



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Regulación local de señales de reparación epitelial en
células estrelladas hepáticas por la insulina/IGF1

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Sánchez Almira, Alberto

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Cotutor/a externo: NOON XX, LUKE

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ETSIAMN

Grado en Biotecnología

Regulación local de señales de reparación epitelial en células estrelladas hepáticas por la insulina/IGF1

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2021/2022

AUTOR: Alberto Sánchez Almira

TUTOR: Dr. Luke Noon

TUTORA ACADÉMICA: Dra. Esther Giraldo Reboloso

Valencia, julio de 2022

Regulación local de señales de reparación epitelial en células estrelladas hepáticas por la insulina/IGF-1

Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), consecuencia de desequilibrios entre la secreción y la sensibilidad a la insulina, ha sido identificada como uno de los factores de riesgo en el desarrollo de la fibrosis hepática, hígado graso no alcohólico, esteatosis no alcohólica y sus complicaciones asociadas. Cuando la insulina o el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) se unen a sus receptores, estos se fosforilan y reclutan proteínas como el sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS2), que acopla estos receptores con las vías de señalización intracelular. La DMT2, la obesidad y la enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica están estrechamente relacionadas con la resistencia a la insulina, que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis hepática. La fibrosis es una respuesta de reparación resultante de la aparición de lesiones repetidas en el hígado en la que, si estas persisten de forma crónica, el parénquima funcional es reemplazado por una acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC). Las células estrelladas hepáticas (HSCs) son células residentes que se encuentran en un estado quiescente en el hígado sano. Tras sufrir una lesión, estas se activan transdiferenciándose a miofibroblastos proliferativos y contráctiles, que constituyen la principal fuente de MEC. Durante este proceso de activación de las HSCs la autofagia juega un papel fundamental. Se ha observado que las HSC participan en la resolución de la fibrosis sufriendo senescencia, apoptosis, o adquiriendo un fenotipo inactivo. También juegan un papel en la reparación epitelial secretando factores paracrinos como el factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7). Resultados previos del grupo han mostrado que IRS2 es necesario para promover la expresión de *FGF7*, sin embargo, no se conoce en detalle el papel que desempeña la señalización a través de insulina/IRS2 en la reversión de las HSC y la expresión de *FGF7*. Por ello, se estudió el efecto de la señalización de insulina mediante el análisis de la expresión génica de cultivos de la línea celular LX2, derivada de HSC, en medio con distinta concentración de suero y en presencia o ausencia del inhibidor de la autofagia 3-metiladenina (3MA), así como mediante inmunocitoquímica. Los resultados de la expresión génica y de la inmunotinción mostraron que la privación de suero promovió la inactivación de las HSCs y se halló una sinergia entre la baja concentración de suero y el tratamiento con 3MA en la expresión de *FGF7*, y de otros genes como *HSPA1B*, asociado a la inactivación de las HSCs, o interleukina 6 (*IL-6*), que podría estar favoreciendo la expresión de *FGF7*, como se ha descrito en fibroblastos.

Palabras clave: IRS2, células estrelladas hepáticas, FGF7, suero bovino fetal, IL-6.

Autor: Alberto Sánchez Almira

Tutor: Dr. Luke Noon

Tutora académica: Esther Giraldo Reboloso

Valencia, julio de 2022

Local regulation of epithelial repair signals in hepatic stellate cells by insulin/IGF-1

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM), a consequence of imbalances between insulin secretion and insulin sensitivity, has been identified as one of the risk factors in the development of liver fibrosis, non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatosis, and their associated complications. When insulin or insulin-like growth factor (IGF-1) bind to their receptors, these become phosphorylated and recruit proteins such as insulin receptor substrate 2 (IRS2), which couples the receptors to intracellular signalling pathways. T2DM, obesity and fatty liver disease associated with metabolic dysfunction are closely related to insulin resistance, which is a risk factor for the development of liver fibrosis. Fibrosis is a repair response resulting from repeated liver injury in which, if chronically persistent, functional parenchyma is replaced by excessive accumulation of extracellular matrix (ECM). Hepatic stellate cells (HSCs) are resident cells that are in a quiescent state in the healthy liver. After injury, they are activated by transdifferentiation into proliferative and contractile myofibroblasts, which are the main source of ECM. During this process of HSC activation, autophagy plays a key role. HSCs have been observed to participate in the resolution of fibrosis by undergoing senescence, apoptosis, or acquiring an inactive phenotype. They also play a role in epithelial repair by secreting paracrine factors such as fibroblast growth factor 7 (FGF7). Previous results from the group have shown that IRS2 is required to promote FGF7 expression, however, the role of insulin/IRS2 signalling in HSC reversal and FGF7 expression is not known in detail. Therefore, the effect of insulin signalling was studied by analysing gene expression of HSC-derived LX2 cell line cultures in medium with different serum concentration and in the presence or absence of the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3MA), as well as by immunocytochemistry. Gene expression and immunostaining results showed that serum deprivation promoted HSC inactivation and a synergy was found between low serum concentration and 3MA treatment in the expression of *FGF7*, and of other genes such as *HSPA1B*, associated with HSC inactivation, or interleukin 6 (*IL-6*), which could be favouring *FGF7* expression, as described in fibroblasts.

Key words: IRS2, hepatic stellate cells, FGF7, fetal bovine serum, IL-6.

Author: Alberto Sánchez Almira

Tutor: Dr. Luke Noon

Academic tutor: Esther Giraldo Reboloso

Valencia, July 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a Luke por haberme acogido una vez más en su laboratorio para realizar este TFG, por toda su atención, sus consejos y la confianza que ha depositado en mí.

Por supuesto, agradecerles a Arantxa, a Amparo, y a Matilde, por haberme enseñado con tanta paciencia y haberme ayudado siempre que lo he necesitado. Tampoco me olvido de Andrea y de Marcos, quienes siempre han estado ahí para echarme un cable cuando lo necesitaba. Echaré de menos esos ratitos de almuerzo todos juntos y que nos venían tan bien para recuperar fuerzas.

A mis amigos, por haberme acompañado todos estos años compartiendo alegrías y penas; y a toda la gente que he conocido durante estos últimos cuatro años y que han hecho de mi estancia en Valencia una de las mejores experiencias que he vivido.

A mi familia, por su cariño y apoyo incondicional desde que era un renacuajo, y especialmente, a mi prima, María, que ha hecho todo lo posible para siempre sacar un hueco para aconsejarme y ayudarme en la elaboración de este trabajo.

Por último, a mis padres, quienes han estado en todo momento a mi lado, celebrando mis triunfos y dándome ánimos en mis horas bajas, esforzándose porque nunca me faltara de nada y pudiera disfrutar de lo que me gusta.

Con este proyecto finaliza una gran etapa de mi vida. Sin todos vosotros esto no hubiera sido posible. Gracias.

ÍNDICE TEMÁTICO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DIABETES	1
1.2. SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA/IGF-1	1
1.3. FIBROSIS	2
1.4. CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS	3
1.5. IRS2	4
1.6. FGF7	4
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4.1. CULTIVO CELULAR	5
4.1.1. Mantenimiento	5
4.1.2. Descongelación	6
4.2. EXPERIMENTOS	6
4.2.1. Experimento 1: Efecto de la concentración de suero	6
4.2.2. Experimento 2: Tratamiento con 3MA 10 mM, IGF-1 10 nM durante 24 h.....	6
4.3. INMUNOTINCIÓN	7
4.3.1. Anticuerpo primario	8
4.3.2. Detección de los núcleos	8
4.3.3. Adquisición de imágenes	8
4.4. RT-qPCR	8
4.4.1. Extracción de RNA	8
4.4.2. Retrotranscripción	8
4.4.3. PCR cuantitativa (qPCR)	9
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
5.1. Tratamiento con 3MA e IGF-1	10
5.2. Efecto de la concentración de suero	12
5.3. Coefficientes de variación de los genes con respecto al tiempo	13
5.4. Normalización de la expresión génica con respecto a 0% FBS	14
5.5. Inmunotinción para la detección de células α-SMA⁺	17
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Señalización de la insulina e IGF-1.....	2
Figura 2: Papel de las HSCs en el desarrollo, progresión y regresión de la fibrosis hepática.	3
Figura 3: Diseño experimental para el cultivo de HSCs bajo condiciones con distinta concentración de suero bovino fetal (Fetal bovine serum, FBS).	6
Figura 4: Diseño experimental para el tratamiento de las HSCs con 3-metiladenina (3MA) (10 mM) y factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) (10 nM).	7
Figura 5: Diseño experimental para el experimento de inmunocitoquímica.	7
Figura 6: Diferencias fenotípicas en las LX2 tras el tratamiento control (2% FBS) o con 3MA 10 mM.	10
Figura 7: Niveles de expresión relativa para cada gen en distintas concentraciones de FBS.	11
Figura 8 : Niveles de expresión relativa de los distintos genes en condiciones con diferente concentración de FBS.....	12
Figura 9: Tendencia de los coeficientes de variación de cada gen en función del tiempo... 	14
Figura 10: Niveles de expresión relativa de cada gen normalizados respecto a la condición 0% FBS.	16
Figura 11: Resultados de la tinción de inmunofluorescencia para la detección de la proteína actina alfa del músculo liso (α-SMA) en las células LX2 cultivadas en las distintas condiciones (0%, 2% y 10% FBS en ausencia o presencia de IGF-1 10 nM).....	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pares de primers directo/reverso utilizados para amplificar cada gen en la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	9
--	----------

Listado de abreviaturas

3MA:	3-metiladenina
ACTA2:	alfa actina 2 del músculo liso
aHSC:	célula estrellada hepática activada
AKT:	Proteína Kinasa B
ANOVA:	análisis de la varianza
COL1A1:	Colágeno alfa tipo I
COL3A1:	Colágeno alfa tipo III
DM:	diabetes mellitus
DMEM:	Medio Eagle modificado por dulbecco
DMT2:	diabetes mellitus tipo 2
FBS:	suero bovino fetal
FGF7:	factor de crecimiento de fibroblastos 7
FGFR2-IIIb:	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 isoforma IIIb
GFAP:	Proteína ácida fibrilar de la glía
HSC:	Célula estrellada hepática
HSPA1B:	Proteína de choque térmico HSP70 1B
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular 1
IGF-1:	Factor de crecimiento similar a la insulina
iHSCs:	Células estrelladas hepáticas inactivas
IL-6:	Interleukina 6
IRS2:	Sustrato del receptor de la insulina 2
KGF:	Factor de crecimiento de keratinocitos
MMP2:	Metaloproteinasa de matriz 2
MMP9:	Metaloproteinasa de matriz 9
mRNA:	RNA mensajero
PBS:	Tampón fosfato salino
PFA:	Paraformaldehído
PI3K:	Fosfoinositol-3 kinasa
PPARγ:	Activador gamma del proliferador de peroxisomas

- qHSC:** Célula estrellada hepática quiescente
- RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
- RU:** Unidades relativas
- α -SMA:** Actina alfa del músculo liso

1.INTRODUCCIÓN

Resultados anteriores del grupo han identificado la señalización de la insulina puede coordinar la reparación de tejidos a través del sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS2), proteína adaptadora que acopla la señalización a través de la insulina a las vías de señalización intracelulares (Manzano-Núñez et al., 2019). Se ha descrito en modelos murinos que la disrupción de IRS2 resulta en un estado de resistencia a la insulina (Withers et al., 1998); condición presente en la diabetes, dificultando la regeneración hepática, y constituyendo un factor de riesgo para el desarrollo de la fibrosis (Aller et al., 2020), en la que la activación de las células estrelladas hepáticas (HSCs) se ha identificado como la principal fuente de acumulación de matriz extracelular (MEC) (Puche et al., 2013). Sin embargo, se desconoce el papel que desempeña la señalización de la insulina en la reversión de las HSCs y en la expresión de factores paracrinos que promueven la regeneración, como el factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7).

