



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biotecnología

Papel de IRS2 en la regulación de la comunicación a través de FGFs en el nicho de células progenitoras hepáticas

Tesis doctoral presentada por:

María José Arámbul Anthony

Dirigida por:

Dr. Luke A. Noon

Dra. Deborah J. Burks

Tutorizada por:

Dra. María Adelaida García Gimeno

Septiembre de 2022

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director, Luke, no solo por ser mi director sino por ser mi mentor. Gracias por confiar en mí desde el primer momento, por abrirme las puertas del mundo de la ciencia y ayudarme a que me quedara en él. Por tener paciencia e ideas infinitas y ver el lado bueno de cualquier resultado. Te agradezco que me hayas dado la confianza de tomar decisiones, de equivocarme y de luchar por mis ideas. Poder sentir el proyecto como mío ha sido fundamental para mi crecimiento como investigadora. Gracias por saber cuándo necesitaba palabras de ánimo, por motivarme en los días buenos y tolerarme en los días malos, soy consciente de la suerte que he tenido de tener un jefe tan excepcional en estos aspectos. Para mí ha sido un honor disfrutar de tu pasión por la ciencia y un placer aprender “discutiendo” contigo. Es difícil agradecerte tanto.

Me gustaría agradecer a Deborah, también directora de la tesis, por encontrar siempre un momento para ayudarme, por sus valiosos consejos científicos y por ser tan cercana con los suyos. Gracias Deborah por creer en mí y querer lo mejor para mí.

Gracias Ada por aceptar ser mi tutora de la UPV, por estar siempre pendiente y ayudarme en todo lo que ha estado en tu mano.

I would like to express my gratitude to Sabine for accepting me in her laboratory, and Abbie for being the most lovely and supportive supervisor during my time at ETH-Zürich. Thank you both for your enormous help in the development of this project. Thanks to the other members of the laboratory for making my stay a pleasant time.

Me gustaría continuar agradecimiento a mi laboratorio. Gracias Aran, por enseñarme con tanta meticulosidad y paciencia, por saber siempre dónde está todo y cómo hacer todo, por escucharme y animarme en cada paso. El laboratorio tiene muchísima suerte de tenerte. Gracias Amparo por tus consejos científicos, por ayudarme tanto a sacar adelante este trabajo y por tener siempre palabras de ánimo. Gracias a ambas por ser mis manos y mi cabeza en tantas ocasiones, vuestra ayuda durante este trabajo ha sido indispensable. Gracias Toni por

enseñarme con tanta paciencia y salero durante mis primeros meses de trabajo y por haber estado siempre disponible para ayudarme después. Gracias a Carlos por compartir conmigo la pasión por NRF2 y por dejar de lado la broma para ser justo en las situaciones serias.

Quiero agradecer también al I-57, principalmente a Rosa, no solo por acogerme dentro de su “unidad familiar” sino por hacerme sentir que formaba parte de ella. Vuestra generosidad ha sido fundamental para este trabajo. Gracias a Arantxi, José Miguel, Carol, Bea, Ali, Alicia y Domingo por hacerme sentir como en casa y por estar siempre dispuestos a ayudarme. Gracias Carol por tu apoyo y por tantos consejos científicos, tenerte cerca es un regalo para cualquier investigador.

Gracias a todos los servicios del CIPF por ser absolutamente excepcionales, tenemos mucha suerte de trabajar en un centro de investigación que cuenta con vuestra ayuda. Mención especial a Alicia y Domingo (citometría) y a Alberto (microscopía confocal) por vuestra contribución durante este trabajo y por vuestra gran profesionalidad.

Quiero continuar agradeciendo a mis dos grandes compañeras de viaje doctoral, Fátima y Arantxi. En los últimos años hemos compartido todo, desde reactivos, bancadas, consejos científicos y congresos, a secretos, comidas (literalmente, cuando alguna olvidaba su “tupper”), tiempo libre, muchísimas risas y algún llanto. Gracias Fátima por ser un referente para mí. Gracias por tantos consejos científicos y no científicos, por ver siempre el lado positivo de las cosas, por convertir en divertido hasta el más aburrido de los experimentos. Gracias Arantxi por compartir conmigo la inmensa generosidad que guardas detrás de ese carácter y esa fuerza que tanto admiro. Gracias por entenderme tan bien, por ser la mejor confidente y compañera de batallas, por saber cuándo necesitaba un abrazo. Gracias a ambas por llenar mi día a día de amistad y buenos momentos.

Gracias José Miguel por tener siempre un “meme” o una noticia que comentar para hacernos a Arantxi y a mí el día a día en el laboratorio más ameno, pero sobre todo gracias por ser amigo y confidente. Gracias a Andrea y Candela, por formar parte de mi “laboratorio particular”. Por estar siempre disponibles para discutir algún dato o protocolo, pero también para desahogarme o tomarnos una cerveza. Andrea, gracias por entenderme siempre, por transmitirme tranquilidad y amor incondicional.

Cande, gracias por cuidarnos tanto, por estar siempre disponible para ayudar y por ser la mejor anfitriona del mundo. Gracias Espe por tus valiosos consejos y por ser siempre tan honesta y clara. Sabéis que es verdad cuando os digo que vuestro apoyo ha sido esencial para mí y que me siento afortunada de teneros. Gracias por formar parte de mis mejores momentos en el CIPF y por entrar en mi vida junto con el resto de los amigos del CIPF (y parejas), entre los que aún no he nombrado a Jesús, Emilio, Gustavo, Mar y María. Gracias a todos vosotros por tantos viajes, cenas, festivales, fallas y días de playa. Volvería a hacer la tesis solo por conoceros (¡que no es poco!).

Thanks to Marion and Ceci for making me feel at home in Zürich. Special thanks to Marion for being the best flatmate I could ever find, for sharing with me so many dinners and chapters of prison break, for showing me your country and let me into your life. Thanks for becoming a life-long friend for me in only three months.

Gracias a mis chicas biotec, Carmen, Marta, Clara y Alba por obligarme a despejarme después del trabajo. Vuestra enorme creatividad para sacarle partido a una carrera que finalmente tampoco era “la carrera del futuro” es un ejemplo para mí. Gracias por hacerme ver que se puede.

Gràcies a “Ni Fet Aposta” per omplir de riures cada cap de setmana, cada viatge, cada festiu. Gràcies per saber que puc comptar amb vosaltres incondicionalment. Fa tant que ens coneixem i hem viscut tantes coses junts que és impossible agrair-vos-ho com mereixeu. Simplement vos diré que gràcies per ser família.

Gràcies a la família Molés-Cases per donar-me a la persona més important de la meua vida, per preocupar-vos per mi a cada pas i per ajudar-me en tot el que heu pogut durant aquesta etapa de doctorat.

Gracias a mis padres, María José y Pepe, y a mi hermana Andrea. Es imposible explicar cuanto os quiero y cuanto agradezco vuestro apoyo incondicional. Gracias, papás, por hacerme ser quién soy, por vuestra inmensa dedicación y preocupación. Gracias por nunca ponerme fronteras y enseñarme que puedo con todo, pero, sobre todo, gracias por transmitirme la certeza de que si fallo estaréis para recogerme. Teta, nunca podré agradecer la suerte que he tenido de crecer al lado de tu luz y tu alegría. Eres mi mitad y mi mejor amiga. Gracias a los tres por escucharme tanto

durante este proceso y por darme tan buenos consejos. Que estéis orgullosos de mí es la mejor recompensa que me llevo de esta tesis doctoral.

Finalment, vull agrair a Vicent per omplir la meua vida de llum, alegria i pau. Gràcies per fer-me feliç i per preocupar-te de fer-me la vida més fàcil en tots els aspectes imaginables. Et dec tantíssims riures com moments de flaqueza he tingut durant aquest doctorat. Gràcies per escoltar-me de manera incansable, i sobretot, per fer-ho sempre amb bona cara i amb interès, tant, que encara m'impresiona quan et sent a tu, teleco, contestant-me sobre *western blot* o *inmunos* (que pesada dec d'haver sigut!). Agrair-te tant d'amor és impossible, no puc tindre un millor company de vida.

Resumen

La resistencia a la insulina se define como un aumento en la cantidad de insulina necesaria para conseguir la homeostasis de glucosa. Una de las complicaciones más comunes de la resistencia a la insulina es el defecto en la reparación de herida. El sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2) es un mediador clave para la señalización de insulina en hígado que actúa de puente entre los receptores de la insulina y del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) y sus cascadas de señalización. Tanto la resistencia a la insulina como cambios en los niveles de expresión de *IRS2* han sido asociados con el desarrollo y la progresión de enfermedades hepáticas graves. El daño hepático crónico generado por algunos factores derivados de la resistencia a la insulina ha sido establecido como determinante en la patofisiología de las enfermedades hepáticas. Sin embargo, sigue siendo una incógnita cómo el daño hepático generado por la resistencia a la insulina escapa de la extraordinaria capacidad de regeneración del hígado.

Durante el daño hepático crónico, la reparación epitelial está mediada por las células progenitoras hepáticas (CPH) que se expanden y diferencian hasta hepatocitos o células biliares rodeadas de un nicho estromal formado por un conjunto de células estrelladas hepáticas (CEH), células inflamatorias, componentes de la matriz extracelular (ECM) y factores de crecimiento. El factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7), expresado por las CEH, resulta crítico para la respuesta de las CPH y para la regeneración hepática. Durante el daño hepático crónico las CEH se activan transdiferenciándose desde células quiescentes a células fibrogénicas (CEHa) denominadas miofibroblastos que depositan ECM para reemplazar el tejido dañado. Para alcanzar una correcta regeneración hepática se requiere la resolución de la activación (“reversión fibrogénica”) de las CEH.

Empleando el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático crónico con la dieta DDC 0.1% y los modelos *in vitro* humanos de CPH (HepaRG) y de CEH (CEH primarias y la línea celular LX-2), los resultados de este trabajo demuestran que la señalización de insulina-IRS2 es necesaria para la epitelización dirigida por la comunicación paracrina a través de FGF7 en el nicho de CPH. Por un lado, IRS2 es

necesario en la población de CEH para permitir su supervivencia durante la reversión fibrogénica, un proceso que según nuestros resultados induce un aumento en la expresión de FGF7. Nuestros datos descubren un potencial mecanismo de regulación mediante el que IRS2 induce la expresión de FGF7 en CEH a través de la remodelación en la ECM mediada por NRF2 y el integrante de la ECM SERPINE1 durante las etapas tempranas de la reversión fibrogénica. El eje NRF2-SERPINE1 ha sido descrito anteriormente en fibroblastos de piel como esencial para la reepitelización de herida. NRF2 es el principal factor de transcripción de respuesta frente al estrés oxidativo (ruta canónica). En hepatocitos, la activación de NRF2 también puede inducirse a través de una ruta no canónica mediada por la proteína cargo de la autofagia P62. A pesar de que nuestros datos descubren a P62 como capaz de inducir la actividad de NRF2 en CPH, también demuestran que IRS2 activa a NRF2 en CPH y en CEH de manera independiente a la ruta no canónica mediada por P62. Por otro lado, demostramos que la señalización de insulina-IRS2, por promover la producción de FGF7, permite un novedoso bucle de inducción positiva mediante el que la respuesta a FGF7 en CPH promueve la expresión de su receptor, *FGFR2b*, favoreciendo su propia sensibilidad y sosteniendo la reparación epitelial.

Futuras estrategias para potenciar en hígado la actividad de NRF2 y la señalización de FGF7 podrían servir para mejorar el pronóstico de los pacientes con resistencia a la insulina, diabetes o enfermedad metabólica por promover la reparación epitelial en hígado y reducir por tanto su riesgo de desarrollar patologías hepáticas graves con elevada tasa de mortalidad.

Abstract

Insulin resistance is defined as an increase in the amount of insulin that is necessary to achieve glucose homeostasis. One of the most prevalent complications of insulin resistance is the wound healing defect. Insulin receptor factor 2 (IRS2) is a key mediator of the insulin signaling in liver, which acts as a bridge between insulin and insulin growth factor 1 (IGF-1) receptors and its downstream molecular pathways. Both, insulin resistance and changes in the expression levels of *IRS2*, have been associated with the development and progression of severe liver diseases. Chronic liver injury produced by insulin resistance has been established as crucial in the pathophysiology of liver disease. However, it remains unknown how the chronic liver injury produced by insulin resistance escapes from the extraordinary ability of the liver to regenerate.

During chronic liver injury, epithelial repair is mediated by liver progenitor cells (LPC), that expand and differentiate into hepatocytes and cholangiocytes surrounded by a stromal niche that consist of hepatic stellate cells (HSC), inflammatory cells, extracellular matrix (ECM) components and growth factors. Fibroblast growth factor 7 (FGF7), expressed by HSC, is critic for LPC response and liver regeneration. During chronic liver injury, HSC transdifferentiate from quiescent to active fibrogenic HSC (aHSC) called myofibroblast. aHSC deposit ECM to replace damaged tissue. A successful regeneration requires the resolution of the HSC activation, i.e., the “fibrogenic reversion” of HSC.

Using the *Irs2*^{-/-} mice model during chronic liver damage induced by 0.1% DDC diet and the human *in vitro* models of LPC (HepaRG) and HSC (primary HSC and the cell line LX-2), our results reveal a new role of insulin-IRS2 in the modulation of the paracrine FGF7 crosstalk in the LPC niche that drives LPC epithelization. On the one hand, IRS2 is necessary in HSC to allow survival during fibrogenic reversion, a process that according to our data induces an increase in FGF7 expression. Our results reveal a potential mechanism by which IRS2 promotes FGF7 expression in HSC through an ECM remodeling process that is mediated by NRF2 and the ECM constituent SERPINE1 during the early stages of fibrogenic reversion. NRF2-

SERPINE1-mediated ECM remodeling has been previously identified in skin fibroblast as essential to promote re-epithelialization of wounds. NRF2 is a transcription factor that is activated in response to oxidative stress (canonical pathway). NRF2 activation in hepatocytes can be also induced by a non-canonical pathway mediated by the autophagy cargo protein P62. Although our data discovers a new ability of P62 to induce NRF2 activity in LPC, we also demonstrate that IRS2 activates NRF2 in LPC and HSC in a P62-independent manner. On the other hand, we demonstrate that insulin-IRS2 signaling, by promoting FGF7 production, enables a novel positive induction loop whereby FGF7 response in LPC promotes the expression of its receptor, *FGFR2b*, favoring its own sensitivity and sustaining epithelial repair.

Future strategies to enhance NRF2 activity or FGF7 signaling in liver might be useful to improve the prognosis of insulin resistance, diabetic, and metabolic disease patients because of its uncovered ability to promote epithelial repair, thus, preventing the development of severe liver pathologies with high mortality risk.

Resum

La resistència a la insulina es defineix com un augment en la quantitat d'insulina necessària per aconseguir l'homeòstasi de glucosa. Una de les complicacions més freqüents de la resistència a la insulina és el defecte en la reparació de ferida. El substrat 2 del receptor de la insulina (IRS2) és un mediador clau per a la senyalització d'insulina en fetge que actua de pont entre els receptors de la insulina i del factor de creixement insulínic (IGF-1) i les seues cascades de senyalització. Tant la resistència a la insulina com els canvis en els nivells d'expressió d'IRS2 han sigut associats amb el desenvolupament i la progressió de malalties hepàtiques greus. El mal hepàtic crònic generat per alguns factors derivats de la resistència a la insulina s'ha establert com a determinant en la patofisiologia de les malalties hepàtiques. No obstant això, els motius pels quals el mal hepàtic generat per la resistència a la insulina escapa a l'extraordinària capacitat de regeneració del fetge són encara una incògnita.

Durant el mal crònic, la reparació epitelial està mediada per les cèl·lules progenitores hepàtiques (CPH) que s'expandeixen i diferencien fins a hepatòcits o cèl·lules biliars envoltades d'un nínxol estromal format per un conjunt de cèl·lules estavellades hepàtiques (CEH), cèl·lules inflamatòries, components de la matriu extracel·lular (ECM) i factors de creixement. El factor de creixement de fibroblasts 7 (FGF7), expressat en fetge per les CEH, resulta crític per a la resposta de les CPH i per a la regeneració hepàtica. Durant el mal hepàtic crònic les CEH s'activen transdiferenciant-se des de cèl·lules quiescents a cèl·lules fibrogèniques denominades miofibroblasts (CEH activades) que depositen ECM per a reemplaçar el teixit danyat. Per a aconseguir una correcta regeneració hepàtica es requereix la resolució de l'activació ("reversió fibrogènica") de les CEH.

