



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Ruolo delle cellule staminali/progenitrici nella rigenerazione epatica e delle vie biliari: fenotipo e vie di segnalazione coinvolte

Facoltà di Farmacia e Medicina

**Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico-Legali e
dell'Apparato Locomotore**

Dottorato in Epato-Gastroenterologia Sperimentale e Clinica, XXXIII ciclo

Candidata:

Dott.ssa Diletta Overi

Tutor:

Ch.mo Prof. Eugenio Gaudio

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Paolo Onori

INDICE

RIASSUNTO	4
1. INTRODUZIONE	6
1.1 Il fegato e le vie biliari: cenni di organizzazione morfo-funzionale e meccanismi di rigenerazione	6
1.2 Le cellule staminali/progenitrici epatiche (HpSC)	8
1.2.1 Anatomia della nicchia delle HpSC	8
1.2.2 Coinvolgimento delle HpSC nella fisiopatologia delle malattie epatiche e delle vie biliari	9
1.3 Le cellule staminali/progenitrici delle vie biliari (BTSC)	11
1.3.1 Anatomia della nicchia delle BTSC	11
1.3.2 Coinvolgimento delle BTSC nella fisiopatologia delle malattie epatiche e delle vie biliari	12
2. SCOPI	15
3. MATERIALI E METODI	16
3.1 Campioni utilizzati	16
3.2 Analisi dei campioni istologici	18
3.3 Colture cellulari	21
3.4 Analisi statistica	22
4. RISULTATI	23
4.1 Studio dell'attivazione delle HpSC	23
4.1.1 La nicchia delle HpSC nella patogenesi delle malattie epatobiliari	23
4.1.2 Vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione delle HpSC	31
4.2 Studio dell'attivazione delle BTSC	33
4.2.1 La nicchia delle BTSC nella patogenesi delle malattie epatobiliari	33
4.2.2 Vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione delle BTSC	34
5. DISCUSSIONE	38
6. CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	46
RINGRAZIAMENTI	52
TABELLE	53
FIGURE	59

RIASSUNTO

Introduzione. Nel fegato e nelle vie biliari sono presenti due distinte popolazioni di cellule staminali/progenitrici: le cellule progenitrici epatiche (HpSC), situate a livello dei dotti di Hering, e le cellule staminali delle vie biliari (BTSC), nelle ghiandole peribiliari dei dotti biliari intraepatici di grosso calibro e dei dotti biliari extraepatici.

Scopo. Lo scopo dello studio è stato quello di studiare l'attivazione delle HpSC e delle BTSC in corso di patologie epatiche e delle vie biliari e le vie di segnalazione coinvolte.

Materiali e Metodi. Sono stati analizzati: pazienti affetti da steatosi epatica non alcolica (NAFLD); pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC) e da colangite sclerosante primitiva (PSC); pazienti affetti da stenosi non-anastomotiche delle vie biliari (NAS) dopo trapianto di fegato; BTSC umane *in vitro*. I campioni sono stati studiati mediante colorazioni istomorfologiche, immunoistochimiche e di immunofluorescenza.

Risultati. Nella NAFLD, l'espansione delle HpSC correla con lo stadio istologico di malattia e con lo stato di attivazione dei miofibroblasti, dei macrofagi e del sistema lipopolisaccaride-TLR4. Nella PBC e nella PSC, l'attivazione delle HpSC correla con lo stadio di fibrosi; il fenotipo e le modalità di attivazione delle HpSC sono differenti, con il pathway di Notch principalmente coinvolto nella PBC e quello di Wnt nella PSC. L'attivazione delle HpSC rappresenta un fattore predittivo della risposta alla terapia di prima linea in pazienti con PBC. Le ghiandole peribiliari sono coinvolte nella patogenesi del danno nelle colangiopatie che colpiscono i dotti biliari extraepatici, risultando attivate e floride nella PSC e, diversamente, fortemente danneggiate nei dotti affetti da NAS. L'attivazione delle BTSC è mediata dai pathway di Wnt e Notch, i cui ligandi sono prodotti dalle cellule stromali ed infiammatorie in corso di PSC.

Conclusioni. Le HpSC e le BTSC sono attivate in patologie epatiche e delle vie biliari. Lo stadio del danno istologico è correlato all'attivazione delle cellule staminali/progenitrici e delle cellule di supporto della nicchia. L'attivazione ed il commissionamento verso un destino specifico delle cellule staminali/progenitrici sono mediati dall'attivazione differenziale delle vie di segnalazione, in maniera finalizzata alla riparazione dello specifico danno.

Elenco delle abbreviazioni utilizzate:

BTSC: Biliary Tree Stem/progenitor Cells (cellule staminali/progenitrici delle vie biliari); CK: citocheratina; HpSC: Hepatic Stem/progenitor Cells (cellule staminali/progenitrici epatiche); LPS: lipopolisaccaride; NAFLD: steatosi epatica non alcolica; NAS: stenosi non-anastomotiche delle vie biliari; PBC: colangite biliare primitiva; PCNA: antigene di proliferazione cellulare; PSC: colangite sclerosante primitiva; UDCA: acido ursodesossicolico.

1. INTRODUZIONE

1.1 IL FEGATO E LE VIE BILIARI: CENNI DI ORGANIZZAZIONE MORFO-FUNZIONALE E MECCANISMI DI RIGENERAZIONE

Il fegato e le vie biliari sono organi il cui rinnovamento, in condizioni normali, è garantito dalla proliferazione delle cellule parenchimali mature, gli epatociti ed i colangiociti (1, 2).

Il parenchima epatico è costituito da cordoni di epatociti anastomizzati tra loro e tra cui sono interposti i sinusoidi epatici, ed è organizzato in unità morfo-funzionali dette "lobuli epatici" (3). Nel contesto del lobulo epatico, gli epatociti presentano tra loro significative differenze morfologiche e funzionali a seconda della loro posizione; nel complesso, tale organizzazione ha portato alla definizione del concetto di zonazione epatica (4). Tale concetto implica la descrizione dell'unità morfo-funzionale dell'acino epatico, individuata come un'area di parenchima irrorata da un ramo della vena porta e dell'arteria epatica e drenata da una vena centrolobulare; dal punto di vista funzionale, gli epatociti localizzati intorno agli spazi portalici (zona periportale o zona 1 dell'acino epatico) ricevono sangue con maggior contenuto di ossigeno e nutrienti e sono caratterizzati da elevata attività di sintesi proteica e di metabolismo del glucosio; diversamente, gli epatociti intorno alle vene centrolobulari (zona pericentrale o zona 3 dell'acino epatico) sono raggiunti da un sangue meno ricco di ossigeno e nutrienti e sono principalmente coinvolti in attività funzionali quali il metabolismo di sostanze xenobiotiche o la beta-ossidazione degli acidi grassi (4).

Sebbene le straordinarie capacità rigenerative del fegato siano note sin dai tempi più antichi, con il mito greco di Prometeo (5), la prima vera dimostrazione scientifica delle proprietà rigenerative degli epatociti si è avuta con lo sviluppo del modello sperimentale di epatectomia parziale nel ratto, tramite il quale è stato

dimostrato come la proliferazione di epatociti maturi contribuisca alla ricostituzione del volume epatico dopo asportazione dei 2/3 dell'organo (6). Più recentemente, è stato dimostrato come gli epatociti maturi possano andare incontro a numerosi cicli replicativi, partecipando dunque al turnover fisiologico dell'organo e, in caso di danno, contribuendo alla rigenerazione del parenchima (7-9). All'interno del lobulo epatico, gli epatociti sembrano peraltro non avere le stesse capacità rigenerative: numerose evidenze hanno infatti indicato come gli epatociti situati in sede periportale (più giovani e diploidi) siano dotati di maggiori capacità replicative ed in grado di ripopolare il parenchima secondo un asse porto-centrale (10). Tuttavia, più recentemente, è stato dimostrato come sia presente una modesta attività proliferativa degli epatociti in tutte le zone del lobulo, al fine di garantire il fisiologico turnover del parenchima epatico (9, 11). In caso di danno acuto, sono primariamente gli epatociti adiacenti alla zona danneggiata a proliferare aiutati, se necessario, da epatociti di zone più lontane; solamente in corso di danno cronico gli epatociti diploidi in sede periportale mostrano un'attività prevalente, supportando la rigenerazione secondo il flusso porto-centrale precedentemente menzionato (12-14). Ciò è dovuto al fatto che, a seguito di un danno cronico, gli epatociti in altre sedi del lobulo, tipicamente poliploidi, vanno incontro a senescenza con conseguente limitazione delle loro capacità replicative (12-14).

I colangiociti costituiscono l'epitelio di rivestimento delle vie biliari, un sistema di dotti che drena la bile dal polo canalicolare degli epatociti fino al duodeno. Tali cellule sono caratterizzate da un fenotipo eterogeneo che riflette la loro posizione a livello dell'albero biliare (2). È possibile infatti identificare due distinte popolazioni di colangiociti: i cosiddetti "piccoli colangiociti" (<15 μ m), i quali rivestono i dotti biliari intraepatici di calibro minore (calibro <300 μ m, ovvero i duttuli biliari, i dotti biliari interlobulari ed i dotti settali) ed i "grandi colangiociti" (>15 μ m), i quali costituiscono l'epitelio di rivestimento dei dotti biliari intraepatici

di grosso calibro (>300µm, ovvero i dotti zonali ed i dotti segmentali) ed i dotti biliari extraepatici (15). Tali sottopopolazioni cellulari sono distinte anche dal punto di vista funzionale, in quanto i piccoli colangiociti sono caratterizzati da elevate capacità proliferative in risposta a diversi stimoli, mentre i grandi colangiociti partecipano alla regolazione attiva della composizione della bile (2, 16-20).

In generale, le capacità proliferative di epatociti e colangiociti ed il loro ruolo nella rigenerazione tissutale sembrano implicare un modesto contributo di cellule staminali/progenitrici alla rigenerazione epatica e delle vie biliari. Nonostante ciò, due popolazioni di cellule staminali/progenitrici sono presenti nel fegato e nelle vie biliari: le cellule progenitrici epatiche (HpSC: Hepatic Stem/progenitor Cells), situate a livello delle ramificazioni più fini delle vie biliari, e le cellule staminali delle vie biliari (BTSC: Biliary Tree Stem/progenitor Cells), localizzate nelle ghiandole peribiliari dei dotti biliari intraepatici di grandi dimensioni e dei dotti biliari extraepatici (21).

1.2 LE CELLULE STAMINALI/PROGENITRICI EPATICHE (HpSC)

1.2.1 Anatomia della nicchia delle HpSC

Le HpSC sono cellule staminali/progenitrici localizzate a livello delle ramificazioni più fini delle vie biliari, ovvero i duttuli di Hering, all'interfaccia tra i duttuli biliari ed il polo canalicolare degli epatociti (22-24). Sono cellule di piccole dimensioni (7-9 µm) e di forma cubica, con un nucleo ovale ed un elevato rapporto nucleo-citoplasma; dal punto di vista immunofenotipico, le HpSC sono caratterizzate dalla co-espressione di marcatori tipici di cellule staminali (principalmente Sox9, Lgr5, CD44, CD133, EpCAM e NCAM), citocheratine (CK) biliari (CK7/19) e marcatori epatocitari (come CK18, HNF4α e albumina) (24-27).

Le HpSC sono situate in una nicchia anatomica e funzionale specializzata composta dai miofibroblasti portalì, dalle cellule stellate epatiche e dai macrofagi residenti (le cellule di Kupffer); tali popolazioni cellulari contribuiscono al

mantenimento dell'integrità funzionale della nicchia e sono in grado di influenzare espansione, proliferazione e differenziamento delle HpSC (28).

Le HpSC sono cellule bipotenti, in grado di differenziare sia in epatociti che in colangiociti maturi, e la loro differenziazione verso uno specifico destino è caratterizzata dall'iniziale comparsa di cellule con un fenotipo intermedio, le quali acquisiscono successivamente i tratti delle cellule mature (29-31). Ad esempio, il differenziamento verso il destino epatocitario implica la comparsa di cellule peculiari con un fenotipo intermedio, denominate "*epatociti intermedi*"; questi ultimi sono cellule di dimensioni intermedie (circa 12-15 μm) tra le HpSC e gli epatociti, sono situati in sede periportale e sono caratterizzati dalla espressione di citocheratine biliari (CK7) con pattern di membrana e dalla co-espressione di marcatori di epatociti maturi (quale ad esempio HepPar1) e di HpSC (quali EpCAM e Sox9) (24, 26, 29, 32, 33). La differenziazione in senso biliare è invece caratterizzata dalla perdita dell'espressione di marcatori staminali e, solo successivamente, dall'acquisizione di proteine funzionali tipiche dei colangiociti maturi (quali ad esempio CFTR e AE2) (24, 26, 29, 32, 33).

1.2.2 Coinvolgimento delle HpSC nella fisiopatologia delle malattie epatiche e delle vie biliari

Le HpSC sono cellule staminali facoltative, poiché non partecipano al fisiologico turnover del parenchima epatico e dell'epitelio biliare (34-36) ma si attivano solo in specifiche condizioni di necessità (1, 2, 9, 19). Le HpSC sono infatti coinvolte nei processi di rigenerazione in seguito a danno estensivo e prolungato nel tempo, allorquando le elevate capacità rigenerative delle cellule mature siano compromesse o esaurite (33, 37, 38). L'attivazione delle HpSC coincide con la comparsa nel parenchima epatico di cordoni di cellule a fenotipo prevalentemente biliare, la cosiddetta reazione duttale; morfologicamente, essa è costituita da duttuli reattivi, strutture tortuose spesso senza un lume ben definito (29).

L'attivazione delle HpSC è stata descritta in numerose patologie umane, sia acute che croniche e che colpiscono primariamente sia epatociti che colangiociti (2, 26, 39, 40). Patologie croniche quali la steatosi epatica non alcolica (NAFLD) o le epatiti virali sono caratterizzate dall'emergenza di una reazione duttale prominente, accompagnata dalla comparsa di epatociti intermedi (26, 41-43). A sua volta, un danno acuto massivo del parenchima epatico (come nell'epatite alcolica o nell'insufficienza epatica acuta) è in grado di indurre la proliferazione delle HpSC in un tentativo di compensare l'improvvisa perdita di epatociti (26, 44, 45). Una reazione duttale prominente è stata inoltre descritta nelle colangiopatie umane, quali ad esempio la colangite biliare primitiva (PBC) e la colangite sclerosante primitiva (PSC). Tali malattie sono caratterizzate da un danno infiammatorio cronico dei dotti biliari che, compromettendo le capacità rigenerative dei colangiociti inducendone senescenza ed apoptosi, ha come conseguenza l'attivazione delle HpSC (26, 40).

In corso di patologie epatiche e delle vie biliari, le cellule di supporto della nicchia (ovvero i macrofagi ed i miofibroblasti portalì) possono modulare il coinvolgimento delle HpSC in corso di danno tramite la produzione di molecole in grado di attivare specifiche vie di segnalazione; in particolare, l'attivazione del pathway di Notch è in grado di determinare il differenziamento in senso colangiocitario delle HpSC (26, 46); diversamente, l'attivazione del pathway di Wnt/ β -catenina guida la loro proliferazione ed il loro differenziamento in epatociti maturi (46-49). Le cellule di supporto della nicchia prendono inoltre parte alla regolazione della composizione della matrice extracellulare ed al suo continuo rimodellamento (28, 50). In tal senso, una composizione specifica della matrice è in grado di mantenere le HpSC all'interno della nicchia in uno stato indifferenziato ed indurne la proliferazione (51-53); diversamente, quando le HpSC in espansione si spostano al di fuori della nicchia, esse si trovano esposte a numerosi segnali e fattori

di crescita e, di conseguenza, possono andare incontro a differenziamento verso un destino maturo (50, 51). D'altra parte, le HpSC attivate in corso di danno cronico possono produrre fattori che, a loro volta, sono in grado di attivare i macrofagi e le cellule fibrogenetiche, favorendo l'instaurarsi di circoli viziosi con inefficiente riparazione del danno epatico e fibrogenesi progressiva (54-57).

1.3 LE CELLULE STAMINALI/PROGENITRICI DELLE VIE BILIARI (BTSC)

1.3.1 Anatomia della nicchia delle BTSC

Le BTSC sono cellule staminali/progenitrici situate nelle ghiandole peribiliari dei dotti biliari intraepatici di grandi dimensioni e dei dotti biliari extraepatici (58-60). Dal punto di vista fenotipico, le BTSC esprimono marcatori tipici delle cellule staminali endodermiche (Sox17, Pdx1, Sox9, EpCAM, Lgr5), possono occasionalmente esprimere marcatori di cellule staminali pluripotenti (ovvero Oct4, Sox2 e Nanog) e sono perlopiù negative a marcatori di colangiociti maturi (quali ad esempio il recettore della secretina o CFTR) (58, 61, 62).

Le BTSC sono cellule multipotenti, in grado di differenziare spontaneamente in epatociti, colangiociti e cellule beta pancreatiche, come dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* (63-65). In particolare, l'iniezione delle BTSC nel fegato in modelli sperimentali murini ha dimostrato la capacità di tali cellule di attecchire e di differenziare in epatociti maturi, in grado di ripopolare il parenchima epatico (65, 66). Inoltre, in un modello murino di legatura delle vie biliari nel topo è stata suggerita la partecipazione delle BTSC al rinnovamento dell'epitelio delle vie biliari con l'osservazione di una risposta proliferativa da parte delle BTSC a livello delle ghiandole peribiliari a seguito del danno (67). Infine, la loro potenzialità verso il destino pancreatico è stata dimostrata tramite la differenziazione *in vitro* delle BTSC in *neo-isole* pancreatiche le quali, una volta trapiantate nel grasso epididimale di topi

diabetici, sono in grado di attecchire e contribuire al miglioramento del profilo glicemico tramite la produzione di insulina (59, 63).

Oltre che a livello delle ghiandole peribiliari, una popolazione di BTSC è stata individuata a livello delle cripte della mucosa della colecisti (65). Tali cellule possono essere isolate, tramite immuno-selezione per EpCAM, da colecisti ottenute da donatori di organi o da pazienti sottoposti a colecistectomia (65). *In vitro*, le cellule isolate mostrano una crescita clonogenica e la capacità di differenziare verso i destini epatocitario, colangiocitario e beta-pancreatico; inoltre, una volta trapiantate in modelli murini di cirrosi, tali cellule hanno dimostrato capacità di attecchire a livello del parenchima epatico e di ripopolarlo differenziando in epatociti maturi (65). Nel complesso, la sottopopolazione di BTSC a livello della colecisti può rappresentare un'utile fonte di cellule staminali/progenitrici per la medicina rigenerativa del fegato, in particolare alla luce dell'ampia disponibilità di campioni di colecisti umana da cui isolare le cellule (21, 65).

1.3.2 Coinvolgimento delle BTSC nella fisiopatologia delle malattie epatiche e delle vie biliari

Le ghiandole peribiliari sono frequentemente coinvolte in corso di patologie del sistema epatobiliare, mostrando aspetti patologici quali necro-infiammazione, dilatazioni, iperplasia e trasformazione neoplastica (60, 68). In particolare, le ghiandole peribiliari e le BTSC sono coinvolte nella fisiopatologia delle colangiopatie umane, quali ad esempio la PSC, l'atresia biliare e le stenosi non-anastomotiche (NAS) delle vie biliari a seguito di trapianto di fegato.