1.1. DIABETES

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), resultado de desequilibrios entre la secreción y la sensibilidad a la insulina (Tuomi et al., 2014) ha sido identificada como uno de los factores de riesgo en el desarrollo de la fibrosis hepática, hígado graso no alcohólico, esteatosis no alcohólica y sus complicaciones asociadas (Trivedi et al., 2021; Tuomi et al., 2014). La DMT2 es la forma de la enfermedad que presenta mayor prevalencia, suponiendo un 90-95% de todos los casos de diabetes (Cheng, 2005). Se trata de una enfermedad de origen multifactorial en la que entre los principales factores que contribuyen a su desarrollo se encuentran la edad, los antecedentes familiares, el sobrepeso, el aumento de la grasa abdominal, la hipertensión, la falta de ejercicio físico y la etnia (Van Tilburg et al., 2001).

Los individuos diabéticos muestran una cicatrización de las heridas impedida y tienen mayor riesgo de mortalidad así como una mayor tasa de morbilidad que la población general, presentando tasas de mortalidad debidas a enfermedades cardiacas de dos a cuatro veces superiores a los individuos no diabéticos (Baltzis et al., 2014; Deshpande et al., 2008). La prevalencia mundial de la diabetes en adultos se ha visto notablemente incrementada durante las últimas décadas (Ogurtsova et al., 2017), de 108 millones de adultos en 1980 a 422 millones en 2014 (Zhou et al., 2016).

La DMT2, la obesidad y la enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica son trastornos íntimamente relacionados con la resistencia a la insulina (Beaulant et al., 2022), un estado que se caracteriza por una respuesta biológica alterada a los niveles circulantes normales de insulina que viene acompañado de hiperinsulinemia como mecanismo compensatorio para mantener una concentración normal de glucosa en el plasma. Los pacientes con resistencia a la insulina experimentan acumulación de lípidos y un aumento de la actividad lipolítica en el tejido adiposo (Adamczak et al., 2022). Además, la resistencia a la insulina constituye un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis hepática en pacientes con DMT2 (Aller et al., 2020).

1.2. SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA/IGF-1

La insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) modulan un amplio espectro de procesos biológicos al actuar sobre dos receptores tirosina kinasa estrechamente

relacionados. La activación de estos receptores inicia una cascada de eventos de fosforilación que resulta en la activación de diferentes enzimas responsables del control de multitud de aspectos de vías de señalización metabólicas (Boucher et al., 2014), como aparece en la figura 1.

La señalización a través de la insulina/IGF-1 cuenta con diferentes puntos de regulación, tanto positiva como negativa, para asegurar una duración e intensidad de la señal apropiadas. Alteraciones en estos puntos de regulación pueden llevar al desarrollo de resistencia a la insulina.

En cuanto se une el ligando a las subunidad α del receptor, tanto en el caso del receptor de la insulina como en el del receptor de IGF-1, ambos sufren un cambio conformacional que induce la activación de la actividad kinasa en las subunidades β , lo que resulta en la transfosforilación entre subunidades β , aumentando la actividad kinasa, y permitiendo el reclutamiento de sustratos de los receptores tales como IRS1 e IRS2, activando entre otros, el eje fosfoinositol-3-kinasa (PI3K)/proteína kinasa B (AKT).

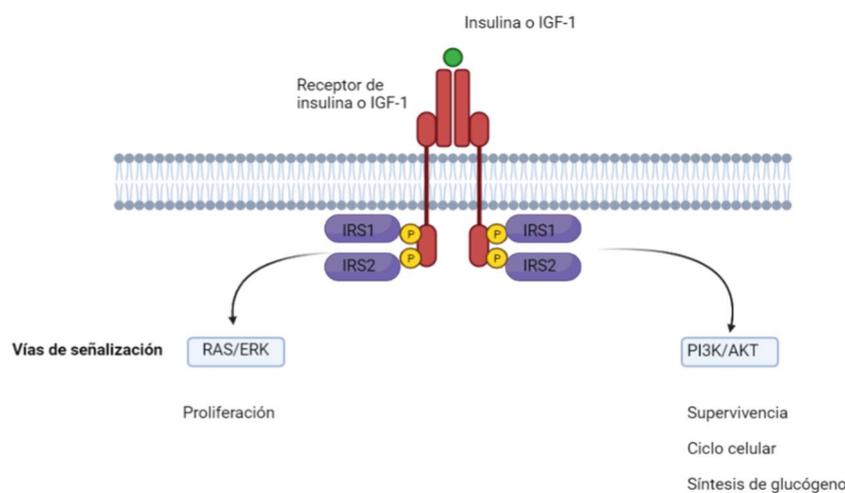


Figura 1: Señalización de la insulina e IGF-1. La activación de los receptores de insulina e IGF-1 por parte de sus ligandos induce una cascada de fosforilación que resulta en el inicio de diversos procesos tales como la regulación del transporte de glucosa, la síntesis lipídica, la gluconeogénesis, el control del ciclo y la supervivencia celular, entre otros. Imagen creada con BioRender, simplificación basada en Boucher et al. (2014).

1.3. FIBROSIS

La fibrosis hepática es una respuesta de reparación resultante de la aparición de lesiones repetidas en el hígado, como consecuencia de enfermedades crónicas tales como la hepatitis viral, esteatohepatitis alcohólica y esteatohepatitis no alcohólica, así como enfermedades autoinmunes y genéticas (Roehlen et al., 2020). Tras una lesión aguda, las células del hígado se regeneran y reemplazan aquellas células necróticas o apoptóticas. Este proceso está asociado a la respuesta inflamatoria y una deposición limitada de matriz extracelular (Bataller & Brenner, 2005). Si la lesión persiste de forma crónica, finalmente la remodelación hepática fracasa y el parénquima funcional es reemplazado por una acumulación excesiva de matriz extracelular, compuesta por colágeno de tipos I, II y III, fibronectina, laminina, y proteoglicanos, entre otros (Biagini & Ballardini, 1989).

Si no se tratan las causas de la fibrosis, con el tiempo esta puede progresar a cirrosis, consecuencia final de la fibrosis del parénquima hepático, que da lugar a la formación de nódulos y a la alteración de la función hepática, conduciendo finalmente al fallo hepático (Friedman, 2003).

Actualmente, las terapias para tratar la fibrosis hepática se enfocan en eliminar o mejorar el agente causal de enfermedades crónicas hepáticas. Estas terapias han demostrado tener éxito al

bloquear la lesión del hígado, deteniendo la progresión de la fibrosis y llegando a observarse la regresión de esta (Trautwein et al., 2015).

1.4. CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS

Las células estrelladas hepáticas activadas (*activated Hepatic Stellate Cells*, aHSC) constituyen la principal fuente de proteínas de la matriz extracelular en enfermedades del hígado, que tienen como consecuencia la aparición de fibrosis (Mederacke et al., 2013). Las células estrelladas hepáticas (HSCs) tienen origen mesenquimal y se localizan en el espacio de Disse, entre hepatocitos y células endoteliales sinusoidales; constituyendo alrededor del 10% de las células residentes en el hígado (Friedman, 2008).

En el hígado sano, las células estrelladas hepáticas se encuentran en un estado quiescente no proliferativo (qHSCs), caracterizado por la acumulación de vitamina A en gotas lipídicas en el citoplasma y la expresión de marcadores como el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) y la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (Liu et al., 2020; Puche et al., 2013). Tras una lesión hepática o su cultivo *in vitro*, las HSCs se activan, movilizand las reservas lipídicas y transdiferenciándose a miofibroblastos proliferativos y contráctiles, que se caracterizan por un incremento en la producción de matriz extracelular (Tsuchida & Friedman, 2017). El modelo más aceptado para la diferenciación desde qHSCs hacia aHSCs propone un proceso de dos pasos. En primer lugar, se da la iniciación, en la que las HSCs son estimuladas de manera paracrina por las células vecinas y se sensibilizan a la acción de citoquinas y otras señales extracelulares, expresando moléculas como *ZF9*, capaz de promover la transactivación del promotor de *COL1A1*, o la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que favorece la adhesión de linfocitos a las HSCs (Hellerbrand et al., 1996; Ratziu et al., 1998). Posteriormente, se produce la perpetuación, que implica la total diferenciación hacia su estado activado, incluyendo la activación de la expresión de genes de la matriz extracelular tales como *COL1A1*, *COL3A1* (De Smet et al., 2021; Friedman, 2008).

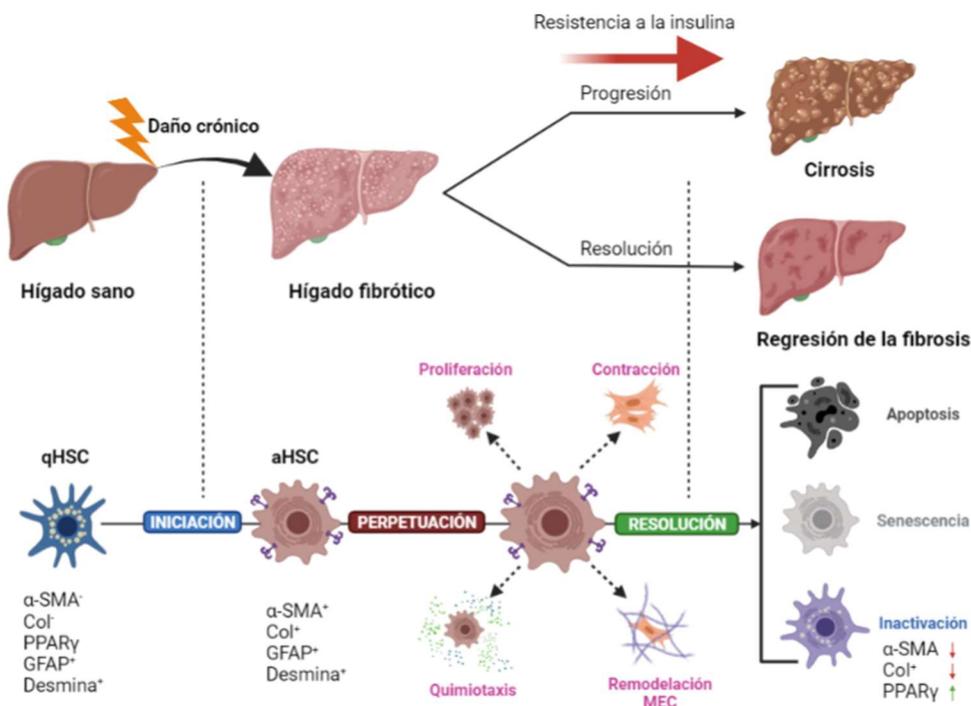


Figura 2: Papel de las HSCs en el desarrollo, progresión y regresión de la fibrosis hepática. Tras producirse un daño crónico en el hígado, las células estrelladas hepáticas (*Hepatic Stellate Cells*, HSCs) cambian hacia un fenotipo activo, caracterizado por la expresión de actina alfa del músculo liso y colágeno, así como por una mayor proliferación, contractibilidad, capacidad de remodelación de la matriz extracelular

y quimiotaxis. Cuando se elimina el agente causal del daño, se puede observar una resolución de la fibrosis, en la que la reducción en el número de células estrelladas se debe a la combinación de procesos de apoptosis, senescencia o inactivación. Células estrelladas hepáticas activas, *aHSCs*; células estrelladas hepáticas quiescentes, *qHSCs*. Adaptación con Biorender de Kitto y Henderson (2021).