A partir de l'ús del model de ratolí *Irs2*^{-/-} durant el mal hepàtic crònic amb la dieta DDC 0.1% i dels models *in vitro* humans de CPH (HepaRG) i de CEH (CEH primàries i la línia cel·lular LX-2), els resultats d'aquest treball demostren que la senyalització d'insulina-IRS2 és necessària per a l'epitelització dirigida per la comunicació paracrina mitjançant FGF7 en el nínxol de CPH. D'una banda, IRS2 és

necessari en la població de CEH per a permetre la seua supervivència durant la reversió fibrogènica, que comporta un augment en l'expressió de FGF7. Les nostres dades descobreixen un potencial mecanisme de regulació mitjançant el qual IRS2 indueix l'expressió de FGF7 en CEH a través de la remodelació en la ECM mediada per NRF2 i per l'integrint de la ECM SERPINE1, que ocorre en les etapes primerenques de la reversió fibrogènica. L'eix NRF2-SERPINE1 ha sigut identificat anteriorment en fibroblasts de pell com a essencial per a la reparació de ferida. NRF2 és el principal factor de transcripció de resposta davant de l'estrés oxidatiu (ruta canònica). En hepatòcits, l'activació de NRF2 també pot induir-se a través d'una ruta no canònica mediada per la proteïna de càrrega de l'autofàgia P62. A pesar que les nostres dades indiquen que P62 és capaç d'induir l'activitat de NRF2 en CPH, també demostren que IRS2 activa NRF2 en CPH i CEH de manera independent a la ruta no canònica mediada per P62. D'altra banda, demostrem que la senyalització d'insulina-IRS2, per promoure la producció de FGF7, permet un nou bucle d'inducció positiva mitjançant el qual la resposta a FGF7 en CPH promou l'expressió del seu receptor, *FGFR2b*, afavorint la seua pròpia sensibilitat i sostenint la reparació epitelial.

Futures estratègies per a potenciar en fetge l'activitat de NRF2 i la senyalització de FGF7 podrien servir per a millorar el pronòstic dels pacients amb resistència a la insulina, diabetis o malaltia metabòlica, per promoure la reparació epitelial en fetge i reduir, per tant, el seu risc de desenvolupar patologies hepàtiques greus amb elevada taxa de mortalitat.

Índice

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
RESUM.....	V
ÍNDICE.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Señalización de insulina/IGF-1	1
1.1.1 Insulina	1
1.1.2 Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1/IGF-2)....	2
1.1.3 Receptores de insulina e IGF-1	3
1.1.4 Sustratos del receptor de insulina (IRSs)	4
1.1.5 Señalización canónica de insulina/IGF-1	6
1.2 Resistencia a la insulina.....	8
1.2.1 Papel central del hígado en la resistencia a la insulina	10
1.2.2 La resistencia a la insulina y las patologías hepáticas	11
1.3 Respuesta reparativa en hígado.....	12
1.3.1 Respuesta de las CPH frente al daño hepático crónico	13
1.3.1.1 El nicho de las CPH. Las CEH y la ECM.	13
1.3.1.2 Regresión del nicho de las CPH	15
1.3.2 La respuesta reparativa durante la progresión de las enfermedades hepáticas	17
1.3.3 La señalización de insulina-IRS2 durante la respuesta reparativa. 18	
1.4 Familia de FGFs.....	19
1.4.1 Señalización de FGFs.....	21
1.4.2 Funciones de los FGFs	22
1.4.3 Subfamilia de FGF7	22
1.4.3.1 Subfamilia de FGF7 durante la organogénesis.	23
1.4.3.2 Subfamilia de FGF7 durante la reparación epitelial en piel.	24
1.4.3.3 Subfamilia FGF7 durante la reparación epitelial en hígado.....	25
1.5 El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2).....	26

1.5.1	NRF2 como defensa frente el estrés oxidativo	26
1.5.2	Activación de NRF2.....	27
1.5.3	Papel protector de NRF2 frente a las patologías hepáticas	28
1.5.4	NRF2 durante la respuesta reparativa	29
1.5.4.1	Papel de NRF2 en CEH	29
1.5.4.2	Papel de NRF2 en hepatocitos	29
1.5.4.3	Papel de NRF2 en fibroblastos de piel.....	30
1.6	Señalización local de insulina/IGF-1-IRS2 durante la respuesta reparativa	32
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
3	MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1	Experimentación animal	39
3.1.1	Modelos	39
3.1.2	Inducción de daño hepático crónico.....	40
3.1.3	Estimulación con Fgf7 recombinante de ratón (Fgf7rr).....	40
3.1.4	Recolección de muestras biológicas	40
3.2	Cultivos celulares	41
3.2.1	Tratamiento con FGF7 recombinante humano (rh) a largo plazo...43	
3.2.2	Tratamiento con FGF7rh a corto plazo	43
3.2.3	Inactivación de células estrelladas con mitomicina C	43
3.2.4	Tratamiento de la línea HepaRG con medio condicionado de CEHp inactivadas.....	44
3.2.5	Cocultivo de CEHp con HepaRG a corto plazo	44
3.2.6	Cocultivo de CEHp/células LX-2 con HepaRG a largo plazo	44
3.2.7	Infección lentiviral de líneas celulares.....	45
3.2.8	Tratamiento con doxiciclina para silenciar <i>P62</i>	47
3.2.9	Tratamiento con 3-MA para inducir reversión fibrogénica en la línea LX-2	47
3.2.10	Transformación bacteriana.....	48
3.2.11	Transfección celular	49
3.2.11.1	Transfección plasmídica.....	49
3.2.11.1.1	Sobreexpresión a corto plazo de <i>Irs2</i>	50
3.2.11.1.1.1	Efecto en la actividad de ARE-luciferasa.....	50
3.2.11.1.1.2	Efecto en el análisis de expresión.	51
3.2.11.1.1.3	Efecto en la morfología de la línea LX-2.....	51

3.2.11.1.2	Efecto en la población negativa (no epitelial) y positiva (epitelial) para la expresión de pAPO2-GFP en la línea HepaRG pAPO2-GFP.....	52
3.2.11.2	Transfección con ARN pequeño de interferencia (siARN)	53
3.2.12	Citometría de flujo	54
3.2.12.1	Separación celular por fluorescencia activada (FACS)	54
3.2.12.1.1	Enriquecimiento de líneas celulares estables.....	54
3.2.12.1.2	Separación de las subpoblaciones de HepaRG pAPOA2-GFP (no epitelial) y pAPOA2-GFP+ (epitelial).....	55
3.2.13	Ensayo de luciferasa-renilla	57
3.2.14	Estimulación con insulina	57
3.2.15	Actividad de SOD	57
3.3	Tinción por inmunofluorescencia	58
3.3.1	Tejidos criopreservados	58
3.3.2	Cultivos celulares	58
3.3.3	Tinción.....	58
3.4	Inmunodetección de proteínas por <i>western blot</i>	60
3.4.1	Extracción de proteínas	60
3.4.2	Cuantificación y preparación de proteínas.....	60
3.4.3	Separación de proteínas por peso molecular y transferencia	61
3.4.4	Detección de proteínas	62
3.5	Análisis de expresión génica por RT-qPCR.....	63
3.5.1	Extracción y purificación de ARN.....	63
3.5.2	Retrotranscripción	63
3.5.3	RT-qPCR.....	64
3.6	Análisis cuantitativo de imagen.....	66
3.6.1	Recuento de células caspasa 3 escindida-FGF7 (+/+).....	66
3.6.2	Análisis con <i>IN Cell Analyser 2200</i>	66
3.6.2.1	Cuantificación de células positivas para HNF4 α en zonas con CEH (Vimentina+) o zonas sin CEH (Vimentina-) durante el cocultivo de HepaRG con CEHp inactivadas	67
3.6.2.2	Análisis del efecto de la sobreexpresión de <i>Irs2</i> y el tratamiento con 3-MA en la morfología celular de la línea LX-2.	67
3.7	Análisis transcriptómico	68
3.8	Análisis estadístico.....	69
4	RESULTADOS	71

4.1	Bloque 1. El silenciamiento de <i>Irs2 in vivo</i> reprime las señales de reparación de tejido a través de Fgf7 durante el daño hepático crónico.	71
4.2	Bloque 2. La señalización de insulina/IGF-1-IRS2 actúa en CPH para promover la respuesta a FGF7.	74
4.2.1	La ausencia de insulina-IRS2 impide la epitelización mediada por FGF7	74
4.2.2	FGF7 induce su propia sensibilidad promoviendo la expresión de su receptor <i>FGFR2b</i> de manera dependiente a la señalización de insulina-IRS2	77
4.2.3	La inducción en la expresión de <i>FGFR2b</i> tras el tratamiento con FGF7rh no es directa y deriva del aumento en la epitelización.	79
4.3	Bloque 3. IRS2 actúa en las CEH del nicho de las CPH para inducir FGF7.	80
4.3.1	Desarrollo del modelo de estudio de la comunicación paracrina FGF7 (CEH)-FGFR2b (HepaRG) <i>in vitro</i>	80
4.3.1.1	La comunicación entre CEH-CPH a través de FGF7-FGFR2b se activa durante el arresto celular de las CEH y requiere de contacto estrecho célula-célula entre ambas poblaciones.	81
4.3.1.2	El cocultivo de CEHp inactivadas y HepaRG a largo plazo reproduce las interacciones heterotípicas necesarias para inducir la epitelización a través de FGF7.....	83
4.3.1.3	La comunicación heterotípica entre LX-2 (CEH) y HepaRG es dependiente de <i>IRS2</i>	85
4.3.1.4	Las células LX-2 experimentan una reversión fibrogénica espontánea y dependiente de la expresión de <i>IRS2</i> durante el cocultivo con las células HepaRG.....	89
4.3.2	La línea HepaRG como modelo de estudio de la comunicación paracrina a través de FGF7.	92
4.3.2.1	La expresión de <i>IRS2</i> en HepaRG correlaciona con la de <i>FGF7</i> y promueve la epitelización.....	93
4.3.2.2	La sobreexpresión de <i>Irs2</i> actúa de específicamente sobre la subpoblación no epitelial (<i>APOA2</i> -) en la línea HepaRG para promover su epitelización y la expresión de FGF7	95
4.4	Bloque 4. Mecanismo molecular del eje IRS2-FGF7 en CEH.	99
4.4.1	La sobreexpresión de <i>Irs2</i> en la línea HepaRG genera una inducción en la señalización de NRF2 como huella de transcripción más marcada.....	99
4.4.2	La sobreexpresión de <i>Irs2</i> induce la actividad de NRF2, reduce el estrés oxidativo y promueve la acumulación de P62 en HepaRG	100
4.4.3	P62 regula la actividad de NRF2 y participa en la supervivencia celular en HepaRG.....	103

4.4.4	Una sobreexpresión a corto plazo de <i>Irs2</i> (24h) es suficiente para inducir la actividad de NRF2 y la expresión de <i>FGF7</i> en HepaRG	107
4.4.5	La sobreexpresión de <i>Irs2</i> no actúa a través de <i>P62</i> para inducir la actividad de NRF2 en HepaRG.....	109
4.4.6	La sobreexpresión de <i>Irs2</i> no actúa a través de <i>P62</i> para inducir la actividad de NRF2 en LX-2.....	110
4.4.7	El eje <i>Irs2</i> -NRF2 promueve en LX-2 la expresión de los genes asociados con la remodelación de la ECM <i>FGF7</i> y <i>SERPINE1</i> ... 112	
4.4.8	La sobreexpresión de <i>Irs2</i> a corto plazo (24h) es insuficiente para provocar la reversión fibrogénica en la línea LX-2.....	115
4.4.8.1	La activación del eje <i>Irs2</i> -NRF2 en CEH a corto plazo (24h) es insuficiente para inducir la morfología característica que provoca la reversión fibrogénica.....	115
4.4.8.2	La huella de expresión generada por la sobreexpresión de <i>Irs2</i> a corto plazo (24h) difiere de la generada por la reversión fibrogénica inducida por el tratamiento con 3-MA en la línea LX-2.....	118
4.4.9	El eje <i>Irs2</i> -NRF2- <i>SERPINE1</i> actúa en los primeros estadios de la reversión fibrogénica de LX-2.	122
5	DISCUSIÓN	127
6	CONCLUSIONES	143
7	CONCLUSIONS.....	145
8	BIBLIOGRAFÍA	147

Lista de figuras

Figura 1. Ilustración esquemática de IGFR-1 e IR y sus respectivas afinidades por insulina, IGF-1 e IGF-2.....	4
Figura 2. Esquema de los dominios de interacción de la familia IRS.....	7
Figura 3. Principales cascadas de señalización aguas abajo de IRS1/2.	8
Figura 4. Ilustración representativa de la respuesta reparativa hepática frente al daño hepático crónico.	14
Figura 5. Reversión fibrogénica de las CEH.....	16
Figura 6. El defecto en la respuesta reparativa ha sido asociado con la progresión de las enfermedades hepáticas vinculadas con la resistencia a la insulina.....	18
Figura 7. Estructura y ayuste alternativo de los FGFR.....	21
Figura 8. Subfamilia de FGF7.....	23
Figura 9. Mecanismos de activación de NRF2.	28
Figura 10. La reprogramación celular mediada por NRF2 en fibroblastos induce la reepitelización de herida y la tumorigénesis.....	31
Figura 11. Efecto local de la insulina en el nicho de células madre/progenitoras. .	33
Figura 12. La señalización endocrina de insulina/IGF-1-IRS2 regula la comunicación paracrina entre FGF7 (CEH) y FGFR2b (CPH) durante el daño hepático crónico.	37
Figura 13. Líneas celulares empleadas.....	43
Figura 14. Eficacia del silenciamiento inducible de P62 (GFP reportero) en las líneas HepaRG y LX-2.....	55
Figura 15. Gráfica representativa de la separación celular de la población HepaRG pAPOA2-GFP DsRed+ (transfectada) en las poblaciones pAPOA2-GFP- y pAPOA2-GFP+.....	56
Figura 16. El silenciamiento de <i>Irs2 in vivo</i> reprime la respuesta a Fgf7 a través de Fgfr2b.....	72
Figura 17. El silenciamiento de <i>Irs2 in vivo</i> induce apoptosis en las células Fgf7+ durante el daño hepático crónico.....	73
Figura 18. El tratamiento con FGF7rh induce la diferenciación de la línea HepaRG.....	75
Figura 19. La señalización de insulina-IRS2 permite la epitelización mediada por FGF7 en HepaRG.....	76
Figura 20. El patrón de expresión de <i>IRS2</i> colocaliza con FGFR2 en las islas de hepatocitos.....	77
Figura 21. La señalización de insulina- <i>IRS2</i> media un bucle de inducción positiva por el que FGF7 induce la expresión de <i>FGFR2b</i>	78

Figura 22. El tratamiento con FGF7rh a corto plazo induce la expresión de <i>APOA2</i> y <i>SPP1</i> y reduce la expresión de <i>FGFR2b</i> en HepaRG.	79
Figura 23. La comunicación entre CEH-CPH a través de FGF7-FGFR2b se activa durante el arresto celular de las CEH y requiere de contacto estrecho célula-célula entre ambas poblaciones.	82
Figura 24. El cocultivo a largo plazo de HepaRG con CEHp recrea las interacciones heterotípicas entre CEH-CPH e induce la diferenciación/epitelización.	84
Figura 25. El silenciamiento de <i>IRS2</i> en LX-2 impide la comunicación heterotípica mediada por FGF7-FGFR2b en el cocultivo de LX-2 y HepaRG.	86
Figura 26. El silenciamiento de <i>IRS2</i> en LX-2 durante el cocultivo impide la epitelización en HepaRG mediada por la comunicación FGF7-FGFR2b.	87
Figura 27. El silenciamiento de <i>IRS2</i> en CEH impide la producción de FGFs rompiendo el bucle de inducción de FGFR2b y generando un defecto en la epitelización.	88
Figura 28. El silenciamiento de <i>IRS2</i> en LX-2 promueve su expansión durante el cocultivo con HepaRG.	90
Figura 29. El silenciamiento de <i>IRS2</i> en LX2 impide su reversión durante el cocultivo con HepaRG.	91
Figura 30. Modelo representativo del papel de <i>IRS2</i> en el nicho de CEH durante el cocultivo con HepaRG.	92
Figura 31. La expresión de <i>IRS2</i> en HepaRG correlaciona con la de FGF7 y promueve la diferenciación.	94
Figura 32. La sobreexpresión de <i>Irs2</i> actúa en la subpoblación no epitelial (<i>APOA2</i> -) de la línea HepaRG p <i>APOA2-GFP</i> para inducir la expresión de <i>FGF7</i>	96
Figura 33. La sobreexpresión de <i>Irs2</i> actúa de manera específica en la subpoblación no epitelial (<i>APOA2</i> -) de la línea HepaRG p <i>APOA2-GFP</i> para inducir la expresión de marcadores hepatocíticos.	97
Figura 34. Modelo representativo del papel de <i>IRS2</i> en la línea celular HepaRG.	98
Figura 35. La activación de la señalización de NRF2 es la huella transcriptómica más marcada tras la sobreexpresión de <i>Irs2</i> en HepaRG.	100
Figura 36. La sobreexpresión de <i>Irs2</i> a largo plazo (Lenti- <i>Irs2</i>) en HepaRG induce la actividad de NRF2 reduce los niveles de estrés oxidativo (SOD) y promueve una acumulación constitutiva de P62.	102
Figura 37. El silenciamiento de <i>P62</i> (48h) en HepaRG reduce la actividad de NRF2.	104
Figura 38. El silenciamiento de <i>P62</i> a lo largo de la diferenciación (día 4-11) reduce la viabilidad celular en la línea HepaRG.	106
Figura 39. La sobreexpresión de <i>Irs2</i> a corto plazo (24h) induce la actividad de NRF2 en HepaRG y promueve la expresión de <i>FGF7</i>	108
Figura 40. El silenciamiento de <i>P62</i> (48h) en HepaRG no impide la inducción de NRF2 que genera la sobreexpresión de <i>Irs2</i> a corto plazo (24h).	110