La PSC è una colangiopatia primitiva su base infiammatoria, caratterizzata da un danno cronico dei dotti biliari intraepatici di grandi dimensioni e dei dotti biliari extraepatici con lo sviluppo di multiple stenosi dei dotti; tali stenosi determinano stasi biliare che si associa ad un progressivo danno del parenchima

epatico (69). Istologicamente, le lesioni tipiche della PSC sono caratterizzate da marcata infiammazione e fibrosi della parete del dotto biliare coinvolto. In tale patologia sono state dimostrate significative modificazioni del compartimento delle ghiandole peribiliari (70). In particolare, le cellule delle ghiandole peribiliari vanno incontro ad elevata proliferazione, associata ad un aumento della popolazione staminale (ovvero le BTSC) e ad aspetti di metaplasia mucinosa (70). Inoltre, le alterazioni patologiche delle ghiandole peribiliari nei pazienti con PSC sono associate ad un'aumentata attivazione del pathway di Hedgehog, in grado di attivare i miofibroblasti e, al contempo, di indurre nelle BTSC stesse alcuni caratteri tipici della transizione epitelio-mesenchimale (α SMA, Snai1 e Twist), suggerendo come l'attivazione di tale via di segnalazione possa contribuire alla fibrosi della parete del dotto (70).

La partecipazione delle BTSC ai processi fibrogenetici a livello dei dotti biliari extraepatici è suggerita anche dallo studio delle lesioni tipiche dell'atresia biliare. Tale patologia è caratterizzata dallo sviluppo di stenosi significative dei dotti biliari extraepatici che diventano clinicamente rilevanti nei primi giorni dopo la nascita con grave colestasi, portando allo sviluppo di cirrosi biliare e alla necessità di trapianto di fegato in età pediatrica (71). Similmente alla PSC, nei dotti affetti da atresia biliare le ghiandole peribiliari sono caratterizzate da un'aumentata espressione dei ligandi di Hedgehog, e tale espressione risulta correlata allo sviluppo di una malattia più grave e progressiva, suggerendo un attivo contributo delle cellule delle ghiandole peribiliari nei processi fibrogenetici a carico della parete dei dotti biliari (72).

Il ruolo del compartimento delle BTSC nella rigenerazione dei dotti biliari danneggiati è suggerito anche dal loro coinvolgimento nello sviluppo di stenosi non-anastomotiche delle vie biliari dopo trapianto ortotopico di fegato (73). Le stenosi non-anastomotiche delle vie biliari rappresentano una complicanza del

trapianto e sono caratterizzate dallo sviluppo di gravi stenosi dei dotti biliari che si presentano in sedi diverse dal punto di anastomosi chirurgica tra il dotto del donatore con quello del ricevente (73). In tale contesto, è stato osservato come la presenza di un danno a carico delle ghiandole peribiliari con compromissione del compartimento staminale al momento del trapianto fosse associata ad una maggiore probabilità di sviluppare stenosi non-anastomotiche delle vie biliari, indicando un possibile ruolo delle BTSC nel determinare un'adeguata rigenerazione tissutale (74, 75).

2. SCOPI

Lo scopo generale del progetto è stato quello di studiare il coinvolgimento delle cellule progenitrici epatiche (HpSC) e delle cellule staminali delle vie biliari (BTSC) nelle patologie epatiche e delle vie biliari.

Per quanto riguarda la nicchia delle HpSC, gli scopi specifici sono stati i seguenti:

- studiare la partecipazione delle HpSC nelle patologie epatobiliari ed in particolare nella steatosi epatica non alcolica (NAFLD), nella colangite biliare primitiva (PBC) e nella colangite sclerosante primitiva (PSC);
- studiare le vie di segnalazione di Notch e Wnt nell'attivazione delle HpSC ed il loro coinvolgimento nelle colangiopatie.

In parallelo, per quanto riguarda la nicchia delle BTSC, gli scopi specifici sono stati i seguenti:

- studiare il coinvolgimento delle BTSC nelle patologie epatobiliari ed in particolare nella PSC e nelle stenosi non anastomotiche delle vie biliari (NAS) dopo trapianto di fegato;
- studiare le vie di segnalazione di Notch e Wnt nell'attivazione delle BTSC ed il loro coinvolgimento nelle colangiopatie.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI UTILIZZATI

Campioni di fegato e vie biliari con istologia normale (N=10)

In questo progetto stati utilizzati, come controlli, blocchi in paraffina di campioni di fegato e vie biliari con istologia normale ottenuti da donatori di fegato (Dipartimento di Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo "Paride Stefanini", Sapienza Università di Roma). I donatori erano caratterizzati da test di funzionalità epatica nella norma, assenza di assunzione significativa di alcool (≥ 30 g/settimana), negatività per marcatori di patologie epatiche autoimmuni, negatività ai test sierologici per l'epatite B (HBsAg) e per l'epatite C (anti-HCV) ed assenza di alterazioni in immagini radiologiche dell'addome. Nessuno dei soggetti era affetto da diabete, ipertensione arteriosa, insufficienza renale, cardiopatie o obesità.

Per ciascun paziente è stato ottenuto il consenso informato in forma scritta. Il protocollo di studio era conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 (76) ed è stato revisionato ed approvato dal comitato etico presso il Policlinico Umberto I (prot. #541/10).

Pazienti adulti affetti da NAFLD (N=50)

Sono stati utilizzati blocchi in paraffina di biopsie epatiche di pazienti affetti da NAFLD. I pazienti erano stati precedentemente reclutati presso il Day Service di Medicina Interna del Policlinico Umberto I di Roma. I criteri di inclusione sono stati i seguenti: negatività ai test sierologici per l'epatite B e C; assenza in anamnesi di un consumo, presente o passato, di un'assunzione giornaliera media di alcol >20 g. I criteri di esclusione sono stati i seguenti: neoplasie attive; presenza di danno epatico indotto da farmaci; assunzione di antiossidanti o vitamine.

I pazienti con NAFLD che presentavano livelli sierici di enzimi epatici persistentemente elevati (>6 mesi) ed evidenza ecografia di steatosi epatica sono

stati sottoposti a biopsia epatica percutanea eco-guidata. Tale procedura è stata svolta sotto sedazione cosciente utilizzando un ago di Klatskin da 16G. I frustoli ottenuti sono stati fissati in formalina tamponata al 4% per 2-4 ore ed inclusi in paraffina con un basso punto di fusione (55-57°C).

Per ciascun paziente è stato ottenuto il consenso informato in forma scritta. Il protocollo di studio era conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 (76) ed è stato revisionato ed approvato dal comitato etico presso il Policlinico Umberto I (prot. #873/11).

Pazienti affetti da colangiopatie

Sono state utilizzate sezioni istologiche in bianco di biopsie epatiche ottenute da pazienti affetti da PBC (N=20) precedentemente reclutati presso il Policlinico Umberto I (Sapienza Università di Roma). È stata inoltre studiata una casistica più ampia (N=82) di pazienti di cui erano disponibili la biopsia ed i dati clinici/sierologici al momento della diagnosi e di cui erano stati ottenuti nuovamente i dati clinici/sierologici dopo un anno di terapia con acido ursodesossicolico (UDCA). I pazienti inclusi in questa coorte erano stati reclutati nell'ambito di uno studio prospettico da parte del Registro Italiano della PBC. Per la diagnosi di PBC sono stati applicati i criteri diagnostici secondo le linee guida EASL (77). Sono stati esclusi i pazienti che presentavano altre patologie epatiche concomitanti (incluse epatite autoimmune/sindrome da overlap, epatopatia alcolica, NAFLD o epatiti virali). Le classi prognostiche sono state determinate seguendo i criteri della Mayo Clinic (Mayo Clinic's Updated Natural History Model for PBC), mentre gli score Global PBC e UK-PBC sono stati utilizzati per stratificare la progressione del rischio nei pazienti.

Sono stati utilizzati sezioni istologiche in bianco di campioni chirurgici di fegato e vie biliari ottenuti da pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC, N= 20) presenti presso il laboratorio di microscopia ottica del Dipartimento di

Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico-Legali e dell'Apparato Locomotore (Sapienza Università di Roma) ed precedentemente ricevute in virtù di progetti di ricerca in essere in collaborazione con l'Ospedale Universitario di Oslo (Norwegian PSC Research Center, Division of Cancer Surgery and Transplantation). Per la diagnosi di PSC sono stati applicati i criteri diagnostici secondo le linee guida più recenti (78). Le classi prognostiche sono state determinate seguendo i criteri della Mayo Clinic (Mayo Clinic's Revised Natural History Model for PSC).

Sono state utilizzate sezioni istologiche in bianco di campioni ottenuti da pazienti sottoposti a ritrapianto di fegato per stenosi non-anastomotiche delle vie biliari (NAS, N=10) presenti presso il laboratorio di microscopia ottica del Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico-Legali e dell'Apparato Locomotore (Sapienza Università di Roma). La diagnosi di NAS è stata svolta tramite colangiopancreatografia endoscopica retrograda (ERCP), risonanza magnetica o colangiografia transepatica percutanea; la presenza di NAS era definita dalla presenza di stenosi, dilatazioni o irregolarità dei dotti biliari extraepatici o dei grandi dotti intraepatici a livello dell'organo trapiantato, in assenza di trombosi dell'arteria epatica e non a livello dell'anastomosi tra il donatore ed il ricevente.

Per ciascun paziente è stato ottenuto il consenso informato in forma scritta. Il protocollo di studio era conforme alle linee guida etiche della Dichiarazione di Helsinki del 1975 (76) ed è stato revisionato ed approvato dai comitati etici locali (Università degli Studi di Milano-Bicocca: PBC322; Policlinico Umberto I di Roma: prot. #541/10).

3.2 ANALISI DEI CAMPIONI ISTOLOGICI

Per tutti i campioni, sono state ottenute sezioni istologiche dello spessore di 3µm e sono state eseguite colorazioni istologiche standard quali ematossilina ed eosina e Sirius Red/Fast Green. L'idoneità dei campioni istologici è stata valutata

sulla base delle colorazioni istomorfologiche (tra i criteri di valutazione, la presenza di almeno cinque spazi portali).

Per le reazioni immunistochemiche, l'attività della perossidasi endogena è stata bloccata tramite incubazione per 30 minuti in perossido di idrogeno (2,5%). Gli antigeni sono stati smascherati tramite incubazione con Proteinasi K per 10 minuti a temperatura ambiente (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; codice S3020). Le sezioni sono state quindi incubate per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario (**Tabella 1**). I campioni sono stati poi sciacquati con soluzione tampone (PBS) e successivamente incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con anticorpo secondario biotinilato, seguito da un'incubazione con il complesso streptavidina-perossidasi (LSAB+ kit, Dako; codice K0690). Come substrato cromogeno è stata usata la diaminobenzidina (Dako; codice K3468) e le sezioni sono state successivamente contrastate con ematossilina.

Per le reazioni di immunofluorescenza, le sezioni sono state incubate con anticorpi primari per una notte a 4°C. I campioni sono stati sciacquati con PBS e successivamente incubati per 45 minuti con anticorpi secondari specie-specifici (AlexaFluor®, ThermoFisher Scientifics, Waltham, MA, USA); le sezioni sono state contrastate con 4',6-diamino-2-fenilindolo (DAPI) per la visualizzazione dei nuclei. Per tutte le reazioni sono stati inclusi anche controlli negativi, in cui l'anticorpo primario è stato sostituito da PBS.

Tutte le sezioni istologiche sono state esaminate in cieco tramite il microscopio Leica Microsystems DM4500B (Leica, Wetzlar, Germany); successivamente, le sezioni sono state acquisite digitalmente tramite scansione con il sistema Aperio (Aperio ScanScope CS System oppure Aperio ScanScope FL, Aperio Digital Pathology, Leica Biosystems) ed analizzate tramite il software di analisi delle immagini ImageScope (Aperio Digital Pathology, Leica Biosystems).

La valutazione isto-patologica dei pazienti affetti da NAFLD, è stata svolta sulla base dei criteri del NAFLD Clinical Research Network (CRN) (79, 80) ed applicando l'algoritmo FLIP (81, 82). Nelle biopsie di pazienti affetti da PBC e PSC, lo stadio di fibrosi è stato valutato sulla base dei criteri di Ludwig (83). I grandi dotti biliari ottenuti da pazienti affetti da PSC e da NAS sono stati valutati, tramite le colorazioni istomorfologiche, in termini di numero di focolai infiammatori e spessore della parete del dotto.

Per quanto riguarda le reazioni immunoistochimiche e di immunofluorescenza, la positività a determinati antigeni è stata valutata in termini di numero di cellule positive per campo microscopico a 40x o, in alternativa, calcolata automaticamente sull'intera sezione tramite un algoritmo ed espressa come percentuale di area positiva o come score semi-quantitativo (0= <5%; 1=5-10%; 2=11-30%; 3=31-50%; 4=>50%). Il significato biologico dei singoli antigeni studiati è riassunto in **Tabella 1**.

L'entità dell'attivazione delle HpSC è stata valutata in termini di estensione della reazione duttale, mentre il commissionamento verso il destino epatocitario è stato quantificato sulla base della presenza di epatociti intermedi e/o dell'espressione di HepPar1 nei dotti reattivi. L'estensione della reazione duttale è stata valutata mediante colorazione immunoistochimica per CK7; l'area occupata dai dotti reattivi CK7⁺ è stata calcolata automaticamente mediante ImageScope; i dotti biliari interlobulari sono stati manualmente esclusi dal conteggio. La presenza di epatociti intermedi è stata valutata mediante colorazione immunoistochimica per CK7 o EpCAM, ed espressa con il seguente sistema: 0= assenza di epatociti intermedi; 1= singoli/occasionali epatociti intermedi; 2= cluster di epatociti intermedi (84). Il numero delle giunzioni duttulo-canicolari è stato valutato in doppie immunofluorescenze per CK7 e ABCB11 e definito come il punto di giunzione tra i dotti biliari (CK7⁺) ed i canalicoli (ABCB11⁺); le giunzioni sono state

contate a livello di tutti gli spazi portalari in ciascuna sezione e sono riportate come numero di giunzioni per spazio portale oppure come rapporto giunzioni/duttuli dell'intera sezione.

L'area delle ghiandole peribiliari è stata misurata tramite ImageScope su colorazioni immunoistochimiche per CK7 ed è espressa come percentuale dell'area della parete del dotto occupata da ghiandole peribiliari. La densità microvascolare nella parete dei dotti è stata calcolata come l'area occupata da vasi positivi al fattore di von Willebrand (vWF) tramite ImageScope, ed espressa come estensione ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$).

3.3 COLTURE CELLULARI

Le BTSC umane sono state isolate dalle vie biliari extraepatiche umane (58, 63) e coltivate in sospensione, utilizzando piastre a bassa adesività, in Kubota Medium (KM), un terreno di coltura privo di siero sviluppato per la sopravvivenza e l'espansione di cellule staminali/progenitrici endodermiche (85). La crescita degli sferoidi (in termini di modificazioni di morfologia, dimensioni e numero) è stata valutata 24 ore dopo l'isolamento e dopo 4 e 7 giorni in coltura.

Per valutare gli effetti *in vitro* delle vie di segnalazione sulle cellule staminali biliari umane sono stati sviluppati specifici terreni di coltura, utilizzando come base il KM ed aggiungendo specifici fattori di attivazione dei pathway di Notch e di Wnt/ β -catenina. In particolare, sono stati utilizzati i seguenti terreni: i) terreno di stimolazione del pathway di Notch (Notch-medium: Notch-M): KM con aggiunta di DLL-1 (attivatore del pathway di Notch), dorsomorfina (inibitore del pathway di BMP) e ciclopamina (inibitore del pathway di Hedgehog); ii) terreno di stimolazione del pathway di Wnt (Wnt-M): KM con aggiunta di R-spondina 1 (attivatore di Wnt), DAPT (inibitore del pathway di Notch), dorsomorfina e ciclopamina.

La proliferazione delle BTSC è stata valutata in termini di tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare (86). L'RNA totale è stato estratto dalle colture cellulari secondo procedure standard (87) ed i livelli di mRNA sono stati analizzati tramite RT-qPCR, come precedentemente descritto (86). Per l'immunofluorescenza, le cellule sono state coltivate su *chamber slide* e poi fissate con acetone.

3.4 ANALISI STATISTICA

Le variabili categoriali sono state riportate come percentuale; le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard, o come mediana e range interquartile. La distribuzione normale dei parametri è stata valutata tramite il test di Kolmogorov-Smimov. Per le variabili continue con distribuzione normale sono stati utilizzati il test *t* di Student per campioni non appaiati e l'analisi di correlazione di Pearson. Per le variabili con distribuzione non normale sono stati utilizzati il test U di Mann-Whitney ed il test di correlazione di Spearman. Per lo studio di variabili ottenute dagli stessi pazienti in due tempi diversi è stato utilizzato il test di Wilcoxon per dati appaiati. Le variabili categoriali sono state paragonate utilizzando il test del Chi-quadro o il test esatto di Fischer. Per le correlazioni multivariate, sono stati utilizzati modelli di regressione lineare. La significatività statistica è stata fissata come un valore $p < 0,05$. Le analisi sono state svolte utilizzando il software IBM SPSS Statistics (v25.0, IBM, Armonk, NY, USA).

4. RISULTATI

4.1 STUDIO DELL'ATTIVAZIONE DELLE HpSC

4.1.1 La nicchia delle HpSC nella patogenesi delle malattie epatobiliari

La nicchia delle HpSC nei pazienti affetti da NAFLD¹

Le caratteristiche antropometriche e cliniche dei pazienti sono riportate nella **Tabella 2**. Sulla base dell'algoritmo diagnostico FLIP, i pazienti nella coorte in esame sono stati suddivisi in pazienti con steatosi semplice (N=25) e pazienti con steatoepatite (NASH: N=25). I valori ottenuti dalla caratterizzazione istomorfologica dei pazienti sono riportati nella **Tabella 3A**. Le biopsie ottenute da pazienti affetti da NASH erano caratterizzate da punteggi significativamente più alti di steatosi ed infiammazione lobulare e da un maggiore grado complessivo di attività di malattia (NAS) rispetto alle biopsie di pazienti con steatosi semplice ($p<0,01$; **Figura 1A**). Inoltre, i pazienti con NASH erano caratterizzati da uno stadio più avanzato di fibrosi rispetto a quelli con steatosi semplice ($p<0,001$; **Figura 1A**) e da una più frequente presenza di infiammazione portale ($p=0,023$).

Successivamente, l'attivazione delle HpSC è stata valutata sulla base dell'estensione della reazione duttale ed in termini di presenza di epatociti intermedi (**Figura 1B**). I pazienti affetti da NASH erano caratterizzati da un'estensione maggiore della reazione duttale ($5,6\pm 6,4\%$) rispetto a quelli con steatosi semplice ($1,5\pm 1,3\%$; $p=0,012$); i pazienti affetti da NASH presentavano inoltre un numero maggiore di epatociti intermedi (score: $1,0\pm 0,8$) rispetto ai pazienti con steatosi semplice (score: $0,4\pm 0,6$; $p=0,026$). Inoltre, l'estensione della reazione duttale era significativamente correlata con il punteggio NAS ($r=0,522$; $p=0,001$) e con lo stadio di fibrosi ($r=0,490$; $p=0,003$).

¹ I risultati riportati nella presente sezione sono stati ottenuti durante il periodo del Dottorato e sono oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

Carpino G, [...] Overi D, et al. Increased liver localization of lipopolysaccharides in human and experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2020 Aug;72(2):470-485 (ref. #88).

