LSECs son células altamente especializadas que se encuentran en la interfaz entre las células sanguíneas, por un lado, y los hepatocitos y las CEH por otro. Representan una barrera permeable y tienen la mayor capacidad de endocitosis de las células humanas (Poisson et al., 2017).

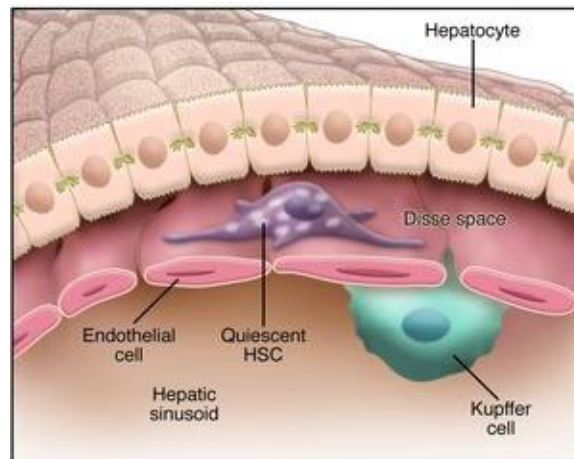


Figura 2. Estructura del sinusoides hepático. Imagen extraída de Iredale JP et al, *Journal of Clinical Investigation*, 2007.

1.1. Enfermedad hepática por alcohol

La enfermedad hepática por alcohol (ALD, de sus siglas en inglés, *Alcohol related liver disease*) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en el mundo, que presenta una elevada morbilidad y mortalidad, y que constituye el 0,9% de las muertes mundiales y el 47,9% de las muertes relacionadas con la cirrosis (Altamirano and Bataller, 2011; Gao and Bataller, 2011).

La ALD presenta una amplia gama de manifestaciones (**Figura 3**), desde una simple esteatosis asintomática (acumulación anormal de grasa) hasta formas más graves de

INTRODUCCIÓN

daño hepático, como la esteatohepatitis (acumulación de grasa que causa inflamación y daño), la fibrosis progresiva (producción descontrolada de ECM que se acumula en el hígado) y la cirrosis, que se manifiesta como consecuencia de un daño crónico persistente, y que eventualmente, puede desencadenar la aparición de carcinoma hepatocelular (HCC, de sus siglas en inglés, Hepatocelular carcinoma) (Tome et al. 2004). La ALD se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo, inflamación, incapacidad del hígado para regenerar debido a una alteración del metabolismo de los hepatocitos, y a la translocación de productos bacterianos de la microbiota intestinal al torrente sanguíneo (Gao and Bataller, 2011). Además, el consumo de alcohol prolongado tiene efectos sinérgicos sobre otras patologías como el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, de sus siglas en inglés, *Non-alcohol related fatty liver disease*) y trastornos genéticos como la hemocromatosis, que pueden desencadenar una progresión acelerada de la enfermedad hepática (Gao et al. 2011a). De la misma manera, también puede causar trastornos no relacionados con el hígado, como infecciones, eventos cardiovasculares o enfermedades del sistema nervioso (Gao et al. 2011b).

Es importante señalar que, en la actualidad, sólo entre el 10 y el 20% de los pacientes con consumo excesivo de alcohol desarrollan ALD grave, lo que indica que también están implicados otros factores como el sexo, la obesidad, el hábito de fumar, la dieta, y algunos factores genéticos. El desarrollo de una ALD grave, como la cirrosis, conlleva además una serie de complicaciones como la ascitis, varices esofágicas, insuficiencia renal, infecciones bacterianas o HCC (Lucey et al. 2009).

Los pacientes con ALD y consumo excesivo de alcohol pueden sufrir episodios agudos de hepatitis alcohólica (AH, de sus siglas en inglés, *Alcohol-related hepatitis*) (**Figura 3**); en muchos casos, la AH conduce a complicaciones graves relacionadas con la insuficiencia hepática y la hipertensión portal, que se asocian a un mal pronóstico (20-50% de mortalidad en un plazo de 3 meses) (Lucey et al., 2009). Hasta la fecha, el tratamiento más efectivo para tratar la AH han sido los corticosteroides, sin embargo, el 40% de los pacientes siguen teniendo una alta tasa de mortalidad a corto plazo. En los últimos años se han estudiado distintas dianas para tratar la AH severa, como la inflamación, el estrés oxidativo, la muerte celular, la microbiota intestinal y la

regeneración hepática (Louvet and Mathurin, 2015). Aun así, el trasplante de hígado sigue siendo la mejor opción de tratamiento, sin embargo, la mayoría de los pacientes con AH severa no pueden solicitar un trasplante de hígado debido al requerimiento de 6 meses de abstinencia.

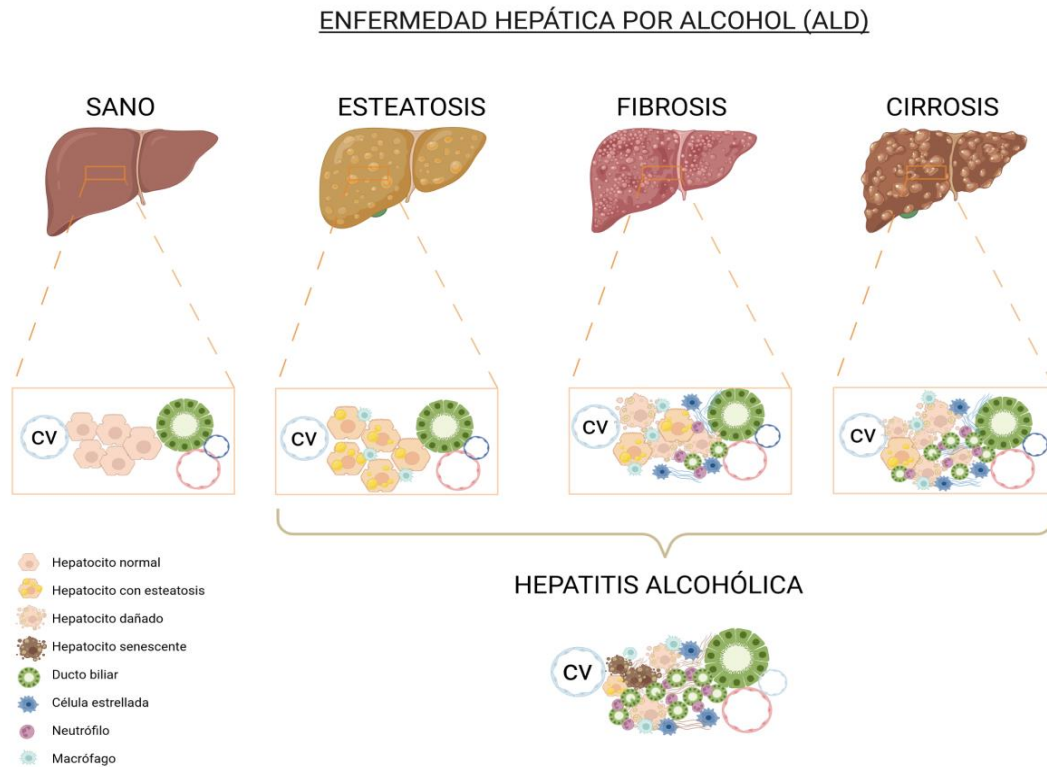


Figura 3. Enfermedad hepática por alcohol. Representación de los eventos que se desencadenan en cada uno de los estadios de la enfermedad.

1.1.1. Hepatitis alcohólica

La AH es un síndrome caracterizado por ictericia, fiebre, e insuficiencia hepática, que se produce tras décadas de consumo excesivo de alcohol (Lucey et al., 2009). La AH se desarrolla en pacientes con esteatosis o cirrosis subyacente. Se cree que la prevalencia de la AH se da entre el 10% y el 35% de los bebedores activos y en los casos severos tiene un mal pronóstico a corto plazo (Gao and Bataller, 2011).

Las principales características histológicas de la AH incluyen lesión hepatocelular, infiltración de neutrófilos, inclusiones hialinas de Mallory-Denk, esteatosis, fibrosis intrasinusoidal y pericentral (Gao and Bataller, 2011), y proliferación del ducto biliar o reacción ductular (RD). Estas características se explican en detalle a continuación.

INTRODUCCIÓN

1.1.1.1. Daño hepatocelular

Inicialmente, a través de la enzima alcohol deshidrogenasa, el etanol se metaboliza a acetaldehído en el citosol. Como consecuencia, se generan especies reactivas de oxígeno y tiene lugar la peroxidación lipídica y el agotamiento del glutatión mitocondrial y de la S-adenosilmetionina. Todos estos productos preparan y sensibilizan a los hepatocitos para responder al daño. El daño hepatocelular se evidencia por la presencia de “ballooning” centrilobular y los cuerpos de Mallory-Denk, que son inclusiones eosinófilas amorfas formadas por filamentos intermedios dañados (Lucey et al. 2009; Gao et al. 2011a).

1.1.1.2. Esteatosis

La esteatosis se caracteriza por la acumulación de grasa (principalmente triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol) en los hepatocitos. Los primeros estudios indicaron que el consumo de alcohol altera la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y provoca esteatosis. También se ha observado que la ingesta de alcohol aumenta la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo hacia el hígado. Además, estudios recientes muestran que la exposición al alcohol alteraría los factores de transcripción asociados al metabolismo de los lípidos, estimulando la lipogénesis, e inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos (Gao and Bataller, 2011).

1.1.1.3. Fibrosis

La fibrosis hepática es una respuesta de cicatrización a una lesión hepática crónica y se caracteriza por la acumulación excesiva de colágeno y otras proteínas de la ECM. Las CEH activadas son la principal fuente de proteínas de la ECM, junto con los miofibroblastos portales. El daño hepatocelular inducido por el alcohol aumenta los niveles de citoquinas, quimioquinas y componentes de la inmunidad innata, induciendo la activación de las CEH y la fibrogénesis (Gao and Bataller, 2011). En la ALD y la AH, se observa tanto fibrosis intrasinusoidal (en el espacio entre las células endoteliales y los hepatocitos) como fibrosis periportal, presentando un patrón de distribución hexagonal en los diferentes lóbulos hepáticos. Cuando el daño es prolongado, la acumulación excesiva de ECM y la inflamación crónica podrían derivar en cirrosis (Lucey et al. 2009).

1.1.1.4. Infiltración de neutrófilos

La infiltración de neutrófilos es una de las características principales de la AH. Se ha observado que moléculas como el acetaldehído, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , de sus siglas en inglés, Tumor necrosis factor alpha) o el lipopolisacárido (LPS), así como derivados de bacterias intestinales que se traslocan al hígado, estimulan la producción de quimiocinas y citocinas en pacientes con AH. Las quimiocinas de la familia CXC- (de sus siglas en inglés, C-X-C motif chemokine) como CXC ligand (L) 1, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), CXCL10, junto con otras quimiocinas como CCL20, CCL2 o la interleucina (IL) 17 están sobre-expresadas en estos pacientes (Colmenero et al. 2007; Dominguez et al. 2009; Lemmers et al. 2009; Affo et al. 2014), y se ha descrito que algunas de ellas, como la IL-8, CXCL1, o IL-17, promueven el reclutamiento de neutrófilos durante la progresión de la AH (Dominguez et al. 2009; Lemmers et al. 2009).

1.1.1.5. Proliferación del ducto biliar (reacción ductular)

La expansión de la RD se ha observado en casos de daño hepático crónico y se asocia con una deficiente capacidad regenerativa de los hepatocitos (Yang et al., 2004a). Varios estudios han investigado la presencia de la RD en las enfermedades hepáticas (Gouw et al., 2011; Yang et al., 2004a), y en concreto, en la AH se ha demostrado que la RD correlaciona con una mayor inflamación, fibrosis y mortalidad a corto plazo (Dubuquoy et al., 2015a; Lanthier et al., 2015; Sancho-Bru et al., 2012a). La RD suele ir acompañada de ECM y células inflamatorias, que contribuyen a la expansión de la misma (Gadd et al., 2014a; Williams et al., 2014).

Actualmente, no existen modelos animales que logren reproducir el espectro de la ALD, y en particular la ALD avanzada. Los modelos de ratón realizados hasta la fecha (Lamas-Paz et al., 2018), han mostrado que la esteatosis hepática es la característica principal tras el tratamiento con etanol, mientras que la inducción de fibrosis o cirrosis requiere insultos secundarios. Dada esta limitación, la investigación traslacional basada en muestras humanas es fundamental para identificar nuevas opciones de tratamiento. De hecho, la gran mayoría de los resultados expuestos en esta tesis doctoral se han basado en muestras humanas.

2. REGENERACIÓN HEPÁTICA DE LAS CÉLULAS EPITELIALES

El hígado es un órgano capaz de regenerar por completo su función y arquitectura tras un daño. De hecho, el hígado es el único órgano sólido que utiliza mecanismos de regeneración para garantizar que la relación hígado-peso corporal esté siempre al 100% de lo que se requiere para la homeostasis corporal. Al mantenimiento de la masa hepática al 100% se le denominó "hepatostato" (Michalopoulos, 2007). En condiciones de homeostasis, los hepatocitos se encuentran en un estado quiescente (G0), con ausencia de proliferación. Sin embargo, tras la eliminación de parte del parénquima, los hepatocitos proliferan para restaurar la función hepática (Michalopoulos, 2007). Los mecanismos de regeneración hepática han sido ampliamente estudiados en modelos experimentales de hepatectomía parcial (PH, de sus siglas en inglés, Partial hepatectomy), así como en modelos de daño agudo inducido por tóxicos.

2.1. Hepatectomía parcial

El modelo experimental de PH consiste en la extirpación de una parte específica de los lóbulos hepáticos sin afectar a los lóbulos restantes, lo cual permite estudiar el proceso regenerativo de forma fisiológica. La PH se realizó por primera vez en 1931 en ratas, y demostraron que tras la cirugía, las poblaciones celulares maduras restablecían la masa hepática mediante los procesos de proliferación, síntesis de DNA (de sus siglas en inglés, Deoxyribonucleic Acid), e hipertrofia (Higgins, 1931). Los primeros eventos que tienen lugar tras una PH implican la expresión de más de 100 genes en los hepatocitos (Fausto, 2000), preparándoles de esta forma para responder a las señales regenerativas. Es importante destacar, que la activación de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, de sus siglas en inglés, Epidermal Growth Factor Receptor) y de los receptores del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFR, de sus siglas en inglés, Hepatocyte Growth Factor Receptor), justo después de la cirugía, es esencial para estimular la síntesis de DNA. De hecho, se ha observado que el deterioro de ambas señales provoca la muerte de los ratones (Paranjpe et al., 2016). Además, los hepatocitos que están proliferando secretan varios factores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, de sus siglas en inglés, Vascular Endothelial

Growth Factor), el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$, de sus siglas en inglés, Transforming growth factor alpha), el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1, de sus siglas en inglés, Fibroblast growth factor 1) y el FGF2, y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, de sus siglas en inglés, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) que sirven de estímulo mitogénico para otras células hepáticas (Michalopoulos and DeFrances, 1997). La proliferación de los hepatocitos finaliza al cabo de los 6-8 días aproximadamente. Por otro lado, la proliferación de los colangiocitos tiene lugar unas horas más tarde que la de los hepatocitos, y además de cMET y EGFR, el receptor de ácidos biliares TGR5 es también un regulador necesario para la proliferación de los mismos (Michalopoulos and Bhushan, 2020).

2.2. Proliferación de los hepatocitos

La capacidad proliferativa de los hepatocitos en la regeneración hepática se ha estudiado utilizando el modelo de ratones $Fah^{-/-}$. La ausencia de la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa (Fah , de sus siglas en inglés, Fumarylacetoacetate hydrolase), que participa en la degradación de la tirosina, induce la muerte de los hepatocitos debido a la acumulación de metabolitos tóxicos. De esta manera, hepatocitos aislados de ratones Fah^{+} fueron trasplantados 6 veces consecutivas en ratones $Fah^{-/-}$, siendo capaces de repoblar hasta el 70%-95% del parénquima hepático (Overturf et al., 1997). Resultados similares se observaron cuando se trasplantaron hepatocitos humanos en ratones $Fah^{-/-}$ inmunocomprometidos ($Rag2^{-/-}Il-2rg^{-/-}$) (Azuma et al., 2007).

Dado que el ratón $Fah^{-/-}$ no presenta una delección completa de los hepatocitos (0,1%-1% de hepatocitos Fah^{+}), este modelo también se utilizó para estudiar los cambios epigenéticos en los hepatocitos tras una lesión aguda. De esta manera, se aislaron núcleos de hepatocitos quiescentes y proliferativos y se realizó un ensayo de secuenciación de la cromatina. Este análisis reveló una clara diferencia en los perfiles epigenéticos de los hepatocitos quiescentes y proliferativos, mostrando estos últimos

INTRODUCCIÓN

un enriquecimiento de las vías implicadas en el crecimiento y la proliferación celular (Wang et al., 2020).

2.2.1 Zonación replicativa

La capacidad regenerativa de los hepatocitos a lo largo del lóbulo hepático ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los años, sin embargo, aún se desconoce si todos los hepatocitos tienen la misma capacidad replicativa o si por ejemplo un grupo específico de hepatocitos que tengan activa la señalización por Wnt (de sus siglas en inglés, Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1) tienen una mayor capacidad para repoblar el parénquima hepático (Wang et al., 2015). Como se ha explicado anteriormente, aunque todos los hepatocitos presentan una apariencia similar, tienen diferentes funciones metabólicas dependiendo de su localización (Gebhardt, 1992). Los estudios de "lineage tracing" han servido de gran utilidad para realizar el seguimiento tanto de los hepatocitos pericentrales como de los periportales, así como para determinar su capacidad de proliferación.

Actualmente, aún existe controversia acerca de la existencia de una población de hepatocitos con una mayor capacidad replicativa. *Chen et al* (Chen et al., 2020), marcaron aleatoriamente hepatocitos en condiciones de homeostasis y de daño, y demostraron que los hepatocitos de las tres zonas eran capaces de proliferar. De forma similar, el marcaje específico de hepatocitos pericentrales AXIN2⁺ (de sus siglas en inglés, Axis Inhibition Protein 2) reveló que en una situación de homeostasis, estos hepatocitos tenían una contribución limitada, y que tras un procedimiento de PH, su capacidad proliferativa era similar a la del resto de hepatocitos (Sun et al., 2020). Por otro lado, el seguimiento de una población preexistente de hepatocitos periportales que expresaban el factor de transcripción Sox9 (de sus siglas en inglés, SRY-Box Transcription Factor 9) demostró que tenían la capacidad de expandirse hacia las zonas pericentrales, y recuperar la masa hepática tras una lesión crónica inducida por CCL4 (de sus siglas en inglés, Carbon tetrachloride) (Font-Burgada et al., 2015a). Estos hepatocitos se denominaron "hepatocitos híbridos", y el análisis de secuenciación de RNA reveló que presentaban un fenotipo intermedio, expresando tanto genes específicos de hepatocitos como de célula biliar (Font-Burgada et al., 2015a).

Por último, estudios más recientes han demostrado que los hepatocitos proliferativos se encuentran ampliamente distribuidos en el parénquima independientemente de la localización. Así, Planas Paz *et al* identificaron hepatocitos LGR4⁺ (de sus siglas en inglés, Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 4), presentes en todo el lóbulo hepático, con igual capacidad replicativa en condiciones de homeostasis y después de una PH (Planas-Paz et al., 2016). Asimismo, Lin *et al* demostraron que los hepatocitos con una alta actividad telomerasa (TERT^{high}) eran responsables de la regeneración del hígado en homeostasis y en respuesta a un daño (Lin et al., 2018). Estos estudios se han resumido en la **Figura 4**.

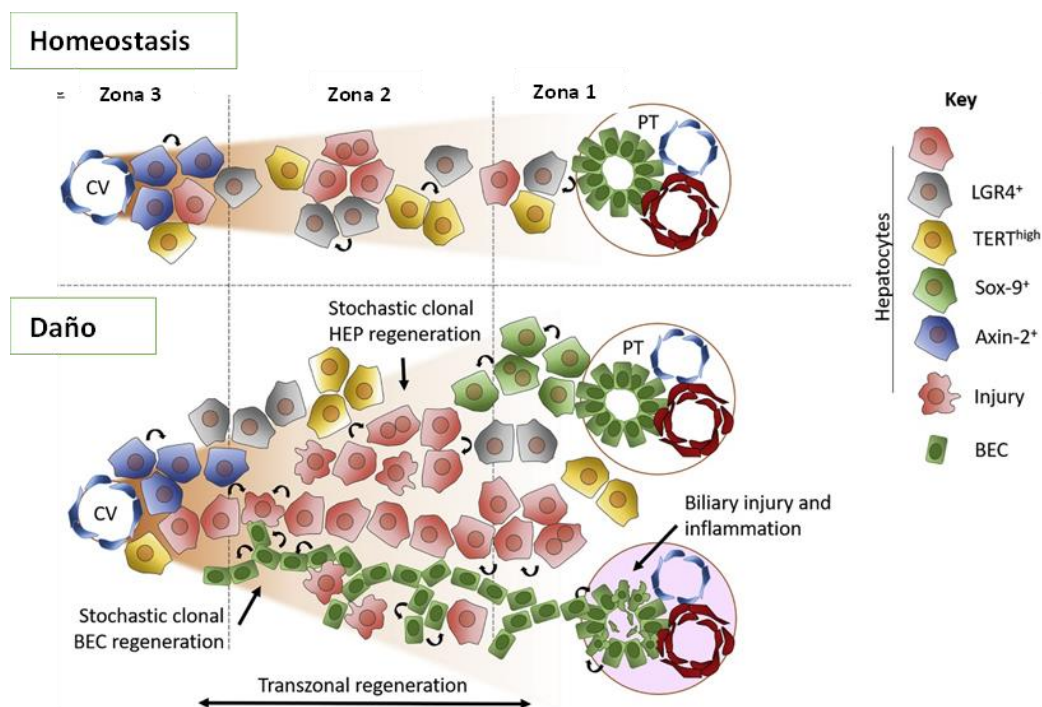


Figura 4. Zonación replicativa. Imagen extraída de Gadd V *et al*, *Cell Stem Cell*, 2020.

2.3. Proliferación de las células epiteliales del conducto biliar

El modelo experimental en ratón de ligadura del conducto biliar (BDL, de sus siglas en inglés, Bile duct ligation) se ha utilizado ampliamente para estudiar la lesión y la proliferación biliar, ya que su procedimiento conduce a la acumulación de bilis intrahepática, daño hepatocelular y un aumento de la fibrosis (Kountouras et al., 1984). Tras una BDL, la proliferación de células epiteliales del conducto biliar (BEC, de sus siglas

INTRODUCCIÓN

en inglés, Biliary epithelial cells) tiene lugar desde los conductos extrahepáticos a los intrahepáticos mediante la activación de distintas vías de señalización, con el fin de restaurar el epitelio biliar (Gadd et al., 2020).

La vía de señalización de Hippo ha sido identificada previamente como un importante regulador del fenotipo hepático y concretamente, se ha visto que la proteína YAP (de sus siglas en inglés, Yes1 Associated Transcriptional Regulator) está específicamente enriquecida y activada en el compartimento biliar (Yimlamai et al., 2014). De hecho, recientemente, se ha observado que YAP promueve la proliferación y la regeneración del epitelio biliar tras una lesión hepática colestásica inducida por BDL o dieta DDC (de sus siglas en inglés, 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine) (Pepe-Mooney et al., 2019; Planas-Paz et al., 2019).

La proliferación de lasnBEC no solo ocurre en aquellas enfermedades que afectan al epitelio biliar, sino que también tiene lugar en las que el daño afecta directamente a los hepatocitos. Este fenómeno se denomina RD y se definió como "una reacción celular de fenotipo biliar, aunque con un origen no necesariamente biliar" (Roskams et al., 2004). La RD surge y se expande en la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas o tras un daño hepático masivo, y se asocia a una deficiente capacidad regenerativa de los hepatocitos (Gouw et al., 2011; Yang et al., 2004b). La RD contiene una población heterogénea de células que comprende BEC reactivas, células hepatobiliares intermedias y CPH más inmaduras.

2.3.1. Origen de las CPH

Las CPH se definieron por primera vez como "células ovas" en un modelo de carcinogénesis en rata, y se describieron como una población celular ovoide con un citoplasma pequeño y ligeramente basófilo (Farber, 1956). Como se resume en la **Figura 5**, las CPH representan una población heterogénea de células progenitoras/madre facultativas que estarían ausentes en un hígado sano, y que emergerían en situaciones de daño específicas, activándose y proliferando (Bird et al., 2008). Esta activación se daría principalmente cuando la capacidad replicativa de los hepatocitos maduros se viera comprometida a causa de toxinas como el alcohol, o también cuando los

colangiocitos no pudieran restaurar su propia población (Kaur et al., 2015). Además, estas células tienen un potencial clonogénico y de bipotencialidad, con la capacidad de diferenciarse tanto a hepatocitos como a colangiocitos (Dorrell et al., 2011; Shin et al., 2011). Por último, aunque la visión más aceptada es que las CPH se originan a partir de un precursor de origen intrahepático situado en el canal de Hering, (Paku et al., 2001), existen otros estudios que sugieren que otros tipos celulares podrían dar lugar a las CPH.

Las CPH surgen cuando el hígado sufre un daño y la capacidad de proliferación de los hepatocitos se ve afectada (Fausto, 2004). El modelo experimental mejor establecido para inducir la activación de las células ovas es el de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) / PH en rata. Este modelo consiste en la inducción de 2-AAF para promover el bloqueo de la proliferación de los hepatocitos, seguido de una PH (Evarts et al., 1987). Como consecuencia, las CPH se activan y proliferan en las áreas periportales. Mediante el uso de este modelo experimental, varios estudios sugirieron que las CPH derivaban de los colangiocitos (Petersen et al., 1997). Sin embargo, debido a que en los modelos experimentales con rata no existe la posibilidad de hacer un seguimiento celular por “lineage tracing”, los estudios que se realizaron con posterioridad para determinar el origen de las CPH se llevaron a cabo en ratón.

Los ratones carecen de la enzima sulfotransferasa, por ello, con el fin de estudiar el origen de las CPH, se realizaron modelos de daño alternativos al de 2-AAF para inducir la activación de las células ovas, como la administración de la dieta DDC (Preisegger et al., 1999) o una dieta complementada con etionina y deficiente en colina (CDE)(Akhurst et al., 2005a). Sin embargo, a diferencia del modelo de rata 2-AAF/PH, estos dos modelos no comprometían la proliferación de los hepatocitos. Mediante la combinación de estos modelos de daño y la técnica de “lineage tracing” para el seguimiento específico de las BEC o los hepatocitos, varios estudios indicaron que ambas poblaciones epiteliales podían dar lugar a CPH (Español-Suñer et al., 2012; Furuyama et al., 2011; Rodrigo-Torres et al., 2014). Por un lado, mediante el marcaje de manera específica e irreversible de las BEC que expresaban Osteopontina (OPN) (Español-Suñer et al., 2012), Hnf1 β (de sus siglas en inglés, HNF1 Homeobox B) (Rodrigo-Torres et al., 2014), Krt19 (de sus siglas en inglés, Cytokeratin 19) (Schaub et al., 2014; Yanger et al., 2014) o Sox9 (Tarlow et al.,

INTRODUCCIÓN

2014a), se demostró que, en diferentes condiciones de daño, las CPH derivaban de las BEC. Además, estos resultados se confirmaron con posterioridad en modelos experimentales en los que se indujo el bloqueo de la proliferación de hepatocitos mediante manipulación genética (Lu et al., 2015; Raven et al., 2017a), confirmando de esta manera los resultados que se habían observado previamente en el modelo de 2-AAF en rata. Por otro lado, otros estudios en los que se realizó el seguimiento de la población de hepatocitos, también demostraron la contribución de esta población epitelial a la generación de las CPH (Tarlow et al., 2014b; Yanger et al., 2013a, 2014).

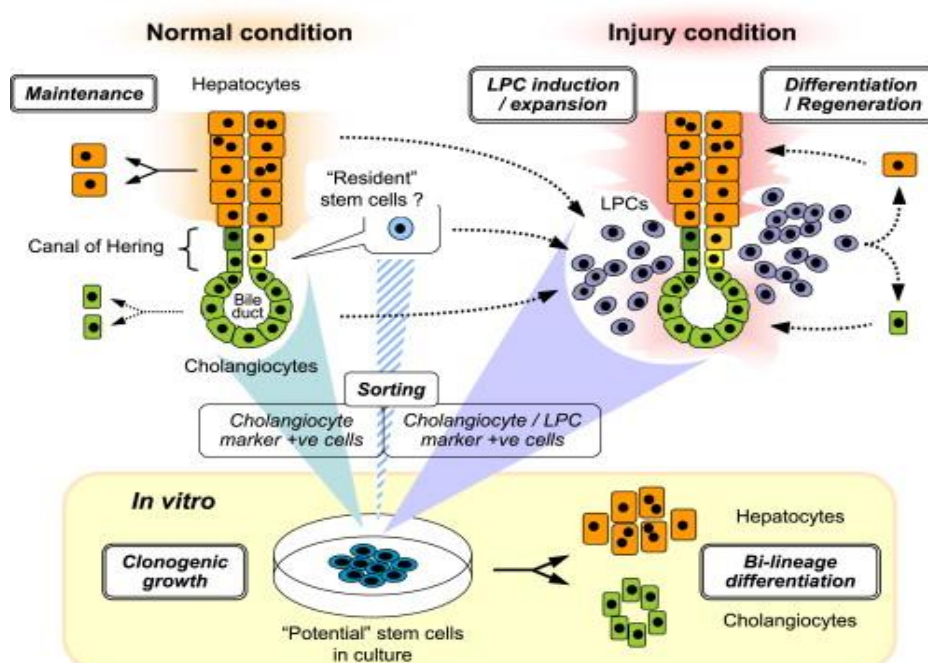


Figura 5. Células progenitoras hepáticas en homeostasis y en respuesta al daño. Imagen extraída de Miyajima A et al, *Cell Stem Cell*, 2014.

2.3.2. Caracterización de las CPH

Se han descrito numerosos marcadores para caracterizar las CPH, sin embargo, la mayoría de estos marcadores no son únicos y exclusivos de esta población, sino que comparten expresión con colangiocitos y/o hepatocitos, e incluso con hepatoblastos embrionarios. Esto se debe a la progresiva diferenciación de las CPH, que conlleva cambios en la expresión génica y en la morfología, lo que reflejaría la heterogeneidad

fenotípica de esta población (Bird et al., 2008). Además, el fenotipo también se ve condicionado por el tipo de daño, y la gravedad de la enfermedad (Kaur et al., 2015).

En base a los numerosos estudios de caracterización, se considera que las CPH presentan un fenotipo de transición entre los hepatocitos y las células biliares, expresando marcadores del epitelio biliar como Krt7 (de sus siglas en inglés, Cytokeratin-7) y Krt19, y marcadores de hepatocitos como la albúmina, Krt8 y Krt18, pero también el marcador de hepatoblastos AFP (de sus siglas en inglés, Alpha fetoprotein) (Kuhlmann and Peschke, 2006) y marcadores de células madre como c-kit (Fujio et al. 1994), CD34 (Baumann et al. 1999), Sca-1 (Petersen et al. 2003), CD133 (Rountree et al. 2007), EpCAM (de sus siglas en inglés, Epithelial cell adhesion molecule) (Okabe et al., 2009), Sox9 y el marcador neural NCAM, entre otros (Kaur et al., 2015). Además, las CPH también fueron identificadas por el anticuerpo A6, que se dirige a un epítipo desconocido de las células ovales (Petersen et al., 2003), o por el anticuerpo Mic1-1c3, que reconoce las células ductales (Dorrell et al., 2011).

Mediante el uso de marcadores específicos, varios estudios han intentado aislar CPH, y han revelado que ciertas características como la actividad de la aldehído deshidrogenasa, Epcam o gp38 (Eckert et al., 2016) se encontraban expresadas tanto en condiciones fisiológicas como de daño, sin embargo, había otras que se observaban únicamente en respuesta a una lesión (Dollé et al., 2012; Okabe et al., 2009). Así, se observó que Trop2 (Tacstd2, de sus siglas en inglés, Tumor Associated Calcium Signal Transducer 2), molécula transmembrana paróloga de EpCAM, se expresaba en las CPH en un modelo de daño inducido por dieta DDC, mientras que estaba ausente en los colangiocitos en condiciones fisiológicas (Okabe et al., 2009). Del mismo modo, el factor de transcripción Foxl1, también se encontraba expresado en las CPH únicamente tras el daño (Sackett et al., 2009). Más recientemente, se descubrió que Lgr5, que es un marcador de células madre bien establecido en el intestino, también se expresaba en las CPH en el hígado dañado (Huch et al., 2013a). Además, las células madre Lgr5⁺ podían aislarse y expandirse *in vitro*, mediante un sistema de cultivo en 3D, y retener el potencial de diferenciación a lo largo del tiempo.

INTRODUCCIÓN

Recientemente, la heterogeneidad de las CPH también se ha puesto de manifiesto en estudios de secuenciación de RNA de célula única (scRNAseq) de células EPCAM⁺ aisladas de ratones con DDC (Pepe-Mooney et al., 2019; Planas-Paz et al., 2019).

2.3.3. Mecanismos de regulación de las CPH

2.3.3.1. Proliferación de las CPH

La activación y expansión de las CPH se ha detectado en una amplia variedad de enfermedades hepáticas, incluyendo ALD (Roskams et al., 2003a), NAFLD, la hepatitis viral crónica (Lowe et al., 1999) y la enfermedad hepática colestásica (Roskams et al., 1998). Además, la activación de las CPH viene acompañada del reclutamiento de células inmunitarias, la remodelación de la ECM y la activación de los miofibroblastos (So et al., 2020).

Los mecanismos moleculares que regulan la activación de las CPH se han estudiado ampliamente utilizando modelos animales de daño crónico. Jung Y *et al*, observaron que los hepatocitos en proceso de apoptosis, debido a la supresión específica del inhibidor kappa B quinasa, producían ligandos hedgehog (Hh) que promovían la activación de las CPH (Jung et al., 2010). Del mismo modo, Li D *et al*, demostraron que la delección específica de survivina en los hepatocitos inducía la apoptosis y la inflamación de los mismos, lo que conducía a la activación de las CPH (Li et al., 2013). Estos estudios apoyan el hecho de que la proliferación ineficiente de los hepatocitos da lugar a la activación de las CPH. Recientemente se ha descrito que YAP y MTORC1 promueven la expansión de las BEC y CPH en ratones, y que regulan de manera positiva el crecimiento de organoides derivados de BEC *in vitro* (Planas-Paz et al., 2019).

Además, se ha observado la asociación entre las células inflamatorias y la activación y proliferación de las CPH. Así, las KC son capaces de activar a las CPH mediante la secreción de TWEAK (de sus siglas en inglés, Tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis), el cual se une al receptor Fn14 en las CPH (Jakubowski et al., 2005). Además, los hepatocitos que sobreexpresan TWEAK también promueven la proliferación de las CPH a través de la vía de NFkB (de sus siglas en inglés, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Jakubowski et al., 2005; Tirnitz-Parker

et al., 2010). Del mismo modo, los monocitos, los macrófagos y las propias CPH producen TNF, lo que conduce a la activación y expansión de las mismas (Eckert et al., 2016). De hecho, ratones deficientes en el receptor 1 de TNF (TNFR1) mostraron una respuesta disminuida de la activación de las CPH en un modelo de daño inducido por CDE (Knight et al., 2000).

En la misma línea, otros factores que median la proliferación de las CPH son la isoenzima ciclooxigenasa (COX-2), que media la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, y RAGE (de sus siglas en inglés, receptor for advanced glycation endproducts), que se une a diversas moléculas que derivan de células dañadas, como HMGB1 (de sus siglas en inglés, high mobility group box 1) o la molécula S100. (Davies et al., 2006; Pusterla et al., 2013). Además de las moléculas inflamatorias, también se ha demostrado que las hormonas, las adipoquinas y los neurotransmisores afectan a la respuesta de las CPH (Fausto et al., 2012). También se ha descrito que los factores de crecimiento, HGF y FGF7, derivados de las CEH, influyen en la proliferación de las CPH (Ishikawa et al., 2012; Takase et al., 2013).

Otras moléculas como la interleucina-6 (IL-6) (Yeoh et al., 2007), la linfotóxina beta (LT β) (Akhurst et al., 2005b; Ruddell et al., 2009), la galectina-3 (Hsieh et al., 2015) y el VEGF (Franchitto et al., 2013) también influyen en la activación de las CPH.

Por último, también se han descrito algunos mecanismos de regulación negativa de la proliferación de las CPH. En este sentido, los ligandos del receptor X del hígado (LXR) (Wang et al., 2017b) y del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) (Faust et al., 2013) bloquean la proliferación de las CPH mediante el bloqueo del ciclo celular. Además, TGF β 1 (Thenappan et al., 2010) e Interferon alpha (Lim et al., 2006) inhiben la proliferación de las CPH en modelos de daño inducidos por dieta DDC y CDE.

2.3.3.2. Migración de las CPH

Se ha descrito que la somatostatina y la vía de PI3K están implicadas en la migración de las CPH (Jung et al., 2012). Experimentos *in vitro* han demostrado el papel de la vía SDF-1 α /CXCR4 (de sus siglas en inglés, Stromal cell-derived factor-1 alpha/CXC chemokine receptor 4) en la migración de las células madre mesenquimales de la médula ósea y de

INTRODUCCIÓN

las CPH (Hatch et al., 2002). Además, se ha observado que la pleiotrofina y su receptor controlan la movilización de las CPH, regulando así la intensidad de la RD (Michelotti et al., 2016).

2.3.3.3. Diferenciación de las CPH

Como se ha mencionado anteriormente, las CPH son células facultativas con capacidad para diferenciarse hacia hepatocitos y colangiocitos. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos por los cuales las CPH se diferencian hacia los distintos linajes. Los primeros estudios describieron el papel de HGF (Ishikawa et al., 2012) y de la oncostatina M (Bird et al., 2008) en la diferenciación de las CPH hacia hepatocitos. Más tarde, Boulter *et al*, demostró que la activación de Wnt en las CPH inducía la diferenciación hacia un fenotipo hepatocitario, mientras que la activación de Notch promovía la diferenciación hacia un fenotipo colangiolar (Boulter et al., 2012). Mediante el estudio de un modelo de daño inducido por DDC, caracterizado por la afectación de los colangiocitos, se observó que la expresión del ligando de Notch, Jagged 1, en los fibroblastos periportales, promovía la activación de la vía de Notch en las CPH; de manera contraria, en un modelo de daño inducido por CDE, caracterizado por un daño hepatocitario, la fagocitosis de debris de hepatocitos inducía la activación de la vía de Wnt en los macrófagos, y en consecuencia la diferenciación de las CPH hacia hepatocitos (Boulter et al., 2013). Estos resultados coincidían con publicaciones anteriores en las que se describía el papel de la vía de Notch y de Wnt en las enfermedades hepáticas humanas (Spee et al., 2010a). Además, también se ha mostrado que Jagged 1 hace sinergia con TGF β impulsando la diferenciación hacia un fenotipo biliar (Kaylan et al., 2016).

2.3.4. Interacción de las CPH y el microambiente hepático

Como se ha descrito anteriormente, el nicho de las CPH constituye la parte más distal del árbol biliar, denominada canal de Hering (Theise et al., 1999). El nicho de las células madre se define como el microambiente celular y extracelular que rodea y mantiene a las células madre. Además, ayuda a mantener un equilibrio entre la autorrenovación y la maduración/diferenciación en aquellas situaciones que lo requieren. En un contexto

de daño, la respuesta de las CPH viene determinada por su microambiente (Boulter et al., 2013), el cual proporciona señales clave que influyen en la actividad de las CPH. El nicho de las CPH consiste en células epiteliales (colangiocitos y hepatocitos), CEH, LSECs y células inmunitarias. A continuación, describiremos los estudios más relevantes sobre la interacción entre las CPH y los diferentes tipos celulares, así como entre las CPH y la ECM.

2.3.4.1. CPH y fibrosis

En las enfermedades hepáticas crónicas, la expansión de las CPH se ha correlacionado con el grado de inflamación, fibrosis y severidad de la enfermedad (Lowes et al., 1999; Roskams et al., 2003b), indicando la asociación entre las CPH y la fibrosis hepática. Las CEH, las cuales juegan un papel principal en la respuesta fibrogénica, se activan por medio de citoquinas inflamatorias, y pasan de un fenotipo quiescente a un fenotipo miofibroblástico (Friedman, 2008). Tras su activación, las CEH promueven la formación de ECM y el aumento de la fibrosis, lo cual influye en la proliferación y la diferenciación de las CPH. Además, las CEH producen varios factores de crecimiento, como TGF- α , HGF, FGF, y TNF, que afectan directamente al crecimiento y la proliferación de las CEH (Chen et al., 2012).

Por otro lado, las CPH también promueven la fibrosis periportal mediante la secreción de una variedad de factores de crecimiento, incluyendo TGF β y Hh (Kaur et al., 2015). También se ha descrito que la vía de LT β desempeña un papel importante en la interacción entre las CEH y las CPH. Las CPH que expresan LT β actúan de forma paracrina sobre las CEH, mediando el reclutamiento de CPH, CEH y leucocitos necesarios para la reparación de daño. El papel de la vía de LT β en la fibrogénesis se confirmó en un modelo murino de daño crónico que presentaba la delección del receptor de LT β , y como consecuencia presentaba un menor grado de fibrosis (Ruddell et al., 2009). La OPN es otra señal paracrina que desencadena la activación de las CEH y la producción de ECM (Coombes et al., 2015). Además, también se ha visto que Dlk-1, un ligando no-canónico de Notch derivado de las CPH, también activaría directamente las CEH (Pan et al., 2011).

INTRODUCCIÓN

2.3.4.2. Interacción entre las CPH y la ECM

La remodelación de la ECM es crucial en la actividad de las CPH, incluyendo su activación, proliferación y migración hacia el tejido dañado (Van Hul et al., 2009; Vestentoft et al., 2013). Una producción aberrante de ECM y la subsiguiente alteración de las citoquinas y las señales de crecimiento determinarán el microambiente de las CPH. Además, la rigidez de la matriz también es relevante en la capacidad de diferenciación de las CPH (Kourouklis et al., 2016). Van Hul *et al*, demostraron que, en un modelo murino de daño inducido por CDE, la deposición de colágeno-I y laminina tenía lugar de manera previa a la activación de las CPH, probablemente, para proporcionar una matriz específica para las CPH (Van Hul et al., 2009; Kallis et al., 2011).

El papel de la laminina (componente de la ECM) en la actividad de las CPH, es decir, su capacidad de proliferación y su estado de diferenciación, ha sido ampliamente estudiado (Clayton and Forbes, 2009). Kallis Y.N. *et al*, utilizaron modelos experimentales de ratón resistentes a la degradación de la metaloproteinasa de la matriz (MMP, de sus siglas en inglés, Matrix metalloproteinases), y mostraron una respuesta atenuada de las CPH durante la regresión del daño inducido por CCl₄, lo que sugería la asociación de la remodelación de la ECM y la activación de las CPH (Kallis et al., 2011). De hecho, la degradación de la ECM junto con la producción de un microambiente rico en laminina promovía la expansión de las CPH e inhibía su diferenciación hacia un fenotipo hepatocitario (Kallis et al., 2011). De manera contraria, se ha observado que la pérdida de un ambiente enriquecido en laminina induce la diferenciación a hepatocitos (Lorenzini et al., 2010). Estos resultados apoyan el hecho de que en la AH haya una escasa contribución de las CPH a hepatocitos maduros, pues en estos pacientes se ha observado un aumento en la expresión de laminina (Dubuquoy et al., 2015a).

2.3.4.3. Interacción entre las CPH y las células inmunes

La activación de las CPHs viene acompañada por el reclutamiento de células inflamatorias. En respuesta a un daño, las células inmunes residentes, principalmente las KC, reclutan monocitos inflamatorios, precursores mieloides, y neutrófilos, para

cooperar en la respuesta inflamatoria (Eckert et al., 2015). Como se ha descrito anteriormente, los factores secretados por las KC influyen en la respuesta de las CPH a un daño (Viebahn et al., 2010), sin embargo, el análisis de un modelo de ratón con daño inducido por dieta CDE mostró que las CPH también expresaban quimiocinas como CCL2 y CX(3)CL1, las cuales inducían el reclutamiento de macrófagos (Viebahn et al., 2010). Además, también se ha descrito la interacción de las CPH con otras poblaciones inflamatorias como las células dendríticas, los linfocitos T y las NK (de sus siglas en inglés, Natural Killer) (Lukacs-Kornek and Lammert, 2017).

2.3.4.4. CPH y angiogénesis

La actividad de las CPH se ha asociado a la angiogénesis o formación de nuevos vasos. Mientras que en un paciente sano las BEC expresan niveles muy bajos de VEGF así como de los receptores de VEGF, en muestras de hígados de pacientes con cirrosis se ha observado un aumento de la expresión de VEGF-A, VEGF-C y de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-3 en las CPH (Franchitto et al., 2013). En este contexto, la expresión de VEGF en las CPH impulsa la proliferación de las LSEC, pero también promueve la activación de los colangiocitos y las CPH de forma autocrina y paracrina (Gaudio et al., 2005). Además, en pacientes con cirrosis biliar primaria (PBC, de sus siglas en inglés, Primary biliary cirrhosis), se ha descrito que el número de nuevos vasos se correlaciona con el nivel de activación de las CPH (Franchitto et al., 2013). Recientemente, un estudio de nuestro grupo demostró que las CPH promueven la angiogénesis intrahepática a través de la señalización de SLIT2-ROBO1 (de sus siglas en inglés, Slit2-Roundabout 1) en un modelo experimental de daño inducido por DDC. Además, se observó que en pacientes con ALD severa, la expresión de SLIT2-ROBO1 correlacionaba de manera positiva con la extensión de la RD y la gravedad de la enfermedad (Coll et al., 2022). Estos resultados indican la asociación de las CPH y la angiogénesis, sin embargo, la interacción entre las CPH y las LSEC requiere una mayor exploración.

Los mecanismos de regulación de las CPH así como su interacción con el microambiente se ha resumido en la **Figura 6**

INTRODUCCIÓN

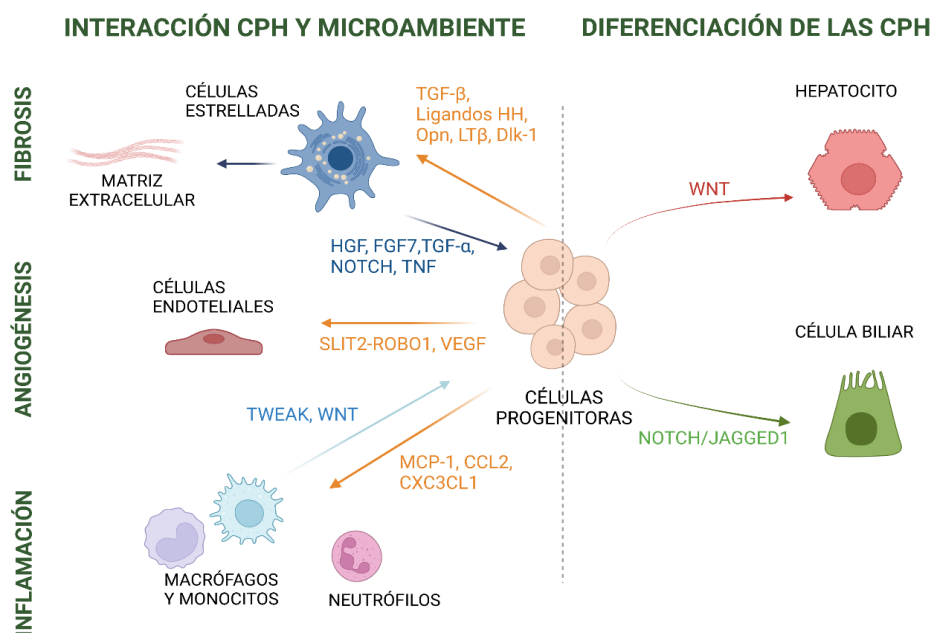


Figura 6. Interacción de las células progenitoras hepáticas (CPH) y el microambiente hepático, activación de las CPH y diferenciación de las CPH.

2.3.5. Las CPH en las enfermedades hepáticas

Como se ha mencionado anteriormente, la expansión de la RD y las CPH tiene lugar cuando la capacidad de replicación de las células epiteliales del hígado está comprometida. Así, un primer estudio demostró que pacientes con daño hepático agudo (ALF, de sus siglas en inglés, acute liver failure) y una necrosis hepática masiva, combinado con la incapacidad de replicación de los hepatocitos restantes, presentaban una RD prominente (Katoonizadeh et al., 2006a). En las enfermedades hepáticas crónicas, la extensión de la RD se correlacionó con la severidad de la enfermedad (Gouw et al., 2011; Guldiken et al., 2016a; Lowes et al., 1999; Machado et al., 2015; Weng et al., 2015). En pacientes con NAFLD, la expansión de la RD se correlacionó positivamente con la ineficiente capacidad de replicación de los hepatocitos, el grado de fibrosis y el aumento de la inflamación portal, caracterizada por macrófagos y linfocitos (Gadd et al., 2014b; Richardson et al., 2007). Del mismo modo, los pacientes con enfermedad hepática crónica por virus C, presentaron un alto grado de RD, acompañado de una extensa fibrosis y un mayor número de CEH activadas (Clouston et al., 2005; Helal et al., 2018; Prakoso et al., 2014).

Es importante destacar que, aunque la RD se activa y expande en la mayoría de las formas de daño hepático severo y crónico, existen diferencias fenotípicas en función de la etiología y la severidad de la enfermedad. En este contexto, podemos encontrar desde ductos biliares bien formados con un lumen claro hasta ductos más desorganizados sin lumen evidente (Gouw et al., 2011). Así, estudios recientes han tratado de caracterizar la RD presente en diferentes etiologías, mostrando por ejemplo, que el fenotipo de la RD en una PBC y en una cirrosis esclerosante primaria (PSC, de sus siglas en inglés, Primary sclerosing cholangitis) es diferente, así como las vías de señalización que promueven la activación de las CPH (Carpino et al., 2018). Del mismo modo, Govaere *et al.*, aislaron por microdissección láser (LCM, de sus siglas en inglés, Laser capture microdissection) las células de la RD de pacientes con VHC y PBC, y encontraron que las CPH de las muestras de VHC, estaban enriquecidas en genes relacionados con la neoangiogénesis, mientras que las CPH de muestras con PBC estaban enriquecidas en genes relacionados con el estrés oxidativo (Govaere et al.).

En cuanto al perfil inflamatorio de la RD, un estudio reciente demostró el papel de la señalización de NF- κ B a través de RELB en la proliferación de CPH en diferentes enfermedades hepáticas, como PSC, PBC, NASH, hepatitis autoinmune, hepatitis viral y ALD. Además, la supresión de RELB en un modelo de ratón con DDC, redujo el reclutamiento inflamatorio, y el grado de fibrosis, apoyando el papel de las CPH en la inflamación (Elßner et al., 2019).

El papel de las CPH en la carcinogénesis hepática ha sido motivo de debate durante mucho tiempo (Sia et al., 2017). La asociación de la RD con la progresión de la enfermedad y el hecho de que casi el 50% de las muestras de pacientes con HCC expresen marcadores de BEC, han sugerido que las CPH podrían jugar un papel en la carcinogénesis (Roskams, 2006). Además, se ha observado una fuerte correlación entre la presencia de las células de la RD en las zonas peritumorales y el grado de inflamación y fibrosis (Ko et al., 2020). Sin embargo, a día de hoy, se desconoce el papel y el impacto de la RD en la carcinogénesis.

En conjunto, estas investigaciones han demostrado que la RD constituye una población heterogénea de células, cuyo fenotipo y funcionalidad se ve claramente afectado por el

INTRODUCCIÓN

tipo de daño y el grado de severidad. Por esta razón, uno de los objetivos de esta tesis ha consistido en el estudio exhaustivo del perfil de expresión génica de la RD en pacientes con AH, así como el impacto de la RD en el reclutamiento de células inflamatorias, y la inflamación sistémica.

3. REGENERACIÓN HEPÁTICA EN DAÑO CRÓNICO: PLASTICIDAD CELULAR

Como se ha descrito en las secciones anteriores, la regeneración del hígado está mediada por la replicación de ambas poblaciones epiteliales, los hepatocitos y los colangiocitos (**Figura 7**), sin embargo, ante un daño agudo o crónico severo, la capacidad regenerativa del hígado se ve comprometida. La evaluación histológica de muestras de hígado de pacientes con enfermedad hepática crónica ha mostrado que existe un aumento del número de hepatocitos senescentes, lo que conlleva a la incapacidad de estas células para proliferar y regenerar el parénquima hepático (WIEMANN et al., 2002). En estas circunstancias, la plasticidad de las células epiteliales se ha sugerido como un mecanismo alternativo de regeneración hepática, en el que los hepatocitos y los colangiocitos podrían actuar como "células madre facultativas" entre sí (**Figura 7**) (Michalopoulos and Khan, 2015).

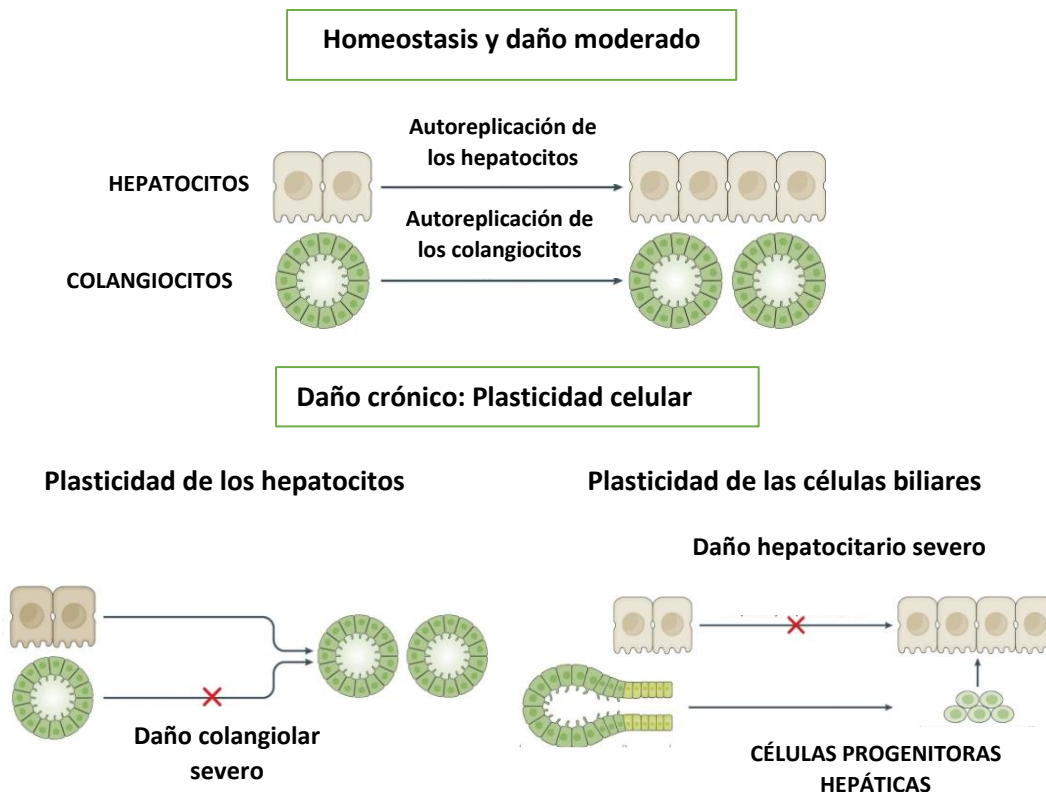


Figura 7. Regeneración hepática en condiciones standard y en un contexto de daño crónico. Imagen adaptada de Michalopoulos and Bhushan, *Nature Review Gastroenterology and Hepatology*, 2020.

3.1. Plasticidad de los hepatocitos

La plasticidad hepatocitaria se define como el proceso mediante el cual los hepatocitos adquieren de manera progresiva rasgos biliares mientras reducen las características y la competencia funcional de los hepatocitos. La reprogramación de los hepatocitos hacia un fenotipo biliar se observó por primera vez en un modelo de rata, en el que se trasplantaron hepatocitos dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV)⁺ a ratas (DPPIV)⁻. A continuación, las ratas fueron sometidas a una BDL y tras 30 días de recuperación, el 1,75% de las células biliares KRT7⁺ eran DPPIV⁺. Además, un tratamiento previo con 4,4-metilendianilina, que inhibe la proliferación biliar, multiplicó por 36 el porcentaje de células biliares DPPIV⁺, lo que sugirió la capacidad de los hepatocitos para regenerar el epitelio biliar (Michalopoulos et al., 2005). Resultados similares se observaron mediante “lineage tracing” en hígados de ratones quiméricos, en los cuales, hepatocitos β -Gal-positivos y ROSA26R-mTmg trasplantados, se transdiferenciaron hacia un fenotipo biliar (Nagahama et al., 2014; Tarlow et al., 2014c). De manera interesante, Tarlow B *et al*, observaron que cuando el daño cesaba, los hepatocitos desdiferenciados eran capaces de revertir su fenotipo hacia un hepatocito maduro (Tarlow et al., 2014b). La reprogramación de hepatocitos a BEC también se observó en ratones Mx1-Cre-ROSA26R en los que se indujo daño por DDC, pero también cuando los ratones fueron sometidos a un daño más hepatotóxico mediado por CCL4 o TAA (de sus siglas en inglés, Thioacetamide) (Nagahama et al., 2014). Además, Font-Burgada *et al*, demostraron que en respuesta a un daño por DDC, un 10% de los hepatocitos periportales sufrían grandes cambios morfológicos, perdiendo la expresión del factor nuclear de hepatocito (HNF4 α , de sus siglas en inglés, Hepatocyte nuclear factor 4-alpha) y aumentando la expresión de marcadores biliares como Sox9 y Opn (Font-Burgada et al., 2015b) (**Figura 8**). De manera interesante, Han *et al*, demostraron que tras un daño, un único hepatocito Sox9⁺ tenía la capacidad de diferenciarse hacia un fenotipo biliar o hacia un hepatocito, sugiriendo que los hepatocitos Sox9⁺ podrían tener bipotencialidad (Han et al., 2019).

3.1.1. Mecanismos moleculares que regulan la plasticidad de los hepatocitos

Muchas de las vías de señalización que regulan la proliferación del epitelio biliar también se han observado en la reprogramación de los hepatocitos. En un hígado sano, se ha visto que la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de Notch1, NICD o Yap, induce la desdiferenciación de los hepatocitos (Yanger et al., 2013a; Yimlamai et al., 2014). En consecuencia, ratones con la delección de NICD o Yap, no mostraban reprogramación de hepatocitos a BEC (Li et al., 2019b; Yanger et al., 2013b). Dado que la vía de Notch actúa downstream de la vía de Hippo, se sugirió que la vía Hippo podría regular la plasticidad de los hepatocitos a través de la señalización de Notch (Yimlamai et al., 2014).

La reprogramación inducida por Yap también se ha observado en un modelo de daño inducido por DDC (Pepe-Mooney et al., 2019) (**Figura 8**). En este contexto, se demostró que la delección genética de Lgr4 y Lgr5 en los hepatocitos era prescindible para la inducción de Sox9 en los hepatocitos; en contraste con un estudio anterior, el cual mostraba que la sobreexpresión de β -catenina de manera específica en los hepatocitos conducía a la reprogramación de los mismos (Okabe et al., 2016). La respuesta de los hepatocitos a Yap también se ha asociado a la remodelación de la cromatina. Weiping Li *et al*, identificaron que Arid1a, componente del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF, participaba en la capacidad de los hepatocitos para desdiferenciarse en respuesta a Yap (Li et al., 2019b).

En lo que se refiere a las enfermedades genéticas, el síndrome de Alargille se caracteriza por una alteración del desarrollo del árbol biliar. En este contexto, se observó que vía TGF β , los hepatocitos eran capaces de reprogramarse con el fin de regenerar el epitelio biliar en un modelo murino (**Figura 8**). De hecho, la delección específica del receptor de TGF β II en los hepatocitos, redujo significativamente la capacidad de los hepatocitos para transdiferenciarse (Schaub et al., 2018)

La transdiferenciación de los hepatocitos también se ha considerado como un proceso maladaptativo ya que han dado lugar a la aparición tanto de CCA (de sus siglas en inglés,

INTRODUCCIÓN

cholangiocarcinoma) intrahepático (Fan et al., 2012) como de HCC (Mu et al., 2015). Estas células tumorales se caracterizaban por una pérdida de identidad hepatocitaria, y por el aumento de expresión de marcadores biliares como Sox9, Krt19 y AFP. Curiosamente, un estudio reciente *in vitro* demostró que la sobreexpresión de RAS en organoides de hepatocitos humanos daba lugar a células de CCA como resultado de la transdiferenciación de los hepatocitos (Sun et al., 2019).