Figura 41. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) induce la actividad de NRF2 en LX-2 de manera independiente a P62. 111

Figura 42. Eficiencia del silenciamiento de NRF2 (48h) y de la sobreexpresión de *Irs2* (24h) a corto plazo en LX2. 113

Figura 43. La sobreexpresión de *Irs2* (24h) a corto plazo actúa a través de NRF2 en LX-2 para promover la expresión de los genes asociados con la remodelación de la ECM *SERPINE1* y *FGF7* y de manera independiente a NRF2 para inducir la expresión en *IL6*. 114

Figura 44. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) en LX-2 no genera una morfología característica de CEH quiescentes/revertidas, pero aumenta el número de células/campo. 117

Figura 45. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) reprime la inducción en P53 generada por la reversión fibrogénica de la línea celular LX-2 con 3-MA. ... 119

Figura 46. La reversión fibrogénica de LX-2 generada por el tratamiento con 3-MA modula la expresión de *FGF7*, *SERPINE1* e *IL6* de manera complementaria al eje *Irs2*-NRF2. 121

Figura 47. La expresión de *IRS2* en LX-2 en cocultivo con HepaRG es esencial para la inducción de *SERPINE1* en las primeras etapas de la reversión fibrogénica y para frenar la proliferación (expresión de *KI67*) en las etapas posteriores. 124

Figura 48. Modelo esquemático del papel de *IRS2* en el nicho de CPH. 125

Figura 49. Modelo esquemático del impacto del papel de *IRS2* en la regulación de la comunicación a través de FGFs en el nicho de las CPH, en la asociación entre la resistencia a la insulina y las patologías hepáticas. 142

Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de los fenotipos generados por la delección de las diferentes <i>Irs</i> en ratón.	5
Tabla 2. Partículas lentivirales empleadas para generar líneas celulares estables.	45
Tabla 3. Características de los plásmidos empleados para transfección plasmídica.	48
Tabla 4. Mezcla para transfectar un pocillo de placa de 24 y un <i>flask</i> T75.	49
Tabla 5. Proporciones empleadas para los diferentes vectores cotransfectados por línea celular para analizar el efecto de la sobreexpresión de <i>Irs2</i> en la actividad de ARE.	50
Tabla 6. Proporciones empleadas para los diferentes vectores cotransfectados por línea celular para analizar el efecto de la sobreexpresión de <i>Irs2</i> en el análisis de expresión.	51
Tabla 7. Vectores cotransfectados para analizar el efecto de la sobreexpresión de <i>Irs2</i> en la morfología de la línea LX-2.	52
Tabla 8. Vectores cotransfectados para analizar el efecto de la sobreexpresión de <i>Irs2</i> en las poblaciones pAPOA2-GFP (+/-) en la línea HepaRG.	52
Tabla 9. Características del siARN para silenciar <i>NRF2</i>	53
Tabla 10. Mezcla para transfectar siRNA en 1 pocillo de placa de 24.	53
Tabla 11. Lista de anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia.	59
Tabla 12. Volúmenes empleados de los diferentes componentes de la fase de separación en función del % de acrilamida empleado.	61
Tabla 13. Volúmenes empleados de los diferentes componentes de la fase de estancamiento (4.5% de acrilamida).	61
Tabla 14. Lista de anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de proteínas por <i>western blot</i>	62
Tabla 15. Listado de secuencias de cebadores empleadas el análisis de expresión por RT-qPCR.	65
Tabla 16. Filtros de excitación/emisión empleados en las adquisiciones con <i>IN cell Analyser 2200</i>	66

Lista de abreviaturas

3-MA	3-metil adenina.
ACTA2	α -actina del músculo liso, del inglés <i>α-smooth muscle actin</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario.
AH	arteria hepática.
AKT/PKB	proteína quinasa b, del inglés <i>protein kinase b</i> .
ARE	elemento de respuesta antioxidante, del inglés <i>antioxidant response element</i> .
ARN	ácido ribonucleico.
ARNm	ácido ribonucleico mensajero.
BCA	ácido bicinconínico, del inglés <i>bicinchoninic acid</i> .
BSA	suero de albúmina bovina, del inglés <i>bovine serum albumin</i> .
CB	conducto biliar.
CEEA	comité ético de experimentación animal.
CEH	células estrelladas hepáticas.
CEHa	células estrelladas hepáticas activadas.
CEHi	células estrelladas hepáticas inactivadas.
CEHq	células estrelladas hepáticas quiescentes.
CO	células ovales.
COL1A1	colágeno alfa-1 tipo 1, del inglés <i>collagen type 1 alpha 1 chain</i> .
COL1A3	colágeno alfa-1 tipo 1, del inglés <i>collagen type 1 alpha 3 chain</i> .
COL3A1	colágeno alfa-3 tipo 1, del inglés <i>collagen type 3 alpha 1 chain</i> .
CPH	células progenitoras hepáticas.
DDC	3.5-dietoxicarbinol-1.4-dihidrocolina.
dH2O	agua destilada.
DMEM	medio dulbecco modificado, del inglés <i>dulbecco's modified eagle medium</i> .
DMT2	diabetes mellitus tipo 2
DMSO	dimetilsulfóxido.
E-CADH	e-cadherina epitelial.

ECM	matriz extracelular, del inglés <i>extracellular matrix</i> .
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético, del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> .
EHGNA	enfermedad del hígado graso no alcohólico.
EHNA	esteatohepatitis no alcohólica.
FRS2	sustrato 2 de receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés <i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i> .
HSC	<i>hepatic stellate cells</i>
HSPA1	proteína de choque térmico de la familia a, del inglés <i>heat shock protein family A</i> .
EMT	transición epitelio-mesenquimal, del inglés <i>epithelial-mesenchymal transition</i> .
ERK	quinasa regulada por señal extracelular, del inglés <i>extracellular signal-regulated kinase</i> .
FBS	suero fetal bovino, del inglés <i>fetal bovine serum</i> .
FCIII	clon fetal III, del inglés <i>fetal clone III</i> .
FGF	factor de crecimiento fibroblástico, del inglés <i>fibroblast growth factor</i> .
FGFR	receptor de factor de crecimiento fibroblástico, del inglés <i>fibroblast growth factor receptor</i> .
<i>Fgf7</i>^{-/-}	ratón con delección del gen <i>Fgf7</i> .
<i>Fgf10</i>^{-/-}	ratón con delección del gen <i>Fgf10</i> .
FOXO	proteína de caja forkhead O1, del inglés <i>forkhead box protein O</i> .
FP	fibroblasto portal.
GDP	guanosín difosfato.
GFAP	proteína ácida fibrilar glial, del inglés <i>glial fibrillary acidic protein</i> .
GFP	proteína verde fluorescente, del inglés <i>green fluorescent protein</i> .
Grb2	adaptador del receptor del factor de crecimiento 2, del inglés <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> .
GSEA	análisis de enriquecimiento de conjuntos genes del inglés <i>gene set enrichment analysis</i> .
GSK3β	glucógeno sintasa quinasa 3 beta, del inglés <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i> .
GTP	guanosín trifosfato.

HCC	hepatocarcinoma celular, del inglés <i>hepatocellular carcinoma</i> .
HMGB1	la proteína del cuadro 1 del grupo de alta movilidad, del inglés <i>high mobility group box 1 protein</i> .
HNF4α	factor nuclear 4 α de hepatocito, del inglés <i>hepatocyte nuclear factor 4α</i> .
HPSG	proteoglicanos heparán sulfato, del inglés <i>heparan sulfate proteoglycans</i> .
HRP	peroxidasa de rábano, del inglés <i>horseradish peroxidase</i> .
IGF-1/IGF-2	factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2, del inglés <i>insulin-like growth factor 1 y 2</i> .
IGF-1R	receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1, del inglés <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> .
IL6	Interleucina 6, del inglés <i>interleukine 6</i>
IP	yoduro de propidio, del inglés <i>propidium iodide</i>
<i>Ir</i>-/-	ratón con delección del gen del receptor de la insulina
IR	receptor de insulina, del inglés <i>insulin receptor</i> .
IRS	substrato receptor de insulina, del inglés <i>insulin receptor substrate</i> .
<i>Irs1</i>-/-	ratón con delección del gen <i>Irs1</i> .
<i>Irs2</i>-/-	ratón con delección del gen <i>Irs2</i> .
<i>Irs3</i>-/-	ratón con delección del gen del gen <i>Irs3</i> .
<i>Irs4</i>-/-	ratón con delección del gen del gen <i>Irs4</i> .
KRLB	dominio de unión a quinasa reguladora, del inglés <i>kinase regulatory-loop binding</i> .
LPC	<i>liver progenitor cells</i>
MAF	fibrosarcoma musculoaponeurótico, del inglés <i>musculoaponeurotic fibrosarcoma</i> .
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i> .
MEK 1/2	quinasa de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2, del inglés <i>mitogen-activated protein kinase or extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> .
MET	transición mesenquimal-epitelial, del inglés <i>mesenchymal-epithelial transition</i> .
Mic1-1c3	citoquina inhibidora de macrófagos 1-1c3, del inglés <i>macrophage inhibitory cytokine 1-1c3</i> .
MitoC	mitomicina c.

MMP	metaloproteínasa de matriz, del inglés <i>matrix metalloproteinase</i>
MOI	multiplicidad de infección, del inglés <i>multiplicity of infection</i> .
mTOR	diana de la rapamicina en mamíferos, del inglés <i>mammalian target of rapamycin</i> .
NP-40	nonidet p-40.
NQO1	nad (p) h quinona deshidrogenasa 1, del inglés <i>nad(p)h quinone oxidoreductase 1</i> .
Nrf1^{-/-}	ratón con delección del gen del gen <i>nrf1</i> .
Nrf2^{-/-}	ratón con delección del gen del gen <i>nrf2</i> .
NRF2	factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2, del inglés <i>nuclear factor-erythroid 2 related factor 2</i> .
Nrf3^{-/-}	ratón con delección del gen <i>nrf3</i> .
OCT	compuesto de temperatura óptima de corte, del inglés <i>optimal cutting temperature</i> .
PAI-1	inhibidor 1 del activador de fibrinógeno, del inglés <i>plasminogen activator inhibitor-1</i> .
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate-buffered saline</i> .
PFA	paraformaldehído.
PH	dominio <i>pleckstrin</i> homólogo.
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinasa, del inglés <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> .
PIP	proteína inducible por prolactina.
PKC	proteína quinasa c, del inglés <i>protein kinase 3</i> .
PLL	polilisina, del inglés <i>poly l- lysine</i> .
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> .
PTB	dominio de unión a fosfo-tirosina, del inglés <i>phospho-tyrosine binding</i> .
Pten	homólogo de fosfatasa y tensina, del inglés <i>phosphatase and tensin homolog</i> .
Rh	recombinante humano.
RI	resistencia a la insulina.
ROS	especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i> .
RPL19	proteína ribosomal I19, del inglés <i>ribosomal protein I19</i>
Rr	recombinante de ratón.

SASP	fenotipo de secreción asociado a senescencia, del inglés <i>senescence associated secretoty phenotype</i> .
SOD	superóxido dismutasas.
SQSTM1	secuestoma 1, del inglés <i>sequestosome 1</i> .
TK	tirosina quinasa, del inglés <i>tyrosine kinase</i> .
VHC	virus de la hepatitis c.
PVDF	fluoruro de polivinilideno, del inglés <i>polyvinyl difluoride</i> .
RAF	proteína de fibrosarcoma acelerado rápidamente, del inglés <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> .
RAS	proteína del sarcoma de rata, del inglés <i>rat sarcoma</i> .
rpm	revoluciones por minuto.
RT-qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> .
SDS	dodecilsulfato sódico, del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i> .
SDS-PAGE	gel de electroforesis de poliacrilamida-sds del inglés <i>sds-polyacrylamide gel electrophoresis</i> .
SH-2	dominio 2 de la proteína src.
SHP2	proteína del dominio SH-2.
sh-RNA	arn de horquilla corta, del inglés <i>short hairpin RNA</i> .
SOS	el factor de intercambio de nucleótidos de guanina, del inglés <i>son of sevenless homolog</i> .
SPF	libre de agentes patógenos específicos, del inglés <i>specific pathogen free</i> .
SPP1	osteopontina 1 o fosfoproteína secretada 1, del inglés <i>secreted phosphoprotein 1</i> .
TBST	tampón fosfato salino con <i>tween</i> , del inglés <i>tris buffered saline tween 20</i> .
THY1	antígeno celular del timo 1, del inglés <i>thymus cell antigen 1</i> .
Tris-HCl	hidrocloruro de tris, del inglés <i>tris hydrochloride</i> .
UR	unidades relativas.
VC	vena central.
VHC	virus de la hepatitis c.
VP	vena porta.
WT	fenotipo salvaje, del inglés <i>wild type</i> .
α-SMA	α -actina del músculo liso, del inglés <i>α-smooth muscle actin</i> .

Capítulo 1.

Introducción

En este trabajo evaluamos el papel de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 durante la respuesta reparativa frente al daño hepático crónico como mecanismo subyacente a la asociación entre la resistencia a la insulina y la progresión de las enfermedades hepáticas. Los mecanismos descubiertos involucran a los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y a la señalización del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2).

1.1 Señalización de insulina/IGF-1

1.1.1 Insulina

La insulina es una hormona peptídica clave para la regulación de la homeostasis de glucosa, el crecimiento de los tejidos y el desarrollo [1][2]. La insulina es producida y secretada por las células β de las islas pancreáticas [3], aunque recientemente se ha sugerido que también podría ser producida en cantidades menores por un grupo de neuronas del sistema nervioso central [4]. La hiperglucemia generada por la ingesta de alimentos es la que impulsa a las células β del páncreas a secretar una pequeña cantidad de su contenido en insulina. La insulina secretada por el páncreas se dirige directamente a la vena hepática portal y pasa a través del hígado distribuyéndose entre sus principales células diana, los hepatocitos, que recibirán la insulina como una señal para captar glucosa y almacenarla [5]. En consecuencia, el hígado está siempre expuesto a concentraciones de insulina muy elevadas en comparación con otros órganos. De hecho, en humanos, el hígado clarifica de un 40-80% [6][7] de la cantidad total de insulina en sangre, que, posteriormente, alcanzará la circulación sistémica para llegar, entre otros, al músculo esquelético y

Capítulo 1. Introducción

al tejido adiposo. Clínicamente, la principal función de la insulina es regular la homeostasis de glucosa, promoviendo su incorporación en tejido adiposo y músculos y previniendo su producción en hígado mediante la inhibición de la gluconeogénesis y la gluconeogénesis. Sin embargo, de manera paralela, la insulina es un importante factor mitogénico que induce el crecimiento, la división celular, la migración y también inhibe la apoptosis, por lo que resulta crítica para la fisiología celular en números tejidos [8]. Además, la insulina tiene la habilidad de potenciar el efecto de otros factores como el factor de crecimiento insulínico (IGF-1), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [9]. Esta potenciación de la respuesta mitogénica a otros factores le otorga a la insulina un papel principal durante la patogénesis derivada de la hiperinsulinemia [10].