Para que tenga lugar la regresión de la fibrosis hepática, uno de los factores clave es la reducción del número de *aHSCs*. De hecho, se ha observado que la eliminación de miofibroblastos hepáticos mediante apoptosis constituye un mecanismo clave para que el hígado recupere su arquitectura normal (Iredale et al., 1998). Sin embargo, existen otros mecanismos alternativos, como la rediferenciación de miofibroblastos a células estrelladas hepáticas inactivas (*iHSCs*) o la inducción de senescencia de las *aHSCs* que también contribuyen a la regresión de la fibrosis. Estas *iHSCs* presentan diferencias con respecto a las *qHSCs*, reteniendo un estado preactivado que las hace más susceptibles de activarse ante subsecuentes estímulos profibrogénicos (Troeger et al., 2012). Durante este proceso de reversión se reduce la expresión de genes como *ACTA2* o *COL1A1* que codifican para la alfa actina del músculo liso y el colágeno de tipo I, respectivamente. Actualmente el papel que desempeña el eje insulina/IGF-1 en la reversión de las HSCs no ha sido esclarecido por completo. Existen estudios en los que la insulina parece ser capaz de inducir la activación de las HSCs, promoviendo una expresión aumentada del factor de crecimiento de tejido conectivo, que a su vez estimula la fibrogénesis, así como incrementando la expresión de colágeno de tipo I (*COL1A1*) y de actina alfa del músculo liso (α -SMA), a través del eje insulina/PI3K-AKT (Cai et al., 2017; Lin et al., 2009; Paradis et al., 2001), mientras que en otros estudios, el tratamiento de las HSCs con un cóctel adipogénico compuesto por isobutimetilxantina, dexametasona e insulina, promovió la aparición de un fenotipo revertido (She et al., 2005; Zhang et al., 2017). Por ello, en el presente trabajo se pretende ahondar en el papel que cumple la señalización a través de la insulina/IGF-1 en el proceso de reversión de las HSCs y la reparación tisular.

1.5. IRS2

Como se ha mencionado anteriormente, tras la unión del ligando al receptor de la insulina o de IGF-1, se produce un cambio conformacional del receptor, induciendo la autofosforilación de residuos de tirosina y, permitiendo así el reclutamiento de los sustratos de los receptores. IRS2 es uno de los sustratos del receptor de la insulina cuya función es acoplar la señalización de IGF-1 y de la insulina a las vías de señalización intracelular. Además, IRS2 media multitud de procesos biológicos tales como el crecimiento y desarrollo de las células beta pancreáticas, la detección de nutrientes por parte del sistema nervioso central (CNS) y del hipotálamo, así como la plasticidad sináptica en el hipocampo y la formación de recuerdos o la función de las células endoteliales (White, 2014). En modelos murinos se ha observado que la disrupción de IRS2 en el hígado se traduce en la aparición de resistencia a la insulina, y el desarrollo de diabetes tipo 2, así como en una mayor dificultad para promover la regeneración hepática durante el daño crónico (Manzano-Núñez et al., 2019; Withers et al., 1998).

1.6. FGF7

El factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7), también conocido como factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), es una proteína de alrededor de 22 kDa que actúa como un potente mitógeno en diferentes tipos de células epiteliales (Rubin et al., 1989). Este factor ejerce sus efectos biológicos promoviendo la reparación epitelial al unirse a su receptor de alta afinidad FGFR2-IIIb, el cual es expresado por varios tipos de células epiteliales entre las que se encuentran los hepatocitos (Housley et al., 1994; Werner, 1998). La expresión de FGF7 se ve inducida tras producirse una lesión cutánea, así como ante daños en el riñón o en el caso de la enfermedad intestinal inflamatoria (Brauchle et al., 1996; Ichimura et al., 1996). Esta inducción está reducida y aparece con mayor retraso en ratones diabéticos, además también se ha observado un retraso en

la reepitelización de la herida en ratones transgénicos deficientes para el FGFR2-III(Werner, 1998; Werner et al., 1994).

En el hígado, la expresión de FGF7 ha sido exclusivamente atribuida a las aHSCs, pero no en las qHSCs ni en otros tipos celulares. Además, mediante inmunohistoquímica se ha hallado una co-localización de las señales de α -SMA y FGF7 en células similares a los miofibroblastos, indicando que las aHSCs son una fuente de FGF7 *in vivo* (Stelling et al., 2004). Asimismo, IRS2 es necesario para la inducción de la expresión de FGF7 por parte de las HSCs, puesto que en ratones *Irs2*^{-/-} se observaron defectos para inducir la expresión de FGF7 (Manzano-Núñez et al., 2019).

Teniendo en cuenta lo anterior, para estudiar los factores que participan en el proceso de reversión de las HSCs, en este proyecto se empleará la línea celular LX2, células estrelladas hepáticas humanas primarias inmortalizadas con el antígeno T tumoral grande SV40 tras sucesivos cultivos de células en pases tempranos en condiciones de baja concentración de suero(Xu et al., 2005).

2.HIPÓTESIS

Se ha descrito que el suero es capaz de inducir la activación de las HSCs, así como que el bloqueo farmacológico de la autofagia con 3-metiladenina (3MA) reduce la activación de las HSCs. Resultados anteriores del grupo han mostrado que IRS2 es necesario para la expresión de FGF7 y que existe una sinergia entre el tratamiento con 3MA y la sobreexpresión de *Irs2* promoviendo la expresión de *FGF7*. Por lo que se hipotetiza que la privación de FBS o el tratamiento con 3-metiladenina (3MA), que inducirían la inactivación de las HSCs podrían potenciar la activación del eje FGF7/IRS2, ya que podría existir una sinergia entre la privación de suero y el tratamiento con 3MA para inducir la expresión de *FGF7*.

3.OBJETIVOS

- I. Investigar el rol que desempeña la señalización a través de insulina/IRS2 en la reversión de las HSCs y en la expresión de *FGF7*.
- II. Caracterizar señales que puedan promover la reversión de las HSCs y la expresión de FGF7, a través del análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CULTIVO CELULAR

4.1.1.Mantenimiento

Las células pertenecientes a la línea celular LX2 (Cat. # SCC064, Sigma-Aldrich), derivada de células estrelladas hepáticas humanas, fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (Gibco), suplementado con 2% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor (Sigma-Aldrich), 1% penicilina/estreptomina (Fisher Scientific) y 2 mM L-glutamina (Fisher Scientific), en un incubador humidificado, a 37°C, 5% CO₂. El cultivo se realizó hasta que se alcanzó un 70-80% de confluencia. Una vez alcanzada, se realizó un lavado con 10 mL de *Phosphate Buffered Saline* 1X (PBS) (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2g KH₂PO₄; 1,44 g Na₂HPO₄; 1L ddH₂O, pH = 7,4) los cultivos fueron tripsinizados (0,25%

tripsina EDTA) (Gibco) durante 3 minutos. Tras este periodo, la tripsina fue inactivada con medio DMEM y las células fueron centrifugadas a 300 g durante 3 minutos. Por último, las células fueron resuspendidas y sembradas a una densidad de $0,6 \times 10^6$ células/placa en placas de 100 mm (Corning) tras su recuento utilizando un contador Z2 Beckman® Coulter. Se realizaron pases subsiguientes para preparar los diferentes experimentos.

4.1.2. Descongelación

Las células fueron descongeladas en medio de cultivo que contiene los componentes mencionados anteriormente, suplementado con 10% FBS, y centrifugadas durante 3 minutos a 300 g. Tras la centrifugación, las células fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado con 10% FBS. Transcurridas 24h tras la descongelación, se les sustituyó el medio por medio DMEM suplementado con 2% FBS.

4.2. EXPERIMENTOS

4.2.1. Experimento 1: Efecto de la concentración de suero

Las células LX2 fueron sembradas en una placa de 6 pocillos (VWR) a una densidad de $0,2 \times 10^6$ células/pocillo, con 2 mL/pocillo de medio DMEM suplementado con 2% de FBS. Transcurridas 24 horas, el medio fue aspirado y se lavó tres veces todos los pocillos con medio DMEM 0% FBS. Una vez completados los lavados, el medio se sustituyó por medio DMEM suplementado con 0%; 0,2%; 2% y 10% respectivamente, tal y como se muestra en la figura 3. Transcurridas 48 horas desde la siembra de las células, se realizó la lisis de estas y la purificación del RNA.



Figura 3: Diseño experimental para el cultivo de HSCs bajo condiciones con distinta concentración de suero bovino fetal (Fetal bovine serum, FBS). Las células fueron sembradas en el día -1, el medio fue reemplazado por su correspondiente condición 24 h más tarde, en el día 0; y la lisis de las células para la extracción de RNA se realizó en el día 1.

4.2.2. Experimento 2: Tratamiento con 3MA 10 mM, IGF-1 10 nM durante 24 h.

En el día -1, las células LX2 fueron sembradas en dos placas de 24 pocillos (VWR) a una densidad de $0,03 \times 10^6$ células/pocillo en 0,5 mL de medio DMEM suplementado con 0%, 0,2%, 2% y 10% FBS respectivamente. Tras 24 horas, a día 0, para cada pocillo se realizaron tres lavados con medio DMEM 0% FBS, y posteriormente este fue reemplazado por el mismo medio de cultivo suplementado con 0%, 0,2%, 2% y 10% FBS, en sus respectivos pocillos; así como con factor de crecimiento similar a la insulina 1 humano recombinante (*Insulin-like growth factor I*, IGF-1) 10 nM (STEMCELL Technologies) tanto para los pocillos control como para los pocillos tratados con 3-metiladenina (3MA) (Sigma-Aldrich) 10 mM, como se muestra en la figura 4.

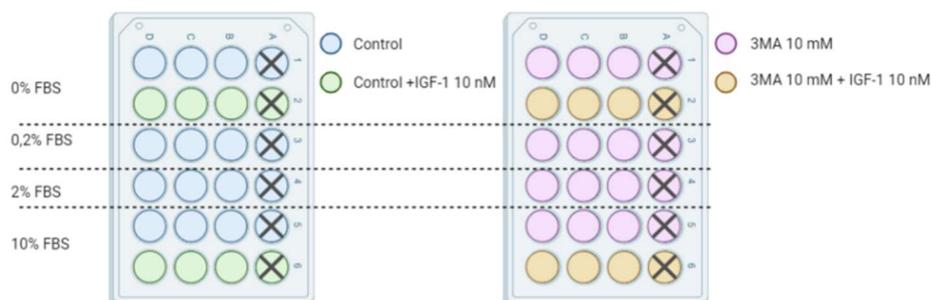


Figura 4: Diseño experimental para el tratamiento de las HSCs con 3-metiladenina (3MA) (10 mM) y factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) (10 nM). Las HSCs fueron sembradas por triplicado en medio de cultivo suplementado con 0% , 0,2%, 2% y 10% FBS. En color azul aparecen los pocillos tratados con el control (medio suplementado con FBS); en verde, los pocillos tratados con medio suplementado con 10 nM de IGF-1; en violeta los pocillos tratados con medio suplementado con 3MA 10 mM; y en naranja, los pocillos tratados con medio suplementado con la combinación de 3MA 10 mM e IGF-1 10 nM.

Para la preparación del medio suplementado con 3MA se resuspendieron 0,02088 g de 3MA en 14 mL de medio DMEM 0% FBS atemperado. Previamente a su adición a los pocillos, el medio fue filtrado con filtros de jeringa de 28 mm de diámetro, de 0,2 μ m de tamaño de poro y membrana de polietersulfona (PES) (Corning®). Una vez filtrado, a partir del stock de medio 0% FBS 3MA 10 mM, se preparó medio al 0,2%, 2% y 10% tal y se aplicó el tratamiento tal y como aparece en la figura 4.