È stata poi valutata l'attivazione delle cellule fibrogenetiche, in termini di numero di cellule stellate e miofibroblasti portalì attivati (α SMA⁺; **Figura 1C**). I pazienti affetti da NASH erano caratterizzati da un numero maggiore sia di cellule stellate che di miofibroblasti portalì (rispettivamente $5,5\pm 4,2$ e $7,5\pm 5,9$) rispetto ai pazienti con steatosi semplice (rispettivamente $2,8\pm 2,4$ e $3,6\pm 2,9$; $p=0,025$ e $p=0,012$). Inoltre, il numero di miofibroblasti portalì è risultato correlato in maniera significativa con il punteggio NAS ($r=0,366$; $p=0,024$), con lo stadio di fibrosi ($r=0,340$; $p=0,039$) e con l'estensione della reazione duttale ($r=0,565$; $p<0,001$).

Successivamente, sono state valutate le diverse popolazioni di macrofagi (**Figura 2A; Tabella 3B**) sia a livello portale che lobulare, ed in particolare i macrofagi CD68⁺ e le sottopopolazioni di macrofagi S100A9⁺ (M1, pro-infiammatori) e CD163⁺ (M2, anti-infiammatori). Le biopsie di pazienti affetti da NAFLD presentavano un numero maggiore di macrofagi CD68⁺ lobulari ($15,9\pm 4,3$) e portalì ($8,6\pm 4,2$) rispetto ai fegati sani (rispettivamente $10,8\pm 2,0$ e $4,3\pm 1,2$; $p=0,011$ e $p=0,006$). Sia le biopsie di pazienti affetti da NASH che quelle di pazienti affetti da steatosi semplice mostravano un numero maggiore di macrofagi lobulari CD68⁺ rispetto ai fegati normali ($p<0,05$); diversamente, solo i fegati affetti da NASH mostravano un numero significativamente maggiore di macrofagi portalì CD68⁺ rispetto ai fegati sani ($p=0,009$). Inoltre, il numero di macrofagi CD68⁺ era significativamente correlato con il NAS ($r=0,598$; $p=0,040$).

Per quanto riguarda i macrofagi pro-infiammatori, il numero di macrofagi S100A9⁺ lobulari e portalì risultava aumentato nei pazienti affetti da NAFLD ($7,7\pm 4,1$ e $4,5\pm 2,9$) rispetto ai fegati normali ($4,2\pm 0,8$ e $0,6\pm 0,5$; $p=0,036$ e $p=0,004$, rispettivamente). I pazienti affetti da NASH, ma non quelli affetti da steatosi semplice, presentavano un numero maggiore di macrofagi S100A9⁺ lobulari ($p=0,014$) rispetto ai fegati normali; invece, il numero di macrofagi S100A9⁺ portalì era aumentato sia nella NASH ($p=0,001$) che nella steatosi semplice ($p=0,002$) rispetto

ai fegati sani. Il numero di macrofagi S100A9⁺ portalici correlava significativamente con il NAS ($r=0,742$; $p=0,000$), con la fibrosi ($r=0,481$; $p=0,043$) e con l'infiammazione portale ($r=0,511$; $p=0,001$).

Il numero dei macrofagi CD163⁺ lobulari e portalici era ridotto nella NAFLD (rispettivamente $4,5\pm 2,8$ e $1,0\pm 1,1$) rispetto ai fegati normali ($8,6\pm 1,5$ e $3,0\pm 1,6$; $p<0,05$). Inoltre, il numero dei macrofagi CD163⁺ lobulari era significativamente ridotto sia nei pazienti affetti da steatosi semplice ($6,2\pm 1,5$) che in quelli con NASH ($3,6\pm 2,3$) rispetto ai fegati normali ($p<0,05$), e nei pazienti con NASH rispetto a quelli con steatosi semplice ($p<0,05$). Il numero dei macrofagi CD163⁺ portalici era significativamente ridotto nella NASH ($0,3\pm 0,7$) ma non nella steatosi semplice ($1,7\pm 1,1$) rispetto ai fegati normali ($p<0,05$), e nella NASH rispetto alla steatosi semplice ($p<0,05$). Il numero dei macrofagi CD163⁺ lobulari era inversamente correlato con il NAS ($r=-0,666$; $p=0,013$).

La reazione duttale era correlata significativamente con il numero di macrofagi S100A9⁺ in sede portale ($r=0,617$; $p=0,008$), mentre non erano presenti correlazioni con il numero di macrofagi S100A9⁺ lobulari o con le altre sottopopolazioni macrofagiche.

Alla luce della correlazione osservata tra la reazione duttale ed i macrofagi pro-infiammatori, è stata indagata la presenza di macrofagi TLR4⁺ a livello dei sinusoidi epatici e negli spazi portalici nei pazienti affetti da NAFLD (**Figura 2A**). Il numero dei macrofagi TLR4⁺ è risultato maggiore nei pazienti con NAFLD ($10,7\pm 4,7$) rispetto ai fegati normali ($5,0\pm 2,1$; $p=0,01$). I macrofagi TLR4⁺ erano presenti sia in sede portale che lobulare. Un aumento significativo del numero dei macrofagi TLR4⁺ rispetto ai fegati normali era presente sia nei pazienti con NASH che in quelli con steatosi semplice ($p<0,05$). Le biopsie ottenute da pazienti affetti da NASH mostravano inoltre un numero maggiore di macrofagi TLR4⁺ rispetto a quelle ottenute da pazienti con steatosi semplice. Il numero di macrofagi TLR4⁺

risultava correlato con il NAS ($r=0,497$; $p=0,030$) e con lo score di fibrosi ($r=0,523$; $p=0,021$). Era inoltre presente una correlazione tra la reazione duttale ed il numero dei macrofagi TLR4⁺ ($r=0,636$; $p=0,008$), in particolare con i macrofagi TLR4⁺ in sede portale ($r=0,809$; $p<0,001$). Il numero dei macrofagi TLR4⁺ correlava con i livelli sierici di lipopolisaccaride (LPS, $r=0,595$; $p=0,009$), un potente attivatore del sistema TLR. In accordo, i macrofagi TLR4⁺ si presentavano positivi al lipopolisaccaride e co-esprimevano MyD88, un marcatore di attivazione del complesso TLR4 (**Figura 2B**).

La nicchia delle HpSC nei pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC) e da colangite sclerosante primitiva (PSC)²

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riassunte nelle **Tabelle 4A-B**. Tutte le biopsie sono state stadiate secondo i criteri di Ludwig (**Figura 3A**), ed i pazienti sono stati suddivisi in stadi precoci (Ludwig I/II) e stadi avanzati (Ludwig III/IV). Le biopsie ottenute da pazienti affetti da PBC erano caratterizzate da una maggiore estensione della reazione duttale (**Figura 3B**) sia negli stadi precoci ($5,1\pm 0,6\%$) che in quelli avanzati ($11,9\pm 1,4\%$) rispetto ai fegati normali ($2,4\pm 1,7\%$; rispettivamente $p<0,01$ e $p<0,001$); i pazienti in stadi più avanzati mostravano inoltre una reazione duttale significativamente più estesa rispetto agli stadi precoci ($p<0,001$). Nei campioni ottenuti da pazienti affetti da PSC (**Figura 3B**), la reazione duttale era leggermente, ma non significativamente, aumentata negli stadi precoci di PSC ($3,2\pm 1,2\%$; $p=0,28$) rispetto ai fegati normali; diversamente, gli stadi avanzati di PSC erano caratterizzati da una reazione duttale più estesa ($7,0\pm 2,0\%$) rispetto agli stadi precoci ed ai controlli ($p<0,05$). Al confronto tra le due colangiopatie, la reazione duttale risultava, a parità di stadio, significativamente inferiore nella PSC

² I risultati riportati nella presente sezione sono stati ottenuti durante il periodo del Dottorato e sono oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

Carpino G, [...] Overi D, et al. Hepatic Stem/Progenitor Cell Activation Differs between Primary Sclerosing and Primary Biliary Cholangitis. *American Journal of Pathology*. 2018 Mar;188(3):627-639 (ref. #89).

rispetto alla PBC ($p<0,01$). In entrambe le patologie, la reazione duttale era correlata con l'estensione della fibrosi (PBC: $r=0,63$, $p<0,01$; PSC: $r=0,62$; $p<0,01$).

L'indice di proliferazione della reazione duttale (valutato come percentuale di cellule della reazione duttale positive all'antigene di proliferazione cellulare - PCNA) era significativamente maggiore negli stadi precoci ($5,8\pm 2,9\%$; $p<0,01$) e in quelli avanzati della PBC ($38,8\pm 6,2\%$) rispetto ai fegati normali ($18,0\pm 2,1\%$; $p<0,01$), e negli stadi avanzati di PBC rispetto a quelli precoci ($p<0,05$; **Figura 3C**). In maniera analoga, nella PSC l'indice di proliferazione della reazione duttale era significativamente maggiore negli stadi precoci ($10,0\pm 3,7\%$) e in quelli avanzati ($24,4\pm 3,8\%$) rispetto ai fegati sani (rispettivamente $p<0,001$ e $p<0,05$), e negli stadi avanzati di PSC rispetto a quelli precoci ($p<0,001$; **Figura 3C**). Al confronto tra le due colangiopatie, l'indice di proliferazione della reazione duttale era maggiore nei pazienti con PBC rispetto a quelli con PSC ($p<0,001$).

Il confronto tra l'estensione della reazione duttale ed i parametri clinici ha mostrato che, nei pazienti affetti da PBC, la reazione duttale correlava con la bilirubina totale ($r=0,937$; $p<0,001$), con la γ GT ($r=0,736$; $p<0,05$), con i punteggi UK-PBC a 5, 10 e 15 anni ($r=0,785$, $r=0,820$ e $r=0,847$; $p<0,001$), nonché con i punteggi GLOBE PBC ($r=0,791$; $p<0,01$) e GLOBE PBC per la sopravvivenza liberi da trapianto a 3, 5 e 10 anni ($r=0,852$, $r=0,850$ e $r=0,833$; $p<0,01$). Nei pazienti affetti da PSC, la reazione duttale correlava con il punteggio Mayo ($r=0,827$; $p<0,05$) e con i livelli di bilirubina ($r=0,84$; $p<0,05$) ed inversamente con l'albumina sierica ($r=-0,84$; $p<0,05$).

Ruolo delle HpSC nella risposta al trattamento con acido ursodesossicolico (UDCA) in pazienti affetti da PBC

Lo studio è stato volto ad indagare il significato clinico-prognostico della reazione duttale con particolare interesse al ruolo della reazione duttale come fattore predittivo della risposta clinica alla terapia con UDCA. A tale scopo, è stata studiata una coorte più ampia di pazienti affetti da PBC (N=82) dei quali erano

disponibili la biopsia ed i dati clinici/sierologici al momento della diagnosi e di cui erano stati ottenuti nuovamente i dati clinici/sierologici dopo un anno di terapia con UDCA.

Le biopsie in questa coorte sono state classificate, sulla base della stadiazione istologica secondo Ludwig, in: Ludwig I (N=36), Ludwig II (N=22), Ludwig III (N=19) e Ludwig IV (N=5). Sono stati inoltre applicati i punteggi di attività di malattia secondo Nakanuma ed Ishak.

Per quanto riguarda la stadiazione secondo Ludwig, lo studio di questa coorte ha dimostrato la correlazione tra l'attivazione della reazione duttale e lo stadio di malattia (**Tabella 5A**). Inoltre, suddividendo i pazienti sulla base dello stadio secondo Ludwig, i pazienti in stadi avanzati (Ludwig III/IV) presentavano una reazione duttale più estesa ($6,9\pm 5,4\%$) ed un numero maggiore di epatociti intermedi (score: $1,7\pm 1,0$) rispetto agli stadi precoci (Ludwig I/II, rispettivamente $3,0\pm 2,7\%$ e score: $0,8\pm 1,0$; $p<0,001$; **Figura 4A**). Il confronto tra singoli stadi di Ludwig ha mostrato un progressivo aumento della reazione duttale e del numero di epatociti intermedi (**Tabella 5B**); i pazienti affetti da PBC con Ludwig I non presentavano differenze in termini di reazione duttale e numero di epatociti intermedi rispetto ai fegati normali.

Per quanto riguarda la valutazione istologica secondo il sistema di Nakanuma, l'estensione della reazione duttale (**Figura 4B**) ed il numero di epatociti intermedi erano significativamente correlati con lo stadio di fibrosi (rispettivamente, $r=0,510$ e $r=0,505$; $p<0,001$) e con il grado di duttopenia ($r=0,429$ e $r=0,615$; $p<0,001$). Diversamente, non sono state osservate correlazioni con l'attività di epatite e di colangite secondo Nakanuma e con la stadiazione secondo Ishak. Nel complesso questi dati indicano che lo stadio di malattia, ma non il grado di attività, rappresenta il principale fattore associato all'attivazione delle HpSC.

Nella coorte in esame, l'estensione della reazione duttale è risultata significativamente correlata alla fosfatasi alcalina (ALP: $r=0,644$; $p<0,001$), alle transaminasi (ALT: $r=0,326$; $p=0,002$) ed alla bilirubina ($r=0,241$; $p=0,026$). Diversamente, lo stadio di PBC secondo Ludwig risultava solo leggermente correlato alla fosfatasi alcalina ($r=0,248$; $p=0,021$) ed alle transaminasi (AST: $r=0,250$; $p=0,046$). Non erano invece presenti correlazioni significative tra i parametri biochimici e gli altri indici di danno istologico. L'analisi di regressione lineare ha individuato una correlazione significativa tra la reazione duttale ed i livelli di fosfatasi alcalina, indipendentemente dagli altri parametri istologici ($\beta=0,684$; $p=0,001$).

È stato successivamente valutato se l'estensione della reazione duttale potesse rappresentare un predittore della risposta all'UDCA (**Figura 4C**). In particolare, l'estensione della reazione duttale è risultata inversamente correlata allo score di risposta all'UDCA (UDCA Response Score – URS, $r=-0,738$; $p<0,001$) e direttamente correlata ai livelli di fosfatasi alcalina dopo 12 mesi di terapia con UDCA (ALP12: $r=0,734$; $p<0,001$). Inoltre, l'analisi di regressione lineare ha mostrato come la reazione duttale fosse un predittore significativo delle ALP12 ($\beta=0,734$; $p<0,001$), indipendentemente dagli altri parametri istologici studiati.

Successivamente, è stato valutato se la reazione duttale potesse essere in grado di aggiungere valore prognostico nei pazienti con lo stesso stadio istologico di malattia (**Tabella 5C**); lo studio di correlazione tra la reazione duttale e il punteggio URS ha mostrato come tale correlazione fosse presente in tutti gli stadi di malattia; diversamente, nei pazienti con Ludwig I, la reazione duttale non risultava significativamente correlata ad i livelli di ALP12. Dal momento che l'estensione della reazione duttale non era significativamente elevata nei pazienti in stadio I rispetto ai controlli, queste osservazioni sembrano suggerire che la reazione

duttale possa essere meno utile come predittore della risposta all'UDCA negli stadi precoci di malattia.

Per chiarire i meccanismi alla base delle correlazioni tra l'estensione della reazione duttale e la progressione del danno, sono stati studiati gli aspetti fenotipici dell'attivazione della nicchia delle HpSC in una sottopopolazione di 30 pazienti, rappresentativa dell'intera coorte in termini di stadio di malattia ed estensione della reazione duttale (**Figura 5A-C**).

Lo studio del fenotipo della reazione duttale in questi pazienti ha mostrato come i duttuli reattivi fossero caratterizzati da una minore espressione dei marcatori di colangiociti maturi quali il recettore per la secretina (score: $1,6 \pm 1,3$) e MUC1 (score: $0,4 \pm 0,7$) rispetto ai fegati normali (rispettivamente, score: $3,3 \pm 0,8$, $p < 0,008$ e score: $1,7 \pm 0,5$, $p < 0,004$; **Figura 5A**). Non sono state osservate correlazioni tra l'espressione di marcatori di colangiociti maturi e l'estensione della reazione duttale. La reazione duttale nei campioni con PBC presentava inoltre un'elevata espressione di Sox9 ($48,6 \pm 26,5\%$) senza differenze significative rispetto ai fegati normali ($54,4 \pm 23,1\%$; **Figura 5B**). L'espressione di Sox9 nei pazienti con PBC risultava correlata all'estensione della reazione duttale ($r=0,702$; $p < 0,001$) alla duttopenia ($r=0,501$; $p < 0,001$) ed ai livelli di fosfatasi alcalina ($r=0,631$; $p < 0,001$).

Lo studio delle giunzioni tra la reazione duttale ed i canalicoli biliari degli epatociti ha mostrato un numero significativamente inferiore di giunzioni per spazio portale ($0,7 \pm 0,7$) e di giunzioni per duttulo ($0,3 \pm 0,3$) significativamente inferiore nei pazienti affetti da PBC rispetto ai fegati normali (rispettivamente, $1,7 \pm 0,4$ e $0,6 \pm 0,1$; $p=0,002$ e $p=0,006$; **Figura 5C**). Rispetto ai fegati normali, il numero di giunzioni era inoltre significativamente inferiore negli stadi precoci ($p < 0,05$) ma non in quelli tardivi rispetto ai fegati normali. Infine, il numero delle giunzioni per spazio portale e delle giunzioni per duttulo risultavano direttamente correlati

all'estensione della reazione duttale (rispettivamente, $r=0,452$, $p=0,018$ e $r=0,486$, $p=0,010$).

Per quanto riguarda invece l'attivazione delle cellule fibrogenetiche, i pazienti affetti da PBC erano caratterizzati da un numero di cellule stellate attivate (αSMA^+) e miofibroblasti portali significativamente maggiore (rispettivamente, $4,9\pm 2,7$ e $6,4\pm 4,9$) rispetto ai fegati con istologia normale (rispettivamente, $2,8\pm 1,1$ e $2,7\pm 0,5$; $p<0,05$; **Figura 5B**). In particolare, lo studio separato delle biopsie in stadi precoci ed in stadi avanzati ha mostrato un aumento significativo delle cellule stellate e dei miofibroblasti portali attivati rispetto ai fegati normali nei pazienti in stadi avanzati (rispettivamente, $6,2\pm 2,8$ e $10,6\pm 6,4$; $p<0,01$) ma non quelli in stadi precoci (rispettivamente, $4,3\pm 2,6$ e $4,4\pm 2,3$). Gli stadi avanzati erano ulteriormente caratterizzati da un numero maggiore di miofibroblasti portali rispetto ai pazienti negli stadi precoci ($p=0,005$). Il numero delle cellule stellate e dei miofibroblasti attivati risultava significativamente correlato con l'estensione della reazione duttale (rispettivamente, $r=0,761$ e $r=0,878$; $p<0,001$) e con i livelli di fosfatasi alcalina alla diagnosi (rispettivamente, $r=0,607$ e $r=0,866$; $p<0,01$) e dopo un anno di trattamento con UDCA (rispettivamente, $r=0,820$ e $r=0,792$; $p<0,001$).

4.1.2 Vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione delle HpSC

Attivazione delle vie di segnalazione di Notch e Wnt nei pazienti affetti da colangiopatie³

Questa parte del presente studio è stata volta a valutare quale fosse lo stato di attivazione delle due principali vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione delle cellule progenitrici (Notch e di Wnt/ β -catenina; **Figura 6A-B**) nelle colangiopatie umane.

³ I risultati riportati nella presente sezione sono stati ottenuti durante il periodo del Dottorato e sono oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

Carpino G, [...] Overi D, et al. Hepatic Stem/Progenitor Cell Activation Differs between Primary Sclerosing and Primary Biliary Cholangitis. *American Journal of Pathology*. 2018 Mar;188(3):627-639 (ref. #89).