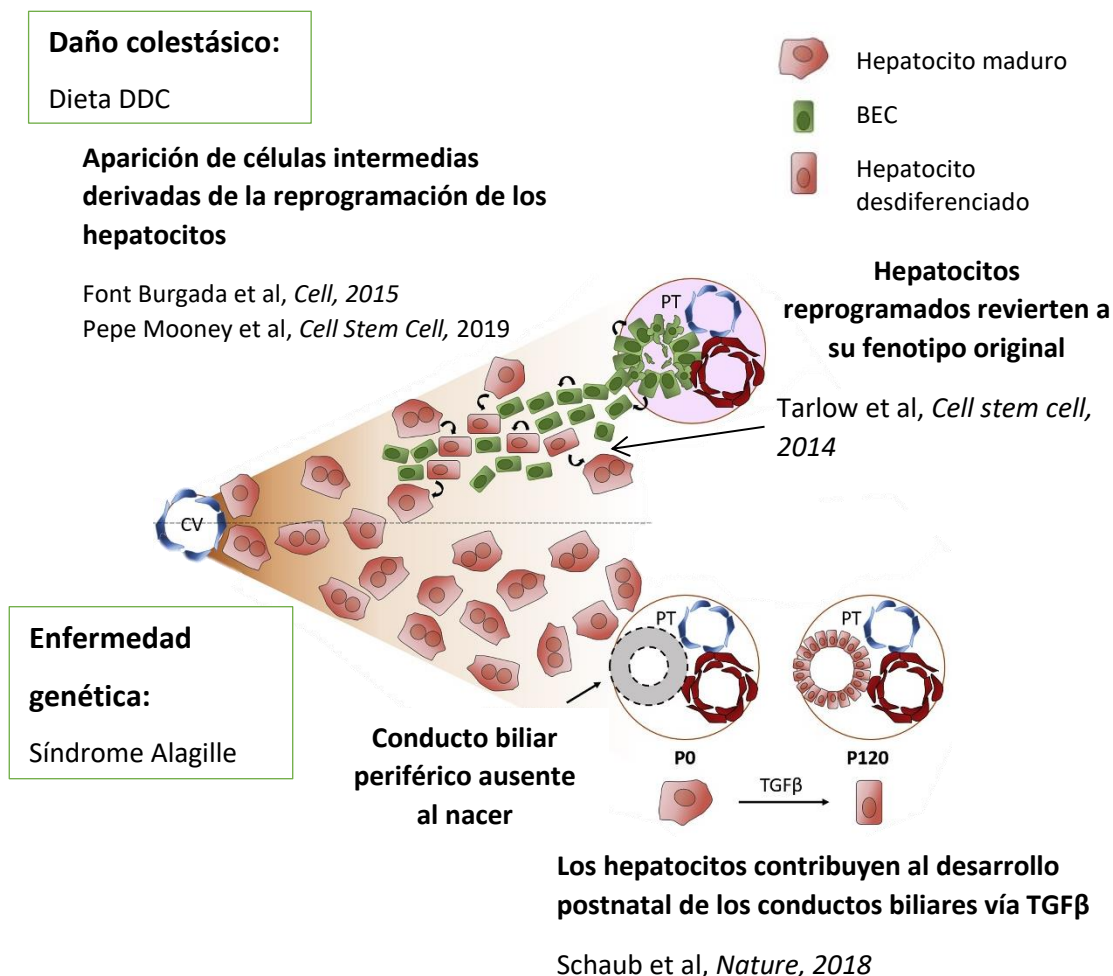


Figura 8. Plasticidad de los hepatocitos. Imagen adaptada de Gadd et al, *Cell Stem Cell*, 2020.

3.2. Plasticidad de las BEC

El papel de las BEC en la regeneración hepática ha sido objeto de estudio durante muchos años, y se ha estudiado mediante el uso de la técnica de “lineage tracing” en modelos murinos. A través del marcaje de BEC que expresaban *Opn* (Español-Suñer et al., 2012) o *HNF1β* (Rodrigo-Torres et al., 2014), y la administración de un daños agudo

(APAP, PH o inyección única de CCl₄) o un daño crónico por CCl₄, los primeros estudios no mostraron contribución de las BEC en la formación de nuevos hepatocitos. Se sugirió que estos resultados podían deberse a que estos modelos de daño hepático presentaban una RD limitada, y a que la capacidad proliferativa de los hepatocitos no estaba altamente afectada. Sin embargo, cuando se administró una dieta CDE durante 3 semanas, seguida de un periodo de 2 semanas sin daño, se observó algo de contribución, aunque limitada, de las BEC a hepatocitos (alrededor del 2%) (**Figura 9**). Por el contrario, el daño hepático inducido por DDC no dio lugar a hepatocitos derivados de BEC (Español-Suñer et al., 2012; Rodrigo-Torres et al., 2014). Como se ha mencionado anteriormente, un microambiente rico en laminina puede desempeñar un papel crucial en la capacidad de las células biliares para diferenciarse hacia los hepatocitos, y esto podría explicar porque en el daño por DDC, donde hay una lámina gruesa de laminina, no hay contribución a la regeneración de los hepatocitos. De hecho, Español-Suñer *et al*, demostraron que la inhibición del depósito de laminina en un modelo de daño por CDE aumentaba hasta un 3,26% la extensión de los hepatocitos derivados de BEC (Español-Suñer et al., 2012).

Una de las posibles explicaciones a esta contribución tan limitada de las BEC a la generación de nuevos hepatocitos, es, que la capacidad proliferativa de los hepatocitos no se ve completamente alterada, y por lo tanto, no refleja realmente lo que ocurre en la enfermedad hepática crónica humana. Con el fin de abordar esta limitación y mimetizar mejor lo que sucede en la enfermedad hepática, estudios recientes han llevado a cabo modificaciones genéticas para promover la parada replicativa de los hepatocitos (Raven et al., 2017b; Russell et al., 2018) (**Figura 9**). De esta manera, Raven *et al*, indujeron la delección de la integrina $\beta 1$ en los hepatocitos mediante la administración del adenovirus AAV8.TBG.cre, seguido de la administración crónica de una dieta deficiente en metionina y colina (MCD, de sus siglas en inglés, methionine choline- deficient), TAA o DDC, y un posterior periodo de recuperación. La supresión de la integrina $\beta 1$ indujo un aumento de la expresión de p21 en los hepatocitos y una deficiente proliferación de los mismos. A partir del día 7 del periodo de recuperación, se empezaron a observar hepatocitos derivados de BEC, alcanzando el 20-30% del parénquima total al día 14 (Raven et al., 2017a). También se mostraron resultados

INTRODUCCIÓN

parecidos tras la supresión de β -catenina en hepatocitos en un modelo de daño inducido por CDE (Russell et al., 2018). Dado que la senescencia de los hepatocitos se ha observado en pacientes con enfermedad hepática crónica (Clouston et al., 2005), Raven *et al*, indujeron la sobreexpresión de P21 en prácticamente la totalidad de los hepatocitos mediante la administración del adenovirus AAV8.TBG.p21. A continuación, estos ratones fueron sometidos a un modelo de daño con dieta CDE, MCD o DDC durante 12 días y se realizó un seguimiento de los colangiocitos que expresaban Krt19, resultando en aproximadamente un 15% de hepatocitos derivados de colangiocitos. El análisis transcriptómico de los hepatocitos recién generados reveló su similitud con hepatocitos WT aislados de un modelo de ratón con dieta MCD seguido de un periodo sin dieta, mientras que resultaron ser transcripcionalmente diferentes de los colangiocitos (Raven et al., 2017a).

De manera alternativa a la manipulación genética, y con el fin de promover la diferenciación de BEC a hepatocitos, otros estudios han realizado modelos de daño crónico de larga duración (Deng et al., 2018; Manco et al., 2019) (**Figura 9**). De este modo, el tratamiento con TAA o DDC durante 24 semanas dio lugar a hepatocitos derivados de BEC (alrededor del 20 % del parénquima) (Deng et al., 2018). De manera similar, la diferenciación de hepatocitos durante la administración crónica de CCl4 durante 8 semanas representó el 12 % del parénquima hepático.

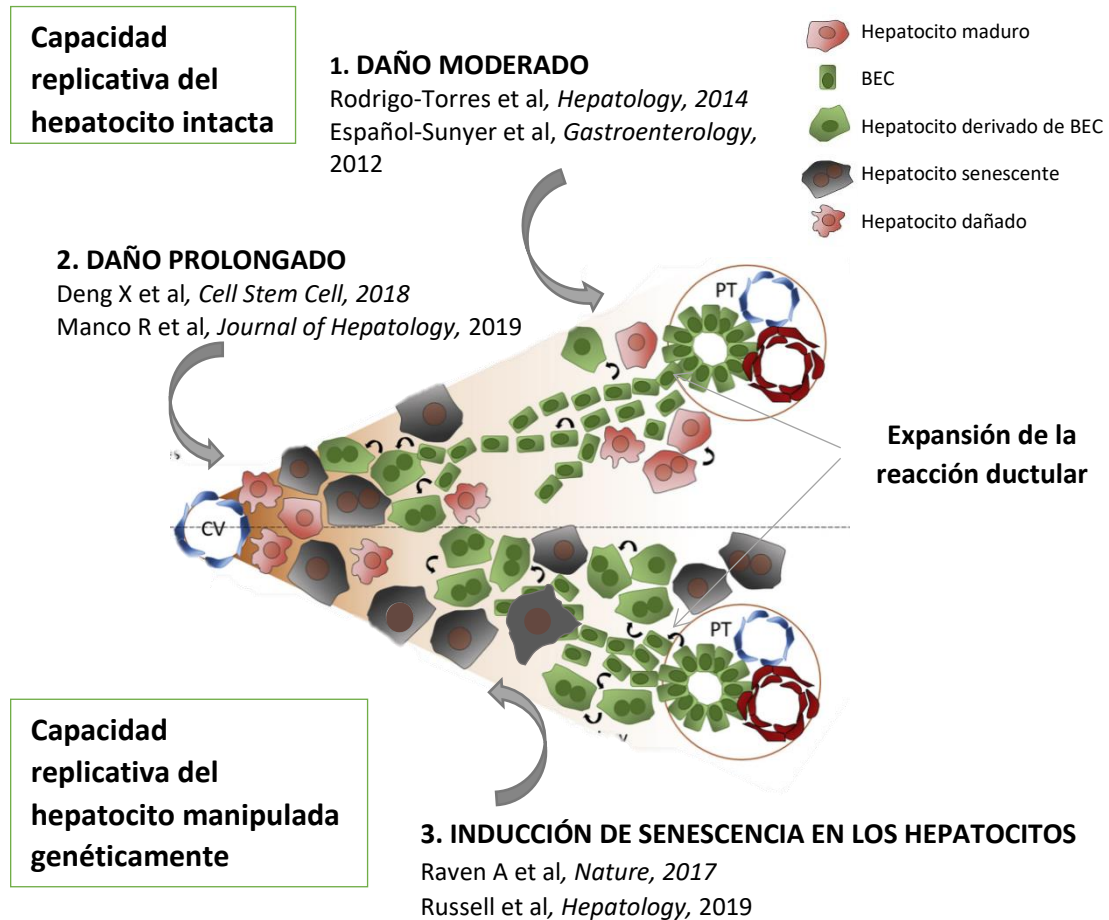


Figura 9. Plasticidad de las células biliares epiteliales. (1) En respuesta a un daño moderado apenas hay contribución de las BEC a la generación de nuevos hepatocitos. **(2)** En respuesta a un daño severo prolongado, aumenta la diferenciación de las BEC a hepatocitos **(3)** El bloqueo de la replicación de los hepatocitos aumenta el número de hepatocitos derivados de BEC. Imagen adaptada de Gadd *et al*, *Cell Stem Cell*, 2020.

3.2.1. Mecanismos moleculares que regulan la plasticidad de las BEC

Los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación de las BEC a hepatocitos *in vivo* son poco conocidos. Para elucidar las vías de señalización que regula el crecimiento y el potencial de diferenciación de las BEC, en los últimos años se ha desarrollado un sistema de cultivo de organoides biliares en 3D (explicado en detalle en la sección 4) (Huch et al., 2013a). La vía de Wnt/ β -catenina y su conocido gen diana, *Lgr5*, se han descrito en muchos nichos de células progenitoras (Barker et al., 2007a). También se han identificado células *Lgr5*⁺ en el epitelio biliar del hígado dañado. Tras su aislamiento, las células *Lgr5*⁺ experimentan una expansión clonal y forman estructuras biliares en forma de organoide (Huch et al., 2013a). A partir de estos organoides biliares se han

INTRODUCCIÓN

podido generar hepatocitos siguiendo un protocolo de diferenciación basado en la inhibición de la vía de Notch y TGF β .

Sin embargo, el papel de la señalización canónica de Wnt/ β -catenina en el epitelio biliar ha sido cuestionado recientemente, ya que se ha observado que ratones LRP5/6-knockout con la señalización Wnt canónica interrumpida pero con la señalización no canónica intacta, tienen una respuesta ductal equivalente a la de los animales WT (Okabe et al., 2016). En acuerdo con estos resultados, y en contraste con estudios anteriores, el análisis de scRNA-seq de colangiocitos de ratón aislados tras una lesión hepática inducida por DDC reveló que los genes diana de Wnt, Lgr5 y Axin2 no se expresaban en las BEC, y que la interrupción de los componentes de señalización Wnt/ β -catenina en los hepatocitos periportales no tenía ningún efecto sobre la RD (Planas-Paz et al., 2019).

Recientemente, se han investigado los mecanismos que promueven la autorrenovación y proliferación de las BEC adultas. Aloia *et al.*, analizaron los cambios transcripcionales de BEC EpCAM⁺ aisladas durante las primeras 24 h de cultivo en organoides. Identificaron la metilcitosina dioxigenasa 1 (TET1, de sus siglas en inglés, ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1) como un modificador epigenético crucial para la capacidad de autorrenovación de los organoides de BEC. Además, estos resultados se confirmaron *in vivo* utilizando un modelo de ratón con una mutación específica de TET1 en las BEC, que dio lugar a una RD menos proliferativa, y a una menor capacidad de las BEC para diferenciarse hacia hepatocitos (Aloia et al., 2019).

3.3. Plasticidad de las células epiteliales en la enfermedad hepática

A diferencia de la experimentación *in vivo*, encontrar evidencias de plasticidad celular en humanos presenta limitaciones obvias, como la imposibilidad de realizar experimentos de “lineage tracing”. Debido a esto, la mayoría de los datos humanos se basan en análisis histológicos y transcriptómicos. A pesar de esta limitación, hay varios estudios que sugieren que la plasticidad de las células epiteliales tiene una gran relevancia clínica en la regeneración del hígado. Así, la presencia de células con un fenotipo intermedio entre hepatocitos y células biliares se han identificado en muestras

de hígado humano de diferentes etiologías (VAN EYKEN et al., 1988; Katoonizadeh et al., 2006a; Matsukuma et al., 2012; Roskams et al., 2004; Sancho-Bru et al., 2012a; Stueck and Wanless, 2015). Sin embargo, en muchos casos se desconoce si estas células derivan de la diferenciación biliar, de la transdiferenciación de hepatocitos o de una combinación de ambas.

Las enfermedades hepáticas colestásicas se caracterizan por una afectación grave de los colangiocitos. En este contexto, se han observado células hepatobiliares que expresan el marcador de hepatocitos HNF4 α y el marcador biliar KRT7 (VAN EYKEN et al., 1988; Fabris et al., 2007) y se ha sugerido que estas células intermedias podrían proceder de la desdiferenciación de los hepatocitos. Por el contrario, las enfermedades que afectan principalmente a los hepatocitos se han asociado a la presencia de hepatocitos derivados de BEC, que se localizan en zonas necróticas del parénquima (Katoonizadeh et al., 2006b; Stueck and Wanless, 2015). Sin embargo, no está claro si estos nódulos regenerativos corresponden a hepatocitos supervivientes, o si derivan de la diferenciación biliar, o si es una combinación de ambos fenómenos (Fellous et al., 2009; Lin et al., 2010).

Dado que la expansión de la RD también se ha observado en las fases iniciales de la enfermedad hepática, se ha debatido si en estas circunstancias las células biliares tienen la capacidad de diferenciarse a hepatocitos o si este proceso sólo se produce cuando la proliferación de los hepatocitos está comprometida. Katoonizadeh *et al.*, revelaron que los pacientes con menos de 1 semana de daño no presentaban células intermedias, sin embargo, sí que se observaban en más del 70% de los pacientes cuando la duración de la afectación se mantenía entre 1-4 semanas, lo que sugería que la diferenciación de las BEC a hepatocitos se producía al menos después de 1 semana del insulto (Katoonizadeh et al., 2006b).

Por otro lado, la presencia de RD en ausencia de proliferación de hepatocitos no siempre se ha asociado con la regeneración del hígado. De hecho, los pacientes con AH se caracterizan por tener una gran extensión de RD, la cual se ha visto que correlaciona con la mortalidad a corto plazo de estos pacientes, indicando en este caso el papel patogénico de la RD (Dubuquoy et al., 2015a; Sancho-Bru et al., 2012a).

3.3.1. Mecanismos moleculares que regulan la plasticidad en la enfermedad hepática

Los mecanismos moleculares que impulsan la reprogramación de las células epiteliales en las enfermedades hepáticas siguen siendo en gran medida desconocidos, sin embargo, estudios recientes han mostrado el papel de la vía de TGF β y de HIPPO/YAP en la desdiferenciación de los hepatocitos en pacientes con ALF y AH (Argemi et al., 2019; Bou Saleh et al., 2021; Hyun et al., 2019, 2020). Argemi JM *et al*, revelaron que la ALD avanzada se asocia con una disminución de la actividad de los factores de transcripción enriquecidos en el hígado. De manera importante, el análisis de integración predijo una gran disminución del principal factor de transcripción de los hepatocitos, HNF4 α , y demostraron que TGF β 1 utiliza la subunidad P2 del promotor de HNF4 α en los hepatocitos para inducir la pérdida de identidad de los hepatocitos (Argemi et al., 2019). En el mismo contexto, Hyun *et al*, demostraron que la proteína reguladora ESRP2 (de sus siglas en inglés, Epithelial splicing regulatory protein 2), la cual controla la señalización de Hippo para mantener el fenotipo maduro de los hepatocitos, se encontraba inhibida en pacientes con AH severa. La inhibición continuada de ESRP2 promovía la atenuación de la vía de Hippo y por lo tanto la acumulación en el hígado de hepatocitos desdiferenciados con características inmaduras (Hyun et al., 2019). El mismo grupo también reveló el papel de Hippo/Yap en la reprogramación de hepatocitos en el contexto de ALF (Hyun et al., 2019). De nuevo, en la AH, Bou Saleh *et al*, también confirmaron el papel de YAP en la reprogramación de los hepatocitos y en la progresión de la enfermedad (Bou Saleh et al., 2021).

Estos estudios, junto con las evidencias histológicas, proporcionan pruebas convincentes de los procesos de plasticidad epitelial durante la patogénesis, y de que estos fenómenos podrían ser un mecanismo alternativo de regeneración hepática. Sin embargo, aún se desconoce el impacto de la plasticidad epitelial en la enfermedad hepática crónica. Por ello, el segundo objetivo de esta tesis pretende entender el impacto de la desdiferenciación de los hepatocitos en la progresión de la ALD, así como evaluar el perfil transcriptómico de las células intermedias que derivan de esta desdiferenciación y los posibles mecanismos moleculares que promueven su aparición.

4. ORGANOIDES PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA

La tecnología de los organoides se ha convertido en un modelo *in vitro* clave para estudiar el desarrollo y la enfermedad del hígado humano. Esta tecnología surgió con el fin de vencer las limitaciones que ofrece el acceso a muestras humanas, así como las diferencias intrínsecas que existen entre los modelos animales y los humanos.

4.1. Origen y conceptos básicos de los organoides

La tecnología de los organoides se estableció por primera vez en el laboratorio de Clevers en relación con el estudio de las células madre intestinales. Este hallazgo supuso un gran avance en el campo de las células madre, ya que permitió cultivar a largo plazo epitelios intestinales con capacidad de autorrenovación, y que imitaban la estructura de la cripta y las vellosidades, y la composición celular (Sato et al., 2009). Basándose en los profundos conocimientos sobre el microambiente de las células madre intestinales (Barker et al., 2007b), Sato *et al*, aislaron células madre adultas Lgr5+ del intestino delgado, y las cultivaron utilizando 1- un medio de cultivo suplementado con varios factores de crecimiento que permitía recapitular específicamente el nicho de las células madre intestinales y 2- Matrigel, que es una ECM obtenida de tumores de Engelbreth-Holm-Swarm (Sato et al., 2009). Es importante destacar que, entre los factores de crecimiento incluidos en el medio de cultivo, RSPO-1 (de sus siglas en inglés, R-spondin-1 precursor), que es un ligando de LGR4/5/6 que regula la señalización de Wnt, era crucial para el crecimiento de las células madre intestinales. Otras optimizaciones de este protocolo permitieron el cultivo de organoides de células madre Lgr5+ de otros órganos, incluyendo el colon (Sato et al., 2011), el estómago (Barker et al., 2010), y el hígado (Huch et al., 2013b).

El término organoide fue definido por Lancaster y Knoblich (Lancaster and Knoblich, 2014) como un modelo *in vitro* en 3D que puede desarrollarse a partir de células madre pluripotentes (PSC, de sus siglas en inglés, Pluripotent stem cells) o de células progenitoras residentes del tejido. Los organoides debían contener más de un tipo de célula, con capacidad de autorrenovación y autoorganización mediante mecanismos similares a los que tienen lugar *in vivo*, y recapitular la estructura y función del tejido de

INTRODUCCIÓN

origen. Dado que la mayoría de los modelos de organoides hepáticos están compuestos por un único tipo celular, Huch y Koo (Huch and Koo, 2015) definieron posteriormente los organoides como una estructura 3D en la que las células se autoorganizan espontáneamente de forma similar al órgano de origen y recapitulan algunas de sus funciones. Dado el inmenso crecimiento de este campo de investigación, recientemente, un grupo de más de 60 expertos se han reunido para aclarar el término de organoide y lo han definido como una estructura tridimensional derivada de células madre (pluripotentes), progenitoras y/o diferenciadas que se autoorganizan a través de interacciones célula-célula y célula-matriz, para recapitular aspectos de la arquitectura y función del tejido nativo *in vitro* (Marsee et al., 2021)

En el hígado, las células residen en un microambiente complejo en el que interactúan con múltiples señales derivadas de otras células, factores solubles y la ECM. Además, estas interacciones son cruciales para el mantenimiento y la regulación del fenotipo y la funcionalidad de las células. Así, se ha demostrado que el sistema 3D recapitula mejor la arquitectura y la función del tejido de origen en comparación con los sistemas de cultivo 2D. Una de las principales razones es que las interacciones célula-célula y célula-ECM se producen en las tres dimensiones, mientras que en un sistema 2D, estas interacciones se limitan al plano horizontal. Además, el acceso de las células a los nutrientes y a las moléculas de señalización se mimetiza mejor en un sistema 3D, donde no hay una concentración uniforme de moléculas para todas las células, como sí que ocurre con un cultivo 2D. En conjunto, estas observaciones indican que la manipulación del microambiente tiene un impacto directo en la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de las células (Baker and Chen, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, los organoides pueden desarrollarse a partir de PSCs o de células progenitoras residentes del tejido. Los organoides derivados de PSC se cultivan en un medio específico complementado con los factores de crecimiento necesarios para recapitular las etapas del desarrollo embrionario. Por otro lado, en el caso de los organoides generados a partir de células progenitoras del tejido, el medio de cultivo deberá imitar el microambiente de las células madre tanto en condiciones

fisiológicas como de daño. Además, los organoides deben estar incluidos en una matriz de Matrigel, que proporcionará la ECM especializada para los organoides.

4.2. Organoides derivados de tejido adulto

Un estudio previo (Michalopoulos et al., 2001) ya había demostrado que hepatocitos aislados de rata junto con otras células hepáticas podían crecer en sistemas de cultivo denominados “roller”, dando lugar a estructuras que se asemejaban a la arquitectura hepática, pero con una baja tasa de supervivencia. Mediante modificaciones en el protocolo previamente descrito para los organoides intestinales, Huch *et al.*, aislaron ductos biliares Lgr5⁺ tanto de ratón sano como con daño hepático, y generaron el primer sistema de organoides hepáticos (Huch et al., 2013a) (**Figura 10**). Las células biliares eran capaces de organizarse en estructuras 3D y de expandirse a largo plazo, como células progenitoras adultas. Estas células se cultivaron con WNT3a, RSPO1, EGF, HGF, FGF10 y Noggin, y tenían la capacidad de diferenciarse hacia hepatocitos. La diferenciación de los hepatocitos se indujo mediante la eliminación de la RSPO1 y HGF, la suplementación con inhibidores de Notch y TGFβ, y la adición de FGF7, EGF y dexametasona (Huch et al., 2013a, 2015a). Los organoides resultantes, similares a los hepatocitos, eran capaces de secretar albúmina, acumular glucógeno e inducir el sistema del citocromo P450, aunque seguían expresando el marcador biliar Krt19.

Posteriormente, mediante pequeñas modificaciones del protocolo de cultivo, se generaron organoides hepáticos a partir de tejido humano adulto sano (Huch et al., 2015b). En este caso, los organoides derivaban de células EpCAM⁺ aisladas. Tanto los organoides derivados de ratones como de humanos recapitulaban las características de los colangiocitos, en términos de morfología, expresión de marcadores y funcionalidad. Sin embargo, no expresaban marcadores específicos de hepatocitos maduros, como la albúmina o el CYP3A4 (Huch et al., 2015b).

Recientemente, dos estudios dirigidos por los laboratorios de Nusse y Clevers, respectivamente, mostraron el cultivo de organoides a largo plazo de hepatocitos primarios de ratón, los cuales recapitulaban las características morfológicas y funcionales de los hepatocitos (**Figura 10**). Mientras que Hu *et al.* (Hu et al., 2018)

INTRODUCCIÓN

basaron el protocolo en el aumento de la señalización de RSPO1 y FGF, Peng *et al.* (Peng et al., 2018) cultivaron organoides con TNF α , ya que se ha descrito que durante el daño, las citoquinas inflamatorias secretadas por los macrófagos contribuyen a la regeneración (Michalopoulos, 2007). Además, los organoides de hepatocitos también pueden generarse a partir de hepatocitos primarios humanos fetales y adultos, los cuales forman unas estructuras similares a “racimos de uvas”. Sin embargo, en comparación con los hepatocitos primarios adultos, los organoides de hepatocitos expresan AFP, y tras la retirada de Wnt son capaces de reprogramarse a colangiocitos, lo que indica su fenotipo inmaduro y plástico. Para mejorar la maduración, se añadió oncostatina M y dexametasona al medio, y esto además permitió el trasplante de estos organoides en hígados de ratones con daño (Hu et al., 2018; Peng et al., 2018).

A pesar de que los organoides derivados de hepatocitos presentan claras ventajas, como su potencial como terapia para la regeneración hepática, los que presentan una mayor eficiencia, pudiendo ser expandidos al menos 16 veces, derivan de células hepáticas fetales, sin embargo, la obtención de estas células está condicionada a la disponibilidad de donantes humanos (Hu et al., 2018).

Tejido adulto

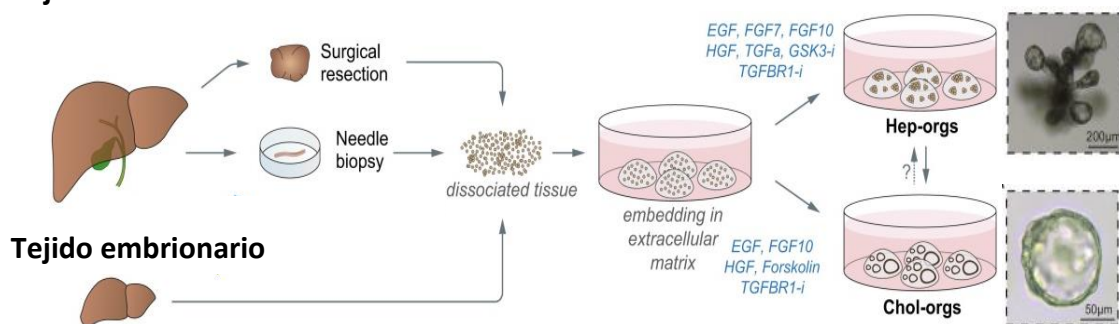


Figura 10. Generación de organoides biliares y hepatocitarios a partir de tejido adulto y embrionario. Imagen adaptada de Nuciforo S *et al*, *Journal Hep Reports*, 2020 y Prior N *et al*, *Gut*, 2019

Es importante destacar que el uso de muestras de hígado adulto da la oportunidad de generar organoides de pacientes que conservan el fondo genético del tejido de origen, incluyendo mutaciones específicas como ocurre en las enfermedades monogénicas o el cáncer. Además, pueden ser manipulados genéticamente mediante la tecnología CRIPR-Cas9 (Driehuis and Clevers, 2017). Así, en los últimos años, varios estudios han

investigado la generación de organoides a partir de pacientes con síndrome de Alagille y deficiencia de Alpha-1 antitripsina (Huch et al., 2015a), PSC (Soroka et al., 2019), y de tumores hepáticos primarios (Broutier et al., 2017; Cao et al., 2019; Li et al., 2019a; Nuciforo et al., 2018; Schneeberger et al., 2020).

El hecho de que los organoides derivados de tejido humano pudieran conservar las características del tejido parental ha sido clave en esta tesis, ya que nos ha permitido generar organoides derivados de explantes de pacientes cirróticos con el fin de poder estudiar la plasticidad de las células epiteliales del hígado.

4.3. Organoides y medicina regenerativa

La limitada disponibilidad de donantes para los pacientes que necesitan un trasplante pone de manifiesto la necesidad de nuevas alternativas al trasplante de hígado. En los últimos años, los organoides derivados de células Lgr5⁺ han ofrecido una potencial alternativa para la ingeniería de tejidos o el trasplante de células. Para restaurar entre el 10% y el 20% del parénquima hepático, se necesitan entre 20-50 x 10⁹ células (Willems et al., 2017), sin embargo, a día de hoy, aún no existen métodos que permitan expandir los organoides hepáticos para conseguir este volumen de células. Recientemente, Schneeberger *et al.*, (Schneeberger et al., 2020) expandieron células humanas Lgr5⁺ en “spinner disks” que contenían Matrigel, lo que permitió altas tasas de proliferación, capacidad de repoblación y capacidad de diferenciación hacia colangiocitos y hepatocitos. Además, estas células, se podían expandir durante al menos 6 semanas. La mayor proliferación en comparación con los sistemas de cultivo normales podría explicarse por un suministro homogéneo de oxígeno, ya que se ha descrito que los organoides situados en los bordes del Matrigel crecen más rápidamente que los situados en el centro de la gota. Sin embargo, estos organoides no eran capaces de injertarse tras el xenotrasplante en ratones Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/y} (FRG), sugiriendo su incapacidad para alcanzar un fenotipo bien diferenciado (Schneeberger et al., 2020).

5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN CXCR4

Los receptores de quimiocinas son receptores transmembrana acoplados a proteínas G, y se distinguen 4 tipos en función del tipo de quimiocina a la que se unen. (Wang et al., 2021a). Entre ellos, CXCR4 (de sus siglas en inglés, C-X-C motif chemokine receptor 4) ha sido ampliamente estudiado por su papel en las funciones celulares, la respuesta inmunitaria, el crecimiento, y el desarrollo (Wang et al., 2021a).

5.1. Cxcr4 y sus ligandos

Cxcr4 se describió por primera vez en los leucocitos de la sangre periférica, y posteriormente en las células madre hematopoyéticas, los linfocitos B, las células epiteliales y endoteliales, los fibroblastos estromales y las células tumorales. El único ligando canónico de Cxcr4 es CXCL12, sin embargo, Cxcr4 también interactúa con otros ligandos endógenos como el factor inhibidor de migración, MIF (Bernhagen et al., 2007), que es una citocina implicada en la regulación de la inmunidad innata; la ubiquitina extracelular (Saini et al., 2010), que es un antagonista de CXCL12; y las β defensinas humanas (HBD, de sus siglas en inglés, human beta defensins) (Quiñones-Mateu et al., 2003); y ligandos exógenos, incluyendo la proteína inflamatoria viral de macrófagos 2 (Vmip-II, de sus siglas en inglés, viral macrophage inflammatory protein 2) y la glicoproteína del VIH GP120 (Quiñones-Mateu et al., 2003). La señalización de CXCR4 está mediada por las proteínas G, que tienen 3 subunidades, $G\alpha$, $G\beta$ y GY . Tras la activación de CXCR4, la proteína G se disocia en $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, que mediarán diferentes señalizaciones, incluyendo las vías de ROCK, MAPK, JAK y MTOR (Wang et al., 2021b). Además de la señalización a través de las proteínas G, los receptores activados también pueden reclutar β -arrestina, dando lugar a la activación de la vía de señalización MAPK, independiente de las proteínas G (Wang and Knaut, 2014). Todas estas vías desempeñan un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades, incluidas las hepáticas.

5.2. Cxcr4 y la enfermedad hepática

La expresión de Cxcr4 en las CEH, y los consiguientes cambios fenotípicos tras la activación de CXCL12, han demostrado tener una gran relevancia en la homeostasis

hepática y las respuestas a distintas lesiones (Hong et al., 2009). Tras la activación de Cxcr4, se producen cambios conformacionales que desencadenan una serie de eventos de señalización intracelular mediados por las vías ERK1/2, MAPK, JNK y AKT (Ghanem et al., 2014). Esta activación da lugar a un proceso de quimiotaxis, que implicará reorganización del citoesqueleto, polimerización de la actina, polarización, formación de pseudópodos y procesos de adhesión (Sun et al., 2010). Además, como se explicará más adelante, CXCL12 y Cxcr4 se expresan en las células tumorales, lo que sugiere que esta vía de señalización podría actuar de manera autocrina promoviendo el crecimiento, la migración y la invasión (Sutton et al., 2007). Por último, esta vía también tiene un papel importante en el desarrollo embrionario, ya que se ha demostrado la letalidad como consecuencia de la delección de CXCL12 o Cxcr4 en ratones transgénicos (Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998).

5.2.1. Papel de la vía CXCL12-CXCR4 en el daño agudo y la regeneración hepática

A pesar de que el papel de CXCL12 no ha sido ampliamente estudiado en pacientes, sí que se ha investigado en modelos experimentales de ratón, demostrando la participación de CXCL12 en la regeneración hepática tras un daño agudo. Se ha observado que la expresión de CXCL12 aumenta de manera gradual tras un insulto agudo de CCl4, y que de manera paralela, tiene lugar el reclutamiento de células progenitoras hematopoyéticas que expresan Cxcr4, con el fin de reparar el daño (Kollet et al., 2003).

En un modelo de daño agudo por CCl4 también se observó el papel protector de Cxcr4, pues la inhibición con AMD3100, que es un inhibidor específico de CXCR4, indujo un aumento del reclutamiento de neutrófilos y una mayor necrosis (Saiman et al., 2015). De manera contraria, en un modelo de isquemia-reperfusión (I/R), el tratamiento con AMD3100 dio lugar a un aumento de la proliferación de hepatocitos y a una reducción de la necrosis tras la perfusión. Del mismo modo, la administración de CXCL12 recombinante disminuyó la proliferación de hepatocitos tras la lesión (Wilson et al., 2015), indicando en este caso, que la vía de CXCL12-CXCR4 no promueve la regeneración

INTRODUCCIÓN

hepática tras una I/R. Curiosamente, tras una hepatectomía parcial, el eje CXCL12/CXCR4 fue indispensable para la proliferación de hepatocitos y, por tanto, para la regeneración del hígado, sugiriendo un mecanismo específico tras la privación de oxígeno (Wilson et al., 2015). En conjunto, varios estudios indican una función protectora del eje CXCL12/CXCR4 en modelos de daño hepático agudo. Sin embargo, cuando el hígado se ve temporalmente sometido a hipoxia, la regeneración tisular mejora con la inhibición de Cxcr4, lo que indica una función perjudicial de esta vía.

5.2.2. Papel de la vía CXCL12-CXCR4 en la activación de las CEH y la fibrosis hepática

Hasta la fecha, se han reportado varios estudios en pacientes que sugieren la participación de la vía de CXCL12-CXCR4 en la progresión de la enfermedad hepática crónica y la fibrosis. Wald *et al.*, (Wald et al., 2004) observaron que CXCL12 estaba elevado en las LSEC, así como en el plasma de pacientes con fibrosis hepática avanzada (HBV y HCV), en comparación con controles sanos. En este contexto, Cxcr4 estaba expresado en los linfocitos, sugiriendo la interacción entre esta población y las LSEC. De forma similar, en pacientes cirróticos por virus C, se demostró que CXCL12 se une a Cxcr4 en las CEH, induciendo su proliferación y la formación de colágeno, y la consiguiente progresión de la fibrosis (Hong et al., 2009). Además, Saiman *et al.*, mediante el uso de líneas celulares y CEH primarias humanas, mostraron que CXCL12 era capaz de inducir la contracción de las CEH de forma Cxcr4 dependiente (Saiman et al., 2013). En conjunto, estos estudios sugieren que intervenir la vía de CXCL12-CXCR4 podría ser beneficioso en la enfermedad hepática crónica.

De esta manera, de forma paralela a la inducción de un daño crónico, principalmente mediado por CCL4, varios estudios han realizado modelos animales transgénicos con la delección de CXCR4 o bien han administrado el inhibidor de CXCR4, AMD3100 (Ding et al., 2014; Saiman et al., 2015; Tsuchiya et al., 2012). Curiosamente, estos estudios observaron que no se producía una mejora en la fibrosis hepática, sino que incluso aumentaba la inflamación. De manera contraria, estudios posteriores (Liu et al., 2016a; Sung et al., 2018), sí que mostraron resultados favorables. En uno de ellos, combinaron

el silenciamiento de la expresión de VEGF junto con la administración de AMD3100 encapsulado en nanopartículas en un modelo de ratón con CCl₄, dando lugar a la inhibición de la proliferación y la activación de las CEH (Liu et al., 2016b). Resultados similares fueron reportados por otro estudio en el cual combinaron un inhibidor de MEK junto con sorafenib (Sung et al., 2018).

Estos resultados contradictorios podrían ser debidos al papel que CXCL12 ejerce en el daño crónico reclutando células madre mesenquimales. En conjunto, estos resultados sugieren que el simple bloqueo del eje CXCL12-CXCR4 no es suficiente para mejorar la fibrosis hepática *in vivo*, probablemente debido a los efectos no deseados sobre las funciones pro-regenerativas de la vía de CXCL12. Por lo tanto, se requieren nuevas estrategias con el fin de modular la vía de CXCL12-CXCR4 en la enfermedad crónica del hígado.

5.2.3. Papel de la vía CXCL12-CXCR4 en la carcinogénesis

El eje CXCL12/CXCR4 ha sido ampliamente estudiado en muchos tipos de cáncer, ya que se ha hecho evidente que interferir sobre esta vía podría ser beneficioso (Sun et al., 2010). Se ha observado que las células tumorales que expresan Cxcr4 son propensas a la inducción de metástasis en órganos que expresan niveles elevados de CXCL12, como el hígado. Además, este mecanismo también se ha visto implicado en el desarrollo de metástasis en varios tipos de cáncer, como el de mama, pulmón o páncreas (Sun et al., 2010). Numerosos estudios han demostrado la expresión proteica de CXCR4 en los tejidos de pacientes con HCC, pero no en los tejidos hepáticos normales (Liu et al., 2008; Xiang et al., 2009b), mostrando además una correlación positiva entre la expresión de CXCR4, la agresividad del tumor y un mal pronóstico de los pacientes (Xiang et al., 2009a, 2009b). De manera similar, un estudio en CCA mostró que un aumento en la expresión de CXCR4 se asociaba con la progresión del tumor, metástasis, y un peor pronóstico (Zhao et al., 2014).

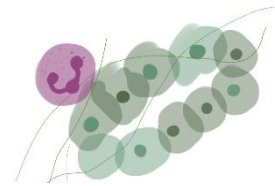
Estudios recientes han demostrado que el microambiente tumoral desempeña un papel crucial en la metástasis y el desarrollo del cáncer. Durante la metástasis, tiene lugar la formación de nuevos vasos o angiogénesis, en la cual se ha observado el papel de la

INTRODUCCIÓN

señalización de CXCR4 (Wang et al., 2016). De esta manera, se observó que la expresión de EphA1 en las células tumorales inducía el reclutamiento de células endoteliales promoviendo la angiogénesis vía CXCL12/CXCR4 (Wang et al., 2016). De hecho, Cxcr4 y su ligando CXCL12 inician la migración celular y la angiogénesis a través de la activación de las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/Akt, promoviendo así el crecimiento, la proliferación, la metástasis y la invasión de las células cancerígenas (Yang et al., 2019). Además, se ha observado que la vía de CXCL12/CXCR4 induce la expresión de la MMP10 en las células tumorales a través de la vía ERK1/2, lo que contribuye a la angiogénesis, el crecimiento y la diseminación del tumor (García-Irigoyen et al., 2015). Por último, se ha mostrado la función de CXCR4 en la transducción de señales intracelulares, como la rigidez de la matriz, a través de la vía de YAP, impulsando la progresión del tumor (Yang et al., 2020)

Varios estudios han empleado diferentes estrategias con el fin de intervenir la vía de CXCL12-CXCR4 y bloquear la progresión del tumor. Gran parte de estos estudios han combinado la inhibición de CXCR4 mediante el uso nanopartículas, junto con Sorafenib, observándose un efecto beneficioso del uso de esta combinación (Chen et al., 2017; Gao et al., 2015; Zheng et al., 2019)

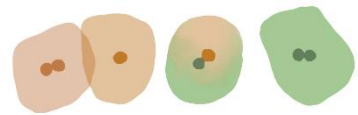
HIPÓTESIS



HIPÓTESIS

En un contexto de daño crónico severo, se ha observado que la plasticidad de las dos principales poblaciones epiteliales, los hepatocitos y los colangiocitos, juega un papel crucial en la respuesta al daño. En estas circunstancias, tiene lugar por un lado la activación y proliferación de la reacción ductular en las áreas periportales, y, por otro lado, la reprogramación de los hepatocitos, dando lugar a las células hepatobiliares, que tienen un fenotipo intermedio entre los hepatocitos y las células biliares. La hipótesis de este trabajo es que ambos procesos tienen lugar en la enfermedad hepática crónica, y que se asocian a una deficiente regeneración del hígado y a la progresión de la enfermedad. Además, creemos que el microambiente hepático podría jugar un papel fundamental en la modulación de la plasticidad celular. Por último, pensamos que interferir sobre los fenómenos de plasticidad constituye una estrategia terapéutica prometedora para mejorar la función hepática en el contexto del daño crónico severo.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVO GLOBAL

Evaluar el impacto de las células de la reacción ductular y las células hepatobiliares en la progresión de la enfermedad hepática por alcohol, e identificar los mecanismos moleculares que promueven la plasticidad celular en la hepatitis alcohólica.

PRIMER OBJETIVO

Estudiar el perfil de expresión génica de la reacción ductular en pacientes con hepatitis alcohólica, así como el impacto de la reacción ductular en el reclutamiento de células inflamatorias y la inflamación sistémica.

- **Objetivos específicos**

1. Evaluar el perfil transcriptómico de la reacción ductular en la hepatitis alcohólica
2. Evaluar la asociación de la reacción ductular y la inflamación sistémica
3. Generar un modelo in vitro de organoides que recapitule las características de la reacción ductular
4. Investigar la interrelación entre las células de la reacción ductular y los neutrófilos

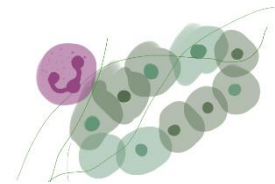
SEGUNDO OBJETIVO

Estudiar el perfil de expresión génica de las células hepatobiliares en la hepatitis alcohólica, así como los mecanismos moleculares que promueven la desdiferenciación de los hepatocitos.

- **Objetivos específicos**

1. Evaluar el impacto de la reacción ductular y la reprogramación de los hepatocitos en la progresión de la enfermedad hepática por alcohol
2. Evaluar el perfil transcriptómico y funcional de las células hepatobiliares en la hepatitis alcohólica
3. Investigar las vías moleculares que promueven la reprogramación de los hepatocitos y su impacto en la progresión de la enfermedad

MATERIAL Y MÉTODOS



1. PACIENTES

1.1. Pacientes de los cuales se obtuvo muestra para microdissección por captura láser

Las muestras para el procedimiento de LCM se obtuvieron de pacientes con características clínicas, analíticas e histológicas de AH ingresados en el Hôpital Claude Huriez de Lille (Francia). La información de los pacientes se describe en la **Tabla 1**. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado (estudios QuickTrans (NCT01756794) y TargetOH (CPP 14/67)).

Tabla 1. Características basales de los pacientes con hepatitis alcohólica de los que se obtuvieron muestras para microdissección por captura láser

	AH severa (n=6) Mediana (25-75 IQR)
Datos demográficos	
Edad, mediana (IQR)	54 (47-60)
Género, masculino n (%)	3 (50)
Puntuaciones de gravedad	
Child-Pugh, mediana (IQR)	12 (11-13)
MELD, mediana (IQR)	29 (27-31)
ABIC, mediana (IQR)	7.9 (6.9-9.0)
HVPG, mediana (IQR)	nd
SIRS, n (%) *	
Decompensaciones n (%)	
Ascitis	4 (67)
HE	3(50)
UGIB	4 (67)
AKI	4 (67)
Infecciones	5 (83)
Parámetros analíticos, mediana (IQR)	
Hemoglobina g/dL	9.2 (9.2-11.3)
Recuento leucocitario x10 ⁹ /L	12.2 (8.3-20.5)
Recuento plaquetas x10 ⁹ /L	107 (83-120)
AST (IU/L)	177 (146-201)
ALT (IU/L)	58 (44-71)
Albumina (g/dL)	2.4 (2.1-2.6)
Creatinina mg/dL	0.8 (0.8-1.5)
Bilirubina mg/dL	15.0 (11.0-22.9)
INR	2.1 (1.9-2.3)
GGT (IU/L)	367 (272-720)
ALP (IU/L)	260 (233-304)
Sodio (mEq/L)	129 (127-130)

AH, Hepatitis Alcohólica; MELD, Modelo de hepatopatía en estado terminal; ABIC, edad-bilirubina-INR-creatinina; HVPG, Gradiente de presión venosa hepática; SIRS, Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; HE, Encefalopatía hepática; UGIB, Hemorragia digestiva alta; AKI, Lesión renal aguda; AST, Aspartato aminotransferasa; ALT, Alanina aminotransferasa; INR, Coeficiente internacional normalizado; GGT, Gamma-glutamyl transferasa; ALP, Fosfatasa alcalina

1.2. Pacientes de los cuales se obtuvo biopsia hepática

Las muestras se obtuvieron de pacientes ingresados en la Unidad Hepática del Hospital Clinic de Barcelona. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital. Una cohorte de 29 pacientes con ALD de los cuales se había realizado un array, se empleó para evaluar la correlación de genes de la RD con la progresión de la enfermedad: pacientes con pre-cirrosis (n=4), pacientes con cirrosis sin AH (n=7) y pacientes con AH (n=12). Para la cuantificación histológica del porcentaje de RD y de células hepatobiliares, se empleó una cohorte de 35 pacientes con ALD: pacientes con pre-cirrosis (n=3), pacientes con cirrosis compensada (n=4), pacientes con cirrosis descompensada (n=13) y pacientes con AH (n=15). Los parámetros clínicos y bioquímicos de las dos cohortes se muestran en la **Tablas 2 y 3**, respectivamente. Las muestras de hígado y suero de los pacientes con AH se seleccionaron en función de la disponibilidad y la calidad del RNA, y se utilizaron para realizar el análisis de la expresión génica del RNA y la determinación de citoquinas.

Los criterios para incluir los pacientes con AH fueron un consumo de alcohol excesivo (>60 g/día) antes del ingreso, niveles altos de AST, ALT, γ -glutamyltranspeptidasa, bilirrubina y el diagnóstico por histología. Las biopsias se obtuvieron mediante biopsia transyugular. Se excluyeron aquellos pacientes con carcinoma hepatocelular.

Adicionalmente, para los estudios de RNAseq del Objetivo 2, las muestras de tejido se obtuvieron del biorrepositorio humano del consorcio internacional InTeam financiado por NIH. Los pacientes con esteatohepatitis alcohólica temprana (ASH) se obtuvieron de Cliniques Universitaires Saint-Luc (Bruselas, Bélgica). Todos los pacientes incluidos dieron su consentimiento informado por escrito y los protocolos de investigación fueron aprobados por los Comités de Ética locales y por la Junta de Revisión Institucional central de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill. Los pacientes se seleccionaron de acuerdo con diferentes grupos de estadios clínicamente relevantes: 1-pacientes con ASH temprana, que no eran obesos y presentaban una elevada ingesta de alcohol, y que presentaban una leve elevación de las transaminasas y criterios histológicos de esteatohepatitis (n= 12), 2- pacientes con AH confirmada histológicamente a los que se les realizó una biopsia antes de cualquier tratamiento (n= 18) y explantes de pacientes

con AH que se sometieron a un trasplante temprano siguiendo un protocolo bien definido (n= 11). Las características de estos pacientes, previamente publicadas (Argemi et al., 2019), se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 2. Características basales de los pacientes con ALD

	Pre-CH (n=4)	CH (n=7)	AH (n=12)	Controles (n=6)
Datos demográficos				
Edad, mediana (IQR)	55(48,75-71)	59(51-66)	54(49-60,75)	45(24,75-45,5)
Género, masculino n (%)	2(50)	6(86)	10 (83)	5 (83)
Puntuación de gravedad				
Child-Pugh, mediana (IQR)	8(8-10,75)	7(5-11)	9(8-10,75)	---
MELD, mediana (IQR)	18(7,25-11,25)	15(8-23)	21(11,25-29,75)	---
ABIC, mediana (IQR)	7(6,1-8,32)	7(6,64-8,83)	8(7,06-9,125)	---
HVPG, mediana (IQR)	nd	nd	nd	---
SIRS, n (%) *				---
Decompensaciones n (%)				
Ascitis	0 (0)	3 (43)	8 (67)	---
HE	0 (0)	1 (14)	3 (25)	---
UGIB (HDA)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	---
AKI	0 (0)	2 (28)	3 (25)	---
Infecciones	0 (0)	1 (14)	3 (25)	---
Parámetros Analíticos, mediana (IQR)				
Hemoglobina g/dL	9,6(10,1-12,6)	11,4(8,7-13,6)	9,3(7,6-11,5)	14,5(14,2-14,8)
Recuento Leucocitario x10 ⁹ /L	9,3(3,1-13,6)	5,9(3,8-8,8)	11,3 (6,9-13,5)	7,2(6,2-8,2)
Recuento plaquetario x10 ⁹ /L	190,5 (87,7-292)	153,4(60-175)	195,8 (111-322,7)	293,83(196-387,2)
AST (IU/L)	116,6 (47,2-151,7)	86,9 (37,7-115,5)	113,5 (75,75-137)	26,67(22,5-31)
ALT (IU/L)	73,8 (35,2-79,7)	49,5 (23-75)	67,5(30,75-81)	29,17(18,7-39,7)
Albumina (g/dL)	3,1 (2,7-4,1)	3,4 (3,2-4,6)	2,9 (2,6-3,2)	4,5(4,3-4,6)
Creatinina mg/dL	1,1 (0,57-0,9)	1,39 (0,57-3,23)	1,2 (0,56-1,58)	0,87(0,74-0,97)
Bilirubina mg/dL	11,2(0,95-1,7)	5,25 (0,6-5,9)	14 (1,65-21)	0,6(0,3-0,825)
INR	1,4 (1,01-1,24)	1,4 (1,09-1,84)	1,6 (1,27-1,96)	0,97(0,91-1,02)
GGT (IU/L)	733(246,5-1807)	400,6 (32-167)	498,9 (125,5-655)	18,20(10,5-24,5)
Sodio (mEq/L)	137,1 (138,2-144,2)	139,8 (136-142)	136,6 (135-138,7)	140,5(139-142)

Tabla 3. Características basales de los pacientes con ALD en los cuales se realizó cuantificación histológica

	Pre-CH (n=3)	CH Compensada (n=4)	CH Descompensada (n=13)	AH (n=15)
Datos Demográficos				
Edad, mediana (IQR)	59(nd)	56(43-65,25)	54(49-61,5)	52(45,25-58,75)
Género, masculino n (%)	1(33,3)	3(75)	10(77)	11(73)
Puntuación de gravedad				
Child-Pugh, mediana (IQR)	5,33	6 (5-8)	9,38 (7-11,5)	10 (8,75-12)
MELD, mediana (IQR)	9	11,75 (8,25-17,5)	19,53 (16-23)	23,85 (12,75-33,25)
ABIC, mediana (IQR)	7	7(5,52-8,52)	8(6,71-8,31)	8(7,105-9,295)
HVPG, mediana (IQR)	Nd	Nd	Nd	Nd
SIRS, n (%) *				
Decompensaciones n (%)				
Ascitis	0(0)	1(25)	11(36,6)	8(53,33)
HE	0(0)	0(0)	1(33,33)	1(6,66)
UGIB (HDA)	0(0)	0(0)	1(33,33)	1(6,66)
AKI	0(0)	0(0)	2(15,38)	1(6,66)
Infecciones	0(0)	1(25)	2(15,38)	3(20)
Parámetros Analíticos, mediana (IQR)				
Hemoglobina g/dL	11,4	13,75 (9,55-16,9)	9,8 (8,1-11,375)	9,5 (8,2-11,52)
Recuento leucocitario x10 ⁹ /L	8,740	6,91 (3,26-10,69)	6,91 (4,07-8,58)	12003,57
Recuento plaquetario x10 ⁹ /L	229,66	192,25 (127,5-214,75)	116,23 (62,5-139)	178,5 (100-243,5)
AST (IU/L)	102	32,66 (20-49,25)	84,15 (34,5-96,5)	107,21 (63,5-121,5)
ALT (IU/L)	57,33	22,25 (16,25-28)	30,15 (15-42)	53,29 (24,25-83,25)
Albumina (g/dL)	3,633	3,85 (2,625-4,575)	3,033 (2,55-3,5)	2,8 (2,575-3)
Creatinina mg/dL	0,67	1,67 (0,687-3,37)	1,10 (0,585-1,585)	1,25 (0,63-1,745)
Bilirubina mg/dL	1,33	1,1 (0,6-1,95)	7,08 (2-8,65)	15,41 (2,925-23,9)
INR	1,12	1,115 (1,07-1,175)	1,66 (1,35-1,83)	1,78 (1,25-2,16)
GGT (IU/L)	1154	94,25 (23,75-208)	197,6 (55,5-257,5)	320,5 (81,5-572)
Sodio (mEq/L)	141,66	139 (134,5-142,5)	136 (132-139,5)	134,8 (133,5-136,5)

CH, Cirrosis; AH, Hepatitis Alcohólica; MELD, Modelo de hepatopatía en estado terminal; ABIC, edad-bilirubina-INR-creatinina; HVPG, Gradiente de presión venosa hepática; SIRS, Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; HE, Encefalopatía hepática; UGIB, Hemorragia digestiva alta; AKI, Lesión renal aguda; AST, Aspartato aminotransferasa; ALT, Alanina aminotransferasa; INR, Coeficiente internacional normalizado; GGT, Gamma-glutamyl transferasa; ALP, Fosfatasa alcalina

Tabla 4. Características basales de los pacientes y los individuos controles en el momento de la biopsia hepática. Datos extraídos de Argemi JM et al, *Nature Communications*, 2019

	ASH Temprana (n=12)	AH Severa (n=18)	AH Severa (explantos) (n=11)	Controles (n=10)
Datos demográficos				
Edad- media (IQR)	52(48.2-58.7)	51(47.2-57.7)	48.9(48-56)	32(28.8-50.7)
Género: masculino n (%)	7(58.3)	11(61.1)	7(63.6)	7(70)
Severidad median (IQR)				
Child-Pugh	N/A	11(9-11.7)	10.7(9-12)	N/A
MELD	N/A	24(22-27.7)	24.5(21.4-27.2)	N/A
ABIC	N/A	8.3(7.8-8.8)	N/D	N/A
Descompensaciones - N(%)				
Ascitis	0	14(83.3)	7(72.7)	0
H/E	0	5(27.8)	1(9)	0
UGIB	0	1(5.6)	2(18.2)	0
AKI	0	10 (55.6)	N/D	0
Infecciones	0	5(33.3)	5(55.6)	0
Parámetros Analíticos, mediana(IQR)				
Hemoglobina g/dL	14.3(13.6-16.6)	11.6 (10.7-13.2)	N/D	14.6(12.9-15.5)
Recuento leucocitario x10 ⁹ /L	5.6(4.6-7.2)	8.3 (6.6-12.7)	10.8(7.4-14.2)	5.7(5.1-7.2)
Plaquetas x10 ⁹ /L	179(121-237)	118 (67-208)	N/D	237(210-282)
AST (U/L)	107(64-154)	114.5 (62.5-158.3)	170(131-279)	21.5(18.8-26.5)
ALT (U/L)	70.3(53.5-89.8)	32.5 (20-44)	N/D	25(14.8-34.3)
Bilirrubina mg/dL	1.2(0.7-1.5)	19 (12.3-26.7)	16.3(11.1-24.3)	0.6(0.5-0.7)
GGT (U/L)	388(200-723)	406(165-721)	N/D	17(13.5-24.8)
ALP (U/L)	100(62-141)	386(147-491)	N/D	147(106-191)
Albumina (g/dL)	4.5(4.2-4.7)	2.9 (2.3-3.3)	2.4(2-3)	4.6(4.3-4.6)
Creatinina mg/dL	0.6(0.59-0.77)	0.79 (0.61-1)	0.69(0.53-0.73)	0.8(0.74-0.9)
Sodio (mEq/L)	139(136-140)	136(132-139)	N/D	140(138.7-141.5)
INR	1(0.9-1)	1.6 (1.2-3.3)	1.8(1.6-2.6)	1.03(0.99-1.06)

ASH, Esteatohepatitis relacionada con el alcohol; AH, Hepatitis Alcohólica; MELD, Modelo de hepatopatía en estado terminal; ABIC, edad-bilirrubina-INR-creatinina; HVPG, Gradiente de presión venosa hepática; SIRS, Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; HE, Encefalopatía hepática; UGIB, Hemorragia digestiva alta; AKI, Lesión renal aguda; AST, Aspartato aminotransferasa; ALT, Alanina aminotransferasa; INR, Coeficiente internacional normalizado; GGT, Gamma-glutamil transferasa; ALP, Fosfatasa alcalina

2. AISLAMIENTO DE POBLACIONES MEDIANTE MICRODISECCIÓN POR CAPTURA LÁSER

Como describimos en la revisión sobre LCM publicada recientemente en nuestro grupo (Aguilar-Bravo and Sancho-Bru, 2019) (Revisión Anexada), el proceso completo se puede dividir en tres fases, el procesamiento de la muestra, el proceso de microdissección, y por último, los análisis posteriores, que en el caso de este estudio, han consistido en la secuenciación del RNA. Durante todo el proceso, se trabajó en condiciones de ausencia de ribonucleasas (RNAasa) con el fin de garantizar la mayor integridad posible del RNA. Estas tres etapas se han representado en la **Figura 11**.

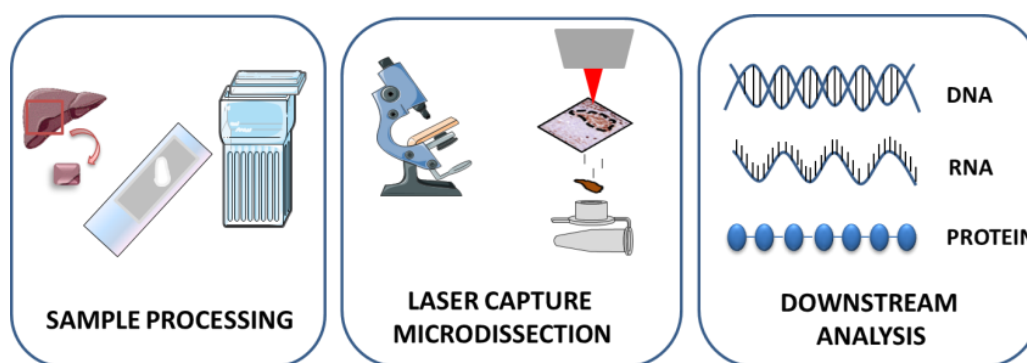


Figura 11. Etapas del proceso de microdissección por captura láser. Imagen extraída de Aguilar-Bravo *et al*, *Hepatology International*, 2019.

2.1. Procesamiento de la muestra

Se emplearon muestras de hígado obtenidas de pacientes con AH, fijadas con formalina, e incluidas en parafina. Se realizaron secciones de ocho μm y se montaron en portaobjetos PEN de cristal (Leica, Wetzlar, Alemania) (NO 11505158, 2,0 mm). Los portaobjetos se colocaron a 55°C durante 2 horas, y a continuación, se inició el protocolo de tinción siguiendo los siguientes pasos:

- Xileno: 3 veces, 20 segundos cada vez
- Etanol absoluto: 2 veces, 30 segundos cada vez
- Etanol 95%: 2 veces, 30 segundos cada vez

- Etanol 70%: 2 veces, 30 segundos cada vez
- Agua destilada: 30 segundos
- DPBS estéril: 30 segundos
- Anticuerpo primario, KRT7 anti-humano (M7018, Dako, Glostrup, Dinamarca), 1:50, durante 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda
- Lavado con DPBS estéril: 3 veces, 1 minuto cada vez
- Anticuerpo secundario (EnVision™, Dako, K4007) durante 15 minutos a temperatura ambiente
- Lavado con DPBS estéril: 3 veces, 1 minuto cada vez
- Diaminobencidina (DAB) (Dako, K1011): 2 minutos
- Cubrir el portaobjetos con agua DEPC (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y dejar secar durante 40 minutos.
- Guardar las muestras a -80°C hasta el momento de realizar la LCM

2.2. Microdissección por captura láser

La microdissección se realizó con un microscopio Leica LMD6000 (Leica). Para el primer objetivo, se diseccionaron tres fracciones diferentes por muestra (n=6): Células de la RD KRT7 positivas (KRT7⁺), células KRT7 negativas (KRT7⁻) que comprendían pequeñas áreas de hepatocitos y áreas de fibrosis, y una fracción total compuesta por una selección aleatoria de áreas KRT7⁺ y KRT7⁻. Para el segundo objetivo (n=4), se aislaron células de la RD KRT7⁺, hepatocitos KRT7⁺, y hepatocitos KRT7⁻ (nódulos de regeneración). En el segundo estudio, dada la dificultad para distinguir de manera correcta las tres poblaciones, se realizó una tinción convencional de KRT7 y contraste con hematoxilina en cortes consecutivos a las muestras de las cuales se iba a realizar la LCM. Se realizó un escaneo de estas tinciones y se usaron como guía. En todos los casos, se aisló un área mínima de 1,7 mm² con el fin de poder realizar la posterior secuenciación del RNA. En la **Figura 12** se puede observar una muestra teñida para KRT7 antes y después de realizar la microdissección.