4.3. INMUNOTINCIÓN

Para realizar la inmunotinción, se sembraron $0,025 \times 10^6$ células por pocillo en cubreobjetos pretratados con gelatina 0,1% en una placa de 24 pocillos. Transcurridas 24 h desde su siembra (día 0) el medio DMEM suplementado con 2% FBS fue aspirado, y se realizaron tres lavados con medio DMEM 0% FBS. Una vez completados los lavados, se añadió 0,5 mL por pocillo de medio DMEM suplementado con 0%, 2% y 10% FBS respectivamente, en ausencia o presencia de IGF-1 10 nM (STEMCELL Technologies); como se muestra en la figura 5.

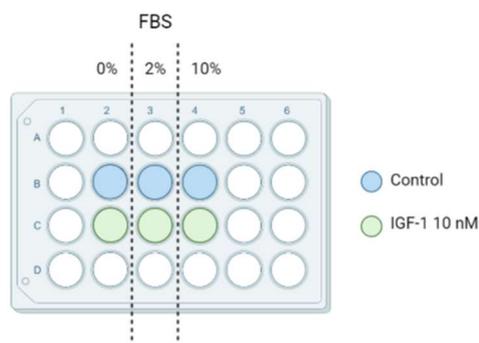


Figura 5: Diseño experimental para el experimento de inmunocitoquímica. Las células fueron sembradas en una placa de 24 pocillos, en medio suplementado con 0%, 2% y 10% de suero bovino fetal (FBS). En azul aparece el tratamiento control (medio suplementado con FBS); en verde aparecen los pocillos tratados con medio suplementado con FBS e IGF-1 10 nM.

A las 48 h desde su siembra, se aspiró el medio de los pocillos, se realizó un lavado con PBS 1X y las células fueron fijadas en los cubreobjetos con paraformaldehído (PFA) 4% (ThermoFisher) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X, y tras el último lavado, las células fueron permeabilizadas con PBS [0,5% Triton x100] durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se incubaron las células en disolución de bloqueo (PBS [1% BSA, 5% Suero equino, 0,2% Triton x100]) durante 1 h a temperatura ambiente. Durante la incubación se preparó una dilución

1:1000 de anticuerpo primario en disolución de bloqueo. Se necesitaron 60 µL de disolución de anticuerpos por cubreobjetos.

Transcurrida la incubación con la disolución de bloqueo, se incubaron las células con la disolución de anticuerpo primario que ya está conjugado al fluoróforo Cy3TM durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron seis lavados con PBS 1X y se incubaron con la Hoechst diluido en PBS [1% BSA, 0,2% Triton x100] (1:1000) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizaron seis lavados con PBS 1X y posteriormente se lavó dos veces con H₂O. Por último, se montó los cubreobjetos en portaobjetos utilizando medio de montaje fluorescente (Dako). Finalmente, los portaobjetos fueron almacenados en una carpeta de cartón para portaobjetos en la nevera a 4°C.

4.3.1. Anticuerpo primario

El anticuerpo primario utilizado para la inmunofluorescencia fue: Anti-Actin, α -Smooth Muscle - Cy3TM antibody, Mouse monoclonal (1:1000) (Sigma-Aldrich).

4.3.2. Detección de los núcleos

Para la detección de los núcleos celulares se utilizó el agente intercalante Hoechst (1:1000) (Sigma-Aldrich).

4.3.3. Adquisición de imágenes

Para la adquisición de imágenes de inmunofluorescencia se empleó un microscopio convencional de fluorescencia con una lente objetivo de 20x. Todas las imágenes se adquirieron con el mismo nivel de exposición.

El resto de imágenes fueron adquiridas con un microscopio invertido con filtro de contraste de fases, con el objetivo 10x.

4.4. RT-PCR

4.4.1. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA en las placas de seis pocillos, se le retiró el medio de cultivo a las células LX2 y se realizó tres lavados con PBS frío. Posteriormente, se extrajo el RNA utilizando el kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue eluido con 40 µL de agua libre de RNAsas.

La extracción de RNA de las placas de veinticuatro pocillos se realizó de la misma manera, utilizando el kit Quick-RNATM Miniprep kit (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comprobar la calidad del RNA se midieron con el equipo Nanodrop la absorbancia y los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 nm.

4.4.2. Retrotranscripción

Por cada reacción, 250 ng de RNA total fueron retrotranscritos a DNA complementario (cDNA) utilizando el kit PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara) siguiendo las instrucciones del fabricante para el ensayo qPCR del intercalador (TB Green). Se preparó una mezcla común con los componentes del kit, que posteriormente fue dispensada en viales Eppendorf de 0,2 mL de volumen. Para cada reacción se calculó el volumen necesario de RNA para alcanzar los 250 ng y se añadió agua libre de RNAsas hasta completar un volumen de 10 µL.

Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó 15 min a 37°C (transcripción reversa), 5 s a 85°C (inactivación de la transcriptasa reversa por calor), y finalmente a 4°C. Por último, se diluyeron 4 µL de cDNA con agua libre de RNasas para alcanzar un volumen final de 500 µL (1:125). Esta disolución diluida de cDNA fue congelada a -20 °C para su uso posterior. Para un almacenamiento a más largo plazo, el cDNA se congeló a -80°C.

4.4.3. PCR cuantitativa (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa comparativa (RT-PCR) se realizó con el equipo Lightcycler 480 (Roche). Se añadieron 5 µL de cDNA de la disolución diluida (1:125) en cada reacción PCR por triplicado. El gen de expresión constitutiva *RPL19* fue utilizado como gen de referencia para la normalización de la expresión mediante el método Δ Ct. Los pares de *primers* (directo/reverso) para cada gen aparecen recogidos en la tabla 1.

Tabla 1. Pares de primers directo/reverso utilizados para amplificar cada gen en la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

Gen	Directo	Reverso
<i>IRS2</i>	CCACCATCGTGAAAGAGTGA	TGAAATGGATGCATCGTACC
<i>FGF7</i>	TGCAATGAACAAGGAAGGAA	CCGTTGTGTGTCCATTTAGC
<i>KI67</i>	ACGGATTATACCTGGCCTTCC	GGAAGCTGGATACGGATGTCA
<i>SERPINE1</i>	TGATGGCTCAGACCAACAAG	TAGGGCAGTTCAGGATGTC
<i>IL-6</i>	GCACTGGCAGAAAACAACCT	TTTACCAGGCAAGTCTCCT
<i>HSPA1B</i>	TCAGGCCCTACCATTGAGGA	GAGTCCCAACAGTCCACCTC
<i>COL1A1</i>	TGGTGACAAGGGTGAGACAG	CTCCAGAGGGACCTTGTTCA
<i>COL3A1</i>	GGTGAGCCTGGTAAGAATGG	CTTGCCATCTTCGCCTTTAG
<i>α-SMA</i>	CAGTGGCCATCTCATTTTCA	CTGACGTGGCTATTCCTTC
<i>RPL19</i>	CGAATGCCAGAGAAGGTCAC	CCATGAGAATCCGCTTGTTT

La reacción PCR fue catalizada por TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara), siguiendo el siguiente programa de PCR: Desnaturalización del cDNA a 95°C durante 5 min, seguida de 45 ciclos de amplificación (95°C 10 s – 58°C 20 s – 72°C 30 s), los cuales son sucedidos un ciclo de *melting curve* (95°C 5 s – 65°C 1 min – detección continua a 97°C) y por último un ciclo de enfriamiento en el que se disminuye la temperatura gradualmente desde 40 °C hasta 4°C.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con el *software* GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA), utilizando el análisis *one way* ANOVA seguido por una comparación múltiple *post hoc* con el método de Tukey entre las distintas condiciones, en el caso del experimento del suero (n = 4). Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (SD). La significancia estadística se estableció en un valor de $p \leq 0,05$ y los resultados de la prueba estadística se expresaron de la siguiente manera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Tratamiento con 3MA e IGF-1.

Actualmente los mecanismos que inducen el proceso de reversión en las aHSCs no se encuentran caracterizados detalladamente. Por ello, las células LX2 fueron cultivadas a diferentes concentraciones de FBS, en presencia o ausencia de 3MA, un análogo de nucleótido que actúa como inhibidor de la autofagia, como control positivo para un fenotipo inactivo; dado que la autofagia es un proceso de gran importancia para la activación de las HSCs, participando en el movilización de las gotas lipídicas para obtener energía, observándose un incremento en el flujo autofágico durante la activación de estas células(Thoen et al., 2011). Además, se ha descrito que la inhibición de la autofagia resultó en una atenuación de la fibrosis a juzgar por la menor expresión de *COL1A1*, *ACTA2*, y un mayor contenido en gotas lipídicas(Hernandez-Gea et al., 2012). Como se muestra en la figura 6, el tratamiento con 3MA produjo cambios fenotípicos notables, en los que destaca la presencia de prolongaciones citoplasmáticas similares a las dendritas, que son características de qHSCs (Sato et al., 2003).

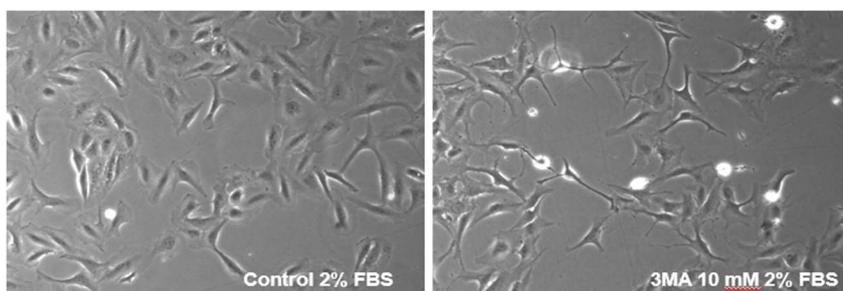


Figura 6: Diferencias fenotípicas en las LX2 tras el tratamiento control (2% FBS) o con 3MA 10 mM. Las células tratadas con 3MA presentan una morfología más ramificada, con prolongaciones citoplasmáticas similares a las dendritas, fenotipo más similar al de las qHSCs. Imágenes adquiridas en un microscopio invertido con el objetivo 10X.

En cuanto a nivel transcripcional (figura 7), las células tratadas con 3MA mostraron una menor expresión de genes asociados a un ambiente profibrótico tales como *COL1A1*, *ACTA2*, o *SERPINE1*, con la excepción del gen *COL3A1* que vio aumentada su expresión con respecto a las condiciones control, sugiriendo en general que las células parecían presentar un fenotipo más quiescente. Asimismo, también mostraron una expresión más elevada de *IRS2*, *FGF7*, *IL-6* y *HSPA1B*, que en condiciones control. Por otro lado, se observó una tendencia de los genes *FGF7*, *IL-6*, *HSPA1B* a ver reducida su expresión a concentraciones crecientes de FBS, mientras que los genes asociados a procesos fibróticos *ACTA2* y *SERPINE1* mostraron una tendencia contraria, incrementando su expresión conforme fue aumentando la concentración de FBS. Sin embargo, los genes *COL1A1* y *COL3A1* tendieron a ver reducida su expresión a mayores concentraciones de FBS.