Per quanto riguarda il pathway di Notch, è stata osservata una maggiore espressione del ligando Notch1 da parte delle cellule della reazione duttale nei campioni di stadi avanzati di PBC (score: $3,6\pm 0,5$) e PSC (score: $2,8\pm 0,4$) rispetto ai controlli (score: $0,5\pm 0,1$; $p<0,05$), che risultava inoltre essere maggiore nella PBC rispetto alla PSC ($p<0,05$). Diversamente, lo studio del pathway di Wnt ha mostrato una maggiore espressione dei ligandi Wnt1 e Wnt3a nei campioni di PSC in stadi avanzati (rispettivamente, score: $2,8\pm 0,9$ e $2,0\pm 1,0$) e di PBC in stadi avanzati (score: $0,6\pm 0,5$ e $0,2\pm 0,5$) rispetto ai controlli (score: 0; $p<0,05$); inoltre, i pazienti con PSC in stadio avanzato presentavano dei livelli maggiori di Wnt1 e Wnt3a rispetto alla PBC in stadio avanzato ($p<0,05$). In accordo, è stata osservata una maggiore espressione della β -catenina non fosforilata (ovvero attivata) nei campioni di PSC (score: $3,3\pm 1,0$) e di PBC in stadi avanzati (score: $1,5\pm 1,0$) rispetto ai controlli (score: $0,5\pm 0,1$; $p<0,05$); inoltre, i pazienti affetti da PSC erano caratterizzati da livelli maggiori di β -catenina attivata rispetto ai pazienti con PBC ($p<0,05$).

Per valutare se la diversa attivazione delle vie di segnalazione evidenziata nei campioni di PSC e PBC fosse associata ad una differente modalità di attivazione delle HpSC, è dunque stato studiato il fenotipo delle cellule della reazione duttale (**Figura 6C**).

Nei campioni di fegato con istologia normale, è stato osservato tramite doppia immunofluorescenza che la maggioranza delle cellule CK7⁺ a livello dei duttuli di Hering co-esprimeva Sox9 (score: $3,6\pm 0,5$) e CK19 (score: 4 ± 0). Nei pazienti con PBC in stadio avanzato, la maggioranza dei duttuli reattivi si trovava all'interno dei setti fibrosi, e le cellule CK7⁺ co-esprimevano Sox9 (score: $3,8\pm 0,4$) e CK19 (score: $3,7\pm 0,5$). Nella PSC in stadi avanzati, i duttuli reattivi si trovavano all'interfaccia tra il parenchima e i setti fibrotici, con numerosi duttuli che si espandevano verso il centro del lobulo/nodulo; una percentuale variabile di cellule

CK7⁺ della reazione duttale co-esprimeva Sox9 (score: 1,2±0,4) e CK19 (score: 1,65±0,5), con valori inferiori rispetto ai controlli e rispetto alla PBC ($p<0,01$).

Sia nei fegati normali che nella PBC, le cellule dei duttuli reattivi risultavano perlopiù negative al marcatore epatocitario HepPar1 (score: 0). Invece, nei campioni di PSC in stadio avanzato ma non in stadio precoce erano presenti cellule HepPar1⁺ nei duttuli reattivi (score: 1±0,8). In accordo, la presenza di epatociti intermedi era maggiore nei campioni di PSC in stadio avanzato (score: 1,8±0,5) rispetto a quelli con PBC in stadio avanzato (score: 0,6±0,6; $p<0,01$), mentre erano del tutto assenti nei fegati normali e solo raramente visibili negli stadi più precoci di PSC e PBC.

4.2 STUDIO DELL'ATTIVAZIONE DELLE BTSC

4.2.1 La nicchia delle BTSC nella patogenesi delle malattie epatobiliari

Coinvolgimento delle BTSC e delle ghiandole peribiliari nella PSC e nelle NAS

La parete dei dotti biliari extraepatici affetti da PSC mostrava le alterazioni isto-morfologiche caratteristiche della patologia, quali la presenza di infiltrati infiammatori e la deposizione di fibre collagene (**Tabella 6; Figura 7A**). Inoltre, i dotti affetti da PSC erano caratterizzati da uno spessore maggiore della parete (969±207µm) rispetto ai dotti di controllo (132±58µm; $p<0,001$; **Figura 7A**).

Lo studio delle ghiandole peribiliari nei pazienti affetti da PSC (**Tabella 6**) ha evidenziato come i dotti biliari extraepatici affetti da PSC fossero caratterizzati da una maggiore estensione dell'area occupata dalle ghiandole peribiliari (5,6±2,5%) rispetto ai campioni di controllo (1,7±0,5%; $p<0,01$; **Figura 7B**). L'area occupata dalle ghiandole peribiliari risultava inoltre significativamente correlata all'entità dell'infiltrato infiammatorio nel dotto ($r=0,774$; $p<0,01$). In accordo, le ghiandole peribiliari presentavano una maggiore percentuale di cellule PCNA⁺ (proliferanti) nei campioni di PSC (38,7±11,0%) rispetto ai controlli (7,2±3,9%; $p<0,001$; **Figura 7C**). Nei dotti affetti da PSC, le ghiandole peribiliari erano inoltre costituite da una

percentuale maggiore di cellule Sox9⁺ (37,0±7,6%) rispetto ai campioni di controllo (15,2±6,3%; $p<0,01$; **Figura 8A**).

Le pareti dei dotti affetti da PSC presentavano inoltre una maggiore densità microvascolare (7.229±1.183 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$) rispetto ai dotti normali (2.305±869 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$; $p<0,001$; **Figura 8B**); la densità microvascolare risultava correlata con il numero di infiltrati infiammatori ($r=0,580$; $p<0,05$). Le cellule delle ghiandole peribiliari nei dotti affetti da PSC mostravano una maggiore espressione di VEGF-A (score: 2,8±1,2%) rispetto ai dotti normali (score: 0,7±0,8%; $p<0,01$; **Figura 8B**).

Lo studio dei dotti biliari extraepatici nei pazienti affetti da NAS (**Tabella 6**) ha mostrato come le ghiandole peribiliari risultassero fortemente danneggiate e con aspetti di necrosi in percentuale maggiore (score: 2,4±1,2) rispetto ai controlli (score: 0,4±0,5; $p<0,01$) ed ai campioni di PSC (score: 0,8±0,8; $p<0,05$; **Figura 7B**). In accordo, i dotti affetti da NAS erano caratterizzati da una minore estensione dell'area occupata dalle ghiandole peribiliari (1,0±0,5%) rispetto ai campioni di controllo e di PSC ($p<0,05$ e $p<0,001$, rispettivamente). In parallelo, le ghiandole peribiliari nei dotti affetti da NAS presentavano una ridotta percentuale di cellule PCNA⁺ (19,9±7,8%; **Figura 7C**) rispetto ai controlli ($p<0,01$) ed ai campioni di PSC ($p<0,01$).

Lo studio del fenotipo delle ghiandole peribiliari nei dotti biliari affetti da NAS (**Figura 8A-B**) ha mostrato una minore percentuale (score: 1,0±0,7) di cellule con ciglio primario (marcatore di colangiociti maturi) rispetto ai controlli (score: 2,6±0,9; $p<0,05$) ed ai campioni di PSC (score: 3,2±0,8; $p<0,01$). L'espressione del marcatore Sox9 nelle ghiandole peribiliari ha mostrato una percentuale nei dotti NAS (11,7±11,8%) non diversa dai controlli ($p=0,561$) ma ridotta rispetto ai campioni PSC ($p<0,01$).

La parete dei dotti biliari extraepatici affetti da NAS era caratterizzata da uno spessore maggiore della parete (505±130 μm) rispetto ai dotti di controllo ($p<0,001$; **Figura 7A**) ma minore rispetto ai campioni PSC ($p<0,05$). Inoltre, i dotti affetti da

NAS presentavano una minore densità microvascolare ($1.505 \pm 578 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$; **Figura 8C**) rispetto ai dotti normali ($p < 0,05$) ed ai dotti affetti da PSC ($p < 0,001$). Infine, le cellule delle ghiandole peribiliari nei dotti affetti da NAS mostravano inoltre una maggiore espressione di VEGF-A (score: $2,3 \pm 1,0\%$; **Figura 8C**) rispetto ai dotti normali ($p < 0,05$) ma non significativamente diversa rispetto ai campioni di PSC ($p = 0,382$).

4.2.2 Vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione delle BTSC

Isolamento e coltura delle BTSC umane

Lo studio delle BTSC umane *in vitro* è stato svolto isolando tali cellule dalle vie biliari extraepatiche umane (**Figura 9A**).

In breve, si è provveduto a separare le vie biliari dal tessuto epatico tramite dissezione; successivamente, le vie biliari sono state frammentate e trasferite in una soluzione di digestione composta da collagenasi e DNasi a bagnomaria (37°C). La sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata e filtrata. Successivamente le cellule sono state incubate per un'ora in una piastra per colture cellulari al fine di rimuovere le cellule stromali rimaste; il soprannatante contenente le cellule in sospensione è stato raccolto e trasferito in piastre a bassa adesività. Dopo poche ore di coltura in Kubota's Medium (KM), le BTSC si sono organizzate spontaneamente in aggregati tridimensionali (c.d. sferoidi).

Dopo 24 ore dall'isolamento, gli sferoidi in coltura apparivano in prevalenza di piccole dimensioni ($21,75 \pm 7,98 \mu\text{m}$); il loro diametro aumentava progressivamente nei tempi sperimentali successivi ($26,8 \pm 10,8 \mu\text{m}$ a 4 giorni; $32,5 \pm 21,5 \mu\text{m}$ a 7 giorni; $p < 0,001$); in parallelo, si evidenziava un'aumentata proporzione degli sferoidi di grandi dimensioni ($> 50 \mu\text{m}$; $p < 0,001$).

Effetti in vitro delle vie di segnalazione di Wnt/ β -catenina e Notch sulle BTSC umane⁴

Gli effetti delle vie di segnalazione sulle BTSC sono stati studiati mediante coltura in terreni specifici per la stimolazione del pathway di Wnt/ β -catenina (Wnt-M) e di Notch (Notch-M).

Gli effetti del terreno di coltura nell'effettiva stimolazione del pathway di Wnt/ β -catenina (**Figura 9B**) sono stati dimostrati tramite immunofluorescenza, con l'osservazione di un aumento dell'espressione della forma attiva della β -catenina (non fosforilata) rispetto al livello totale di proteina. In tali condizioni, le BTSC mostravano una maggiore proliferazione rispetto alle condizioni di controllo (ovvero la coltura in KM), come dimostrato dall'aumentata espressione di PCNA in immunofluorescenza. Inoltre, le cellule coltivate in Wnt-M non presentavano modificazioni nell'espressione di geni di staminalità, né segni di differenziamento verso il destino epatocitario o colangiocitario.

La coltura delle BTSC in Notch-M (**Figura 9C**) ha provocato, come atteso, l'attivazione della via di segnalazione di Notch come dimostrato dall'espressione citoplasmatica di Notch1 mediante immunofluorescenza. In tali condizioni, le cellule hanno mostrato una riduzione della proliferazione cellulare ed un'aumentata espressione di marcatori di colangiociti maturi, quali il recettore per la secretina ed il ciglio primario.

Attivazione delle vie di segnalazione di Notch e Wnt/ β -catenina in corso di PSC⁵

Successivamente, sono state studiate le vie di segnalazione a livello delle ghiandole peribiliari dei pazienti affetti da PSC. Per quanto riguarda l'attivazione del pathway di Wnt, è stato osservato un aumento dell'espressione della β -catenina attivata nelle ghiandole peribiliari nei campioni PSC rispetto ai campioni di

⁴⁻⁵I risultati riportati nelle presenti sezioni sono stati ottenuti durante il periodo del Dottorato e sono oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

Carpino G, [...] Overi D, et al. *Peribiliary gland niche participates in biliary tree regeneration in mouse and in human primary sclerosing cholangitis*. *Hepatology*. 2020 Mar;71(3):972-989 (ref.# 90).

controllo ($p < 0,05$; **Figura 9D**). Doppie immunofluorescenze per il marcatore di cellule infiammatorie S100A9 e per i ligandi di Wnt (Wnt1 e Wnt3a) hanno mostrato come tali fattori fossero espressi dalle cellule infiammatorie infiltranti i dotti biliari affetti da PSC (**Figura 9E**). Per quanto riguarda la via di segnalazione di Notch, le ghiandole peribiliari nei campioni PSC mostravano un aumento dell'espressione di Notch1 (score: 2), Notch2 (score: 4; **Figura 9F**) e del fattore di trascrizione nucleare Hes1 (score: 4) rispetto ai campioni di controllo ($p < 0,05$). Lo studio dei ligandi di Notch ha mostrato come l'espressione di DLL4 e Jag2 fosse aumentata nelle ghiandole peribiliari nei campioni PSC (score: 3) rispetto ai campioni di controllo (score: 3; $p < 0,05$). Tali fattori erano espressi sia da cellule delle ghiandole peribiliari che da cellule infiammatorie e stromali attorno alle ghiandole stesse (**Figura 9G**).

5. DISCUSSIONE

I principali risultati del presente studio relativi alla nicchia delle HpSC hanno dimostrato che: i) l'attivazione delle HpSC è correlata allo stadio di fibrosi nella NAFLD e nelle colangiopatie (PBC e PSC), in associazione con lo stato di attivazione dei miofibroblasti e, nella NAFLD, con i macrofagi ed il sistema di TLR4; nei pazienti con PBC, l'estensione della reazione duttale rappresenta un predittore della probabilità di risposta alla terapia di prima linea; ii) le vie di segnalazione di Wnt/ β -catenina e Notch sono coinvolte differentemente nella PBC e nella PSC, in associazione al fenotipo ed allo stato di attivazione delle HpSC. In parallelo, lo studio della nicchia delle BTSC ha dimostrato che: i) l'attivazione delle BTSC è correlata allo sviluppo di stenosi delle vie biliari nella PSC e significativamente compromessa nella patogenesi delle stenosi non-anastomotiche delle vie biliari (NAS) dopo trapianto di fegato; ii) le vie di segnalazione di Wnt/ β -catenina e Notch sono in grado di indurre *in vitro* la proliferazione delle BTSC ed il loro differenziamento verso il destino colangiocitario e risultano attivate in corso di PSC.

La NAFLD è una patologia epatica caratterizzata da danno cronico degli epatociti dovuto ad un eccessivo accumulo di acidi grassi a livello degli epatociti, in un processo definito "lipotossicità" (91, 92). In tale contesto, i processi rigenerativi a livello del parenchima epatico sono caratterizzati dall'emergenza della reazione duttale e dall'attivazione del compartimento delle HpSC (42, 84, 93, 94). In particolare, il presente studio ha dimostrato che, nei pazienti affetti da NAFLD, l'espansione del compartimento delle HpSC è associata all'attivazione delle cellule di supporto della nicchia, quali i miofibroblasti portalì ed i macrofagi. In questi pazienti, l'attivazione delle HpSC (in termini di reazione duttale) è infatti risultata correlata allo stadio di fibrosi ed al numero di cellule fibrogenetiche attivate, soprattutto a livello portale; tale dato è in accordo con il ruolo dell'attivazione delle HpSC nel determinare lo sviluppo di un pattern di fibrosi periportale che, nella

NAFLD, si è dimostrato più rapidamente progressivo (26, 56, 95, 96). In parallelo, è stato dimostrato come l'entità della reazione duttale sia a sua volta correlata al numero di macrofagi pro-infiammatori a livello portale, ed in maniera particolare alla presenza di macrofagi TLR4⁺. Tramite tale recettore, i macrofagi sono in grado di riconoscere molecole associate al danno tissutale (tra cui il lipopolisaccaride) (97, 98). Nel presente studio è stato osservato come i pazienti con NASH presentassero un numero maggiore di macrofagi TLR4⁺ a livello portale e come essi risultassero positivi al lipopolisaccaride; tali osservazioni suggeriscono come il lipopolisaccaride da traslocazione intestinale possa localizzarsi a livello dei macrofagi portali nel fegato ed attivare localmente il sistema TLR4. La correlazione osservata tra i macrofagi TLR4⁺ portali e l'estensione della reazione duttale suggerisce inoltre una possibile influenza del sistema lipopolisaccaride-TLR4, tramite i macrofagi epatici, nell'attivazione delle HpSC e, pertanto, sulla progressione del danno epatico. Nel complesso, le osservazioni ottenute nei pazienti affetti da NAFLD indicano come l'attivazione delle HpSC sia correlata allo stadio di fibrosi ed associata, mediante un potenziale rapporto di influenza reciproca, allo stato di attivazione delle cellule infiammatorie e fibrogenetiche.

Una rilevante attivazione della nicchia delle HpSC può essere osservata anche nelle colangiopatie, patologie che colpiscono le vie biliari causando una compromissione del flusso biliare (colestasi) e conseguente danno epatico (99). Tra le colangiopatie umane primitive, la PBC e la PSC differiscono tra loro sulla base del bersaglio primario del danno, delle caratteristiche istopatologiche e degli aspetti clinici: la PBC è una colangiopatia cronica caratterizzata da danno immuno-mediato dei dotti biliari interlobulari che nel tempo evolve nella scomparsa dei dotti biliari interlobulari negli spazi portali (la cosiddetta duttopenia); diversamente, la PSC è caratterizzata dallo sviluppo di multiple lesioni stenose su base infiammatoria/fibrotica a livello dei grandi dotti biliari intraepatici e dei dotti

extraepatici. In entrambe le patologie, l'evoluzione del danno biliare porta, comunque, ad un coinvolgimento del parenchima epatico per colestasi, con la comparsa della reazione duttale e lo sviluppo di fibrosi epatica progressiva (25, 26).

In tale contesto, nel presente studio è stato osservato come la reazione duttale fosse significativamente correlata con l'estensione della fibrosi e con lo stadio di malattia in entrambe le patologie. Tuttavia, la PBC era caratterizzata da una reazione duttale più estesa ed aumentata significativamente negli stadi precoci rispetto alla PSC, in cui era di minore entità ed appariva significativa solo negli stadi più avanzati. La reazione duttale era inoltre caratterizzata da cellule con un fenotipo staminale/biliare nella PBC, mostrando invece evidenti segni di differenziamento in senso epatocitario nella PSC.

In accordo con il ruolo determinante della reazione duttale nella progressione della fibrosi, nel presente studio è stata inoltre osservata una correlazione significativa tra l'estensione della reazione duttale e gli score prognostici nelle due patologie. La stadiazione istologica rappresenta un predittore dell'evoluzione clinica sia nei pazienti con PBC (100, 101) che nei pazienti affetti da PSC (99). Tali osservazioni suggeriscono come la valutazione dell'estensione della reazione duttale nelle biopsie epatiche al momento della diagnosi possa rappresentare un ulteriore marcatore prognostico utile nell'inquadramento dei pazienti affetti da colangiopatie. Alla luce della correlazione osservata tra l'estensione della reazione duttale ed una peggiore prognosi osservata nei pazienti con PBC, è stata studiata una casistica di pazienti naïve, dei quali erano disponibili la biopsia ed i dati clinici/sierologici al momento della diagnosi di PBC e di cui erano stati ottenuti nuovamente i dati sierologici dopo un anno di terapia con UDCA.

Il trattamento con UDCA rappresenta la terapia di prima linea per i pazienti con PBC (102). Purtroppo una frazione di pazienti è caratterizzata da una scarsa risposta alla terapia e la possibilità di indentificare tali pazienti a priori

permetterebbe di indirizzarli fin dall'inizio verso un trattamento di seconda linea, prevenendo una progressione ulteriore del danno (103). In tal senso, nel presente studio l'estensione della reazione duttale è risultata inversamente correlata al punteggio URS, uno score validato per la stima della probabilità di risposta alla terapia (103); inoltre, in maniera prospettica, l'estensione della reazione duttale alla diagnosi è risultata direttamente correlata ai livelli di fosfatasi alcalina dopo un anno di terapia, confermando come pazienti caratterizzati da una marcata attivazione del compartimento delle HpSC siano particolarmente a rischio di progressione del danno.