MATERIAL Y MÉTODOS

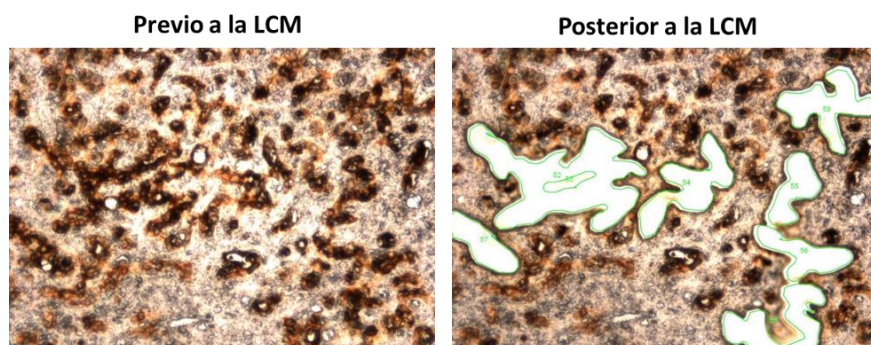


Figura 12. Microdissección por captura láser. Imagen extraída de Aguilar-Bravo et al, *Hepatology International*, 2019.

2.3. Procesamiento del RNA y secuenciación de las muestras aisladas por LCM

El aislamiento del RNA se realizó de la siguiente manera: Se añadieron 50 μ L de Proteinasa K (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a las muestras y se incubaron durante al menos 16 horas a 65°C. El RNA se extrajo utilizando el kit de extracción y aislamiento de ARN Arcturus® Paradise® Plus (ThermoFisher Scientific, ref. KIT0312-I) siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y la calidad del RNA se determinaron con el Bioanalizador Pico. El análisis de RNA-Seq se realizó utilizando 1-10ng de RNA obtenido de las distintas fracciones. Para cada una de las muestras, se crearon bibliotecas utilizando el kit de expresión génica humana AmpliSeq Transcriptome (ThermoFisher Scientific, ref. A26325) y la guía del usuario MAN0010743 (revisión A.0) con pequeñas modificaciones. Se utilizó el kit de código de barras Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit (ThermoFisher Scientific, ref.4471250) para identificar las lecturas de cada muestra. Cada biblioteca se purificó utilizando perlas AMPure XP, 1,5x (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos; ref. A63880). Se utilizó el sistema Ion OneTouch 2 (OT2) para obtener los fragmentos de la biblioteca (ThermoFisher Scientific, A26434). Las muestras obtenidas se cargaron en un chip Ion PI y se secuenciaron utilizando el kit Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 (ThermoFisher Scientific, ref. A26433, siguiendo la guía MAN0010948 Rev. A.0) en el secuenciador Ion Proton durante 520 ciclos; se realizaron dos ejecuciones del chip. Las lecturas de la secuencia se generaron con el Torrent Suite™ v.4.6. Las lecturas únicas mapeadas

(software Novoalign V3.02.08) se resumieron como recuentos que representan los niveles de expresión génica para más de 20.800 genes diferentes presentes en el panel AmpliSeq Human Gene Expression. Los genes de baja expresión no se consideraron en la fase de expresión diferencial si la suma de los recuentos era inferior a 100. La modelización lineal y la expresión diferencial se calcularon mediante el paquete R lina (Ritchie et al., 2015). Los valores de Fold Change, los p-valores moderados y sus p-valores ajustados para pruebas múltiples se calcularon mediante Benjamini-Hochberg para estimar la tasa de falsos descubrimientos (FDR).

Los datos de la secuenciación de la microdissección se depositaron en el Archivo de Lecturas de Secuencias (SRA, de sus siglas en inglés, Sequence Read Archive) del NCBI con los números de acceso **GSE199168** y **PRJNA393451**.

3. MODELOS ANIMALES

Todos los modelos animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud. Actualmente, no existe ningún modelo animal con alcohol que mimetice todas las características de la hepatitis alcohólica. Por ello, en este estudio hemos usado el modelo de daño inducido por dieta DDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ya que recapitula la gran mayoría de las características histológicas y fisiopatológicas de las enfermedades crónicas del hígado como una prominente RD, fibrosis, colestasis e infiltración de neutrófilos.

Para nuestro estudio, utilizamos ratones C57BL6/J (Charles River) y se utilizaron machos y hembras de entre 8-12 semanas que se alojaron en condiciones estándar.

3.1. Modelo experimental de inhibición del reclutamiento de neutrófilos

Para llevar a cabo este modelo, se administró una dieta estándar para roedores que contenía un 0,1% de DDC durante 3 semanas. Para inhibir la actividad del receptor CXCR1/2, se utilizó el inhibidor SCH-527123 (APEXBio), que se resuspendió en 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) al 20% (Sigma Aldrich). El inhibidor o el vehículo se administraron diariamente por vía oral a una dosis de 50mg/kg de peso corporal como se muestra en la **Figura 13**. Transcurrido este tiempo, se sacrificaron los animales y se recogieron muestras de hígado y sangre.



Figure 13. Esquema experimental. Modelo de daño crónico en el que se ha inhibido el receptor CXCR1/2.

3.2. Modelo de sobreexpresión de Cxcr4

Para inducir la sobreexpresión de CXCR4 se administró por vía intravenosa el plásmido AAV8-TBG-m-CXCR4-IRES-eYFP (Vector Biolabs; AAV-256411) y el plásmido AAV8-Ctrl (AAV8-TBG-YFP, Cat N°: PV-1678) en ratones de 8 semanas. Esta estrategia induce la sobreexpresión de Cxcr4 específicamente en los hepatocitos, ya que el virus AAV8 es hepatotrópico y el promotor de la globulina de unión a tiroxina (TBG, de sus siglas en inglés, thyroxine binding globulin) se induce principalmente en los hepatocitos. Los virus AAV8 se diluyeron en DPBS estéril y se administraron por inyección en la vena de la cola a una concentración de $2,5 \times 10^{11}$ partículas virales por ratón. Tras un periodo de lavado de 2 semanas, se administró dieta DDC al 0,1% o una dieta control durante 1 semana, como se muestra en la **Figura 14**. Transcurrido este tiempo, se sacrificaron los animales y se recogieron muestras de hígado y sangre.

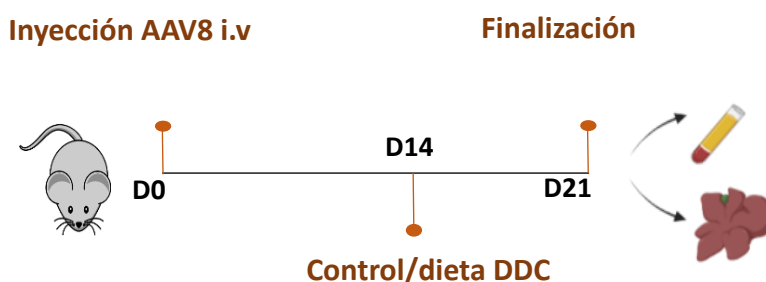


Figura 14. Esquema experimental. Modelo de sobreexpresión de CXCR4

3.3. Modelo de inhibición farmacológica de CXCR4

Para inhibir la vía de CXCL12-CXCR4, realizamos un modelo crónico mediante la administración de dieta DDC durante 3 semanas. El antagonista del receptor CXCR4, AMD3100 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), se resuspendió en DPBS estéril y se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 5 mg/kg en días alternos durante la última semana o durante las dos últimas semanas del modelo, como se muestra en la **Figura 15**. Los grupos control fueron inyectados con el vehículo, DPBS.

MATERIAL Y MÉTODOS

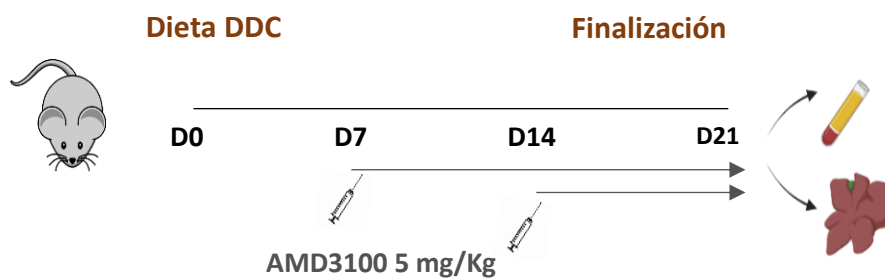


Figura 15. Esquema experimental. Modelo de inhibición farmacológica de Cxcr4

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA: HISTOLOGÍA Y ELISAS

4.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de muestras parafinadas

Las secciones hepáticas de ratón y de tejido humano embebidas en parafina se desparafinaron y se incubaron en *Target Retrieval Solution* (Citrato Ph6, Dako) en una olla a presión durante 20 minutos, o se rehidrataron y se incubaron con *EnVision Flex Target Retrieval Solution Low o High Ph* (DAKO) mediante el uso del equipo Dako PT Link. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con DPBS de 5 minutos cada uno, tras lo cual, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con DPBS, se realizó el revelado con DAB. Posteriormente, se hizo el contraste de las tinciones con hematoxilina. En el caso de la inmunofluorescencia, tras la incubación con el anticuerpo secundario, las secciones se montaron con el medio de montaje que contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para la tinción nuclear.

4.2. Inmunofluorescencia en organoides

Los organoides obtenidos a partir de muestras de pacientes con cirrosis se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. La permeabilización se realizó con PBS suplementado con Triton X100 al 0.5% durante 10 minutos a 4°C. Después de 3 lavados con PBS, los organoides se incubaron con la solución de bloqueo (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3.5Mm NaH₂PO₄, 7.7 mM Na₃, 0.1% BSA, 0.2% Triton X-100, 0.05% Tween-20 y 10% suero de cabra) durante 45-60 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario en la misma solución de bloqueo durante 40-50 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS, y se conservaron en PBS a 4°C. Las imágenes se adquirieron usando el microscopio confocal LSM880 de Zeiss.

4.3. Inmunofluorescencia en tejido hepático humano mediante “CLEARING”

La técnica de “clearing” es un método que permite realizar inmunomarcaje de estructuras tisulares de hasta 3 mm de grosor, con el fin de obtener imágenes en 3D. Esta técnica se llevó a cabo en tejido hepático de pacientes cirróticos siguiendo el protocolo de iDISCO (Renier et al., 2014) con pequeñas modificaciones. Brevemente, las muestras de tejido hepático de aproximadamente 3 mm de grosor se fijaron en paraformaldehído al 4%, y se mantuvieron en agitación a 4 °C durante toda la noche. A continuación, las muestras se lavaron tres veces en DPBS-/ con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con diluciones de metanol/agua y se decoloraron con peróxido de hidrógeno al 5% en metanol durante una noche a 4°C. Seguidamente, las muestras se rehidrataron con series de metanol/agua, se lavaron, y se permeabilizaron a 37°C durante 2 días. Tras la incubación en solución de bloqueo durante 2 días adicionales a 37°C, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios KRT7 (1:50, DAKO, M7018) y MPO (1:50, Abcam, ab9535) durante 5 días a 37°C.

Después de un día de lavados consecutivos, se añadieron los anticuerpos secundarios Donkey anti Rabbit Cy3 (1:500, Jackson ImmunoResearch, 111-165-003) y Rat anti Mouse Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen, A11001) durante 4 días a 37°C. Las muestras se lavaron a lo largo de un día, se deshidrataron con series de metanol/agua y se incubaron en soluciones de DCM al 66% y al 100% (Sigma 270997-12) durante 3 horas y 15 minutos, respectivamente. Por último, tras la incubación con DiBenzyl Ether (DBE, Sigma 108014), se adquirieron imágenes de las muestras con el microscopio confocal LSM880 de Zeiss utilizando el software Imaris Cell.

4.4. Cuantificación de las células de la reacción ductular y hepatobiliares en biopsias de pacientes con ALD

Las biopsias de hígado se tiñeron con KRT7 con el fin de identificar las células HB (hepatocitos KRT7⁺), en marrón claro, y las células de la DR (células KRT7⁺), en marrón oscuro. Se tomaron imágenes consecutivas para abarcar la totalidad de cada biopsia. El

área ocupada por ambas poblaciones se cuantificó de manera manual mediante el software Image J. El porcentaje de área de ambas poblaciones se evaluó en relación con el área total.

El listado de anticuerpos empleados se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para las tinciones

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	CAT NO.
Sox9	1:500	Millipore Sigma	AB5535
KRT19	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank	TROMA-III
KRT7	1:50	DAKO	M701801
KRT23	1:50	Sigma	HPA012050
HNF1B	1:50	Sigma	HPA002083
CXCL5	1:100	RyD	AF254
EPCAM	1:100	DAKO	M080429
HEP-PAR1	Listo par usar	DAKO	IR624
TROP2	1:200	RyD	AF650
CXCR4	1:100	Abcam	ab124824
CXCL12	1:100	RyD	MAB350
MPO	1:50	Abcam	ab9535
P21	1:50	CNIO	HUGO291
Biotinylated rabbit anti-rat	1:200	Vector Labs	BA-4000
Biotinylated rabbit anti-goat	1:600	DAKO	E0466
Donkey anti-rabbit cy3	1:500	Jackson Immuno Research	712-165-150
Goat anti-mouse AF488	1:200	Invitrogene	A21432
Donkey anti-goat AF488	1:200	Jackson Immuno Research	705-545-147
Donkey anti-goat Cy3	1:200	Jackson Immuno Research	705-165-147

4.5. Detección de CXCL5 y TROP2 en suero de pacientes

Los niveles séricos de CXCL5 (DX000, R&D) y TROP2 (CSB-EL023072HU, Cusabio) se midieron en suero de pacientes controles y con AH mediante el uso de dos kits de ELISA específicos siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. CULTIVOS CELULARES

5.1. Generación de organoides de muestras hepáticas de pacientes con cirrosis

Las células hepáticas se aislaron y cultivaron siguiendo el protocolo descrito por Broutier *et al.*, (Broutier *et al.*, 2016) con pequeñas modificaciones.

1. En primer lugar, el tejido se disoció en una placa de Petri con medio de lavado (DMEM GlutaMAX suplementado con 1% de suero fetal bovino (FBS, de sus siglas en inglés, fetal bovine serum) y 1% penicillin/streptomycin).
2. El tejido bien disociado se traspasó a un falcon de 15ml y se añadieron 10 ml de medio de lavado frío.
3. Se pipeteó varias veces arriba y abajo con una pipeta de 10ml con el fin de eliminar eritrocitos y grasa. Una vez el tejido había precipitado, se eliminaron aproximadamente 7 ml del sobrenadante. Este procedimiento se repitió una vez más.
4. A continuación, se añadieron 10ml del medio de digestión pre-calentado a 37°C. El medio de digestión consistía en medio de lavado suplementado con colagenasa XI (C9407; Sigma) y Dispasa II (17105-041; Life Technologies), ambas a una concentración del 0,012% en HBSS, y DNAsal (DN25-1g; Sigma) a una concentración final de 0,1 mg/ml. El tejido se incubó en agitación a 37°C durante 30 minutos.
5. Una vez finalizada la digestión, se añadió medio de lavado frío hasta los 15 ml y el material se pasó a través de un filtro de 70 µm. Se añadió medio frío hasta los 50ml y se centrifugó a 300G durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, y el material digerido se transfirió a un tubo de 15 ml para repetir la centrifugación.
6. El pellet obtenido se mezcló con Matrigel (Amsbio, Abingdon UK) (Huch *et al.*, 2015) y se sembraron 50.000-100.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos (50 µL de matrigel/pocillo). Las placas se mantuvieron durante 10-15 minutos en el incubador a 37°C. Una vez el matrigel se había solidificado, se añadió el medio de expansión de organoides (OEM) (**Tabla 6**). Rock se añadió únicamente durante la primera semana.

MATERIAL Y MÉTODOS

7. Los organoides se pasaron a una concentración de 1:4 aproximadamente cada 7-10 días.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo de organoides derivados de tejido cirrótico

MEDIO EXPANSIÓN (OEM)	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
ADVANCED DMEM/F12		Thermofisher	12634
P/S	1%	LONZA	DE17-602E
GLUTAMAX	1%	Gibco	35050061
HEPES	1%	Gibco	15630080
EGF	50 ng/ml	Peprotech	AF-100-15
HGF	25 ng/ml	Peprotech	100-39H
FGF10	100 ng/ml	Peprotech	500-P151G
NOGGIN	25 ng/ml	Peprotech	120-10C
RSPO1	500 ng/ml	Peprotech	120-38
MIXA			
N-ACETILCISTEINA	1.25 mM	SIGMA	616-91-1
NICOTINAMIDA	10 mM	SIGMA	N3376
MIXB			
CHIRCOLIN	0.5 µM	Axon Medchem	1386
FORSKOLIN	10 µM	Axon Medchem	2264
A83-01	5 µM	Axon Medchem	1421
MIXC			
B27 Sin Vitamina A	1%	Life Technologies	12587-010
N2	1%	Life Technologies	17502-048
GASTRIN	10 nM	SIGMA	G9145-.1MG
ROCK*	10 ul (10 mM)	Axon Medchem	1683

*Solo se añade durante la primera semana

El sombreado muestra los componentes del medio basal de organoides (OBM, de sus siglas en inglés, Organoid Basal Medium)

5.1.1. Descongelación y pase de organoides

DESCONGELACIÓN

1. En primer lugar, se añadieron 4 ml de OBM frío en un falcon de 15 ml.
2. El vial se descongeló en un baño a 37°C
3. El contenido del vial se transfirió al falcon con OBM y se centrifugó durante 4 minutos a 1200 rpm a 4°C.
4. El pellet resultante se resuspendió con matrigel y se plaqueó en un único pocillo de una placa de 24.

PASE DE ORGANOIDES

1. Se aspiró el medio del pocillo y se rompió la gota de matrigel con 1ml de ADVANCED DMEM/F12 frío.
2. Se pipeteó bien para disgregar de forma mecánica la gota y se transfirió a un falcon de 15 ml.
3. Se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos.
4. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de TripLE Express Enzyme (1X, Gibco; 12604021).
5. El material celular se incubó a 37°C durante 5 minutos, y a continuación, con una pipeta pasteur de plástico, se pipeteó arriba y abajo unas 10 veces aproximadamente.
6. La acción enzimática de TripLE se paró con 10 ml de ADVANCED DMEM/F12 frío
7. Se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos, el pellet resultante se resuspendió en la cantidad de matrigel requerida según el pase a realizar.

5.2. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica humana

Los neutrófilos se aislaron de la sangre periférica de pacientes con cirrosis mediante gradiente de densidad utilizando Polymorphprep™ (Axis-Shield, Oslo, Noruega). Se añadió un volumen de 5 ml de sangre sobre 5 ml de Polymorphprep™ y se centrifugó a 500G, durante 35 minutos, a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se recogió la banda inferior que contenía granulocitos.

5.3. Aislamiento de hepatocitos de ratón

Los hepatocitos primarios para los experimentos *in vitro* se aislaron de ratones C57BL/6J (n=4) mediante un protocolo de perfusión retrógrada *in situ* de tres pasos a través de la vena cava inferior, como se describió previamente (López-Vicario et al., 2015):

1. Mediante una cánula de 24G, se perfundió la vena cava inferior con solución de lavado (solución A), seguidamente, se cortó la vena porta y se abrió la cavidad abdominal para bloquear con un clamp quirúrgico la vena supra hepática, y de esa manera, cerrar el circuito. Una vez cerrado el circuito, la solución A se mantuvo a un caudal de 5ml/min hasta que el hígado adquirió un color blanquecino.
2. Se perfundió con la solución de digestión (solución B) que contiene colagenasa al 0,04%. Una vez el hígado estaba digerido, se separó del resto de tejidos y se transfirió a una placa de Petri.
3. El hígado se desmenuzó en una placa Petri con la tercera solución (solución C), que contenía colagenasa y DNasa I, y se incubó en agitación a 37º, durante 5 minutos

El hígado digerido se pasó a través de un filtro de 70 µm (BD Biosciences) y se centrifugó a 60G durante 2 minutos de forma que los hepatocitos quedaron en el pellet. Los hepatocitos aislados se sembraron en placas de 12 pocillos (600.000/pocillo) recubiertas de colágeno I, con medio E-William suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, Penicilina-Streptomina al 1%, insulina 1 µM, Hepes 15 mM y β-mercaptoetanol 50µM.

Los componentes y concentraciones de las soluciones A, B y C se muestran en la **Tabla 7.**

Tabla 7. Soluciones para la perfusión del hígado

REACTIVOS	SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN B	SOLUCIÓN C
HBSS^{-/-}	35 ml	25 ml	20 ml
HEPES	10 mM	10 mM	-
CaCl₂	-	5 mM	-
EDTA	0.5 mM	-	-
Colagenesa IV (sigma)	-	0.04%	0.01%
DNasa	-	-	0.001%

6. ENSAYOS *IN VITRO*

6.1. Respuesta de organoides a mediadores inflamatorios

A una confluencia del 70%, el OEM de los organoides se sustituyó por OBM durante una noche. A continuación, los organoides se estimularon con 50 ng/ml de TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.), 10 ng/ml de IL-1 β (Sigma), o 100 ng/ml de LPS (Sigma), durante 6 horas. Los organoides también se incubaron con 10 μ M del inhibidor de NF- κ B (BAY 11-7082, Sigma) durante 1 hora, previo a la estimulación con IL-1 β durante 6 horas.

6.2. Ensayo de migración de neutrófilos

Para evaluar la migración de neutrófilos inducida por el medio condicionado (MC) de organoides en comparación con el OBM (**Figura 16**), se utilizó el kit comercial MIGRATEST (Glycotope Biotechnology, Heidelberg). Este ensayo permite la determinación cuantitativa por citometría de flujo de la función quimiotáctica de los neutrófilos. Permite determinar el número de neutrófilos que han migrado a través de los insertos de cultivo celular que tienen un tamaño de poro de 3 μ m. El protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La citometría de flujo se realizó utilizando un FACS-Canto (Becton, Dickinson and Company, BD, New Jersey, NJ, USA).

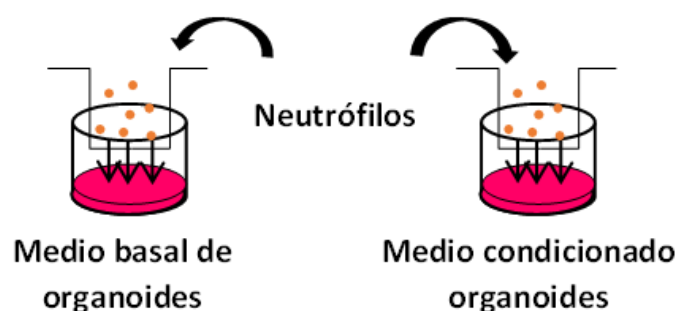


Figura 16. Esquema experimental del test de migración de neutrófilos.

6.3. Co-cultivo indirecto de organoides y neutrófilos

Para evaluar el efecto del MC de los organoides sobre los neutrófilos, se plaquearon neutrófilos derivados de sangre periférica humana a una densidad de 500.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 18 horas con el MC de organoides. Como vehículo, se utilizó el OBM de organoides. Para investigar el efecto contrario, en primer lugar, se cultivaron neutrófilos a una densidad de 250.000 células/pocillo con medio RPMI en una placa de 48 pocillos y se estimularon con LPS o vehículo durante 6 horas. A continuación, se recogieron los MC y se utilizaron para estimular los organoides durante 6 horas. En este caso, como vehículo se utilizó medio RPMI sin FBS. El esquema de este ensayo se muestra en la **Figura 17**.

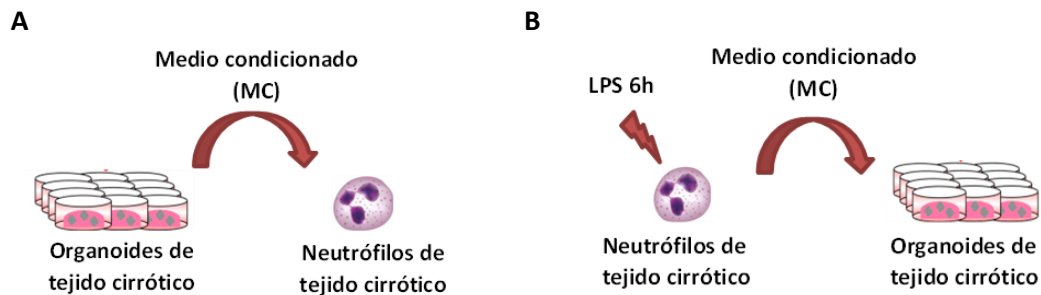


Figura 17. Co-cultivo indirecto de organoides y neutrófilos. (A) Cultivo de neutrófilos con MC de organoides **(B)** Cultivo de organoides con MC de neutrófilos.

6.4. Ensayos *in vitro* con hepatocitos primarios

Dado que los hepatocitos controles no expresan Cxcr4, antes de realizar un estímulo con CXCL12 recombinante, los hepatocitos se incubaron con TGFβ1 (10ng/ml) durante 6h en medio E-Williams suplementado con 1% de FBS. A continuación, los hepatocitos se incubaron con CXCL12 (200 ng/ml) hasta 24 horas. Los hepatocitos incubados sólo con TGFβ1, CXCL12 o vehículo se utilizaron como control.

7. EXTRACCIÓN DE RNA, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA

7.1. Extracción de RNA

El método empleado para realizar la extracción del RNA dependió del tipo de muestra:

- **Muestras de tejido hepático:** Se uso el reactivo Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA), ya que son muestras que contenían gran cantidad de RNA.
- **Muestra celulares:** Se usaron los kits RNeasy Mini Kit o RNeasy Micro Kit, ambos de Quiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits permiten recuperar de manera más eficiente el RNA en aquellas muestras que no tienen una cantidad muy elevada.

El RNA total extraído se sometió a un control de calidad mediante el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

7.2. Retrotranscripción

Para evaluar la expresión génica, el RNA mensajero (RNAm) se tiene que retrotranscribir a DNA. Con este fin, se empleó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3. PCR cuantitativa

La cuantificación del RNAm se llevó a cabo utilizando sondas Taqman y de IDT (**Tabla 8** y **Tabla 9**). Los niveles de RNAm se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con un ciclador ABI 7900 HT (Life Technologies). Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 8. Sondas Taqman empleadas para evaluar la expresión génica

GEN	ESPECIE	REFERENCIA
CXCL1	Humano	Hs00605382_gH
CXCL2	Humano	Hs00601975_m1
CXCL5	Humano	Hs01099660_g1
CXCL6	Humano	Hs00605742_g1
CXCL8	Humano	Hs00174103_m1
CCL20	Humano	Hs00355476_m1
CCL28	Humano	Hs00219797_m1
TNF-α	Humano	Hs00174128_m1
IL-1B	Humano	Hs01555410_m1
KRT7	Humano	Hs00559840_m1
KRT19	Humano	Hs00761767_s1
SOX9	Humano	Hs00165814_m1
Epcam	Ratón	Mm00493214_m1
Hnf1β	Ratón	Mm00447459_m1
Timp1	Ratón	Mm01341361_m1
Col1a1	Ratón	Mm00801666_g1
Col1a2	Ratón	Mm00483921_m1
Mmp2	Ratón	Mm00439498_m1
Pdgfrβ	Ratón	Mm00435553_m1
Cxcl5	Ratón	Mm00436451_g1
Cxcl10	Ratón	Mm00445235_m1
Il6	Ratón	Mm00446190_m1
CCL20	Ratón	Mm01268754_m1

Tabla 9. Sondas IDT para evaluar la expresión génica

GEN	ESPECIE	REFERENCIA/SECUENCIA	
Snai1	Ratón	NM_011427	
Tgfb1	Ratón	NM_011577	
Cxcr4	Ratón	NM_009911	
Cxcl12	Ratón	NM_013655	
Cebpa	Ratón	NM_007678	
Cyp1a2	Ratón	NM_001136059	
Actb	Ratón	NM_007393	
Epcam	Ratón	R 5'-	F 5'-
		ATGGTCGTAGGGGCTTTCTC- 3'	AGGGGCGATCCAGAACAACG- 3'
Alb	Ratón	R 5'-	F 5'-
		TCAACTGTCAGAGCGAGAAG- 3'	AGACTGCCTTGTGTGGAAGAC- 3'
Vim	Ratón	R 5'-	F 5'-
		CATTCTGCCCTGTTACTC- 3'	CTTCCAGAGTTCAGTCAACA- 3'
Krt7	Ratón	R 5'-CTCCAGCAGCTTGCGGT- 3'	F 5'-GGGATGACCTCCGCAA-3'

7.4. Array de muestras hepáticas procedentes de pacientes con ALD y de organoides derivados de tejido cirrótico

El transcriptoma de tejido total de una cohorte de pacientes con ALD (información de los pacientes en **Tabla 2**) y de organoides obtenidos a partir de tejido hepático de 4 pacientes con cirrosis, todos ellos a fase 3, se evaluó utilizando los genechips Affymetrix HG-U219 (Affymetrix, Santa Clara, California, Estados Unidos). Como muestra control del transcriptoma de los organoides, se usó el transcriptoma derivado de individuos controles.

Los datos de microarrays de organoides se depositaron en el Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI con el número de acceso **GSE100901**.

8. ANÁLISIS COMPUTACIONALES

▪ Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA, de sus siglas en inglés, Principal Component Analysis) es un análisis estadístico que permite interpretar conjuntos de datos muy extensos sintetizando la información, pero manteniendo aquellas variables que mejor representen la variabilidad de todas las muestras analizadas. El PCA se representa en una escala multidimensional con el fin de visualizar el nivel de similitud de los casos individuales de un conjunto de datos.

▪ Análisis funcionales de los genes diferencialmente expresados entre las poblaciones celulares aisladas mediante microdissección

Para realizar el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en la RD y en los organoides (Objetivo 1) y en las células HB (Objetivo 2), se emplearon los distintos softwares que se explican a continuación:

- Ingenuity Pathway Analysis

El análisis funcional de los genes diferencialmente expresados se realizó mediante el software comercial Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen; Red Wood, CA). Aquellas vías canónicas que eran estadísticamente significativas, así como los reguladores de la expresión génica que IPA predijo como activados ($z\text{-score} > 2$) o inhibidos ($z\text{-score} < -2$), fueron anotados.

- SsgSEA

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA, de sus siglas en inglés, Gene Set Enrichment Analysis) es un método computacional que determina si un conjunto de genes muestra diferencias estadísticamente significativas entre dos muestras determinadas. El enriquecimiento de las vías se evaluó mediante este software, y se representó mediante un gráfico que muestra los valores de enriquecimiento medio escalados y centrados por grupo.

- Enrich R (Ma'ayan lab)

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta base de datos permitió evaluar las vías que estaban enriquecidas en los listados de genes diferencialmente expresados. Las vías significativas de KEGG y GO fueron anotadas.

- Análisis de interacción de proteínas

El análisis de interacción de proteínas se realizó mediante el software string-db.org. Para el primer objetivo, se evaluó la interacción entre los genes aumentados en la RD con un $\log_{2}FC > 3$; en el segundo objetivo se evaluó la signatura de genes enriquecidos en las células HB respecto a los hepatocitos, y que además correlacionaban con mal pronóstico. En ambos estudios se eliminaron los nodos desconectados de la red principal y se aplicó una fiabilidad de 0,900.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas se describieron con su media (intervalo de confianza del 95%) o su mediana (rango intercuartil). Las variables categóricas se describieron mediante recuentos y porcentajes. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student o la prueba *U* de Mann-Whitney cuando procedía. Las correlaciones entre variables se evaluaron mediante la rho de Spearman o la *r* de Pearson, según procediera. Se utilizó el análisis del área bajo la curva característica del receptor (AUROC, de sus siglas en inglés, Area Under Receiver Operating Characteristic) para determinar el mejor valor de corte y la precisión (sensibilidad y especificidad) de las variables continuas asociadas.

RESULTADOS



OBJETIVO 1

LAS CÉLULAS DE LA REACCIÓN DUCTULAR PRESENTAN UN PERFIL INFLAMATORIO Y RECLUTAN NEUTRÓFILOS EN LA HEPATITIS ALCOHÓLICA

El objetivo global de esta tesis era evaluar el perfil transcriptómico de las células de la RD y de las células HB en la ALD, y más concretamente en la AH. Gracias a este primer objetivo, se ha identificado el perfil transcriptómico de las células de la RD mediante LCM en pacientes con AH y se ha evaluado su asociación con la progresión de la enfermedad.

El análisis transcriptómico de las células de la RD revela su perfil proinflamatorio.

Con el fin de analizar el perfil transcriptómico de las células de la RD, secciones de hígado embebidas en parafina de 6 pacientes con AH se tiñeron para KRT7 y se realizó LCM. Como se muestra en la **Figura 18A**, se aislaron áreas de RD KRT7⁺, áreas KRT7⁻ y áreas de hígado total, y se analizaron mediante secuenciación. Como se esperaba, el PCA mostró que la fracción KRT7⁺ estaba alejada de la fracción KRT7⁻ y a una distancia intermedia de la fracción total (**Figura 18B**).

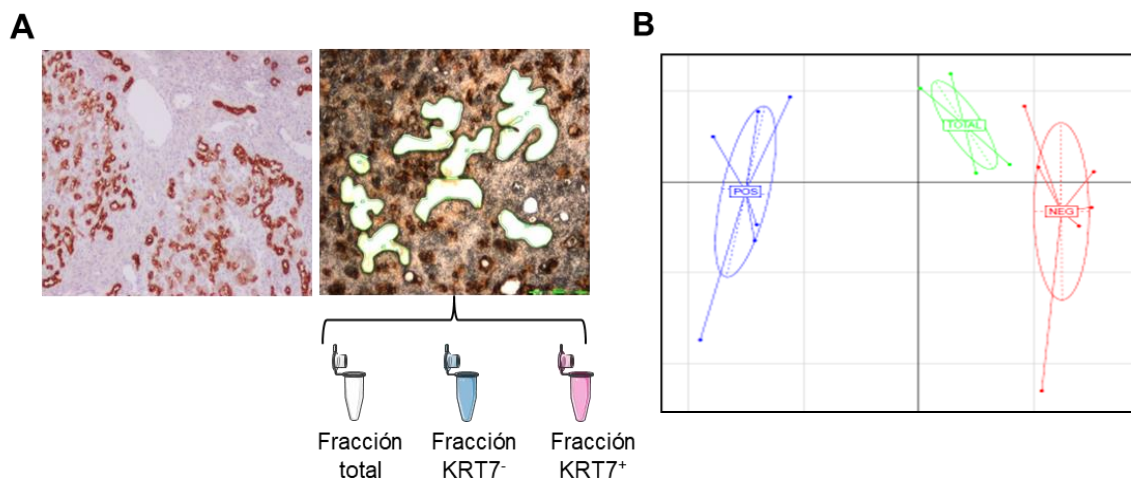


Figura 18. Esquema de las muestras aisladas por microdissección por captura láser (LCM).

(A) Tinción de KRT7 con y sin contraste con hematoxilina en secciones de hígado embebidas en parafina de pacientes con AH. Esquema de las poblaciones seleccionadas mediante LCM: áreas KRT7⁺ (n=6), KRT7⁻ (n=6) y totales (n=4). (B) Análisis de componentes principales (PCA) que muestra las tres poblaciones de las que se secuenció el RNA. Cada muestra se sitúa en el espacio bidimensional según su perfil de expresión. La fracción KRT7⁺ (POS) se representa en azul, la fracción KRT7⁻ (NEG) en rojo y la fracción total en verde.

RESULTADOS

En comparación con la fracción KRT7⁻, las células KRT7⁺ mostraron 2321 genes aumentados y 2031 genes disminuidos. Como se muestra en la **Figura 19**, los 50 genes más aumentados, contenían marcadores de CPH bien conocidos, como KRT7 y PROM1, así como genes no identificados previamente por ser expresados en la RD y las CPH.

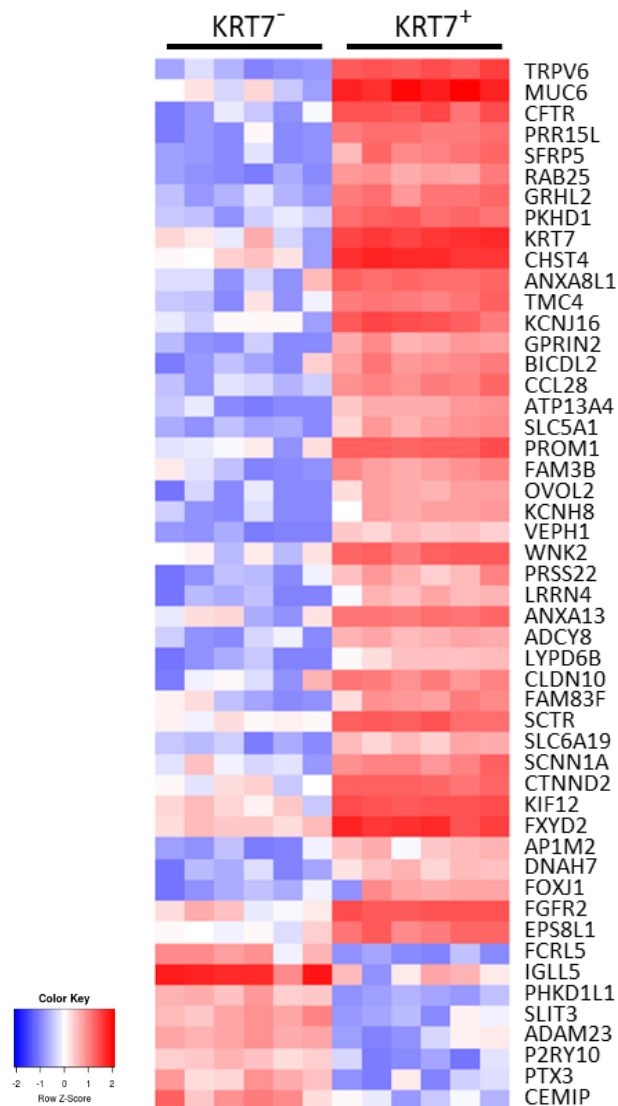


Figura 19. Mapa de calor de los 50 genes más diferencialmente expresados en la fracción KRT7⁺ vs. KRT7⁻. El color rojo indica un enriquecimiento de la expresión génica, mientras que el color azul muestra una disminución de la expresión génica.

La expresión de los marcadores de CPH en el RD se confirmó mediante inmunohistoquímica en secciones de hígado de pacientes con AH (**Figura 20**).

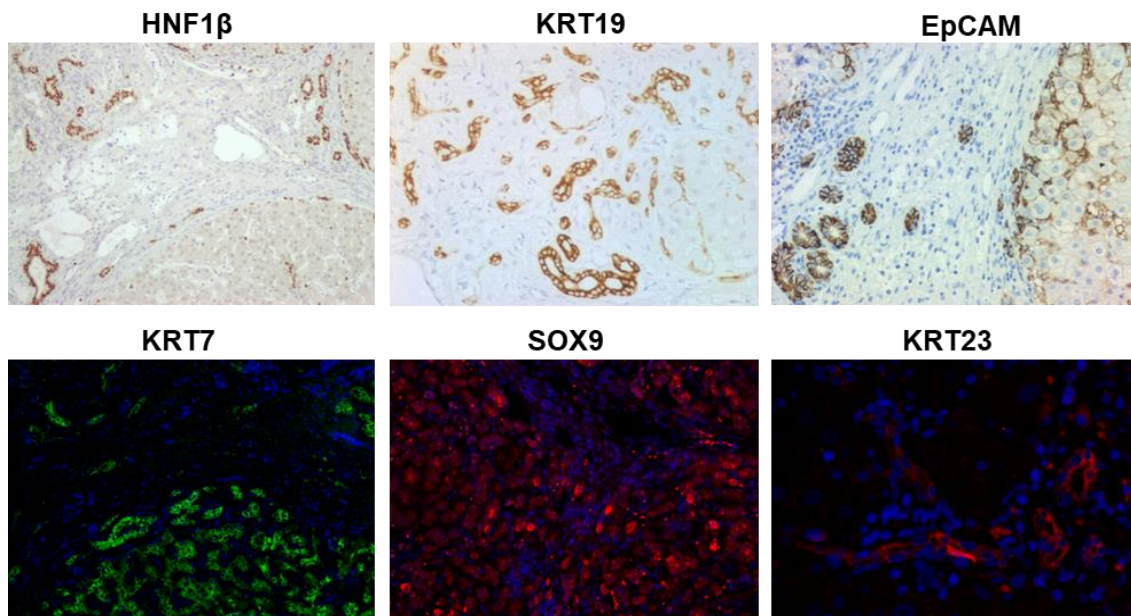


Figura 20. Caracterización histológica de las células de la reacción ductular (DR). Imágenes representativas de la tinción de marcadores de CPH (HNF1 β , KRT19, EPCAM, KRT7, SOX9 y KRT23) en secciones de hígado de pacientes con hepatitis alcohólica (AH).

Es importante destacar que la expresión de marcadores específicos de otros tipos de células hepáticas en la fracción KRT7⁺ en comparación con la fracción KRT7⁻ era negativa: Neutrófilos (MPO; FC= -4,91 \pm 7,44), KC (CD68; FC= -3,9 \pm 1,34), CEH (PDGFRB; FC= -2,43 \pm 1,64), LSEC (VWF; FC= -8,27 \pm 2,21) y células inflamatorias infiltrantes (CD45; FC= -5,34 \pm 2,49), demostrando la pureza de la fracción aislada.

El análisis funcional realizado mediante IPA y GO mostró que los genes aumentados (FC>2) en las células KRT7⁺ estaban implicados en vías relacionadas con la inflamación como "Adhesión de agranulocitos" y "Adhesión de granulocitos y diapedesis", "Señalización NIK/NF-kappaB" o "Quimiotaxis de neutrófilos", así como en vías de señalización clave como "Señalización Wnt" o "Señalización Ephrin A" (**Tabla 10**).

RESULTADOS

Table 10. Análisis funcional de los genes aumentados en la fracción KRT7⁺

Vías GO	<i>p</i>	Vías IPA	<i>p</i>
Adhesión celular	4,2E-14	Adhesión de agranulocitos y diapedesis	3,34E-03
Respuesta Inflamatoria	6,8E-10	Adhesión de granulocitos y diapedesis	3,39E-03
Vía de señalización de Wnt	9,0E-07	Señalización de Efrina A	9,50E-03
Señalización NIK/NF-kappaB	1,3E-06	Señalización de la extravasación de leucocitos	2,10E-02
Señalización célula-célula	4,0E-06	Señalización de ErbB	4,30E-02
Migración leucocitaria	4,2E-06	Señalización de las uniones estrechas	5,01E-02
Quimiotaxis de neutrófilos	6,4E-06		
Adhesión célula-matriz	8,8E-06		
Vía de señalización mediada por quimioquinas	1,1E-05		
Quimiotaxis celular	1,3E-05		

Curiosamente, varios miembros de la familia de quimiocinas CXC- y CCL- incluidos en la vía de “adhesión de granulocitos y diapédesis”, como CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 y CXCL8, estaban altamente expresados en la fracción KRT7⁺ (**Tabla 11**).

Tabla 11. Genes de la vía “adhesión de granulocitos y diapédesis”

Gen	Fold Change (KRT7 ⁺ vs KRT7 ⁻)	p
CCL28	160,817	3,13E-09
CLDN1	5,259	7,57E-05
CLDN3	11,364	3,32E-06
CLDN4	10,054	6,26E-06
CLDN7	5,639	6,37E-05
CLDN9	15,258	7,36E-06
CLDN10	74,484	1,16E-04
CX3CL1	3,310	1,38E-03
CXCL2	2,314	9,25E-03
CXCL5	4,554	2,91E-02
CXCL6	4,399	1,51E-02
CXCL8	3,841	6,18E-03
IL18	2,992	7,31E-04
ITGA2	3,554	3,37E-05
ITGA3	2,732	3,71E-03
MMP7	6,482	1,28E-03
MMP24	6,905	1,57E-03

A continuación, evaluamos la red de interacción de proteínas de los genes altamente expresados en la RD mediante STRING. Como se muestra en la **Figura 21**, los genes aumentados en la RD incluían: genes de la familia de las claudinas, que se expresan en las uniones estrechas de los conductos biliares en desarrollo; genes del metabolismo de los ácidos biliares y las vías de transporte de iones; y marcadores de CPH como EpCAM, KRT7, KRT19, PROM1, junto con miembros de la familia de las mucinas.

Tabla 12. Genes incrementados en la fracción KRT7⁺ vs. KRT7⁻ cuya expresión aumenta conforme progresa la enfermedad hepática por alcohol (ALD).

	Fc PRECH vs. Ctrl	Fc CH vs. Ctrl	Fc AH vs. Ctrl	P CHILD	P MELD
KRT19	-1,55	3,00	2,92		*
KRT7	2,85	10,72	10,25	*	
FGF13	-1,03	1,24	1,45	*	
TESC	1,73	6,41	7,02	*	
GULP1	-1,16	1,46	1,28	*	
ITGB8	-1,05	1,18	1,15	*	*
PDZK1IP1	1,47	7,34	7,55	*	
ANXA3	-1,17	2,63	2,20	*	*
MTCL1	1,32	2,65	2,58	*	*
SNORA23	-1,12	1,01	1,03	*	*
MUC20	1,38	2,22	2,24	*	*
DSG2	-1,08	1,33	1,87	*	*
CLCF1	-1,00	1,11	1,16		*
PFKP	1,32	3,88	6,40	*	
CXCL6	2,18	7,39	22,48	*	*
ELF3	2,11	3,18	4,82	*	*
RASEF	1,22	2,02	3,33	*	*
KRT23	2,58	8,83	22,47	*	*
TACSTD2	-1,02	3,95	5,24	*	*
SPP1	1,87	6,54	16,01	*	*
CXCL5	-1,03	1,38	1,83		*
ITGA2	1,13	2,26	3,36	*	
CXCL8	1,11	1,88	6,99	*	*

PRECH, pre-cirrosis; CH, cirrosis; AH, hepatitis alcohólica; MELD, Model for End- stage Liver Disease

RESULTADOS

Según el patrón de expresión a lo largo de la progresión de la ALD, se identificaron dos grupos de genes: un primer grupo de genes que mostraba un aumento de la expresión a lo largo de la progresión de la enfermedad pero con un nivel de expresión similar entre el tejido hepático de los pacientes con cirrosis y el de los pacientes con AH (**Figura 22A**); y un segundo grupo de genes que mostraba un aumento constante de la expresión génica a lo largo de la progresión de la ALD y que se expresaba de forma diferencial entre el tejido hepático de los pacientes con cirrosis y el de los pacientes con AH (**Figura 22B**). Este último grupo de genes contenía marcadores de CPH como KRT23 y TACSTD2, así como miembros de la familia CXC- como CXCL5, CXCL6 y CXCL8 (**Figura 22B**), lo que indicaba la asociación de los marcadores de CPH y los mediadores inflamatorios en la ALD avanzada, y en particular, en la AH.

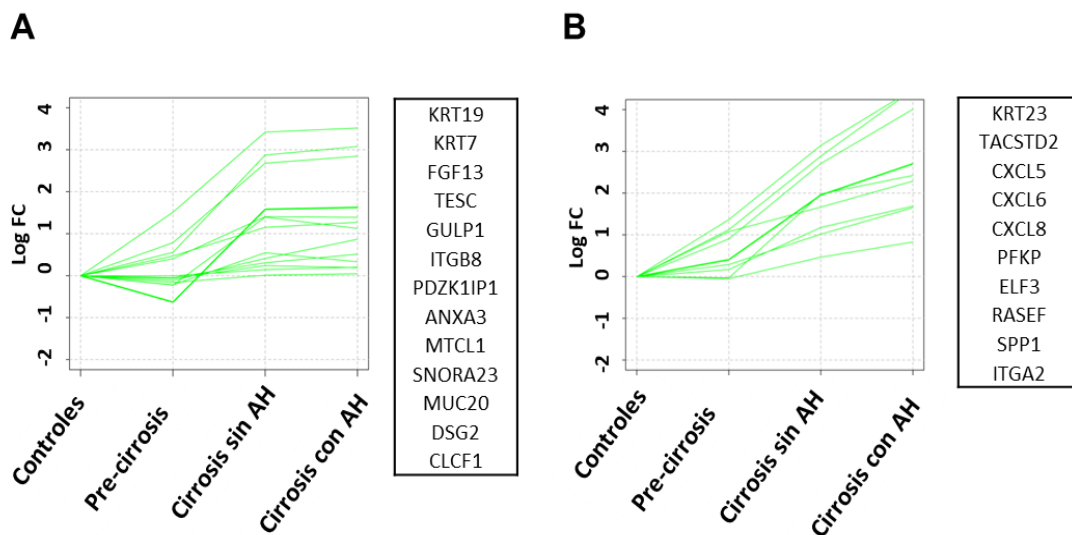


Figura 22. Expresión de los genes de la reacción ductular (RD) en la progresión de la enfermedad hepática por alcohol (ALD). Expresión de los genes de la RD que se correlacionan positivamente con la puntuación MELD y Child-Pugh a lo largo de la progresión de la ALD. Se representan dos grupos diferenciados de genes según el patrón de expresión a lo largo de la progresión de la ALD: **(A)** genes que aumentan con la progresión de la ALD pero que no aumentan de manera significativa en los pacientes con AH, **(B)** genes que aumentan con la progresión de la ALD pero que además aumentan de manera significativa en los pacientes con AH respecto a los pacientes con cirrosis sin AH.

Para confirmar esta asociación, se evaluó la correlación de los marcadores de CPH con las quimiocinas pro-inflamatorias de la familia CXC- y CCL-, usando el transcriptoma de tejido total de una cohorte de pacientes con ALD. Esta evaluación demostró una correlación positiva entre ambos grupos de genes (**Figura 23**).

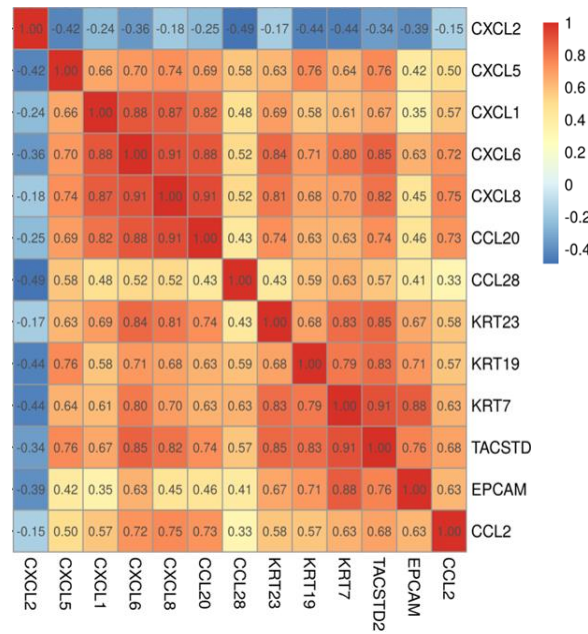


Figura 23. Asociación entre la reacción ductular (RD) y los mediadores inflamatorios. Correlación de la expresión génica de los marcadores de células progenitoras hepáticas (CPH) y las quimiocinas pro-inflamatorias. Los valores de expresión génica se han evaluado en los datos transcriptómicos derivados de biopsias hepáticas de pacientes con ALD.

Mientras que los marcadores expresados en las células de la RD (KRT7, KRT19, SOX9, HNF1B, SPP1, CFTR y SCTR) mostraron una fuerte correlación con las quimiocinas pro-inflamatorias, los transportadores característicos de los colangiocitos (SLC10A2, SLC4A2, SLC9A1, SLC2A1, SLC51A, SLC8A1, SLC5A1, ABCB4, ATP2B1, KCNN2, KCNN4), mostraron una menor correlación con las quimiocinas inflamatorias (**Figura 24**), sugiriendo que las CPH son una fuente importante de mediadores inflamatorios.

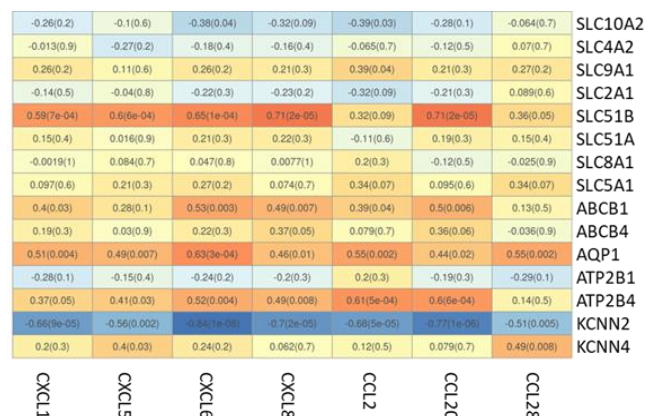


Figura 24. Asociación entre los marcadores de colangiocitos y la inflamación. Correlación entre los principales transportadores de colangiocitos (margen derecho), con las quimiocinas pro-inflamatorias (margen inferior). Los valores de expresión génica se han evaluado en los datos transcriptómicos derivados de biopsias hepáticas de pacientes con ALD.

RESULTADOS

La correlación de las quimiocinas proinflamatorias con los marcadores de CPH se confirmó mediante qPCR en muestras de tejido hepático de pacientes con AH. El análisis de la expresión génica mostró que la expresión de KRT7 correlacionaba positivamente con CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 y CXCL8 (**Figura 25**). En conjunto, estos resultados indican que la presencia de la RD está fuertemente asociada a la expresión de quimiocinas proinflamatorias en el hígado.

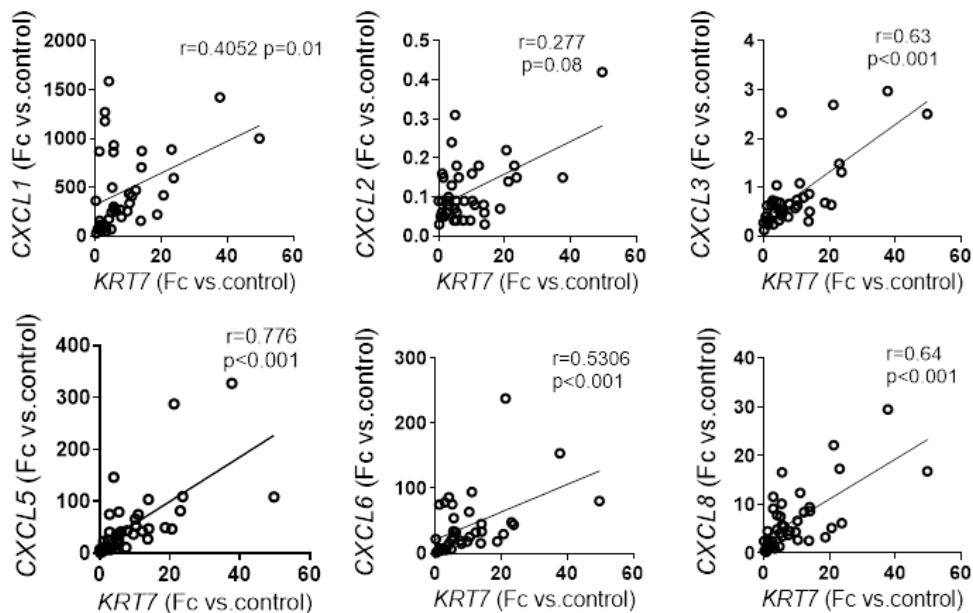


Figura 25. Asociación de las células KRT7⁺ y los mediadores inflamatorios en la hepatitis alcohólica (AH). Correlación de la expresión génica, evaluada por qPCR (Fc vs. ctrl) en pacientes con AH (n=40), de KRT7 con las quimiocinas inflamatorias (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 y CXCL8). Se indican el coeficiente de regresión (r) y el p-valor de cada correlación.

Para evaluar si el perfil proinflamatorio de las células de la RD podía tener un efecto sistémico en la AH, evaluamos los niveles plasmáticos de TROP2 y de CXCL5, una quimiocina que se ha asociado a mal pronóstico en los pacientes con AH (Dominguez et al., 2009) y que está altamente expresada en las células KRT7⁺. Como se muestra en la **Figura 26A**, los niveles séricos de TROP2 estaban aumentados en los pacientes con AH en comparación con los controles sanos. Además, los niveles de TROP2 se correlacionaron con los niveles séricos de CXCL5. La expresión hepática de CXCL5 y TROP2 en las células de la RD se confirmó mediante inmunohistoquímica en el tejido hepático de pacientes con AH (**Figura 26B**). Estos resultados sugieren que, además del

posible efecto intrahepático, los mediadores proinflamatorios expresados por las células de la RD también pueden afectar a la inflamación sistémica.

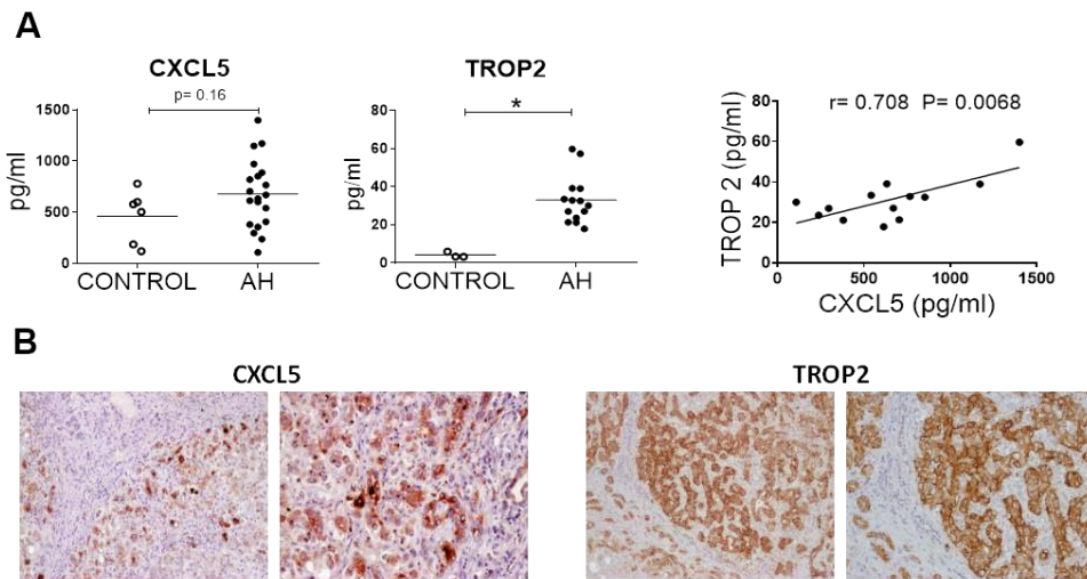


Figura 26. Correlación de la reacción ductular (RD) con la inflamación sistémica en pacientes con hepatitis alcohólica (AH) (A) Niveles séricos (pg/ml) de CXCL5 y TROP2 en pacientes con AH (n=20 y n=14, respectivamente) comparados con individuos controles (n=6 y n=3, respectivamente) *p<0,05 en comparación con los individuos controles. (B) Correlación de los niveles séricos de CXCL5 y TROP2 en suero (pg/ml) en pacientes con AH (n=14). Se indican el coeficiente de regresión (r) y el p-valor (C) Inmunohistoquímica representativa de CXCL5 y TROP2 en secciones de hígado de pacientes con AH.

Los organoides hepáticos derivados de tejido cirrótico mimetizan la RD y tienen un perfil pro-inflamatorio.

Dado que los organoides hepáticos biliares presentan un perfil colangiolar e inmaduro, para estudiar la RD *in vitro*, exploramos si los organoides podrían recapitular las características de la RD, y por tanto, si podrían utilizarse como modelo para estudiar la RD. En las enfermedades biliares, se conoce que los colangiocitos reactivos (Alvaro et al., 2007) muestran un perfil proinflamatorio. Para determinar si las CPH con un fenotipo más inmaduro también expresan mediadores inflamatorios, se generaron organoides hepáticos a partir de tejido hepático de pacientes con cirrosis. Como se muestra en la **Figura 27**, los organoides hepáticos humanos expresaban KRT7 y EpCAM, evaluado por inmunofluorescencia.

RESULTADOS

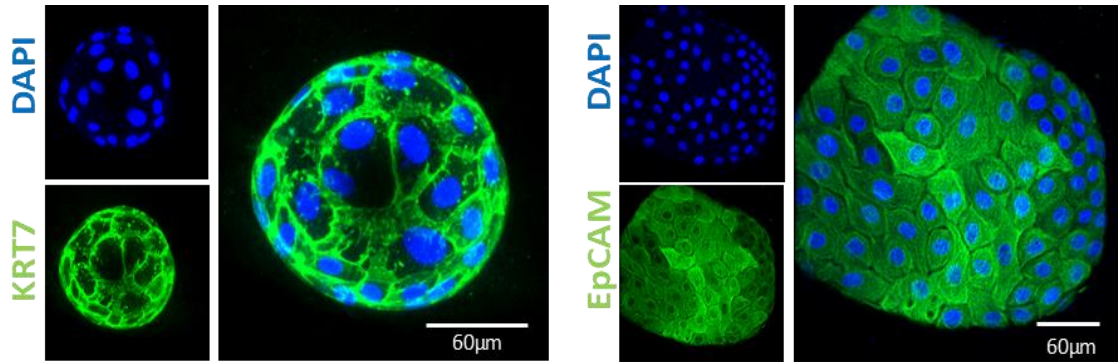


Figura 27. Análisis histológico de organoides hepáticos derivados de pacientes con cirrosis. Inmunofluorescencia de los marcadores de células progenitoras hepáticas (CPH), EpCAM y KRT7, en los organoides hepáticos.