En líneas generales se halló un paralelismo entre las tendencias de expresión génica de las células cultivadas en condiciones control y aquellas tratadas con 3MA, observándose un incremento de genes asociados a la fibrosis como *SERPINE1* y *ACTA2*, cuya expresión se vio atenuada debido al tratamiento con 3MA, insinuando que la exposición a este compuesto induce la aparición de un fenotipo inactivo; así como una reducción en genes cuya expresión se encuentra asociada a un fenotipo más revertido como *HSPA1B* o *FGF7*. Esto parece sugerir una mayor activación de las HSCs a mayor concentración de FBS. Sin embargo, las excepciones encontradas anteriormente en los genes *COL1A1* y *COL3A1* parecen contradecir esta hipótesis. Una posible explicación para este hecho podría ser que dicha contradicción sea resultado de errores humanos cometidos durante los distintos pasos llevados a cabo para el procesamiento de las muestras, puesto que el experimento se realizó una única vez (N=1). Por ello, se realizaron más

experimentos en los que se evaluó el efecto de la concentración de FBS sobre las HSCs para poder extraer conclusiones válidas.

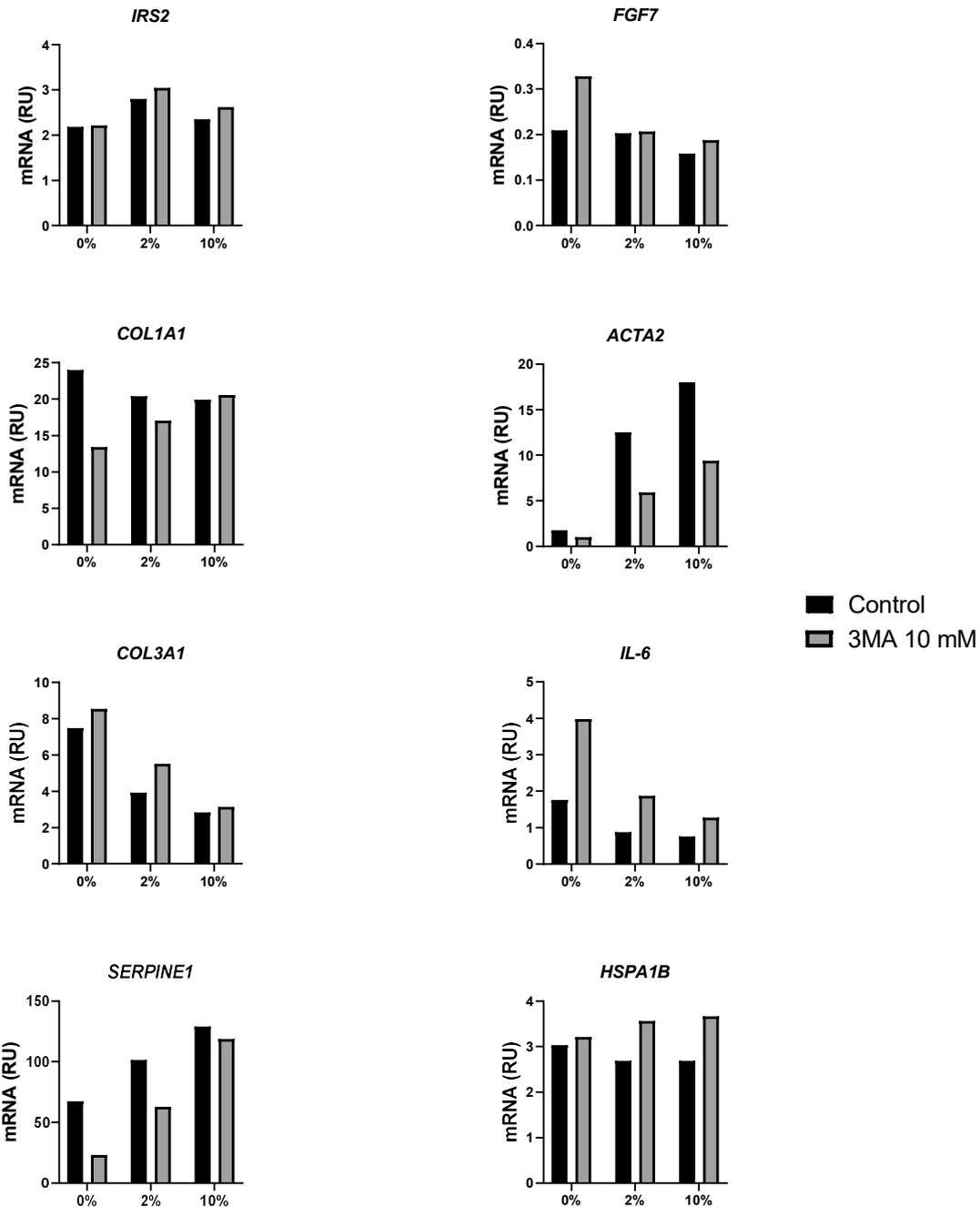


Figura 7: Niveles de expresión relativa para cada gen en distintas concentraciones de FBS. Se observa una tendencia a aumentar su expresión a concentraciones crecientes de suero para los genes *ACTA2* y *SERPINE1* relacionados con la activación de las HSC y la fibrosis. En estos genes el tratamiento con 3MA 10 mM redujo su expresión con respecto a las condiciones control. Los genes *COL3A1*, *IL-6*, *HSPA1B* y *FGF7* mostraron una tendencia a disminuir su expresión conforme aumentó la concentración de FBS. El tratamiento con 3MA 10 mM indujo una mayor expresión de los genes anteriormente mencionados con respecto a las condiciones control, también para el caso del gen *IRS2*. Experimento n = 1. Las barras representan la media de los replicados técnicos. El color gris representa las condiciones tratadas con 3MA 10 mM; el color negro, las condiciones control.

5.2. Efecto de la concentración de suero.

La similitud hallada entre el tratamiento con 3MA y el cultivo a bajas concentraciones de FBS en los patrones de expresión de los distintos genes, parece sugerir que las HSCs presentan un fenotipo más inactivo bajo estas condiciones. Por ello, se realizó un análisis de la expresión génica de las HSCs cultivadas a diferentes concentraciones de FBS (figura 8).

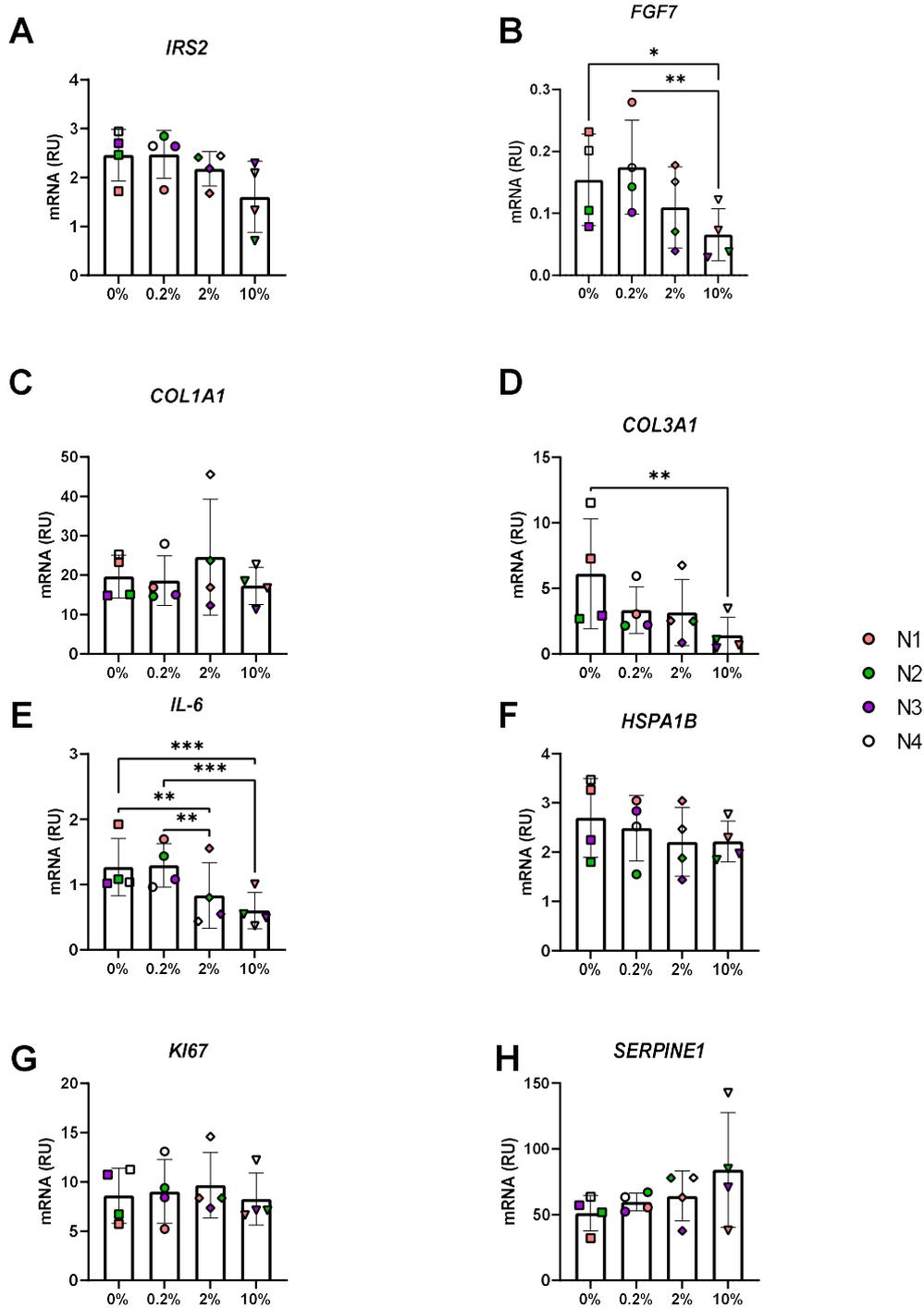


Figura 8: Niveles de expresión relativa de los distintos genes en condiciones con diferente concentración de FBS. Experimento n = 4. Cada punto representa una réplica biológica. Las barras representan la media + SD. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

< 0,01; ***p < 0,001. Para comparar medias se utilizó un análisis *one way* ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples). *RU*: *Unidades relativas*. Las rampas indican la tendencia de expresión de los genes. En azul, genes que reducen su expresión a concentraciones crecientes de suero; en rojo, genes que incrementan su expresión.

Los resultados del análisis fueron los siguientes:

Se observó una tendencia a la reducción de la expresión de *IRS2* a concentraciones crecientes de FBS (figura 8A). Este también fue el caso para *IL-6*, en el que además se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones, viéndose reducida conforme fue incrementando la concentración de suero (figura 8E); y para *COL3A1*, que contrariamente a lo esperado según la hipótesis de que la ausencia de suero resultaría en una menor activación en las LX2, también redujo su expresión al aumentar la concentración de FBS (figura 8D).

Por otro lado, la expresión del gen *FGF7* se redujo de manera significativa en las condiciones con mayor concentración de suero, presentando la máxima expresión en las células cultivadas con medio suplementado con 0,2% de FBS (figura 8B), lo que sugiere que se requiere cierta cantidad de factores de crecimiento en el suero para inducir su expresión. También se encontró una tendencia a reducir su expresión en el caso de *HSPA1B*, que desempeña un papel promoviendo la supervivencia ante condiciones de estrés, a concentraciones crecientes de suero (figura 8F). No obstante, en el caso de *SERPINE1*, gen que codifica para el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (*Plasminogen activator inhibitor 1*, PAI-1), se observó la tendencia contraria, incrementándose su expresión a mayores concentraciones de suero (figura 8H). Se ha descrito que la inhibición de PAI-1 resulta en una menor acumulación de MEC, así como una mayor actividad de las metaloproteasas de matriz 9 y 2 (*Matrix metalloproteases 9 y 2*; MMP9 y MMP2), sin embargo no afectó a la activación de las HSCs (Bergheim et al., 2006; Noguchi et al., 2020; Wang et al., 2007). Resultados anteriores del grupo han mostrado que *SERPINE1* se encuentra aguas debajo de *IRS2*, observando una inducción en la expresión de este gen tras sobreexpresar *IRS2*. Sin embargo, en este proyecto la expresión de *IRS2* y de *SERPINE1* muestran tendencias opuestas, en las condiciones cuyos niveles de expresión de *IRS2* fueron menores se corresponden con una mayor expresión de *SERPINE1*. Por último, no se hallaron diferencias significativas ni ninguna tendencia para el gene *COL1A1* (figura 8C).