1.1.2 Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1/IGF-2)

El factor de crecimiento insulínico (IGF-1) es una hormona peptídica que presenta una homología estructural del 60% con el factor de crecimiento insulínico 2 (IGF-2) y del 45% con la insulina [11]. Ambos, IGF-1 e IGF-2, son esenciales durante el crecimiento embrionario [12]. Sin embargo, tras el nacimiento, IGF-1 ha demostrado tener un papel predominante. De hecho, en ratones se ha observado que los elevados niveles de IGF-2 característicos del periodo prenatal desaparecen casi en su totalidad al alcanzar la etapa postnatal [13]. En humanos, sin embargo, IGF-2 ha sido detectado en adultos [14] aunque sus funciones son en gran medida desconocidas [15].

El hígado produce el 75% del IGF-1 circulante [16] que se une a las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBP3 e IGFBP5) y a la subunidad ácida lábil (ALS) para alargar su vida media y facilitar su biodisponibilidad [17][18]. La expresión de IGF-1, IGFBP3 y ALS por parte de los hepatocitos es regulada predominantemente por la hormona de crecimiento (GH) [19], aunque otros factores como la matriz extracelular (ECM), factores de crecimiento u hormonas también pueden modular su secreción en hígado [20]. En hígado sano el IGF-1 es secretado tanto por los hepatocitos como por múltiples células no parenquimales como las células estrelladas humanas (CEH) [21]. A pesar de que los hepatocitos son los principales productores de IGF-1 (expresan de 5 a 20 más IGF-1 que las células no parenquimales [22]) presentan

niveles prácticamente indetectables del receptor de IGF-1 (IGF-R1) [23]. Sin embargo, el IGF-1R es expresado durante el desarrollo hepatocítico [24] y en hepatocarcinomas [25]. Asimismo, durante la regeneración hepática, en la que se requiere una oleada de nuevos hepatocitos, IGF-1 promueve la proliferación de hepatocitos y acelera la síntesis de ADN mediante un mecanismo que continúa siendo desconocido y que podría ser extrahepatocítico [26]. IGF-1 también se produce de manera local y menos abundante en el resto de tejidos [27] donde funciona de manera paracrina/autocrina. Ambos, el IGF-1 endocrino producido por el hígado y el producido localmente por el resto de tejidos comparten como función principal la de promover el crecimiento prenatal y postnatal [12] y poseen potencial antioxidante, antiinflamatorio y mitogénico [28]. IGF-1 también genera efectos importantes en el metabolismo, ya que juntos, IGF-1, GH y la insulina orquestan un eje que informa a las células de si la cantidad de nutrientes es la adecuada para que eviten entrar en apoptosis y, en su lugar, promuevan la síntesis proteica, el crecimiento y la diferenciación [29].

1.1.3 Receptores de insulina e IGF-1

La insulina se une con elevada afinidad al receptor de insulina (IR) [30]. Asimismo, IGF-1 e IGF-2 poseen elevada afinidad por el receptor de IGF-1 (IGFR-1) [30]. Ambos receptores están formados por dos subunidades α extracelulares que determinan la especificidad a ligandos y dos subunidades β que son proteínas transmembrana con actividad tirosina quinasa [31][32]. Además, el IR y el IGF-1R presentan elevada homología, del 84% en las subunidades β y del 64-67% en las subunidades α [30]. Es precisamente esta similitud la que permite a la insulina unirse a IGFR-1, aunque con baja afinidad. Además, el ajuste alternativo del ácido ribonucleico (ARN) correspondiente al IR, genera un IR de “tipo B” que, aunque mantiene una elevada afinidad con la insulina, permite también la unión de IGF-1 [33]. Por otra parte, otro evento de ajuste alternativo genera una variante del IR “tipo A” que presenta elevada afinidad no solo por la insulina sino también por IGF-1 e IGF-2 [34]. Curiosamente, la unión de IGF-1 a IR-A e IR-B activa específicamente la señalización a través del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2) [33]. Adicionalmente, cuando IR e IGFR-1 se expresan en la misma célula parte de ellos forman un receptor híbrido de α - β hemireceptor de IR y α - β

Capítulo 1. Introducción

hemireceptor de IGFR-1 que se une con mayor afinidad a IGF-1 que a la insulina [35] (Figura 1).

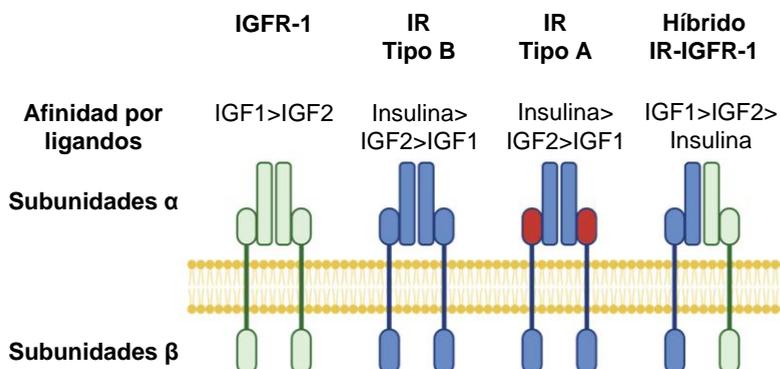


Figura 1. Ilustración esquemática de IGFR-1 e IR y sus respectivas afinidades por insulina, IGF-1 e IGF-2.

Cada receptor está compuesto por dos unidades extracelulares α que interaccionan de forma específica con cada hormona activando la actividad tirosina quinasa de las unidades transmembrana β. Se emplean diferentes colores para representar las diferencias generadas por ajuste alternativo. Autoría propia: "Created with BioRender.com".

1.1.4 Sustratos del receptor de insulina (IRSs)

Los IRSs son una familia de proteínas adaptadoras citoplasmáticas que transmiten las señales del IR e IGF-1R para activar la respuesta celular. La familia de IRS tiene 4 miembros clásicos (IRS1-4) [36] y dos descubiertos recientemente, IRS-5 (asociada a la quinasa DOK4) e IRS-6 (asociada a la quinasa DOK5) [37]. IRS1 e IRS2, que se expresan de manera ubicua, son los principales mediadores de los efectos mitogénicos dependientes de insulina y son muy abundantes en hígado donde interaccionan a través de sus dominios de homología src 2 (SH-2) con efectores de la señalización de insulina para regular el metabolismo [38].

Dado que el ratón con delección de *Igfr-1* presenta un crecimiento retardado y muere al nacer [39] y el ratón con delección de IR (*Ir-/-*), a pesar de presentar un desarrollo intrauterino normal, muere en tan solo 72h por hiperglicemia severa y cetoacidosis con insulinemia [40], los modelos animales con delección de *Irs* han sido fundamentales para establecer la gran variedad de funciones llevada a cabo por la

Capítulo 1. Introducción

señalización de insulina, así como para evidenciar que, aunque las diferentes *Irs* presentan elevada homología, realizan funciones muy distintas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de los fenotipos generados por la delección de las diferentes *Irs* en ratón.

	Crecimiento	Otras alteraciones	RI	Diabetes	Muerte prematura
<i>Irs1</i> ^{-/-}	30% menor	-	Sí	No	No
<i>Irs2</i> ^{-/-}	Normal	Cerebro pequeño Infertilidad Problemas de visión Pérdida de células β pancreáticas	Sí	Sí	Sí, posterior en hembras
<i>Irs3</i> ^{-/-}	Normal	-	No	No	No
<i>Irs4</i> ^{-/-}	Retraso moderado	Intolerancia leve a la glucosa	No	No	No

RI=Resistencia a la insulina.

El tamaño de los ratones con delección en el gen *Irs1* (*Irs1*^{-/-}) al nacer es un 30% menor que el de los ratones de fenotipo salvaje y se mantiene reducido a lo largo de sus vidas implicando a *Irs1* en la regulación del crecimiento. Por el contrario, el tamaño de los ratones con delección de *Irs2* (*Irs2*^{-/-}) es el normal, pero padecen defectos específicos de tejido. Los ratones *Irs2*^{-/-} presentan un cerebro de menor tamaño por padecer una reducción del 50% en la proliferación neuronal [41], tienen un número reducido de células fotorreceptoras por un incremento en su apoptosis [42] y las hembras son menos fértiles por tener ovarios pequeños y con menor número de folículos [43]. Ambos, *Irs1*^{-/-} e *Irs2*^{-/-} desarrollan en tan solo 4 semanas resistencia periférica a la insulina [44], pero únicamente los ratones *Irs2*^{-/-} desarrollan diabetes a las 8-10 semanas por presentar una reducción significativa en la masa de células β pancreáticas [45]. Esto se debe a que Igfr-1 señala a través de *Irs2* para promover la supervivencia y el desarrollo de las células β pancreáticas. Como consecuencia, la vida máxima de los machos *Irs2*^{-/-} suele ser de 12 semanas, mientras que en las hembras la diabetes progresa de forma más lenta, sobreviviendo hasta las 24 semanas de vida. Varios estudios posteriormente han identificado a *Irs2* como el principal mediador de las acciones de la insulina, tanto

Capítulo 1. Introducción

metabólicas como de crecimiento, en hígado, músculo, tejido adiposo y páncreas, mientras que *Irs1* tendría un papel principal en músculo esquelético [46][47][48].

IRS3, no ha podido detectarse en humanos [49] y en roedores se expresa predominantemente en adipocitos [50]. El ratón con delección en *Irs3* (*Irs3*^{-/-}) no presenta ninguna anomalía en el crecimiento o en la homeostasis de glucosa [51].

La expresión de IRS4 presenta un patrón más restringido encontrándose principalmente en cerebro, riñones, timo e hígado. En hígado, la expresión de *Irs4* aumenta junto con la de *Irs2* durante la regeneración hepática [52] y se ha visto involucrado con la progresión del carcinoma hepatocelular (HCC) [53]. El ratón con delección de *Irs4* (*Irs4*^{-/-}) presenta únicamente un retraso moderado del crecimiento y una intolerancia leve a la glucosa [54].

1.1.5 Señalización canónica de insulina/IGF-1

La unión de la insulina o de IGF-1 a las subunidades extracelulares del receptor desencadena en la autofosforilación de los residuos de tirosina en la subunidad intracelular de los receptores permitiendo la unión de las proteínas IRS al receptor por su dominio de unión fosfotirosina (PTB). Los receptores fosforilan a las proteínas IRS en múltiples residuos de tirosina creando numerosos sitios de unión para proteínas con dominios SH-2 [55]. Las principales proteínas con dominio SH-2 que regulan el metabolismo y la expresión génica aguas abajo de las proteínas IRS son el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que se une a la AKT (también conocida como proteína quinasa B), para activar la ruta PI3K-AKT y la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2) que se une al factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS) para activar la ruta de la proteína del virus del sarcoma de rata y de las quinasas MAP (RAS-MAPK) (**Figura 2**). La activación de estas cascadas de señalización requiere mayoritariamente de la fosforilación de IRS1 e IRS2 [56].

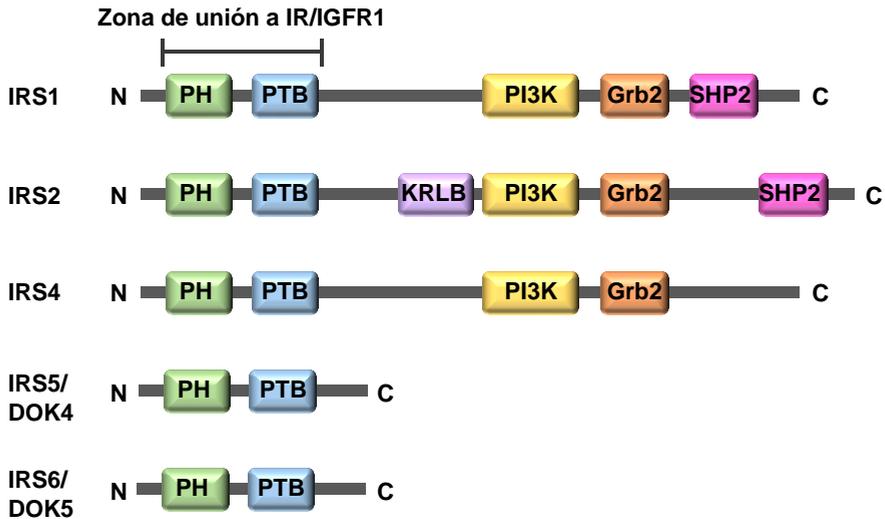


Figura 2. Esquema de los dominios de interacción de la familia IRS.

Los IRSs se unen al dominio intracelular del IR e IGF-1R a través del dominio de unión a *pleckstrina* (PH) y del dominio de unión a fosfotirosina (PTB) e interaccionan con el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) para activar la ruta PI3K-AKT. Para activar la ruta RAS-MAPK interaccionan o bien con proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2) o bien con la proteína del dominio SH-2 (SHP2). Autoría propia: "Created with BioRender.com".

Ruta PI3K-AKT: La unión a IRS1-2 activa a PI3K que convierte al fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato (PIP-2) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP-3). La unión con PIP-3 media la disociación de AKT de la membrana plasmática, permitiendo que pueda ser activado por otras quinasas. Una vez activo AKT activará a la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) mediante fosforilación para inducir la síntesis proteica y la proliferación celular e inhibirá mediante fosforilación al factor de transcripción de la proteína de la caja forkhead O (FOXO) y a la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK-3 β), para promover la supervivencia y el crecimiento [57] [58] [59] (Figura 3).

Ruta RAS-MAPK: Esta cascada se inicia predominantemente con la unión del complejo formado GRB2 y por SOS a la proteína fosforilada IRS1/2. SOS activa por proximidad a RAS, que posteriormente activará a la quinasa de aceleración rápido del fibrosarcoma (RAF) y en consecuencia la fosforilación de MEK (quinasa activada

Capítulo 1. Introducción

por mitógenos) y de ERK (las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2) que inducirán principalmente la expresión de genes crecimiento [56] (**Figura 3**).

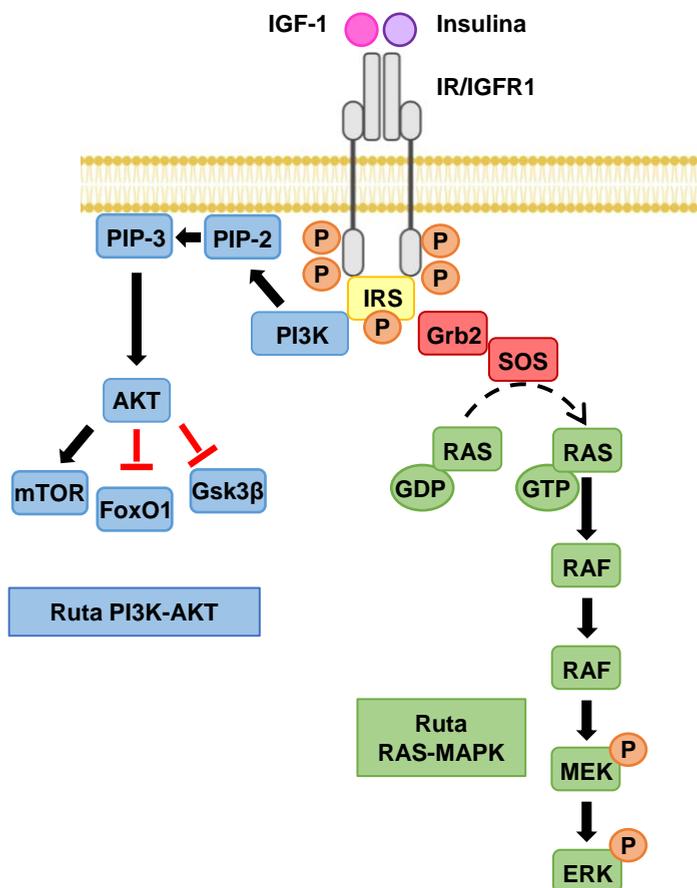


Figura 3. Principales cascadas de señalización aguas abajo de IRS1/2.

Ilustración esquemática de los mecanismos mediante los que IRS1/2 activan la ruta PI3K-AKT (en azul) y la ruta RAS-MAPK (en verde). Autoría propia: "Created with BioRender.com".