Como se muestra en el GSEA (**Figura 28**), el análisis transcriptómico de los organoides hepáticos mostró un alto enriquecimiento en los genes expresados en la RD, lo que indica una gran similitud entre los organoides y la RD. Estos resultados sugieren que los organoides hepáticos podrían utilizarse como un modelo *in vitro* para estudiar la RD.

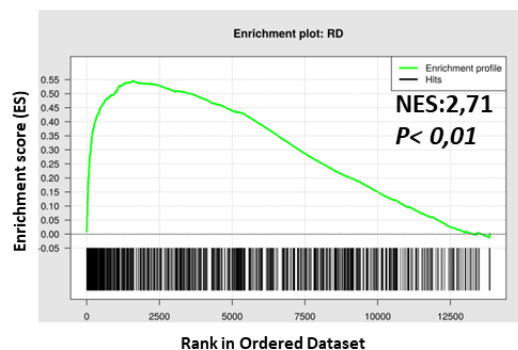


Figura 28. Comparativa entre la reacción ductular humana y los organoides hepáticos. GSEA entre el transcriptoma de los organoides hepáticos y los genes diferencialmente expresados en la fracción KRT7⁺ vs. KRT7⁻. El perfil de expresión génica de los organoides humanos (n=4) vs. tejido hepático de individuos controles (n=4) se utilizó como set de datos. Se indica el valor de enriquecimiento normalizado (NES) y el p-valor.

Cabe destacar que, de la misma manera que las células de la RD, los organoides hepáticos también expresaban quimiocinas de la familia CXC- y CCL- (**Figura 29A**). El análisis por qPCR confirmó la expresión de marcadores de CPH (KRT7, SOX9, EpCAM y KRT19), así como de los mediadores proinflamatorios (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL8 y CCL28) en los organoides hepáticos (**Figura 29B**). Además, los organoides

hepáticos también producían CXCL5 ($11,5 \pm 5,6$ ng/ml), tal y como se detectó en el medio de cultivo de organoides.

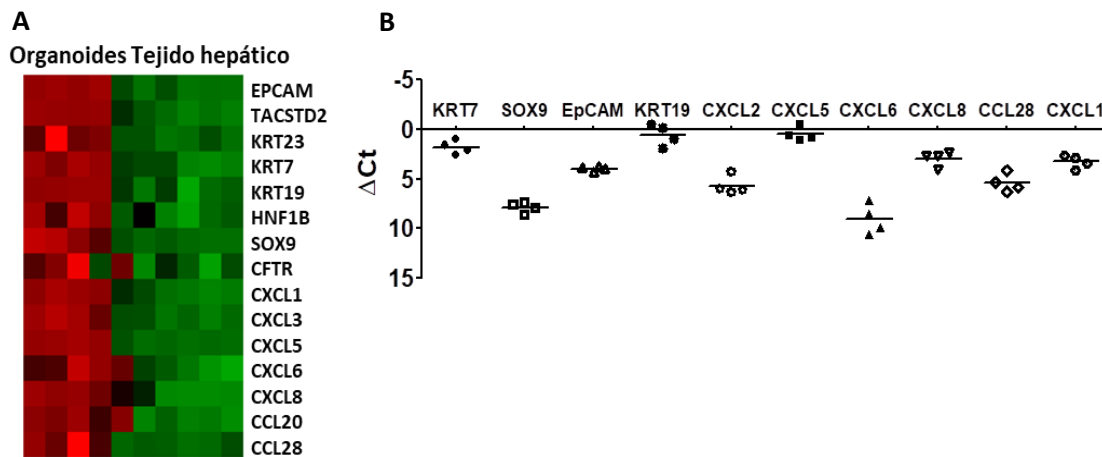


Figura 29. Análisis transcriptómico de los organoides hepáticos. (A) Mapa de calor que ilustra la expresión génica de los marcadores de CPH y las citoquinas inflamatorias en los organoides hepáticos, en comparación con el tejido hepático de individuos controles. **(B)** Expresión génica evaluada por qPCR de marcadores de CPH (KRT7, KRT19, EpCAM y SOX9) y mediadores inflamatorios (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL8 y CCL28) en los organoides humanos. Los niveles de expresión génica se muestran como valores ΔCt (n=4).

Como se muestra en la **Tabla 13**, el análisis funcional realizado por IPA y KEGG mostró que los genes aumentados en los organoides, en comparación con el tejido hepático de individuos controles, también estaban implicados en vías de inflamación como la "Adhesión de agranulocitos", la "Adhesión de granulocitos y diapedesis", la "Señalización de quimioquinas" o la "Vía de señalización de TNF", pero también en otras vías relevantes como la "Vía de señalización de ErbB", la "Señalización de Wnt/ β -catenina" o la "Señalización de ERK/MAPK".

RESULTADOS

Tabla 13. Análisis funcional de los genes aumentados en los organoides cirróticos

KEGG	<i>p</i>	IPA	<i>p</i>
Vía de señalización de Hippo	2,16E-06	Señalización Wnt/ β -catenin	7,76E-05
Uniones estrechas	5,18E-06	Señalización ERK/MAPK	8,51E-05
Apoptosis	1,56E-05	Señalización PI3K/AKT	1,29E-04
Vía de señalización de TNF	7,98E-04	Señalización IL-8	1,51E-04
Migración trasendotelial de leucocitos	2,66E-3	Señalización de Quimioquinas	1,70E-04
Vía de señalización ErbB	9,92E-3	Adhesión de granulocitos y diapedesis	3,33E-02
Vía de señalización Wnt	1,33E-2	Activación de NF- κ B por virus	3,55 E-2
Vía de señalización TGF- β	4,71E-2		

Para evaluar si los organoides presentaban características de colangiocito maduro, se evaluaron una serie de marcadores y transportadores clave de colangiocitos. Como se muestra en la **Tabla 14**, la mayoría de los transportadores de colangiocitos no se expresaban en los organoides.

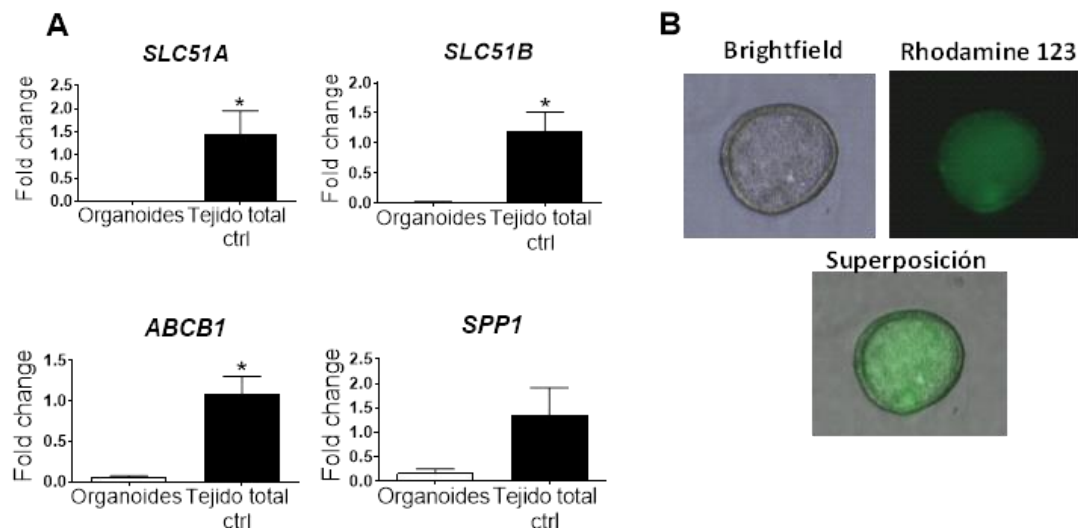
Table 14. Expresión de marcadores de colangiocitos en organoides cirróticos

Gen	Fold Change organoides vs. tejido ctrl	P
SOX9	16,22	2,3E-08
KRT7	109,10	8,0E-09
KRT19	126,76	2,4E-08
HNF1B	2,99	1,4E-05
SPP1	2,87	8,9E-02
CFTR	3,14	2,2E-02
SCTR	1,00	9,9E-01
GPBAR1	-2,22	6,1E-05
SSTR2	-1,17	2,1E-01
ONECUT1	-3,40	1,6E-04
SLC4A2	1,95	8,4E-04
SLC9A1	1,53	2,4E-03
SLC2A1	11,80	1,8E-07
SLC51B	-1,36	7,2E-03
SLC51A	-13,23	5,1E-06
SLC8A1	-2,09	4,9E-04
SLC5A1	6,30	9,3E-06
ABCB4	-76,54	1,1E-11
AQP1	-1,20	1,2E-01
ATP2B1	1,24	1,9E-01
ATP2B4	-1,08	5,3E-01
KCNN2	-50,50	4,4E-06
KCNN4	10,43	3,9E-07
JAG1	3,90	3,1E-07
NOTCH2	-2,04	7,4E-05

Además, aunque los organoides expresaban (ABCB1/MDR1) (**Figura 30A**) y eran capaces de secretar rodhamina 123 en el lumen (**Figura 30B**), la secreción no se inhibía con verapamilo, un inhibidor del transportador MDR1, lo que sugiere que la secreción de rodhamina no era dependiente de MDR1.

RESULTADOS

Estos resultados están de acuerdo con estudios anteriores que sugieren el fenotipo inmaduro de los organoides (Huch et al., 2013b).



A continuación, para evaluar si distintos mediadores inflamatorios podían inducir una respuesta inflamatoria en las CPH, los organoides fueron tratados con IL-1 β , TNF α y LPS. Mientras que la estimulación de los organoides de hígado con IL-1 β y TNF α aumentó la expresión de CXCL1, CXCL5, CXCL6 y CXCL8 (Figura 31A y 31B), evaluado mediante qPCR, el tratamiento con LPS no indujo ningún efecto sobre la expresión de genes proinflamatorios (Figura 31C).

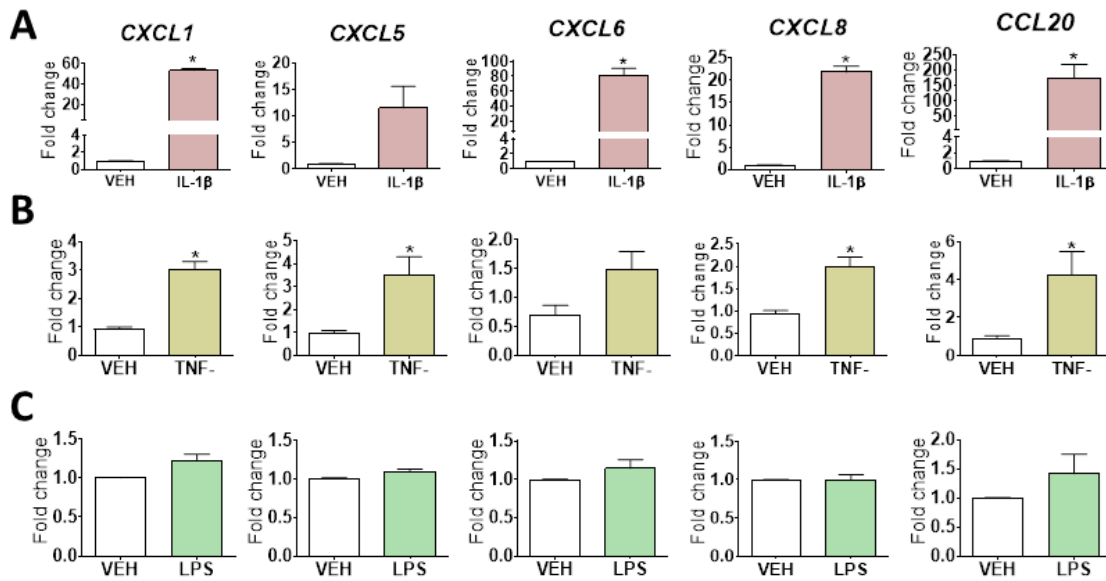


Figura 31. Respuesta de los organoides hepáticos a los mediadores inflamatorios. Expresión génica de citoquinas inflamatorias (CXCL1, CXCL5, CXCL6 y CXCL8) evaluadas por qPCR en los organoides hepáticos tras la estimulación con IL-1 β , TNF- α y LPS. La expresión génica se muestra como el Fc vs. VEH. n=3, *p<0,05 vs. VEH

Como se mostró anteriormente, el análisis funcional de GO reveló que la RD estaba enriquecida en la vía de NF- κ B, sin embargo, el bloqueo de la vía canónica NF- κ B con un inhibidor de NF- κ B no mostró ningún efecto sobre el perfil proinflamatorio basal de los organoides. Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de NF- κ B redujo la expresión de CXCL1 inducida por IL-1 β y mostró una reducción no significativa de la expresión de CXCL5, CXCL6, CXCL8 y CCL20 (**Figura 32**).

En conjunto, estos resultados indican que los organoides hepáticos pueden ser una buena herramienta para estudiar la RD, y sugieren que las CPH presentan un perfil proinflamatorio en el tejido hepático dañado.

RESULTADOS

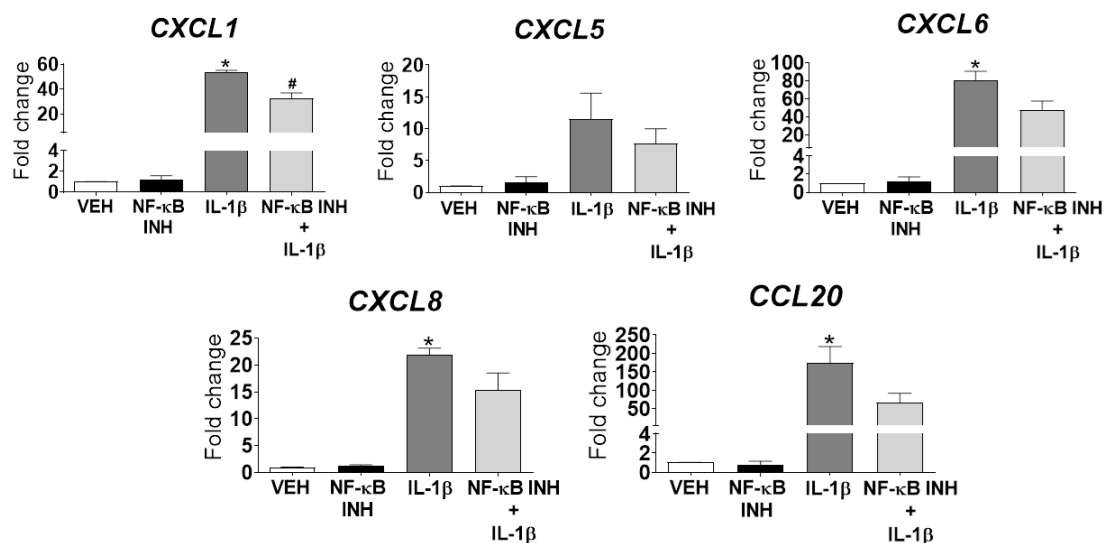


Figura 32. Inhibición de la vía de NF-κB en los organoides hepáticos. Los organoides se incubaron con el vehículo (VEH) o con un inhibidor de NF-κB (NF-κB INH) previo a la estimulación con IL-1β durante 6h. La expresión génica evaluada por qPCR de las citoquinas CXCL1, CXCL5, CXCL6 y CXCL8 se muestra como Fc vs. VEH (n=3), *p<0,05 vs. VEH, #p<0,05 vs. IL-1β

Las células de la RD reclutan neutrófilos en la zona periportal.

CXCL1, CXCL3 y CXCL5 son fuertes quimioatrayentes de los neutrófilos, una de las poblaciones inflamatorias mayoritaria en la AH, por ello, a continuación, investigamos si las células de la RD reclutaban neutrófilos en la zona periportal. Descubrimos que, en la enfermedad hepática crónica avanzada, los neutrófilos se reclutaban en la zona periportal, y se asociaban estrechamente con las células biliares KRT7⁺ en todas las etiologías examinadas, incluyendo HCV, HBV, NASH y ALD (**Figura 33**). Esta observación sugiere que el reclutamiento de neutrófilos en las zonas de RD es una característica común en las enfermedades hepáticas avanzadas, independientemente de la causa de la enfermedad.

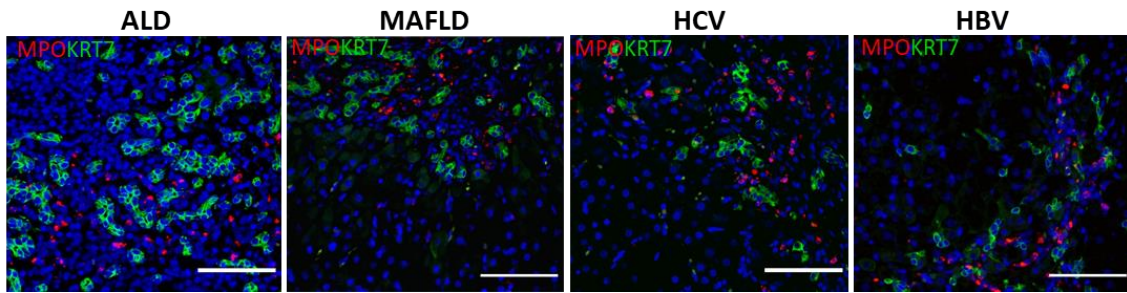


Figura 33. Análisis histológico del reclutamiento de neutrófilos en las enfermedades hepáticas crónicas. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de mieloperoxidasa (MPO) y KRT7 que muestran la presencia de neutrófilos reclutados alrededor de las células de la RD en resecciones hepáticas de pacientes con diferentes etiologías de enfermedad hepática crónica, incluyendo la enfermedad hepática relacionada con el alcohol (ALD), la enfermedad por hígado graso no-alcohólica (NASH) y la enfermedad por virus de la hepatitis C y B (HCV y HBV).

De manera importante, observamos que el número de neutrófilos reclutados aumentaba con la progresión de la enfermedad, y se correlacionaba positivamente con la expansión de la RD (**Figura 34**).

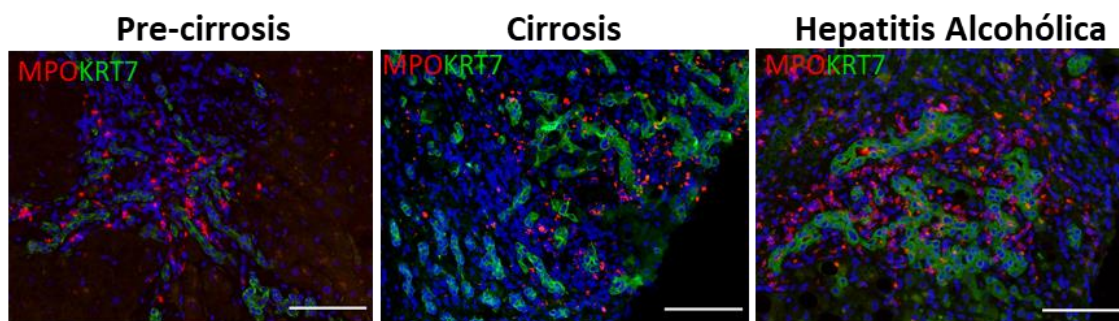


Figura 34. Análisis histológico del reclutamiento de neutrófilos en la enfermedad hepática por alcohol (ALD). Inmunofluorescencia de mieloperoxidasa (MPO) y KRT7 mostrando los neutrófilos retenidos en la reacción ductular (RD) en resecciones hepáticas de pacientes en diferentes estadios de ALD, precirrosis (F=1-2), cirrosis (F=4) y hepatitis alcohólica (AH).

Además, la técnica de “clearing” en tejido hepático de pacientes con enfermedad hepática crónica avanzada demostró que los neutrófilos no sólo eran reclutados en la zona periportal, sino que estaban en estrecho contacto con las células que expresan el marcador biliar KRT7 (**Figura 35**), sugiriendo que podría existir una interacción entre ambos tipos celulares

RESULTADOS

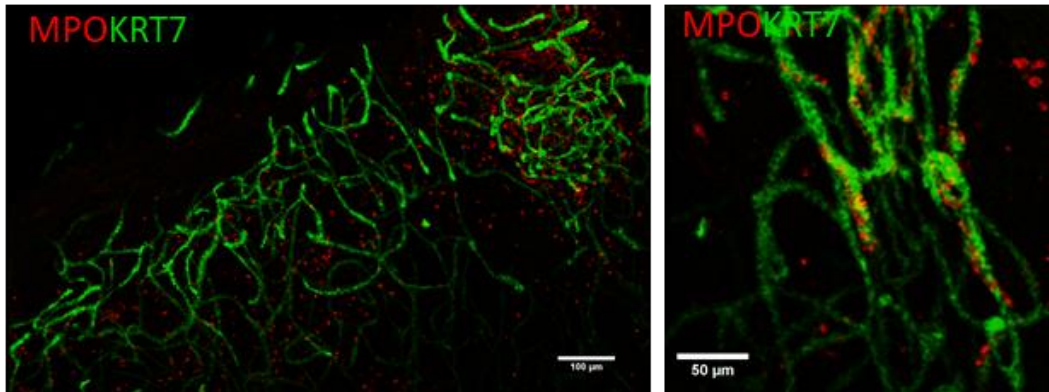


Figura 35. Los neutrófilos se encuentran en contacto estrecho con las células de la reacción ductular (RD). “Clearing” de una sección hepática de 3 mm derivada de un paciente con cirrosis que muestra como los neutrófilos (MPO) se encuentran en contacto con las células de la RD KRT7⁺.

Para evaluar si los macrófagos también podían ser reclutados en las zonas de RD, realizamos una doble inmunofluorescencia de EpCAM y CD68 (marcador de macrófagos humanos). A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos hepáticos se distribuyeron uniformemente por todo el tejido y no en contacto con la RD (**Figura 36**).

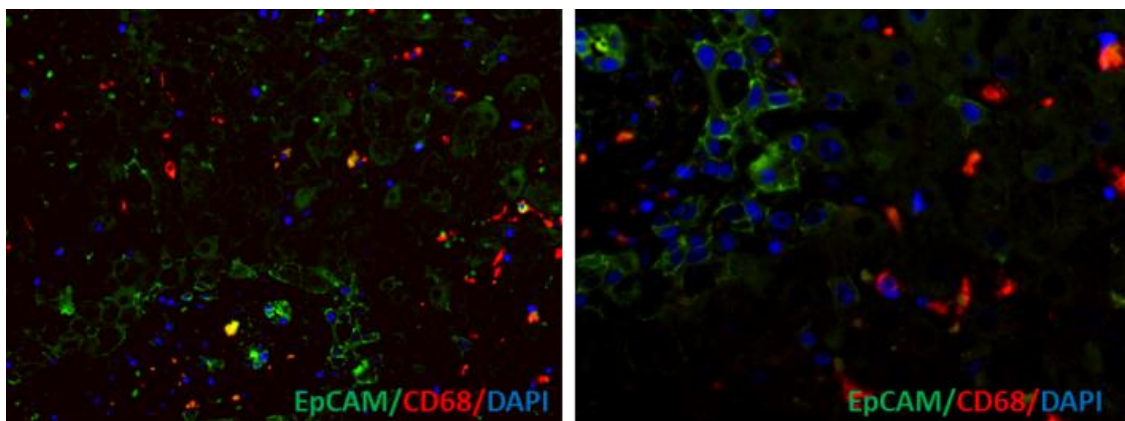


Figura 36. Análisis histológico del reclutamiento de las células de Kupffer (KC) en las zonas de reacción ductular (RD). Imagen representativa de la doble inmunofluorescencia en secciones hepáticas de pacientes con enfermedad hepática crónica relacionada con el alcohol (ALD) del marcador de RD, EPCAM, y el marcador de KC, CD68.

Para determinar si las CPH podían promover el reclutamiento de neutrófilos, analizamos el efecto de los organoides hepáticos sobre los neutrófilos *in vitro*. El MC de los organoides hepáticos (MC CPH) indujo un aumento de la migración de neutrófilos en comparación con el medio basal (**Figura 37**). Además, se observó un cambio en la morfología de los neutrófilos, como se muestra en el gráfico de dispersión frontal vs lateral (**Figura 37**).

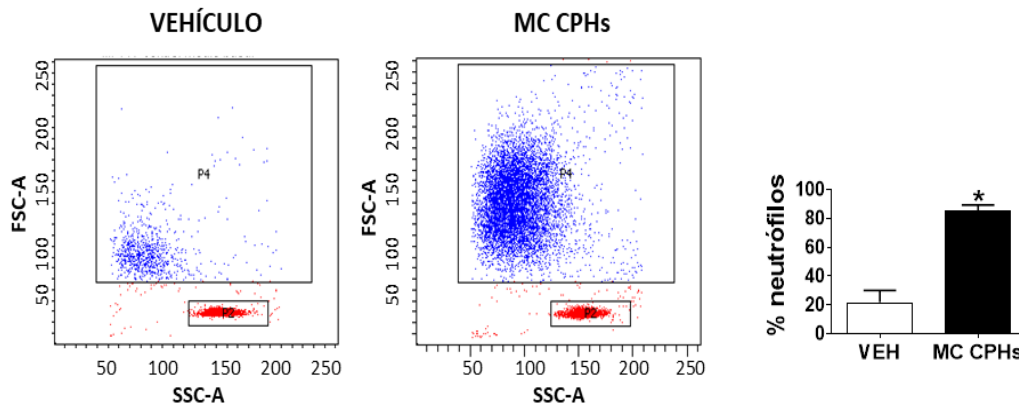


Figura 37. Los organoides de células progenitoras hepáticas (CPH) reclutan neutrófilos. Ensayo de migración de neutrófilos en respuesta al medio condicionado de organoides de CPH (MC CPH) o al vehículo (VEH). Se utilizó el MC de 3 líneas de organoides diferentes y se evaluaron en neutrófilos derivados de sangre periférica de pacientes con cirrosis (n=3). Se muestra el porcentaje de neutrófilos que migran en respuesta al MC vs. VEH.

Para analizar si la interacción entre las CPH y los neutrófilos inducía un perfil proinflamatorio, se utilizó el MC de ambas poblaciones. Los neutrófilos cultivados durante 18 horas con el MC de los organoides aumentaron la expresión de CXCL1, CXCL2, TNF α e IL1 β (**Figura 38A**). Por otra parte, el MC de neutrófilos aumentó la expresión de CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8 y CCL20 en los organoides en comparación con los tratados con vehículo (**Figura 38B**). Curiosamente, el medio condicionado de los neutrófilos estimulados con LPS durante 6h aumentó aún más la expresión de mediadores inflamatorios en los organoides (**Figura 38B**).

RESULTADOS

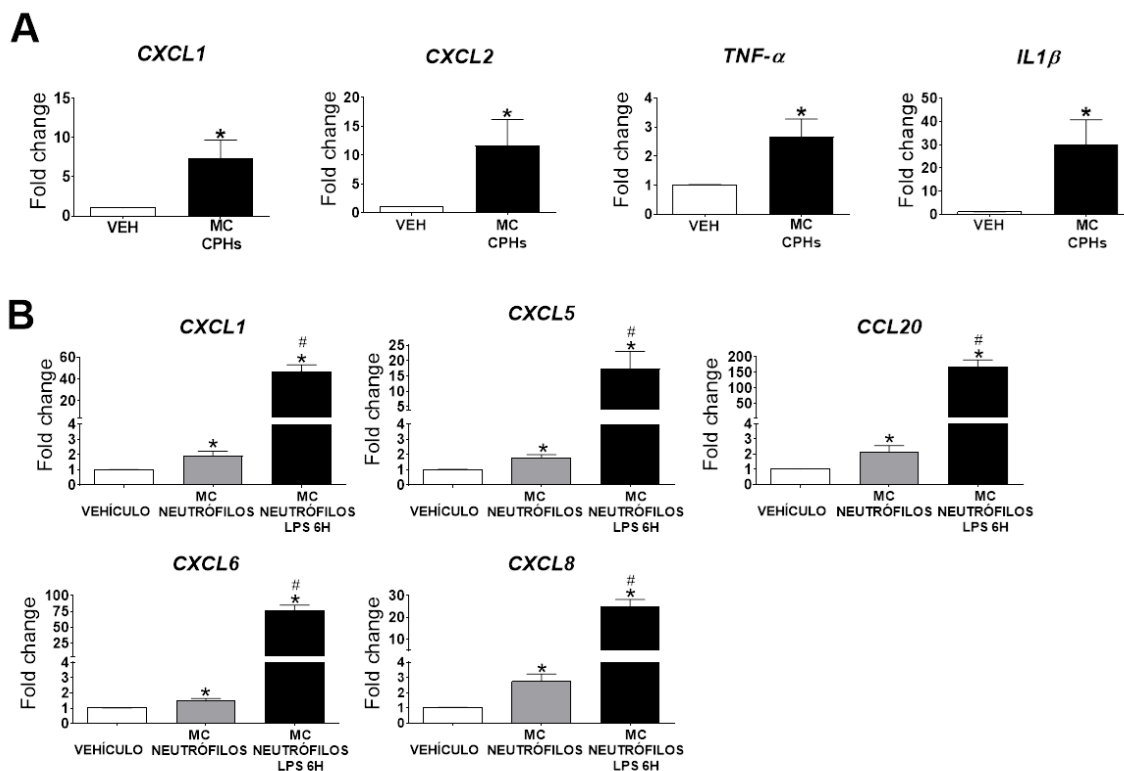


Figura 38. Co-cultivo indirecto entre los organoides hepáticos y los neutrófilos derivados de pacientes con cirrosis. (A) Respuesta de los neutrófilos al medio condicionado de los organoides de células progenitoras hepáticas (MC CPH). Los neutrófilos aislados se incubaron con el MC de 3 pacientes con cirrosis o con el vehículo (VEH) durante 18 horas. La expresión génica se muestra como Fc vs. VEH (n=3) *p<0,05 vs. VEH. **(B)** Respuesta de los organoides al MC de los neutrófilos. Para la estimulación de los organoides se utilizó el MC de neutrófilos estimulados con vehículo o LPS durante 6 horas. Los resultados se muestran como Fc vs. VEH (n=5) *p<0,05 vs. VEH. #p<0,05 vs. MC neutrófilos sin LPS.

Dado que no se había observado ningún efecto directo del LPS en los organoides, como se mostró anteriormente, sugerimos que los mediadores secretados por los neutrófilos podían estar potenciando el perfil inflamatorio de los organoides. Estos resultados indican que existe una interacción entre las células de la RD y los neutrófilos, que puede dar lugar a la migración de neutrófilos en las zonas de la RD y a una consiguiente respuesta inflamatoria.

Con el fin de evaluar el efecto de los neutrófilos en el daño hepático crónico, empleamos el modelo experimental con dieta DDC, ya que se ha observado que recapitula muchas de las características de la enfermedad crónica por alcohol, como la RD, la fibrosis o el reclutamiento de neutrófilos. Como se muestra en la **Figura 39**, existe una gran similitud

entre el perfil transcriptómico de las células de la RD humana y las células de la RD aisladas de ratones con dieta DDC, en comparación con las células de la RD de ratones con un daño inducido por dieta CDE (Rodrigo-Torres et al., 2014).

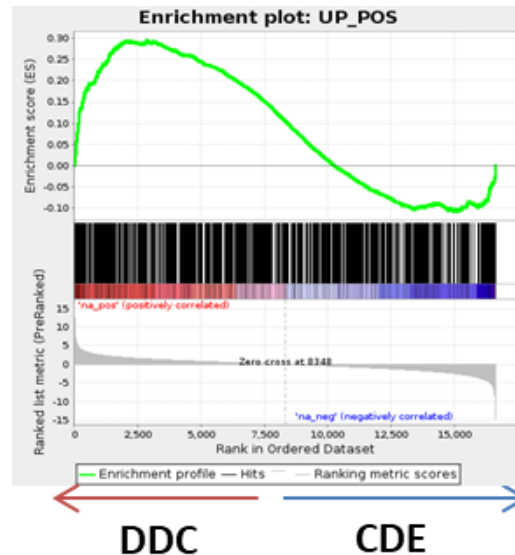


Figura 39. GSEA entre el perfil transcriptómico de la reacción ductular (RD) humana y el transcriptoma de las células de la RD de ratones tratados con DDC y CDE. Se utilizó como set de datos el perfil de expresión génica de las células de la RD de ratones tratados con DDC vs. CDE. Se muestra el valor de enriquecimiento normalizado (NES) y el p-valor. Estos resultados muestran que la RD humana muestra una gran similitud con la RD de los ratones tratados con DDC.

En base a estas observaciones, quisimos evaluar el efecto de inhibir el reclutamiento de los neutrófilos sobre la RD y la progresión del daño. Como hemos descrito previamente, las CPH presentan un aumento en la expresión de las quimiocinas CXCL1, 5, 6 y 8, las cuales son ligandos del receptor CXCR1/2. Por esta razón, inhibimos el reclutamiento de neutrófilos mediante la administración del inhibidor de CXCR1/2 SCH-527123. El inhibidor de CXCR1/2 se administró durante 3 semanas de manera paralela a la administración de dieta DDC. La inhibición de CXCR1/2 dio lugar a una reducción significativa del reclutamiento de neutrófilos, de la expansión de la RD, del grado de fibrosis y la angiogénesis intrahepática (**Figura 40**). En resumen, estos resultados indican que los neutrófilos están implicados en el desarrollo de una respuesta regenerativa inadaptada en la enfermedad hepática crónica, mediando la expansión de la RD, la fibrosis y la angiogénesis.

RESULTADOS

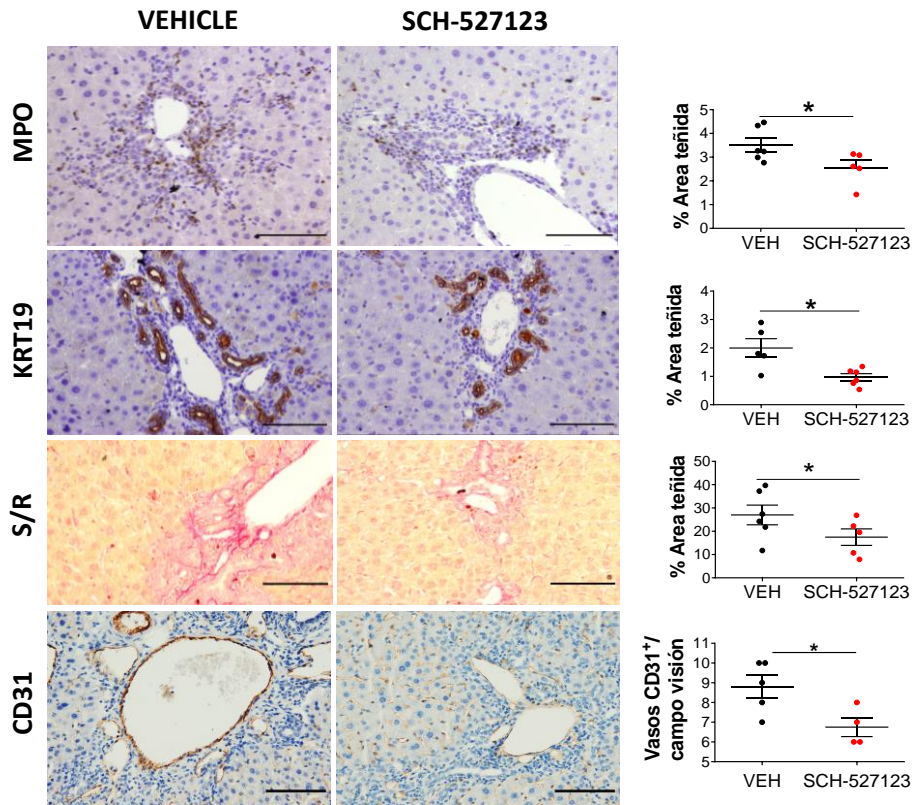


Figura 40. Bloqueo del reclutamiento de neutrófilos mediante la administración de un inhibidor de CXCR1/2. Los ratones fueron alimentados con DDC y tratados diariamente con el inhibidor de CXCR1/2 (SCH-527123) durante 3 semanas. Imágenes representativas de MPO, KRT19, tinción S/R y CD31 de secciones de hígado de ratones tratados con dieta DDC durante 3 semanas y tratados con el inhibidor de CXCR1/2 o el vehículo (n=5-6 ratones por grupo). La angiogénesis se midió contando manualmente el número de vasos CD31⁺ por campo de visión. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. VEH.

OBJETIVO 2

EL PERFIL DE LAS CÉLULAS HEPATOBILIARES EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA POR ALCOHOL IDENTIFICA CXCR4 COMO IMPULSOR DE LA REPROGRAMACIÓN CELULAR

Gracias al segundo objetivo de esta tesis se ha podido estudiar de manera independiente la asociación de las células HB y las células de la RD con la progresión de la enfermedad. Además, se ha evaluado el perfil transcriptómico de las células HB y los mecanismos moleculares que regulan la desdiferenciación de los hepatocitos.

Las células HB son un sello distintivo de la AH y se correlacionan con la progresión de la enfermedad

La expansión de la RD en pacientes con AH y su correlación con la gravedad de la enfermedad se ha descrito previamente (Dubuquoy et al., 2015a; Sancho-Bru et al., 2012b). Además, los estudios histológicos en muestras humanas han demostrado la presencia de células HB que expresan marcadores biliares como KRT7, manteniendo la morfología de los hepatocitos (Sancho-Bru et al., 2012b; Spee et al., 2010a). En este estudio, nos planteamos estudiar las células HB y las células de la DR de forma independiente para evaluar su asociación con la progresión de la enfermedad. Para ello, en primer lugar, las biopsias de hígado de pacientes con ALD se tiñeron para KRT7 como se muestra en la **Figura 41**.

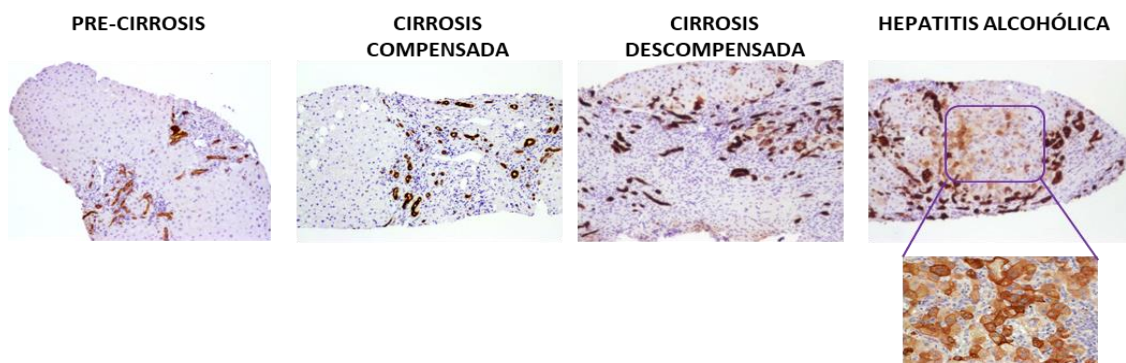


Figura 41. Análisis histológico de las células hepatobiliares (HB) y de las células de la reacción ductular (RD) en la progresión de la enfermedad hepática por alcohol (ALD). Tinción de KRT7 en biopsias hepáticas de 3 pacientes con precirrosis, 4 pacientes con cirrosis compensada, 13 pacientes con cirrosis descompensada y 15 pacientes con AH.

RESULTADOS

Tanto las células HB como las de la DR aumentaron en los pacientes con cirrosis descompensada y en los pacientes con AH en comparación con los pacientes con precirrosis y cirrosis compensada (**Figura 42A**). Sin embargo, mientras que el grado de RD no cambiaba en los pacientes con cirrosis descompensada y AH, la cantidad de células HB aumentaba en los pacientes con AH en comparación con los pacientes con cirrosis descompensada (**Figura 42B**).

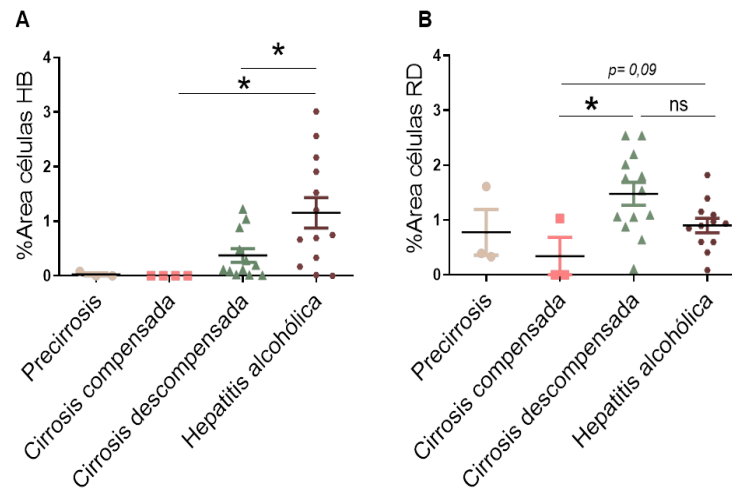


Figura 42. Asociación de las células hepatobiliares (HB) y de la reacción ductular (RD) con la progresión de la enfermedad hepática por alcohol (ALD). Representación del área de células HB (hepatocitos KRT7⁺) y del área de células de la RD a lo largo de la progresión de la ALD. * $p < 0,05$.

Además, la cantidad de células HB y de la DR correlacionaban de manera positiva ($r=0,41$; $p=0,02$) (**Figura 43**).

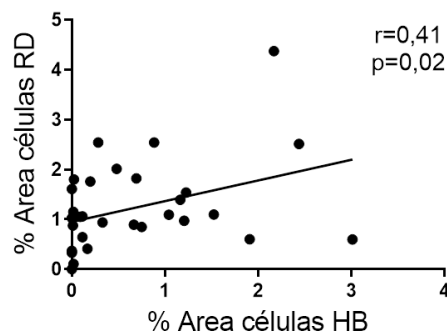


Figura 43. Correlación entre las células hepatobiliares (HB) y las células de la reacción ductular (RD). Correlación entre el área ocupada por las células HB y el área ocupada por la RD en las biopsias de pacientes con enfermedad hepática por alcohol (ALD).

Es importante destacar que, mientras que las células de la DR no presentaban una correlación significativa con la gravedad de la enfermedad, el número de células HB mostró una correlación positiva con la puntuación de CHILD PUGH ($r=0,52$; $p<0,01$) y una correlación negativa con los valores de albúmina ($r= -0,4$; $p=0,03$) (**Figura 44**). En conjunto, estos resultados sugieren que las células HB, pero no las células de la DR, se asocian con una peor función hepática en pacientes con ALD avanzada.

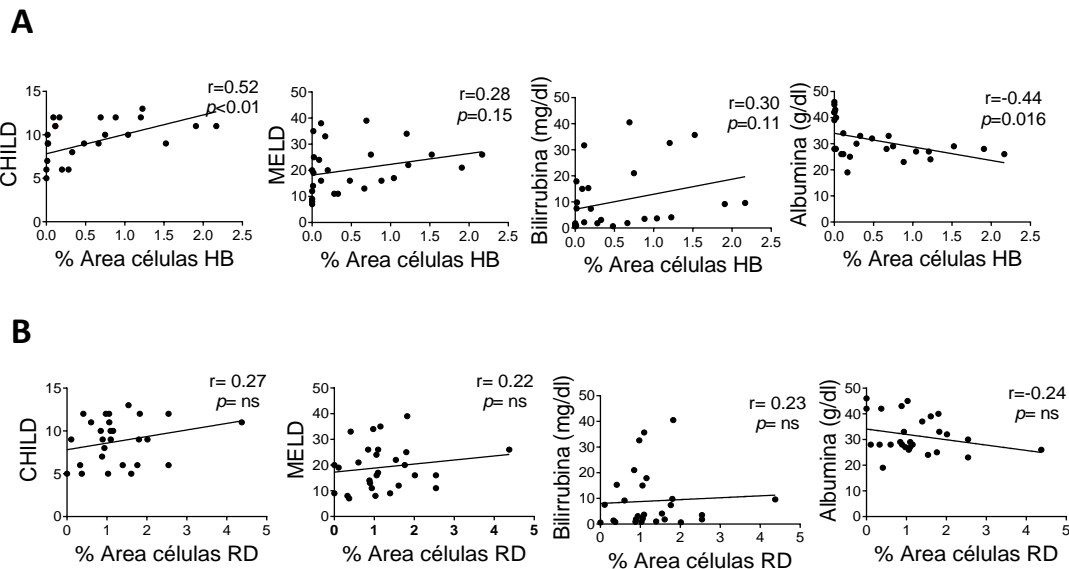


Figura 44. Asociación de las células hepatobiliarias (HB) y de la reacción ductular (DR) con los parámetros clínicos asociados a los pacientes con enfermedad hepática por alcohol (ALD). Correlación entre las células HB (%área) (A) y las células de la DR (%área) (B) con los parámetros clínicos (Child Pugh y MELD) y bioquímicos (albúmina y bilirrubina) asociados a la cohorte de pacientes con ALD. Se indican el coeficiente de regresión (r) y el p-valor de cada correlación.

Caracterización del perfil transcriptómico de las células HB

Para investigar el perfil de expresión génica de las células HB, realizamos una LCM y un análisis de secuenciación del RNA de las células HB (hepatocitos KRT7⁺), los hepatocitos (hepatocitos KRT7⁻) y las células de la RD KRT7⁺, a partir de secciones de hígado embebidas en parafina de cuatro pacientes con ALD avanzada (**Figura 45A**). Como se muestra en la **Figura 45B**, el análisis de PCA de los datos de transcriptómica reveló una marcada distancia entre las tres poblaciones, indicando importantes cambios en el perfil de expresión génica (**Tabla 1 y 2 del Anexo**).

RESULTADOS

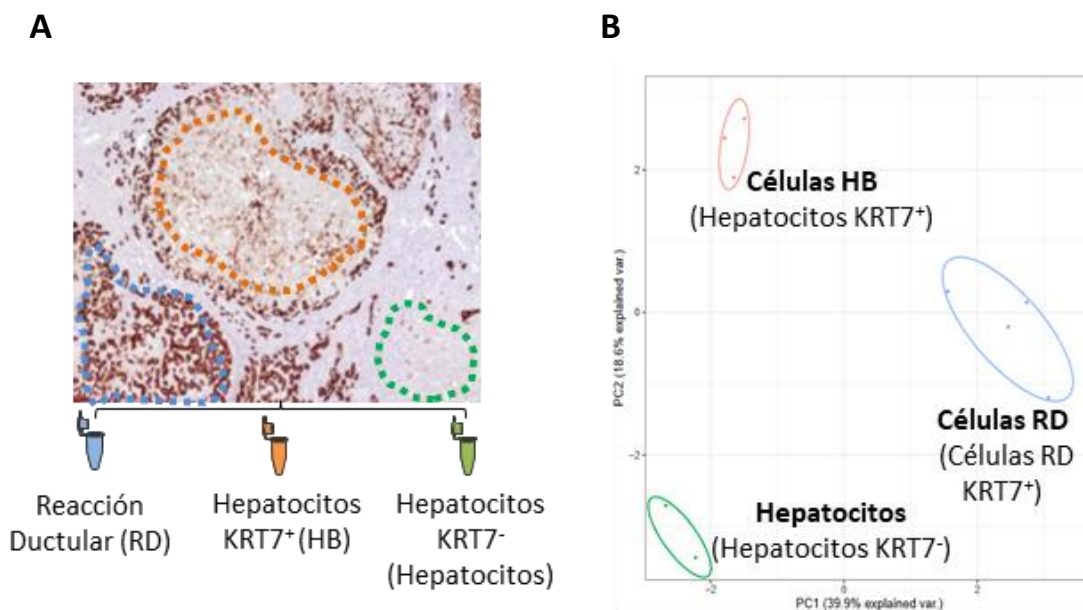


Figura 45. Microdissección por captura láser (LCM) y secuenciación del RNA de las células hepatobiliares (HB). (A) Tinción de KRT7 de un explante de hígado con AH que muestra las tres poblaciones aisladas por LCM; células de la reacción ductular (RD) KRT7⁺ en azul (n=4), células hepatobiliares (HB) (hepatocitos KRT7⁺) en naranja (n=3) y hepatocitos (hepatocitos KRT7⁻) en verde (n=2). (B) Análisis de componentes principales (PCA) que muestra las poblaciones aisladas que se sometieron a la secuenciación del RNA. Cada muestra está posicionada en el espacio bidimensional según su perfil de expresión.

A continuación, quisimos determinar si el aumento en la expresión de genes biliares en los hepatocitos estaba asociado a la progresión de la enfermedad. Así, realizamos un análisis de GSEA para evaluar la expresión de; 1) Signatura génica de hepatocito a BEC (genes aumentados en RD vs. HB vs. Hepatocitos) y 2) Signatura génica de hepatocito (genes aumentados en hepatocitos vs. HB vs. RD), en pacientes con AH en comparación con pacientes con ASH (Argemi et al., 2019) (**Figura 46**). El GSEA mostró un enriquecimiento positivo de la firma génica hepatobiliar (hepatocito a BEC) en los pacientes con AH (NES: 2,92; p : 2,47E-05) (**Figura 46A**). Por el contrario, la firma génica hepatocitaria estaba enriquecida en los pacientes con ASH (NES: -2,26; p : 1,66E-05) (**Figura 46B**). Estos resultados indican que los pacientes con AH presentan un aumento de la expresión de los genes asociados a la reprogramación de hepatocitos a BEC y a la pérdida de identidad hepatocitaria.

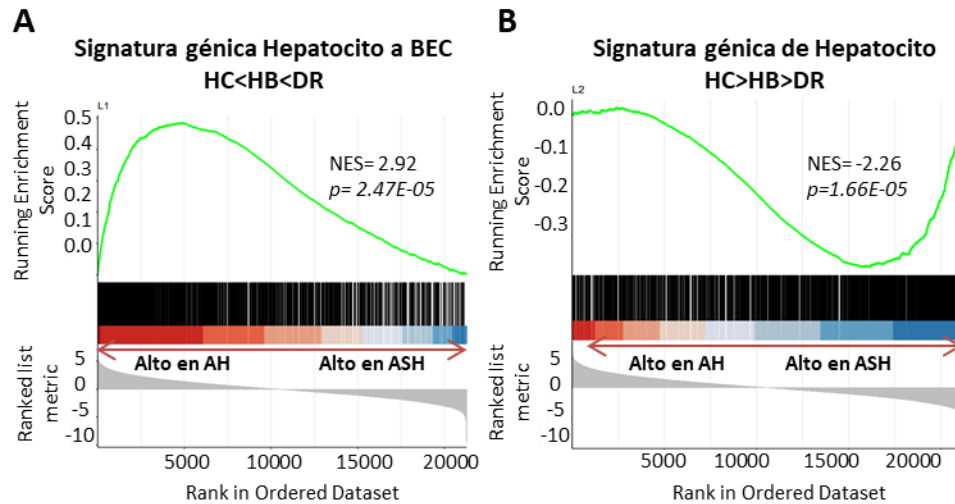


Figura 46. La reprogramación de los hepatocitos se asocia a la progresión de la enfermedad. GSEA de la firma génica hepatocito a BEC (hepatocitos<HB<DR) y la firma génica de hepatocitos (hepatocitos>HB>DR) en el set de datos correspondiente al transcriptoma de pacientes con AH vs. ASH. Se indica el valor de enriquecimiento normalizado (NES) y el p-valor.

Para analizar más a fondo el perfil transcriptómico de las tres poblaciones aisladas por LCM, se evaluaron marcadores clave de hepatocitos, BEC y células progenitoras. Como se muestra en la **Figura 47** y en la **Tabla 3 del Anexo**, la expresión de los genes específicos de hepatocitos mostró una reducción leve en las células HB en comparación con los hepatocitos. Sin embargo, las células HB sí que presentaron un aumento en la expresión de genes de BEC y células progenitoras, como AGR2, CLDN4, TACSTD2, KRT19 y SOX9, entre otros (**Figura 47**).

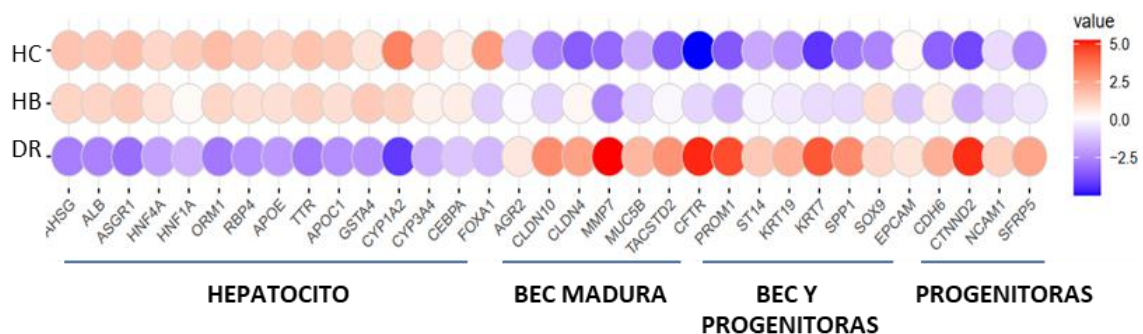


Figura 47. Las células hepatobiliares (HB) presentan un fenotipo intermedio entre los hepatocitos (HC) y las células de la reacción ductular (RD). Diagrama que resume los valores de expresión media de los genes hepáticos y biliares en las tres poblaciones, HC, células (HB) y células de la RD. Los puntos rojos y azules representan el enriquecimiento positivo y negativo, respectivamente.

RESULTADOS

La expresión de marcadores específicos de BEC (EPCAM, KRT7, SOX9 y TROP2) y del marcador de hepatocitos HEPAR1 se confirmó mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (**Figura 48**) en muestras de tejido hepático de pacientes con AH. Estos resultados sugieren que las células HB muestran aumento en la expresión de los genes biliares mientras que mantienen en cierta medida la expresión de los marcadores de hepatocitos.

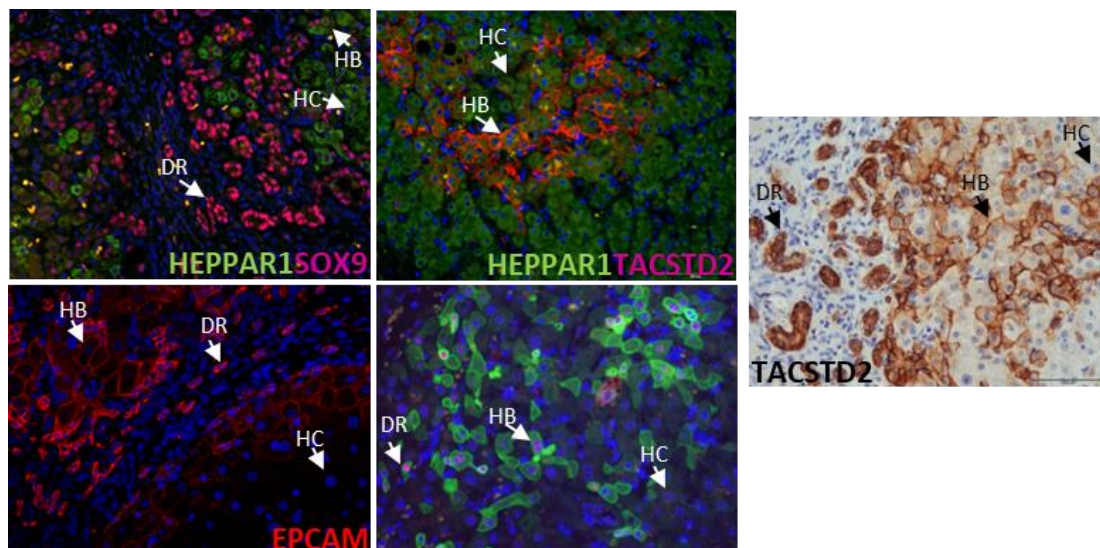


Figura 48. Caracterización histológica de las células hepatobiliares (HB). Imágenes representativas de marcadores biliares (EPCAM, KRT7, SOX9 y TROP2) y hepatocitarios (HEPPAR1) en secciones de hígado embebidas en parafina de pacientes con AH. Se indican los hepatocitos (HC), las células HB y células de la reacción ductular (DR).

Análisis funcional de las células HB

Para entender los eventos moleculares que promueven la plasticidad de los hepatocitos, se utilizó GSEA para identificar las vías enriquecidas en cada población. Como se muestra en la **Figura 49** y en la **Tabla 4 del Anexo**, el análisis reveló que tanto los hepatocitos como las células HB estaban enriquecidos en las vías metabólicas, como la gluconeogénesis o el metabolismo de los ácidos biliares, así como en las vías asociadas a la apoptosis. Curiosamente, las células HB estaban enriquecidas en vías inflamatorias como la vía de NF κ B, y vías relacionadas con la progresión del cáncer y la matriz extracelular, como JAK-STAT, CXCR4, y la activación de las MMP.

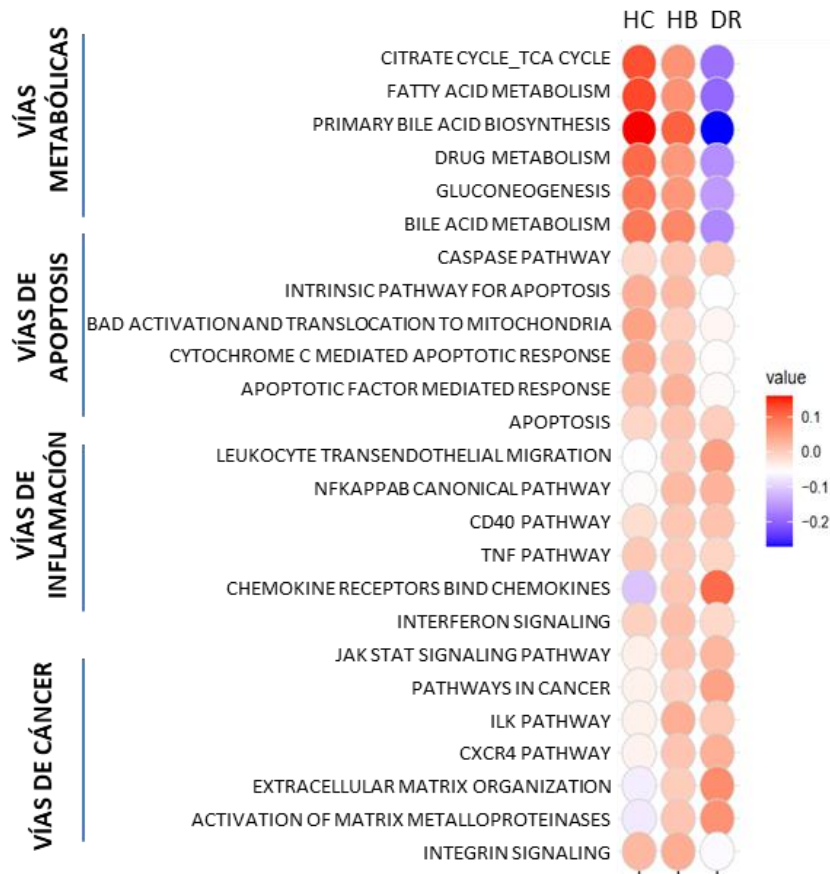


Figura 49. Análisis funcional de las células hepatobiliares (HB). Diagrama que muestra las vías enriquecidas en las tres poblaciones (HC, HB, DR). Los puntos rojos representan conjuntos de genes activados y los puntos azules representan conjuntos de genes desregulados. Los p-valores se muestran en la **Tabla 4 del Anexo I**.

A continuación, realizamos un análisis más exhaustivo comparando de manera independiente las células HB con los hepatocitos, o con las células de la DR. Este análisis identificó 438 genes aumentados y 399 genes disminuidos en las células HB vs. los hepatocitos. Como se muestra en la **Figura 50A**, las células HB mostraron una regulación a la baja del ligando Notch, JAG2 y de genes asociados a función hepática, como FOXA1 y GGT1, entre otros. Los genes aumentados en las células HB incluían marcadores biliares, como SPP1, TACSTD2 y CLDN4, genes relacionados con la transición epitelial-mesenquimal (EMT, de sus siglas en inglés, epithelial to mesenchymal transition), como ZEB2 y TGFβR1, y genes asociados a la vía de CXCR4, como CXCR4, PAG1, ITGA4 e ITGA8. La comparación del perfil transcriptómico de las células HB con las células de la RD (**Figura 50B**) mostró 603 genes aumentados y 558 genes disminuidos, y de manera contraria a la otra comparativa, se observó una expresión reducida de marcadores

RESULTADOS

biliares como KRT7, EPCAM o PROM1, y un enriquecimiento en genes de hepatocitos como ALB, HNF4A o SLC10A1. Los 50 genes más aumentados y disminuidos en ambas comparativas (HB vs. HC y HB vs. RD) se muestran en las **Tablas 1 y 2** del Anexo.