5.3. Coeficientes de variación de los genes con respecto al tiempo

Sin embargo, dada la gran variabilidad entre réplicas biológicas observada en la mayoría de los genes analizados, se decidió calcular los coeficientes de variación de los genes a diferentes tiempos (figura 9) para comprobar si dicha variabilidad era, en parte, debida a errores en el pipeteo a la hora de introducir la muestra en la placa de qPCR.

Como se puede observar en la figura 9, los coeficientes de variación para uno de los genes se redujeron con el tiempo, sugiriendo que los errores en el pipeteo fueron disminuyendo a medida que se adquirió destreza en la técnica.

Teniendo en cuenta lo anterior y para descartar que las diferencias encontradas entre condiciones fueran debidas a la variación intraexperimental, se normalizó la expresión relativa de cada gen a una condición control, en este caso 0% FBS, la de menor concentración de FBS, para poder analizar cómo afecta el aumento de este a la expresión de los distintos genes.

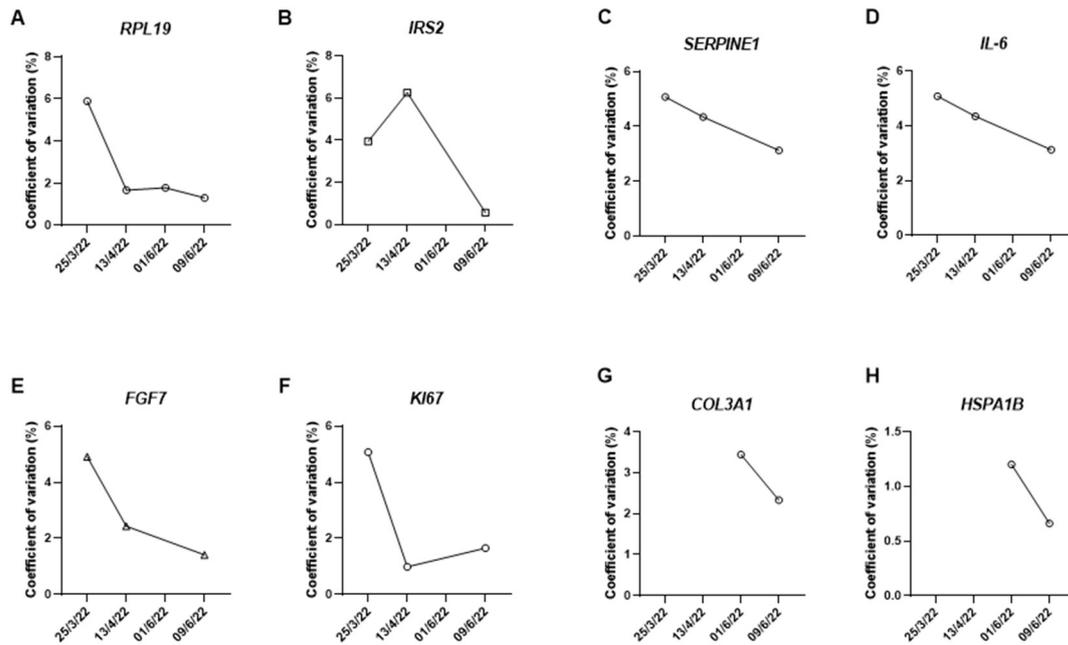


Figura 9: Tendencia de los coeficientes de variación de cada gen en función del tiempo. Se observa una tendencia hacia la disminución de la variación con el tiempo. Cada punto representa el valor del coeficiente de variación del gen correspondiente en una fecha determinada.

5.4. Normalización de la expresión génica con respecto a 0% FBS.

Como se puede apreciar en la figura 10, tras la normalización con respecto a la condición 0% FBS se siguió observando una reducción de los niveles de expresión de *IRS2* a concentraciones crecientes de suero, encontrándose diferencias significativas entre las condiciones 0,2% y 10% (figura 10A). Estas diferencias podrían haber sido enmascaradas debido a la baja expresión del gen en comparación con otros genes como *SERPINE1*, *COL1A1* o *KI67* dada la gran variabilidad existente antes de la normalización. Existen estudios en los que se ha observado una inducción en la expresión de *IRS2* en el hígado ante condiciones de ayuno, similares a las que experimentarían las células en condiciones de baja concentración de suero (Canetti et al., 2005), lo que respaldaría lo observado en este trabajo.

Además, también se siguieron encontrando diferencias significativas en la expresión de *FGF7* entre las distintas condiciones, siendo esta menor en aquellas condiciones de mayor concentración de FBS (figura 10B). Resultados anteriores del grupo mostraron que la sobreexpresión de *IRS2* en HSCs resultó en una mayor expresión de *FGF7*. Dado que se ha observado que *IRS2* es necesario para la expresión de *FGF7* y que a su vez promueve la supervivencia de las HSCs que expresan este factor (Manzano-Núñez et al., 2019), esta reducción en la expresión de tanto *IRS2* como de *FGF7* parece indicar que las HSCs se encuentran activadas a una alta concentración de suero, y puesto que se observó una mayor expresión de ambos genes en las condiciones de menor concentración de FBS, los resultados parecen sugerir que a bajas concentraciones de suero las HSCs presentan un fenotipo más quiescente o inactivo.

Asimismo, se sigue observando una reducción significativa en la expresión de *IL-6* a concentraciones crecientes de FBS, siendo máxima la expresión de esta citoquina en las condiciones de menor concentración de FBS (figura 10E). Se ha descrito que la *IL-6* es capaz de promover la expresión de *FGF7* en fibroblastos (Chedid et al., 1994), así como de inducir la senescencia de fibroblastos mediante la activación de *STAT3* (Kojima et al., 2013). En conjunto, esto parece sugerir que la expresión de *IL-6* en las condiciones de baja concentración de suero esté promoviendo la expresión de *FGF7*, fomentando la regeneración. Sin embargo, los niveles

de expresión de *IL-6* podrían no coincidir con la concentración de IL-6, ya que podría existir una regulación negativa a nivel proteína de esta citoquina, por lo que deberían realizarse futuros experimentos para comprobar mediante *western blot* o ELISA la concentración de IL-6 en las HSCs sometidas a estas mismas condiciones.

Por otro lado, siguieron sin observarse diferencias significativas en los niveles de *COL1A1* (figura 10C), y la expresión de *COL3A1* (figura 10D) se vio reducida significativamente en las condiciones de mayor concentración de suero, aparentando contradecir la hipótesis de que el suero promueve la activación de las HSCs (Schinagl et al., 2021). Sin embargo, se ha descrito que la omisión de insulina, que se podría dar en las condiciones 0% y 0,2% FBS, en las que se observó una mayor expresión de COL3A1, no afectó a la expresión de los genes *COL1A1*, *COL3A1* y *ACTA2* (Manzano-Núñez et al., 2019), por lo que una ausencia o menor señalización de insulina/IGF-1 podría no ser suficiente para evitar la completa activación de las HSCs. Además, este fenómeno podría también deberse a que la exposición de las células durante 24 horas ante estas distintas concentraciones de suero no fuera suficiente para inducir los cambios esperados en el perfil transcripcional de las células, por lo que sería interesante repetir los experimentos bajo las mismas condiciones a más largo plazo, como 48 y 72 horas, para observar los cambios que se producen en la expresión de los colágenos de tipo I y III.

Además, no se observaron diferencias significativas en la proliferación de las células en las distintas condiciones, a juzgar por los niveles de expresión del marcador de proliferación *KI67*, sin embargo, sí que se observa una ligera tendencia a incrementar su expresión a mayores concentraciones de FBS. Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de *HSPA1B*, proteína antiapoptótica, que ha sido descrita como un marcador de quiescencia cuya expresión se ve disminuida en las aHSCs (Kisseleva et al., 2012), aunque sí se observa una leve tendencia a una mayor expresión en condiciones de baja concentración de FBS.

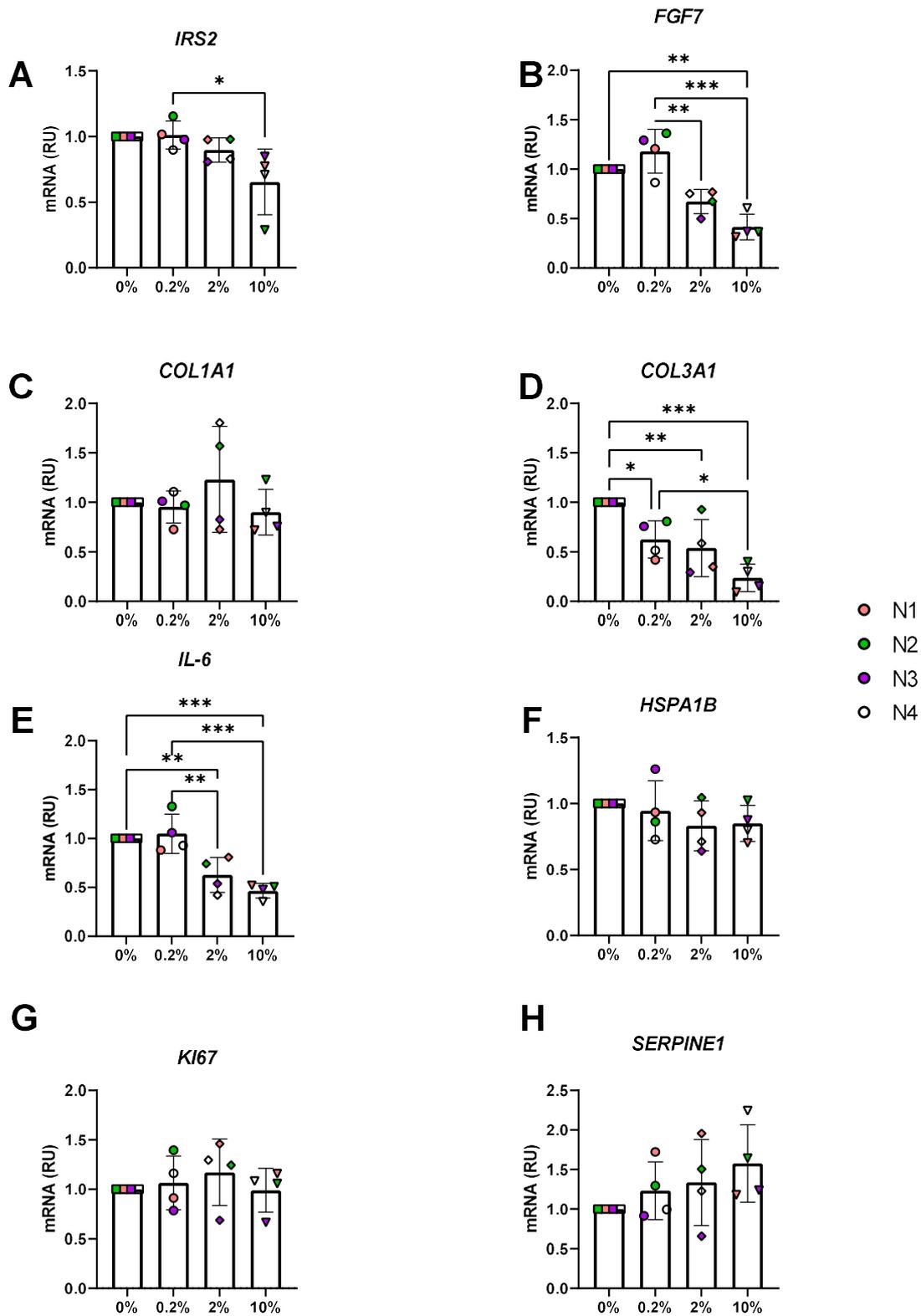


Figura 20: Niveles de expresión relativa de cada gen normalizados respecto a la condición 0% FBS. Experimento n = 4. Las barras representan la media + SD. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. Para comparar medias se utilizó un análisis *one way ANOVA* (Tukey's para comparaciones múltiples). *RU*: Unidades relativas. Se observaron diferencias significativas en los genes *IRS2*, *FGF7*, *COL3A1* e *IL-6*, aumentando su expresión conforme se redujo la concentración de FBS. Las rampas indican la tendencia de expresión de los genes. En azul, genes que reducen su expresión a concentraciones crecientes de suero; en rojo, genes que incrementan su expresión.