1.2 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina sistémica afecta al sistema nervioso, a músculos, páncreas, riñones, corazón, sistema inmune e hígado y se define como un aumento en la cantidad de insulina necesaria para conseguir la homeostasis de glucosa. La disminución de la sensibilidad a la insulina resulta en una reducción de la

Capítulo 1. Introducción

incorporación de glucosa en tejidos periféricos, principalmente en músculo y tejido adiposo. Por otra parte, la incapacidad del hígado para responder a la insulina impide la inhibición de producción de glucosa por lo que la resistencia a la insulina cursa no solo con hiperinsulinemia compensatoria sino también con hiperglicemia. Además, la resistencia a la insulina disminuye la inhibición de la lipoproteína lipasa, promoviendo la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos como músculo esquelético e hígado. La combinación de hiperinsulinemia, hiperglicemia y el exceso de lípidos generan alteraciones en la señalización de insulina en estos tejidos mediante diversos mecanismos subyacentes que incluyen el aumento del estrés oxidativo y la secreción de citoquinas inflamatorias que exacerban la condición [60] [61]. A nivel celular estos mecanismos derivan o bien en la inhibición de la fosforilación de IRS1/2 [62] o bien en un aumento de su degradación por ubiquitinación reduciendo la señalización de insulina [63].

A nivel mundial, la prevalencia de la resistencia a la insulina se estima que va del 15.5% en Europa [64] al 46.5% en zonas como Tailandia, Texas (US) y Venezuela [65][66]. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina se encuentra la edad [67], el índice de grasa corporal siendo específicamente relevante la grasa abdominal [68], el género, siendo más común en hombres [69] o la inactividad física [70].

A pesar de que la resistencia a la insulina es un factor determinante para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DMT2), la mayoría de los individuos con resistencia a la insulina no desarrolla DMT2. La sobrecarga nutricional continuada no solo se considera uno de los principales factores desencadenantes de la resistencia a la insulina [71], sino también de su progresión a DMT2 [72]. En concordancia, la obesidad normalmente deriva en resistencia a la insulina [73]. Sin embargo, únicamente un tercio de los pacientes obesos y con resistencia a la insulina progresa hasta desarrollar DMT2 [74]. En ambos, humanos y roedores, el factor crítico que determina la transición desde obeso-resistente a la insulina al desarrollo de DMT2 es el fallo de las células β pancreáticas que implica una reducción en su masa y un deterioro de sus funciones. La hiperinsulinemia puede dañar a las células β pancreáticas y participar en la reducción de la secreción de insulina en las mismas, induciendo con ello el desarrollo de T2DM [75]. Entre los factores determinantes que

Capítulo 1. Introducción

ocurren en las células β pancreáticas para desencadenar en este fallo se encuentra la genética, la sobrecarga metabólica en las mitocondrias, el estrés en el retículo endoplasmático o la deposición de fibras amiloides [60]. La resistencia a la insulina es reversible, pero una vez se desarrolla DMT2 y las células β pancreáticas están dañadas, su progresión es inevitable [76]. Como ya se ha explicado anteriormente el modelo de ratón *Irs2*^{-/-}, a diferencia del ratón *Irs1*^{-/-}, es capaz de experimentar esta progresión desde resistencia a la insulina hasta DMT2.

La similitud entre IGF-1 e insulina (homología, receptores compartidos etc.) ha apuntado durante años a la idea de que IGF-1 podría participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina. En concordancia, se ha visto que la hiperinsulinemia desregula la producción de IGF-1 en hígado como mecanismo compensatorio mediado principalmente por las IGFbps [77]. Asimismo, bajos niveles de IGF-1 han sido asociados con un aumento del riesgo de padecer resistencia insulina en humanos [78]. Finalmente, en los últimos años, se ha demostrado que la deficiencia de IGF-1 en hígado resulta en resistencia a la insulina [79] [80] y que el tratamiento con IGF-1 recombinante en humanos con DMT2 mejora la resistencia a la insulina [81]. Aunque el mecanismo mediante el que IGF-1 mejora la señalización de insulina es todavía desconocido, su efecto antiinflamatorio y su papel como promotor de la lipólisis y de la incorporación de glucosa en músculo han sido planteados como posibles efectos beneficiosos de IGF-1 durante la resistencia a la insulina [82].

1.2.1 Papel central del hígado en la resistencia a la insulina

El modelo animal de ratón con delección específica de *Ir* en hepatocitos exhibe una marcada resistencia a la insulina acompañada de una severa intolerancia a la glucosa y un defecto en la modulación de la expresión genética y en la represión de glucosa en hígado [83]. Por el contrario, el ratón con delección del *Ir* en músculo esquelético presenta niveles normales de glucosa y de insulina [84]. En tejido adiposo, la deficiencia de *Ir* está asociada con una reducción de los niveles de insulina sugiriendo incluso una mejora en la sensibilidad a insulina [85]. Cuando se lleva a cabo una delección simultánea del *Ir* en tejido graso y músculo, no se observa ningún cambio en los niveles de glucosa o de insulina. Así pues, es la resistencia a la insulina hepática, y no la periférica, la que promueve el desarrollo de hiperglicemia e intolerancia a la glucosa [61].

1.2.2 La resistencia a la insulina y las patologías hepáticas

En hígado, la resistencia a la insulina bloquea la capacidad de la insulina para suprimir la gluconeogénesis, pero, curiosamente, mantiene su habilidad para promover la lipogénesis. Este fenómeno, conocido como resistencia a la insulina selectiva, está dirigido predominantemente por la distribución diferencial y las alteraciones en la expresión de *Irs2* con respecto a *Irs1* [86] y resulta en la acumulación de grasa en hígado [87]. De un hígado sano (<5% de grasa en hepatocitos) se evoluciona a un hígado con esteatosis (>5% de grasa en hepatocitos) conocido como enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) [88]. Este proceso es conocido como el “primer *hit*” de la EHGNA. Sin embargo, la progresión de la EHGNA abarca prácticamente todo el espectro de patologías hepáticas comenzando en esteatosis y progresando primero, hasta esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y posteriormente hasta cirrosis con elevadas posibilidades de evolucionar a hepatocarcinoma celular (HCC) y fallo hepático [89]. Aunque existen actualmente teorías extensamente aceptadas que engloban parte de los mecanismos implicados en la progresión de la EHGNA como la teoría del “segundo *hit*” (explicada más abajo), todavía existe un gran desconocimiento al respecto. Por el momento uno de los aspectos en los que existe consenso es que aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar graves enfermedades hepáticas son aquellos con síndrome metabólico, indicando que la resistencia a la insulina juega un papel crucial en la progresión de las mismas [90][91]. De hecho, en el caso de la EHGNA, un consenso internacional de expertos ha renombrado la EHGNA como la enfermedad hepática asociada al metabolismo [92]

Durante el “primer *hit*” de la EHGNA ocurre una acumulación de lípidos, que engloba triglicéridos, ácidos grasos libres y pequeñas cantidades de colesterol [93] generando esteatosis. Sin embargo, muchos pacientes con esteatosis nunca progresan hasta EHGNA. Esto sugiere por tanto que el desarrollo de la EHGNA requiere de un “segundo *hit*”. La teoría del “segundo *hit*” fue planteada por Day y James y señala al estrés oxidativo como iniciador de la progresión de la EHGNA [94]. Según estos autores el “segundo *hit*” se inicia con la peroxidación de lípidos que altera las reacciones redox generando disfunción mitocondrial en hepatocitos y da lugar a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El retículo

Capítulo 1. Introducción

endoplasmático y los peroxisomas también contribuyen a la generación de ROS. Las ROS dañan a los hepatocitos que como defensa liberan factores para activar a las CEH, las principales inductoras de la fibrosis, activando la respuesta reparativa en hígado [95][96]. La EHGNA es la enfermedad hepática más común con una prevalencia a nivel mundial del 25% [97], siendo la ésta 5 veces mayor en pacientes con DMT2 que en aquellos que no la padecen [98]. Actualmente, la EHGNA se ha convertido en un problema de salud público que ya constituye la primera causa de trasplante de hígado en mujeres y la segunda en hombres [99].

Si, a su vez, la EHGNA puede causar o empeorar la resistencia a la insulina sigue siendo un tema controvertido [100], sin embargo, sí que se ha demostrado que padecer EHGNA aumenta el riesgo de desarrollar DMT2 [101]. Asimismo, la resistencia a la insulina es una de principales características patológicas en pacientes con infección por virus de hepatitis C (VHC) derivando en gran parte de los casos en DMT2 [102].

Múltiples estudios han asociado la resistencia a la insulina derivada del VHC con la progresión de la enfermedad hepática por promover la fibrosis hepática, observándose correlación con la reducción de los niveles hepáticos de IRS2 [103] así como la esteatosis [104] y el desarrollo de HCC [105]. Sin embargo, los mecanismos que orquestan el impacto de la resistencia a la insulina en la progresión de la enfermedad hepática siguen siendo mayoritariamente desconocidos.

1.3 Respuesta reparativa en hígado

El hígado presenta una extraordinaria capacidad de regeneración. En principio, cuando el hígado sufre un daño, se activa un proceso de regeneración que se basa en la proliferación de hepatocitos preexistentes para reemplazar el tejido dañado [106]. Sin embargo, en desórdenes hepáticos crónicos en los que la capacidad proliferativa de los hepatocitos se ve impedida, se activa una segunda vía de regeneración mediada por la respuesta de las células progenitoras hepáticas (CPH) que histopatológicamente se conoce como reacción ductular [107].

1.3.1 Respuesta de las CPH frente al daño hepático crónico

La reacción ductular es una lesión reactiva en la zona periportal (que rodea a la vena porta) y que está constituida por estructuras ductales, denominadas CPH, acompañadas de un conjunto formado por células estromales (CEH y fibroblastos portales (FP)), células inflamatorias, componentes de la ECM, factores de crecimiento y citoquinas, que constituyen el denominado nicho de las CPH. El término estromal describe al tejido conectivo que forma una estructura de soporte en la que residen las células funcionales del tejido [108]. La ECM es un conjunto de proteínas que interacciona de manera bidireccional con las células que la rodean para crear un microambiente que regula la homeostasis celular [109][110]. La ECM forma una estructura tridimensional que funciona como un andamio para facilitar la migración celular o la adhesión de factores de crecimiento o citoquinas [111] para modular, entre otros, la supervivencia [112], proliferación, diferenciación o “*cell fate*” [113] [114] de las células circundantes.

Las señales del nicho han demostrado ser esenciales para la regulación de las CPH frente al daño crónico [115]. Las CPH, denominadas células ovals (CO) en ratón, emergen o bien a partir del nicho de CPH adultas localizado en el conducto de Hering, o bien a partir de la dediferenciación de hepatocitos y células biliares epiteliales [116]. Las CPH se expanden guiadas por las señales del nicho proliferando extensamente y diferenciándose de nuevo a células funcionales del tejido hepático: hepatocitos y células biliares [117]. Entre estas señales se encuentran los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), que son secretados principalmente por las CEH y los FP [118][119], siendo entre ellos particularmente relevante el factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7) que ya sido establecido como crítico para expansión de las CPH y la regeneración [118].

1.3.1.1 El nicho de las CPH. Las CEH y la ECM

La CEH son células mesenquimales estromales que se localizan adyacentes a la vena porta y a la vena central en el denominado espacio de Disse (entre las células sinusoidales endoteliales y los hepatocitos) y que constituyen del 5-8% de las células hepáticas en un hígado sano [119][120].

Capítulo 1. Introducción

Frente al daño hepático, las CEH se activan transdiferenciándose desde células quiescentes, que acumulan vitamina A, a células proliferativas y fibrogénicas denominadas miofibroblastos (CEH activadas) que migran hasta la zona de daño. Cuando el daño se convierte en crónico, la acumulación de CEH activadas se hace más evidente alrededor de las CPH en la zona periportal, donde llevan a cabo un proceso denominado fibrosis que está descrito como un depósito excesivo de ECM que sirve para reemplazar el tejido dañado [121] (**Figura 4**).

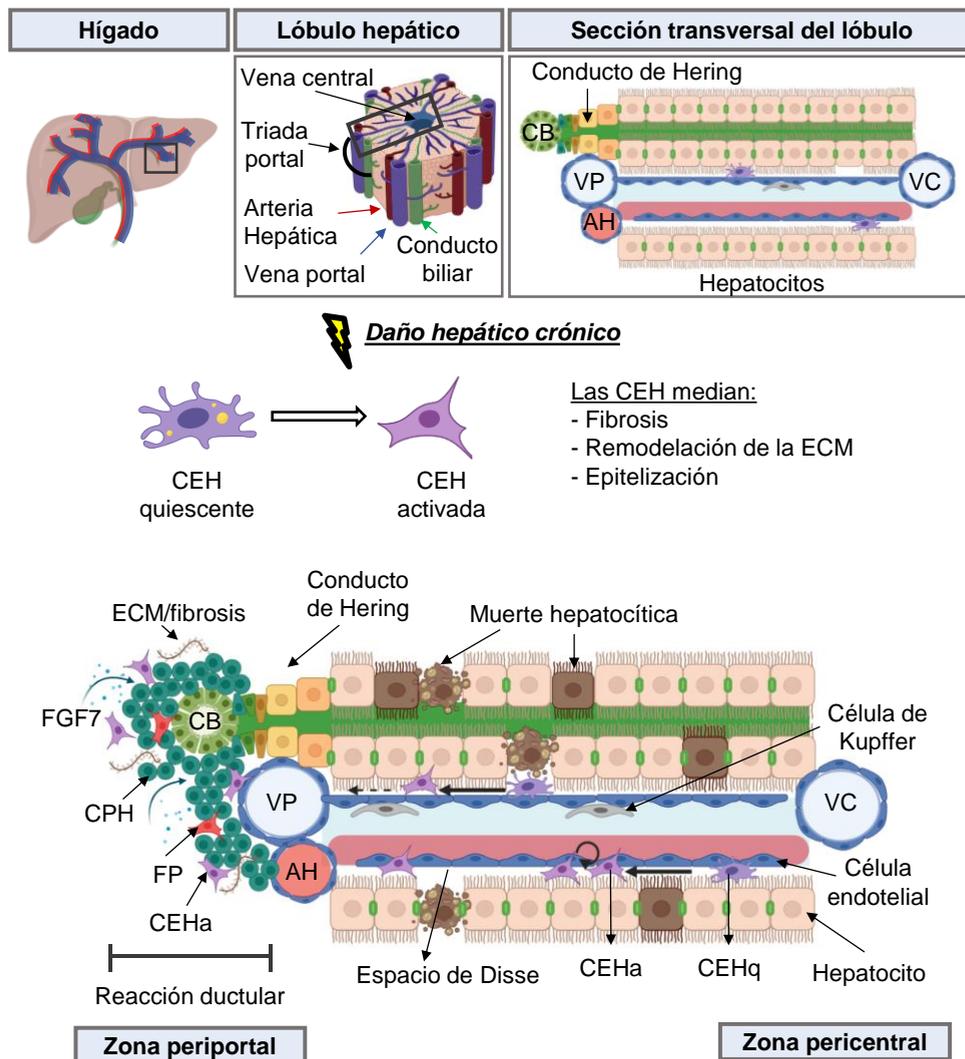


Figura 4. Ilustración representativa de la respuesta reparativa hepática frente al daño hepático crónico.

Continuación Figura 4: El esquema de la parte superior visualiza la anatomía hepática con menor aumento (órgano), aumento intermedio (lóbulo) y a mayor aumento (a nivel celular). La parte inferior ilustra la respuesta de las CPH a nivel celular durante el daño crónico, que se inicia con la activación de las CEH y da lugar a la reacción ductular alrededor de la vena portal. CB=conducto biliar; VP=vena portal; VC=vena central; AH=arteria hepática; ECM=matriz extracelular; FGF7=factor de crecimiento de fibroblastos 7; CPH=células progenitoras hepáticas; CEHa= células estrelladas hepáticas activadas; CEHq=células estrelladas hepáticas quiescentes; FP=fibroblastos portales. Autoría propia, "Created with BioRender.com".

1.3.1.2 Regresión del nicho de las CPH

Para alcanzar una correcta regeneración hepática se requiere la regresión de la fibrosis, dado que la continua acumulación de ECM destruye las estructuras hepáticas e imposibilita la correcta función del hígado [122]. Para ello es necesaria la resolución de la activación de las CEH que son las principales productoras de ECM durante la fibrosis hepática [123] [124]. De hecho, la activación sostenida de las CEH deriva en cirrosis, un estado muy avanzado de fibrosis hepática en el que no sólo aparece una mayor deposición de ECM, sino que también se produce disrupción tisular, alteración de la circulación sanguínea y riesgo de fallo hepático [122][125]. Del proceso de reversión de las CEH, aunque es muy poco conocido hasta el momento, se sabe que es dinámico y reversible, y que ocurre durante la reparación del tejido y cuando cesa el daño [126] [127]. Las CEH desaparecen o bien entrando en apoptosis o senescencia, o bien mediante su reversión fibrogénica desde CEH activadas a un estado inactivado (CEH revertida) caracterizado por la salida del ciclo celular en el que se asemejan de nuevo a CEH quiescentes [128][126] permitiendo así la regresión de la activación de las CEH y la reparación del tejido epitelial funcional (**Figura 5**).