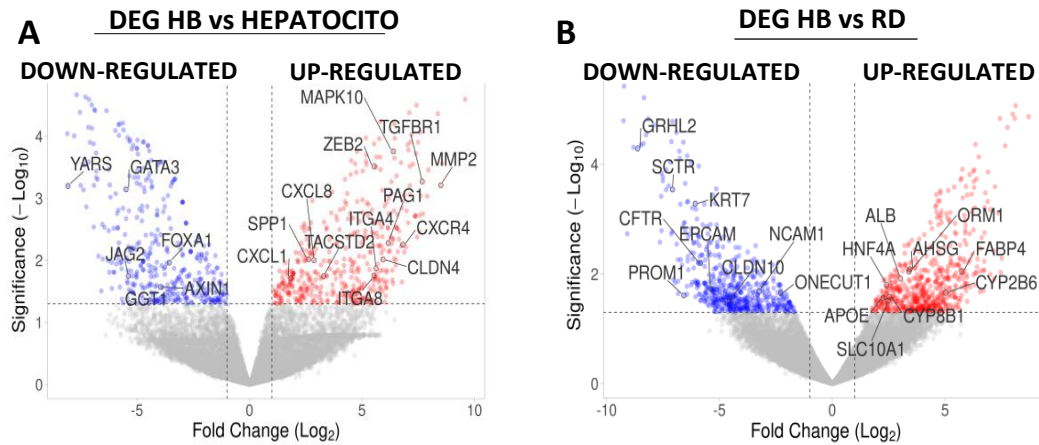


Figura 50. Análisis transcriptómico de las células hepatobiliares (HB) (A) Volcano plot de los genes diferencialmente expresados (DEG, de sus siglas en inglés, differentially expressed genes) en las células HB vs. los hepatocitos o **(B)** vs. las células de la reacción ductular (RD). Los genes seleccionados de cada panel están anotados.

Estas dos comparativas fueron a su vez analizadas con el fin de identificar vías diferencialmente enriquecidas, así como reguladores upstream. En comparación con los hepatocitos, las células HB estaban enriquecidas en vías relacionadas con cáncer, inflamación, senescencia celular y la vía de señalización de CXCL12 (**Tabla 15**).

Table 15. Análisis funcional de los genes aumentados en las células hepatobilires (HB) vs. hepatocitos

MSigDB Hallmark y KEGG	<i>p</i>	GO	<i>p</i>	IPA	<i>p</i>
Señalización vía KRAS	0.0009	Transición G2/M del ciclo celular	0.0014	Papel de BRCA1 en el daño del DNA	4,90E-05
Migración trasendotelial de leucocitos	0.0006	Transporte de amidas	0.0023	Vía de señalización de cáncer de pulmón	2,14E-04
Señalización de TNF- α vía NF-KB	0.0028	Transporte de vitaminas	0.0035	Señalización de la leucemia mieloide crónica	6,61E-04
Vía de señalización del receptor Toll-like	0.0055	Transición de fase del ciclo celular mitótico	0.0039	Señalización del cáncer de pecho	6,76E-04
Vía de señalización ErbB	0.0079	Vía de señalización de la quemoquina CXCL12	0.0040	Señalización del adenocarcinoma pancreático	7,59E-04
Señalización de quimioquinas	0.0176			Señalización renina-angiotensina	1,95E-03
Transición EMT	0.0222			Señalización del cáncer de próstata	3,31E-03
Senescencia celular	0.0416			Señalización NGF	

GO, Gene Ontologies; MSigDB, molecular signature database; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Por otro lado, en comparación con las células de la DR, las células HB estaban enriquecidas en las vías del metabolismo hepático y mostraban una reducción de las vías asociadas a las células biliares, como la secreción biliar, la señalización Notch o la señalización Wnt-beta catenina (**Tabla 16**).

RESULTADOS

Table 16. Análisis funcional de los genes incrementados en las células hepatobiliares (HB) vs. las células de la reacción ductular (RD)

MSigDB Hallmark y KEGG	<i>p</i>	GO	<i>p</i>	IPA	<i>p</i>
Secreción pancreática	0.0003	Homeostasis iónica	0.0001	Activación FXR/RXR	2,00E-18
Secreción de Bilis	0.0024	Respuesta celular a quetona	0.0005	Activación LXR/RXR	1,32E-09
Vía de Notch	0.0042	Importación de cationes inorgánicos a través de la membrana plasmática	0.0008	Señalización de la respuesta de fase aguda	8,71E-08
Uniones apicales	0.0160	Respuesta celular a forskolin	0.0013	Sistema de coagulación	2,34E-06
Señalización de Wnt-beta Catenin	0.0233	Respuesta a vitamina D	0.0013	Biosíntesis de estrógeno	8,51E-04
		Respuesta celular al alcohol	0.0015	Señalización AMPK	1,62E-03
		Quimiotaxis celular	0.0021	Vía WNT/Ca+	2,34E-03
		Regulación de la transducción de señales	0.0021		
		Regulación de la vía de Wnt	0.0025		

GO, Gene Ontologies; MSigDB, molecular signature database; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Por último, el análisis de los reguladores up-stream (**Figura 51**) nos permitió analizar los reguladores que podrían estar activados en cada una de las comparativas. De esta manera, factores de transcripción relacionados con EMT, como SMAD3 o SNAI1, y citoquinas y factores de crecimiento como CCL2, IL17A o TNF, se predijeron como activados en las células HB en comparación con los hepatocitos. Por otro lado, en comparación con las células de la RD, se predijeron como activados ($z\text{-score} > 2$) factores de transcripción específicos de hepatocito como HNF4A o PPARGC1A.

	VIAS REGULADORAS UPSTREAM	
	Factores de transcripción	Citoquinas y factores de crecimiento
DEG HB vs. Hepatocitos	RELA, JUN, NANOG, STAT1, CEBPB, CEBPA, SMAD3, POU5F1, SNAI1	TGFB1, IFNG, IL22, IGF1, CCL2, FGF2, TNF, IL17A, OSM, HGF, CSF2, AGT
DEG HB vs. RD	HNF4A, GATA4, PPARGC1A, HNF1A, SREBF1, CREB3L3, MED1, XBP1	IFNA2, CX3CL1

Figura 51. Predicción de los reguladores upstream activados en las células hepatobiliares (HB). Reguladores upstream activados en células HB frente a hepatocitos o reguladores upstream activados en células HB vs. células de la reacción ductular (RD). Se anotaron los factores de transcripción, las citoquinas y los factores de crecimiento con un valor de z-score >2.

Los genes aumentados en las células HB frente a los hepatocitos se evaluaron en una cohorte de pacientes con ALD (Argemi et al., 2019). Como se muestra en el mapa de calor (**Figura 52**) y en la **Tabla 5 del Anexo**, de los 438 genes aumentados en las células HB en comparación con los hepatocitos, 40 genes se encontraban aumentados en los pacientes con AH severa en comparación con los pacientes con AH no severa y correlacionaban de manera positiva con los marcadores clínicos de severidad.

RESULTADOS

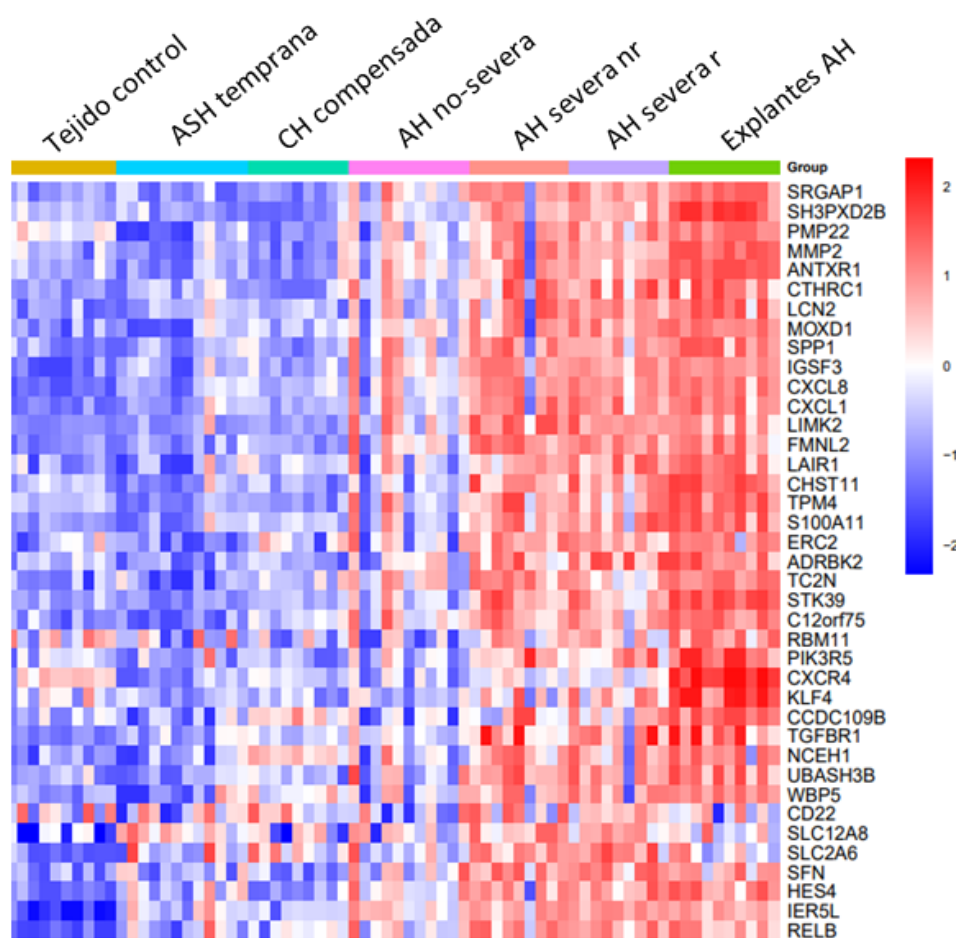


Figura 52. La signatura de células hepatobiliares (HB) se asocia con la progresión de la enfermedad. Mapa de calor que ilustra la signatura génica de las células HB a lo largo de la progresión de la enfermedad hepática por alcohol (ALD). El color rojo indica un aumento de la expresión génica, mientras que el color azul muestra una expresión génica reducida. ASH: esteatohepatitis relacionada con el alcohol; comp CH: cirrosis compensada; AH: hepatitis relacionada con el alcohol; nr: no respondedores; r: respondedores.

Posteriormente, una red de interacción de proteínas de estos genes reveló el vínculo entre CXCR4, la vía de TGFB y los miembros de la familia CXCL-(**Figura 53**). En conjunto, estos resultados sugieren que las vías de inflamación y los procesos asociados al cáncer pueden desempeñar un papel importante en la reprogramación de los hepatocitos en la AH.

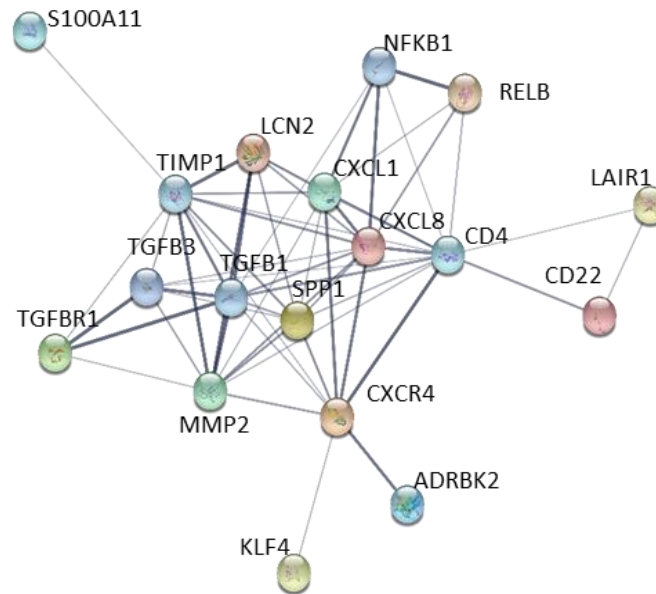


Figura 53. Red de interacción de proteínas de la signatura de las células hepatobiliares (HB). De los 39 genes de la signatura, 10 fueron agrupados y 8 genes adicionales fueron añadidos a través del software String.

La señalización de CXCR4 está asociada a la pérdida de identidad de los hepatocitos y a la progresión de la enfermedad

Como se mostró en la **Figura 49**, la vía de CXCR4 se encontraba enriquecida en las células HB en comparación con los hepatocitos, además, la expresión génica de CXCR4 también estaba altamente expresada en las células HB en comparación con los hepatocitos (Fold Change: 112) (**Figura 54**).

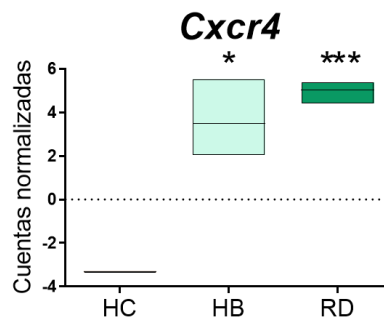


Figura 54. La expresión de CXCR4 está aumentada en las células hepatobiliares (HB) y las de la reacción ductular (RD) en comparación con los hepatocitos. Nivel de expresión de CXCR4 (cuentas normalizadas) en las poblaciones aisladas por microdissección láser. Las diferencias significativas se indican cómo * $p < 0,05$.

RESULTADOS

En un contexto tumoral, se ha descrito que CXCR4 fomenta la plasticidad y el crecimiento de las células tumorales (Guo et al., 2016). Por lo tanto, evaluamos el papel de CXCR4 en la reprogramación de hepatocitos a BEC. Confirmando el perfil de expresión génica, el análisis proteico mostró la expresión de CXCR4 y EPCAM en las células HB y de la RD (**Figura 55A**). Además, se vio que CXCL12 se expresaba en las células de la RD y en las células no parenquimales (**Figura 55B**).

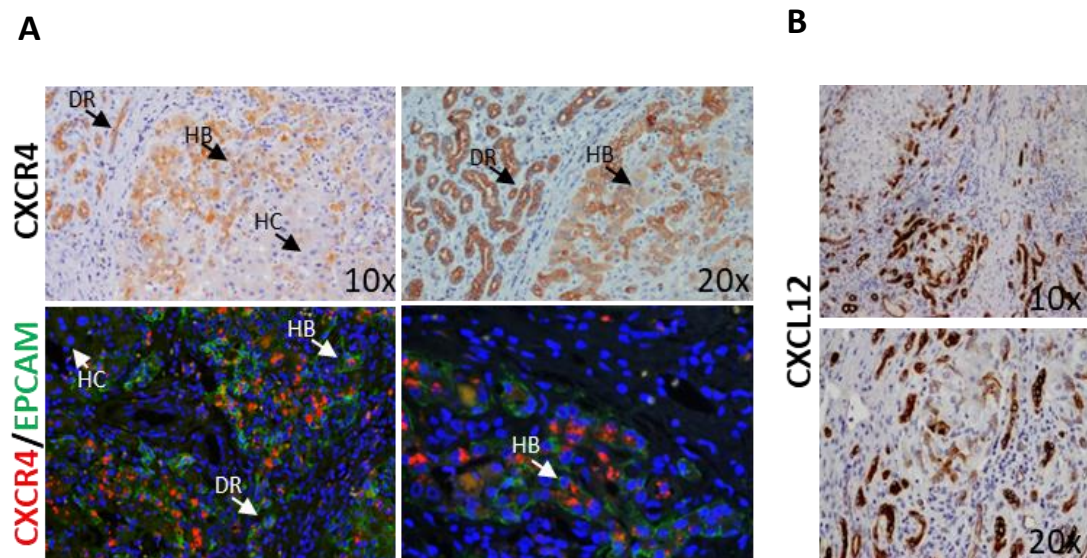


Figura 55. Caracterización histológica de la vía de CXCR4. (A) Imagen representativa de CXCR4 y doble inmunofluorescencia con EPCAM y (B) imagen representativa de CXCL12 en secciones de hígado de pacientes con AH. Se indican los hepatocitos (HC), las células HB y de la RD.

A continuación, evaluamos la asociación de CXCR4 con la dediferenciación de los hepatocitos en una cohorte de pacientes con AH (Argemi et al., 2019). Curiosamente, como se muestra en la **Figura 56A**, la expresión de CXCR4 se correlacionó negativamente con los factores de transcripción de los hepatocitos y la albúmina, pero mostró una correlación positiva con los marcadores de células biliares y progenitoras. Además, se observó una correlación positiva de la expresión de CXCR4 con los marcadores de inflamación y EMT. De manera importante, la expresión del gen CXCR4 correlacionaba de manera positiva con los parámetros clínicos de mal pronóstico, como CHILD y Bilirrubina (**Figura 56B**).

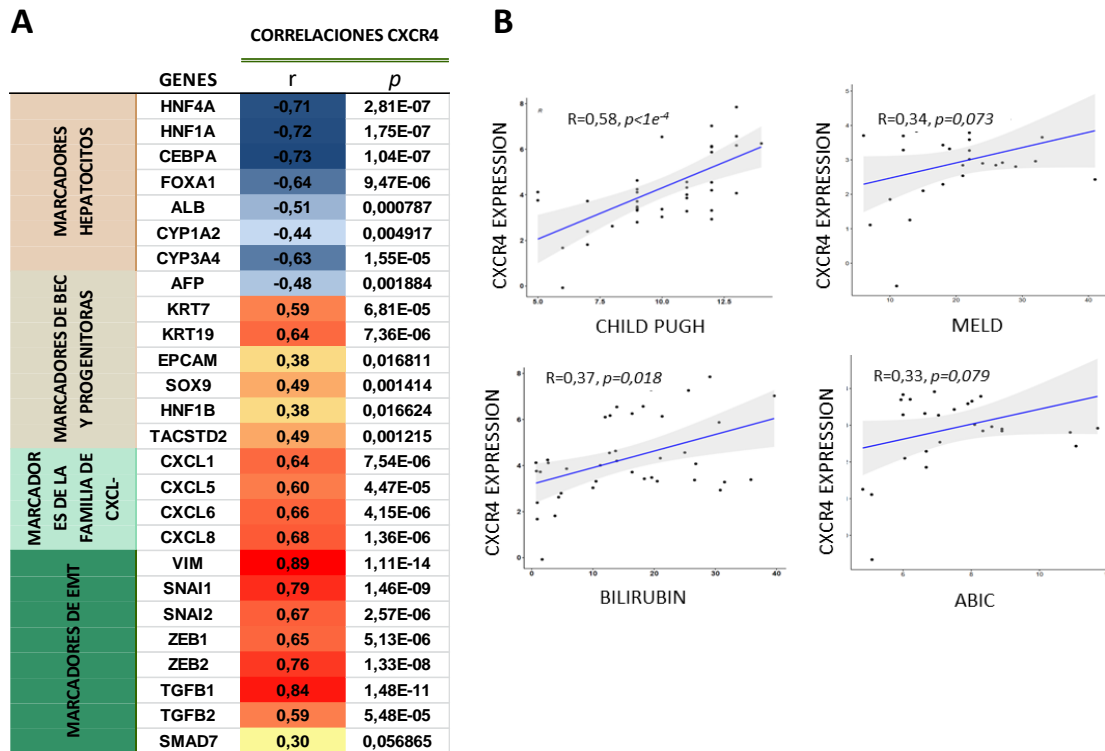


Figura 56. La expresión de Cxcr4 correlaciona con la pérdida de identidad de los hepatocitos y la progresión de la enfermedad. (A) Correlación de la expresión de CXCR4 con 4 set de genes específicos: genes de la familia CXCL-, marcadores de hepatocitos, marcadores biliares y marcadores de transición epitelio-mesenquima (EMT) y **(B)** correlación con parámetros clínicos. Se utilizaron como conjunto de datos el transcriptoma de los pacientes con hepatitis alcohólica (AH). Se indican el coeficiente de regresión (r) y el p-valor.

Hasta la fecha, y como hemos mencionado en el primer objetivo, no existen modelos de ratón que recapitulen las características fisiopatológicas de la AH, caracterizada, entre otros rasgos, por la expansión de la RD y la reprogramación hepatocitos. Por ello, para estudiar funcionalmente el papel de la expresión de Cxcr4 en la reprogramación de los hepatocitos y en la RD, utilizamos el modelo de ratón con dieta DDC, de la misma manera que en el primer objetivo. Como se muestra en la **Figura 57**, la expresión de Cxcr4 era casi indetectable en el hígado de ratones controles, sin embargo, se observó un claro aumento de la expresión de Cxcr4 a lo largo de la progresión del daño, de la misma manera que los genes Tgfb1 y Epcam.

RESULTADOS

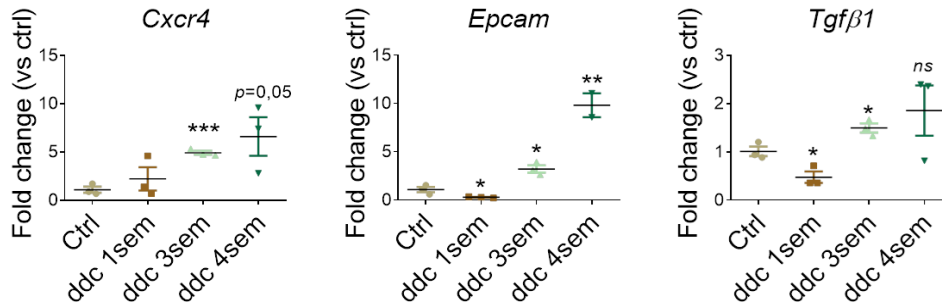


Figura 57. La expresión de CXCR4 correlaciona con la progresión del daño inducido por dieta DDC. Nivel de expresión génica evaluado por qPCR de *Cxcr4*, *Tgfβ1*, *Smad3* y *Epcam* en tejido hepático de ratones controles y ratones con daño por DDC, 1, 3 y 4 semanas (sem). Los valores de expresión se representan como Fc vs. control (ctrl). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Además, para investigar si los hepatocitos eran la principal fuente de expresión de *Cxcr4*, se analizaron hepatocitos primarios aislados de ratones controles y tratados con DDC. Los hepatocitos de los ratones tratados con DDC mostraron un aumento significativo de *Cxcr4* junto con *Tgfβ1*, *Smad3*, *Epcam*, *Snail-1*, *Vim* y la subunidad fetal del factor de transcripción de los hepatocitos *Hnf4α*, *Hnf4α-p2* (**Figura 58**) reproduciendo los resultados observados en los pacientes con AH.

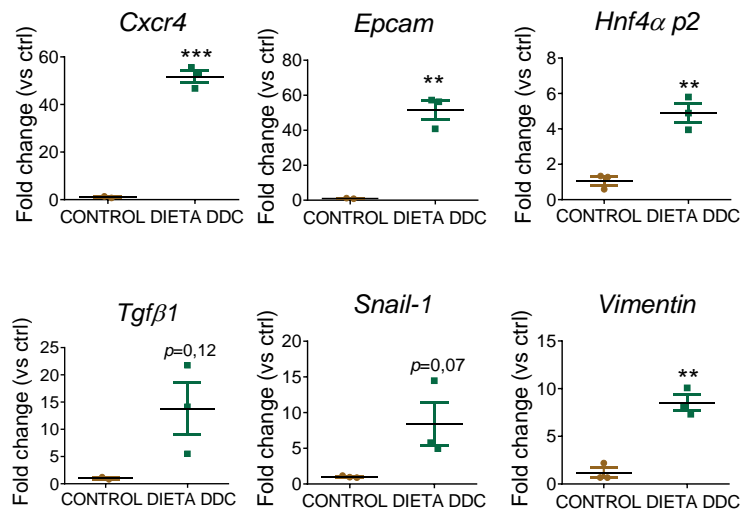


Figura 58. La expresión de *Cxcr4* aumenta en los hepatocitos en un modelo de daño inducido por DDC. Nivel de expresión génica evaluado por qPCR de *Cxcr4*, *Epcam*, *Hnf4α-p2*, *Tgfβ1*, *Snail-1* y *Vimentin* en hepatocitos primarios aislados de ratones controles (Phep Ctrl) y de ratones con daño por DDC durante 3 semanas (Phep ddc 3 sem). Los valores de expresión se representan como Fc vs. control (ctrl). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Se sabe que TGFβ1 induce la expresión de CXCR4 en las células tumorales (Bertran et al., 2013); por ello, hepatocitos primarios aislados de ratones controles se incubaron con TGFβ1 previo a la estimulación con CXCL12 recombinante (rCXCL12). Como se muestra en la **Figura 59**, TGFβ1 indujo un aumento en la expresión de Cxcr4, Cxcl12, Epcam y Krt7 en los hepatocitos, y la estimulación con rCXCL12 aumentó aún más la expresión de los marcadores biliares Epcam y Krt7. En conjunto, estos resultados apoyan que CXCR4 puede inducir la desdiferenciación de los hepatocitos.

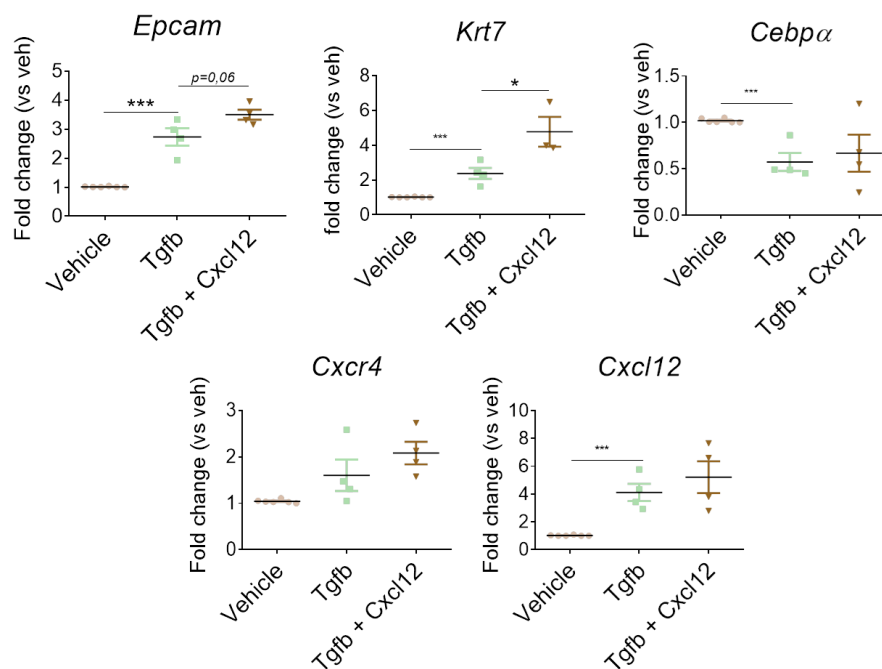


Figura 59. CXCL12-CXCR4 inducen la reprogramación de hepatocitos in vitro. (A) Nivel de expresión génica evaluado por qPCR de hepatocitos primarios de ratón incubados con Tgfb1 durante 6h, previo a la incubación con rCXCL12 hasta 24h. La expresión génica se muestra como Fc vs. Vehículo (veh). n=4, *p<0,05 vs. veh.

CXCR4 promueve la pérdida de identidad de los hepatocitos y el daño hepático crónico

Para evaluar el efecto de Cxcr4 en los hepatocitos *in vivo*, indujimos la sobreexpresión de Cxcr4 inyectando por vía intravenosa el plásmido AAV8-TBG-CXCR4 en ratones C57BL6/J. Dos semanas más tarde, se administró dieta DDC o dieta control durante una semana a los ratones. Como se muestra en la **Figura 60**, la sobreexpresión de Cxcr4 se confirmó a nivel de expresión génica (**Figura 60A**) y proteica (**Figura 60B**) tanto en los ratones controles como en los dañados.

RESULTADOS

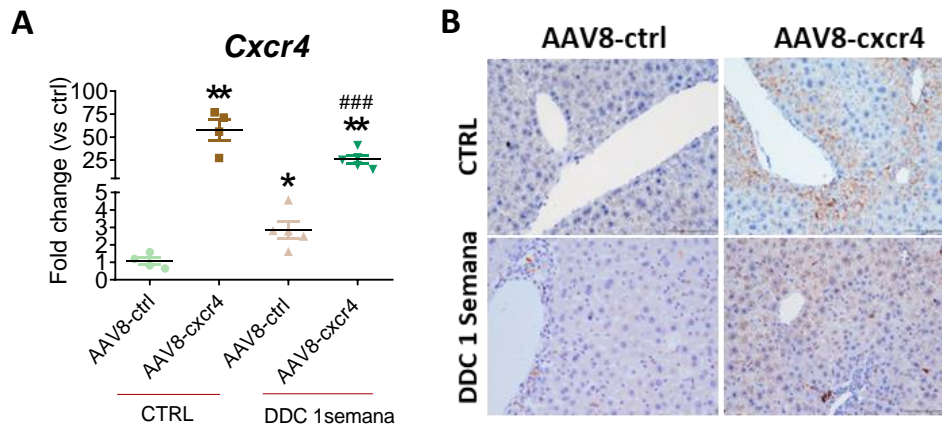
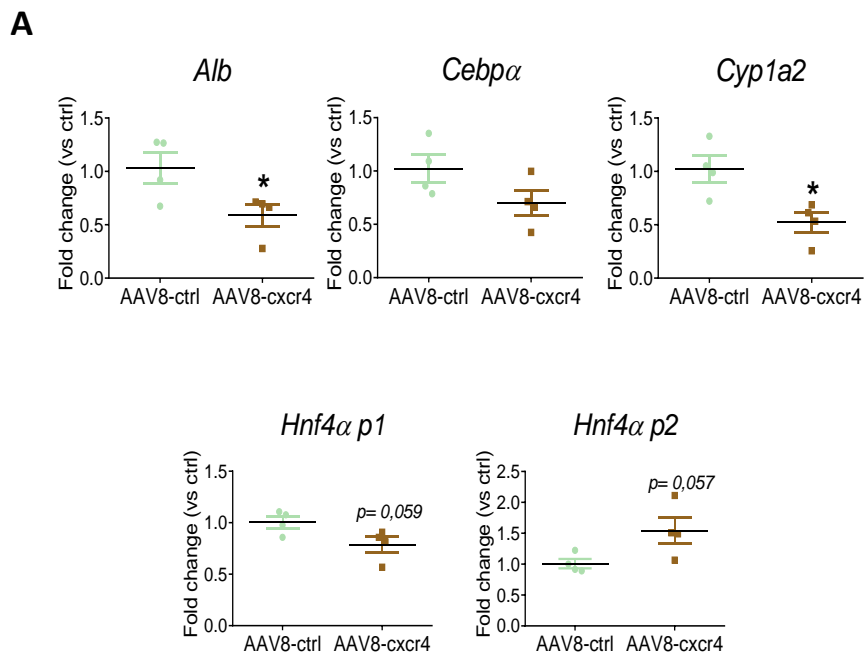


Figura 60. Aumento de la expresión de CXCR4 mediada por AAV8. (A) Confirmación por qPCR de la sobre-expresión de Cxcr4 inducida por AAV8 en ratones controles (ctrl) y con daño por DDC. La expresión génica se muestra como Fc vs. AAV8-Ctrl. * $p < 0,05$ vs. AAV8-Ctrl. # $p < 0,05$ vs. AAV8-ctrl DDC 1sem. (B) Imágenes representativas de la tinción de CXCR4 en los grupos experimentales control y DDC.

La sobreexpresión de Cxcr4 en los ratones controles indujo una disminución de la expresión de genes específicos de hepatocitos (**Figura 61A**) pero no indujo cambios a nivel de daño hepático (**Figura 61B**).



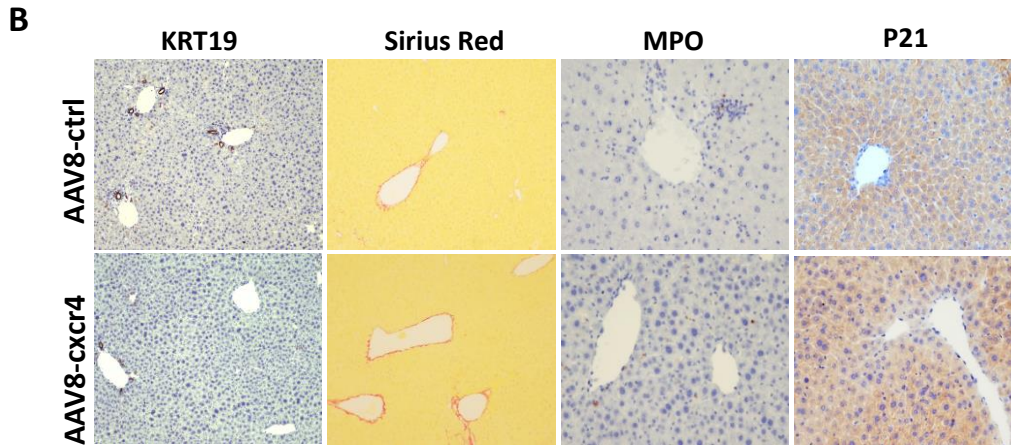


Figura 61. La sobreexpresión de CXCR4 en ratones no tratados no promueve daño hepático. (A) Análisis qRT-PCR de los marcadores específicos de hepatocitos en los ratones que sobreexpresan CXCR4 (n=4) en comparación con los ratones de control (n=4). La expresión génica se muestra como Fc vs. ctrl. Las diferencias significativas se indican cómo *p<0,05 **(B)** Imágenes representativas de la tinción de Krt19, Mpo, p21 y tinción de sirius/red.

Sin embargo, los ratones con la sobreexpresión de Cxcr4 y dieta DDC, mostraron un leve aumento no significativo de los niveles de transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina **(Figura 62)**.

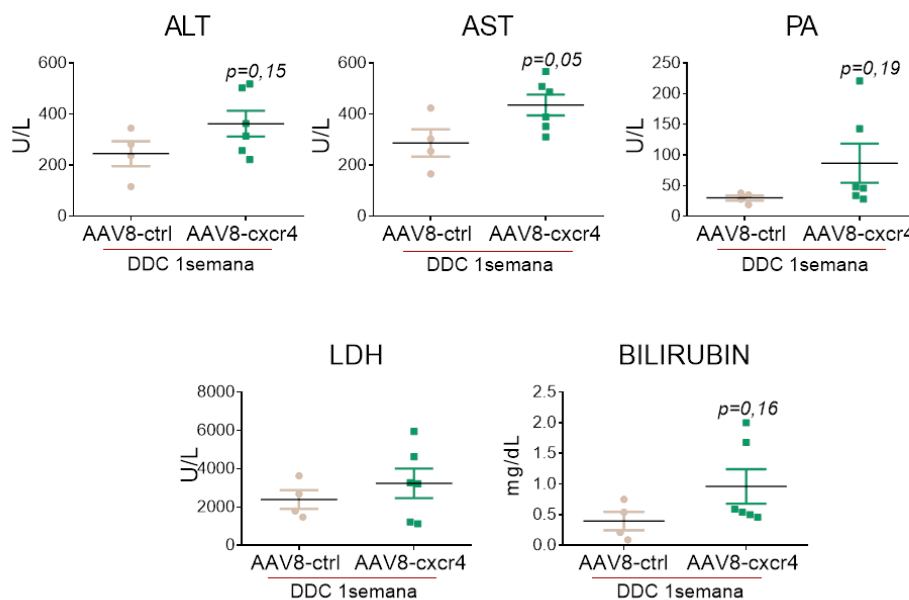


Figura 62. La sobreexpresión de CXCR4 en ratones tratados con DDC promueve un aumento del daño hepático. Niveles séricos de los parámetros bioquímicos en ratones que sobreexpresan CXCR4 y están tratados con DDC vs. ratones tratados con DDC con AAV8-ctrl. *p<0,05 vs. AAV8-ctrl. Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (PA, de sus siglas en inglés, alkaline phosphatase), Lactato deshidrogenasa (LDH)

RESULTADOS

Además, como se muestra en la **Figura 63**, también presentaron una menor expresión de genes de hepatocitos maduros como Alb, Cebp α y Cyp1a2 y una mayor expresión de la subunidad fetal de Hnf4 α (Hnf4 α p2), lo que sugiere que la sobreexpresión de Cxcr4 promueve directamente una pérdida del perfil de diferenciación de los hepatocitos.

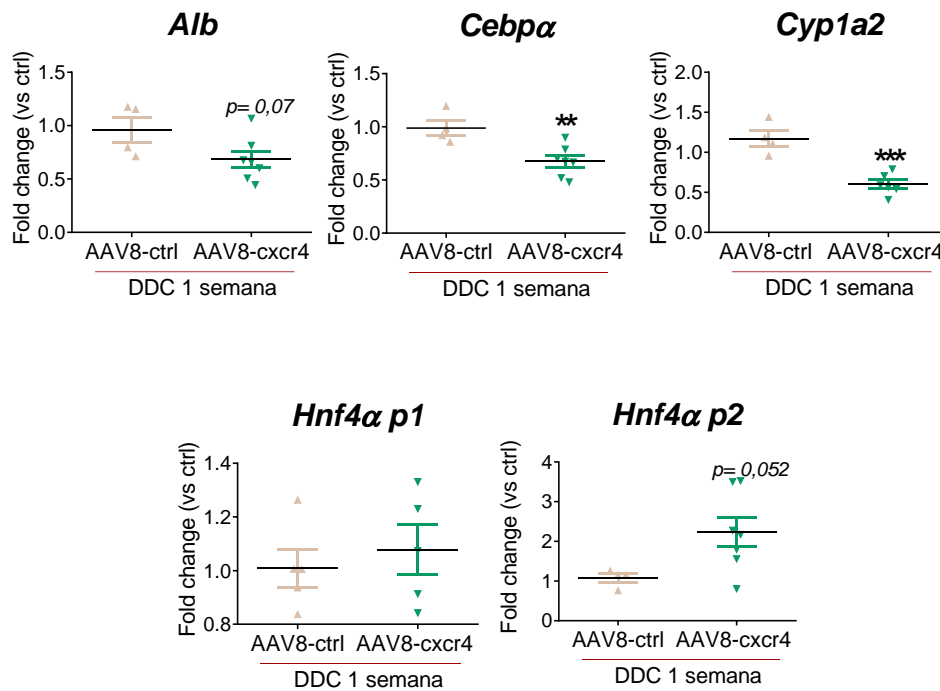


Figura 63. La sobre-expresión de Cxcr4 en los ratones tratados con DDC induce la pérdida de identidad de los hepatocitos. Expresión génica por qPCR de los marcadores específicos de hepatocito en los grupos experimentales con dieta DDC. Los datos se muestran como Fc vs. AAV8-Ctrl. *p<0,05 vs. Ctrl.

Por último, como se muestra en la **Figura 64**, la sobreexpresión de Cxcr4 en los animales tratados con DDC promovió la expansión de la RD, aumentó el grado de fibrosis y la infiltración periportal de neutrófilos. Además, los hepatocitos mostraron una mayor expresión del factor de transcripción de parada del ciclo celular P21. Estos resultados indican que, en el contexto de una lesión hepática crónica, la expresión de Cxcr4 en los hepatocitos promueve la pérdida del fenotipo maduro de los hepatocitos y la progresión de la enfermedad.

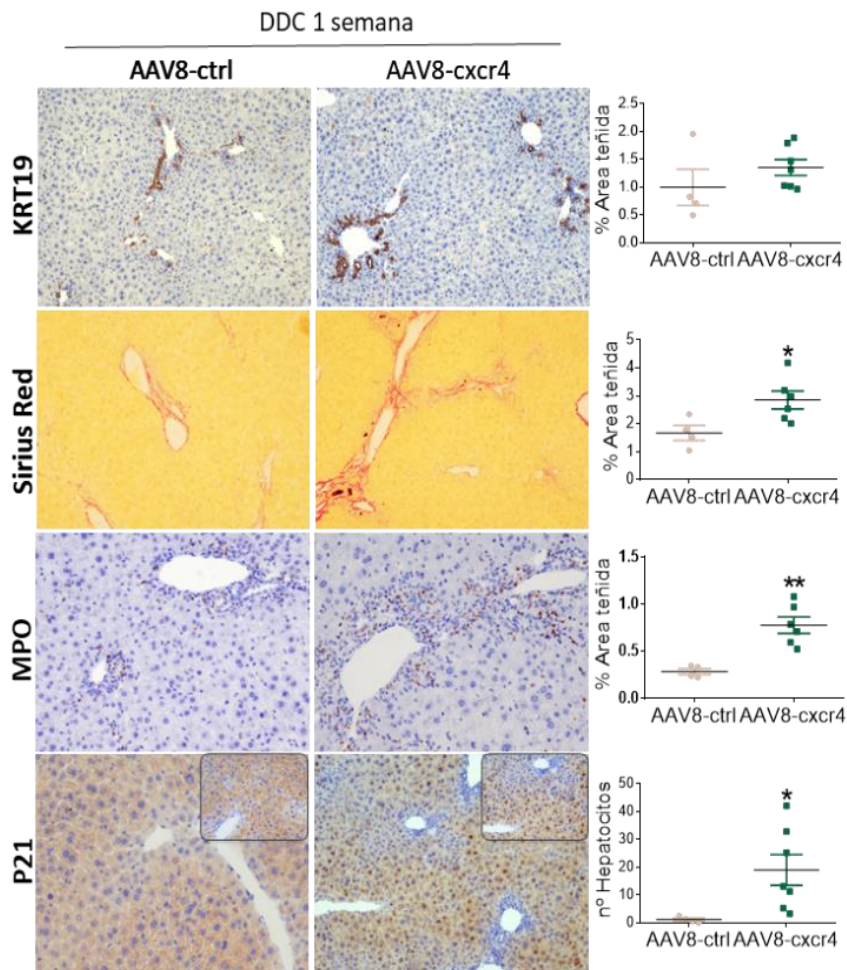


Figura 64. Caracterización histológica de los ratones con la sobre-expresión de Cxcr4 y daño por inducido por DDC. Imágenes representativas de las tinciones de KRT19, MPO, P21 y la tinción de fibrosis Sirius/red en los grupos tratados con DDC, AAV8-Ctrl (n=4) y AAV8-CXCR4 (n=7). Se muestra la cuantificación del área teñida en ambos grupos experimentales. Las diferencias significativas se indican como * $p < 0,05$

La inhibición de la vía CXCL12-CXCR4 reduce el daño hepático crónico

Para evaluar el impacto funcional de la vía de señalización CXCL12-CXCR4 en el daño hepático crónico y la reprogramación de los hepatocitos, tratamos a ratones con dieta DDC con el inhibidor específico de Cxcr4, AMD3100. Como se explicó en la metodología, se diseñaron dos intervenciones terapéuticas en el modelo de dieta DDC de 3 semanas: 1) la administración de AMD3100 durante la última semana de la dieta, o 2) la administración de AMD3100 durante las últimas 2 semanas de la dieta (**Figura 15**).

Los ratones tratados con AMD3100 mostraron una disminución de los niveles séricos de bilirrubina, pero ningún cambio en los niveles séricos de transaminasas (**Figura 65**).

RESULTADOS

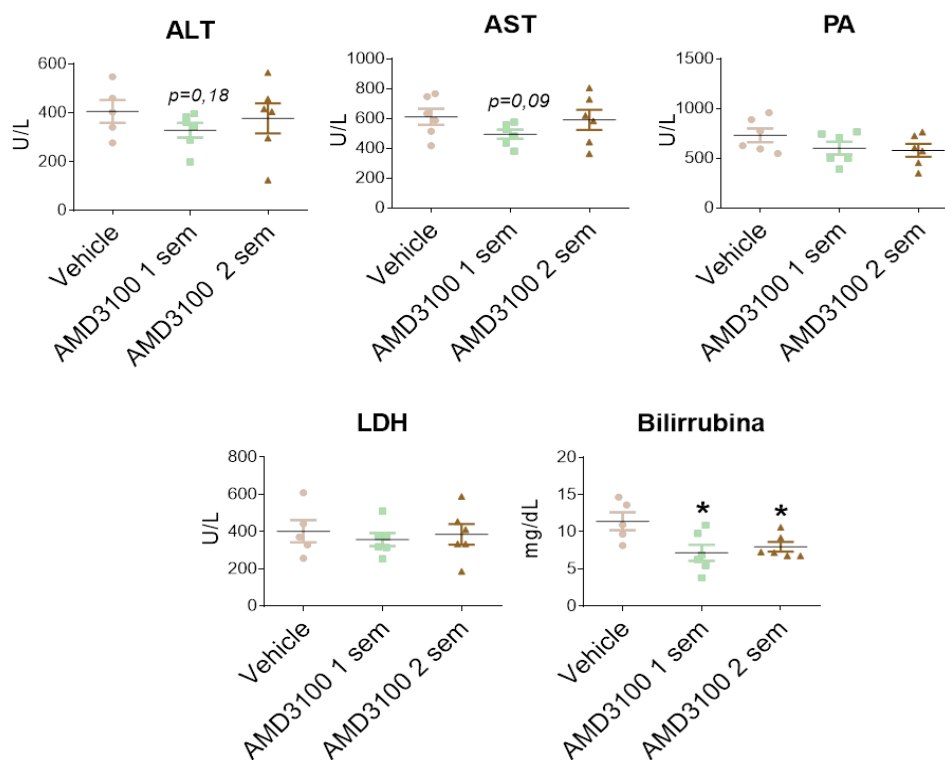


Figura 65. La inhibición de la vía de CXCL12-CXCR4 reduce el daño hepático crónico. Niveles séricos de los parámetros bioquímicos en las tres condiciones experimentales (vehículo, AMD3100 1 semana, AMD3100 2 semanas). Las diferencias significativas se indican cómo * $p < 0,05$

Además, como se muestra en la **Figura 66**, el tratamiento de los ratones con AMD3100 redujo significativamente la extensión de la RD y la fibrosis en ambos grupos, pero no tuvo ningún efecto sobre el reclutamiento de neutrófilos. Para evaluar el efecto de Cxcl12-Cxcr4 en la reprogramación de hepatocitos a BEC, evaluamos la expresión de Sox9 en los hepatocitos, ya que se ha descrito que Sox9 se expresa en los hepatocitos reprogramados en respuesta a un daño por DDC (Merrell et al., 2021) Como se muestra en la **Figura 66**, el número de hepatocitos SOX9 positivos se redujo significativamente en ambos grupos experimentales tratados con AMD3100 en comparación con el vehículo. Estos resultados demuestran que las estrategias dirigidas a bloquear la vía de CXCL12-CXCR4 en las enfermedades crónicas del hígado pueden prevenir la pérdida de identidad de los hepatocitos y mitigar la progresión del daño hepático.

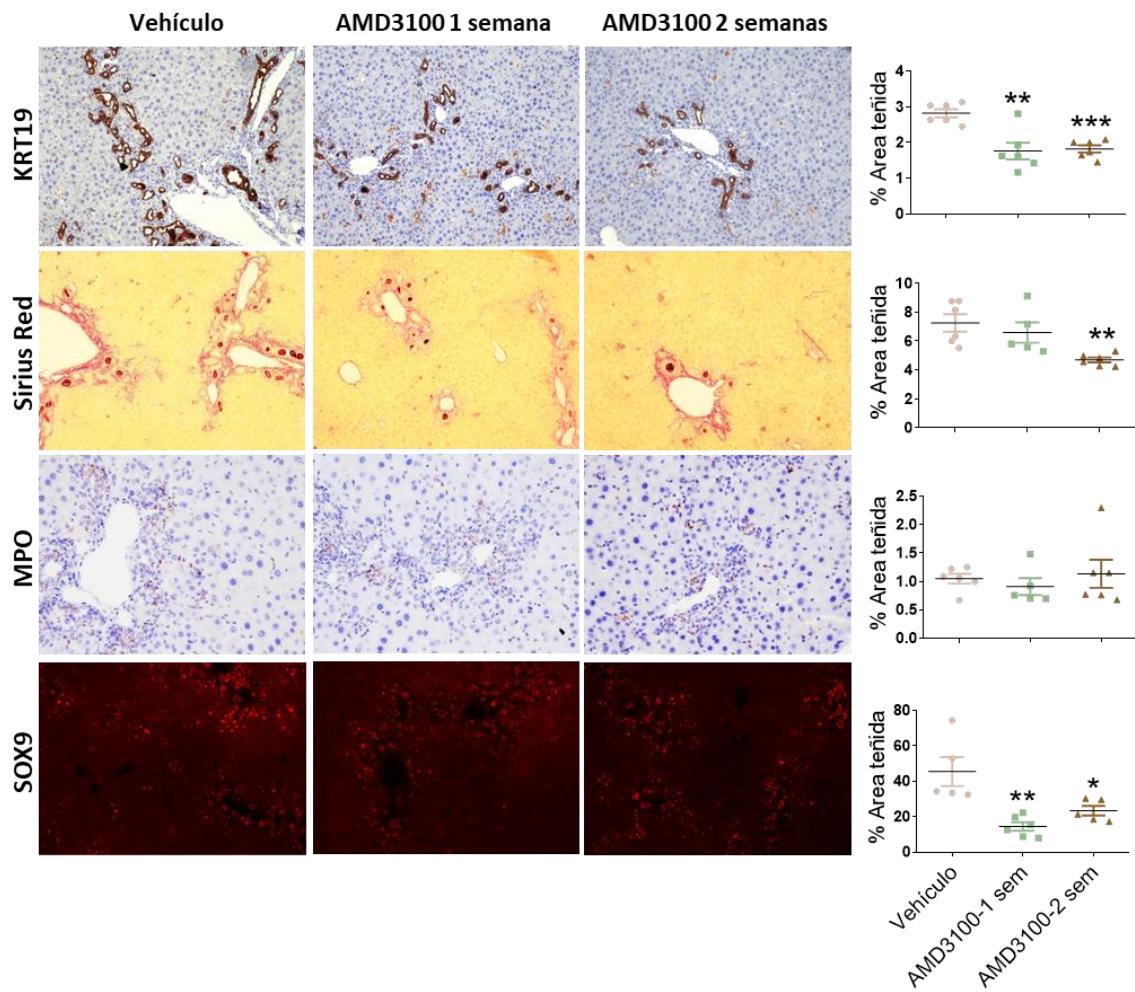
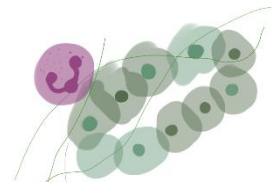


Figura 66. La inhibición de Cxcr4 en un modelo de daño crónico reduce el daño hepático y la reprogramación de los hepatocitos. Imágenes representativas de las tinciones de KRT19, SOX9, MPO y la tinción de fibrosis Sirius red en las tres condiciones experimentales (vehículo, AMD3100 1 semana, AMD3100 2 semanas). Se muestra la cuantificación del área teñida para cada grupo. Las diferencias significativas se indican cómo * $p < 0,05$ vs. Vehículo. Las imágenes son representativas de $n=6$ ratones por condición.

DISCUSIÓN



En esta tesis hemos evaluado la presencia y el impacto de la plasticidad celular en la enfermedad hepática crónica, concretamente, los fenómenos de RD y reprogramación de los hepatocitos. Curiosamente, hemos observado que, aunque ambos procesos aumentan conforme progresa la ALD, sólo las células HB aumentan de manera significativa en los pacientes con AH respecto a pacientes con cirrosis descompensada, además, muestran una correlación positiva con la severidad de la enfermedad y la pérdida de identidad hepatocitaria. Además, mediante la combinación de LCM y RNA-seq, hemos descrito el perfil transcriptómico de las células de la RD y de las células HB. Por un lado, hemos mostrado que las células de la RD presentan un perfil pro-inflamatorio y que se asocian con la inflamación sistémica y el reclutamiento de neutrófilos. Asimismo, hemos establecido un modelo de organoides *in vitro* que mimetiza el perfil de expresión génica de la RD. Por otro lado, hemos descrito que las células HB presentan un fenotipo intermedio entre las células biliares y los hepatocitos y que expresan vías de inflamación similares a las células de la RD. Por último, hemos identificado la vía de Cxcr4 como un mecanismo potencial en la reprogramación de los hepatocitos y en la progresión del daño. En resumen, los resultados de esta tesis aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos involucrados en la plasticidad celular en un contexto de daño hepático crónico. Además, estos estudios sugieren que, estrategias dirigidas a reducir el fenotipo inflamatorio de la RD, así como a revertir la desdiferenciación de los hepatocitos y potenciar la diferenciación, pueden ser interesantes para mejorar la función hepática en los casos de enfermedad hepática avanzada.

Varios estudios han demostrado la importante expansión de las células de la RD en la AH, así como la asociación de marcadores de CPH con la severidad de la enfermedad y la mortalidad a corto plazo (Dubuquoy et al., 2015b; Lanthier et al., 2015; Sancho-Bru et al., 2012a). Uno de estos estudios (Sancho-Bru et al., 2012a), realizado en nuestro grupo, demostró la asociación de las CPHs con la progresión de la enfermedad en base a una cuantificación histológica conjunta de células de la RD así como de células HB que eran positivas para las tinciones de EPCAM o KRT7. Sin embargo, esta tesis va más allá de esos hallazgos y proporciona una cuantificación independiente de las células HB y de las células de la DR en pacientes con ALD. A diferencia de la RD, demostramos que la

DISCUSIÓN

presencia de células HB es un sello distintivo de la AH, ya que el número de células HB aumenta significativamente en los pacientes con AH en comparación con los pacientes con cirrosis descompensada, y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Además, nuestros datos sugieren que la desdiferenciación de los hepatocitos puede ser un proceso patogénico específico que tiene lugar en la ALD, concomitante con la expansión de la RD. Estos resultados no contradicen los estudios anteriores que demuestran la correlación de la RD con la gravedad de la enfermedad (Dubuquoy et al., 2015b; Guldiken et al., 2016b; Sancho-Bru et al., 2012a), ya que también observamos que ambos procesos (RD y células HB) están aumentados en estadios avanzados de la ALD y correlacionan positivamente.

Hasta ahora, los estudios de plasticidad en humanos se han basado casi exclusivamente en la evaluación histológica y la secuenciación de tejido total (Argemi et al., 2019; Bou Saleh et al., 2021; Hyun et al., 2019, 2020; Sancho-Bru et al., 2012a; Spee et al., 2010b). Una de las principales limitaciones que presenta la caracterización de la RD y de la reprogramación de los hepatocitos ha sido la limitada disponibilidad de tejido hepático de pacientes con AH. Para resolver esta limitación, realizamos la microdissección en el conjunto único de muestras de la Universidad de Lille de pacientes con AH sometidos a trasplante de hígado temprano (Dubuquoy et al., 2015a; Mathurin et al., 2011) en el contexto de los ensayos clínicos QuickTrans (NCT01756794) y TargetOH (CPP 14/67). Esta estrategia nos permitió evaluar el perfil transcriptómico de las células de la RD (primer objetivo) y de las células HB (segundo objetivo), así como las vías moleculares implicadas en la expansión y diferenciación de la RD, y en la reprogramación de los hepatocitos. Nuestros resultados están en acuerdo con estudios anteriores que describieron las vías de Notch y Wnt en la RD (Spee et al., 2010c), no obstante, nuestro estudio va más allá e identifica la expresión de nuevas vías como "señalización de la Efrina A", "señalización de la ErbB", "señalización de NF-kappaB", "reclutamiento de leucocitos" o "vía de respuesta a la hipoxia". Por otro lado, observamos que las células HB se caracterizaban por la adquisición de un fenotipo inmaduro y biliar bien caracterizado, aunque mantenían, hasta cierto punto, el perfil hepatocitario. Estos resultados pueden explicar observaciones anteriores *in vivo* en las que hepatocitos reprogramados fueron capaces de autorrenovarse y alcanzar un fenotipo de hepatocito

diferenciado (Tanimizu et al., 2014; Tarlow et al., 2014c; Yanger et al., 2013a). Curiosamente, encontramos que las células HB mostraban un perfil inflamatorio similar al de las células de la RD, caracterizado por la expresión de vías como "señalización de NF-kappaB" o "migración transendotelial de leucocitos". Estos resultados sugieren que la desdiferenciación de los hepatocitos también podría estar implicada en el reclutamiento de células inflamatorias y en la progresión de la enfermedad.

Se ha demostrado que la expresión hepática de quimiocinas CXC predice la hipertensión portal y la supervivencia en pacientes con AH (Dominguez et al., 2009). Este estudio indica que la RD y las células HB son una fuente importante de quimiocinas CXC y CCL, lo que concuerda con estudios previos que muestran que las células epiteliales biliares expresan y secretan quimiocinas como IL-6, IL-8 y CCL28 (Eksteen et al., 2006; Isse et al., 2007; Yokoyama et al., 2006). El hecho de que la RD y las células HB tengan un perfil pro-inflamatorio abre importantes interrogantes sobre su contribución real a la reparación tisular y a la respuesta inflamatoria intrahepática en las enfermedades hepáticas, y en particular, en la AH. Estudios anteriores han demostrado la asociación de células inflamatorias con la RD en las enfermedades hepáticas crónicas (Carpino et al., 2013; Gadd et al., 2014a). En este estudio mostramos que, aunque la RD expresa una serie de citoquinas implicadas en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, sólo los neutrófilos se localizaron en la región periductular. Nuestros resultados muestran que la RD puede jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria intrahepática en la AH, produciendo citoquinas que podrían participar en el reclutamiento de células inflamatorias en el hígado. Los resultados obtenidos en el contexto de la AH coinciden con otros informes que describen la expresión de mediadores pro-fibrogénicos y pro-inflamatorios por parte de las células de la RD en otras enfermedades hepáticas (Alvaro et al., 2007; Carpino et al., 2013; Eksteen et al., 2006; Isse et al., 2007). Además, el hecho de que CXCL5, uno de los principales mediadores inflamatorios expresados por las células de la RD, pueda detectarse en el suero y se correlacione con la expansión de la RD, sugiere que los mediadores inflamatorios expresados en la RD pueden tener un efecto paracrino y potencialmente sistémico.

Las enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por una respuesta inflamatoria hepática sostenida, que conduce al desarrollo de fibrosis y a una regeneración hepática

DISCUSIÓN

deficiente. En este contexto, se ha demostrado que los neutrófilos reclutados están asociados a un aumento de la lesión hepática, la colestasis y la hipertensión portal (Hilscher et al., 2019; Takeuchi et al., 2021). Sin embargo, la contribución de los neutrófilos a la enfermedad hepática crónica sigue siendo poco conocida. Mientras que los estudios experimentales han demostrado que la secreción de moléculas hidrolíticas y oxidativas en el lugar de la lesión afecta a las células vecinas exacerbando la lesión hepática, en los pacientes con AH la extensión de los neutrófilos infiltrados en el hígado se correlaciona con buen pronóstico y supervivencia (Altamirano et al. 2014; Marwick et al. 2018; W. Yang et al. 2019). Además, se ha informado de que la función de los neutrófilos está alterada en la insuficiencia hepática aguda-crónica, lo que sugiere que tanto el reclutamiento como la función de los neutrófilos pueden estar alterados en el contexto de la AH (Boussif et al., 2016; Rolas et al., 2017; Tritto et al., 2011). También es importante señalar que los mecanismos que impulsan el reclutamiento de neutrófilos pueden ser diversos y los que median el reclutamiento en las zonas de parénquima (principalmente la necrosis de los hepatocitos) pueden ser diferentes de los que promueven el reclutamiento en la zona periportal, que puede estar mediado por la producción de quimiocinas, entre otros factores.

En las lesiones hepáticas agudas, los neutrófilos orquestan la reparación de los tejidos promoviendo la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio (Yang et al., 2019). Además, en el daño hepático crónico, los estudios realizados sugieren que los neutrófilos pueden atenuar la fibrosis hepática (Saijou et al., 2018). Nuestro estudio amplía la comprensión del papel de los neutrófilos en la lesión hepática crónica y proporciona evidencias de que los neutrófilos están involucrados en la expansión de la RD y están asociados con el aumento de los mecanismos de reparación patológica, como la fibrosis y la angiogénesis. En el presente estudio, al interferir sobre las señales quimioatrayentes de los neutrófilos mediante un inhibidor de CXCR1/2, confirmamos la capacidad dependiente de las citocinas de las células de la RD (EPCAM⁺) para reclutar neutrófilos. Utilizando datos humanos y animales, demostramos que los neutrófilos y las células EPCAM⁺ de la RD están en contacto directo, lo que indica la interacción entre ambas poblaciones celulares. Además del papel en la regeneración biliar, estos resultados amplían el concepto de que los neutrófilos pueden interactuar

funcionalmente con las células epiteliales promoviendo su proliferación y regeneración, y por tanto también podrían estar desempeñando un papel en otros tejidos epiteliales.

Se han descrito numerosos marcadores para caracterizar las CPH, sin embargo, la mayoría de estos marcadores no son únicos y exclusivos de esta población, lo que dificulta su aislamiento y estudio. Por esta razón, en este estudio hemos generado un modelo de organoides derivados de pacientes con cirrosis que recapitula las características de las células de la RD. Los organoides generados a partir de células madre/progenitoras residentes en el tejido han mostrado un gran potencial como modelos de enfermedades y como fuente de células para la medicina regenerativa (Huch et al., 2013c, 2015a). Utilizando esta tecnología, observamos que el perfil de expresión génica de los organoides hepáticos procedentes de hígados cirróticos se asemeja mucho al de la RD de los pacientes, mostrando un perfil de expresión génica y un perfil inflamatorio muy similar al de la RD. Además, los organoides son capaces de responder a los mediadores inflamatorios aumentando la expresión de quimioquinas y de promover la migración de los neutrófilos y un aumento del perfil inflamatorio de los mismos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los organoides hepáticos pueden ser un buen modelo *in vitro* para estudiar la RD en las enfermedades hepáticas crónicas.

Los estudios de “lineage tracing” en modelos animales han puesto de manifiesto la excepcional plasticidad de las células hepáticas, incluyendo procesos de transdiferenciación tanto de BEC a hepatocito, como de hepatocito a BEC (Raven et al., 2017b; Russell et al., 2019; Sekiya and Suzuki, 2014; Tarlow et al., 2014b). Sin embargo, en las enfermedades hepáticas, es difícil confirmar estos procesos fisiopatológicos y evaluar en qué medida tiene lugar. Aunque la interacción entre la reprogramación de los hepatocitos y la expansión de las células de la RD en las enfermedades hepáticas aún requiere investigación, en esta tesis, sugerimos que ambos eventos pueden tener lugar simultáneamente y pueden ser impulsados por vías reguladoras específicas como CXCR4.