5.5. Inmunotinción para la detección de células α -SMA⁺.

Para constatar el efecto del suero sobre el estado de activación de las HSCs se realizó una inmunotinción de las células sujetas a las distintas condiciones con diferentes concentraciones de FBS (figura 11), que reveló un descenso en el número de células positivas para α -SMA, marcador de activación de las HSCs, conforme fue disminuyendo la concentración de FBS, siguiendo la misma tendencia que los niveles de expresión de mRNA del gen *ACTA2* (figura 7), que codifica para dicha proteína, lo que parece respaldar resultados previos descritos en la bibliografía en los que el cultivo de las HSCs en 10% de FBS produjo un incremento en la expresión a nivel de proteína de α -SMA, que se vio revertido al cultivarlas 24 horas adicionales en medio suplementado con 1% FBS (Schinagl et al., 2021). No obstante, cabría esperar que el cultivo de las células LX2 mostrase una respuesta más homogénea en cuanto a la expresión de esta proteína, con una mayoría de células α -SMA⁺ en altas concentraciones de suero, sin embargo, existen estudios en modelos murinos que sugieren la existencia de diversas subpoblaciones de aHSCs, que se diferencian por la expresión de ciertos genes. Mientras que unas subpoblaciones expresan altos niveles de citoquinas inflamatorias como *Ccl2* o *Cxcl10*, otras expresan genes asociados a la movilidad y contractibilidad (*Acta2*, *Vim*) o genes asociados a la organización y deposición de MEC (*Colla1*, *Lox*) (Rosenthal et al., 2021; Yang et al., 2021). Por lo tanto, una posible explicación para la heterogeneidad observada en la expresión de α -SMA podría ser debida a la existencia de subpoblaciones de HSC dentro del cultivo.

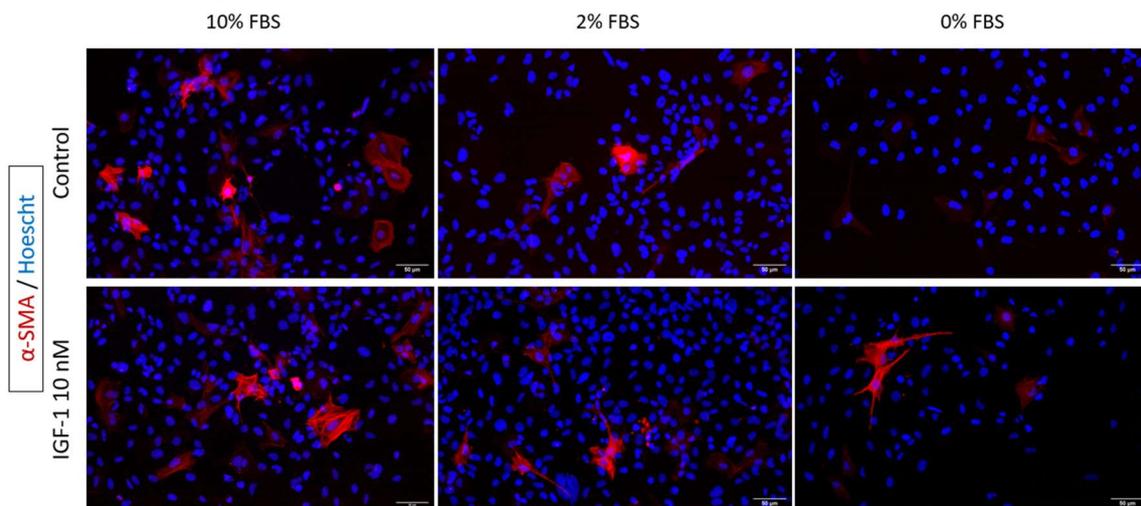


Figura 31: Resultados de la tinción de inmunofluorescencia para la detección de la proteína actina alfa del músculo liso (α -SMA) en las células LX2 cultivadas en las distintas condiciones (0%, 2% y 10% FBS en ausencia o presencia de IGF-1 10 nM). En azul aparecen los núcleos marcados con Hoescht; en rojo, las células positivas para α -SMA. Se observa un incremento en el número de células α -SMA⁺ según va aumentando la concentración de FBS, indicando una mayor activación a mayores niveles de suero. La presencia de IGF-1 no parece afectar al número de células α -SMA⁺. Experimento n = 1. Barra de escala = 50 μ m

Además, existe controversia entre el papel que lleva a cabo IGF-1 en la activación de las HSCs. Por un lado, existen estudios en los que el tratamiento con IGF-1 resultó en una reducción del número de HSCs α -SMA⁺, junto con un aumento en el número de HSCs positivas para la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia, así como en el incremento de los niveles de p53, sugiriendo que IGF-1 es capaz de inducir senescencia en las HSCs de manera dependiente de p53 (Handayaningsih et al., 2012; Nishizawa et al., 2016). Por otro lado, en otros estudios se observó que el tratamiento con IGF-1 produjo un aumento en la proliferación de las HSCs y en los niveles de expresión de colágeno de tipo I, así como en el número de HSCs α -SMA⁺, sugiriendo una mayor activación de las células (Svegliati-Baroni et al., 1999; Villar-Lorenzo et al., 2019).

Sin embargo, en la figura 11 no se observaron diferencias notables en la mayoría de condiciones, entre las condiciones control y aquellas suplementadas con 10 nM de IGF-1 humano recombinante, a excepción de las células cultivadas en 0% FBS, en las que la retirada de IGF-1 parece reducir el número de HSCs α -SMA⁺, apoyando lo descrito en otros estudios (Villar-Lorenzo et al., 2019). Podría ser que un periodo de 24 horas de suplementación con este factor no es suficiente para apreciar diferencias notables con respecto al control en el resto de condiciones. Por ello, sería interesante repetir el experimento más veces, tratando los cultivos durante periodos de tiempo más prolongados tales como 48 y 72 horas, analizando la expresión de genes marcadores de activación (*ACTA2*, *COL1A1*, *COL3A1*) y de reversión (*HSPA1B*), así como la expresión de estos genes a nivel de proteína.

6.CONCLUSIONES

- I. La privación de FBS promueve la inactivación de las HSCs, a juzgar por la reducción en el número de células α -SMA⁺ y la menor expresión de los genes *SERPINE1* y *ACTA2*, así como unos mayores niveles de *HSPA1B*.
- II. Existe una sinergia entre el tratamiento con 3MA y la ausencia de señalización de insulina/IGF-1 a la hora de inducir la expresión de *FGF7*, *IL-6* y *HSPA1B*.
- III. El aumento de expresión de *IL-6* en las condiciones con poca concentración de FBS podría estar favoreciendo una mayor expresión de *FGF7* a través de la inactivación de las HSCs.
- IV. A corto plazo (24 h) se observó un incremento en la expresión de *COL3A1*, disminuyendo su expresión a concentraciones crecientes de FBS tanto en condiciones como baja concentración de FBS como con el tratamiento con 3MA. Por lo que sería interesante estudiar la expresión de dicho gen a más largo plazo en estas condiciones.

Considerando el conjunto de resultados obtenidos, se debería profundizar en la señalización de las HSCs a bajas concentraciones de suero para una mejor caracterización del proceso de reversión de estas células, así como para identificar señales aguas arriba del eje IRS2/FGF7 que podrían promover su activación, tales como la estimulación con citocinas tales como IL-6.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adamczak, M., Ritz, E., & Wiecek, A. (2022). Carbohydrate metabolism in chronic renal disease. *Nutritional Management of Renal Disease*, 29–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818540-7.00005-7>
- Aller, R., Sigüenza, R., Pina, M., Laserna, C., Antolín, B., Burgueño, B., Durà, M., Izaola, O., Primo, D., & de Luis, D. A. (2020). Insulin resistance is related with liver fibrosis in type 2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease proven biopsy and Mediterranean diet pattern as a protective factor. *Endocrine*, 68(3), 557–563. <https://doi.org/10.1007/S12020-020-02268-7/TABLES/3>
- Baltzis, D., Eleftheriadou, I., & Veves, A. (2014). Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances in Therapy*, 31(8), 817–836. <https://doi.org/10.1007/S12325-014-0140-X/TABLES/1>
- Battaller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>
- Beaulant, A., Dia, M., Pillot, B., Chauvin, M.-A., Ji-cao, J., Durand, C., Bendridi, N., Chanon, S., Vieille-Marchiset, A., Da Silva, C. C., Patouraux, S., Anty, R., Iannelli, A., Tran, A., Gual, P., Vidal, H., Gomez, L., Paillard, M., & Rieusset, J. (2022). Endoplasmic reticulum-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2022.03.017>
- Bergheim, I., Guo, L., Davis, M. A., Duveau, I., & Arteel, G. E. (2006). Critical Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cholestatic Liver Injury and Fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 592–600. <https://doi.org/10.1124/JPET.105.095042>
- Biagini, G., & Ballardini, G. (1989). Liver fibrosis and extracellular matrix. *Journal of Hepatology*, 8(1), 115–124. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(89\)90170-0](https://doi.org/10.1016/0168-8278(89)90170-0)
- Boucher, J., Kleinriders, A., & Ronald Kahn, C. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A009191>
- Brauchle, M., Madlener, M., Wagner, A. D., Angermeyer, K., Lauer, U., Hofschneider, P. H., Gregor, M., & Werner, S. (1996). Keratinocyte growth factor is highly overexpressed in inflammatory bowel disease. *The American Journal of Pathology*, 149(2), 521. [/pmc/articles/PMC1865327/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1865327/)
- Cai, C. X., Buddha, H., Castelino-Prabhu, S., Zhang, Z., Britton, R. S., Bacon, B. R., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2017). Activation of Insulin-PI3K/Akt-p70S6K Pathway in Hepatic Stellate Cells Contributes to Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 62(4), 968–978. <https://doi.org/10.1007/S10620-017-4470-9/FIGURES/6>
- Canettieri, G., Koo, S. H., Berdeaux, R., Heredia, J., Hedrick, S., Zhang, X., & Montminy, M. (2005). Dual role of the coactivator TORC2 in modulating hepatic glucose output and insulin signaling. *Cell Metabolism*, 2(5), 331–338. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2005.09.008>