Capítulo 1. Introducción

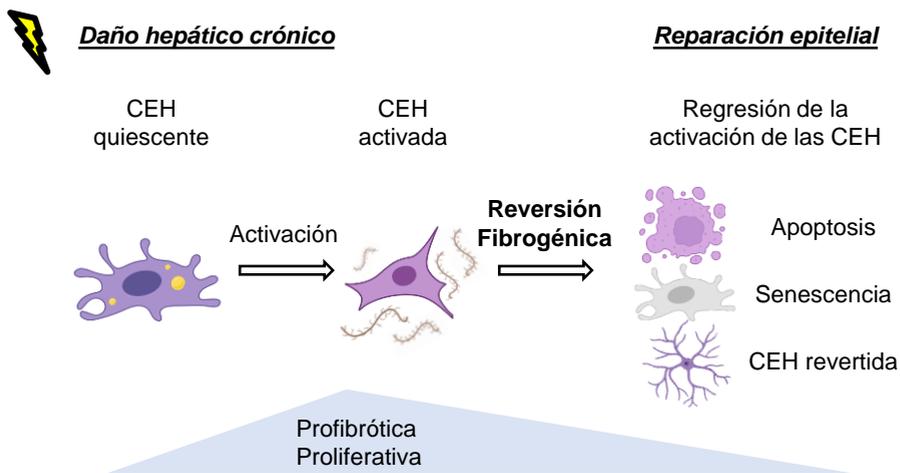


Figura 5. Reversión fibrogénica de las CEH.

Ilustración representativa de los diferentes estados de transdiferenciación de las CEH desde su activación durante el daño crónico hasta su regresión, que resulta esencial para la reparación epitelial y que ocurre mediante apoptosis, senescencia y reversión a un estado similar al quiescente. CEH=células estrelladas hepáticas. Autoría propia: “Created with BioRender.com”.

En los últimos años se ha dedicado mucho esfuerzo a intentar entender los mecanismos que regulan la activación e inactivación de las CEH. Uno de los mecanismos involucrados más caracterizados hasta el momento es la regulación del flujo autofágico. La autofagia es un proceso catabólico dependiente de lisosoma que permite la obtención de nutrientes a través de la degradación de orgánulos citoplasmáticos [129]. Las CEH en estado quiescente acumulan gotas lipídicas (vitamina A) como reserva de energía [128]. En caso de daño hepático, el flujo autofágico de las CEH se activa para obtener ácidos grasos a partir de los ésteres de retinilo (vitamina A) presentes en las gotas lipídicas, que aportarán la energía necesaria para mantener a las CEH en estado activado, es decir, en estado fibrótico y proliferativo. Un bloqueo en la autofagia limita la energía de las CEH, frenando su activación y con ello la fibrosis [130]. *In vitro*, el tratamiento a corto plazo de la línea de CEH LX-2 con el inhibidor del flujo autofágico 3-Metil Adenina (3-MA) ha demostrado ser suficiente para frenar la activación de la línea LX-2, reduciendo la expresión de marcadores de fibrosis [131] y promoviendo la acumulación de lípidos [130], es decir, generando un fenotipo característico de CEH revertida (quiescente).

La cantidad y composición de la ECM varía en base a la transdiferenciación de las CEH durante la progresión/resolución del daño hepático [110][132]. El dinamismo de la ECM depende de su ritmo de síntesis y de degradación proteolítica que es llevada a cabo por las metaloproteinasas (MMPs). El inhibidor 1 del activador de fibrinógeno (PAI-1/SERPINE1), inhibe la activación de las MMPs dependiente de plasminógeno [133] y es considerado, por tanto, como uno de los principales remodeladores de la ECM. En hígado, SERPINE1 se incluye en la lista de elementos integrantes del ECM cuya función consiste en regular la propia ECM [110]. Las CEH son una fuente muy importante de SERPINE1 [134], que también puede ser secretada por hepatocitos [135]. Sin embargo, existe una gran controversia sobre la contribución de SERPINE1 en la regulación del ECM y su impacto en la regeneración hepática, de manera que existen estudios que señalan a SERPINE1 como inductora de fibrosis [136] [137] y otros como antifibrótica [138].

1.3.2 La respuesta reparativa durante la progresión de las enfermedades hepáticas

El defecto en la respuesta reparativa mediada por el nicho de las células progenitoras hepáticas (CPH) ha sido propuesto como un evento crucial para progresión de las enfermedades hepáticas [89][139].

Entre los múltiples estudios que respaldan esta propuesta se encuentra un análisis comparativo entre pacientes con EHGNA “moderada” y EHGNA “severa” (con elevado grado de fibrosis) que encontró como genes distintivos aquellos implicados en la regulación de la reparación de tejido/regeneración y el metabolismo [140]. Estudios en EHGNA, tanto en ratón como en humano, han confirmado la presencia de reacciones ductulares y han establecido una fuerte correlación entre la presencia de estos eventos y la progresión de la enfermedad [107][141]. También se observan reacciones ductulares en pacientes con VHC siendo el incremento en CPH especialmente relevante en aquellas secciones hepáticas obtenidas de pacientes con cirrosis causada por VHC [142]. Sin embargo, queda por evaluar la posible implicación de la resistencia a la insulina en el defecto de la respuesta reparativa que facilita la progresión de la enfermedad hepática (**Figura 6**).

Capítulo 1. Introducción

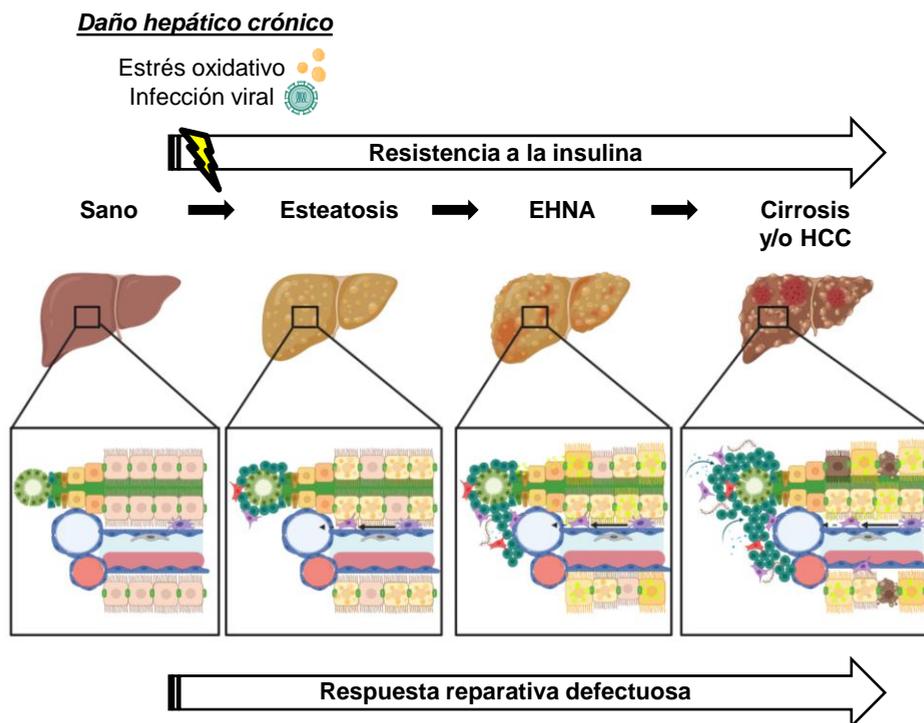


Figura 6. El defecto en la respuesta reparativa ha sido asociado con la progresión de las enfermedades hepáticas vinculadas con la resistencia a la insulina.

Ilustración esquemática del impacto de la reacción ductular frente al daño crónico en la progresión de la EHGNA [89] y la posible implicación de la resistencia a la insulina en el proceso. Autoría propia: "Created with BioRender.com".

1.3.3 La señalización de insulina-IRS2 durante la respuesta reparativa

El defecto crónico en la respuesta reparativa cutánea es una de las principales complicaciones en pacientes con diabetes (afectando al 25% de los pacientes [143]). Comparado con el resto de la población, los pacientes con diabetes tienen de 10 a 20 veces más riesgo de padecer una amputación por úlceras crónicas [144]. La resistencia a la insulina, uno de los sellos distintivos de la DMT2 que recientemente se ha visto también involucrada en la patogénesis de la DMT1 [145], provoca un retraso en la reparación de herida en piel de ratón [146]. En la misma línea, la aplicación de insulina de manera tópica en ratas diabéticas (con resistencia a la insulina) es suficiente para contrarrestar el defecto en la señalización de insulina y acelerar la reparación de herida [147] sugiriendo que la resistencia a la insulina

podría ser uno de los factores desencadenantes del defecto crónico en la respuesta reparativa cutánea durante la DMT2. Curiosamente, los ratones diabéticos también presentan un defecto en *Fgf7*, originado por mecanismos todavía desconocidos, que retrasa la reparación cutánea [148], de manera que el tratamiento con FGFs ha sido planteado como terapia para las úlceras de pie diabético [149].

Al igual que en piel, la insulina ha demostrado tener un fuerte efecto trófico durante la regeneración hepática. Tras una hepatectomía ocurre un aumento en los niveles de insulina en hígado que resulta crítico para la regeneración hepática [150] hasta tal punto que los pacientes con falta de insulina (insulinopenia) presentan elevado riesgo de padecer fallo hepático tras la misma [151]. El tratamiento con IGF-1 recombinante *in vivo* durante el daño crónico generado con inhalación de CCl_4 también ha demostrado mejorar la función hepática por reducir el estrés oxidativo y la fibrosis [152]. Por otra parte, el correcto funcionamiento del metabolismo de glucosa en hígado ya ha sido descrito como esencial para el suministro de energía que requiere la regeneración hepática [153]. Tanto es así que la oxintomodulina, un novedoso tratamiento contra la DMT2, ha sido propuesto como un potencial tratamiento para pacientes con EHNA por mejorar la regeneración hepática en ratón [154]. El impacto perjudicial de la resistencia a la insulina/DMT2 en la respuesta reparativa ha sido extensamente estudiado en tejido cutáneo, en el que se ha calificado a esta condición como “heridas de diabetes” [143]. No obstante, a pesar del enorme paralelismo entre los efectos de la resistencia a la insulina/DMT2 en la respuesta reparativa de piel e hígado, existen muy pocos estudios sobre el impacto de la resistencia a la insulina en la respuesta reparativa hepática y por consiguiente en la progresión de las patologías hepáticas.

1.4 Familia de FGFs

En mamíferos la familia FGF consta de 18 ligandos que señalizan a través de 4 receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR) [155]. Los FGFR1-4 son receptores transmembrana tirosina quinasa muy conservados [155]. Un quinto receptor FGFR5 (también conocido como FGFR1) puede unirse a FGFs pero no tiene dominio tirosina quinasa y ha sido sugerido como modulador negativo de la señalización de FGFs [156]. Las FGFs son glicoproteínas secretadas que

Capítulo 1. Introducción

generalmente quedan retenidas por la ECM o por la superficie celular por proteoglicanos heparán sulfato (HPSG). Para señalar, las FGFs necesitan ser liberadas de la ECM por las heparinasas, proteasas o proteínas de unión específica a FGF, para posteriormente unirse a los HPSG de superficie celular que estabilizarán la unión ligando FGF-FGFR formando un complejo ternario [157] [158]. Las FGFs se unen con baja afinidad a las HPSG de la superficie celular y con elevada afinidad con su FGFR correspondiente [159].

Los FGFR consisten en tres dominios extracelulares de inmunoglobulinas (Ig-I, Ig-II, Ig-III), una única hélice transmembrana y un dominio tirosina quinasa (TK) partido intracelular. Los dominios Ig-II e Ig-III forman el sitio de unión con el ligando y con los HPSG [155]. La especificidad de unión con el ligando FGF la determina el ajuste alternativo del dominio Ig-III. La primera mitad de Ig-III es codificada por el exón (IIIa) que se divide en el exón IIIb (“b”) o el exón IIIc (“c”) y codifica la región transmembrana [160][161] (**Figura 7**). Los tejidos epiteliales expresan predominantemente la isoforma “b” mientras que los tejidos mesenquimales expresan la isoforma “c” [155]. FGFR4 presenta una isoforma única que es paróloga a la isoforma “c” [160]. Otros parámetros que también participan en la especificidad de unión son la expresión específica de los diferentes ligandos y receptores en función del tejido y la interacción de FGFs y FGFRs con algunas proteínas secretadas o de superficie celular como la familia “*Klotho*” que aumentan la especificidad por el ligando FGF23 [162][163].

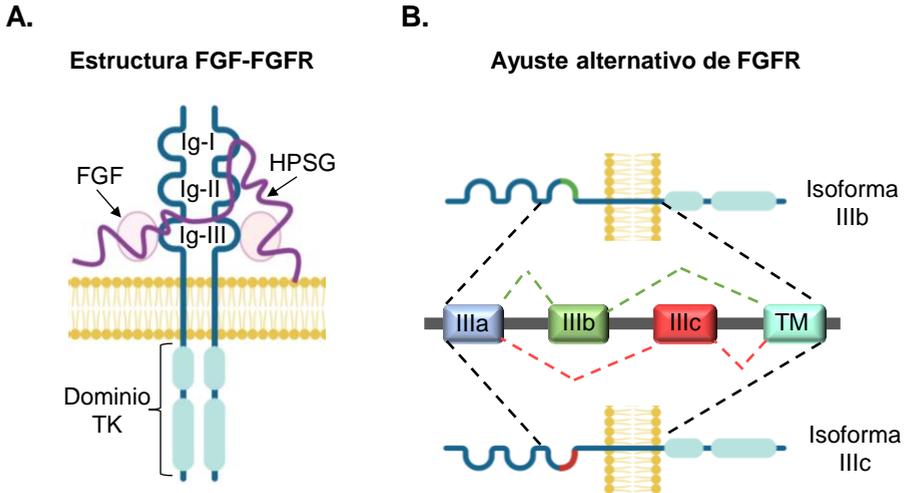


Figura 7. Estructura y ajuste alternativo de los FGFR.

(A) La estructura básica del complejo factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-receptor de FGF (FGFR) consiste en dos moléculas de receptor, dos moléculas de FGFs y una molécula de proteoglicanos de heparán sulfato (HPSG). La parte intracelular de las moléculas del receptor consisten en un dominio tirosina quinasa (TK). (B) La especificidad de ligando de los FGFRs viene determinada por ajuste alternativo del dominio Ig-III. La primera mitad del Ig-III viene codificada por el exón invariable IIIa que se divide en el exón IIIb o bien en el exón IIIc. Ambos IIIa y IIIb se dividen para dar lugar al exón que codifica la región transmembrana (TM). Autoría propia: "Created with BioRender.com".

1.4.1 Señalización de FGFs

Los FGFR señalizan como dímeros. Su dimerización dependiente de ligando provoca un cambio conformacional en la estructura del receptor que activa el dominio intracelular de quinasa y resulta en la transfosforilación de los dominios tirosina quinasa y de la cola intracelular. Dicha fosforilación permite el acoplamiento de proteínas adaptadoras como el sustrato 2 de receptor de FGFR (FRS2) que se unen a través de su dominio de unión fosfotirosina (PTB) a la zona yuxtamembrana de los FGFRs. Los FGFRs activados fosforilan a FRS2 en múltiples sitios permitiendo el reclutamiento de SOS y GRB2 para posteriormente activar la ruta inductora del crecimiento y supervivencia RAS-MAPK [164]. Por otra parte, GRB2 también es capaz de reclutar un complejo que incluye a PI3K para activar la ruta antiapoptótica PI3K-AKT [165]. Así pues, la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 y

Capítulo 1. Introducción

la señalización de FGF-FGFR comparten sus principales efectores moleculares y presentan, por tanto, funciones similares.

1.4.2 Funciones de los FGFs

Los FGFs actúan como mitógenos de amplio espectro, algunos FGFs pueden también inducir migración celular, angiogénesis, crecimiento y supervivencia celular [166][167]. Las FGFs se han visto implicadas en la regulación del desarrollo en vertebrados. De hecho, ya se ha demostrado que los FGFRs llevan a cabo un papel crucial durante el desarrollo temprano modulando procesos como el crecimiento de blastocito o la inducción del mesodermo primario [168]. En las etapas tardías del desarrollo las FGFs regulan el crecimiento y la diferenciación en varios tejidos y órganos [169][170]. Cuando se expresan de manera inapropiada, los FGFs y sus receptores pueden contribuir a la patogénesis del cáncer [155], así como al desarrollo de desórdenes hereditarios óseos como la acondroplasia [171]. Además, los FGFs, y en particular la subfamilia de FGF7, han sido establecidos como moduladores clave de los procesos de reparación en diferentes tejidos y órganos e incluso han sido estudiados como posibles tratamientos frente a defectos en la reepitelización de herida, la radiación o la mucositis generada por quimioterapia [172].