En el presente estudio encontramos un aumento de la expresión de Cxcr4 en los hepatocitos reprogramados y en las células de la RD en pacientes con AH severa. Además, mediante el uso del transcriptoma de tejido hepático total derivado de una cohorte de pacientes con AH, revelamos la asociación de la expresión génica de Cxcr4

DISCUSIÓN

con la pérdida de identidad de los hepatocitos, inflamación y una mayor gravedad de la enfermedad. La correlación de la expresión de *Cxcr4* con un fenotipo más inmaduro, caracterizado por la expresión de marcadores de célula biliar-progenitora, así como marcadores de transición EMT, está de acuerdo con el uso de *Cxcr4* como biomarcador para evaluar la eficiencia de la generación del endodermo en la diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas a hepatocitos (Holtzinger et al., 2015).

Además, se sabe que la vía de *Cxcr4* desempeña un papel crucial en la progresión de gran variedad de tumores (Zlotnik, 2008). En particular, en el HCC, la expresión de *Cxcr4* está aumentada en aquellos pacientes que presentan un fenotipo tumoral menos diferenciado y una cirrosis subyacente (Bertran et al., 2013). En este estudio, aportamos pruebas de que la vía de *Cxcr4* promueve la reprogramación de los hepatocitos en la ALD avanzada. Este hallazgo concuerda con el doble papel de vías como la del TGF β o la de Hippo, que están implicadas tanto en la reprogramación de hepatocitos a BEC como en la tumorigénesis (Argemi et al., 2019; Bou Saleh et al., 2021), (Liu et al., 2021; Perra et al., 2014). Estos resultados sugieren que los mecanismos que promueven la reprogramación celular en las células tumorales y los hepatocitos en las enfermedades avanzadas, podrían ser similares.

Cxcr4 está implicado en la EMT parcial en el contexto del tumor hepático (Malfettone et al., 2017). Hasta la fecha, los estudios de “lineage tracing” demuestran que los hepatocitos no sufren una EMT completa durante el daño crónico (Taura et al., 2010). Sin embargo, en lugar de una EMT completa, una EMT parcial, caracterizada por la expresión simultánea de marcadores epiteliales y mesenquimales, sería más probable en condiciones de daño (Aiello et al., 2018). En este trabajo mostramos que las células HB expresan tanto marcadores epiteliales como mesenquimales. Además, encontramos una correlación positiva de la expresión de *CXCR4* con ambos, marcadores epiteliales biliares como *EPCAM*, y marcadores mesenquimales como *TGF β 1*, *ZEB* o *SNAI*. Además, los hepatocitos primarios aislados de ratones tratados con DDC expresan simultáneamente *Epcam*, y los marcadores mesenquimales *Tgf β 1*, *Smad3*, *Snai1* y *Vim*, además de *Cxcr4*. En conjunto, estos resultados indican que las células HB muestran un patrón típico de las células que sufren una EMT parcial y que *Cxcr4* podría estar implicado en este proceso.

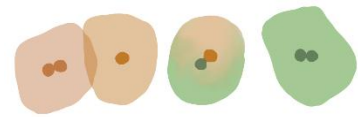
Estudios en pacientes han mostrado la participación de la vía de CXCL12-CXCR4 en la progresión de la enfermedad hepática crónica y la fibrosis y han sugerido que su modulación podría ser beneficiosa en la progresión de la fibrosis (Liepelt and Tacke, 2016). En este contexto, la inhibición del eje CXCL12/CXCR4 en modelos experimentales ha dado lugar a resultados contradictorios (Ding et al., 2014; Saiman et al., 2015), sugiriendo que el simple bloqueo del eje CXCL12-CXCR4 no es suficiente para mejorar la fibrosis hepática *in vivo*. En un contexto tumoral, la inhibición de CXCR4 se ha visto que atenúa la malignidad del tumor al disminuir la capacidad invasiva, la proliferación y la migración de las células tumorales (Wang et al., 2017a). En este estudio, el uso terapéutico del inhibidor específico de CXCR4, AMD3100, en ratones tratados con DDC redujo la dediferenciación de los hepatocitos, la extensión de la RD y la fibrosis. No se observó ningún efecto sobre el reclutamiento de neutrófilos, a pesar de que hemos observado que esta población inflamatoria expresa *Cxcr4* (datos no publicados). Además, aunque la inhibición farmacológica puede tener otros efectos además de los directamente atribuibles a la reducción de la reprogramación de los hepatocitos, nuestros resultados están de acuerdo con un estudio reciente en el que indican que el uso terapéutico del mRNA de HNF4 α para restaurar la función de los hepatocitos revierte la fibrosis hepática (Yang et al., 2021). Por lo tanto, estos resultados proporcionan pruebas de la aplicabilidad de AMD3100 como estrategia terapéutica para mejorar la diferenciación de los hepatocitos y la reparación del hígado.

Los estudios incluidos en esta tesis revelan la importancia de preservar un control estricto sobre los fenómenos de plasticidad celular con el fin de mantener la función hepática y la reparación tisular. Es necesario por lo tanto comprender en qué medida la plasticidad epitelial contribuye a la regeneración hepática o bien a la patogénesis del hígado, es decir, hasta qué punto la RD o la dediferenciación de los hepatocitos podrían inducir un proceso de malignidad. Para ello, es de gran importancia evaluar las posibles consecuencias de la activación de estos mecanismos, así como la epigenética que subyace estos procesos. Además, entender la interacción entre el epitelio hepático y el microambiente sería de gran ayuda para desarrollar terapias que promuevan la regeneración mediante la modificación del nicho hepático.

DISCUSIÓN

Por último, los resultados de esta tesis sugieren que las estrategias dirigidas a modular el perfil inflamatorio de la RD y de las células HB, así como promover la maduración de los hepatocitos, podrían tener un gran potencial terapéutico en el tratamiento de la ALD avanzada.

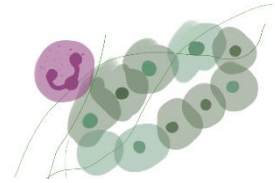
CONCLUSIONES



Las principales conclusiones de esta tesis doctoral son:

1. La reacción ductular presenta un perfil pro-inflamatorio que promueve el reclutamiento de células inmunes y se asocia con la inflamación sistémica.
2. El modelo *in vitro* de organoides derivados de pacientes con cirrosis recapitula el perfil de expresión génica de la reacción ductular, caracterizado por la expresión de marcadores de células progenitoras hepáticas y de citoquinas pro-inflamatorias.
3. En la enfermedad hepática por alcohol, pero también en otras etiologías como hígado graso no alcohólico o virus C, los neutrófilos se localizan en estrecho contacto con la reacción ductular.
4. Los organoides cirróticos inducen la migración de los neutrófilos *in vitro* y promueven el perfil inflamatorio de los mismos. Asimismo, los neutrófilos promueven el perfil inflamatorio de la reacción ductular.
5. El modelo *in vivo* de daño inducido por DDC mimetiza las características de los pacientes con hepatitis alcohólica y el reclutamiento de neutrófilos alrededor de la reacción ductular.
6. La inhibición del reclutamiento de los neutrófilos en un modelo DDC reduce la expansión de la reacción ductular y el grado de fibrosis.
7. Las células de la reacción ductular y las células hepatobiliares se asocian con la progresión de la enfermedad hepática por alcohol, sin embargo, solo las células hepatobiliares correlacionan con una peor función hepática.
8. Las células hepatobiliares adquieren un perfil biliar-progenitor, así como un perfil inflamatorio similar al de la reacción ductular.
9. Cxcr4 se asocia con la progresión de la enfermedad e induce la reprogramación de los hepatocitos en un modelo *in vivo* de daño hepático crónico.
10. La inhibición farmacológica *in vivo* de Cxcr4 revierte la reprogramación de los hepatocitos, además de atenuar la reacción ductular y reducir el grado de fibrosis, lo que indica el potencial de Cxcr4 como diana terapéutica en la enfermedad hepática crónica

BIBLIOGRAFÍA



1. Aguilar-Bravo, B., and Sancho-Bru, P. (2019). Laser capture microdissection: techniques and applications in liver diseases. *Hepatol. Int.* *13*, 138–147.
2. Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahnoud, A., Furth, E.E., et al. (2018). EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev. Cell* *45*, 681-695.e4.
3. Akhurst, B., Matthews, V., Husk, K., Smyth, M.J., Abraham, L.J., and Yeoh, G.C. (2005a). Differential lymphotoxin- γ and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* *41*, 327–335.
4. Akhurst, B., Matthews, V., Husk, K., Smyth, M.J., Abraham, L.J., and Yeoh, G.C. (2005b). Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* *41*, 327–335.
5. Aloia, L., McKie, M.A., Vernaz, G., Cordero-Espinoza, L., Aleksieva, N., van den Ameele, J., Antonica, F., Font-Cunill, B., Raven, A., Aiese Cigliano, R., et al. (2019). Epigenetic remodelling licences adult cholangiocytes for organoid formation and liver regeneration. *Nat. Cell Biol.* *21*, 1321–1333.
6. Altamirano, J., and Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 491–501.
7. Alvaro, D., Mancino, M.G., Glaser, S., Gaudio, E., Marzioni, M., Francis, H., and Alpini, G. (2007). Proliferating Cholangiocytes: A Neuroendocrine Compartment in the Diseased Liver. *Gastroenterology* *132*, 415–431.
8. Argemi, J., Latasa, M.U., Atkinson, S.R., Blokhin, I.O., Massey, V., Gue, J.P., Cabezas, J., Lozano, J.J., Van Booven, D., Bell, A., et al. (2019). Defective HNF4 α -dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat. Commun.*
9. Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in *Fah*^{-/-}/*Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-} mice. *Nat. Biotechnol.* *25*, 903.
10. Baker, B.M., and Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* *125*, 3015.
11. Barker, N., Van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007a). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003–1007.
12. Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007b). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003–1007.
13. Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T.,

BIBLIOGRAFÍA

- Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., et al. (2010). Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell* 6, 25–36.
14. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., et al. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* 13, 587–596.
 15. Bertran, E., Crosas-Molist, E., Sancho, P., Caja, L., Lopez-Luque, J., Navarro, E., Egea, G., Lastra, R., Serrano, T., Ramos, E., et al. (2013). Overactivation of the TGF- β pathway confers a mesenchymal-like phenotype and CXCR4-dependent migratory properties to liver tumor cells. *Hepatology* 58, 2032–2044.
 16. Bird, T.G., Lorenzini, S., and Forbes, S.J. (2008). Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res.* 331, 283–300.
 17. Bou Saleh, M., Louvet, A., Ntandja-Wandji, L.C., Boleslawski, E., Gnemmi, V., Lassailly, G., Truant, S., Maggioro, F., Ningarhari, M., Artru, F., et al. (2021). Loss of hepatocyte identity following aberrant YAP activation: A key mechanism in alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* 75, 912–923.
 18. Boulter, L., Govaere, O., Bird, T.G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R.A., Seo, S.S., Spee, B., Van Rooijen, N., et al. (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat. Med.* 18, 572–579.
 19. Boulter, L., Lu, W.Y., and Forbes, S.J. (2013). Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J. Clin. Invest.* 123, 1867–1873.
 20. Boussif, A., Rolas, L., Weiss, E., Bouriche, H., Moreau, R., and Périanin, A. (2016). Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. *J. Hepatol.* 64, 1041–1048.
 21. Broutier, L., Andersson-Rolf, A., Hindley, C.J., Boj, S.F., Clevers, H., Koo, B.-K., and Huch, M. (2016). Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat. Protoc.* 11, 1724–1743.
 22. Broutier, L., Mastrogianni, G., Verstegen, M.M.A., Francies, H.E., Gavarró, L.M., Bradshaw, C.R., Allen, G.E., Arnes-Benito, R., Sidorova, O., Gaspersz, M.P., et al. (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat. Med.* 23, 1424–1435.
 23. Cao, W., Liu, J., Wang, L., Li, M., Verstegen, M.M.A., Yin, Y., Ma, B., Chen, K., Bolkestein, M., Sprengers, D., et al. (2019). Modeling liver cancer and therapy responsiveness using

- organoids derived from primary mouse liver tumors. *Carcinogenesis* *40*, 145–154.
24. Carpino, G., Renzi, A., Onori, P., and Gaudio, E. (2013). Role of Hepatic Progenitor Cells in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development: Cellular Cross-Talks and Molecular Networks. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 20112–20130.
 25. Carpino, G., Cardinale, V., Folseraas, T., Overi, D., Floreani, A., Franchitto, A., Onori, P., Cazzagon, N., Berloco, P.B., Karlsen, T.H., et al. (2018). Hepatic Stem/Progenitor Cell Activation Differs between Primary Sclerosing and Primary Biliary Cholangitis. *Am. J. Pathol.* *188*, 627–639.
 26. Chen, F., Jimenez, R.J., Sharma, K., Luu, H.Y., Hsu, B.Y., Ravindranathan, A., Stohr, B.A., and Willenbring, H. (2020). Broad Distribution of Hepatocyte Proliferation in Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell* *26*, 27-33.e4.
 27. Chen, L., Zhang, W., Zhou, Q.D., Yang, H.Q., Liang, H.F., Zhang, B.X., Long, X., and Chen, X.P. (2012). HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. *Cell Biochem. Funct.* *30*, 588–596.
 28. Chen, Y., Liu, Y.C., Sung, Y.C., Ramjiawan, R.R., Lin, T.T., Chang, C.C., Jeng, K.S., Chang, C.F., Liu, C.H., Gao, D.Y., et al. (2017). Overcoming sorafenib evasion in hepatocellular carcinoma using CXCR4-targeted nanoparticles to co-deliver MEK-inhibitors. *Sci. Rep.* *7*.
 29. Clayton, E., and Forbes, S.J. (2009). The isolation and in vitro expansion of hepatic Sca-1 progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *381*, 549–553.
 30. Clouston, A.D., Powell, E.E., Walsh, M.J., Richardson, M.M., Demetris, A.J., and Jonsson, J.R. (2005). Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: Roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* *41*, 809–818.
 31. Coll, M., Ariño, S., Martínez-Sánchez, C., Garcia-Pras, E., Gallego, J., Moles, A., Aguilar-Bravo, B., Blaya, D., Vallverdú, J., Rubio-Tomás, T., et al. (2022). Ductular reaction promotes intrahepatic angiogenesis through Slit2–Roundabout 1 signaling. *Hepatology* *75*, 353–368.
 32. Coombes, J.D., Swiderska-Syn, M., Dollé, L., Reid, D., Eksteen, B., Claridge, L., Briones-Orta, M.A., Shetty, S., Oo, Y.H., Riva, A., et al. (2015). Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice. *Gut* *64*, 1120–1131.
 33. Davies, R.A., Knight, B., Tian, Y.W., Yeoh, G.C.T., and Olynyk, J.K. (2006). Hepatic oval cell response to the choline-deficient, ethionine supplemented model of murine liver injury is attenuated by the administration of a cyclo-oxygenase 2 inhibitor. *Carcinogenesis* *27*, 1607–1616.
 34. Deng, X., Zhang, X., Li, W., Feng, R.-X., Li, L., Yi, G.-R., Zhang, X.-N., Yin, C., Yu, H.-Y., Zhang, J.-P., et al. (2018). Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into

BIBLIOGRAFÍA

- Hepatocytes. *Cell Stem Cell* 23, 114-122.e3.
35. Ding, B., Sen, Cao, Z., Lis, R., Nolan, D.J., Guo, P., Simons, M., Penfold, M.E., Shido, K., Rabbany, S.Y., and Rafii, S. (2014). Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature* 505, 97–102.
 36. Dollé, L., Best, J., Empsen, C., Mei, J., Van Rossen, E., Roelandt, P., Snykers, S., Najimi, M., Al Battah, F., Theise, N.D., et al. (2012). Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity in naïve mice. *Hepatology* 55, 540–552.
 37. Dominguez, M., Miquel, R., Colmenero, J., Moreno, M., García-Pagán, J., Bosch, J., Arroyo, V., Ginès, P., Caballería, J., and Bataller, R. (2009). Hepatic Expression of CXC Chemokines Predicts Portal Hypertension and Survival in Patients With Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* 136, 1639–1650.
 38. Dorrell, C., Erker, L., Schug, J., Kopp, J.L., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Duncan, A.W., Finegold, M.J., Sander, M., et al. (2011). Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev.* 25, 1193–1203.
 39. Driehuis, E., and Clevers, H. (2017). CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G257–G265.
 40. Dubuquoy, L., Louvet, A., Lassailly, G., Truant, S., Boleslawski, E., Artru, F., Maggiotto, F., Gantier, E., Buob, D., Leteurtre, E., et al. (2015a). Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* 64, 1949–1960.
 41. Dubuquoy, L., Louvet, A., Lassailly, G., Truant, S., Boleslawski, E., Artru, F., Maggiotto, F., Gantier, E., Buob, D., Leteurtre, E., et al. (2015b). Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut*.
 42. Eckert, C., Klein, N., Kornek, M., and Lukacs-Kornek, V. (2015). The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. *Front. Immunol.* 6, 179.
 43. Eckert, C., Kim, Y.O., Julich, H., Heier, E.C., Klein, N., Krause, E., Tschernig, T., Kornek, M., Lammert, F., Schuppan, D., et al. (2016). Podoplanin discriminates distinct stromal cell populations and a novel progenitor subset in the liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G1–G12.
 44. Eksteen, B., Miles, A., Curbishley, S.M., Tselepis, C., Grant, A.J., Walker, L.S.K., and Adams, D.H. (2006). Epithelial Inflammation Is Associated with CCL28 Production and the Recruitment of Regulatory T Cells Expressing CCR10. *J. Immunol.* 177, 593–603.
 45. Elßner, C., Goeppert, B., Longerich, T., Scherr, A.L., Stindt, J., Nanduri, L.K., Rupp, C., Kather, J.N., Schmitt, N., Kautz, N., et al. (2019). Nuclear Translocation of RELB Is Increased in Diseased Human Liver and Promotes Ductular Reaction and Biliary Fibrosis in Mice.

- Gastroenterology 156, 1190-1205.e14.
46. Español-Suñer, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin, P., Lemaigre, F., and Leclercq, I.A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 143.
 47. Evarts, R.P., Nagy, P., Marsden, E., and Thorgeirsson, S.S. (1987). A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8, 1737–1740.
 48. VAN EYKEN, P., SCIOT, R., and DESMET, V.J. (1988). A cytokeratin immunohistochemical study of alcoholic liver disease: evidence that hepatocytes can express 'bile duct-type' cytokeratins. *Histopathology* 13, 605–617.
 49. Fabris, L., Cadamuro, M., Guido, M., Spirli, C., Fiorotto, R., Colledan, M., Torre, G., Alberti, D., Sonzogni, A., Okolicsanyi, 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, 641–653.
 50. Fan, B., Malato, Y., Calvisi, D.F., Naqvi, S., Razumilava, N., Ribback, S., Gores, G.J., Dombrowski, F., Evert, M., Chen, X., et al. (2012). Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 2911–2915.
 51. 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, 142.
 52. Faust, D., Kletting, S., Ueberham, E., and Dietrich, C. (2013). Aryl hydrocarbon receptor-dependent cell cycle arrest in isolated mouse oval cells. *Toxicol. Lett.* 223, 73–80.
 53. Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32, 19–31.
 54. Fausto, N. (2004). Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39, 1477–1487.
 55. Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2012). Liver regeneration. *J. Hepatol.* 57, 692–694.
 56. Fellous, T.G., Islam, S., Tadrous, P.J., Elia, G., Kocher, H.M., Bhattacharya, S., Mears, L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., Greaves, L.C., et al. (2009). Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 49, 1655–1663.
 57. Font-Burgada, J., Shalapour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Valasek, M.A., Ye, L., et al. (2015a). Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* 162, 766–779.
 58. Font-Burgada, J., Shalapour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A.,

BIBLIOGRAFÍA

- Taniguchi, K., Nakagawa, H., Valasek, M.A., Ye, L., et al. (2015b). Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* 162, 766–779.
59. Franchitto, A., Onori, P., Renzi, A., Carpino, G., Mancinelli, R., Alvaro, D., and Gaudio, E. (2013). Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors by hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2, 68–77.
60. Friedman, S.L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 88, 125–172.
61. Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., et al. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* 43, 34–41.
62. Gadd, V.L., Skoien, R., Powell, E.E., Fagan, K.J., Winterford, C., Horsfall, L., Irvine, K., and Clouston, A.D. (2014a). The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59, 1393–1405.
63. Gadd, V.L., Skoien, R., Powell, E.E., Fagan, K.J., Winterford, C., Horsfall, L., Irvine, K., and Clouston, A.D. (2014b). The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 59, 1393–1405.
64. Gadd, V.L., Aleksieva, N., and Forbes, S.J. (2020). Epithelial Plasticity during Liver Injury and Regeneration. *Cell Stem Cell* 27, 557–573.
65. Gao, B., and Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141, 1572–1585.
66. Gao, D.Y., Lin, T.T., Sung, Y.C., Liu, Y.C., Chiang, W.H., Chang, C.C., Liu, J.Y., and Chen, Y. (2015). CXCR4-targeted lipid-coated PLGA nanoparticles deliver sorafenib and overcome acquired drug resistance in liver cancer. *Biomaterials* 67, 194–203.
67. García-Irigoyen, O., Latasa, M.U., Carotti, S., Uriarte, I., Elizalde, M., Urtasun, R., Vespasiani-Gentilucci, U., Morini, S., Benito, P., Ladero, J.M., et al. (2015). Matrix Metalloproteinase 10 Contributes To Hepatocarcinogenesis in a Novel Crosstalk With the Stromal Derived Factor 1/C-X-C Chemokine Receptor 4 Axis. *Hepatology* 62, 166–178.
68. Gaudio, E., Onori, P., Franchitto, A., Pannarale, L., Alpini, G., and Alvaro, D. (2005). Hepatic microcirculation and cholangiocyte physiopathology. *Ital. J. Anat. Embryol.* 110, 71–75.
69. Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* 53, 275–354.
70. Ghanem, I., Riveiro, M.E., Paradis, V., Faivre, S., Vázquez de Parga, P.M., and Raymond, E. (2014). Insights on the CXCL12-CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis.

- Am. J. Transl. Res. *6*, 340–352.
71. Gouw, A.S.H., Clouston, A.D., and Theise, N.D. (2011). Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* *54*, 1853–1863.
 72. Govaere, O., Cockell, S., Haele, M. Van, Wouters, J., Delm, W. Van, Van Den Eynde, K., Bianchi, A., Van Eijnsden, R., Van Steenberghe, W., Monbaliu, D., et al. High-throughput sequencing identifies aetiology-dependent differences in ductular reaction in human chronic liver disease.
 73. Guldiken, N., Kobazi Ensari, G., Lahiri, P., Couchy, G., Preisinger, C., Liedtke, C., Zimmermann, H.W., Ziol, M., Boor, P., Zucman-Rossi, J., et al. (2016a). Keratin 23 is a stress-inducible marker of mouse and human ductular reaction in liver disease. *J. Hepatol.* *65*, 552–559.
 74. Guldiken, N., Kobazi Ensari, G., Lahiri, P., Couchy, G., Preisinger, C., Liedtke, C., Zimmermann, H.W., Ziol, M., Boor, P., Zucman-Rossi, J., et al. (2016b). Keratin 23 is a stress-inducible marker of mouse and human ductular reaction in liver disease. *J. Hepatol.* *65*, 552–559.
 75. Guo, F., Wang, Y., Liu, J., Mok, S.C., Xue, F., and Zhang, W. (2016). CXCL12/CXCR4: A symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* *35*, 816–826.
 76. Han, X., Wang, Y., Pu, W., Huang, X., Qiu, L., Li, Y., Yu, W., Zhao, H., Liu, X., He, L., et al. (2019). Lineage Tracing Reveals the Bipotency of SOX9+ Hepatocytes during Liver Regeneration. *Stem Cell Reports* *12*, 624.
 77. Hatch, H.M., Zheng, D., Jorgensen, M.L., and Petersen, B.E. (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*, 339–351.
 78. Helal, T.E.S.A., Ehsan, N.A., Radwan, N.A., and Abdelsameea, E. (2018). Relationship between hepatic progenitor cells and stellate cells in chronic hepatitis C genotype 4. *APMIS* *126*, 14–20.
 79. Higgins, G.M. (1931). Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* *1*, 186–202.
 80. Hilscher, M.B., Sehwat, T., Arab, J.P., Zeng, Z., Gao, J., Liu, M., Kostallari, E., Gao, Y., Simonetto, D.A., Yaqoob, U., et al. (2019). Mechanical Stretch Increases Expression of CXCL1 in Liver Sinusoidal Endothelial Cells to Recruit Neutrophils, Generate Sinusoidal Microthrombi, and Promote Portal Hypertension. *Gastroenterology* *157*, 193-209.e9.
 81. Hong, F., Tuyama, A., Lee, T.F., Loke, J., Agarwal, R., Cheng, X., Garg, A., Fiel, M.I., Schwartz, M., Walewski, J., et al. (2009). Hepatic stellate cells express functional CXCR4: Role in

BIBLIOGRAFÍA

- stromal cell-derived factor-1 α -mediated stellate cell activation. *Hepatology* 49, 2055–2067.
82. Hsieh, W.C., Mackinnon, A.C., Lu, W.Y., Jung, J., Boulter, L., Henderson, N.C., Simpson, K.J., Schotanus, B., Wojtacha, D., Bird, T.G., et al. (2015). Galectin-3 regulates hepatic progenitor cell expansion during liver injury. *Gut* 64, 312–321.
83. Hu, H., Gehart, H., Artegiani, B., López-Iglesias, C., Dekkers, F., Basak, O., van Es, J., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Begthel, H., Korving, J., et al. (2018). Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. *Cell* 175, 1591-1606.e19.
84. Huch, M., and Koo, B.K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 142, 3113–3125.
85. Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., Van Es, J.H., Li, V.S.W., Van De Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., et al. (2013a). In vitro expansion of single Lgr5 + liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
86. Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., Van Es, J.H., Li, V.S.W., Van De Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., et al. (2013b). In vitro expansion of single Lgr5 + liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
87. Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S.W., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., et al. (2013c). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
88. Huch, M., Gehart, H., Van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Versteegen, M.A., Ellis, E., Van Wenum, M., Fuchs, S., De Ligt, J., et al. (2015a). Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell* 160, 299–312.
89. Huch, M., Gehart, H., Van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Versteegen, M.M.A., Ellis, E., Van Wenum, M., Fuchs, S.A., De Ligt, J., et al. (2015b). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160, 299–312.
90. Van Hul, N.K.M., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Horsmans, Y., and Leclercq, I.A. (2009). Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 49, 1625–1635.
91. Hyun, J., Oh, S.H., Premont, R.T., Guy, C.D., Berg, C.L., and Diehl, A.M. (2019). Dysregulated activation of fetal liver programme in acute liver failure. *Gut* 68, 1076–1087.
92. Hyun, J., Sun, Z., Ahmadi, A.R., Bangru, S., Chembazhi, U. V., Du, K., Chen, T., Tsukamoto, H., Rusyn, I., Kalsotra, A., et al. (2020). Epithelial splicing regulatory protein 2-mediated alternative splicing reprograms hepatocytes in severe alcoholic hepatitis. *J. Clin. Invest.*
93. Ishikawa, T., Factor, V.M., Marquardt, J.U., Raggi, C., Seo, D., Kitade, M., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2012). Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-

- cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 55, 1215–1226.
94. Isse, K., Harada, K., and Nakanuma, Y. (2007). IL-8 expression by biliary epithelial cells is associated with neutrophilic infiltration and reactive bile ductules. *Liver Int.* 27, 672–680.
 95. Jakubowski, A., Ambrose, C., Parr, M., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., Zheng, T.S., Browning, B., Michaelson, J.S., Baestcher, M., Wang, B., et al. (2005). TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J. Clin. Invest.* 115, 2330–2340.
 96. Jung, Y., Witek, R.P., Syn, W.K., Choi, S.S., Omenetti, A., Premont, R., Guy, C.D., and Diehl, A.M. (2010). Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut* 59, 655–665.
 97. Jung, Y., Oh, S.H., Witek, R.P., and Petersen, B.E. (2012). Somatostatin stimulates the migration of hepatic oval cells in the injured rat liver. *Liver Int.* 32, 312.
 98. Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 179–203.
 99. Kallis, Y.N., Robson, A.J., Fallowfield, J.A., Thomas, H.C., Alison, M.R., Wright, N.A., Goldin, R.D., Iredale, J.P., and Forbes, S.J. (2011). Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut* 60, 525–533.
 100. Katoonizadeh, A., Nevens, F., Verslype, C., Pirenne, J., and Roskams, T. (2006a). Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int.* 26, 1225–1233.
 101. Katoonizadeh, A., Nevens, F., Verslype, C., Pirenne, J., and Roskams, T. (2006b). Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int.* 26, 1225–1233.
 102. Kaur, S., Siddiqui, H., and Bhat, M.H. (2015). REVIEW Hepatic Progenitor Cells in Action Liver Regeneration or Fibrosis? *Am. J. Pathol.* 185, 2342–2350.
 103. Kaylan, K.B., Ermilova, V., Yada, R.C., and Underhill, G.H. (2016). Combinatorial microenvironmental regulation of liver progenitor differentiation by Notch ligands, TGFβ and extracellular matrix. *Sci. Reports* 2016 6, 1–15.
 104. Knight, B., Yeoh, G.C., Husk, K.L., Ly, T., Abraham, L.J., Yu, C., Rhim, J.A., and Fausto, N. (2000). Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J. Exp. Med.* 192, 1809–1818.
 105. Ko, S., Russell, J.O., Molina, L.M., and Monga, S.P. (2020). Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15, 23–50.
 106. Kollet, O., Shvitiel, S., Chen, Y.Q., Suriawinata, J., Thung, S.N., Dabeva, M.D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., et al. (2003). HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-

BIBLIOGRAFÍA

- induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J. Clin. Invest.* *112*, 160–169.
107. Kountouras, J., Billing, B.H., and Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* *65*, 305.
108. Kourouklis, A.P., Kaylan, K.B., and Underhill, G.H. (2016). Substrate stiffness and matrix composition coordinately control the differentiation of liver progenitor cells. *Biomaterials* *99*, 82–94.
109. Kuhlmann, W.D., and Peschke, P. (2006). Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int. J. Exp. Pathol.* *87*, 343–359.
110. Lamas-Paz, A., Hao, F., Nelson, L.J., Vázquez, M.T., Canals, S., del Moral, M.G., Martínez-Naves, E., Nevzorova, Y.A., and Cubero, F.J. (2018). Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J. Gastroenterol.* *24*, 5063–5075.
111. Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (80-). *345*.
112. Lanthier, N., Rubbia-Brandt, L., Lin-Marq, N., Clément, S., Frossard, J.L., Goossens, N., Hadengue, A., and Spahr, L. (2015). Hepatic cell proliferation plays a pivotal role in the prognosis of alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.*
113. Li, D., Cen, J., Chen, X., Conway, E.M., Ji, Y., and Hui, L. (2013). Hepatic loss of survivin impairs postnatal liver development and promotes expansion of hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* *58*, 2109–2121.
114. Li, L., Knutsdottir, H., Hui, K., Weiss, M.J., He, J., Philosophe, B., Cameron, A.M., Wolfgang, C.L., Pawlik, T.M., Ghiaur, G., et al. (2019a). Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity. *JCI Insight* *4*.
115. Li, W., Yang, L., He, Q., Hu, C., Zhu, L., Ma, X., Ma, X., Bao, S., Li, L., Chen, Y., et al. (2019b). A Homeostatic Arid1a-Dependent Permissive Chromatin State Licenses Hepatocyte Responsiveness to Liver-Injury-Associated YAP Signaling. *Cell Stem Cell* *25*, 54-68.e5.
116. Liepelt, A., and Tacke, F. (2016). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *311*, G203–G209.
117. Lim, R., Knight, B., Patel, K., McHutchison, J.G., Yeoh, G.C., and Olynyk, J.K. (2006). Antiproliferative effects of interferon alpha on hepatic progenitor cells in vitro and in vivo. *Hepatology* *43*, 1074–1083.
118. Lin, S., Nascimento, E.M., Gajera, C.R., Chen, L., Neuhöfer, P., Garbuzov, A., Wang, S., and Artandi, S.E. (2018). Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury. *Nature* *556*, 244–248.
119. Lin, W.-R., Lim, S.-N., McDonald, S.A.C., Graham, T., Wright, V.L., Peplow, C.L., Humphries, A., Kocher, H.M., Wright, N.A., Dhillon, A.P., et al. (2010). The histogenesis of

- regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology* 51, 1017–1026.
120. Liu, C.H., Chan, K.M., Chiang, T., Liu, J.Y., Chern, G.G., Hsu, F.F., Wu, Y.H., Liu, Y.C., and Chen, Y. (2016a). Dual-Functional Nanoparticles Targeting CXCR4 and Delivering Antiangiogenic siRNA Ameliorate Liver Fibrosis. *Mol. Pharm.* 13, 2253–2262.
121. Liu, C.H., Chan, K.M., Chiang, T., Liu, J.Y., Chern, G.G., Hsu, F.F., Wu, Y.H., Liu, Y.C., and Chen, Y. (2016b). Dual-functional nanoparticles targeting CXCR4 and delivering antiangiogenic siRNA ameliorate liver fibrosis. *Mol. Pharm.* 13, 2253–2262.
122. Liu, H., Pan, Z., Li, A., Fu, S., Lei, Y., Sun, H., Wu, M., and Zhou, W. (2008). Roles of chemokine receptor 4 (CXCR4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell. Mol. Immunol.* 5, 373–378.
123. Liu, Y., Zhuo, S., Zhou, Y., Ma, L., Sun, Z., Wu, X., Wang, X.W., Gao, B., and Yang, Y. (2021). Yap-Sox9 signaling determines hepatocyte plasticity and lineage-specific hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* 76, 652–664.
124. López-Vicario, C., Alcaraz-Quiles, J., García-Alonso, V., Rius, B., Hwang, S.H., Titos, E., Lopategi, A., Hammock, B.D., Arroyo, V., and Clària, J. (2015). Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: role for omega-3 epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 536–541.
125. Lorenzini, S., Bird, T.G., Boulter, L., Bellamy, C., Samuel, K., Aucott, R., Clayton, E., Andreone, P., Bernardi, M., Golding, M., et al. (2010). Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut* 59, 645–654.
126. Louvet, A., and Mathurin, P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015 124 12, 231–242.
127. Lowes, K.N., Brennan, B.A., Yeoh, G.C., and Olynyk, J.K. (1999). Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.* 154, 537–541.
128. Lu, W.Y., Bird, T.G., Boulter, L., Tsuchiya, A., Cole, A.M., Hay, T., Guest, R. V., Wojtacha, D., Man, T.Y., Mackinnon, A., et al. (2015). Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat. Cell Biol.* 17, 973–983.
129. Lucey, M.R., Mathurin, P., and Morgan, T.R. (2009). Alcoholic hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 360, 2758–2769.
130. Lukacs-Kornek, V., and Lammert, F. (2017). The progenitor cell dilemma: Cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury. *J. Hepatol.* 66, 619–630.
131. Machado, M.V., Michelotti, G.A., Pereira, T.A., Xie, G., Premont, R., Cortez-Pinto, H., and Diehl, A.M. (2015). Accumulation of duct cells with activated YAP parallels fibrosis

BIBLIOGRAFÍA

- progression in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *63*, 962–970.
132. Malfettone, A., Soukupova, J., Bertran, E., Crosas-Molist, E., Lastra, R., Fernando, J., Koudelkova, P., Rani, B., Fabra, Á., Serrano, T., et al. (2017). Transforming growth factor- β -induced plasticity causes a migratory stemness phenotype in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* *392*, 39–50.
133. Mall, F.P. (1906). A study of the structural unit of the liver. *Am. J. Anat.* *5*, 227–308.
134. Manco, R., Clerbaux, L.A., Verhulst, S., Bou Nader, M., Sempoux, C., Ambroise, J., Bearzatto, B., Gala, J.L., Horsmans, Y., van Grunsven, L., et al. (2019). Reactive cholangiocytes differentiate into proliferative hepatocytes with efficient DNA repair in mice with chronic liver injury. *J. Hepatol.* *70*, 1180–1191.
135. Maroni, L., Haibo, B., Ray, D., Zhou, T., Wan, Y., Meng, F., Marzioni, M., and Alpini, G. (2015). Functional and Structural Features of Cholangiocytes in Health and Disease. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *1*, 368.
136. Marsee, A., Roos, F.J.M., Verstegen, M.M.A., Roos, F., Verstegen, M., Clevers, H., Vallier, L., Takebe, T., Huch, M., Peng, W.C., et al. (2021). Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell* *28*, 816–832.
137. Mathurin, P., Moreno, C., Samuel, D., Dumortier, J., Salleron, J., Durand, F., Castel, H., Duhamel, A., Pageaux, G.-P., Leroy, V., et al. (2011). Early Liver Transplantation for Severe Alcoholic Hepatitis. *N. Engl. J. Med.* *365*, 1790–1800.
138. Matsukuma, S., Takeo, H., Kono, T., Nagata, Y., and Sato, K. (2012). Aberrant cytokeratin 7 expression of centrilobular hepatocytes: a clinicopathological study. *Histopathology* *61*, 857–862.
139. Merrell, A.J., Peng, T., Li, J., Sun, K., Li, B., Katsuda, T., Grompe, M., Tan, K., and Stanger, B.Z. (2021). Dynamic transcriptional and epigenetic changes drive cellular plasticity in the liver. *Hepatology* hep.31704.
140. Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* *213*, 286–300.
141. Michalopoulos, G.K., and Bhushan, B. (2020). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *2020* 181 18, 40–55.
142. Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* (80-). *276*, 60–65.
143. Michalopoulos, G.K., and Khan, Z. (2015). Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology* *149*, 876–882.
144. Michalopoulos, G.K., Bowen, W.C., Mulè, K., and Stolz, D.B. (2001). Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am. J. Pathol.* *159*, 1877–1887.

145. Michalopoulos, G.K., Barua, L., and Bowen, W.C. (2005). Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology* 41, 535–544.
146. Michelotti, G.A., Tucker, A., Swiderska-Syn, M., Machado, M.V., Choi, S.S., Kruger, L., Soderblom, E., Thompson, J.W., Mayer-Salman, M., Himburg, H.A., et al. (2016). Pleiotrophin regulates the ductular reaction by controlling the migration of cells in liver progenitor niches. *Gut* 65, 683–692.
147. Moorman, A.F.M., Vermeulen, J.L.M., Charles, R., and Lamers, W.H. (1989). Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity. *Hepatology* 9, 367–372.
148. Mu, X., Español-Suñer, R., Mederacke, I., Affò, S., Manco, R., Sempoux, C., Lemaigre, F.P., Adili, A., Yuan, D., Weber, A., et al. (2015). Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment. *J. Clin. Invest.* 125, 3891–3903.
149. Nagahama, Y., Sone, M., Chen, X., Okada, Y., Yamamoto, M., Xin, B., Matsuo, Y., Komatsu, M., Suzuki, A., Enomoto, K., et al. (2014). Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injury. *Am. J. Pathol.* 184, 3001–3012.
150. Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S.I., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635–638.
151. Nuciforo, S., Fofana, I., Matter, M.S., Blumer, T., Calabrese, D., Boldanova, T., Piscuoglio, S., Wieland, S., Ringnalda, F., Schwank, G., et al. (2018). Organoid Models of Human Liver Cancers Derived from Tumor Needle Biopsies. *Cell Rep.* 24, 1363–1376.
152. Okabe, H., Yang, J., Sylakowski, K., Yovchev, M., Miyagawa, Y., Nagarajan, S., Chikina, M., Thompson, M., Oertel, M., Baba, H., et al. (2016). Wnt signaling regulates hepatobiliary repair following cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* 64, 1652–1666.
153. Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., and Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136, 1951–1960.
154. Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., and Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 151, 1273.
155. Paku, S., Schnur, J., Nagy, P., and Thorgeirsson, S.S. (2001). Origin and structural

BIBLIOGRAFÍA

- evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Pathol.* *158*, 1313–1323.
156. Pan, R.L., Wang, P., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. (2011). Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation. *J. Biol. Chem.* *286*, 12340–12348.
157. Paranjpe, S., Bowen, W.C., Mars, W.M., Orr, A., Haynes, M.M., DeFrances, M.C., Liu, S., Tseng, G.C., Tsagianni, A., and Michalopoulos, G.K. (2016). Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology* *64*, 1711–1724.
158. Peng, W.C., Logan, C.Y., Fish, M., Anbarchian, T., Aguisanda, F., Álvarez-Varela, A., Wu, P., Jin, Y., Zhu, J., Li, B., et al. (2018). Inflammatory Cytokine TNF α Promotes the Long-Term Expansion of Primary Hepatocytes in 3D Culture. *Cell* *175*, 1607-1619.e15.
159. Pepe-Mooney, B.J., Dill, M.T., Alemany, A., Ordovas-Montanes, J., Matsushita, Y., Rao, A., Sen, A., Miyazaki, M., Anakk, S., Dawson, P.A., et al. (2019). Single-Cell Analysis of the Liver Epithelium Reveals Dynamic Heterogeneity and an Essential Role for YAP in Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell*.
160. Perra, A., Kowalik, M.A., Ghiso, E., Ledda-Columbano, G.M., Di Tommaso, L., Angioni, M.M., Raschioni, C., Testore, E., Roncalli, M., Giordano, S., et al. (2014). YAP activation is an early event and a potential therapeutic target in liver cancer development. *J. Hepatol.* *61*, 1088–1096.
161. Petersen, B.E., Zajac, V.F., and Michalopoulos, G.K. (1997). Bile ductular damage induced by methylene dianiline inhibits oval cell activation. *Am. J. Pathol.* *151*, 905.
162. Petersen, B.E., Grossbard, B., Hatch, H., Pi, L., Deng, J., and Scott, E.W. (2003). Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* *37*, 632–640.
163. Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pikiólek, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., Mart, P., et al. (2016). The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat. Cell Biol.* *18*, 467–479.
164. Planas-Paz, L., Sun, T., Pikiólek, M., Cochran, N.R., Bergling, S., Orsini, V., Yang, Z., Sigoillot, F., Jetzer, J., Syed, M., et al. (2019). YAP, but Not RSPO-LGR4/5, Signaling in Biliary Epithelial Cells Promotes a Ductular Reaction in Response to Liver Injury. *Cell Stem Cell* *25*, 39-53.e10.
165. Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., and Rautou, P.E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* *66*, 212–227.
166. Prakoso, E., Tirnitz-Parker, J.E.E., Clouston, A.D., Kayali, Z., Lee, A., Gan, E.K., Ramm, G.A.,

- Kench, J.G., Bowen, D.G., Olynyk, J.K., et al. (2014). Analysis Of The Intrahepatic Ductular Reaction And Progenitor Cell Responses In Hepatitis C Virus Recurrence Post-Liver Transplantation. *Liver Transplant*. 20, n/a-n/a.
167. Preisegger, K.H., Factor, V.M., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Denk, H., and Thorgeirsson, S.S. (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, 103–109.
168. Pusterla, T., Németh, J., Stein, I., Wiechert, L., Knigin, D., Marhenke, S., Longerich, T., Kumar, V., Arnold, B., Vogel, A., et al. (2013). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a key regulator of oval cell activation and inflammation-associated liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 58, 363–373.
169. Quiñones-Mateu, M.E., Lederman, M.M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H.R., Marotta, M.L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P., et al. (2003). Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 17.
170. Raven, A., Lu, W.-Y., Man, T.Y., Ferreira-Gonzalez, S., O’Duibhir, E., Dwyer, B.J., Thomson, J.P., Meehan, R.R., Bogorad, R., Koteliansky, V., et al. (2017a). Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature* 547, 350–354.
171. Raven, A., Lu, W.Y., Man, T.Y., Ferreira-Gonzalez, S., O’Duibhir, E., Dwyer, B.J., Thomson, J.P., Meehan, R.R., Bogorad, R., Koteliansky, V., et al. (2017b). Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature* 547, 350–354.
172. Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159, 896–910.
173. Richardson, M.M., Jonsson, J.R., Powell, E.E., Brunt, E.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Bhathal, P.S., Dixon, J.B., Weltman, M.D., Tilg, H., Moschen, A.R., et al. (2007). Progressive Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: Association With Altered Regeneration and a Ductular Reaction. *Gastroenterology* 133, 80–90.
174. Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47.
175. Rodrigo-Torres, D., Affò, S., Coll, M., Morales-Ibanez, O., Millán, C., Blaya, D., Alvarez-Guaita, A., Rentero, C., Lozano, J.J., Maestro, M.A., et al. (2014). The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology* 60, 1367–1377.

BIBLIOGRAFÍA

176. Rolas, L., Boussif, A., Weiss, E., Lettéron, P., Haddad, O., El-Benna, J., Rautou, P.-E., Moreau, R., and Périainin, A. (2017). NADPH oxidase depletion in neutrophils from patients with cirrhosis and restoration via toll-like receptor 7/8 activation. *Gut* gutjnl-2016-313443.
177. Roskams, T. (2006). Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006 2527 25, 3818–3822.
178. Roskams, T., De Vos, R., Van Eyken, P., Myazaki, H., Van Damme, B., and Desmet, V. (1998). Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J. Hepatol.* 29, 455–463.
179. Roskams, T., Yang, S.Q., Koteish, A., Durnez, A., DeVos, R., Huang, X., Achten, R., Verslype, C., and Diehl, A.M. (2003a). Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans with Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am. J. Pathol.* 163, 1301–1311.
180. Roskams, T., Yang, S.Q., Koteish, A., Durnez, A., DeVos, R., Huang, X., Achten, R., Verslype, C., and Diehl, A.M. (2003b). Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans with Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am. J. Pathol.* 163, 1301.
181. Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V., et al. (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*.
182. Ruddell, R.G., Knight, B., Tirnitz-Parker, J.E.E., Akhurst, B., Summerville, L., Subramaniam, V.N., Olynyk, J.K., and Ramm, G.A. (2009). Lymphotoxin-beta receptor signaling regulates hepatic stellate cell function and wound healing in a murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 49, 227–239.
183. Russell, J.O., Lu, W.-Y., Okabe, H., Abrams, M., Oertel, M., Poddar, M., Singh, S., Forbes, S.J., and Monga, S.P. (2018). Hepatocyte-specific β -catenin deletion during severe liver injury provokes cholangiocytes to differentiate into hepatocytes. *Hepatology*.
184. Russell, J.O., Lu, W.Y., Okabe, H., Abrams, M., Oertel, M., Poddar, M., Singh, S., Forbes, S.J., and Monga, S.P. (2019). Hepatocyte-Specific β -Catenin Deletion During Severe Liver Injury Provokes Cholangiocytes to Differentiate Into Hepatocytes. *Hepatology* 69, 742–759.
185. Sackett, S.D., Li, Z., Hurtt, R., Gao, Y., Wells, R.G., Brondell, K., Kaestner, K.H., and Greenbaum, L.E. (2009). Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 49, 920–929.
186. Saijou, E., Enomoto, Y., Matsuda, M., Yuet-Yin Kok, C., Akira, S., Tanaka, M., and Miyajima, A. (2018). Neutrophils alleviate fibrosis in the CCl4-induced mouse chronic liver

- injury model. *Hepatology*. 2, 703–717.
187. Saiman, Y., Agarwal, R., Hickman, D.S.A., Fausther, M., El-Shamy, A., Dranoff, J.A., Friedman, S.L., and Bansal, M.B. (2013). CXCL12 induces hepatic stellate cell contraction through a calcium-independent pathway. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 305.
188. Saiman, Y., Jiao, J., Fiel, M.I., Friedman, S.L., Aloman, C., and Bansal, M.B. (2015). Inhibition of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis with AMD3100, a CXCR4 small molecule inhibitor, worsens murine hepatic injury. *Hepatology*. 45, 794–803.
189. Saini, V., Marchese, A., and Majetschak, M. (2010). CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 285, 15566–15576.
190. Sancho-Bru, P., Altamirano, J., Rodrigo-Torres, D., Coll, M., Millán, C., José Lozano, J., Miquel, R., Arroyo, V., Caballería, J., Ginès, P., et al. (2012a). Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 55, 1931–1941.
191. Sancho-Bru, P., Altamirano, J., Rodrigo-Torres, D., Coll, M., Millán, C., José Lozano, J., Miquel, R., Arroyo, V., Caballería, J., Ginès, P., et al. (2012b). Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 55, 1931–1941.
192. Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., Van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
193. Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., Van Es, J.H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., et al. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772.
194. Schaub, J.R., Malato, Y., Gormond, C., and Willenbring, H. (2014). Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury. *Cell Rep.* 8, 933–939.
195. Schaub, J.R., Huppert, K.A., Kurial, S.N.T., Hsu, B.Y., Cast, A.E., Donnelly, B., Karns, R.A., Chen, F., Rezvani, M., Luu, H.Y., et al. (2018). De novo formation of the biliary system by TGFβ-mediated hepatocyte transdifferentiation. *Nature* 557, 247–251.
196. Schneeberger, K., Sánchez-Romero, N., Ye, S., van Steenbeek, F.G., Oosterhoff, L.A., Pla Palacin, I., Chen, C., van Wolferen, M.E., van Tienderen, G., Lieshout, R., et al. (2020). Large-Scale Production of LGR5-Positive Bipotential Human Liver Stem Cells. *Hepatology* 72, 257–270.
197. Sekiya, S., and Suzuki, A. (2014). Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the

BIBLIOGRAFÍA

- major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am. J. Pathol.* **184**, 1468–1478.
198. Shin, S., Walton, G., Aoki, R., Brondell, K., Schug, J., Fox, A., Smirnova, O., Dorrell, C., Erker, L., Chu, A.S., et al. (2011). Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential. *Genes Dev.* **25**, 1185–1192.
199. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189.
200. Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S.L., and Llovet, J.M. (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology* **152**, 745–761.
201. So, J., Kim, A., Lee, S.-H., and Shin, D. (2020). Liver progenitor cell-driven liver regeneration. *Exp. Mol. Med.* **52**, 1230–1238.
202. Soroka, C.J., Assis, D.N., Alrabadi, L.S., Roberts, S., Cusack, L., Jaffe, A.B., and Boyer, J.L. (2019). Bile-Derived Organoids From Patients With Primary Sclerosing Cholangitis Recapitulate Their Inflammatory Immune Profile. *Hepatology* **70**, 871–882.
203. Spee, B., Carpino, G., Schotanus, B.A., Katoonizadeh, A., Borght, S. V., Gaudio, E., and Roskams, T. (2010a). Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* **59**, 247–257.
204. Spee, B., Carpino, G., Schotanus, B.A., Katoonizadeh, A., Borght, S. V., Gaudio, E., and Roskams, T. (2010b). Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* **59**, 247–257.
205. Spee, B., Carpino, G., Schotanus, B.A., Katoonizadeh, A., Borght, S. V., Gaudio, E., and Roskams, T. (2010c). Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* **59**, 247–257.
206. Stueck, A.E., and Wanless, I.R. (2015). Hepatocyte buds derived from progenitor cells repopulate regions of parenchymal extinction in human cirrhosis. *Hepatology* **61**, 1696–1707.
207. Sun, L., Wang, Y., Cen, J., Ma, X., Cui, L., Qiu, Z., Zhang, Z., Li, H., Yang, R.Z., Wang, C., et al. (2019). Modelling liver cancer initiation with organoids derived from directly reprogrammed human hepatocytes. *Nat. Cell Biol.* **2019** **21**, 1015–1026.
208. Sun, T., Pikiólek, M., Orsini, V., Bergling, S., Holwerda, S., Morelli, L., Hoppe, P.S., Planas-Paz, L., Yang, Y., Ruffner, H., et al. (2020). AXIN2+ Pericentral Hepatocytes Have Limited Contributions to Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell* **26**, 97-107.e6.
209. Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R.S., Pienta, K.J., and Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 709–722.

210. Sung, Y.C., Liu, Y.C., Chao, P.H., Chang, C.C., Jin, P.R., Lin, T.T., Lin, J.A., Cheng, H.T., Wang, J., Lai, C.P., et al. (2018). Combined delivery of sorafenib and a MEK inhibitor using CXCR4-targeted nanoparticles reduces hepatic fibrosis and prevents tumor development. *Theranostics* 8, 894–905.
211. Sutton, A., Friand, V., Brulé-Donneger, S., Chaigneau, T., Ziol, M., Sainte-Catherine, O., Poiré, A., Saffar, L., Kraemer, M., Vassy, J., et al. (2007). Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol. Cancer Res.* 5, 21–33.
212. Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S.I., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591–594.
213. Takase, H.M., Itoh, T., Ino, S., Wang, T., Koji, T., Akira, S., Takikawa, Y., and Miyajima, A. (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev.* 27, 169–181.
214. Takeuchi, M., Vidigal, P.T., Guerra, M.T., Hundt, M.A., Robert, M.E., Olave-Martinez, M., Aoki, S., Khamphaya, T., Kersten, R., Kruglov, E., et al. (2021). Neutrophils interact with cholangiocytes to cause cholestatic changes in alcoholic hepatitis. *Gut* 70, 342–356.
215. Tanimizu, N., Nishikawa, Y., Ichinohe, N., Akiyama, H., and Mitaka, T. (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, 7589–7598.
216. Tarlow, B.D., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2014a). Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology* 60, 278–289.
217. Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler, W.E., Wakefield, L., Wilson, E.M., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2014b). Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 15, 605–618.
218. Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler, W.E., Wakefield, L., Wilson, E.M., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2014c). Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 15, 605–618.
219. Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Ö Sterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Ö Sterreicher, M., and Brenner, D.A. (2010). Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51, 1027–1036.
220. Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425–1433.

BIBLIOGRAFÍA

221. Thenappan, A., Li, Y., Kitisin, K., Rashid, A., Shetty, K., Johnson, L., and Mishra, L. (2010). Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver. *Hepatology* 51, 1373–1382.
222. Tirnitz-Parker, J.E.E., Viebahn, C.S., Jakubowski, A., Klopčič, B.R.S., Olynyk, J.K., Yeoh, G.C.T., and Knight, B. (2010). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells. *Hepatology* 52, 291–302.
223. Tritto, G., Bechlis, Z., Stadlbauer, V., Davies, N., Francés, R., Shah, N., Mookerjee, R.P., Such, J., and Jalan, R. (2011). Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J. Hepatol.* 55, 574–581.
224. Tsuchiya, A., Imai, M., Kamimura, H., Takamura, M., Yamagiwa, S., Sugiyama, T., Nomoto, M., Heike, T., Nagasawa, T., Nakahata, T., et al. (2012). Increased susceptibility to severe chronic liver damage in CXCR4 conditional knock-out mice. *Dig. Dis. Sci.* 57, 2892–2900.
225. Vestentoft, P.S., Jernes, P., Andersen, J.B., Tran, T.A.T., Jørgensen, T., Rasmussen, M., Bornholdt, J., Grøvdal, L.M., Jensen, C.H., Vogel, L.K., et al. (2013). Molecular constituents of the extracellular matrix in rat liver mounting a hepatic progenitor cell response for tissue repair. *Fibrogenes. Tissue Repair* 6, 1–16.
226. Viebahn, C.S., Benseler, V., Holz, L.E., Elsegood, C.L., Vo, M., Bertolino, P., Ganss, R., and Yeoh, G.C.T. (2010). Invading macrophages play a major role in the liver progenitor cell response to chronic liver injury. *J. Hepatol.* 53, 500–507.
227. Wald, O., Pappo, O., Safadi, R., Dagan-Berger, M., Beider, K., Wald, H., Franitza, S., Weiss, I., Avniel, S., Boaz, P., et al. (2004). Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *Eur. J. Immunol.* 34, 1164–1174.
228. Wang, J., and Knaut, H. (2014). Chemokine signaling in development and disease. *Dev.* 141, 4199–4205.
229. Wang, A.W., Wang, Y.J., Zahm, A.M., Morgan, A.R., Wangensteen, K.J., and Kaestner, K.H. (2020). The Dynamic Chromatin Architecture of the Regenerating Liver. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 121–143.
230. Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y., and Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2 + cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* 524, 180–185.
231. Wang, S., Gao, S., Li, Y., Qian, X., Luan, J., and Lv, X. (2021a). Emerging Importance of Chemokine Receptor CXCR4 and Its Ligand in Liver Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.
232. Wang, S., Gao, S., Li, Y., Qian, X., Luan, J., and Lv, X. (2021b). Emerging Importance of Chemokine Receptor CXCR4 and Its Ligand in Liver Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.

233. Wang, X., Zhang, W., Ding, Y., Guo, X., Yuan, Y., and Li, D. (2017a). CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CXCR4 decreases the malignancy of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* *37*, 3565–3571.
234. Wang, Y., Yu, H., Shan, Y., Tao, C., Wu, F., Yu, Z., Guo, P., Huang, J., Li, J., Zhu, Q., et al. (2016). EphA1 activation promotes the homing of endothelial progenitor cells to hepatocellular carcinoma for tumor neovascularization through the SDF-1/CXCR4 signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *35*.
235. Wang, Z., Yang, X., Chen, L., Zhi, X., Lu, H., Ning, Y., Yeong, J., Chen, S., Yin, L., Wang, X., et al. (2017b). Upregulation of hydroxysteroid sulfotransferase 2B1b promotes hepatic oval cell proliferation by modulating oxysterol-induced LXR activation in a mouse model of liver injury. *Arch. Toxicol.* *91*, 271–287.
236. Weng, H., Cai, X., Yuan, X., Liebe, R., Dooley, S., Li, H., and Wang, T.L. (2015). Two sides of one coin: massive hepatic necrosis and progenitor cell-mediated regeneration in acute liver failure. *Front. Physiol.* *6*.
237. WIEMANN, S.U., SATYANARAYANA, A., TSAHURIDU, M., TILLMANN, H.L., ZENDER, L., KLEMPNAUER, J., FLEMMING, P., FRANCO, S., BLASCO, M.A., MANNS, M.P., et al. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* *16*, 935–942.
238. Willemse, J., Lieshout, R., van der Laan, L.J.W., and Versteegen, M.M.A. (2017). From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *31*, 151–159.
239. Williams, M.J., Clouston, A.D., and Forbes, S.J. (2014). Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology* *146*, 349–356.
240. Wilson, G.C., Freeman, C.M., Kuethe, J.W., Quillin, R.C., Nojima, H., Schuster, R., Blanchard, J., Edwards, M.J., Caldwell, C.C., and Lentsch, A.B. (2015). CXC chemokine receptor-4 signaling limits hepatocyte proliferation after hepatic ischemia-reperfusion in mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *308*, G702–G709.
241. Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* *31*, 125–150.
242. Xiang, Z., Zeng, Z., Tang, Z., Fan, J., Sun, H., Wu, W., and Tan, Y. (2009a). Increased expression of vascular endothelial growth factor-C and nuclear CXCR4 in hepatocellular carcinoma is correlated with lymph node metastasis and poor outcome. *Cancer J.* *15*, 519–525.
243. Xiang, Z.L., Zeng, Z.C., Tang, Z.Y., Fan, J., Zhuang, P.Y., Liang, Y., Tan, Y.S., and He, J. (2009b). Chemokine receptor CXCR4 expression in hepatocellular carcinoma patients

BIBLIOGRAFÍA

- increases the risk of bone metastases and poor survival. *BMC Cancer* 9.
244. Yang, N., Chen, T., Wang, L., Liu, R., Niu, Y., Sun, L., Yao, B., Wang, Y., Yang, W., Liu, Q., et al. (2020). CXCR4 mediates matrix stiffness-induced downregulation of UBTD1 driving hepatocellular carcinoma progression via YAP signaling pathway. *Theranostics* 10, 5790.
245. Yang, S., Koteish, A., Lin, H., Huang, J., Roskams, T., Dawson, V., and Diehl, A.M. (2004a). Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 39, 403–411.
246. Yang, S., Koteish, A., Lin, H., Huang, J., Roskams, T., Dawson, V., and Diehl, A.M. (2004b). Oval Cells Compensate for Damage and Replicative Senescence of Mature Hepatocytes in Mice with Fatty Liver Disease. *Hepatology*.
247. Yang, T., Poenisch, M., Khanal, R., Hu, Q., Dai, Z., Li, R., Song, G., Yuan, Q., Yao, Q., Shen, X., et al. (2021). Therapeutic HNF4A mRNA attenuates liver fibrosis in a preclinical model. *J. Hepatol.* 75, 1420–1433.
248. Yang, W., Tao, Y., Wu, Y., Zhao, X., Ye, W., Zhao, D., Fu, L., Tian, C., Yang, J., He, F., et al. (2019). Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat. Commun.* 10.
249. Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L.R., Shapira, S.N., Maddipati, R., Aiello, N.M., Thung, S.N., Wells, R.G., Greenbaum, L.E., and Stanger, B.Z. (2013a). Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev.* 27, 719–724.
250. Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L.R., Shapira, S.N., Maddipati, R., Aiello, N.M., Thung, S.N., Wells, R.G., Greenbaum, L.E., and Stanger, B.Z. (2013b). Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev.* 27, 719–724.
251. Yanger, K., Knigin, D., Zong, Y., Maggs, L., Gu, G., Akiyama, H., Pikarsky, E., and Stanger, B.Z. (2014). Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 15, 340–349.
252. Yeoh, G.C.T., Ernst, M., Rose-John, S., Akhurst, B., Payne, C., Long, S., Alexander, W., Croker, B., Grail, D., and Matthews, V.B. (2007). Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology* 45, 486–494.
253. Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 157, 1324–1338.
254. Yokoyama, T., Komori, A., Nakamura, M., Takii, Y., Kamihira, T., Shimoda, S., Mori, T., Fujiwara, S., Koyabu, M., Taniguchi, K., et al. (2006). Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -

- MAPK signaling pathways. *Liver Int.* 26, 467–476.
255. Zhao, S., Wang, J., and Qin, C. (2014). Blockade of CXCL12/CXCR4 signaling inhibits intrahepatic cholangiocarcinoma progression and metastasis via inactivation of canonical Wnt pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 33.
256. Zheng, N., Liu, W., Li, B., Nie, H., Liu, J., Cheng, Y., Wang, J., Dong, H., and Jia, L. (2019). Co-delivery of sorafenib and metapristone encapsulated by CXCR4-targeted PLGA-PEG nanoparticles overcomes hepatocellular carcinoma resistance to sorafenib. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38.
257. Zlotnik, A. (2008). New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J. Pathol.* 215, 211–213.