Tale osservazione ha spinto ad indagare se fossero presenti aspetti specifici della reazione duttale in grado di spiegare l'aumentato rischio di progressione osservato. In particolare, è stato osservato come i pazienti affetti da PBC fossero caratterizzati da un minor numero di giunzioni duttulo-canalicolari rispetto ai fegati con istologia normale, specialmente nei pazienti caratterizzati da elevati livelli di fosfatasi alcalina. D'altra parte, la correlazione osservata tra l'estensione della reazione duttale ed il numero di giunzioni duttulo-canalicolari sembra indicare come l'attivazione delle HpSC possa essere indirizzata al tentativo di ripristino dell'integrità di tali giunzioni. In ogni caso, la stretta associazione tra l'attivazione delle HpSC e quella dei miofibroblasti portalari esita in una progressione del danno fibrotico, compromettendo un'efficiente riparazione del danno e determinando una prognosi peggiore per i pazienti.

L'osservazione di significative differenze del fenotipo e nelle modalità di attivazione delle HpSC nella PBC e nella PSC ha portato ad indagare eventuali differenze nell'espressione di molecole delle vie di segnalazione di Notch e Wnt/ β -catenina (28, 104). Tale analisi ha mostrato che i pazienti affetti da PBC erano caratterizzati da una elevata espressione di Notch a livello della reazione duttale. Tale via di segnalazione è implicata nel differenziamento in senso colangiocitario

delle cellule progenitrici epatiche (28, 104, 105), indicando come, nei pazienti affetti da PBC, la reazione duttale possa essere stimolata verso la riparazione del danno colangiocitario a livello dei dotti interlobulari. Diversamente, nella PSC è stata osservata una maggiore attivazione del pathway di Wnt/ β -catenina nella nicchia delle HpSC. È stato precedentemente dimostrato come l'attivazione di tale via di segnalazione a livello della nicchia abbia un ruolo nel determinare la proliferazione ed il differenziamento in senso epatocitario delle HpSC (28, 104-106), suggerendo che l'attivazione delle HpSC nei pazienti affetti da PSC possa essere stimolata a partecipare al rinnovamento del parenchima epatico a seguito del danno colestatico. Nel complesso, i risultati del presente lavoro confermano come le vie di segnalazione coinvolte nella rigenerazione a seguito di danno rispecchino un diverso pattern di attivazione e commissionamento delle HpSC, sulla base dello specifico bisogno rigenerativo.

Per quanto riguarda la PSC, la stadiazione e lo studio della progressione della malattia sono largamente basati sulla valutazione del danno a livello epatico (69); solo in tempi relativamente recenti l'attenzione è stata rivolta anche ai processi rigenerativi a livello dei dotti effettivamente colpiti dal danno primario, ovvero i dotti biliari intraepatici di grandi dimensioni ed i dotti extraepatici. Anche alla luce dello scarso commissionamento delle HpSC in senso biliare osservato nella PSC, il presente studio ha dunque avuto come scopo quello di valutare il contributo delle BTSC ai processi rigenerativi a livello dei dotti biliari extraepatici ed il ruolo delle principali vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione delle cellule staminali (Wnt/ β -catenina e Notch) (28, 104-106).

La PSC è caratterizzata dallo sviluppo di un grave danno immuno-mediato a carico dei grandi dotti biliari intraepatici e dei dotti extraepatici, con un prominente infiltrato infiammatorio e progressione del danno con lo sviluppo di multiple lesioni stenotiche delle vie biliari (107). In tale patologia, i processi

rigenerativi a carico dei dotti si associano ad un prominente coinvolgimento delle ghiandole peribiliari (70); in tal senso, il presente studio ha mostrato una florida attivazione delle ghiandole peribiliari e della popolazione delle BTSC nei pazienti affetti da PSC. In tali pazienti, i dotti biliari erano caratterizzati da fibrosi ed ispessimento della parete del dotto, associato ad un'aumentata massa delle ghiandole peribiliari. I dotti affetti da PSC erano inoltre caratterizzati da un'aumentata estensione del plesso vascolare peribiliare associata ad un'aumentata espressione da parte delle ghiandole peribiliari del fattore angiogenetico VEGF-A.

Oltre alla PSC, altre patologie acquisite dei dotti biliari possono coinvolgere il compartimento delle ghiandole peribiliari. Tra tali patologie, l'insorgenza di stenosi non-anastomotiche (NAS) delle vie biliari rappresenta una grave complicanza biliare a seguito del trapianto di fegato (73, 74, 108). Nel presente studio, i dotti biliari ottenuti da pazienti sottoposti a ritrapianto di fegato per NAS erano caratterizzati da un danno diffuso a carico delle ghiandole peribiliari che si presentavano fortemente necrotiche. Seppure il quadro clinico-radiologico delle NAS abbia numerosi aspetti in comune con la PSC (danno cronico infiammatorio, stenosi dei dotti biliari extraepatici e colestasi ascendente) (73, 107), le due patologie sono risultate istologicamente differenti per le modalità di coinvolgimento delle ghiandole peribiliari; esse risultano infatti iperplastiche nella PSC e fortemente danneggiate nella NAS come dimostrato dall'estensione della massa delle ghiandole e dall'indice di proliferazione delle cellule che le compongono. Inoltre, i dotti affetti da NAS erano caratterizzati da una severa riduzione dei vasi del plesso peribiliare, quest'ultima associabile al danno necrotico a carico delle ghiandole peribiliari. Le ghiandole peribiliari nei dotti affetti da NAS hanno mostrato una riduzione del numero di cellule con ciglio primario ed un parallelo aumento della frazione delle cellule Sox9 positive e dell'espressione di VEGF-A. Tali osservazioni suggeriscono che il danneggiamento delle ghiandole peribiliari nei pazienti affetti

da NAS implichi una perdita delle cellule più mature (109-111) ed un tentativo di risposta compensatoria al danno ischemico da parte del compartimento staminale (BTSC) residente (112, 113).

Al fine di approfondire il contributo del compartimento delle ghiandole peribiliari nella rigenerazione dei dotti biliari, lo studio ha avuto l'obiettivo di identificare anche a livello della nicchia delle BTSC gli effetti delle vie di segnalazione di Wnt/ β -catenina e Notch. In particolare, gli effetti diretti di tali vie sul comportamento delle BTSC sono stati valutati *in vitro*, coltivando le BTSC isolate dalle vie biliari umane in terreni di coltura in cui erano stati aggiunti elementi di stimolazione di un pathway e di inibizione di altri. In particolare, la specifica stimolazione del pathway di Wnt/ β -catenina ha determinato un'aumentata proliferazione delle BTSC, mantenendone l'espressione di marcatori di staminalità; diversamente, la stimolazione della via di segnalazione di Notch ha portato al differenziamento delle BTSC verso un destino colangiocitario.

Infine, sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, è stato valutato il ruolo delle vie di segnalazione di Wnt/ β -catenina e di Notch nell'attivazione delle BTSC. In particolare, nella PSC, è stata osservata un'aumentata attivazione di entrambe le vie di segnalazione a livello delle ghiandole peribiliari, associata alla produzione di ligandi da parte delle BTSC stesse, dei miofibroblasti e delle cellule infiammatorie infiltranti. Tali risultati suggeriscono e supportano il concetto che il danno infiammatorio cronico nei dotti affetti da PSC possa provocare un'attivazione continua delle BTSC da parte delle cellule infiammatorie; in precedenza, è stato dimostrato che, a loro volta, le BTSC attivate producano una serie di fattori capaci di stimolare l'infiammazione e le cellule fibrogenetiche (114); pertanto, nella PSC, è possibile ipotizzare lo stabilirsi di un sorta di circolo vizioso tra BTSC, cellule infiammatorie e miofibroblasti che esita nella fibrosi del dotto piuttosto che nella sua *restitutio ad integrum*.

6. CONCLUSIONI

L'attivazione delle HpSC rappresenta una caratteristica comune di malattie epatiche e delle vie biliari umane; essa risulta correlata all'entità del danno parenchimale e della fibrosi, e si accompagna al reclutamento di cellule fibrogenetiche ed infiammatorie. In particolare, nella NAFLD l'emergenza di una popolazione di macrofagi pro-infiammatori e l'attivazione del sistema TLR4 sono correlate all'estensione della reazione duttale. Nelle colangiopatie umane primitive, il fenotipo della reazione duttale e le vie di segnalazione coinvolte differiscono a seconda dello specifico bisogno rigenerativo, sulla base della patogenesi del danno e rispetto al target cellulare primariamente coinvolto. L'attivazione delle HpSC ha un risvolto clinico rilevante nelle colangiopatie, risultando correlata con la prognosi di malattia e, nella PBC, predittiva della risposta alla terapia di prima linea.

Le ghiandole peribiliari e le BTSC sono coinvolte nella patogenesi delle colangiopatie che colpiscono i dotti biliari intraepatici di grandi dimensioni ed i dotti biliari extraepatici, risultando fortemente attivate nella PSC e compromesse nelle stenosi non anastomotiche post-trapianto. Le vie di segnalazione di Wnt e Notch sono in grado di influenzare lo stato di attivazione delle BTSC e possono modulare l'attività di tale compartimento cellulare in corso di PSC.

In conclusione, l'identificazione dei meccanismi rigenerativi e delle vie di segnalazione coinvolte a livello della nicchia delle HpSC e di quella delle BTSC può fornire importanti informazioni per la comprensione della patogenesi delle malattie epatiche e delle vie biliari che possono avere implicazioni cliniche potenzialmente rilevanti.

BIBLIOGRAFIA

1. Chen F, et al. Broad Distribution of Hepatocyte Proliferation in Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2020;26(1):27-33 e4.
2. Sato K, et al. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology*. 2019;69(1):420-30.
3. Ramachandran P, et al. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(8):457-72.
4. Planas-Paz L, et al. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat Cell Biol*. 2016;18(5):467-79.
5. Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. Tityus: a forgotten myth of liver regeneration. *Journal of hepatology*. 2010;53(2):357-61.
6. Andersen KJ, et al. The natural history of liver regeneration in rats: description of an animal model for liver regeneration studies. *Int J Surg*. 2013;11(9):903-8.
7. Ang CH, et al. Lgr5(+) pericentral hepatocytes are self-maintained in normal liver regeneration and susceptible to hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(39):19530-40.
8. Wang AW, et al. The Dynamic Chromatin Architecture of the Regenerating Liver. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(1):121-43.
9. Lin S, et al. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury. *Nature*. 2018;556(7700):244-8.
10. Bird TG, Forbes SJ. Two Fresh Streams to Fill the Liver's Hepatocyte Pool. *Cell Stem Cell*. 2015;17(4):377-8.
11. Sun T, et al. AXIN2(+) Pericentral Hepatocytes Have Limited Contributions to Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2020;26(1):97-107 e6.
12. Reid LM. Stem/progenitor cells and reprogramming (plasticity) mechanisms in liver, biliary tree, and pancreas. *Hepatology*. 2016;64(1):4-7.
13. Wilkinson PD, et al. The Polyploid State Restricts Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice. *Hepatology*. 2019;69(3):1242-58.
14. Gadd VL, Aleksieva N, Forbes SJ. Epithelial Plasticity during Liver Injury and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2020;27(4):557-73.
15. Banales JM, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(9):557-88.
16. Alvaro D, et al. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology*. 2007;132(1):415-31.
17. Onori P, et al. Activation of the IGF1 system characterizes cholangiocyte survival during progression of primary biliary cirrhosis. *J Histochem Cytochem*. 2007;55(4):327-34.
18. Wu N, et al. The Functional Role of the Secretin/Secretin Receptor Signaling During Cholestatic Liver Injury. *Hepatology*. 2020.
19. Sampaziotis F, et al. Reconstruction of the mouse extrahepatic biliary tree using primary human extrahepatic cholangiocyte organoids. *Nat Med*. 2017;23(8):954-63.
20. Sato K, et al. Mechanisms of cholangiocyte responses to injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(4 Pt B):1262-9.

21. Lanzoni G, Cardinale V, Carpino G. The hepatic, biliary, and pancreatic network of stem/progenitor cell niches in humans: A new reference frame for disease and regeneration. *Hepatology*. 2016;64(1):277-86.
22. Theise ND, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*. 1999;30(6):1425-33.
23. Carpentier R, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1432-8, 8 e1-4.
24. Segal JM, et al. Single cell analysis of human foetal liver captures the transcriptional profile of hepatobiliary hybrid progenitors. *Nat Commun*. 2019;10(1):3350.
25. Libbrecht L, et al. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *Journal of hepatology*. 2000;33(1):76-84.
26. Spee B, et al. Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut*. 2010;59(2):247-57.
27. Alison MR, et al. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology*. 1996;110(4):1182-90.
28. Boulter L, Lu WY, Forbes SJ. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(5):1867-73.
29. Roskams TA, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004;39(6):1739-45.
30. Schmelzer E, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*. 2007;204(8):1973-87.
31. Aizarani N, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature*. 2019;572(7768):199-204.
32. Nomoto M, et al. Appearance of hepatocytelike cells in the interlobular bile ducts of human liver in various liver disease states. *Hepatology*. 1992;16(5):1199-205.
33. Deng X, et al. Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into Hepatocytes. *Cell Stem Cell*. 2018;23(1):114-22 e3.
34. Malato Y, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(12):4850-60.
35. Espanol-Suner R, et al. Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1564-75 e7.
36. Aleksieva N, Forbes SJ. Biliary-derived hepatocytes in chronic liver injury: Bringing new troops to the battlefield? *Journal of hepatology*. 2019;70(6):1051-3.
37. Lu WY, et al. Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol*. 2015;17(8):971-83.
38. Raven A, et al. Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature*. 2017;547(7663):350-4.
39. Crosby HA, et al. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *The American journal of pathology*. 1998;152(3):771-9.
40. Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology*. 2011;54(5):1853-63.

41. Stueck AE, Wanless IR. Hepatocyte buds derived from progenitor cells repopulate regions of parenchymal extinction in human cirrhosis. *Hepatology*. 2015;61(5):1696-707.
42. Wood MJ, et al. Ductular reaction in hereditary hemochromatosis: the link between hepatocyte senescence and fibrosis progression. *Hepatology*. 2014;59(3):848-57.
43. Yoon SM, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology*. 2011;53(3):964-73.
44. Katoonizadeh A, et al. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(10):1225-33.
45. Rastogi A, et al. Two-tier regenerative response in liver failure in humans. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2014;464(5):565-73.
46. Kim KH, et al. CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin alphavbeta(5)-mediated activation of NF-kappaB. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(5):1886-900.
47. Carpino G, et al. Macrophage Activation in Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Correlates with Hepatic Progenitor Cell Response via Wnt3a Pathway. *PloS one*. 2016;11(6):e0157246.
48. Bird TG, et al. Bone marrow injection stimulates hepatic ductular reactions in the absence of injury via macrophage-mediated TWEAK signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(16):6542-7.
49. Jakubowski A, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(9):2330-40.
50. Lorenzini S, et al. Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut*. 2010;59(5):645-54.
51. Kallis YN, et al. Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut*. 2011;60(4):525-33.
52. Hsieh WC, et al. Galectin-3 regulates hepatic progenitor cell expansion during liver injury. *Gut*. 2015;64(2):312-21.
53. Tsuchiya A, et al. Polysialic acid/neural cell adhesion molecule modulates the formation of ductular reactions in liver injury. *Hepatology*. 2014;60(5):1727-40.
54. Ge Y, Fuchs E. Stretching the limits: from homeostasis to stem cell plasticity in wound healing and cancer. *Nat Rev Genet*. 2018;19(5):311-25.
55. Grzelak CA, et al. The intrahepatic signalling niche of hedgehog is defined by primary cilia positive cells during chronic liver injury. *Journal of hepatology*. 2014;60(1):143-51.
56. Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*. 2014;146(2):349-56.
57. Coombes JD, et al. Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice. *Gut*. 2015;64(7):1120-31.
58. Carpino G, et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *Journal of anatomy*. 2012;220(2):186-99.
59. Carpino G, et al. Peribiliary Glands as a Niche of Extrapancreatic Precursors Yielding Insulin-Producing Cells in Experimental and Human Diabetes. *Stem Cells*. 2016;34(5):1332-42.

60. Igarashi S, et al. Participation of peribiliary glands in biliary tract pathophysiologies. *World J Hepatol.* 2013;5(8):425-32.
61. Cardinale V, et al. The biliary tree--a reservoir of multipotent stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(4):231-40.
62. Matsui S, et al. Characterization of Peribiliary Gland-Constituting Cells Based on Differential Expression of Trophoblast Cell Surface Protein 2 in Biliary Tract. *The American journal of pathology.* 2018;188(9):2059-73.
63. Cardinale V, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology.* 2011;54(6):2159-72.
64. Wang Y, et al. Biliary tree stem cells, precursors to pancreatic committed progenitors: evidence for possible life-long pancreatic organogenesis. *Stem Cells.* 2013;31(9):1966-79.
65. Carpino G, et al. Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder. *Journal of hepatology.* 2014;60(6):1194-202.
66. Nevi L, et al. Hyaluronan coating improves liver engraftment of transplanted human biliary tree stem/progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):68.
67. DiPaola F, et al. Identification of intramural epithelial networks linked to peribiliary glands that express progenitor cell markers and proliferate after injury in mice. *Hepatology.* 2013;58(4):1486-96.
68. Pedica F, Heaton N, Quaglia A. Peribiliary glands pathology in a large series of end-stage alcohol-related liver disease. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2020.
69. Dyson JK, et al. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet.* 2018;391(10139):2547-59.
70. Carpino G, et al. Activation of biliary tree stem cells within peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology.* 2015;63(5):1220-8.
71. Mavila N, et al. Expansion of prominin-1-expressing cells in association with fibrosis of biliary atresia. *Hepatology.* 2014;60(3):941-53.
72. Jung HY, et al. Sonic hedgehog (SHH) and glioblastoma-2 (Gli-2) expressions are associated with poor jaundice-free survival in biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2015;50(3):371-6.
73. Nakamura N, et al. Intrahepatic biliary strictures without hepatic artery thrombosis after liver transplantation: an analysis of 1,113 liver transplantations at a single center. *Transplantation.* 2005;79(4):427-32.
74. op den Dries S, et al. Injury to peribiliary glands and vascular plexus before liver transplantation predicts formation of non-anastomotic biliary strictures. *Journal of hepatology.* 2014;60(6):1172-9.
75. van Rijn R, et al. Hypothermic oxygenated machine perfusion reduces bile duct reperfusion injury after transplantation of donation after circulatory death livers. *Liver Transpl.* 2018;24(5):655-64.
76. General Assembly of the World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Coll Dent.* 2014;81(3):14-8.
77. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *Journal of hepatology.* 2017;67(1):145-72.