En hígado, ciertas FGFs como FGF19 y FGF21 han demostrado tener un papel central en la regulación del metabolismo hepático y han sido asociadas de manera directa con la progresión de la EHGNA y el desarrollo del HCC [173][174][175]. Otras como FGF1, FGF2 y la familia FGF8 han sido descubiertas como inductoras de la activación de las CEH y promotoras de la fibrogénesis y de remodelación de la ECM que desencadena en HCC [175][176][177].

1.4.3 Subfamilia de FGF7

La subfamilia de FGF7, formada por FGF3, FGF7, FGF10 y FGF22, es única entre las FGFs porque sus miembros son secretados exclusivamente por el mesénquima y activan específicamente las isoformas “b” de FGFR1/2 presentes en el epitelio presentando mayor afinidad por FGFR2b que por FGFR1b [178][179][180]. El caso de FGF7 es excepcional ya que señala únicamente a través de FGFR2b [167]

(Figura 8). El resto de subfamilias de FGFs son secretadas por los tejidos epiteliales y se unen casi de manera exclusiva a la isoforma mesenquimal “c” de los FGFR [179].

La especificidad de unión entre la subfamilia de FGF7 y FGFR1/2b establece una comunicación paracrina entre mesénquima y epitelio que resulta esencial para el desarrollo y la reparación de tejidos [118] [180].

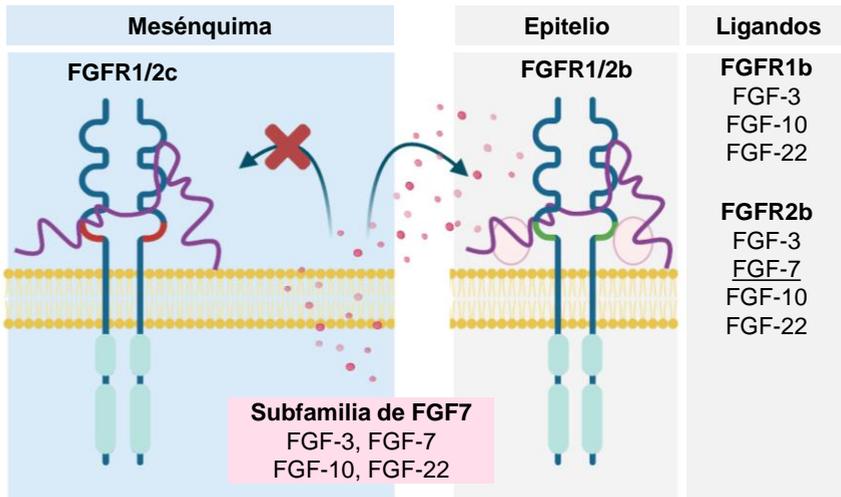


Figura 8. Subfamilia de FGF7.

Las células epiteliales expresan la isoforma IIIb y las mesenquimales expresan la isoforma IIIc. Los FGFs de la subfamilia de FGF7 presentan la particularidad de que son secretados por la mesénquima y se unen únicamente a la isoforma b de FGFR1 y FGFR2 presente en el epitelio. FGF7 se une de manera exclusiva a FGFR2b. Autoría propia: “Created with BioRender.com”.

1.4.3.1 Subfamilia de FGF7 durante la organogénesis

Los embriones del ratón con delección de FGFR2 (ambas isoformas) mueren durante la implantación [181]. La delección de la isoforma *Fgfr2b* (*Fgfr2b*^{-/-}) en ratón origina altos niveles de apoptosis que provocan un fallo en el desarrollo de extremidades, pulmones, glándulas mamarias y de la glándula pituitaria anterior causando la muerte perinatal [182]. Los ratones *Fgfr2b*^{-/-} también presentan un crecimiento anormal en glándulas salivares, páncreas, oído interno, dientes, piel y timo, evidenciando un papel fundamental de *Fgfr2b* en la regulación de la comunicación mesenquimal-epitelial durante la organogénesis. Curiosamente, los ratones con

Capítulo 1. Introducción

deleción de *Fgf10* (*Fgf10*^{-/-}) presentan un fenotipo muy similar al del ratón *Fgfr2b* [183] mientras que los ratones con deleción de *Fgf7* (*Fgf7*^{-/-}) únicamente muestran un leve defecto en el crecimiento del pelo y en la uretra [184] [185]. Los ratones *Fgf3*^{-/-} presentan solo anomalías en el oído interno [186] y todavía no se han detectado defectos derivados de silenciamiento de *Fgf1* en ratones [187]. Estos datos sugieren que *Fgf10* es el ligando de *Fgfr2b* más relevante durante el desarrollo, mientras que *Fgf7* ha sido extensamente relacionado con procesos postnatales como la reparación epitelial y la enfermedad. El papel de la subfamilia de FGF7 en reparación epitelial fue descubierto en piel y en los últimos años ha sido también establecido en hígado.

1.4.3.2 Subfamilia de FGF7 durante la reparación epitelial en piel

En la piel, la comunicación entre fibroblastos (dermis) y queratinocitos (epidermis) es la principal reguladora de la respuesta reparativa [188]. La subfamilia de FGF7 es sintetizada en la piel principalmente por fibroblastos [189][190], células endoteliales [191] y células del sistema inmune [192] para activar de manera paracrina una respuesta en los queratinocitos, que expresan el receptor *FGFR2b* [193]. FGF7 lleva a cabo un papel esencial en piel, tanto en condiciones normales como durante la reparación de herida. El ratón con expresión de la proteína *Fgfr2b* dominante negativa, un receptor mutado que es capaz de inhibir la actividad de los receptores *Fgfr2b* en queratinocitos, presenta severas anomalías en piel sana como atrofia epidérmica y defectos en los folículos pilosos. Además, la falta de *Fgfr2b* tras el daño provoca una reducción en la proliferación de los queratinocitos en el borde de la herida y un retraso en la reepitelización [194]. En concordancia, en piel de ratón, *Fgf7* genera una fuerte inducción en la reparación epitelial tras el daño [189]. Curiosamente, en ratones con falta de *Fgf7*, las heridas por incisión se curan con normalidad, lo que sugiere que la ausencia de *Fgf7* puede ser compensada por otros ligandos de *Fgfr2b*. Uno de los posibles candidatos es *Fgf10*, que se ha encontrado también en piel sana y en los bordes de herida tanto de ratones de fenotipo salvaje como en los ratones con falta de *Fgf7* [192]. Aunque, a diferencia de *Fgf7*, *Fgf10* no se ve inducido durante la reparación de herida [190]. La muerte prematura de los ratones con deleción de *Fgf10* [195] ha dificultado el estudio de su contribución durante el proceso de reparación de herida. Otro de los

posibles candidatos es Fgf22 cuya expresión se ha visto fuertemente inducida en la epidermis hiperproliferativa de las heridas sugiriendo que podría contribuir en la reparación epidérmica [196].

1.4.3.3 Subfamilia FGF7 durante la reparación epitelial en hígado

En hígado de ratón sano no se ha detectado expresión de Fgf7, Fgf10 o Fgf22 y, en el caso de Fgf3, su expresión se ha detectado únicamente en hígados jóvenes pero desaparece con la edad [197]. Fgfr2b ha podido detectarse en hígado sano, aunque a niveles muy bajos viéndose su expresión fuertemente inducida en CO durante el daño hepático [198]. El modelo de ratón con expresión de la proteína *Fgfr2b* dominante negativa únicamente en hepatocitos, presenta una regeneración hepática impedida tras el daño agudo (hepatectomía) debido a un defecto en la proliferación de los hepatocitos que quedan arrestados en la fase G1 tardía del ciclo celular [197]. Entre sus múltiples ligandos, el papel de Fgfr2 durante la regeneración hepática ha sido recientemente atribuido a Fgf7.

En hígado humano y de ratón, FGF7 es expresado por las CEH en estado activado (miofibroblastos) [199]. Sin embargo, en el modelo de daño hepático crónico en ratón con la dieta 3.5-dietoxicarbinol-1.4-dihidrocolina (DDC) los FP positivos para el antígeno celular del timo 1(Thy1+) han sido identificados también como fuente de Fgf7 [118] [200]. La expresión de Fgf7 experimenta un aumento aberrante al inicio del daño hepático crónico con la dieta DDC y se mantiene significativamente aumentada durante los siguientes 14 días de dieta [201]. Durante la dieta DDC, los ratones *Fgf7*^{-/-} muestran una reducción significativa en la expansión de CPH y niveles elevados de mortalidad durante el daño hepático crónico, demostrando que la comunicación paracrina entre el Fgf7 secretado principalmente por CEH y Fgfr2b, expresado en CO durante el daño, resulta esencial para iniciar la expansión de CPH así como para el remodelaje y la epitelización de las CPH durante el daño hepático crónico [118]. Sin embargo, los mecanismos que regulan la comunicación a través de Fgf7 en el nicho de las CPH todavía se desconocen.

Respecto al resto de ligandos de Fgfr2b, varios estudios determinan que la inducción en la expresión de *Fgf3* y *Fgf1* es modesta e incluso prácticamente indetectable durante el tratamiento con la dieta DDC [118][201]. Sobre la expresión

Capítulo 1. Introducción

de *Fgf10* y *Fgf22* existe controversia, ya que existen estudios que afirman que su expresión es prácticamente indetectable durante el daño hepático crónico generado con la dieta DDC [118] y otros que detectan una inducción en la expresión de *Fgf10* y *Fgf22* similar a la observada en *Fgf7*. En el mismo estudio se demuestra también que la sobreexpresión de *Fgf10* durante el daño hepático crónico genera un aumento en la expansión de CPH (A6+) [201]. Es posible, por tanto, que *Fgf10* no sea solo relevante durante la organogénesis sino también durante la respuesta reparativa hepática [201]. La función de *Fgf22* durante la respuesta reparativa hepática es desconocida.

1.5 El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2)

1.5.1 NRF2 como defensa frente el estrés oxidativo

El estrés oxidativo es uno de los eventos patogénicos más relevantes para la progresión no solo de la EHGNA, siendo el principal desencadenante del “segundo hit”, sino también del resto de enfermedades hepáticas [202]. El factor de transcripción NRF2 es un elemento crucial en la defensa contra el estrés oxidativo [203]. NRF2 controla la expresión de proteínas antioxidantes y de enzimas involucradas en la detoxificación de productos dañinos que reducen los niveles de ROS actuando como citoprotectores [204]. NRF2 es miembro de la familia ‘cap“n”collar’, de la que en vertebrados también forman parte NRF1 y NRF3 [205]. En el núcleo, los factores de transcripción NRF necesitan dimerizar con las proteínas pequeñas de fibrosarcoma musculoponeurótico (MAF) para unirse al elemento de respuesta antioxidante (ARE) presente en los promotores de sus genes diana [205] [206]. Numerosos estudios con ensayos *in vitro* de unión a ADN y de transfección señalan a NRF2 como la principal proteína inductora de la transcripción dirigida por ARE [206]. De hecho, aunque ambos, NRF1 y NRF2, están presentes en hígado, estudios con la línea celular hepática HepG2 demuestran que NRF2 actúa de manera significativamente más eficiente para activar la expresión de genes a través de ARE que NRF1 [204] [207].

Aunque los tres NRFs presentan patrones de expresión solapados parcialmente y funcionan como factores de transcripción activados por el estrés, estudios con

modelos animales han demostrado que presentan funciones no redundantes [205]. Mientras que en los ratones *Nrf3*^{-/-} no se observa ninguna alteración [208], los ratones *Nrf1*^{-/-} sufren de estrés oxidativo hepático durante el desarrollo [209] y mueren antes de nacer [210]. *Nrf2* no es necesario durante el desarrollo ya que los ratones *Nrf2*^{-/-} nacen sin complicaciones [211]. Sin embargo, el papel crucial de NRF2 frente al estrés oxidativo queda evidenciado por el fenotipo postnatal de los ratones *Nrf2*^{-/-}. Incluso los ratones *Nrf2*^{-/-} jóvenes son más susceptibles a toxinas [212] y con la edad desarrollan desórdenes neurodegenerativos [213] o una enfermedad autoinmune similar a lupus eritematoso [214] cuyo origen se ha relacionado con un exceso de estrés oxidativo.

En piel y en hígado la falta de *Nrf2* incrementa la susceptibilidad de padecer cáncer [215][216]. De hecho, el efecto de varios compuestos antioxidantes evaluados en ensayos clínicos por su potencial como defensa frente a agentes carcinógenos desaparece en ratones *Nrf2*^{-/-} indicando que sus actividades están mediadas por NRF2 [216][217][218][219][220].

1.5.2 Activación de NRF2

La activación de NRF2 puede ocurrir a través de la ruta canónica y de la ruta no canónica. En la ruta canónica la actividad de NRF2 está regulada por la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (KEAP1) que se une a NRF2 por defecto y lo dirige hacia el proteasoma para su degradación. En presencia de estrés oxidativo, KEAP1 actúa como sensor y libera a NRF2, evitando su degradación y permitiendo su traslocación al núcleo para inducir la expresión de genes antioxidantes [221][222]. La ruta no canónica, descubierta recientemente en hepatocitos, está modulada por el sequestosoma 1 (SQSTM1) / P62. Normalmente P62 actúa uniendo las proteínas cargo a la membrana del autofagosoma para que sean degradadas por autofagia [223]. Posteriormente, P62 se integra en el autofagolisosoma y es degradado durante el proceso de autofagia de manera que un bloqueo en la autofagia genera una acumulación de P62 y, asimismo, una acumulación en P62 es considerada como un marcador del bloqueo en la autofagia [224]. P62 presenta una gran afinidad por KEAP1 de manera que, cuando se acumula por un bloqueo en la autofagia, compete con NRF2 por la unión por KEAP1, dejando a NRF2 libre para activar la expresión de sus genes diana [225][226] (**Figura 9**).

Capítulo 1. Introducción

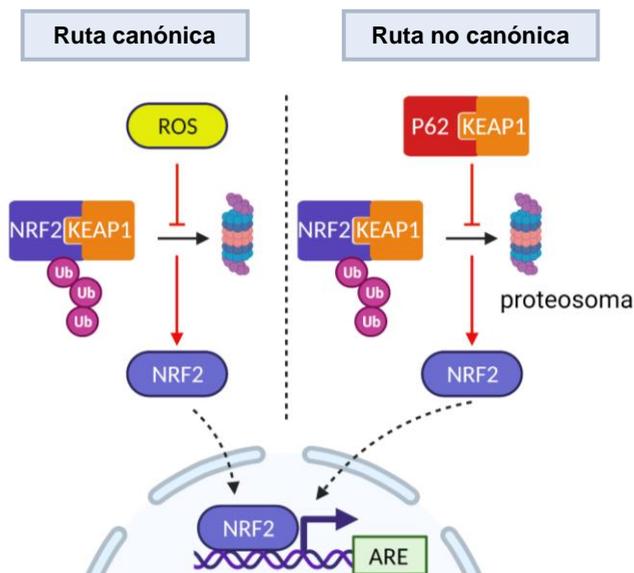


Figura 9. Mecanismos de activación de NRF2.

KEAP1 actúa como modulador negativo de NRF2, uniéndose al mismo para promover su degradación por el proteosoma. En la ruta canónica, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la ruta no canónica, P62, impiden la unión de NRF2 con KEAP1 para evitar su degradación y promover su traslocación al núcleo para activar la expresión de sus genes diana a través del elemento de respuesta antioxidante (ARE). Autoría propia: "Created with BioRender.com".

También existe una estrecha correlación entre la señalización de insulina-IRS2 y el estrés oxidativo pudiendo ambas rutas actuar de manera coordinada. De hecho, la estimulación con insulina promueve la generación de un ambiente oxidado para liberar a la proteína tirosina fosfatasa (PTBP1), inhibidora del receptor de insulina, facilitando y potenciando de este modo la activación de la señalización de insulina [227][228].