ANEXO



Tabla 1 Anexada. Los 50 principales genes aumentados y disminuidos en las células hepatobiliares vs. los hepatocitos

GENES AUMENTADOS	Fc	p	GENES DISMINUÍDOS	Fc	p
ARNT	767,133	2,54E-05	OR6K6	-273,64	9,05E-05
IER5L	374,049	2,74E-04	YARS	-268,12	6,33E-04
MMP2	364,15	6,15E-04	GLOD5	-221,37	9,85E-05
STXBP1	330,896	4,33E-05	C3orf18	-205,63	2,15E-05
E2F5	246,600	3,48E-04	LIN54	-185,39	4,12E-05
TMEM106C	239,260	9,26E-04	SLC44A5	-181,18	6,18E-04
PRELP	208,932	1,77E-03	GATC	-166,07	7,31E-04
TGFBR1	204,294	5,35E-04	TRPV3	-162,57	2,91E-04
GTPBP1	195,846	9,03E-04	SEMA3F	-156,55	2,33E-05
DYNC2H1	191,865	8,58E-05	DMRTA1	-152,36	1,37E-03
UBASH3B	188,928	1,88E-03	ZNF543	-143,30	7,16E-05
DCP1A	187,909	3,42E-03	LAMA3	-141,36	2,60E-04
CLEC4A	180,821	1,25E-04	FOXE3	-140,69	2,54E-05
CASP6	175,541	4,23E-03	OR2A14	-136,35	1,25E-04
USP6NL	171,538	3,15E-05	CTC1	-128,77	3,11E-05
KCTD2	169,231	1,90E-04	NCOA7	-127,97	7,41E-05
OVGP1	164,489	1,97E-03	STOML1	-121,97	1,32E-04
MTX3	163,480	1,93E-03	TPRN	-121,41	2,90E-03
SLC25A32	153,417	2,82E-04	PSPH	-120,44	6,19E-04
UPF3B	146,556	9,51E-05	FBLN7	-119,14	3,71E-05
CCDC146	142,962	1,23E-04	SORCS2	-112,79	1,86E-04
C3AR1	139,747	6,28E-04	GBGT1	-112,62	4,61E-04
ANKRD13A	139,260	8,75E-04	P4HTM	-111,59	3,65E-04
OR1N1	138,949	3,05E-04	HOMER3	-107,59	4,96E-04

ANEXO

USP10	137,232	4,16E-05	WDR74	-104,75	8,55E-03
SLC1A5	133,541	1,66E-04	DEF8	-93,27	2,63E-03
MLH3	130,384	1,36E-04	TESK1	-91,72	9,51E-03
CKAP5	126,483	1,60E-03	BCL2L12	-87,13	2,93E-03
GUCY1A3	124,476	6,10E-03	XPNPEP2	-84,45	1,63E-01
MTF2	117,998	7,40E-03	HDAC11	-81,68	3,87E-05
NAT1	116,663	8,91E-04	S100A13	-77,75	1,01E-02
POLDIP3	112,402	1,12E-03	DEPTOR	-77,33	9,21E-02
CXCR4	112,309	5,59E-03	DPM3	-76,29	3,41E-04
DTWD2	109,987	2,24E-02	GPR153	-74,67	1,55E-02
ZC3H8	109,519	1,44E-03	MED31	-74,07	6,07E-04
PDE4DIP	107,605	5,95E-03	LMF1	-73,48	7,53E-02
SIN3A	106,647	2,66E-04	LTN1	-72,58	9,60E-04
CCDC7	99,927	3,33E-03	PDCD7	-69,63	1,09E-02
TSPAN7	99,725	4,55E-03	CCDC107	-69,16	2,85E-02
CPEB2	96,579	7,27E-03	CMTR1	-69,04	1,03E-01
PEX6	94,802	1,82E-03	JOSD1	-65,18	1,56E-02
NIN	94,527	3,06E-03	TYMS	-64,85	1,55E-02
UBE3D	92,708	4,34E-04	ASMTL	-64,21	9,03E-02
ZNRF3	91,984	2,98E-03	MN1	-62,25	8,09E-05
EXOC2	90,851	1,20E-02	OR6C1	-61,75	8,43E-04
PFKFB3	90,722	9,86E-03	SETMAR	-61,19	5,24E-02
OR8K3	87,927	1,08E-04	ZNF324	-60,51	1,15E-02
SHPRH	86,937	2,25 E-05	POLR3A	-60,37	8,40E-02
CXCL6	86,866	0,092274	LRRC46	-59,33	8,29E-03
GLTSCR1	86,492	6,26E-05	ZNF212	-58,93	1,75E-03

Tabla 2 Anexada. Los 50 principales genes aumentados y disminuidos en las células hepatobiliares vs. las células de la reacción ductular

GENES AUMENTADOS	Fc	p	GENES DISMINUIDOS	Fc	p
MASP2	416,68	1,35E-05	GULP1	-611,64	1,60E-05
SLC27A2	279,04	8,47E-06	LAMA3	-599,76	3,74E-06
CHRNA4	272,33	1,45E-05	MUC6	-543,38	1,85E-03
PRPS1	256,30	1,21E-05	ZNF254	-449,99	4,88E-05
GBP7	216,81	2,12E-05	GRHL2	-395,50	5,15E-05
CTH	202,72	4,60E-05	CTNND2	-359,26	4,47E-05
HIST1H3J	176,51	9,36E-03	C9orf3	-330,30	4,18E-05
ENPP7	172,22	1,46E-05	B4GALNT3	-325,77	6,07E-06
PGLYRP2	163,84	7,69E-04	SLC5A1	-305,49	2,89E-05
RORC	148,14	2,56E-04	RFX3	-285,23	1,48E-05
F10	144,28	3,82E-03	EVC2	-241,71	1,92E-05
APOF	143,34	1,25E-02	MTCL1	-199,80	2,63E-03
BCAS2	128,91	1,01E-02	ZNF543	-191,80	3,83E-04
PFKFB1	127,98	6,69E-04	VEPH1	-190,08	1,45E-04
RAPGEF4	118,46	4,74E-04	ZNF836	-189,93	1,62E-03
SLC47A1	110,32	3,32E-04	ITGB8	-182,44	1,99E-04
TENM1	107,64	6,14E-04	HOMER3	-181,98	1,69E-04
F7	107,63	1,77E-03	WNK2	-164,53	2,91E-04
MOGAT2	106,80	5,83E-03	PTGFR	-163,85	1,25E-04
SNX4	105,89	8,44E-03	DENND6B	-152,07	2,48E-04
SERPIND1	104,19	2,01E-02	RAB25	-144,39	9,13E-05

ANEXO

TUBE1	104,04	8,75E-03	PRSS16	-140,33	3,85E-05
MRPS28	98,48	2,18E-03	TAF1C	-136,95	1,68E-03
ETNK2	94,41	3,43E-03	SCTR	-135,60	2,87E-04
AKR1C4	94,11	8,89E-03	C3orf52	-135,22	1,65E-05
HPR	93,50	2,13E-02	MMP7	-131,42	1,27E-02
RTP3	90,30	7,27E-05	LDOC1	-124,77	1,45E-02
KLKB1	86,71	5,34E-03	ITPR3	-119,75	2,63E-05
ENO3	85,51	7,45E-03	PPP1R13L	-119,01	2,85E-03
TMA16	83,81	1,85E-04	KCNJ16	-114,67	5,49E-03
KCTD18	83,18	9,49E-03	PDE5A	-114,20	2,28E-02
PBLD	81,62	9,52E-03	TRPV6	-114,10	1,35E-02
HFE2	81,30	4,34E-05	IGFBP6	-109,95	5,74E-05
GYS2	79,88	1,57E-02	TCTN2	-108,50	7,78E-05
CETN2	79,09	6,18E-04	TRIM2	-106,04	5,32E-04
MTTP	78,55	1,26E-04	FAM3B	-104,87	5,48E-03
MRPL10	77,98	2,64E-04	PCNXL2	-101,38	6,88E-03
PEX19	77,17	2,05E-04	CFAP70	-98,94	1,41E-03
TMEM82	76,81	1,04E-02	SIRT6	-97,20	3,95E-05
OVGP1	76,53	1,57E-03	CLIC6	-95,92	1,20E-03
VPS33A	76,07	1,34E-04	PROM1	-95,73	2,46E-02
RDH16	73,81	4,41E-03	ARHGEF10	-93,17	1,14E-03
IL1RN	73,01	7,39E-04	SLC29A2	-91,75	1,62E-03
PC	72,34	3,50E-04	GALNT7	-91,71	2,23E-04
SMOC1	69,81	1,72E-02	ZHX2	-86,94	1,68E-02

MOSPD1	68,75	5,57E-03	GABRE	-86,77	2,34E-02
PSAT1	68,11	1,53E-04	B3GALT4	-86,22	6,99E-05
GNAO1	65,04	6,12E-03	AQP1	-85,05	5,79E-03
SLC28A1	63,14	3,15E-02	LAMC2	-84,37	4,81E-03
PRSS3	62,93	3,62E-04	EHF	-83,99	2,12E-03

Table 3 Anexada. Expresión génica de los genes específicos de hepatocitos y de las células biliares en las tres poblaciones aisladas por microdissección láser

GENES	Fc HB vs HC	p HB vs HC	Fc HB vs RD	P HB vs RD
AHSG	-2,00	0,305	10,78	0,008
ALB	-1,53	0,604	8,13	0,012
ASGR1	-1,46	0,440	2,84	0,098
HNF4A	-1,58	0,249	5,30	0,016
HNF1A	-9,90	0,306	8,35	0,228
ORM1	-1,48	0,420	10,55	0,009
RBP4	-2,13	0,028	3,86	0,030
APOE	-1,96	0,442	4,77	0,027
TTR	-1,23	0,892	5,84	0,096
APOC1	-1,39	0,725	5,03	0,044
GSTA4	-2,64	0,209	6,38	0,209
CYP1A2	-2,17	0,773	2,75	0,527
CYP3A4	1,06	0,979	-3,18	0,384
CEBPA	-2,23	0,314	2,55	0,440
FOXA1	-11,80	0,011	3,83	0,290
AGR2	-1,03	0,903	-4,55	0,319
CLDN10	1,33	0,529	-23,53	0,031
CLDN4	61,14	0,010	-3,37	0,049
MMP7	14,28	0,301	-131,42	0,013
MUC5B	1,38	0,741	-3,81	0,334
TACSTD2	9,89	0,018	-10,54	0,003

CFTR	13,14	0,189	-57,67	0,006
PROM1	-1,83	0,646	-95,73	0,025
ST14	17,43	0,181	-4,35	0,097
KRT19	5,22	0,437	-7,71	0,255
KRT7	7,92	0,062	-67,43	0,001
SPP1	6,19	0,010	1,22	0,725
SOX9	13,68	0,128	2,35	0,495
EPCAM	-14,66	0,207	-42,17	0,019
CDH6	6,32	0,426	-8,84	0,142
CTNND2	1,33	0,529	-359,26	0,000
NCAM1	-1,03	0,903	-9,47	0,021
SFRP5	2,16	0,454	-6,79	0,137

HB: Hepatobiliar; HC: Hepatocito; RD: Reacción ductular

ANEXO

Table 4 Anexada. Enriquecimiento de las vías en las tres poblaciones aisladas por microdissección láser

Vía	p HB vs HC	p DR vs HC	p DR vs HB
KEGG_CITRATE_CYCLE_TCA_CYCLE	0,0496	0,0037	0,0098
KEGG_FATTY_ACID_METABOLISM	0,4124	0,0168	0,0026
KEGG_PRIMARY_BILE_ACID_BIOSYNTHESIS	0,4220	0,0349	0,0180
KEGG_RETINOL_METABOLISM	0,4558	0,0302	0,0188
KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	0,4468	0,0318	0,0103
PID_HNF3B_PATHWAY	0,1178	0,0026	0,0073
REACTOME_BILE_ACID_AND_BILE_SALT_METABOLISM	0,2901	0,0208	0,0101
REACTOME_GLYCONEOGENESIS	0,2907	0,0056	0,0150
HALLMARK_BILE_ACID_METABOLISM	0,9832	0,0097	0,0006
BIOCARTA_CASPASE_PATHWAY	0,0439	0,5019	0,5890
REACTOME_INTRINSIC_PATHWAY_FOR_APOPTOSIS	0,0278	0,0205	0,2623
REACTOME_ACTIVATION_OF_BAD_AND_TRANSLLOCATION_TO_MITOCHONDRIA	0,0310	0,0699	0,9584
REACTOME_CYTOCHROME_C_MEDIATED_APOPTOTIC_RESPONSE	0,0006	0,0285	0,3870
REACTOME_APOPTOTIC_FACTOR_MEDIATED_RESPONSE	0,0378	0,0407	0,9944
HALLMARK_APOPTOSIS	0,0215	0,8197	0,6808
KEGG_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	0,0219	0,0909	0,8313
PID_NFKAPPAB_CANONICAL_PATHWAY	0,0429	0,0870	0,7812
PID_CD40_PATHWAY	0,0023	0,4837	0,6917
PID_TNF_PATHWAY	0,0480	0,5149	0,9838
REACTOME_CHEMOKINE_RECEPTORS_BIND_CHEMOKINES	0,0648	0,0260	0,7281
REACTOME_INTERFERON_SIGNALING	0,0308	0,9661	0,4029

KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	0,0078	0,0475	0,6242
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	0,0058	0,1914	0,3872
PID_INTEGRIN3_PATHWAY	0,0059	0,0576	0,5078
PID_ILK_PATHWAY	0,0236	0,8315	0,3458
PID_CXCR4_PATHWAY	0,0018	0,1377	0,8682
PID_INTEGRIN5_PATHWAY	0,0036	0,1314	0,5231
REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	0,0319	0,0303	0,1721
REACTOME_ACTIVATION_OF_MATRIX_METALLOPROTEINASES	0,2852	0,0176	0,3401
REACTOME_INTEGRIN_SIGNALING	0,0036	0,1145	0,0116

HB: Hepatobiliar; HC: Hepatocito; RD: Reacción ductular

ANEXO


Tabla 5 Anexada. Correlación de la signatura de células hepatobiliares con los parámetros clínicos.

GENES	Fc HB vs HC	p SAH vs AH	p-CHILD	p-MELD	ABIC
IER5L	374,045	0,0077			*
MMP2	364,15	0,0247	*		*
TGFBR1	204,29	0,0055	*	*	*
UBASH3B	188,93	0,0079	*		*
CXCR4	112,31	0,0177	*		
PIK3R5	73,04	0,0006	*	*	*
TPM4	66,71	0,0158	*		
CD22	56,91	0,0175			*
STK39	56,23	0,0003	*	*	*
SFN	55,87	0,0037	*	*	
WBP5	54,60	0,0244	*		
CTHRC1	54,46	0,0065	*		*
NCEH1	50,42	0,0068	*	*	*
IGSF3	48,17	0,0148	*		
HES4	45,39	0,0482	*		*
SLC12A8	44,79	0,0213			*
KLF4	37,64	0,0140	*		*
ANTXR1	37,10	0,0375	*		*
MOXD1	32,18	0,0248	*		*
SLC2A6	27,51	0,0001		*	*
SRGAP1	25,89	0,0041	*		*

LAIR1	22,49	0,0019	*		*
ADRBK2	16,00	0,0014	*	*	*
TC2N	14,91	0,0410	*		*
CCDC109B	11,98	0,0198	*		*
SH3PXD2B	8,69	0,0008	*		
C12orf75	7,83	0,0323	*		
CXCL8	7,30	0,0077	*	*	*
S100A11	6,48	0,0013	*		*
SPP1	6,19	0,0371	*		*
CHST11	5,13	6,54E-06	*	*	*
LCN2	4,39	0,0058	*		*
RBM11	3,88	0,0107	*	*	*
ERC2	3,88	0,0026	*	*	*
CXCL1	3,59	0,0047	*	*	
PMP22	3,29	0,0052	*	*	*
LIMK2	3,29	0,0009	*	*	*
FMNL2	3,21	0,0004	*	*	*
RELB	2,27	0,0022		*	*

HB: Hepatobiliar; HC: Hepatocito; SAH: hepatitis relacionada con el alcohol severa; AH: Hepatitis relacionada con el alcohol; MELD, Modelo de hepatopatía en estadio terminal; ABIC, edad-bilirubina-INR-creatinina

Ductular Reaction Cells Display an Inflammatory Profile and Recruit Neutrophils in Alcoholic Hepatitis

Beatriz Aguilar-Bravo,^{1*} Daniel Rodrigo-Torres,^{1*} Silvia Ariño,¹ Mar Coll,^{1,2} Elisa Pose,^{1,3} Delia Blaya,¹ Isabel Graupera,^{1,3} Luis Perea,¹ Júlia Vallverdú,¹ Teresa Rubio-Tomás,¹ Laurent Dubuquoy,⁴ Carolina Armengol,^{2,5} Antonio Lo Nigro,⁶ Peter Stärkel,⁷ Philippe Mathurin,⁴ Ramon Bataller,⁸ Joan Caballería,¹⁻³ Juan José Lozano,^{1,2} Pere Ginès ,¹⁻³ and Pau Sancho-Bru^{1,2}

Chronic liver diseases are characterized by the expansion of ductular reaction (DR) cells and the expression of liver progenitor cell (LPC) markers. In alcoholic hepatitis (AH), the degree of DR expansion correlates with disease progression and short-term survival. However, little is known about the biological properties of DR cells, their impact on the pathogenesis of human liver disease, and their contribution to tissue repair. In this study, we have evaluated the transcriptomic profile of DR cells by laser capture microdissection in patients with AH and assessed its association with disease progression. The transcriptome analysis of cytokeratin 7-positive (KRT7⁺) DR cells uncovered intrinsic gene pathways expressed in DR and genes associated with alcoholic liver disease progression. Importantly, DR presented a proinflammatory profile with expression of neutrophil recruiting C-X-C motif chemokine ligand (CXC) and C-C motif chemokine ligand chemokines. Moreover, LPC markers correlated with liver expression and circulating levels of inflammatory mediators such as CXCL5. Histologically, DR was associated with neutrophil infiltration at the periportal area. In order to model the DR and to assess its functional role, we generated LPC organoids derived from patients with cirrhosis. Liver organoids mimicked the transcriptomic and proinflammatory profile of DR cells. Conditioned medium from organoids induced neutrophil migration and enhanced cytokine expression in neutrophils. Likewise, neutrophils promoted the proinflammatory profile and the expression of chemokines of liver organoids. **Conclusion:** Transcriptomic and functional analysis of KRT7⁺ cells indicate that DR has a proinflammatory profile and promote neutrophil recruitment. These results indicate that DR may be involved in the liver inflammatory response in AH, and suggest that therapeutic strategies targeting DR cells may be useful to mitigate the inflammatory cell recruitment in AH. (HEPATOLOGY 2019;69:2180-2195).

Alcoholic hepatitis (AH) is the most severe form of alcoholic liver disease (ALD), and it is characterized by jaundice, hepatic failure, and short-term mortality.⁽¹⁾ Histologically, AH is characterized by the presence of steatosis, hepatocellular

damage, bilirubinostasis, fibrosis, neutrophil infiltration, and a prominent ductular reaction.^(2,3)

Ductular reaction (DR) emerges and expands in most chronic liver diseases or after massive liver damage, and is associated with poor regenerative capacity

Abbreviations: AH, alcoholic hepatitis; ALD, alcoholic liver disease; CCL, C-C motif chemokine ligand; CXC, C-X-C motif chemokine ligand; DR, ductular reaction; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; FC, Fold change; GO, gene ontologies; IL, interleukin; KRT7, cytokeratin 7; KRT19, cytokeratin 19; LPCs, liver progenitor cells; LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor kappa B; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

Received August 2, 2018; accepted December 13, 2018.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30472/supinfo.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria Carlos III (FIS), cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, "Una manera de hacer Europa" (FIS PI17/00673, PI13/02340, PI12/00330, FIS PI12/01265 to P.S.-B., P.G., J.C.), from the NIH National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism grant 1U01AA021908-01-33490 to P.S.-B. and 1U01AA021908 to R.B. and from the European Foundation for Alcohol Research (ERAB) Grant EA1653 to P.S.-B. P.S.-B. and B.A.-B. are funded by Instituto de Salud Carlos III, Miguel Servet (CP11/00071) and PFIS (FI16/00203), respectively, and cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Europeo (FEDER), Unión Europea, "Una manera de hacer Europa". D.R.-T. received a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, FPU programme. P.G. is funded by Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) 2014 SGR 708, Centro de Investigación en Red Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERebd) and Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA). I.G. is funded by Instituto de Salud Carlos III, Rio

of hepatocytes.⁽⁴⁾ Several studies have investigated the presence of DR in liver disease.⁽⁵⁻⁹⁾ In patients with AH, it correlates with the degree of inflammation, fibrosis, and with short-term mortality.^(2,10,11) The role of DR has been mainly studied in biliary diseases showing the expression of profibrogenic modulators such as platelet-derived growth factor, transforming growth factor (TGF)- β 1, vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor 1, and nerve growth factor and proinflammatory mediators such as interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, interferon- γ , TGF- β , monocyte chemoattractant protein 1, and endothelin-1.⁽¹²⁻¹⁴⁾ In nonalcoholic fatty liver disease, ductular reaction expansion results from an adaptive response to oxidative stress, leading to periportal fibrosis.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ The relationship between hepatic fibrosis and ductular reaction in patients with hepatitis C virus has also been reported.^(8,18)

DR contains a heterogeneous population of cells comprising reactive biliary cells, intermediate hepatobiliary cells, and more immature facultative liver progenitor cells (LPCs). DR is generally accompanied by extracellular matrix and inflammatory cells, which participate in DR expansion.^(6,19) Although DR has been shown to produce profibrogenic mediators,⁽²⁰⁾ to

what extent DR cells participate in the generation of this rich milieu is poorly understood.

The presence of facultative LPCs has been demonstrated *in vivo* by lineage tracing studies and by *in vitro* systems such as liver organoid cultures, which allow culturing leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)⁺ LPCs with the potential to differentiate to hepatocytes and cholangiocytes.⁽²¹⁾ Nevertheless, the origin and fate of LPCs in chronic liver diseases is not completely understood. By genetic labeling of biliary epithelium cells and hepatocytes, animal studies suggest that both biliary cells and hepatocytes may be able to generate facultative LPCs.⁽²²⁻²⁴⁾ Yet, the contribution of LPCs to hepatocyte generation and liver regeneration is still controversial. Although most animal models of acute or chronic liver injury do not show the contribution of LPCs to newly generated hepatocytes,^(25,26) animal models with extended hepatocyte replicative arrest have shown that the biliary compartment might be able to give rise to LPCs that differentiate to mature hepatocytes.^(27,28) These reports suggest that the origin of facultative LPCs and their contribution to liver regeneration in animal models is dependent on the type and extent of injury.

Hortega grant. J.V. is funded by the University of Barcelona. E.P. is funded by PhD4MD grant. C.A. has funds from Instituto de Salud Carlos III (IP13/02340), Ramón y Cajal program (RYC-2010-07249) of the MINECO, AGAUR (SGR17-490), and the H2020 research and innovation programme (grant agreement No. 668596).

© 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.30472

Potential conflict of interest: Nothing to report.

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ³Liver Unit, Hospital Clínic, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Lille Service des Maladies de l'Appareil Digestif, Hôpital Huriez, Unité INSERM 995, Faculté de médecine, Lille, France; ⁵Childhood Liver Oncology group (c-LOG), Program of Predictive and Personalized Medicine of Cancer (PMPPC), Health Sciences Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Campus Can Ruti, Badalona, Spain; ⁶Ri. Med Foundation, Department of Laboratory Medicine and Advanced Biotechnologies, IRCCS-ISMETT (Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione), Palermo, Italy; ⁷Department of Hepato-Gastroenterology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium; ⁸Pittsburgh Liver Research Center, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Pau Sancho-Bru, Ph.D.
Institut d'Investigacions
Biomèdiques August Pi i Sunyer
(IDIBAPS)C/ Rosselló, 149-153, third floor

08036 Barcelona, Spain
E-mail: psancho@clinic.cat
Tel.: +1-34-932275400 Extension 3371

Overall, the biological properties, impact, and contribution of DR and LPCs in human chronic liver diseases is not completely understood; thus, this study was undertaken to fill this knowledge gap.

LPCs are strongly influenced by their niche. Ligands released by cell types conforming the LPC niche, such as hepatic stellate cells or inflammatory cells, are known to determine DR expansion and LPC proliferation and differentiation.^(6,29,30) Yet, their effect on the LPC gene expression profile during liver disease progression has not been assessed. In addition, mediators secreted by LPCs and their effects in disease are largely unknown. Therefore, the global changes in LPCs gene expression profile in liver disease and the influence of DR cells on other cell populations remain elusive.

The aim of this study was to identify the gene expression profile of DR cells. Moreover, we aimed to determine the functional role of the pathways identified. By using a unique set of samples and laser microdissection, we obtained a global transcriptomic analysis of human DR cells and identified signaling pathways and genes expressed during liver disease progression. Importantly, our results identified DR cells as a potential source of chemokines and neutrophil recruitment, which strongly suggests that they might be involved in liver inflammation and inflammatory cell recruitment during the progression of AH.

Materials and Methods

PATIENT INFORMATION

Samples for the microdissection procedure were obtained from patients with clinical, analytical, and histological features of AH admitted to the Hôpital Claude Huriez of Lille (France) (Table 1). Patient information was described.⁽¹⁰⁾ Informed consent was provided by all the patients (QuickTrans [NCT01756794] and TargetOH [CPP 14/67] studies).

All other samples were selected from patients admitted to the Liver Unit of the Hospital Clinic of Barcelona. Informed consent was obtained from all the patients and the study was approved by the Ethics Committee of the hospital. DR genes and their correlation with disease progression were evaluated in 22 patients with ALD: patients with precirrhosis (n = 4), patients with cirrhosis without AH (n = 7), and patients with AH (n = 11). The clinical and biochemical parameters of

TABLE 1. Baseline Characteristics of Patients With Alcoholic Hepatitis From Whom Samples Were Obtained for Microdissection

Characteristic	Severe AH (n = 6), Median (25-75 IQR)
Demographic data	
Age, median (IQR)	54 (47-60)
Sex, male, n (%)	3 (50)
Severity scores	
Child-Pugh, median (IQR)	12 (11-13)
MELD, median (IQR)	29 (27-31)
ABIC, median (IQR)	7.9 (6.9-9.0)
HVPG, median (IQR)	nd
SIRS, n (%)*	
Decompensations, n (%)	
Ascites	4 (67)
HE	3(50)
UGIB	4 (67)
AKI	4 (67)
Infections	5 (83)
Analytical parameters, median (IQR)	
Hemoglobin g/dL	9.2 (9.2-11.3)
Leukocyte count ×10 ⁹ /L	12.2 (8.3-20.5)
Platelet count ×10 ⁹ /L	107 (83-120)
AST (IU/L)	177 (146-201)
ALT (IU/L)	58 (44-71)
Albumin (g/dL)	2.4 (2.1-2.6)
Creatinine (mg/dL)	0.8 (0.8-1.5)
Bilirubin (mg/dL)	15.0 (11.0-22.9)
INR	2.1 (1.9-2.3)
GGT (IU/L)	367 (272-720)
ALP (IU/L)	260 (233-304)
Sodium (mEq/L)	129 (127-130)

*SIRS alone or SIRS plus infection.

Abbreviations: ABIC, age-bilirubin-INR-creatinine score; AH, alcoholic hepatitis; AKI, acute kidney injury; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HE, hepatic encephalopathy; HVPG, hepatic venous pressure gradient; INR, international normalized ratio; IQR, interquartile range; MELD, Model for End-Stage Liver Disease; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; UGIB, upper gastrointestinal bleeding.

these patients are shown in Supporting Table S1. Liver and serum samples from patients with AH were selected based on RNA availability and quality, and were used to perform RNA gene expression analysis and cytokine determination.⁽³¹⁾ Liver organoids were generated from nontumor liver tissue obtained from liver resections and liver explants from patients with cirrhosis with alcohol-induced cirrhosis, nonalcoholic steatohepatitis,

and hepatitis C virus. Organoid transcriptomic data was compared with the gene expression profile of whole liver tissue from 4 patients with compensated cirrhosis with mixed etiologies.

LASER CAPTURE MICRODISSECTION OF PARAFFIN- EMBEDDED LIVER SAMPLES

Eight- μ m sections were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded liver samples from patients with AH (n = 6) in RNase-free conditions, and mounted on RNase-free Glass foiled PEN slides (Leica, Wetzlar, Germany; NO 11505158, 2.0 mm). Slides were placed at 55°C for 2 hours before deparaffinization with Xylene (3 times, 20 seconds each), Ethanol 100% (twice, 30 seconds each), Ethanol 95% (twice, 30 seconds each), Ethanol 70% (twice, 30 seconds each), ddH₂O 30 seconds, and sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Lonza) 30 seconds in RNase-free conditions. Sections were then incubated with mouse anti-human cytokeratin 7 (KRT7) antibody (Dako, Glostrup, Denmark; 1:50, M7018) for 10 minutes at room temperature in a humidified chamber. After a short wash with sterile DPBS, the samples were incubated for 15 minutes with EnVision peroxidase-conjugated mouse secondary antibody (Dako, K4007). As chromogen, 3,3'-diaminobenzidine solution (Dako, K1011) was used for 2 minutes and rinsed with DEPC-treated water (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Once the samples were dry, the slides were kept at -80°C until the laser capture microdissection was performed.

Microdissection was performed using a Leica LMD6000 Microscope (Leica). For each sample, three different fractions were dissected: KRT7-positive (KRT7⁺) DR cells, KRT7-negative (KRT7⁻) cells comprising small areas of hepatocytes and areas of fibrosis, and a total fraction composed by random selection of KRT7-positive and -negative areas (n = 4). A minimum area of 1.7 mm² was used for RNA isolation and sequencing.

GENERATION OF HUMAN LIVER ORGANOIDS FROM CIRRHOTIC LIVER TISSUE

Liver cells were isolated and cultured as described⁽³²⁾ with minor modifications. Briefly, collagenase XI (Sigma, St. Louis, MO) and dispase II

(ThermoFisher) digestion was performed. Digested material was washed and pelleted at 300 g for 5 minutes at 8°C. The pellet obtained was mixed with basement matrix extract (BME; Amsbio, Abingdon, United Kingdom)⁽³³⁾ and 50,000-100,000 cells were seeded per well in a 24-well plate. After the BME had solidified, organoid expansion medium was added (Advanced DMEM/F12; ThermoFisher), 1% Glutamax (ThermoFisher), 1% Hepes (Life Technologies, Carlsbad, CA), 1% Penicillin-Streptomycin (Lonza, Basilea, Switzerland), 1% N2 and 1% B7 without vitamin A (both from Life Technologies), 1.25 mM N-Acetylcysteine, 10 mM Nicotinamide and 10 nM Gastrin (Sigma), 50 ng/mL epidermal growth factor, 100 ng/mL fibroblast growth factor 10, 25 ng/mL hepatocyte growth factor, 25 ng/mL Noggin and 500 ng/mL Rspo1 (PeproTech, London, United Kingdom), 5 μ M A8301, 0.5 μ M CHIR99021, 10 μ M Forskolin, and 10 μ M of Y27632 (Axon Medchem, Groningen, the Netherlands). Y27632 was added only the first 3 days after isolation. At a confluence of 70%, organoid expansion medium was replaced by organoid basal medium overnight. Organoids were then stimulated with 50 ng/mL tumor necrosis factor- α (TNF- α ; R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/mL IL-1 β (Sigma), and 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS; Sigma) for 6 hours. Organoids were also incubated with 10 μ M nuclear factor kappa B (NF- κ B) inhibitor (BAY 11-7082, Sigma) for 1 hour before stimulation with IL-1 β for 6 hours.

RAW DATA INFORMATION

Microdissection raw sequence data were deposited to the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the accession number PRJNA393451, and microarray data from organoids have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus with accession number GSE100901.

SUPPORTING INFORMATION

Detailed information on RNA processing and sequencing, genome-wide transcriptome analysis, functional analysis, immunohistochemistry and immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay, and neutrophil studies can be found in Supporting Information.

Results

WHOLE-TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF DUCTULAR REACTION CELLS REVEALS A PROINFLAMMATORY PROFILE

In order to perform a transcriptome analysis of DR cells, paraffin-embedded liver sections from 6 patients with AH were stained for KRT7 and laser capture microdissected. Areas with KRT7⁺ staining, negative fraction, and total liver were obtained and analyzed by whole-transcriptome sequencing (Fig. 1A). As expected, principal component analysis showed KRT7⁺ fraction to be distant from the KRT7⁻ fraction and at an intermediate distance from the total fraction (Fig. 1B). KRT7⁺ cells showed 2,321 up-regulated genes and 2,031 down-regulated genes compared with the KRT7⁻ fraction. As shown in Fig. 1C, the top 50 up-regulated genes contained well-known LPC markers, such as KRT7 and prominin 1 (PROM1), as well as genes not previously identified to be expressed in DR and LPCs. Expression of LPC markers in DR was confirmed by immunohistochemistry in liver sections of patients with AH (Fig. 1D). Importantly, expression of cell markers from other liver cell types was low in KRT7⁺ compared with KRT7⁻ fraction: Neutrophils (myeloperoxidase [MPO]; Fold change [FC] = -4.91 ± 7.44), Kupffer cells (cluster of differentiation 68 [CD68]; FC = -3.9 ± 1.34), hepatic stellate cells (platelet-derived growth factor receptor beta; FC = -2.43 ± 1.64), endothelial cells (von Willebrand factor; FC = -8.27 ± 2.21), and infiltrating inflammatory cells (cluster of differentiation 45; FC = -5.34 ± 2.49) showing the purity of the microdissected fraction.

Functional analysis performed by ingenuity pathway analysis (IPA) and gene ontologies (GO) showed that genes up-regulated (FC >2) in KRT7⁺ cells were involved in pathways related to inflammation such as “agranulocyte adhesion” and “granulocyte adhesion and diapedesis,” “NIK/NF-kappaB signaling” or “neutrophil chemotaxis” as well as key signaling pathways such as “Wnt signaling” or “aphrin A signaling” (Table 2). Interestingly, a number of chemokine C-X-C motif chemokine ligand (CXC) and C-C motif chemokine ligand (CCL) family members included in the granulocyte adhesion and diapedesis

pathway such as *CCL28*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CXCL6*, and *CXCL8* were highly expressed in the KRT7⁺ fraction (Supporting Table S2).

Next, we evaluated the protein interaction network of genes highly expressed in the DR by functional protein association networks (STRING). As shown in Supporting Fig. S1, DR showed genes related to claudin family, which are expressed in tight junctions in developing bile ducts; bile acid metabolism and ion transport pathways; and LPC markers such as epithelial cell adhesion molecule (*EpcAM*), KRT7, cytokeratin 19 (*KRT19*), and *PROM1*, together with mucins family members.

DUCTULAR REACTION GENES CORRELATE WITH ALCOHOLIC LIVER DISEASE PROGRESSION AND INFLAMMATION

In order to assess the expression of DR genes along alcoholic liver disease progression, we analyzed the expression of the KRT7⁺ profile in a cohort of patients with different stages of ALD.

KRT7⁺ gene expression profile was evaluated in an ALD data set (n = 28) including the whole liver transcriptome from healthy controls (n = 6), patients with precirrhosis (n = 4), patients with cirrhosis (n = 7), and patients with AH (n = 11), together with the clinical data associated. As shown in Fig. 2A, 23 genes up-regulated in KRT7⁺ fraction versus KRT7⁻ fraction (FC >3; *P* < 0.05) were found to positively correlate with Model for End-Stage Liver Disease (MELD) or Child-Pugh score. Two groups of genes were identified according to the pattern of expression along the ALD progression: a first group of genes showing an increase along disease progression but with similar expression level between liver tissue from patients with cirrhosis and those with AH (Supporting Table S3); and a second group of genes showing a steady increase in gene expression along ALD progression and differentially expressed between cirrhotic and AH liver tissue (Supporting Table S4). This last group of genes contains LPC markers such as *KRT23* and tumor-associated calcium signal transducer 2 (*TACSTD2*) as well as CXC family members such as *CXCL5*, *CXCL6*, and *CXCL8* (Fig. 2A; Supporting Table S4), indicating the association of LPC markers and inflammatory mediators

with advanced ALD and particularly AH. To confirm this association, whole-tissue transcriptome analysis was evaluated, revealing a strong correlation of LPC markers with proinflammatory CXC and CCL family

members (Fig. 2B). Whereas markers expressed in ductular reaction cells such as *KRT7*, *KRT19*, *SRY* (sex determining region Y)-box 9 (*SOX9*), *HNF1B*, *SPP1*, *CFTR*, and *SCTR* showed a strong correlation

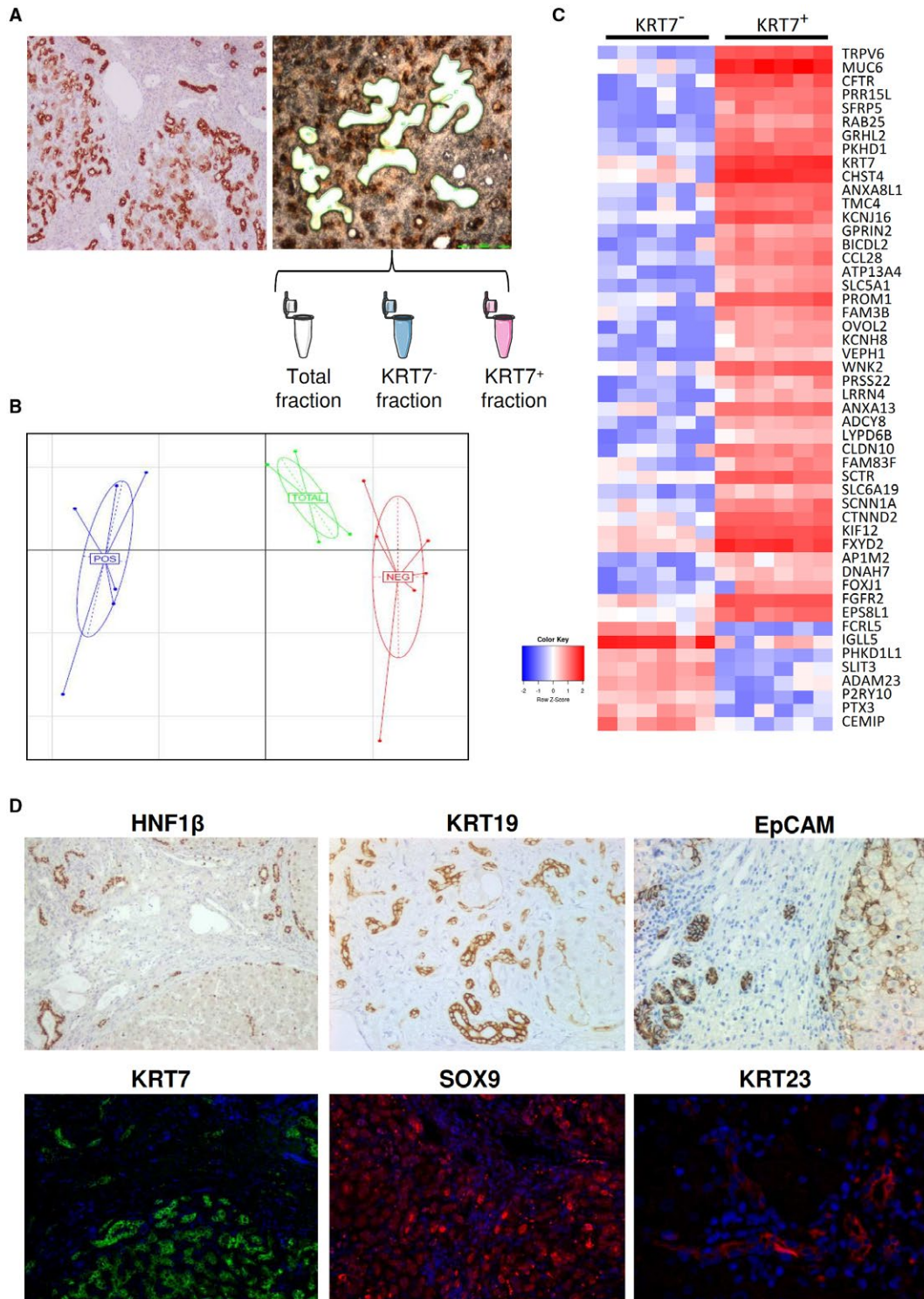


FIG. 1. Gene expression profile of ductular reaction in AH. (A) KRT7 staining with and without counterstaining of paraffin-embedded liver sections of patients with AH. Scheme of populations selected by laser capture microdissection: KRT7-positive (n = 6), -negative (n = 6), and total (n = 4) areas. (B) Principal component analysis showing the three different fractions that underwent RNA sequencing. Each sample is placed in the two-dimensional space according to its RNA expression. The KRT7-positive fraction (POS) is represented in blue, the KRT7-negative fraction (NEG) in red, and the total fraction in green. (C) Heat map of the top 50 differentially expressed genes in KRT7-positive fraction compared with the negative fraction. The red color indicates an enrichment of gene expression, whereas the blue color shows decreased gene expression. (D) Immunohistochemistry of liver progenitor cell markers HNF1 β , KRT19, EpCAM, KRT7, SOX9, and KRT23 in hepatic sections of patients with AH. Abbreviation: HNF1 β , hepatocyte nuclear factor 1 β .

TABLE 2. Functional Analysis of Up-Regulated Genes in Microdissected KRT7⁺ Fraction

GO Pathway	P Value	IPA Pathway	P Value
Cell adhesion	4.2E-14	Agranulocyte adhesion and diapedesis	3.34E-03
Inflammatory response	6.8E-10	Granulocyte adhesion and diapedesis	3.39E-03
Wnt signaling pathway	9.0E-07	Ephrin a signaling	9.50E-03
NIK/NF-kappaB signaling	1.3E-06	Leukocyte extravasation signaling	2.10E-02
Cell-cell signaling	4.0E-06	ErbB signaling	4.30E-02
Leukocyte migration	4.2E-06	Tight junction signaling	5.01E-02
Neutrophil chemotaxis	6.4E-06		
Cell-matrix adhesion	8.8E-06		
Chemokine-mediated Signaling pathway	1.1E-05		
Cell chemotaxis	1.3E-05		
Response to hypoxia	3.6E-05		

Abbreviations: ErbB, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog; GO, gene ontologies; IPA, ingenuity pathway analysis.

with proinflammatory chemokines, cholangiocyte transporters (*SLC10A2*, *SLC4A2*, *SLC9A1*, *SLC2A1*, *SLC51A*, *SLC8A1*, *SLC5A1*, *ABCB4*, *ATP2B1*, *KCNN2*, *KCNN4*) showed lower correlation with inflammatory chemokines (Supporting Fig. S2A), suggesting that LPC may be an important source of inflammatory mediators.

Correlation of proinflammatory chemokines with LPC markers was confirmed by real-time PCR in AH liver tissue samples. Gene expression analysis of whole liver samples from patients with AH showed that *KRT7* expression positively correlated with *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, and *CXCL8* (Fig. 3A). Altogether, these results indicate that the presence of DR is strongly associated with the expression of proinflammatory chemokines in the liver.

In order to evaluate if the proinflammatory profile of DR cells may have an effect systemically in AH, we evaluated plasma levels of TROP2 (encoded

by TACSTD2 [tumor-associated calcium signal transducer 2]), a well-known marker of LPCs, and *CXCL5*, a chemokine associated with poor prognosis in patients with AH⁽³¹⁾ and highly expressed in KRT7⁺ cells. As shown in Fig. 3B, TROP2 serum levels were increased in patients with AH compared with healthy controls. Furthermore, TROP2 levels correlated with *CXCL5* serum levels (Fig. 3C). Moreover, liver expression of *CXCL5* and TROP2 in DR cells was confirmed by immunohistochemistry in liver tissue from patients with AH (Fig. 3D). These results suggest that besides the potential intrahepatic effect, proinflammatory mediators expressed by DR cells may also affect systemic inflammation.

LIVER ORGANOID FROM PATIENTS WITH CIRRHOSIS MIMIC DUCTULAR REACTION AND HAVE A PROINFLAMMATORY PROFILE

In order to study the DR *in vitro*, we explored if liver organoids mimicked DR and if they could therefore be used as a model to study DR.

In biliary diseases, reactive cholangiocytes⁽¹²⁾ are known to show a proinflammatory profile. In order to determine if LPCs with a more immature phenotype also express inflammatory mediators, liver organoids were generated from human cirrhotic liver tissues. As shown in Fig. 4A, human liver organoids expressed KRT7 and EpCAM as assessed by immunofluorescence. Interestingly, transcriptomic analysis of liver organoids showed a high enrichment in genes expressed by the DR as assessed by gene set enrichment analysis, thus indicating a high similarity between organoids and DR (Fig. 4B). These results suggest that liver organoids could be used as a model to mimic DR. Of note, as observed in DR cells, transcriptome analysis of liver organoids showed

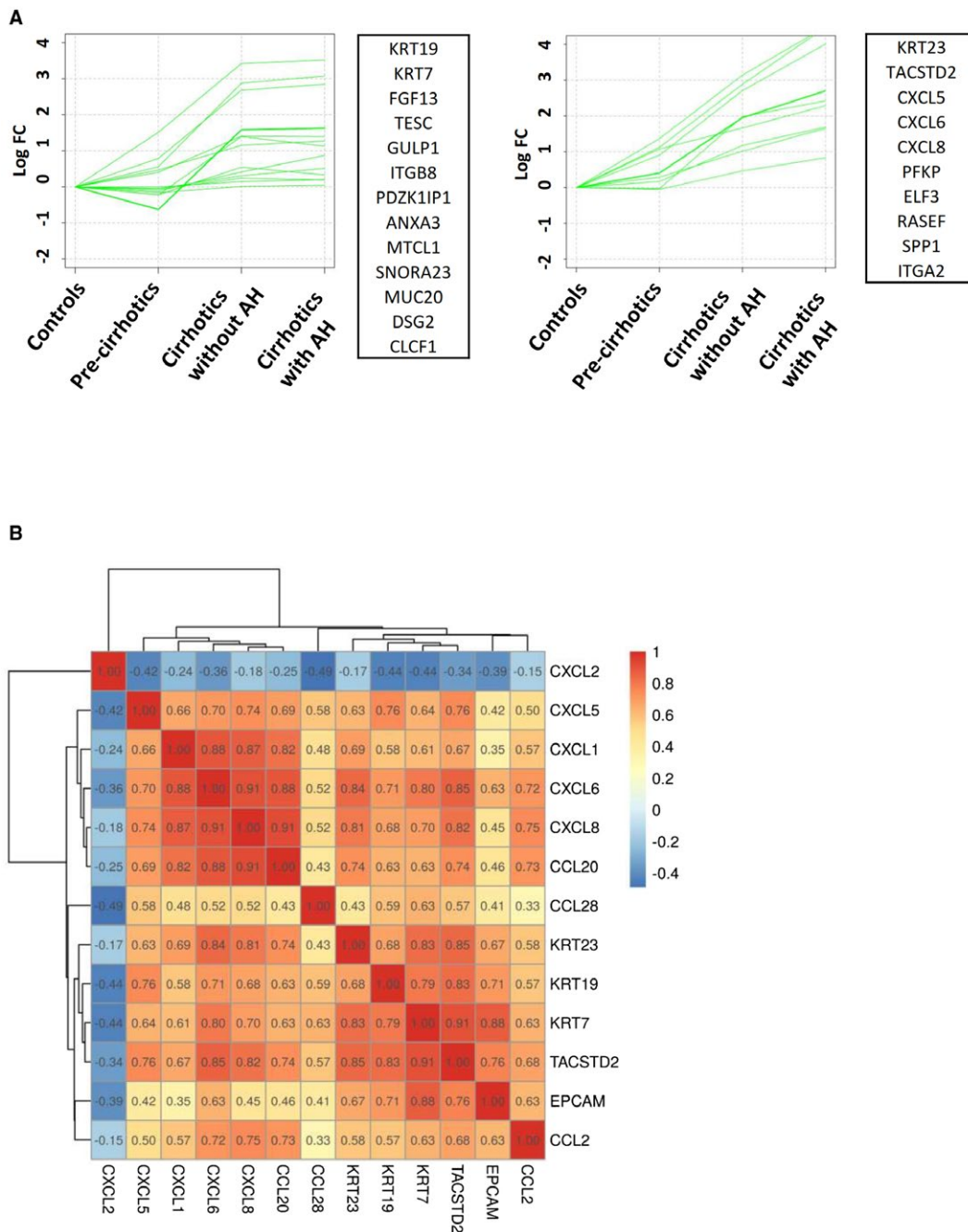


FIG. 2. Expression of DR genes in ALD progression. (A) Expression of DR genes that positively correlate with MELD and Child-Pugh score along ALD progression (data set containing healthy controls [n = 6], patients with precirrhosis [n = 4], and patients with cirrhosis without AH [n = 7] and with AH [n = 11]). Two differentiated group of genes are represented according to the pattern of expression along ALD progression. (B) Correlation between expression of LPC markers and proinflammatory mediators in the ALD data set. Correlations are shown as a heat map. Patient cohort characteristics are shown in Supporting Table S1. Abbreviation: FC, fold change.

expression of CXC and CCL chemokines (Fig. 4C). As shown in Table 3, functional analysis performed by IPA and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

showed that genes up-regulated in organoids compared with whole liver tissue from healthy patients were also involved in inflammation pathways such as

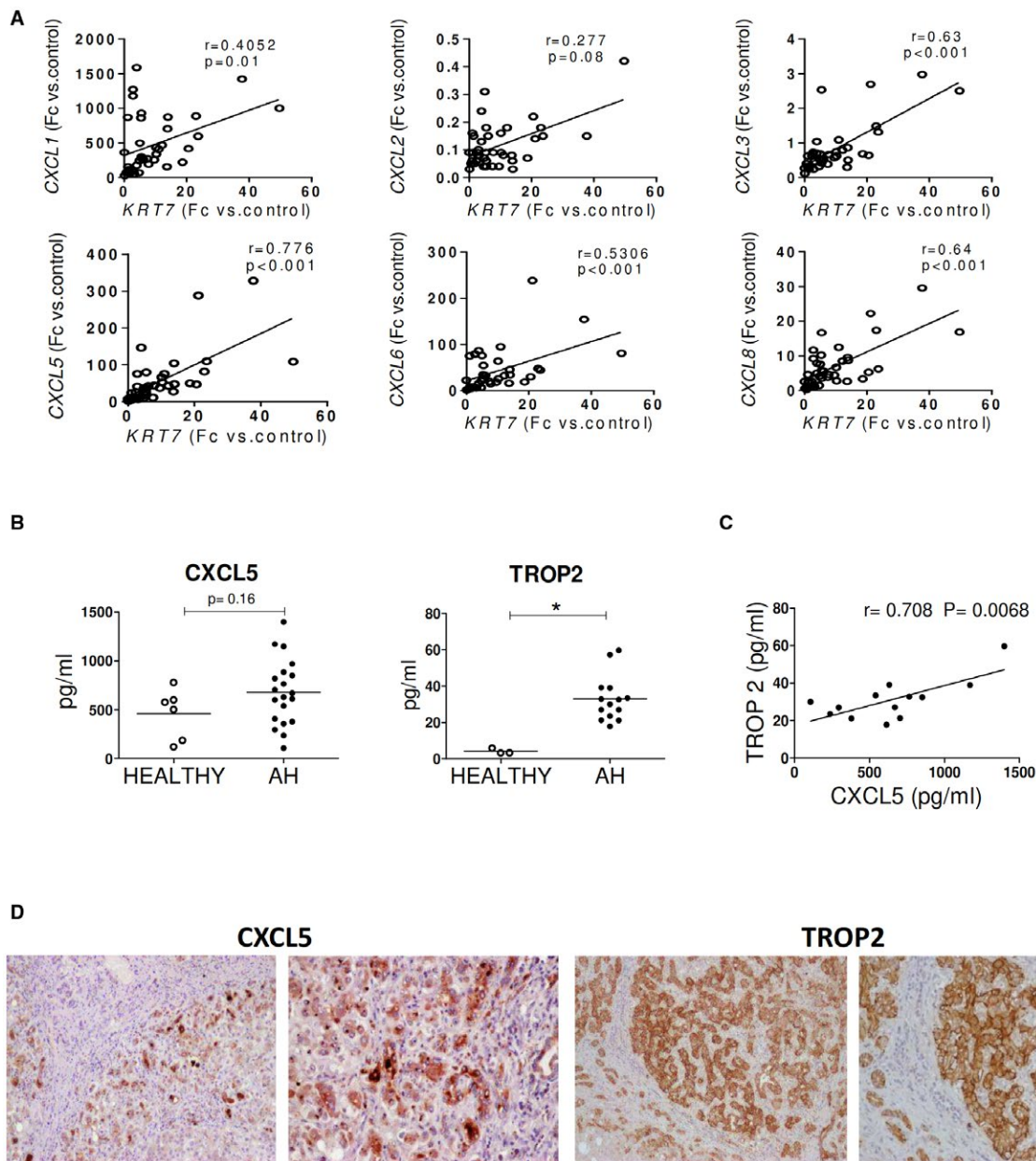


FIG. 3. Correlation of ductular reaction with inflammatory mediators in patients with AH. (A) Correlation of real-time quantitative PCR gene expression (Fc vs. healthy individuals) of *KRT7* with inflammatory cytokines (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, and *CXCL8*) in patients with AH ($n = 40$). The regression coefficient (r) and P value of each correlation are indicated. (B) Serum levels (pg/mL) of *CXCL5* and *TROP2* in patients with AH ($n = 20$ and $n = 14$, respectively) compared with healthy individuals ($n = 6$ and $n = 3$, respectively); $*$, $P < 0.05$ compared with healthy individuals. (C) Correlation of *CXCL5* and *TROP2* serum levels (pg/mL) in patients with AH ($n = 14$). r value and P value is indicated. (D) Representative immunohistochemistry of *CXCL5* and *TROP2* in liver sections of patients with AH. Abbreviation: Fc, fold change.

“agranulocyte adhesion,” “granulocyte adhesion and diapedesis,” “chemokine signaling,” or “TNF signaling pathway” but also in other relevant pathways such as “ErbB signaling pathway,” “Wnt/ β -catenin signaling,”

or “extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling.”

Real-time quantitative PCR analysis confirmed the expression of *KRT7*, *SOX9*, *EpCAM*, and *KRT19*

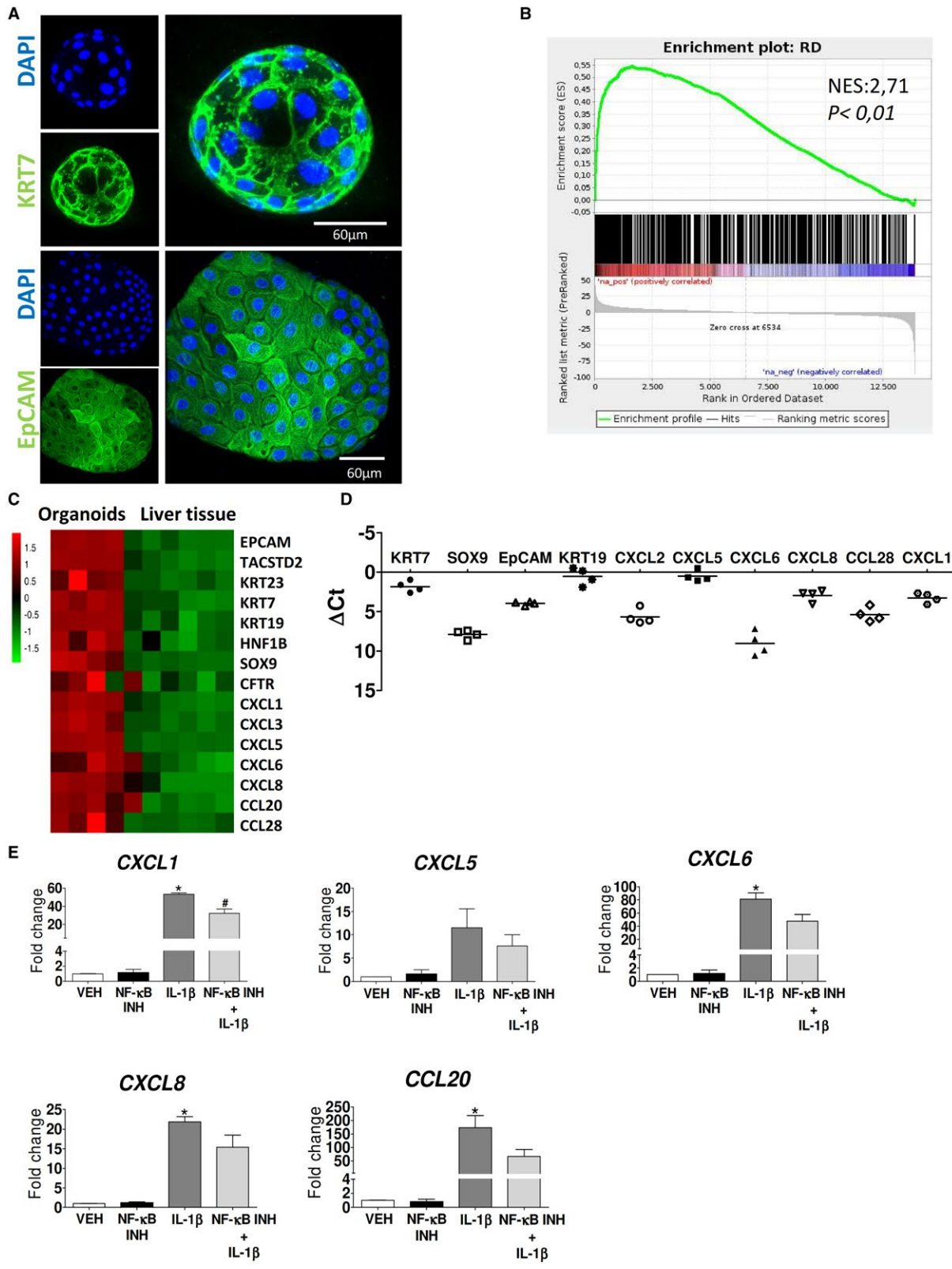


FIG. 4. Transcriptomic and functional analysis of liver organoids from patients with cirrhosis. (A) Immunofluorescence of LPC markers, EpCAM and KRT7, in liver organoids. (B) Gene set enrichment analysis between liver organoid transcriptome and genes expressed in KRT7⁺ microdissected fraction. The gene expression profile of human organoids (n = 4) versus liver tissue from healthy patients (n = 4) was used as a data set. NES and significance is shown. (C) Heat map illustrating gene expression of LPC markers and inflammatory cytokines in liver organoids compared with liver tissue from healthy patients. (D) Real-time PCR gene expression of LPC markers (*KRT7*, *KRT19*, *EpCAM*, and *SOX9*) and inflammatory mediators (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL8*, and *CCL28*) in human organoids. mRNA levels are shown as Δ Ct values compared with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Ct values (n = 4). (E) Expression of inflammatory cytokines in organoids after IL-1 β stimulation and NF- κ B inhibition. Organoids were incubated with VEH or NF- κ B INH and stimulated with IL-1 β for 6 hours. Organoid gene expression of *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL6*, and *CXCL8* is shown as fold change versus VEH. n = 3; *, P < 0.05 compared with VEH; #, P < 0.05 compared with IL-1 β . Abbreviations: NES, normalized enrichment score; NF- κ B INH, NF- κ B inhibitor; VEH, vehicle.

TABLE 3. Functional Analysis of Up-Regulated Genes in Cirrhotic Organoids Transcriptome

KEGG	P Value	IPA Pathways	P Value
Hippo signaling pathway	2.16E-06	Wnt/ β -catenin signaling	7.76E-05
Tight junction	5.18E-06	ERK/MAPK signaling	8.51E-05
Apoptosis	1.56E-05	PI3K/AKT signaling	1.29E-04
TNF signaling pathway	7.98E-04	IL-8 signaling	1.51E-04
Leukocyte transendothelial migration	2.66E-3	Chemokine signaling	1.70E-04
ErbB signaling pathway	9.92E-3	Granulocyte adhesion and diapedesis	3.33E-2
Wnt signaling pathway	1.33E-2	NF- κ B activation by viruses	3.55E-2
TGF-beta signaling pathway	4.71E-2		

Abbreviations: ErbB, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; TGF, transforming growth factor.

LPC markers as well as the proinflammatory mediators *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL8*, and *CCL28* in liver organoids (Fig. 4D). Moreover, liver organoids produced CXCL5 (11.5 \pm 5.6 ng/mL), as detected in the culture supernatant when cultured for 24 hours.

In order to evaluate if organoids show cholangiocyte features, key markers and transporters were evaluated. As shown in Supporting Table S5 and Supporting Fig. S2B, most cholangiocyte transporters were not expressed in organoids. Moreover, although organoids express ABCB1 (multidrug resistance protein 1 [MDR1]) and were able to secrete rodamine 123 (Supporting Fig. S2C) into the lumen, secretion was not blocked by incubation with verapamil, an inhibitor of MDR1 transporter, suggesting that rodamine secretion was not MDR1 dependent. These results are in agreement with previous studies

suggesting the immature/stem phenotype of cultured organoids.⁽²¹⁾

Next, to evaluate if inflammatory response may drive the expression of inflammatory mediators in LPCs, organoids were treated with IL-1 β , TNF- α , and LPS. Whereas stimulation of liver organoids with IL-1 β and TNF- α increased the expression of *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL6*, and *CXCL8* as assessed by real-time quantitative PCR (Fig. 4E; Supporting Fig. S3), LPS treatment did not induce any effect on proinflammatory gene expression (Supporting Fig. S3). As shown by GO analysis, NF- κ B pathway was enriched in DR genes (Table 2); nevertheless, blocking of the NF- κ B canonical pathway with NF- κ B inhibitor did not show any effect on the basal proinflammatory profile of organoids. On the contrary, treatment with NF- κ B inhibitor reduced the expression of *CXCL1* induced by IL-1 β and showed a nonsignificant reduction of *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL8*, and *CCL20* expression (Fig. 4E). Altogether, these results indicate that liver organoids may be a good tool to study DR, and suggest that LPCs present a proinflammatory profile in injured livers.