78. Chapman MH, et al. British Society of Gastroenterology and UK-PSC guidelines for the diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2019;68(8):1356-78.
79. Kleiner DE, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
80. Brunt EM, et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011;53(3):810-20.
81. Bedossa P, and the FLIP Pathology Consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565-75.
82. Bedossa P, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
83. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1978;379(2):103-12.
84. Nobili V, et al. Hepatic progenitor cells activation, fibrosis, and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;56(6):2142-53.
85. Wauthier E, et al. Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods Cell Biol*. 2008;86:137-225.
86. Nevi L, et al. Cryopreservation protocol for human biliary tree stem/progenitors, hepatic and pancreatic precursors. *Sci Rep*. 2017;7(1):6080.
87. Ribaldo R, et al. Preparation of RNA from tissues and cells. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 10:Unit 10 1.
88. Carpino G, et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. *Hepatology*. 2020;72(2):470-85.
89. Carpino G, et al. Hepatic Stem/Progenitor Cell Activation Differs between Primary Sclerosing and Primary Biliary Cholangitis. *The American journal of pathology*. 2018;188(3):627-39.
90. Carpino G, et al. Peribiliary Gland Niche Participates in Biliary Tree Regeneration in Mouse and in Human Primary Sclerosing Cholangitis. *Hepatology*. 2020;71(3):972-89.
91. Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut*. 2018;67(5):963-72.
92. Koliaki C, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739-46.
93. Richardson MM, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology*. 2007;133(1):80-90.
94. Gadd VL, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59(4):1393-405.
95. Della Corte C, et al. Docosahexanoic Acid Plus Vitamin D Treatment Improves Features of NAFLD in Children with Serum Vitamin D Deficiency: Results from a Single Centre Trial. *PloS one*. 2016;11(12):e0168216.
96. Guldiken N, et al. Keratin 23 is a stress-inducible marker of mouse and human ductular reaction in liver disease. *Journal of hepatology*. 2016;65(3):552-9.

97. Douhara A, et al. Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1693-700.
98. Miura K, et al. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010:362847.
99. de Vries E, Beuers U. Management of cholestatic disease in 2017. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2017;37 Suppl 1:123-9.
100. Angulo P, et al. Time course of histological progression in primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(11):3310-3.
101. Burak KW, Angulo P, Lindor KD. Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis? *Am J Gastroenterol.* 2003;98(5):1155-8.
102. Angulo P, et al. Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1999;29(3):644-7.
103. Carbone M, et al. Pretreatment prediction of response to ursodeoxycholic acid in primary biliary cholangitis: development and validation of the UDCA Response Score. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3(9):626-34.
104. Russell JO, Monga SP. Wnt/beta-Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:351-78.
105. Fabris L, et al. Pathobiology of inherited biliary diseases: a roadmap to understand acquired liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(8):497-511.
106. Boulter L, et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med.* 2012;18(4):572-9.
107. Lazaridis KN, LaRusso NF. Primary Sclerosing Cholangitis. *N Engl J Med.* 2016;375(12):1161-70.
108. de Vries Y, von Meijenfeldt FA, Porte RJ. Post-transplant cholangiopathy: Classification, pathogenesis, and preventive strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt B):1507-15.
109. Gaudio E, et al. Cholangiocytes and blood supply. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2006;12(22):3546-52.
110. Fujiwara H, et al. Mutant IDH1 confers resistance to energy stress in normal biliary cells through PFKP-induced aerobic glycolysis and AMPK activation. *Scientific reports.* 2019;9(1):18859.
111. Ryall JG, et al. Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. *Cell Stem Cell.* 2015;17(6):651-62.
112. Lokmic Z, et al. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;296:139-85.
113. Franchitto A, et al. Peribiliary gland damage due to liver transplantation involves peribiliary vascular plexus and vascular endothelial growth factor. *Eur J Histochem.* 2019;63(2).
114. Carpino G, et al. Neoplastic Transformation of the Peribiliary Stem Cell Niche in Cholangiocarcinoma Arisen in Primary Sclerosing Cholangitis. *Hepatology.* 2019;69(2):622-38.

RINGRAZIAMENTI

I campioni ed i dati clinici inclusi nel presente studio sono stati ottenuti grazie alle preziose collaborazioni scientifiche del Prof. Eugenio Gaudio con:

- Prof. Domenico Alvaro e Prof. Vincenzo Cardinale, Sapienza Università di Roma;
- Prof. Francesco Angelico e Prof. Francesco Violi, Sapienza Università di Roma;
- Prof. Pasquale B. Berloco e Prof. Massimo Rossi, Sapienza Università di Roma;
- Prof. Marco Carbone, Università di Milano-Bicocca, Monza;
- Prof. Tom H. Karlsen, Norwegian PSC Research Center, Oslo, Norvegia.

I dati sulle colture cellulari di BTSC sono stati ottenuti durante un periodo di ricerca presso il Dipartimento di Biologia Cellulare e Fisiologia dell'Università della Carolina del Nord (University of North Carolina – UNC, Chapel Hill, USA) coordinato dalla Prof.ssa Lola M. Reid, a cui va un sentito ringraziamento per la sua disponibilità, la sua ospitalità ed il suo supporto alla mia formazione.

TABELLE

Tabella 1. Elenco degli anticorpi primari utilizzati.

Anticorpo	Significato biologico	Produttore	Codice	Diluiz.
ABCB11	Proteina canalicolare	Atlas Antibodies	HPA019035	1:750
αSMA	Miofibroblasti	Dako	M8051	1:50
β-catenina	Forma attiva di β -cat	Cell Signaling Technology	8814S	1:50
CD163	Macrofagi M2	abcam	ab182422	1:100
CD68	Macrofagi	Dako	M0876	1:100
Citocheratina 7	Citocheratina biliare	Dako	M7018	1:100
Citocheratina 19	Citocheratina biliare	abcam	ab133496	1:100
DLL4	Ligando di Notch	Santa Cruz Biotechnology	sc-365429	1:50
EpCAM	HpSC/BTSC	Dako	M3525	1:100
HepPar1	Epatociti maturi	Dako	M7158	1:50
Jag2	Ligando di Notch	Santa Cruz Biotechnology	sc-5604	1:50
LPS	Endotossina	abcam	ab35654	1:50
MUC1	Colangiociti maturi	ThermoFisher	PA5-16847	1:50
MyD88	Effettore di TLR4	Santa Cruz Biotechnology	sc-136970	1:50
Notch 1	Isoforma del recettore Notch	Cell Signaling Technology	3608S	1:50
Notch 2	Isoforma del recettore Notch	Santa Cruz Biotechnology	sc-5545	1:50
PCNA	Cellule proliferanti	Dako	M0879	1:100
S100A9	Macrofagi M1	abcam	ab92507	1:100
SCTR	Colangiociti maturi	Sigma-Aldrich	AT12431	1:50
Sox9	HpSC/BTSC	Millipore	AB5809	1:100
TLR4	Recettore pathway omonimo	Atlas Antibodies	HPA049174	1:200
Tubulina acetilata	Ciglio primario	Sigma-Aldrich	T7451	1:100
VEGF-A	Fattore angiogenetico	Santa Cruz Biotechnology	sc-152	1:50
Wnt1	Ligando pathway Wnt/ β -catenina	Santa Cruz Biotechnology	sc-6280	1:50
Wnt3a	Ligando del pathway Wnt/ β -catenina	Millipore	09-162	1:50
vWF	Cellule endoteliali	Dako	M0616	1:50

Produttori: *Abcam*, Cambridge, UK; *Atlas Antibodies*, Bromma, Svezia; *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, USA; *Dako (Agilent)*, Santa Clara, CA, USA; *Millipore*, Burlington, MA, USA; *ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, USA; *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, TX, USA; *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, USA.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti adulti affetti da NAFLD.

	Steatosi semplice (N=25)	NASH (N=25)	<i>p</i>
Età (anni)	47,6 ± 14,2	51,1 ± 10,8	0,336
Donne (%)	52%	44%	0,778
Fumo di sigaretta	20%	36%	0,345
Ipertensione arteriosa	36%	56%	0,256
Diabete mellito	12%	56%	0,002
BMI (kg/m²)	28,1 ± 3,8	30,2 ± 3,9	0,060
Sindrome metabolica	43,5%	80%	0,016
Colesterolo totale (mg/dl)	187,5 ± 39,1	198,4 ± 32,9	0,301
Colesterolo LDL (mg/dl)	107,7 ± 30,9	120 ± 29,5	0,142
Colesterolo HDL (mg/dl)	53,6 ± 27,4	43,2 ± 11,0	0,085
Trigliceridi (mg/dl)	105 (85,0/150,0)	161,0 (116,0/197,0)	0,006
AST (U/L)	33 (27,0/43,5)	36,0 (30,0/69,0)	0,140
ALT (U/L)	53 (34,0/83,0)	61 (44,0/119,0)	0,125
γGT (U/L)	40 (23,0/82,0)	49 (31,0/91,5)	0,502
LPS (pg/ml)	108 (48,5/140,5)	70 (48,1/119,2)	0,337

I dati sono espressi come media ± deviazione standard, oppure come mediana (range interquartile). I valori *p* significativi sono evidenziati in grassetto.

NAFLD: steatosi epatica non alcolica; BMI: indice di massa corporea; NASH: steatoepatite; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; AST: aspartato-aminotransferasi; ALT: alanino-aminotransferasi; γGT: γ-glutamminil-transpeptidasi; LPS: lipopolisaccaride.

Tabella 3A. Istomorfologia dei pazienti adulti affetti da NAFLD.

	Steatosi semplice (N=25)	NASH (N=25)	<i>p</i>
NAS	2,73 ± 1	5,19 ± 1,18	0,000
Steatosi	1,08 ± 0,89	2,07 ± 0,87	0,000
Infiammazione Lobulare	0,73 ± 0,53	1,63 ± 0,63	0,000
Ballooning	0,92 ± 0,80	1,48 ± 0,75	0,006
Infiammazione portale	32%	64%	0,023
Fibrosi	1,38 ± 0,75	2,59 ± 0,80	0,000

I dati sono riportati come media ± deviazione standard. I valori *p* significativi sono riportati in grassetto.

NAFLD: steatosi epatica non alcolica; NASH: steatoepatite; NAS: NAFLD activity score.

Tabella 3B. Popolazioni di macrofagi in pazienti adulti affetti da NAFLD.

	Fegato sano (N=10)	NAFLD (N=50)	Steatosi semplice (N=25)	NASH (N=25)
Mφ CD68+ Lobulari	10,8 ± 2,0	15,9 ± 4,3 *	15,7 ± 5,2 *	16,4 ± 4,0 *
Mφ CD68+ Portali	4,3 ± 1,5	8,6 ± 4,2 *	5,3 ± 2,6	10,1 ± 4,0 #
Mφ S100A9+ Lobulari	4,2 ± 0,8	7,7 ± 4,1 *	8,2 ± 6,0 *	7,4 ± 2,9 *
Mφ S100A9+ Portali	0,6 ± 0,5	4,9 ± 2,9 *	2,3 ± 0,8 *	5,3 ± 2,8 #
Mφ CD163+ Lobulari	8,6 ± 1,5	4,5 ± 2,3 *	6,2 ± 1,5 *	3,6 ± 2,3 #
Mφ CD163+ Portali	3,0 ± 1,6	1,0 ± 1,1 *	1,7 ± 1,1	0,3 ± 0,7 #
Mφ TLR4+	4,9 ± 2,1	10,6 ± 4,7 *	8,6 ± 3,8 *	11,3 ± 5,0 *

I dati sono riportati come media ± deviazione standard. **p*<0,05 vs fegato normale; #*p*<0,05 vs fegato normale e steatosi semplice; °*p*<0,05 vs steatosi semplice.

NAFLD: steatosi epatica non alcolica; NASH: steatoepatite; NAS: NAFLD activity score; Mφ: macrofagi.

Tabella 4A. Caratteristiche dei pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC).

	PSC - Stadi precoci (N=10)	PSC - Stadi avanzati (N=10)	<i>p</i>
Età (anni)	32,9 ± 5,5	57,13 ± 4,13	<0,001
M/F	6/4	6/4	
Bilirubina (mg/dL)	0,95 ± 0,58	6,43 ± 5,57	<0,05
Albumina (g/l)	44,5 ± 3,5	25,3 ± 4,1	<0,001
AST (xULN)	2,14 ± 0,63	3,79 ± 2,05	0,07
ALP (xULN)	4,23 ± 2,11	1,99 ± 1,61	0,14
γGT (xULN)	3,55 ± 1,99	2,73 ± 3,08	0,61
INR (0,8-1,2)	0,92 ± 0,04	1,9 ± 0,5	<0,001
Mayo Risk Score	basso-intermedio	alto	

Tabella 4B. Caratteristiche dei pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC).

	PBC - Stadi precoci (N=10)	PBC - Stadi avanzati (N=10)	<i>p</i>
Età (anni)	46,33 ± 11,5	46,0 ± 8,54	0,96
M/F	0/10	0/10	
Bilirubina (mg/dL)	0,63 ± 0,29	1,43 ± 1,22	0,14
Albumina (g/l)	40,3 ± 4,3	42,4 ± 4,3	0,5
AST (xULN)	0,89 ± 0,5	1,72 ± 2,04	0,39
ALP (xULN)	2,11 ± 1,94	5,62 ± 2,48	<0,05
γGT (xULN)	3,52 ± 3,54	14,83 ± 5,98	<0,01
INR (0,8-1,2)	0,92 ± 0,04	1,9 ± 0,5	<0,001
UK risk score 5 anni (%)	1,73 ± 1,25	9,69 ± 9,12	<0,05
UK risk score 15 anni (%)	7,05 ± 4,3	29,47 ± 19,32	<0,05
GLOBE PBC score 3 anni (%)	95,93 ± 1,2	90,9 ± 3,24	<0,01
GLOBE PBC score 5 anni (%)	92,85 ± 1,13	84,3 ± 5,4	<0,01
GLOBE PBC score 10 anni (%)	82,47 ± 7,72	66,87 ± 8,61	<0,01

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. I valori *p* significativi sono evidenziati in grassetto.

AST: aspartato-aminotransferasi; ALP: fosfatasi alcalina; γGT: γ-glutammiil-transpeptidasi; ULN: upper limit of normal; INR: international normalized ratio.

Tabella 5A. Attivazione delle HpSC in stadi precoci (Ludwig I/II) ed avanzati (Ludwig III/IV) in pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC).

	Fegato normale (N=10)	PBC – Stadi precoci (N=62)	PBC – Stadi avanzati (N=24)
Reazione duttale (%)	2,4 ± 1,7	3,0 ± 2,7*	6,9 ± 5,4*§
Epatociti intermedi (score)	0,6 ± 0,6	0,8 ± 1,0*	1,7 ± 1,0*§

I dati sono riportati come media ± deviazione standard. * $p < 0,05$ vs fegato normale; § $p < 0,05$ vs stadi precoci.

Tabella 5B. Attivazione delle HpSC nei diversi stadi di fibrosi secondo Ludwig in pazienti affetti da PBC.

	Fegato normale (N=10)	PBC Ludwig I (N=36)	PBC Ludwig II (N=22)	PBC Ludwig III (N=19)	PBC Ludwig IV (N=5)
Reazione duttale (%)	2,4 ± 1,7	2,5 ± 2,4	4,3 ± 3,6 *	5,7 ± 5,0 *	11,2±5,1*§#
Epatociti intermedi (score)	0,6 ± 0,6	0,7 ± 0,9	1,4 ± 1,0 *	1,5 ± 1,0 *	2,4 ± 0,6 *§

I dati sono riportati come media ± deviazione standard. * $p < 0,05$ vs fegato normale e Ludwig I; § $p < 0,05$ vs Ludwig II; # $p < 0,05$ vs Ludwig III.

Tabella 5C. Coefficiente di correlazione tra l'estensione della reazione duttale e lo score di risposta al trattamento con UDCA (URS) ed i livelli di fosfatasi alcalina dopo un anno di terapia con UDCA (ALP12).

	PBC Ludwig I (N=36)	PBC Ludwig II (N=22)	PBC Ludwig III (N=19)	PBC Ludwig IV (N=5)
URS	$r = -0,701 *$	$r = -0,732 *$	$r = -0,808 *$	$r = -0,896$
ALP12	$r = 0,148$	$r = 0,853 *$	$r = 0,763 *$	$r = 0,950 *$

* $p < 0,001$.

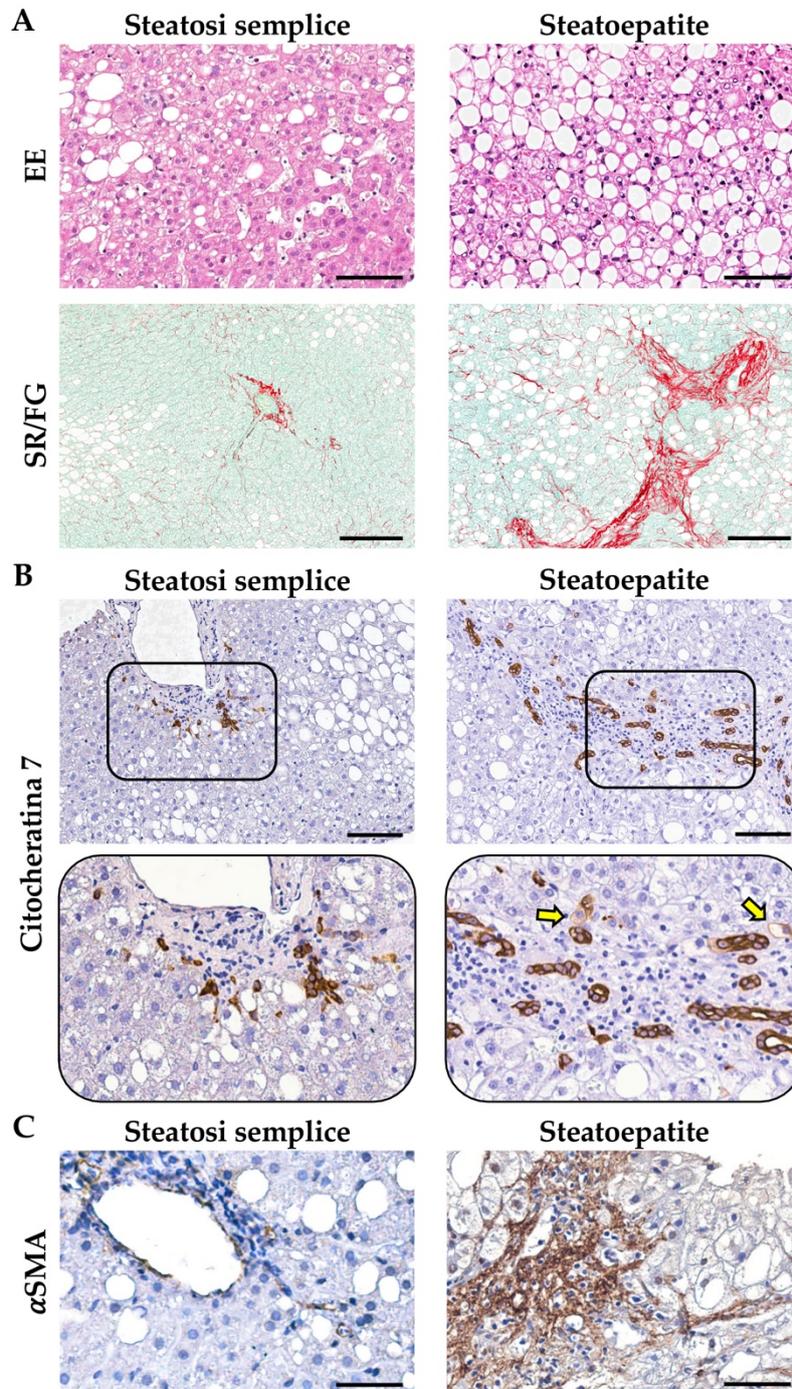
Tabella 6. Caratteristiche delle ghiandole peribiliari dei dotti normali (controlli) ed affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC) e da stenosi non-anastomotiche (NAS) delle vie biliari.