Chedid, M., Rubin, J. S., Csaky, K. G., & Aaronson, S. A. (1994). Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10753–10757. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34123-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34123-6)

Cheng, D. (2005). Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutrition and Metabolism*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-29/TABLES/3>

De Smet, V., Eysackers, N., Merens, V., Kazemzadeh Dastjerd, M., Halder, G., Verhulst, S., Mannaerts, I., & van Grunsven, L. A. (2021). Initiation of hepatic stellate cell activation extends into chronic liver disease. *Cell Death & Disease* 2021 12:12, 12(12), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04377-1>

Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*, 88(11), 1254–1264. <https://doi.org/10.2522/PTJ.20080020>

Friedman, S. L. (2003). Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, 38(1), 38–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00429-4)

Friedman, S. L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiological Reviews*, 88(1), 125. www.prv.org

Handayaningsih, A. E., Takahashi, M., Fukuoka, H., Iguchi, G., Nishizawa, H., Yamamoto, M., Suda, K., & Takahashi, Y. (2012). IGF-I enhances cellular senescence via the reactive oxygen species–p53 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(2), 478–484. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.07.140>

Hellerbrand, C., Wang, S. C., Tsukamoto, H., Brenner, D. A., & Rippe, R. A. (1996). Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology*, 24(3), 670–676. <https://doi.org/10.1002/HEP.510240333>

Hernández-Gea, V., Ghiassinejad, Z., Rozenfeld, R., Gordon, R., Fiel, M. I., Yue, Z., Czaja, M. J., & Friedman, S. L. (2012). Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*, 142(4), 938–946. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.044>

Housley, R. M., Morris, C. F., Boyle, W., Ring, B., Biltz, R., Tarpley, J. E., Aukerman, S. L., Devine, P. L., Whitehead, R. H., & Pierce, G. F. (1994). Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(5), 1764–1777. <https://doi.org/10.1172/JCI117524>

Ichimura, T., Finch, P. W., Zhang, G., Kan, M., & Stevens, J. L. (1996). Induction of FGF-7 after kidney damage: a possible paracrine mechanism for tubule repair. <https://doi.org/10.1152/Ajprenal.1996.271.5.F967>, 271(5) PART 2). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.1996.271.5.F967>

Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C., & Arthur, M. J. P. (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 102(3), 538. <https://doi.org/10.1172/JCI1018>

Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y. H., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., Evans, S. M., Dillmann, W., Glass, C. K., & Brenner, D. A. (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(24), 9448–9453. https://doi.org/10.1073/PNAS.1201840109/SUPPL_FILE/SAPP.PDF

Kitto, L. J., & Henderson, N. C. (2021). Hepatic Stellate Cell Regulation of Liver Regeneration and Repair. *Hepatology Communications*, *5*(3), 358–370. <https://doi.org/10.1002/HEP4.1628>

Kojima, H., Inoue, T., Kunimoto, H., & Nakajima, K. (2013). IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT*. <https://doi.org/10.4161/jkst.25763>

Lin, J., Zheng, S., & Chen, A. (2009). Curcumin attenuates the effects of insulin on stimulating hepatic stellate cell activation by interrupting insulin signaling and attenuating oxidative stress. *Laboratory Investigation* *2009 89:12*, *89*(12), 1397–1409. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.115>

Liu, X., Xu, J., Rosenthal, S., Zhang, L. Juan, McCubbin, R., Meshgin, N., Shang, L., Koyama, Y., Ma, H. Y., Sharma, S., Heinz, S., Glass, C. K., Benner, C., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2020). Identification of Lineage-specific Transcription Factors That Prevent Activation of Hepatic Stellate Cells and Promote Fibrosis Resolution. *Gastroenterology*, *158*(6), 1728. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.01.027>

Manzano-Núñez, F., Arámbul-Anthony, M. J., Galán Albiñana, A., Leal Tassias, A., Acosta Umanzor, C., Borreda Gascó, I., Herrera, A., Forteza Vila, J., Burks, D. J., & Noon, L. A. (2019). Insulin resistance disrupts epithelial repair and niche-progenitor Fgf signaling during chronic liver injury. *PLoS Biology*, *17*(1), e2006972. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972>

Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D. H., Pradere, J. P., & Schwabe, R. F. (2013). Fate-tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its etiology. *Nature Communications*, *4*, 2823. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS3823>

Nishizawa, H., Iguchi, G., Fukuoka, H., Takahashi, M., Suda, K., Bando, H., Matsumoto, R., Yoshida, K., Odake, Y., Ogawa, W., & Takahashi, Y. (2016). IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. *Scientific Reports* *2016 6:1*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep34605>

Noguchi, R., Kaji, K., Namisaki, T., Moriya, K., Kawaratani, H., Kitade, M., Takaya, H., Aihara, Y., Douhara, A., Asada, K., Nishimura, N., Miyata, T., & Yoshiji, H. (2020). Novel oral plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor TM5275 attenuates hepatic fibrosis under metabolic syndrome via suppression of activated hepatic stellate cells in rats. *Molecular Medicine Reports*, *22*(4), 2948. <https://doi.org/10.3892/MMR.2020.11360>

Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Cavan, D., Shaw, J. E., & Makaroff, L. E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *128*, 40–50. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2017.03.024>

Paradis, V., Perlemuter, G., Bonvoust, F., Dargere, D., Parfait, B., Vidaud, M., Conti, M., Huet, S., Ba, N., Buffet, C., & Bedossa, P. (2001). High glucose and hyperinsulinemia

stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 34(4), 738–744. <https://doi.org/10.1053/JHEP.2001.28055>

Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1473–1492. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C120035>

Ratziu, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S., & Friedman, S. L. (1998). Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9500–9505. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.16.9500>

Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS9040875>

Rosenthal, S. B., Liu, X., Ganguly, S., Dhar, D., Pasillas, M. P., Ricciardelli, E., Li, R. Z., Troutman, T. D., Kisseleva, T., Glass, C. K., & Brenner, D. A. (2021). Heterogeneity of hepatic stellate cells in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 74(2), 667. <https://doi.org/10.1002/HEP.31743>

Rubin, J. S., Osada, H., Finch, P. W., Taylor, W. G., Rudikoff, S., & Aaronson, S. A. (1989). Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(3), 802–806. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.3.802>

Sato, M., Suzuki, S., & Senoo, H. (2003). Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and Function*, 28(2), 105–112. <https://doi.org/10.1247/CSF.28.105>

Schinagl, M., Tomin, T., Gindlhuber, J., Honeder, S., Pflieger, R., Schittmayer, M., Trauner, M., & Birner-Gruenberger, R. (2021). Proteomic Changes of Activated Hepatic Stellate Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312782>

She, H., Xiong, S., Hazra, S., & Tsukamoto, H. (2005). Adipogenic Transcriptional Regulation of Hepatic Stellate Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4959–4967. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410078200>

Stelling, H., Mühlbauer, M., Bataille, F., Schölmerich, J., Werner, S., & Hellerbrand, C. (2004). Activated Hepatic Stellate Cells Express Keratinocyte Growth Factor in Chronic Liver Disease. *The American Journal of Pathology*, 165(4), 1233. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63383-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63383-4)

Svegliati-Baroni, G., Ridolfi, F., Di Sario, A., Casini, A., Marucci, L., Gaggiotti, G., Orlandoni, P., Macarri, G., Perego, L., Benedetti, A., & Folli, F. (1999). Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: Differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology*, 29(6), 1743–1751. <https://doi.org/10.1002/HEP.510290632>

Tohen, L. F. R., Guimarães, E. L. M., Dollé, L., Mannaerts, I., Najimi, M., Sokal, E., & Van Grunsven, L. A. (2011). A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *Journal of Hepatology*, 55(6), 1353–1360. <http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168827811005721/fulltext>

Trautwein, C., Friedman, S. L., Schuppan, D., & Pinzani, M. (2015). Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *Journal of Hepatology*, 62(1), S15–S24. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.02.039>

Trivedi, H. D., Suri, J., Oh, D., Schwartz, J., Goyes, D., Idriss, R., Curry, M. P., & Lai, M. (2021). The presence of diabetes impacts liver fibrosis and steatosis by transient elastography in a primary care population. *Annals of Hepatology*, 24, 100336. <https://doi.org/10.1016/J.AOHEP.2021.100336>

Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G. Y., Dapito, D. H., Mu, X., Hsu, C. C., Pradere, J. P., Friedman, R. A., & Schwabe, R. F. (2012). Deactivation of Hepatic Stellate Cells During Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology*, 143(4), 1073-1083.e22. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2012.06.036>

Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 397–411). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>

Tuomi, T., Santoro, N., Caprio, S., Cai, M., Weng, J., & Groop, L. (2014). The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *The Lancet*, 383(9922), 1084–1094. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62219-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62219-9)

Van Tilburg, J., Van Haeften, T. W., Pearson, P., & Wijmenga, C. (2001). Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Genetics*, 38(9), 569–578. <https://doi.org/10.1136/JMG.38.9.569>

Villar-Lorenzo, A., Rada, P., Rey, E., Marañón, P., Arroba, A. I., Santamaría, B., Sáiz, J., Rupérez, F. J., Barbas, C., Garcíá-Monzón, C., Valverde, Á. M., & González-Rodríguez, Á. (2019). Insulin receptor substrate 2 (IRS2) deficiency delays liver fibrosis associated with cholestatic injury. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(7). <https://journals.biologists.com/dmm/article/12/7/dmm038810/3364/Insulin-receptor-substrate-2-IRS2-deficiency>

Wang, H., Zhang, Y., & Heuckeroth, R. O. (2007). PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Letters*, 581(16), 3098–3104. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.05.049>

Werner, S. (1998). Keratinocyte Growth Factor: A Unique Player in Epithelial Repair Processes. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(2), 153–165. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(98\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(98)00010-0)

Werner, S., Breiden, M., Hübner, G., Greenhalgh, D. G., & Longaker, M. T. (1994). Induction of Keratinocyte Growth Factor Expression Is reduced and Delayed During Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 103(4), 469–473. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12395564>

White, M. F. (2014). IRS2 integrates insulin/IGF1 signalling with metabolism, neurodegeneration and longevity. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16(S1), 4–15. <https://doi.org/10.1111/DOM.12347>

Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S., & White, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998 391:6670, 391(6670), 900–904. <https://doi.org/10.1038/36116>

Xu, L., Hui, A. Y., Albanis, E., Arthur, M. J., O’Byrne, S. M., Blaner, W. S., Mukherjee, P., Friedman, S. L., & Eng, F. J. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 54(1), 142. <https://doi.org/10.1136/GUT.2004.042127>

Yang, W., He, H., Wang, T., Su, N., Zhang, F., Jiang, K., Zhu, J., Zhang, C., Niu, K., Wang, L., Yuan, X., Liu, N., Li, L., Wei, W., & Hu, J. (2021). Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell–Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology*, 74(5), 2774–2790. <https://doi.org/10.1002/HEP.31987>

Zhang, H., Chen, F., Fan, X., Lin, C., Hao, Y., Wei, H., Lin, W., Jiang, Y., & He, F. (2017). Quantitative Proteomic analysis on Activated Hepatic Stellate Cells reversion Reveal STAT1 as a key regulator between Liver Fibrosis and recovery. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep44910>

Zhou, B., Lu, Y., Hajifathalian, K., Bentham, J., Di Cesare, M., Danaei, G., Bixby, H., Cowan, M. J., Ali, M. K., Taddei, C., Lo, W. C., Reis-Santos, B., Stevens, G. A., Riley, L. M., Miranda, J. J., Bjerregaard, P., Rivera, J. A., Fouad, H. M., Ma, G., ... Cisneros, J. Z. (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*, 387(10027), 1513–1530. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8)