DUCTULAR REACTION CELLS RECRUIT NEUTROPHILS AT THE PERIORTAL AREA

CXCL1, CXCL3, and CXCL5 are strong chemoattractants of neutrophils, the main inflammatory cell type in AH; thus, we next investigated if DR and LPCs recruit neutrophils to the periportal area. Indeed, double staining of KRT7 and MPO showed that neutrophils locate close to the DR (Fig. 5A), suggesting a potential cross-talk between the two cell types. In order to evaluate if macrophages may be also recruited to DR, we performed double immunofluorescence of EpCAM and CD68. Liver macrophages

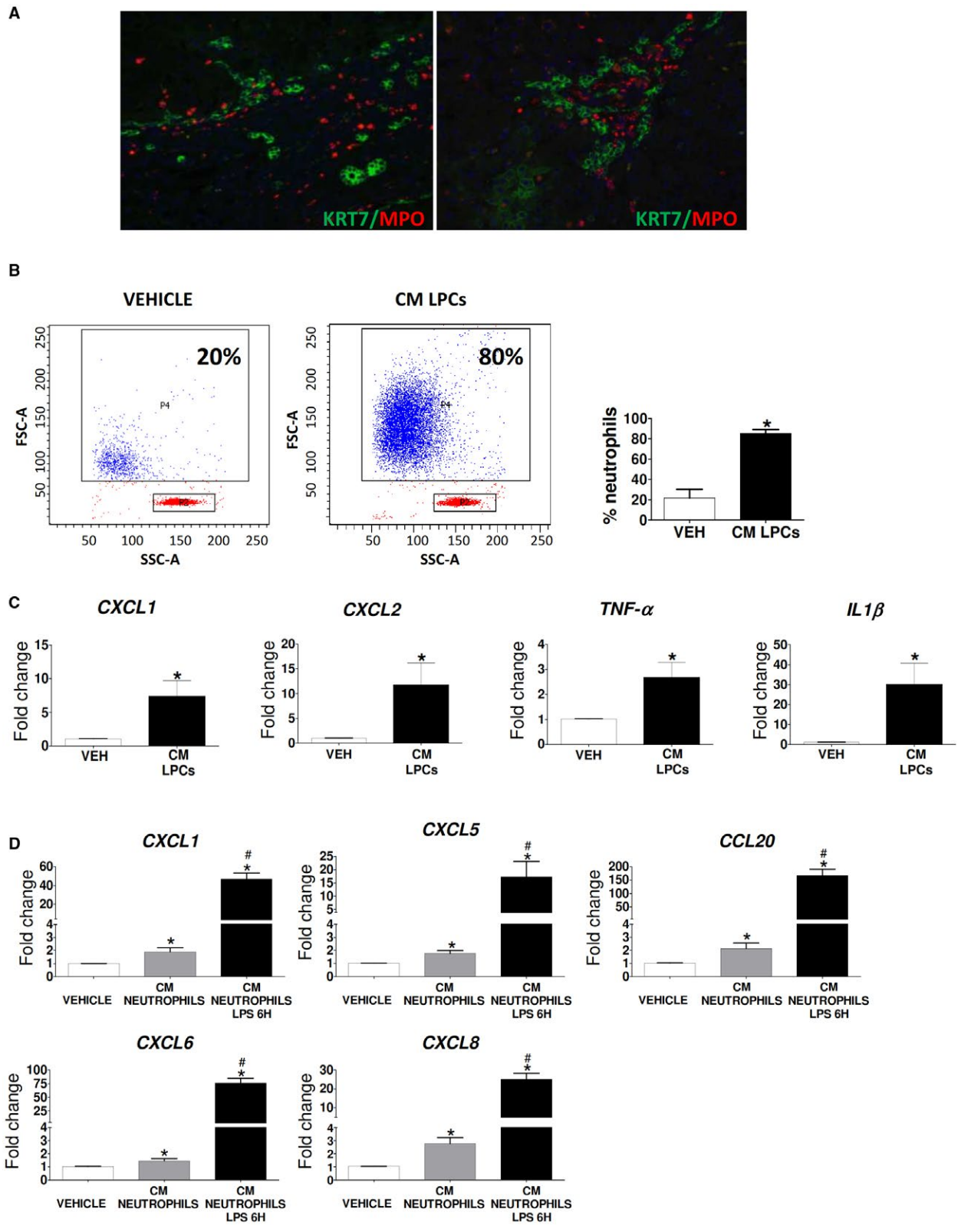


FIG. 5. DR recruits neutrophils. (A) Representative double staining of KRT7 (green) and MPO (red) in alcohol-induced cirrhotic liver sections from 2 different patients. (B) Neutrophil migration assay in response to CM LPCs. Conditioned medium from three different organoid lines was used in three independent neutrophil isolations. (C) Neutrophil response to organoid-conditioned medium. Freshly isolated human neutrophils were incubated with CM LPCs from 3 different patients with cirrhosis for 18 hours. Gene expression is shown as fold change versus VEH after incubation with CM LPCs. $n = 3$; *, $P < 0.05$ compared with VEH. (D) Organoid response to neutrophil-conditioned medium. Conditioned media from neutrophils stimulated with vehicle or LPS for 6 hours was used for organoid stimulation. Results are shown as fold change versus VEH after incubation with CM of neutrophils. $n = 5$; *, $P < 0.05$ compared with VEH. #, $P < 0.05$ compared with CM. Abbreviations: CM LPCs, liver progenitor cells organoid conditioned medium; VEH, vehicle.

were distributed uniformly throughout the tissue and not close to the DR (Supporting Fig. S4).

In order to determine if LPCs could promote neutrophil recruitment, we analyzed *in vitro* the effect of liver organoids on neutrophils. Conditioned medium from liver organoids induced an increase of neutrophils migration as compared with the induction with basal medium (Fig. 5B). Moreover, a change in the shape of neutrophils was observed as it is shown in the forward versus side scatter plot (Fig. 5B). In order to analyze if the cross-talk between LPCs and neutrophils induced a proinflammatory profile, conditioned medium from both populations was used. Neutrophils cultured for 18 hours with organoid-conditioned medium increased the expression of *CXCL1*, *CXCL2*, *TNF- α* , and *IL-1 β* (Fig. 5C). On the other hand, neutrophil-conditioned medium increased the expression of *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL8*, and *CCL20* in liver organoids when compared with vehicle-treated organoids (Fig. 5D). Interestingly, when neutrophils were stimulated for 6 hours with LPS, conditioned medium from LPS-stimulated neutrophils further increased the expression of inflammatory mediators in organoids (Fig. 5D). Given that no direct effect of LPS on organoids was observed (Supporting Fig. S3), mediators secreted by neutrophils may be enhancing the inflammatory profile in organoids. These results suggest the potential cross-talk between DR cells and neutrophils, which may result in neutrophil migration at the site of DR and an enhanced inflammatory response.

Discussion

In this study, we describe the transcriptome profile of DR and identify genes and pathways associated with ALD progression. Moreover, we show that DR cells as well as LPCs have a proinflammatory profile with expression of CXC and CCL chemokines and

are associated with neutrophil infiltration. In addition, we show that liver organoids mimic liver DR, thus being a good *in vitro* model to study DR cells, and promote neutrophil migration and inflammation. Overall, this study provides an understanding of the main pathways involved in DR expansion and suggests that it may play a role in ALD by promoting intrahepatic inflammation.

Several studies have shown the important expansion of DR cells in AH as well as the association of LPC markers with disease.^(2,10,11) However, the contribution of DR to tissue repair or its potential pathophysiologic role in AH has not been specifically investigated. Up to now, human studies have relied almost exclusively on histological assessment to understand the role of DR in chronic liver diseases.^(2,30) One of the main limitations of DR characterization has been the limited availability of liver tissue from patients with AH. To overcome this limitation, we performed microdissection in the unique set of samples from Lille University of patients undergoing early liver transplantation for AH^(10,34) within the context of the clinical trials QuickTrans (NCT01756794) and TargetOH (CPP 14/67). Here we describe a whole transcriptome of DR cells, which may allow the discovery of pathways involved in LPC expansion and differentiation. Our results are in accordance with previous reports exploring the gene expression profile of DR cells in human diseases in which Notch and Wnt pathways were also described.⁽³⁰⁾ Nevertheless, our study identifies the involvement of pathways such as “ephrin A signaling,” “erb B signaling,” or “leukocyte recruitment,” and pathways such as “NF-kappaB signaling” or “response to hypoxia pathway,” previously described in ductular reaction from other liver diseases.^(35,36) These pathways may deserve further analysis to evaluate their suitability as targets to enhance the contribution of LPCs to liver tissue repair. Interestingly, key genes expressed in DR correlated with MELD and Child-Pugh. Because of the

limited number of patients included in this analysis, results should be confirmed in a bigger cohort of patients to better assess the correlation of DR with disease progression.

Hepatic expression of CXC chemokines has been shown to predict portal hypertension and survival in patients with AH.⁽³¹⁾ The present study suggests that an important source of CXC and CCL chemokines may be the DR and LPCs, which is in agreement with other reports showing that biliary epithelial cells express and secrete chemokines such as IL-6, IL-8, and CCL28.^(13,37,38) The finding that DR and LPCs have a proinflammatory profile opens important questions regarding its actual contribution to tissue repair and to intrahepatic inflammatory response in liver diseases and in particular in AH. Previous studies have shown the association of inflammatory cells with DR in chronic liver diseases.^(6,15) In this study, we show that although DR express a number of cytokines involved in neutrophil as well as macrophage recruitment, only neutrophils were localized at the periductular region. Our results show that DR may be an important player in the intrahepatic inflammatory response in AH, producing cytokines that might participate in the inflammatory cell recruitment to the liver. The results obtained in the context of AH are in agreement with other reports describing the expression of profibrogenic and proinflammatory mediators by ductular reaction cells in other liver diseases.^(12,13,15,38) Moreover, the fact that CXCL5, one of the main inflammatory mediators expressed by DR cells, can be detected in serum and correlates with DR expansion suggests that inflammatory mediators expressed in the DR may have both a paracrine and potentially a systemic effect.

The contribution of LPCs to liver regeneration is a controversial topic and is still only partially understood in human diseases. In this regard, the impact of the inflammatory profile of LPCs in their regenerative potential is not known, and whether targeting the inflammatory profile of LPCs might enhance their contribution to liver regeneration deserves further investigation.

AH is characterized by neutrophil infiltration in necrotic inflammatory foci in the liver parenchyma, which correlates with good prognosis in AH.⁽³⁾ Nonetheless, no studies have clearly investigated zonal recruitment of neutrophils and the association of neutrophils with the DR.⁽³⁹⁾ It is important

to note that mechanisms driving neutrophil recruitment may be diverse, and those mediating parenchymal recruitment (mainly hepatocyte necrosis) may be different from those promoting recruitment to the periportal area that may be mediated by chemokine production, among other factors. Although we show neutrophil recruitment to the DR area, interaction between LPC and neutrophils is not formally proved, and the tissue context, the microenvironment, and other cell types might also be important in regulating neutrophil recruitment. Although it is well known that neutrophils play an important role in sterile and nonsterile acute liver injury, their role in liver tissue repair in chronic diseases is not well understood.^(40,41) Moreover, neutrophil function has been reported to be impaired in acute-on-chronic liver failure, thus suggesting that both recruitment and function of neutrophils may be altered in the context of AH.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ Whether the recruitment of neutrophils to the DR plays a deleterious role in the progression of the diseases or helps to orchestrate inflammatory response as a result of an acute-on-chronic injury is unknown.

There are no good markers to specifically identify facultative LPCs within the DR in the human liver. Therefore, liver organoids were generated in order to evaluate the transcriptome and the inflammatory profile of LPCs. Tissue organoids generated from stem/progenitor cells have shown great potential as disease models and as a source of cells for regenerative medicine.⁽²¹⁾ Liver organoid growth is dependent on Wnt signaling by Wnt family member 3a and R-spondin, the ligand for LGR5,^(45,46) a receptor present in most adult stem cells. Liver organoid technology has recently been described, and therefore, organoids generated from liver tissue are poorly characterized. Using this technology, we provide evidence that the gene expression profile of liver organoids from cirrhotic livers closely resembles DR from patients, showing a high gene expression profile overlap and a proinflammatory profile. Moreover, organoids respond to inflammatory mediators, enhancing chemokine expression. Therefore, these results suggest that liver organoids may be a good *in vitro* model to study DR in chronic liver diseases.

In conclusion, AH is characterized by impaired liver function, reduced regenerative potential, and important local and systemic inflammatory response. Several studies have suggested a role for LPCs as potential cellular targets to promote liver regeneration in chronic

liver diseases. The present study suggests that DR and LPCs may also play a role in liver inflammation, and therefore, targeting DR may represent a strategy to modulate intrahepatic inflammatory response.

Acknowledgment: This work was partially performed in Centre Esther Koplowitz. We thank Cristina Millán for the excellent technical support, Pepa Ros for her excellent laboratory management support, and Ellen Delariviere for her work. We are indebted to the Genomics Unit and the Biobank Unit of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their technical help. We thank the Advanced Optical Microscopy Unit from the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona for their support regarding confocal technique.

REFERENCES

- Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011;141:1572-1585.
- 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.
- Altamirano J, Miquel R, Katoonizadeh A, Abraldes JG, Duarte-Rojo A, Louvet A, et al. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2014;146:1231-1239.e1-6.
- Yang S, Koteish A, Lin H, Huang J, Roskams T, Dawson V, et al. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *HEPATOLOGY* 2004;39:403-411.
- Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 2007;133:80-90.
- Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *HEPATOLOGY* 2014;59:1393-1405.
- Carpino G, Cardinale V, Folseraas T, Overi D, Floreani A, Franchitto A, et al. Hepatic stem/progenitor cell activation differs between primary sclerosing and primary biliary cholangitis. *Am J Pathol* 2018;188:627-639.
- Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: Roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *HEPATOLOGY* 2005;41:809-818.
- Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. *Histopathology* 2006;48:546-555.
- Dubuquoy L, Louvet A, Lassailly G, Truant S, Boleslawski E, Artru F, et al. Progenitor cell expansion and impaired hepatocyte regeneration in explanted livers from alcoholic hepatitis. *Gut* 2015;64:1949-1960.
- Lanthier N, Rubbia-Brandt L, Lin-Marq N, Clement S, Frossard JL, Goossens N, et al. Hepatic cell proliferation plays a pivotal role in the prognosis of alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2015;63:609-621.
- Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E, Marzioni M, Francis H, et al. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology* 2007;132:415-431.
- Isse K, Harada K, Nakanuma Y. IL-8 expression by biliary epithelial cells is associated with neutrophilic infiltration and reactive bile ductules. *Liver Int* 2007;27:672-680.
- Theise ND, Kuwahara R. The tissue biology of ductular reactions in human chronic liver disease. *Gastroenterology* 2007;133:350-352.
- Carpino G, Renzi A, Onori P, Gaudio E. Role of hepatic progenitor cells in nonalcoholic fatty liver disease development: cellular cross-talks and molecular networks. *Int J Mol Sci* 2013;14:20112-20130.
- 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.
- Nobili V, Carpino G, Alisi A, Franchitto A, Alpini G, De Vito R, et al. Hepatic progenitor cells activation, fibrosis, and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *HEPATOLOGY* 2012;56:2142-2153.
- Prakoso E, Tirnitz-Parker JE, Clouston AD, Kayali Z, Lee A, Gan EK, et al. Analysis of the intrahepatic ductular reaction and progenitor cell responses in hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2014;20:1508-1519.
- Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology* 2014;146:349-356.
- Tirnitz-Parker JEE, Olynyk JK, Ramm GA. Role of TWEAK in coregulating liver progenitor cell and fibrogenic responses. *HEPATOLOGY* 2014;59:1198-1201.
- 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.
- Rodrigo-Torres D, Affò S, Coll M, Morales-Ibanez O, Millán C, Blaya D, et al. The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *HEPATOLOGY* 2014;60:1367-1377.
- Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ, et al. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014;15:605-618.
- Yanger K, Zong Y, Maggs LR, Shapira SN, Maddipati R, Aiello NM, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev* 2013;27:719-724.
- Tarlow BD, Finegold MJ, Grompe M. Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *HEPATOLOGY* 2014;60:278-289.
- Malato Y, Naqvi S, Schürmann N, Ng R, Wang B, Zape J, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 2011;121:4850-4860.
- Deng X, Zhang X, Li W, Feng RX, Li L, Yi GR, et al. Chronic liver injury induces conversion of biliary epithelial cells into hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2018;23:114-122.e3.
- Raven A, Lu WY, Man TY, Ferreira-Gonzalez S, O'Duibhir E, Dwyer BJ, et al. Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature* 2017;547:350-354.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, et al. Macrophage derived Wnt signalling opposes Notch signalling in a Numb mediated manner to specify HPC fate in chronic liver disease in human and mouse. *Nat Med* 2012;18:572-579.
- Spee B, Carpino G, Schotanus BA, Katoonizadeh A, Vander Borgh S, Gaudio E, et al. Characterisation of the liver progenitor

- cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* 2010;59:247-257.
- 31) Dominguez M, Miquel R, Colmenero J, Moreno M, García-Pagán J, Bosch J, et al. Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2009;136:1639-1650.
 - 32) **Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ**, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc* 2016;11:1724-1743.
 - 33) **Huch M, Gehart H, van Boxtel R**, Hamer K, Blokzijl F, Verstegen MM, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 2015;160:299-312.
 - 34) Mathurin P, Moreno C, Samuel D, Dumortier J, Salleron J, Durand F, et al. Early liver transplantation for severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2011;365:1790-1800.
 - 35) Kim KH, Chen CC, Alpini G, Lau LF. CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin $\alpha\beta 5$ -mediated activation of NF- κ B. *J Clin Invest* 2015;125:1886-1900.
 - 36) Spirli C, Villani A, Mariotti V, Fabris L, Fiorotto R, Strazzabosco M. Posttranslational regulation of polycystin-2 protein expression as a novel mechanism of cholangiocyte reaction and repair from biliary damage. *HEPATOLOGY* 2015;62:1828-1839.
 - 37) Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, Shimoda S, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF- κ B and -MAPK signaling pathways. *Liver Int* 2006;26:467-476.
 - 38) Eksteen B, Miles A, Curbishley SM, Tselepis C, Grant AJ, Walker LS, et al. Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR38. *J Immunol* 2006;177:593-603.
 - 39) Fickert P, Stöger U, Fuchsichler A, Moustafa T, Marschall HU, Weiglein AH, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2007;171:525-536.
 - 40) Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;13:159-175.
 - 41) McDonald B, Kubes P. Innate immune cell trafficking and function during sterile inflammation of the liver. *Gastroenterology* 2016;151:1087-1095.
 - 42) Rolas L, Boussif A, Weiss E, Lettéron P, Haddad O, El-Benna J, et al. NADPH oxidase depletion in neutrophils from patients with cirrhosis and restoration via toll-like receptor 7/8 activation. *Gut* 2018;67:1505-1516.
 - 43) Boussif A, Rolas L, Weiss E, Bouriche H, Moreau R, Périainin A. Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2016;64:1041-1048.
 - 44) **Tritto G, Bechlis Z**, Stadlbauer V, Davies N, Francés R, Shah N, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:574-581.
 - 45) de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 2011;476:293-297.
 - 46) **Carmon KS, Gong X**, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/B-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:11452-11457.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30472/supinfo.



Laser capture microdissection: techniques and applications in liver diseases

Beatriz Aguilar-Bravo¹ · Pau Sancho-Bru^{1,2}

Received: 3 July 2018 / Accepted: 28 November 2018 / Published online: 1 January 2019
© Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2019

Abstract

Routine transcriptomic and proteomic analysis are usually performed at a whole organ or tissue level. These approaches provide an average readout of all cell types present within the tissue but do not allow differentiating the profile of specific cell populations. Laser capture microdissection (LCM) constitutes an excellent tool to isolate cell populations or areas of interest within a tissue. By direct visualization, the selected area is excised by a laser and can be further processed for a variety of downstream analyses. This technology has been widely used in the study of liver diseases, from DNA and RNA sequencing to mass spectrometry. However, LCM also has important limitations. To ensure the best integrity of the molecule of interest, optimal tissue preservation, careful tissue sectioning, and optimization of the staining procedure are required. The present review provides a description of the LCM technology, including tips and technical recommendations to perform the procedure, as well as an overview of studies using LCM technology in the field of liver disease.

Keywords Laser capture microdissection · Liver diseases · Tissue preservation · Transcriptome · Proteome · Downstream analysis

Introduction

Molecular profiling of pure cell populations or cells from selected areas of the tissue is essential to better understand healthy and pathogenic conditions [1, 2]. Most of the studies on genomic and proteomic analysis have been performed with whole tissue samples, precluding the analysis of the region or cells of interest. In the last years, several methods have been optimized to isolate pure populations or single cells, including immunofluorescence cell sorting, immunomagnetic cell isolation, affinity column chromatography, among others. Nevertheless, all these methodologies require fresh tissue and previous steps of enzymatic digestion, which may affect gene expression and native protein. To address these drawbacks, LCM (laser capture microdissection) has been developed and is an excellent method for isolating

specific cells in their native niche without contamination of the surrounding areas. This technology can identify and isolate pure cell populations, and structures or tissues of interest from fixed tissue or fixed cell cultures by direct visualization of cells under a microscope [3–5]. This microscope is coupled to a laser that excises the selected area, which is thereafter collected in a tube. The dissected areas are then used for further analysis such as RNA and DNA analysis or proteomic studies.

LCM is applicable to a wide range of research areas. It has been used for molecular profiling of tissue, which compares different cell populations, i.e., tumor and non-tumor cells; genomic and proteomic molecular profiling; single cell mutation analysis; and forensic analysis, among others.

Laser capture microdissection technology

The whole process of LCM involves 3 steps (Fig. 1): (1) sample processing, (2) the microdissection procedure, and (3) DNA, RNA or protein extraction followed by downstream analyses.

✉ Pau Sancho-Bru
psancho@clinic.cat

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), C/Rosselló, 149-153, Third Floor, 08036 Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain

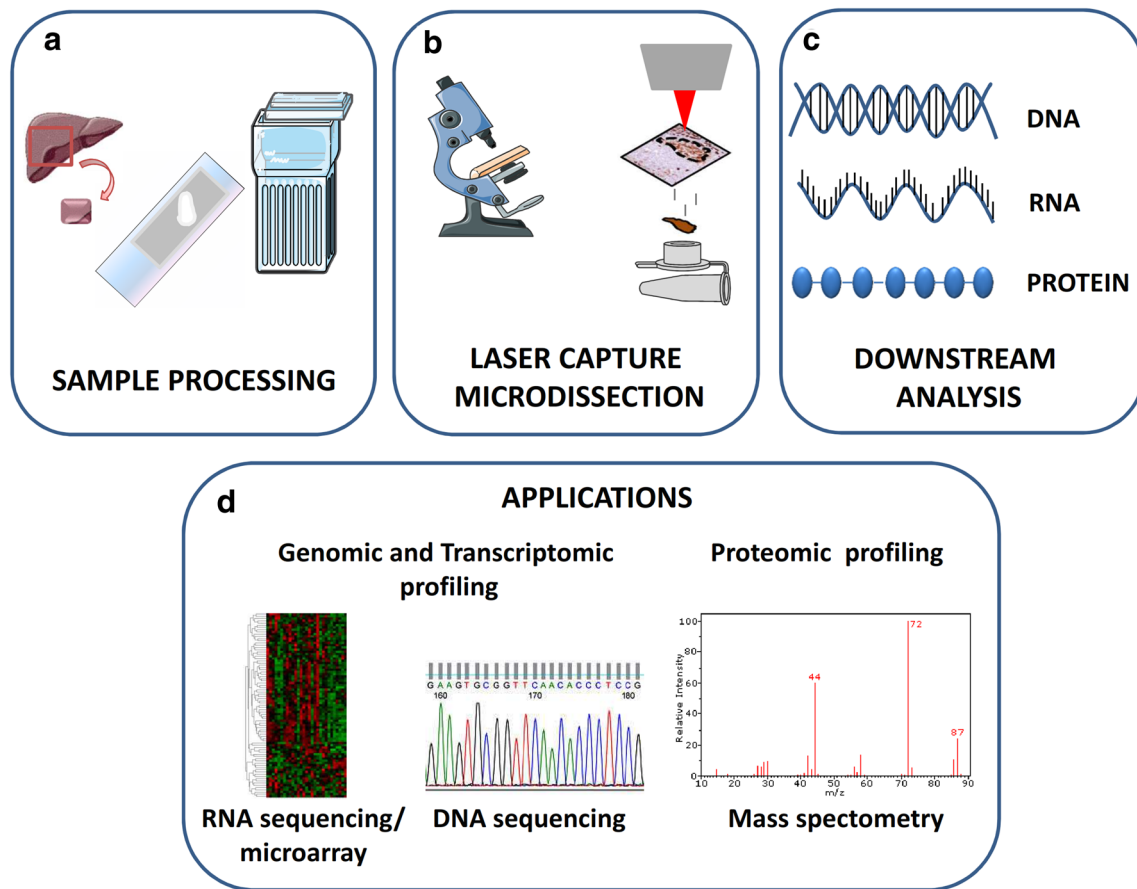


Fig. 1 Laser capture microdissection procedure (LCM). **a** Sample processing; fresh tissue is preserved, sectioned and stained prior to LCM. **b** LCM; selected area is visualized under microscope, excised by laser and collected in the tube's cap. **c** Downstream analysis;

DNA, RNA or protein is extracted from the area selected and used for further analysis. **d** Applications; genomic, transcriptomic and proteomic profiling

Sample processing

Prior to performing LCM, sample processing is a critical step to obtain a good yield and quality of DNA, RNA or protein. The main factors that can affect the integrity of the molecules, and therefore, the downstream analysis are the quality of the sample, tissue preservation methods and sample sectioning and staining. For technical recommendations on the LCM procedure see Table 1.

Tissue preservation

Tissue fixation is the most critical step, and it is determined by the duration of the process, the temperature, and the size of the tissue. Indeed, the longer the fixative takes to penetrate the tissue, the greater the chance of RNA or protein degradation due to ubiquitous RNases and proteases. Formalin has been widely used for tissue fixation due to the good morphological preservation obtained. However, the integrity of the molecules can be affected

by cross-linking reactions of nucleic acids and proteins. Disruption and denaturation of the cross-links may lead to the recovery of peptides and protein fragments instead of intact proteins. For this reason, frozen or ethanol-fixed tissue offers an alternative to formalin, as they allow obtaining a better yield and integrity of RNA and protein [6]. When performing metabolomics studies, fixation is not recommended as many of the small molecules and metabolites in the chemicals used for fixation are soluble, and they can be delocalized or lost during the procedure [7].

Sample sectioning

When cutting the tissue sample with the microtome [formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples] or cryostat (frozen samples), it is important to carefully design the handling procedure, thickness of the slide, and storage of the sample before LCM, according to the molecular analysis to be performed.

Table 1 Technical recommendations on LCM procedure

	Recommended procedures	Avoiding procedures
Sample processing: tissue preservation, sectioning and staining	<p>Frozen samples allow obtaining better integrity of DNA, RNA and protein</p> <p>FFPE samples provide a good morphological preservation but the integrity of the molecules can be affected by the cross-linking reactions</p> <p>When performing tissue sections, all the surfaces and instruments should be cleaned with specific reagents to remove DNases and RNases. Bath water should be autoclaved</p> <p>Fresh solutions should be prepared for staining protocol. Use DEPC-treated water and nuclease-free reagents. RNase and protease inhibitors can be added to staining reagents</p> <p>If glass recipients are used for staining, they should be baked at 180 °C</p> <p>Complete deparaffinization is essential for DNA and RNA extraction. Yield can be decreased because of an inadequate removal of paraffin</p> <p>Immunostaining should be optimized for each of the antibodies used to minimize the incubation time. It is recommended to use high-affinity antibodies for minimal amount of time</p>	<p>Avoid long fixation times</p> <p>Avoid formalin based fixation for metabolomic studies</p> <p>Tissue sections should not be thinner than 5 µm; less than 5 µm may not contain the whole cell thickness</p> <p>Avoid heat or enzymatic pre-treatments</p>
LCM Procedure	<p>It is recommended to perform LCM immediately after the staining</p> <p>All surfaces should be cleaned with specific RNase and DNase free reagents</p> <p>When visualization of specific cell populations is not clear, it is recommended to use a consecutive section with standard staining as a guide</p> <p>It is recommended to microdissect as much as possible cells to get a good yield of the molecule of interest</p> <p>When removing the collection tube with the microdissected cells, it is important to do it very carefully because if the cap hits the holder, the samples may be lost</p>	<p>Do not start microdissection until the sample is completely dried, humidity and bubbles difficult microdissection</p> <p>LCM procedure should not exceed 1 h–1.5 h. Longer times would lead to a decrease in the yield of the molecule of interest</p>

Sections for LCM are usually thicker than those of conventional immunohistochemical analysis, thereby providing a better cellular yield. The thickness can vary between 5 and 15 μm ; less than 5 μm may not contain the whole cell thickness, while a section greater than 15 μm can be difficult to cut and process [8]. To improve tissue adherence to the glass slides, slides without tissue should be placed in a hood under UV rays for 45 min. This step is applied to both cryo- and FFPE-sections.

Before tissue sectioning, all the surfaces and instruments should be cleaned with specific reagents to remove RNases and Dnases, and bath water should be autoclaved. Frozen tissue sections can be stored at -80° for 1 month or up to 3 months if the molecule to extract is RNA or protein, respectively [6]. On the other hand, FFPE tissue sections can be stored at room temperature, although these sections should be cut as close in time as possible to performing the LCM procedure to preserve epitopes that degrade rapidly [9].

Sample staining

The incubation times in staining for LCM differ from the standard protocols used for routine immunohistochemistry analysis in that they are shorter to reduce degradation and to achieve better integrity of the molecule of interest.

When performing staining (cryo-tissue and formalin/ethanol fixed tissue), it is very important to use nuclease-free water and that all the reagents should be fresh. Moreover, the glass recipients used to perform the staining should be baked at 180°C . Alternatively, for the processing of a small amount of samples, RNase free sterile 50 ml tubes can be used to perform the staining.

Hematoxylin and eosin constitutes a common staining protocol for LCM. Mayer's hematoxylin can be used without the bluing step, reducing the exposure to water and degradation. There are other staining protocols such as toluidine blue or Nissl that are also suitable for LCM, and they can be performed in one single step, thereby reducing the probability of degradation [9].

Immunohistochemistry and immunofluorescence can also be performed before LCM, although it is important to take into account that the amount and integrity of some biomolecules, especially RNA, can be affected [10]. Box 1 shows a protocol optimized in our laboratory for KRT7 staining in FFPE samples (in press 10.1002/HEP.30472). Immunostaining should be optimized for each of the antibodies used to minimize the incubation time. Moreover, antigen retrieval should be avoided because it is an aggressive process that affects the integrity of the molecules. For this reason, many antibodies may not be useful for microdissection or may require important optimization which may not allow

1. Xilol, 20 s
2. Xilol, 20 s
3. Xilol, 20 s
4. Absolute ethanol, 30 s
5. Absolute ethanol, 30 s
6. 95% ethanol, 30 s
7. 95% ethanol, 30 s
8. 70% ethanol, 30 s
9. 70% ethanol, 30 s
10. Distilled water, 30 s
11. Steril PBS 1x, 30 s
12. Primary antibody (Mouse Keratin-7 anti-human, DAKO M7018; 1:50), 10 min
13. Wash with PBS 1x, 1 min (x3)
14. Secondary antibody (Dako Envision System HRP Mouse, K4007), 15 min
15. Wash with PBS 1x, 1 min
16. Diaminobenzidine working solution (DAKO, K1011), 2 min
17. Cover the slide with DEPC H_2O and leave it dry for 40 min

*All the steps are performed at room temperature

Box 1 Optimized KRT7 staining for FFPE tissue section

retrieval. It is also important to note that complete deparaffinization is essential to obtain good quality of the molecule of interest, especially DNA and RNA, as protein is usually obtained from frozen samples.

The staining protocols can affect the integrity of the molecule of interest, and therefore, it is recommended to perform LCM immediately after staining [11]. However, if this is not possible, once the samples are dried they can be stored at -80°C (based on our experience on FFPE-sections). Fifty ml RNase and DNase free tubes are adequate for storing the samples at -80°C . In this way, several samples can be stained at the same time and stored until the LCM procedure.

Tissue microdissection

Two technologies are commonly used for LCM: infrared (IR) and ultraviolet (UV). The IR system is based on the addition of a thermolabile polymer directly on the tissue section placed on the slide. The IR laser pulse melts the polymer resulting in the generation of a polymer-cell composite that is removed from the tissue. To prevent damage to the dissected area, the polymer has a dye that absorbs laser energy, thereby protecting the sample. The UV microdissection technology places the tissue section on a polyethylene terephthalate (PET) membrane slide. The area of interest is cut by UV laser and captured in the cap of the tube placed under the tissue slide. Unlike the IR system, the UV system damages the cells located in the perimeter of the cut area, which may interfere in the final downstream analysis if the amount of cells affected by the laser is higher ($> 10\%$)

than the whole selected area [6]. Despite this limitation, the UV system offers several advantages over the IR system. Avoiding contamination of the microdissected sample is very important for downstream analysis. In the IR system, the area of interest becomes attached to an adhesive film, which may be a source of contamination [12]. Conversely, in the UV system, the area microdissected is directly collected in the tube's cap. Moreover, the laser beam diameter can be thinner (0.5 μm) than the IR [13]. This feature in the UV system is an advantage for analyzing small samples and single cell isolation. As described previously, the optimal thickness of the tissue for LCM can vary from 5 to 15 μm , however, the UV system is able to cut tissue sections of up to 200 μm thick.

As explained above in the Sample Staining section, samples stored at -80° after staining should be taken out of the freezer to allow slow thawing prior to starting the microdissection procedure. The presence of water bubbles on the slide makes microdissection impossible, and therefore, it is crucial to not open the tube until the tissue is completely thawed and there are no signs of humidity in the slide. Moreover, all the surfaces should be cleaned with specific RNase and DNase free reagents, and the laser should be calibrated to ensure the cut and detachment of the sample.

When performing microdissection, it is important to cut as close as possible to the perimeter of the cells of interest to avoid contamination of other cell types. Once microdissection has been initiated, the procedure should not exceed 1 h and a half, as longer times will affect molecule integrity.

Downstream analysis

After performing the LCM, the microdissected area is placed in a suitable buffer for DNA, RNA or protein extraction. The number of cells or area microdissected should be adjusted according to the amount of RNA, DNA or protein required for the downstream analysis [6]. Currently, there are several extraction kits allowing RNA isolation from small tissue samples from both frozen and FFPE tissues. Based on our experience in microdissection of liver tissue, a minimum area of 1.5 mm^2 from FFPE sections is required for standard RNA sequencing. However, more efficient methodologies for low-input RNA are being developed. Moreover, to obtain enough RNA for further processing, it is also possible to apply amplification protocols.

LCM offers the possibility of performing several downstream analyses. For example, DNA can be used for next-generation sequencing (NSG), pyrosequencing, loss of heterozygosity; RNA can be used for NGS, microarrays, and quantitative polymerase chain reaction (qPCR); and protein can be applied to western blot, reverse-phase protein microarray and mass spectrometry. Moreover, in addition to transcriptomic and proteomic studies, metabolite analysis

is becoming an essential procedure to characterize specific tissue, mainly in plants [7, 14, 15].

Mass spectrometry imaging is also being used to record the distribution of several molecules directly from tissue without labeling. It is widely used in clinical research for the identification of biomarkers for diagnosis and prognosis [16]. Imaging of metals is gaining special interest. Several metabolic disorders develop as a consequence of a deficiency or excess of specific trace elements in tissue regions and cellular organelles. For this reason, imaging of the spatial distribution and local concentrations of these elements provides a great advantage in many diseases such as Alzheimer's, Parkinson's or Wilson's disease [17, 18].

LCM in liver diseases

LCM has been widely used in the field of liver disease for a variety of downstream analyses (Table 2). These studies comprise microdissection of liver tissue from patients with hepatitis C virus (HCV) [1, 19–23], hepatitis B virus (HBV) [24–28], alcoholic liver disease (ALD) [29–31], non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [32], cholestatic liver injury [33–36] and others [37]. LCM allows evaluation of HCV- and HBV-positive hepatocytes in chronic hepatitis [1, 26]. Kandathil et al. [1] observed clusters of HCV infected hepatocytes that were not randomly distributed. They used single cell LCM combined with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to evaluate infected hepatocytes in patients with chronic HCV and to quantify the viral RNA content per cell. Similarly, Mishiro et al. [26] used LCM coupled with qPCR to analyze the proportion of HBV-DNA in the portal and central areas of hepatic lobules. They observed a positive correlation between the amount of HBV-DNA in hepatocytes from patients with chronic HBV and serum levels of hepatitis B e antigen (HBeAg) [26]. This approach allowed the generation of quantitative data unlike that found in previous studies performing immunohistochemistry and in situ hybridization. Munshaw et al. [23] microdissected hepatocytes from HCV patients with and without fibrosis to find potential genes involved in fibrosis progression within the context of chronic HCV infection. RNA-microarray from both populations of hepatocytes showed a decreased expression of butyrylcholinesterase (BCHE) in hepatocytes from fibrotic tissues [23]. Using the same approach, Honda et al. [19] isolated cells from the liver lobule and portal area of liver biopsies of HCV patients before and after treatment with interferon and ribavirin. They found that patients showing a high expression of interferon and ribavirin-stimulated genes in cells from liver lobules before treatment showed poor response [19].

An important application of LCM in liver disease has been the characterization of cell populations within the

Table 2 Selected laser capture microdissection studies in the field of liver disease

Pathology	Tissue type	Tissue preservation	Staining protocol	Isolated area	Downstream analysis	References
ALD progenitor cells	Human RNA sequencing	FFPE	KRT7	Hepatic		
HVC	Human	Frozen	H	Hepatocytes	RT-PCR	[1]
HVC	Human	Frozen	Toluidine blue	Cells in liver lobules and portal areas	RNA, microarray	[19]
HVC	Human	Frozen	H	Portal tracts and parenchymal segments from pre-cirrhotics and no fibrosis livers	RNA, microarray	[23]
HVB cirrhotic liver	Human	Frozen	HE	Hepatic progenitor cells in cirrhotics and interlobular bile ducts in normal tissue	RNA, microarray	[24]
HVB	Human	FFPE		Peripheral and central hepatocytes	DNA, qPCR	[26]
ASH	Human	Frozen	Cresyl violet	Hepatic progenitor cells	RNA, sequencing	[30]
NAFLD and ALD	Human	FFPE		Hepatocytes and myofibroblasts	DNA, pyrosequencing	[32]
Cholestatic liver injury	Mouse	Frozen	Carbon-labelled ^a	Kupffer cells	qPCR	[34]
Cholestatic liver injury	Human	FFPE	Desmin	HSC	RNA, RT-PCR	[35]
	Mouse	Frozen	Desmin	HSC	RNA, RT-PCR	[35]
PBC	Human	FFPE	HE	Hepatocytes and infiltrating lymphocytes	miRNA, digital PCR	[36]
Acute on chronic liver diseases	Human	Frozen	KRT7	Hepatic progenitor cells	RNA, qPCR and PCR array	[37]
HVB-associated HCC	human	Frozen	HE	Malignant and non-malignant hepatocytes	RNA- microarray	[39]
HCC	Human	FFPE	HE	Normal liver, precancerous lesion and tumour tissue	TaqMan Low Density Array	[40]
HCC	Rat	FFPE	H	Focal tumour lesions	Mass spectrometry	[41]
PSC and CC	Human	FFPE	H	Cholangiocytes and hepatocytes from non-diseased liver, PSC and cholangiocarcinoma	DNA sequencing	[42]
CC	Human	Frozen	H	Normal intrahepatic cholangiocytes and normal hepatocytes	Taqman miRNA (RT-PCR)	[43]
CC	Human	Frozen	cresyl violet	Tumor epithelial and stromal compartments	RNA-microarray	[44]
ICC	Human	Frozen	HE	Stromal cells and non tumor fibrous areas	RNA- microarray	[46]
ICC	Human	FFPE	HE	Tumor and stromal cells	Taqman miRNA (RT-PCR)	[47]
Liver metastasis from CRC	Human	Frozen		Tumour cells from CRC with and without metastases	RNA, microRNA array	[48]
Liver metastasis from CRC	Human	FFPE	cresyl violet	Tumour cells from CRC and their corresponding liver metastasis	RNA, microRNA array	[49]
Liver metastasis from CRC	Human	Frozen	cresyl violet	Tumour cells from CRC with and without metastases	RNA, microRNA array	[50]

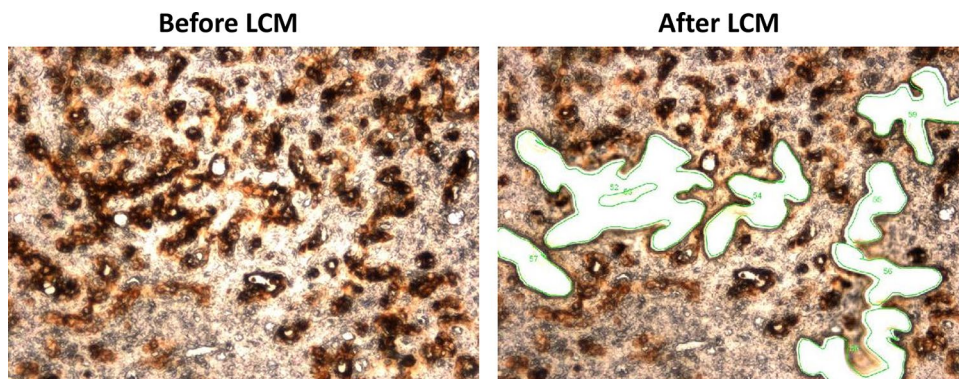
ICC intrahepatic cholangiocarcinoma, *CC* cholangiocarcinoma, *PSC* primary sclerosing cholangitis, *HCC* hepatocellular carcinoma, *HBV* hepatitis B virus, *CRC* colorectal carcinoma, *HCV* hepatitis C virus, *PBC* primary biliary cirrhosis, *NAFLD* non-alcoholic fatty liver disease, *ALD* alcoholic liver disease, *ASH* alcoholic steatohepatitis, *FFPE* formalin fixed paraffin embedded, *HE* haematoxylin–eosin, *H* haematoxylin, *KRT7* cytokeratin 7, *HSC* hepatic stellate cells, *RT-PCR* reverse transcription–polymerase chain reaction

^aMice were inoculated intravenously with india ink (1:100 in saline) to distinguish kupffer cells

context of liver injury. LCM has been used to analyze the transcriptomic profile of cells without the need for performing the cell isolation procedure and allows the study of the

cells in their niche. Mc Daniel et al. used LCM to microdissect hepatic stellate cells from bile duct ligated (BDL) mice that had recovered from cell therapy transplant and

Fig. 2 Laser capture microdissection (LCM) of liver tissue. Microdissection of KRT7⁺ areas of FFPE tissue sections from patients with alcoholic hepatitis. KRT7⁺ area before and after microdissection



from patients with primary biliary cholangitis (PBC). qPCR analysis of hepatic stellate cells from the injury-recovered mice showed an increased expression of senescence markers which led to less fibrosis. However, the expression of senescence markers was decreased in stellate cells from PBC patients, indicating that these cells remained active. Gehring et al. isolated Kupffer cells from a BDL mouse model and found that increased expression of IL-6 assessed by qPCR plays an important role in reducing liver damage [34, 35]. Ductular reaction (DR) cells in chronic liver diseases have been a focus of interest in the last years. DR is present in most chronic liver diseases and is characterized by proliferation of hepatic progenitor cells (HPC) [24, 30, 37], (in press 10.1002/HEP.30472). Wang et al. [24] used LCM combined with microarray analysis to evaluate the gene expression profile of DR from HBV-cirrhotic tissue adjacent to hepatocarcinoma (HCC). Similarly, Ceulemans et al. [30] microdissected HPC enriched areas in alcoholic steatohepatitis livers, and RNA sequencing was performed to analyze the transcriptomic profile. Moreover, Spee et al. [37] used LCM to isolate HPC from patients with acute and chronic liver diseases, and a customized PCR array was performed to evaluate the mechanisms involved in HPC proliferation and differentiation. Additionally, HPCs have also been microdissected in our lab from alcoholic hepatitis patients in order to study the gene expression profile by RNA sequencing of ductular reaction in alcoholic liver disease. Figure 2 shows a KRT7 positive area before and after LCM (in press 10.1002/HEP.30472). These studies have provided better understanding of DR proliferation and the biological properties of HPC in chronic liver diseases. LCM has also been applied to epigenetic studies. Katsumi et al. used LCM coupled with digital PCR to identify the cell population expressing miR-139-5p in patients with PBC. By microdissecting hepatocytes and infiltrated lymphocytes they showed an up-regulation of miR-139-5p in lymphocytes [36]. Likewise, Hardy et al. [32] evaluated the source of the hypermethylated PPAR γ DNA found in plasma from NAFLD patients. Hepatocytes and myofibroblast enriched areas were microdissected from NAFLD and ALD patients

and analyzed by DNA-pyrosequencing, showing a higher degree of methylation in hepatocytes compared to myofibroblasts [32].

- Liver cancer

LCM has been extensively performed in the field of cancer to study hepatocarcinoma (HCC) [38–41], cholangiocarcinoma (CCA) [42–47], and liver metastasis [48–50]. Chronic liver diseases constitute a very important risk factor for the development of HCC. LCM has been used in combination with different downstream analyses in the study of HCC to compare the transcriptome and proteome of malignant and non-malignant cells. Michael et al. [41] used LCM and mass spectrometry to analyze the proteomic profile of focal liver lesions in a rat model of HCC. The proteome characterization gave rise to 11,070 unique peptides which represent 2227 proteins. Known HCC markers were found within these proteins as well as potential new markers for HCC such as aflatoxin B1, aldehyde reductase member 3 and glucose 6-phosphate 1-dehydrogenase [41]. A precancerous liver lesion presents premalignant tissue with a high risk of developing carcinogenesis. Yang et al. [40] combined LCM with TaqMan Low Density Array assay and isolated normal hepatocytes, precancerous tissue and tumor tissue. They identified increased miR-484 in precancerous lesions and demonstrated the potential of this miRNA in cell transformation [40]. Melis et al. [39] compared the transcriptome and HBV expression of whole liver tissue from patients with HBV-associated HCC with microdissected malignant and non-malignant hepatocytes. Microarray analysis from microdissected hepatocytes allowed the identification of two new genes (NUF2 and TTK) not found in whole liver, which were suggested as potential therapeutic targets in HCC [39].

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is characterized by an abundant stroma, and several studies have used LCM to evaluate the microRNA and gene expression profile of this compartment [43, 44, 46, 47]. Asukai et al. [47] used LCM coupled with RT-PCR to analyze miR-130a-3p expression in tumor and stroma cells from patients with ICC. Although

the differences between the two populations were not statistically significant, they were able to stratify patients based on the relative expression of the miRNAs in tumor and stroma (miR-130a-3p high group and the miR-130a-3p low). Similarly, Chen et al. [43] evaluated the miRNA expression profile of 27 ICC samples, and as controls, cholangiocytes and hepatocytes from normal liver tissues were microdissected. They found 38 miRNAs differentially expressed in tumor samples compared to control samples [43]. Sulpice et al. [46] used LCM combined with microarray analysis to study the tumor stromal compartment to identify biomarkers associated with cancer progression. Functional analysis of up-regulated genes in the stroma showed enrichment in pathways related to the cell cycle, extracellular matrix (ECM) and transforming growth factor beta (TGFB). Moreover, they revealed that the expression of osteopontin, TGFB2 and laminin in the stroma correlated with patient outcome [46]. Similarly, Andersen et al. [44] microdissected the tumor epithelium and stroma, and the microarray analysis showed an overexpression of HER2 in the epithelial compartment, and inflammatory cytokines in the stroma.

Mutations in the coding region have been described in carcinomas of the pancreas, esophagus, biliary tract, and familial melanoma [51]. Taniai et al. [42] used LCM to evaluate the role of p16INK4a gene mutations in the progression of PBC to CCA. Cholangiocytes and hepatocytes were isolated from primary sclerosing cholangitis (PSC) patients with and without CCA, and DNA sequencing was performed. They observed the presence of point mutations in the p16INK4a promoter region in cholangiocytes from PSC patients without cholangiocarcinoma, suggesting the contribution of these mutations in cancer progression [42].

LCM has been used for the study of colorectal cancer (CRC) liver metastasis, mainly to evaluate the transcriptome and microRNA profile of malignant cells isolated from colorectal cancer, the corresponding liver metastasis or both tissues [48, 50]. Iida et al. used LCM combined with miRNA array to analyze tumor stroma from CRC with and without liver metastasis. They observed an up-regulation of miR-221 and miR-222 by RT-qPCR in tumor cells from CRC with liver metastasis, and their expression correlated with mortality [48]. Similarly, Murakami et al. [50] microdissected tumor stroma from CRC with and without liver metastasis and described Tenascin C, a target of miR-198, as a new marker for liver metastasis prognostic. Likewise, Iino et al. [49] evaluated miRNA expression in tumor cells microdissected from primary CRC and their corresponding liver metastasis. The microRNA array showed an overexpression of miR-122 in malignant cells from liver metastasis compared to the primary tumor. Moreover, overexpression of miR-122 led to the suppression of the target cationic amino acid transporter 1 in the CCR tumor, which was suggested

as a potential new biomarker to predict postoperative liver metastasis in patients with CCR [49].

Limitations

Although LCM currently constitutes a powerful tool for genomic and proteomic analysis, it has some limitations.

- It is an expensive technology due to the cost of the microdissection equipment.
- Due to inappropriate tissue sample preservation and processing, the yield and quality of DNA, RNA or protein obtained may not be suitable for further analysis.
- The absence of a coverslip on the tissue slide (cryo-tissue and formalin/ethanol fixed tissue) can hinder correct identification of the area to microdissect. A coverslip is important in light microscopy to increase the refractive index of the sample, thereby improving the quality of the image. For samples with poor image quality, standard immunostaining of a consecutive section can be used as a guide to ensure the capture of the correct area.
- Microdissection is a time-consuming technique, mainly due to the optimization of all the steps required to obtain good quality DNA, RNA or protein for the final downstream analysis.
- Cell morphology, tissue structure or histological visualization may preclude single cell or small area microdissection.

Conclusions

LCM has been shown to be an excellent tool for the isolation of tissue areas or specific cell populations within a tissue, without contamination of surrounding cells. Moreover, the areas dissected are available for a variety of downstream analyses in many research fields, including liver diseases. However, LCM technology presents some technical challenges. Specifically, steps concerning tissue preservation, sectioning and staining need to be previously optimized to obtain the best yield and integrity of the molecules of interest.

Acknowledgements The work was funded by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI17/00673), Miguel Servet (CP/00041) and PFIS (FI16/00203), co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, ‘Una manera de hacer Europa’ and The European Foundation for Alcohol Research (ERAB) Grant EA1653.

Compliance with ethical standards

Funding The work was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI17/00673), Miguel Servet (CP/00041) and PFIS

(FI16/00203), co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, ‘Una manera de hacer Europa’ and The European Foundation for Alcohol Research (ERAB) Grant EA1653.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any study with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Kandathil AJ, Graw F, Quinn J, Hwang HS, Torbenson M, Perelson AS, et al. Use of laser capture microdissection to map hepatitis C virus-positive hepatocytes in human liver. *Gastroenterology* 2013;145(1404–1413):e10
- Henriet E, Abou Hammoud A, Dupuy J-W, Dartigues B, Ezzoukry Z, Dugot-Senant N, et al. Argininosuccinate synthase 1 (ASS1): a marker of unclassified hepatocellular adenoma and high bleeding risk. *Hepatology* 2017;66:2016–2028
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998–1001
- Fodor SP, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. DNA SEQUENCING: massively parallel genomics. *Science* (80-) [Internet] 1997;277:393–395 (**American Association for the Advancement of Science**)
- Murray GI, Curran S. Laser capture microdissection: methods and protocols. New York: Humana Press; 2005.
- Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G, et al. Laser-capture microdissection. *Nat Protoc* 2006;1:586–603
- Fang J, Schneider B. Laser microdissection: a sample preparation technique for plant micrometabolic profiling. *Phytochem Anal* 2014;25:307–313
- Datta S, Malhotra L, Dickerson R, Chaffee S, Sen CK, Roy S. Laser capture microdissection: big data from small samples. *Histol Histopathol* 2015;30:1255–1269
- Liu H, McDowell TL, Hanson NE, Tang X, Fujimoto J, Rodriguez-Canales J. Laser capture microdissection for the investigative pathologist. *Vet Pathol* 2014;51(1):257–269
- Tangrea MA, Mukherjee S, Gao B, Markey SP, Du Q, Armani M, et al. Effect of immunohistochemistry on molecular analysis of tissue samples: implications for microdissection technologies. *J Histochem Cytochem* 2011;59:591–600 (**in press 10.1002/HEP.30472**)
- Liu A. Laser capture microdissection in the tissue biorepository. *J Biomol Tech* 2010;21:120–125 (**The Association of Biomolecular Resource Facilities**)
- Vandewoestyne M, Goossens K, Burvenich C, Van Soom A, Peelman L, Deforce D. Laser capture microdissection: should an ultraviolet or infrared laser be used? *Anal Biochem* 2013;439:88–98
- Gallagher RI, Blakely SR, Liotta LA, Espina V. Laser capture microdissection: ArcturusXT infrared capture and UV cutting methods. New York: Humana Press; 2012. pp. 157–178
- Yi L, Liang Z-T, Peng Y, Yao X, Chen H-B, Zhao Z-Z. Tissue-specific metabolite profiling of alkaloids in *Sinomenii Caulis* using laser microdissection and liquid chromatography–quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1248:93–103 (**Elsevier**)
- Schad M, Mungur R, Fiehn O, Kehr J. Metabolic profiling of laser microdissected vascular bundles of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 2005;1:2 (**BioMed Central**)
- Dilillo M, Pellegrini D, Ait-Belkacem R, de Graaf EL, Caleo M, McDonnell LA. Mass spectrometry imaging, laser capture microdissection, and LC-MS/MS of the same tissue section. *J Proteome Res* 2017;16:2993–3001
- Hutchinson RW, Cox AG, McLeod CW, Marshall PS, Harper A, Dawson EL, et al. Imaging and spatial distribution of β -amyloid peptide and metal ions in Alzheimer’s plaques by laser ablation—inductively coupled plasma—mass spectrometry. *Anal Biochem* 2005;346:225–233
- Wu B, Becker JS. Bioimaging of metals in rat brain hippocampus by laser microdissection inductively coupled plasma mass spectrometry (LMD-ICP-MS) using high-efficiency laser ablation chambers. *Int J Mass Spectrom* 2012;323–324:34–40 (**Elsevier**)
- Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, et al. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2010;53:817–826
- Sansonno D, Tucci FA, De Re V, Lauletta G, Montrone M, Libra M, et al. HCV-associated B cell clonalities in the liver do not carry the t(14;18) chromosomal translocation. *Hepatology* 2005;42:1019–1027
- Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, et al. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin-28B genotypes. *Hepatology* 2014;59:828–838
- Chiu K-W, Nakano T, Chen K-D, Hu T-H, Lin C-C, Hsu L-W, et al. Identification of IL-28B genotype modification in hepatocytes after living donor liver transplantation by laser capture microdissection and pyrosequencing analysis. *Biomed Res Int* 2018;2018:1–8
- Munshaw S, Hwang HS, Torbenson M, Quinn J, Hansen KD, Astemborski J, et al. Laser captured hepatocytes show association of butyrylcholinesterase gene loss and fibrosis progression in hepatitis C-infected drug users. *Hepatology* 2012;56:544–554
- Wang H, Gao Y, Jin X, Xiao J. Expression of contactin associated protein-like 2 in a subset of hepatic progenitor cell compartment identified by gene expression profiling in hepatitis B virus-positive cirrhosis. *Liver Int* 2010;30:126–138
- Deng H, Gao Y-B, Wang H-F, Jin X-L, Xiao J-C. Expression of deleted in malignant brain tumours 1 (DMBT1) relates to the proliferation and malignant transformation of hepatic progenitor cells in hepatitis B virus-related liver diseases. *Histopathology* 2012;60:249–260
- Mishiro T, Hamamoto S, Furuta K, Ishimura N, Rumi MAK, Miyake T, et al. Quantitative measurement of hepatitis B virus DNA in different areas of hepatic lobules in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2006;78:37–43
- Tu T, Mason WS, Clouston AD, Shackel NA, McCaughan GW, Yeh MM, et al. Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2015;22:737–753
- Xu W, Wang N-R, Wang H-F, Feng Q, Deng J, Gong Z-Q, et al. Analysis of epithelial-mesenchymal transition markers in the histogenesis of hepatic progenitor cell in HBV-related liver diseases. *Diagn Pathol* 2016;11:136
- McDaniel K, Huang L, Sato K, Wu N, Annable T, Zhou T, et al. The let-7/Lin28 axis regulates activation of hepatic stellate cells in alcoholic liver injury. *J Biol Chem* 2017;292:11336–11347
- Ceulemans A, Verhulst S, Van Haele M, Govaere O, Ventura J-J, van Grunsven LA, et al. RNA-sequencing-based comparative analysis of human hepatic progenitor cells and their niche from alcoholic steatohepatitis livers. *Cell Death Dis* 2017;8:e3164

31. Wu N, McDaniel K, Zhou T, Ramos-Lorenzo S, Wu C, Huang L, et al. Knockout of microRNA-21 attenuates alcoholic hepatitis through VHL/NF- κ B signaling pathway in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Liver Physiol* 2018;315(3):G385–G398. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00111.2018>
32. Hardy T, Zeybel M, Day CP, Dipper C, Masson S, McPherson S, et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2017;66:1321–1328
33. Baba N, Kobashi H, Yamamoto K, Terada R, Suzuki T, Hakoda T, et al. Gene expression profiling in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis using laser capture microdissection and cDNA microarray. *Transl Res* 2006;148:103–113
34. Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Hartly MW, et al. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006;130:810–822
35. McDaniel K, Meng F, Wu N, Sato K, Venter J, Bernuzzi F, et al. Forkhead box A2 regulates biliary heterogeneity and senescence during cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* 2017;65:544–559 (**NIH Public Access**)
36. Katsumi T, Ninomiya M, Nishina T, Mizuno K, Tomita K, Haga H, et al. MiR-139-5p is associated with inflammatory regulation through c-FOS suppression, and contributes to the progression of primary biliary cholangitis. *Lab Invest* 2016;96:1165–1177
37. Spee B, Carpino G, Schotanus BA, Katoonizadeh A, Borght SV, Gaudio E, et al. Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signaling. *Gut* 2010;59:247–257
38. Adam AC, Faudou V, Paschen SA, Adam OM, Kahl P, Drebber U, et al. Hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver is associated with a reduced number of clonal hepatocellular patches in non-tumorous liver parenchyma. *J Pathol* 2012;228:333–340
39. Melis M, Diaz G, Kleiner DE, Zamboni F, Kabat J, Lai J, et al. Viral expression and molecular profiling in liver tissue versus microdissected hepatocytes in hepatitis B virus—associated hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 2014;12:230
40. Yang Y, Lin X, Lu X, Luo G, Zeng T, Tang J, et al. Interferon-microRNA signalling drives liver precancerous lesion formation and hepatocarcinogenesis. *Gut* 2016;65:1186–1201
41. Michael AOA, Ahsan N, Zabala V, Francois-Vaughan H, Post S, Brilliant KE, et al. Proteomic analysis of laser capture microdissected focal lesions in a rat model of progenitor marker-positive hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017;8:26041–26056
42. Taniai M, Higuchi H, Burgart LJ, Gores GJ. p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:1090–1098
43. Chen L, Yan H-X, Yang W, Hu L, Yu L-X, Liu Q, et al. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2009;50:358–369 (**Elsevier**)
44. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 2012;142(1021–1031):e15 (**NIH Public Access**)
45. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, Sato Y, Nakanuma Y. KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Cancer* 2013;119:1669–1674
46. Sulpice L, Rayar M, Desille M, Turlin B, Fautrel A, Boucher E, et al. Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2013;58:1992–2000
47. Asukai K, Kawamoto K, Eguchi H, Konno M, Asai A, Iwagami Y, et al. Micro-RNA-130a-3p regulates gemcitabine resistance via PPARG in cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2017;24:2344–2352
48. Iida M, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, Takenouchi H, Kanekiyo S, et al. Overexpression of miR-221 and miR-222 in the cancer stroma is associated with malignant potential in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2018;40:1621–1631
49. Iino I, Kikuchi H, Miyazaki S, Hiramatsu Y, Ohta M, Kamiya K, et al. Effect of miR-122 and its target gene cationic amino acid transporter 1 on colorectal liver metastasis. *Cancer Sci* 2013;104:624–630
50. Murakami T, Kikuchi H, Ishimatsu H, Iino I, Hirotsu A, Matsumoto T, et al. Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis. *Br J Cancer* 2017;117(9):1360
51. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68:67–108