	Controlli (N=10)	PSC (N=20)	NAS (N=10)
Spessore della parete del dotto (μm)	132 \pm 58	969 \pm 207 *	505 \pm 130 *§
Area delle ghiandole peribiliari (%)	1,7 \pm 0,5	5,6 \pm 2,5 *	1,0 \pm 0,5 *§
Ghiandole peribiliari danneggiate (score)	0,4 \pm 0,5	0,8 \pm 0,8	2,4 \pm 1,2 *§
Cellule PCNA+ (%)	7,2 \pm 3,9	38,7 \pm 11,0 *	19,9 \pm 7,8 *§
Cellule Sox9+ (%)	16,0 \pm 4,2	39,4 \pm 4,4 *	11,7 \pm 1,8 §
Cellule con ciglio primario (score)	2,6 \pm 0,9	3,2 \pm 0,8	1,0 \pm 0,7 *§
Densità microvascolare ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)	2.305 \pm 869	7.229 \pm 1.183 *	1.505 \pm 578 *§
Cellule VEGF+ (score)	0,7 \pm 0,8	2,8 \pm 1,2 *	2,3 \pm 1,0 *

I dati sono riportati come media \pm deviazione standard. * $p < 0,05$ vs fegato normale; § $p < 0,05$ vs PSC.

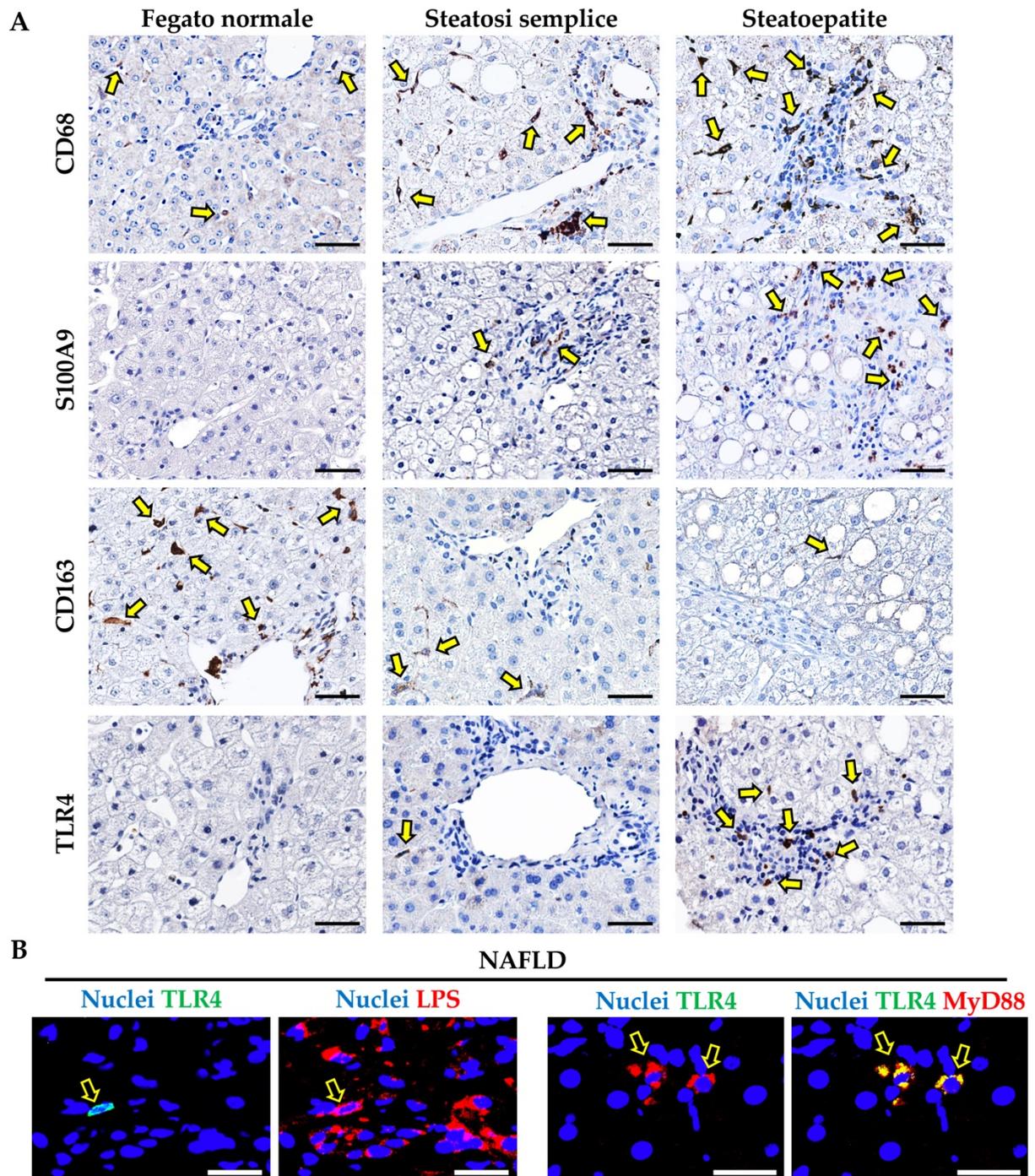
FIGURE

FIGURA 1. Istomorfologia, reazione duttale ed attivazione delle cellule stellate epatiche e dei miofibroblasti portali in biopsie ottenute da pazienti affetti da steatosi semplice e da steatoepatite.



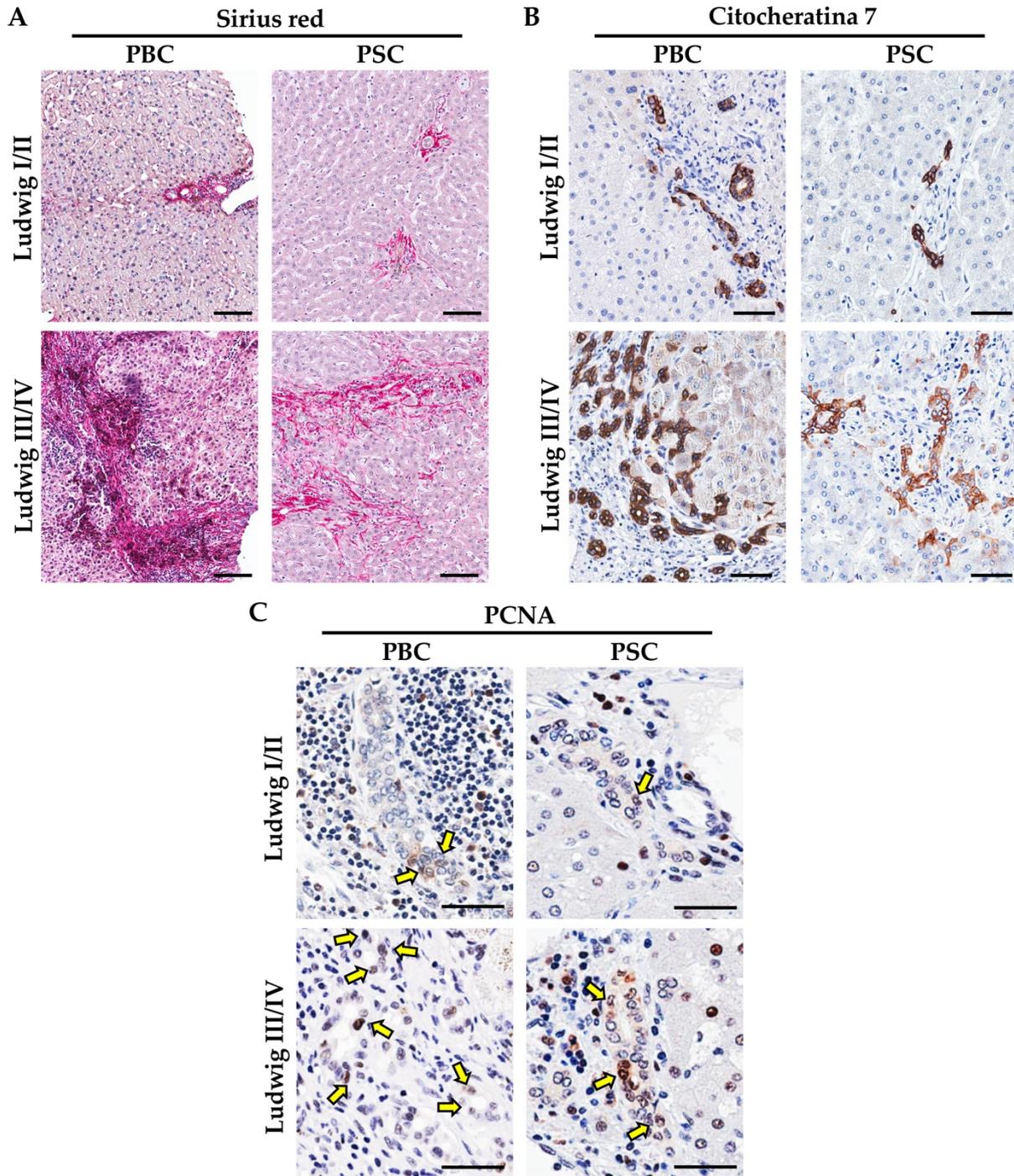
A. Ematossilina ed eosina (EE) e sirius red/fast green (SR/FG). Scala: 100 μ m (EE) e 200 μ m (SR/FG). B. Immu-noistochimica per citocheratina 7 in biopsie ottenute da pazienti affetti da steatosi semplice e steatoepatite. Scala: 100 μ m. Le aree nei riquadri sono ingrandite nel pannello inferiore. Le frecce indicano alcuni epatociti intermedi. C. Immunoistochimica per α SMA in biopsie ottenute da pazienti affetti da steatosi semplice e steatoepatite. Scala: 50 μ m.

FIGURA 2. Sottopopolazioni di macrofagi e sistema TLR4 in biopsie ottenute da pazienti affetti da steatosi semplice e da steatoepatite.



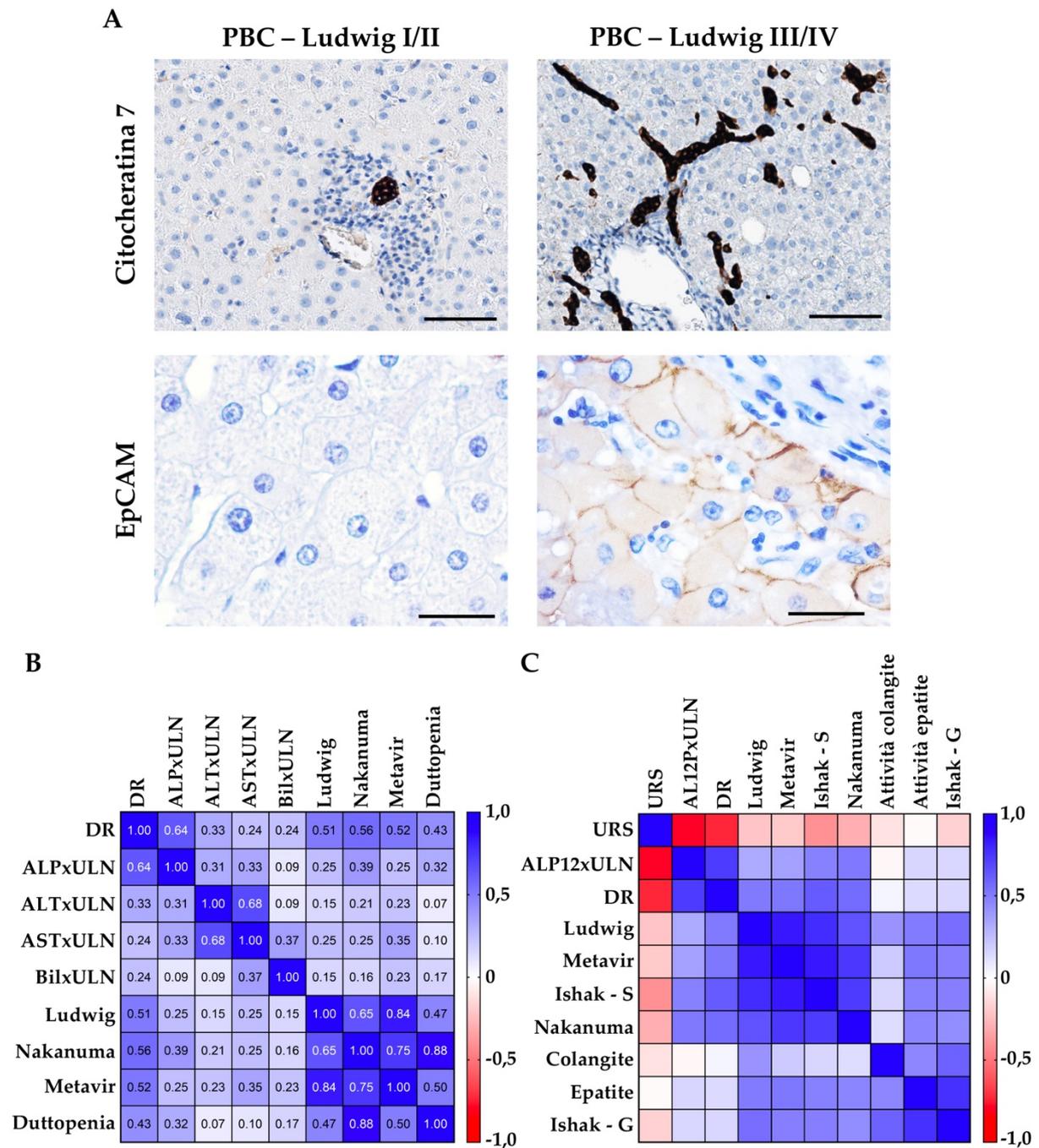
A. Immunoistochimica per CD68, S100A9, CD163 e TLR4. Le frecce indicano i macrofagi positivi allo specifico marcatore. Scala: 50µm. **B.** Doppia immunofluorescenza per TLR4 e LPS (a sinistra), e per TLR4 e MyD88 (a destra) in biopsie ottenute da pazienti affetti da NAFLD. Sono mostrati i canali separati. I nuclei sono mostrati in blu. Scala: 20µm. Immagini in **B** adattate da: *Carpino G, [...] Overi D, et al. Hepatology. 2020 Aug;72(2):470-485.*

FIGURA 3. Istomorfologia ed estensione della reazione duttale in biopsie ottenute da pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC) e colangite sclerosante primitiva (PSC), in stadi precoci (Ludwig I/II) ed avanzati (Ludwig III/IV).



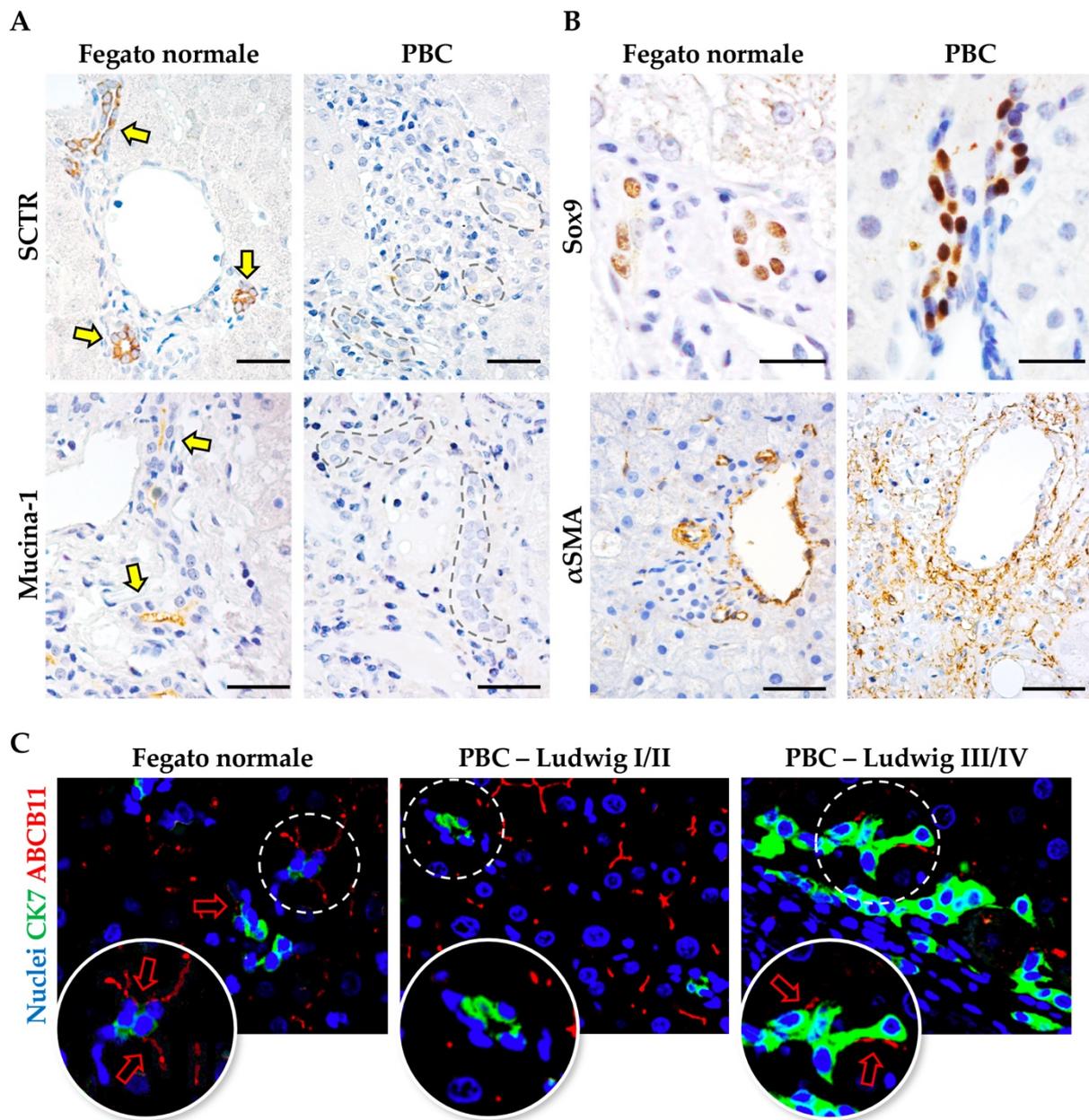
A. Sirius red. Scala: 100µm. **B.** Immunoistochimica per citocheratina 7. Scala: 50µm **C.** Immunoistochimica per PCNA. Le frecce indicano le cellule PCNA⁺ nella reazione duttale. Scala: 50µm.

FIGURA 4. Reazione duttale, epatociti intermedi e correlazioni con i parametri istologici e clinici in pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PBC).



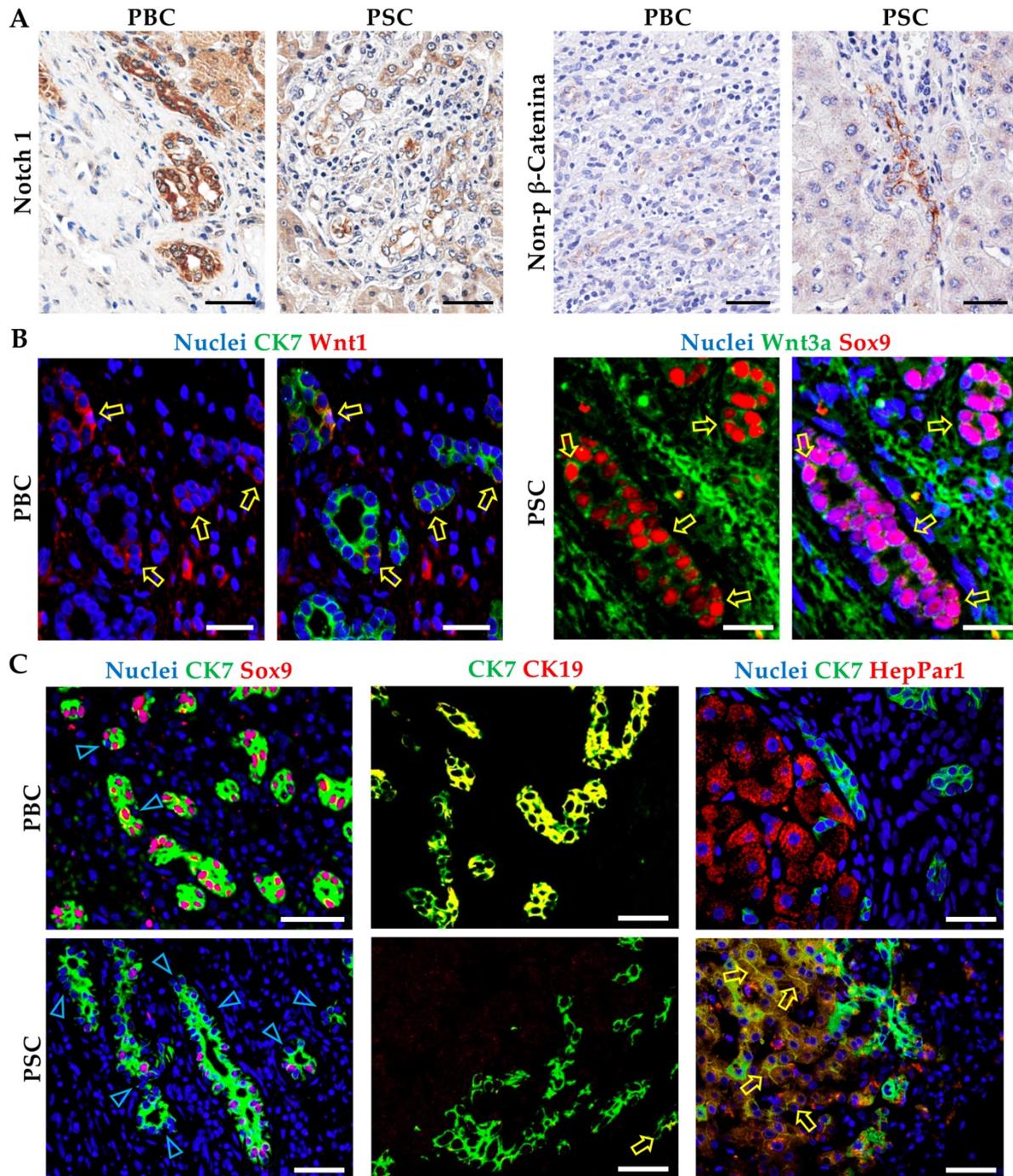
A. Immunoistochimica per citocheratina 7 e per EpCAM in biopsie ottenute da pazienti affetti da PBC in stadi precoci (Ludwig I/II) ed avanzati (Ludwig III/IV). Scala: 75µm (citocheratina 7) e 25µm (EpCAM). **B-C.** Matrici di correlazione tra la reazione duttale ed altri parametri clinici/istologici nei pazienti affetti da PBC (N=82). DR: reazione duttale; ALP: fosfatasi alcalina; ALT: alanino aminotransferasi; AST: aspartato aminotransferasi; Bil: bilirubina; URS: UDCA response score; ALP12: fosfatasi alcalina dopo 12 mesi di trattamento con UDCA; Ishak S: stadio e G: grado.

FIGURA 5. Fenotipo della reazione duttale in pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC).



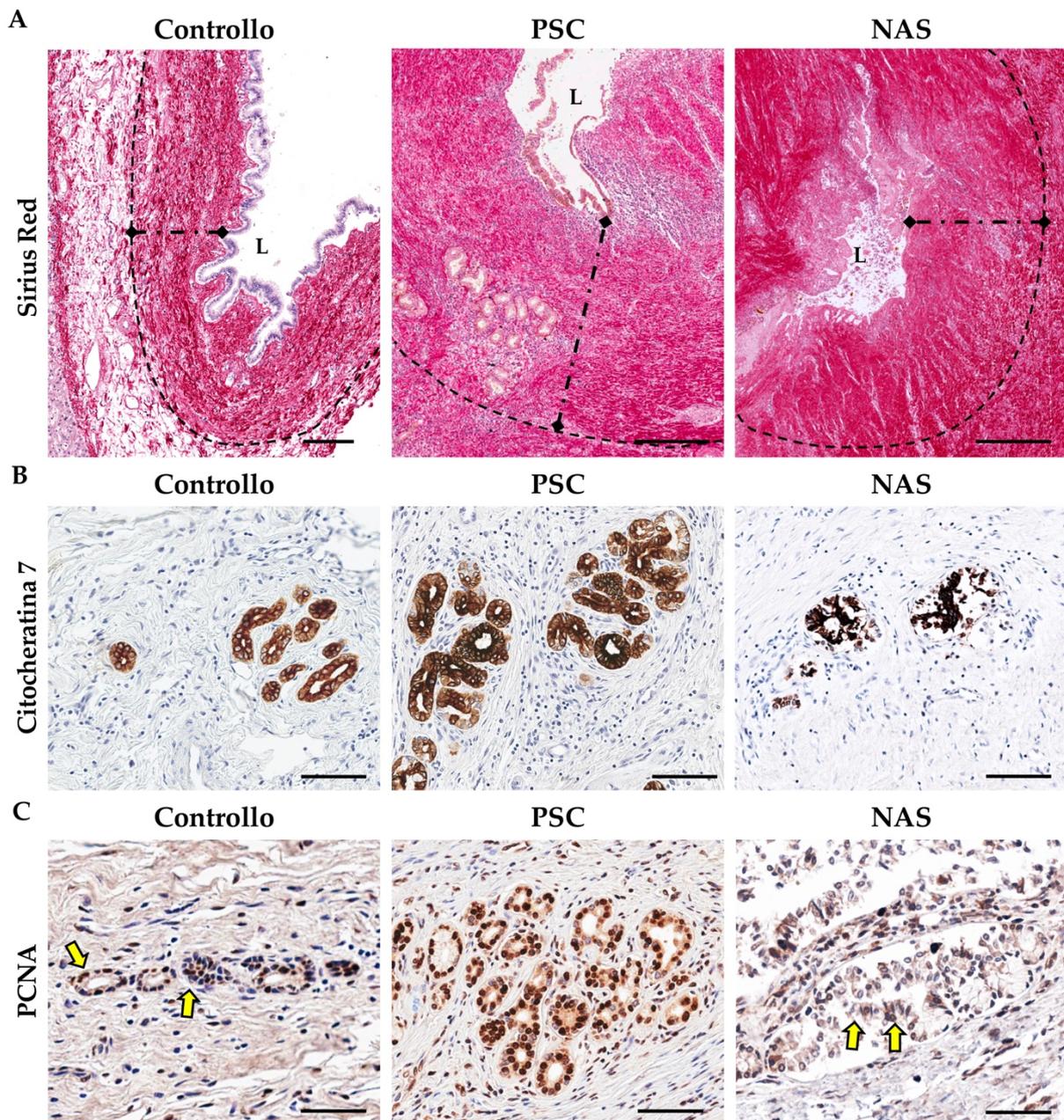
A. Immunoistochimica per il recettore della secretina (SCTR) e per la mucina 1. Scala: 40 μ m. Le frecce indicano le cellule della reazione duttale positive nei fegati con istologia normale; le linee tratteggiate individuano la reazione duttale negativa nella PBC. **B.** Immunoistochimica per Sox9 ed α SMA. Scala: 25 μ m (Sox9) e 40 μ m (α SMA). **C.** Doppia immunofluorescenza per CK7 ed ABCB11 in fegati normali ed in pazienti affetti da PBC in stadi precoci (Ludwig I/II) ed avanzati (III/IV). Le frecce rosse indicano le giunzioni duttulo-canicolari. Le aree tratteggiate sono ingrandite nel cerchio. I nuclei sono mostrati in blu. Ingrandimento: 20x.

FIGURA 6. Vie di segnalazione nella nicchia e fenotipo della reazione duttale in biopsie ottenute da pazienti affetti da colangite biliare primitiva (PBC) e colangite sclerosante primitiva (PSC).



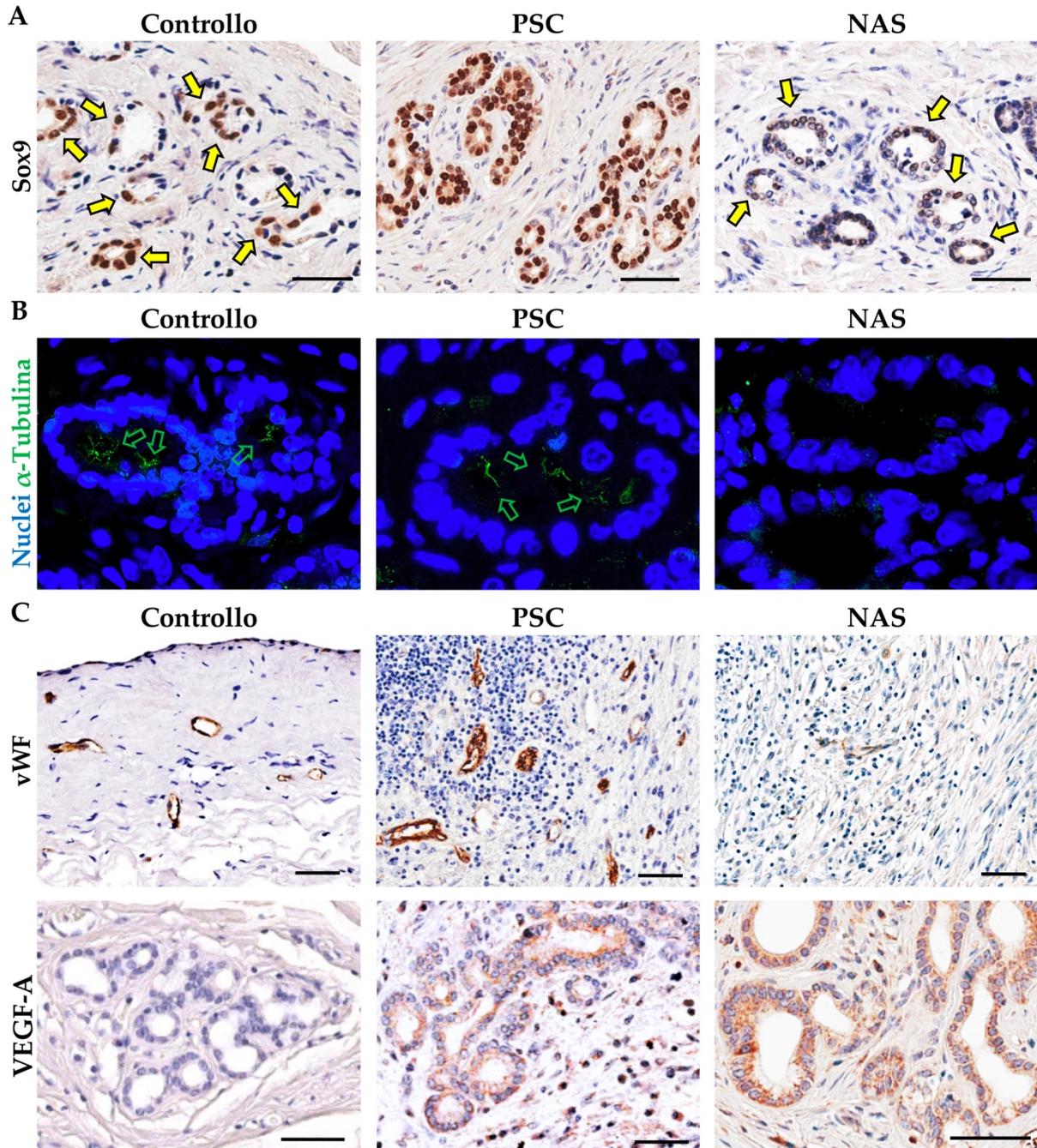
A. Immunoistochimica per Notch1 (a sinistra) e per β -catenina non fosforilata (Non-p, a destra). **B.** Doppia immunofluorescenza per CK7 e Wnt1 in pazienti affetti da PBC (a sinistra), e per Wnt3a e Sox9 in pazienti affetti da PSC (a destra). I nuclei sono mostrati in blu. In A-C, scala: 40 μ m. **C.** Doppia immunofluorescenza per citocheratina (CK) 7 e Sox9, CK7 e CK19, CK7 ed HepPar1. Le punte blu indicano le cellule CK7+/Sox9+. Le frecce gialle indicano le cellule CK7+/CK19+ (al centro) e CK7+/HepPar1+ (a destra). I nuclei sono mostrati in blu. Immagini in **B** ed in **C** (a sinistra) adattate da: Carpio G, [...] Overi D, et al. *American Journal of Pathology*. 2018 Mar;188(3):627-639.

FIGURA 7. Fibrosi del dotto e massa delle ghiandole peribiliari in campioni di dotti biliari extraepatici con istologia normale (controlli) ed in dotti ottenuti da pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC) e da stenosi non-anastomotiche delle vie biliari (NAS).



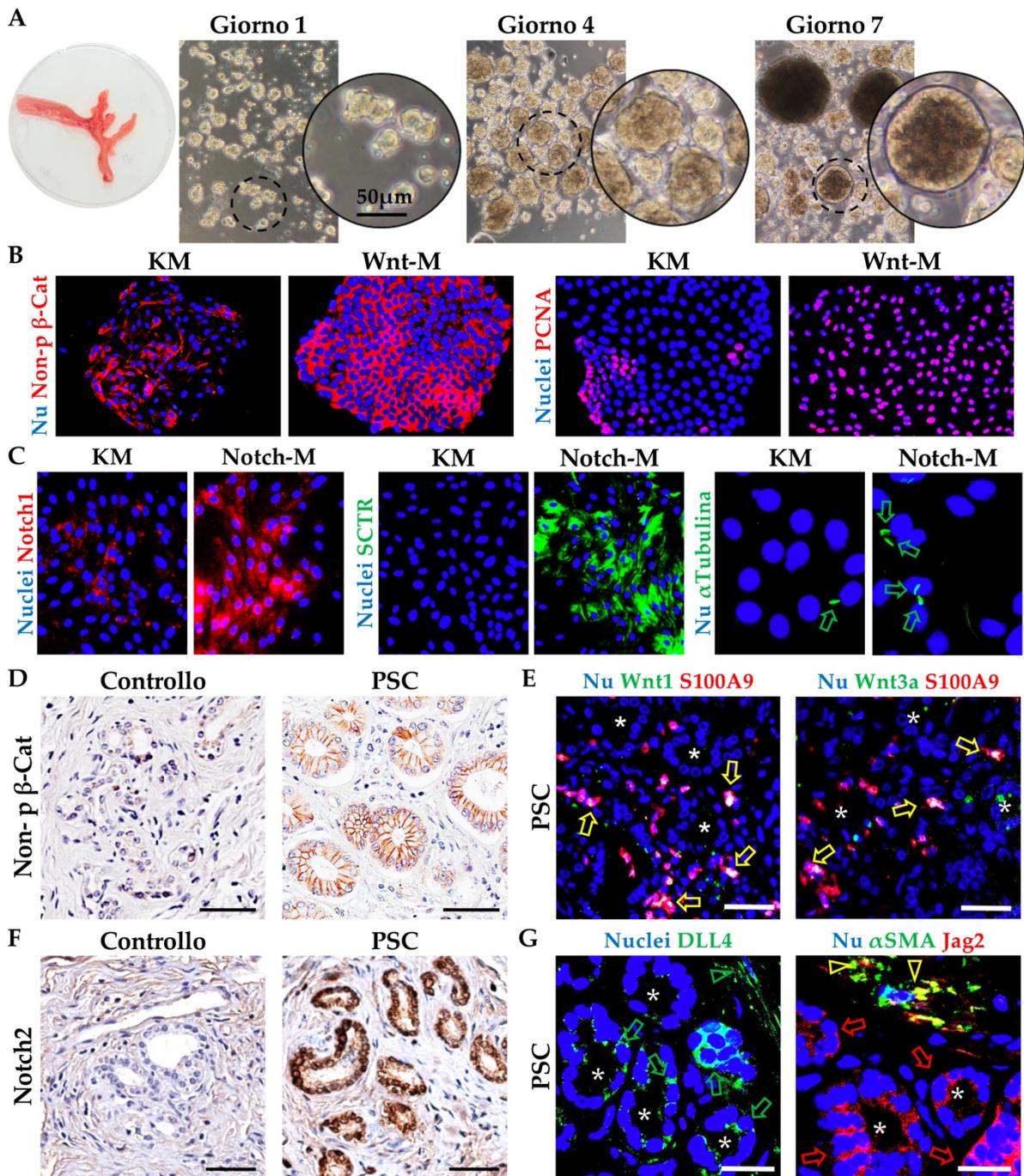
A. Sirius red. La linea e la barra tratteggiate indicano la parete del dotto. L: lume. Scala: 200 μ m. **B.** Immunohistochemica per citocheratina 7. Le frecce indicano le ghiandole peribiliari danneggiate nei dotti con NAS. Scala: 75 μ m. **C.** Immunohistochemica per PCNA. Le frecce indicano le cellule delle ghiandole peribiliari positive a PCNA nei dotti controlli e nei dotti con NAS. Scala: 50 μ m.

FIGURA 8. Fenotipo delle ghiandole peribiliari in campioni di dotti biliari extraepatici con istologia normale (controlli) ed in dotti ottenuti da pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC) e da stenosi non-anastomotiche delle vie biliari (NAS).



A. Immunohistochimica per Sox9. Le frecce indicano le cellule positive nei dotti controllo e nei dotti con NAS. Scala: 50 μ m. **B.** Immunofluorescenza per α -tubulina. Le frecce verdi indicano i cigli primari visibili in sezione. I nuclei sono mostrati in blu. Ingrandimento: 40x. **C.** Immunohistochimica per il fattore di von Willebrand (vWF) e per VEGF. Scala: 50 μ m.

FIGURA 9. Coltura *in vitro* di BTSC umane e vie di segnalazione di Wnt/ β -catenina e Notch *in vitro* ed *in situ* in pazienti affetti da colangite sclerosante primitiva (PSC).



A. Isolamento di BTSC da vie biliari umane e formazione di sferoidi in colture in sospensione dopo 1, 4 e 7 giorni. **B-C.** IF in colture di BTSC in terreno basale (KM), in terreno di stimolazione di Wnt/ β -catenina (Wnt-M) ed in terreno di stimolazione di Notch (Notch-M). Ingrandimenti: 20x (β -catenina non fosforilata, PCNA, Notch1 e SCTR) e 40x (α Tubulina). **D.** IHC per non-p β -Cat. Scala: 40 μ m. **E.** Doppie IF per Wnt1 e S100A9 e per Wnt3a e S100A9 nella PSC. Freccette: cellule Wnt1⁺/Wnt3a⁺ e S100A9⁺. *: adenomeri delle ghiandole peribiliari. Scala: 20 μ m. **C-D.** IHC per Notch2. Scala: 40 μ m. **E.** IF per DLL4 e doppia IF per α SMA e Jag2 nella PSC. Freccette e punte verdi: cellule DLL4⁺ nelle ghiandole peribiliari (*) e nello stroma; freccette rosse: cellule Jag2⁺; punte gialle: cellule α SMA⁺/Jag2⁺. I nuclei (Nu) sono mostrati in blu. **B-C/E-G** adattate da: *Carpino G, [...] Overi D, et al. Hepatology. 2020 Mar;71(3):972-989.*