1.5.3 Papel protector de NRF2 frente a las patologías hepáticas

Los pacientes con EHGNA presentan elevados niveles de estrés oxidativo y de expresión de NRF2 [229] cuya actividad se ha visto aumentada con el progreso de la enfermedad [230]. Los estudios con roedores sugieren que *Nrf2* actúa de manera dual como protector frente al desarrollo de la EHGNA [231]. Esto se debe a que la falta de *Nrf2* ha demostrado, por un lado, activar la lipogénesis y promover la acumulación hepática de lípidos durante el tratamiento con el modelo de dieta grasa

para la inducción de esteatosis, demostrando que Nrf2 protege frente al “primer *hit*” [232][233]. Por otro lado, la delección de Nrf2 promueve la progresión desde esteatosis a EHNA y contribuye para acentuar la enfermedad, evidenciando un papel de Nrf2 como modulador negativo del “segundo *hit*” mediante mecanismos que son todavía desconocidos [234]. En la misma línea, la activación farmacológica de Nrf2 durante el tratamiento con diversos modelos para inducir EHNA ha demostrado ser una estrategia efectiva para prevenir la EHNA y su progresión en ratones de fenotipo salvaje [202][233], a pesar de que por el momento las terapias para EHNA dirigidas a Nrf2 todavía no han sido implementadas en clínica [235].

1.5.4 NRF2 durante la respuesta reparativa

Uno de los posibles mecanismos planteados para explicar el papel protector de Nrf2 frente al desarrollo de patologías hepáticas se basa en las crecientes evidencias de que Nrf2 resulta necesario para la reparación de tejido. Curiosamente el papel crucial de Nrf2 durante la regeneración hepática es dependiente de la señalización de insulina/Igf-1. Así pues, en ratones *Nrf2*^{-/-}, el aumento del estrés oxidativo genera resistencia a la insulina/Igf-1 impidiendo la activación de las cascadas mitogénicas y de supervivencia Pi3k-Akt y Ras-Mapk, y resultando en una regeneración hepática defectuosa [236].

1.5.4.1 Papel de NRF2 en CEH

La falta de *Nrf2* durante el tratamiento con el modelo de fibrosis inducida con CCl₄ agrava la fibrosis y retrasa la regeneración hepática [237]. En concordancia, ya ha sido demostrado que la activación de NRF2 en CEH reprime su activación y atenúa la fibrosis mejorando la regeneración hepática [238].

1.5.4.2 Papel de NRF2 en hepatocitos

En contraste con el efecto atenuador de NRF2 en las CEH, ya se ha demostrado que la activación de NRF2 en hepatocitos promueve la reacción ductular mediante la secreción de la proteína del cuadro 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) promoviendo la progresión de tumores durante el daño crónico generado por un déficit en la autofagia [239]. En concordancia, la sobreactivación de Nrf2 mediada por la acumulación constitutiva de P62 en hepatocitos promueve la hepatomegalia,

Capítulo 1. Introducción

el daño hepático y la tumorigénesis [240]. Estos estudios sugieren que NRF2 podría presentar papeles opuestos en CEH y en hepatocitos y remarcan el estricto equilibrio que requiere la regulación de NRF2 en hígado.

1.5.4.3 Papel de NRF2 en fibroblastos de piel

Nrf2 también ha sido establecido como crucial para la respuesta reparativa en piel. Curiosamente, al igual que en hígado, el papel de Nrf2 durante la respuesta reparativa cutánea también ha sido vinculado con la señalización de insulina/IGF-1. Así pues, múltiples estudios demuestran que la inducción impedida de Nrf2 en el borde de la herida es uno de los principales eventos desencadenantes del defecto en la respuesta reparativa cutánea durante la diabetes [241][242]. Tanto es así que el silenciamiento tópico de Keap1 (inhibidor de Nrf2) mejora la regeneración y acelera el cierre de herida en ratones diabéticos [241][243]. El mecanismo mediante el que Nrf2 promueve la reparación cutánea ya ha sido descrito y está dirigido por los fibroblastos [244]. La sobreexpresión de Nrf2 en fibroblastos induce la transcripción de diversos integrantes de la ECM entre los cuales SERPINE1 (también conocida como PAI-1) desarrolla un papel principal. SERPINE1 ya ha sido descrita anteriormente como necesaria y suficiente para inducir senescencia en fibroblastos [245]. El depósito de SERPINE1 en la ECM es recibido por los fibroblastos como una señal de reprogramación celular y activa un fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP) que promueve la secreción de FGF7 y la reepitelización de herida, pero también la tumorigénesis [244] (**Figura 10**).

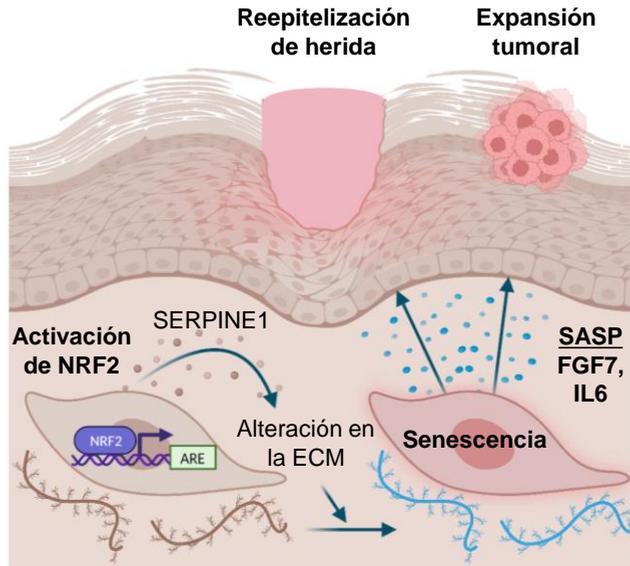


Figura 10. La reprogramación celular mediada por NRF2 en fibroblastos induce la reepitelización de herida y la tumorigénesis.

La activación de NRF2 en fibroblastos altera la composición de la ECM promoviendo entre otros, el depósito de SERPINE1. El aumento de SERPINE1 en la ECM es recibido como una señal de senescencia y activa el fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP) promoviendo la secreción de factores como FGF7 o IL6 que favorecen la epitelización, pero también la tumorigénesis. Autoría propia: "Created with BioRender.com".

Dado que el defecto en la epitelización de herida en ratones diabéticos *db/db* ha sido previamente atribuido a un déficit en la expresión de Fgf7 [246], estos datos sugieren la prometedora hipótesis de que el efecto positivo generado por la activación de NRF2 en la reparación de herida cutánea durante la diabetes podría estar mediado por la inducción de SERPINE1 y FGF7 en fibroblastos. Aunque todavía no se ha evaluado cómo la diabetes resulta en un defecto en Fgf7 ni tampoco el posible papel del eje Nrf2-Serpine1 en el proceso, numerosos estudios asocian el defecto crónico en la reparación de herida cutánea durante la diabetes con una desregulación tanto de la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos como con una inadecuada producción/composición de la ECM [247].

Capítulo 1. Introducción

1.6 Señalización local de insulina/IGF-1-IRS2 durante la respuesta reparativa

Varios estudios recientes sugieren un posible papel de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 en la regulación del nicho de las CPH. Por un lado, el modelo de dieta grasa en ratón que genera resistencia a la insulina y EHGNA [248], provoca un aumento en los niveles de los marcadores de CEH activadas α -sma y Col1a1 [249], un fenotipo que también ha sido detectado en biopsias de humanos con DMT2 [250]. Por otro lado, la infusión continua de insulina en hámsteres durante la inducción de EHGNA diabética (ingesta de la dieta EHNA acompañada de inyecciones de estreptozotocina) mejora significativamente la progresión de la EHGNA, entre otros, a través de la represión en la activación de las CEH [251]. Además, la infusión selectiva de insulina en la zona portal previene la atrofia e induce la proliferación de hepatocitos [252], aumenta la regeneración hepática en donantes de hígado [253] [254] y mejora el ratio de supervivencia durante la hepatitis fulminante [255].

En la misma línea, cambios en los niveles de expresión de *IRS2* han sido asociados con la progresión de enfermedades hepáticas crónicas como la EHGNA [90], la hepatitis [103] o el HCC [256], patologías hepáticas graves en las que se ha observado expansión de CPH y de su nicho [107][257]. En el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} la resistencia a la insulina no origina de manera espontánea daño hepático crónico o EHGNA. Sin embargo, ya ha sido demostrado que el modelo de ratón con delección del homólogo de fosfatasa y tensina (Pten), un regulador negativo de la señalización de Akt, desarrolla progresivamente EHGNA, EHNA y HCC [258] [259] como resultado de un bucle de inducción positiva mediado por la acción conjunta de *Irs2* con la ruta de señalización Hippo-Yap, extensamente conocida como moduladora de la respuesta de las CPH [260][261].

Curiosamente, en los últimos años se ha descubierto que la insulina no solo actúa de manera sistémica, sino que funciona también a nivel local para coordinar el metabolismo y el crecimiento de tejidos. En concreto, la señalización local de insulina desarrolla un papel crucial en la regulación de la respuesta de las células madre/progenitoras frente al daño [262] (**Figura 11**). Este mecanismo fue descubierto en el tejido nervioso de *Drosophila melanogaster* en el que se observó

que las células madre neuronales se activaban únicamente en respuesta a las señales locales de insulina/IGF-1 generadas por las células gliales vecinas del nicho en respuesta a las señales sistémicas derivadas de la ingesta, de manera que la expresión forzosa de insulina/IGF-1 en glia o la activación de PI3K/Akt en neuroblastos, dirigía el crecimiento y la proliferación de los neuroblastos incluso en ayunas [263]. Este sistema, mediante el que el nicho de las células madre actúa como amortiguador, aislando a las células madre de las señales sistémicas y restringiendo su respuesta a las señales locales, se ha visto conservado en mamíferos. La secreción local de IGF-1 mantiene la pluripotencia de las células madre neonatales de espermatogonia [264]. Asimismo, en ratón, el daño provocado por una isquemia resulta en un aumento en la producción de IGF-1 por parte de los astrocitos cercanos a la zona dañada, promoviendo la proliferación de las células neurales vecinas [265] y la infusión directa de IGF-1 en regiones específicas induce neurogénesis observándose paralelismo con el mecanismo detectado en *Drosophila melanogaster* [266]. Sin embargo, por el momento, se desconoce el posible impacto de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 sobre el nicho de CPH durante la regeneración hepática.

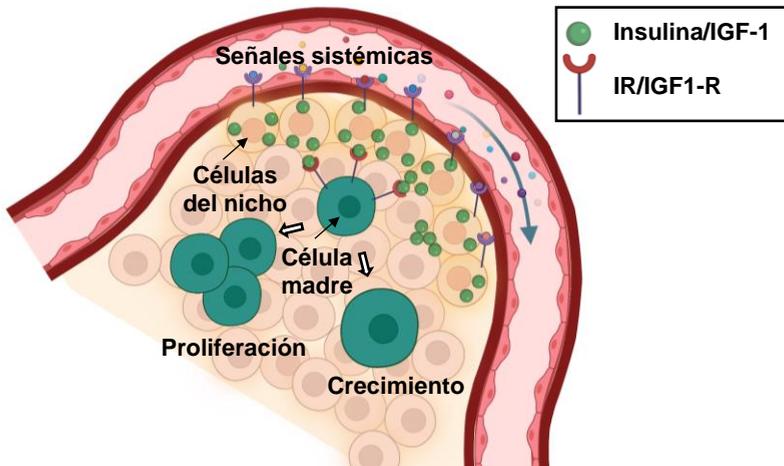


Figura 11. Efecto local de la insulina en el nicho de células madre/progenitoras.

Diferentes señales sistémicas estimulan a las células del nicho para secretar insulina/IGF-1. La insulina/IGF-1 se unen a sus respectivos receptores (IR/IGFR1) expresados por las células madre/progenitoras e inducen cambios en su comportamiento, promoviendo su crecimiento y la proliferación. Autoría propia: "Created with BioRender.com".

Capítulo 2.

Hipótesis y objetivos

Resultados previos del laboratorio demuestran que el modelo murino *Irs2*^{-/-}, resistente a la insulina [267], presenta durante el daño hepático crónico generado con el modelo de dieta DDC 0.1% (1) una regeneración hepática defectuosa [268] (**Figura 12A**), y (2) que una inducción impedida de *Fgf7* y de su receptor *Fgfr2b* (**Figura 12B**) [268]. Estos datos establecen un vínculo entre la señalización endocrina de insulina y la señalización paracrina de *Fgf7* cuyo defecto podría desencadenar en una reepitelización impedida/tardía en hígado, al igual que la que genera la resistencia a insulina en otros tejidos como la piel (**Figura 12A**).

El objetivo del presente trabajo es determinar los mecanismos biológicos y moleculares mediante los que la señalización endocrina de insulina/IGF-1-IRS2 modula la epitelización mediada por FGF7 en el nicho de CPH por su potencial como desencadenante del impacto de la resistencia a insulina en el desarrollo de enfermedades hepáticas.

Para estudiar el papel de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 en la epitelización mediada por FGF7 en el nicho de CPH se ha empleado el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático crónico con la dieta DDC 0.1% y diversos modelos celulares *in vitro* de CPH (HepaRG) y de CEH (CEH primarias (CEHp) y la línea celular LX-2) mediante los que se evaluarán las siguientes hipótesis (**Figura 12C**):

Hipótesis 1. La señalización de insulina/IGF-1-IRS2 actúa en las CPH para promover la respuesta a FGF7 a través de FGFR2b y, por tanto, su efecto en la epitelización desde CPH hasta hepatocitos.

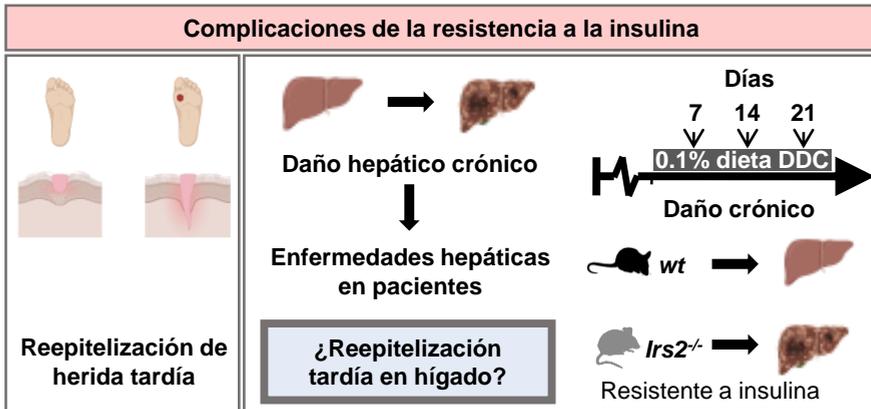
- Estudiar el efecto de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 en la respuesta de las CO/CPH a FGF7 *in vivo* e *in vitro*.

Capítulo 2. Hipótesis y resultados

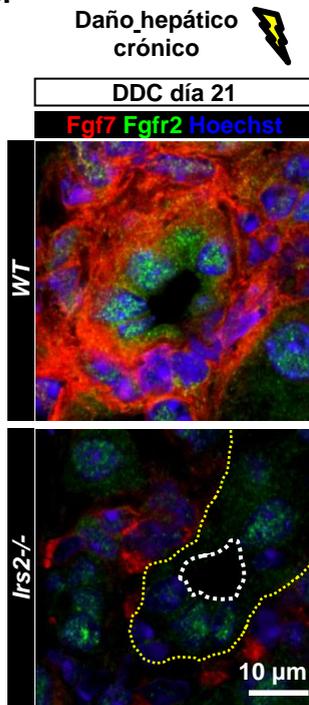
Hipótesis 2. La señalización de insulina/IGF-1-IRS2 actúa en el nicho para inducir FGF7.

- Determinar la función biológica de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 en la regulación de Fgf7 *in vivo*.
- Generar un modelo para estudiar la comunicación paracrina a través de FGF7 en el nicho de CPH *in vitro*.
- Evaluar el mecanismo biológico y molecular mediante el que la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 actúa en el nicho para inducir FGF7, empleando, entre otros, el modelo generado.

A.



B.



C.

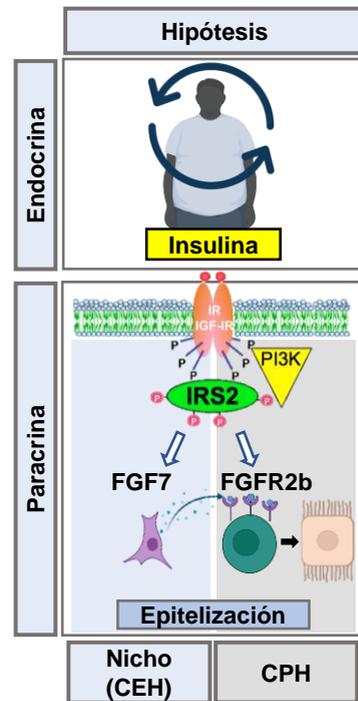


Figura 12. La señalización endocrina de insulina/IGF-1-IRS2 regula la comunicación paracrina entre FGF7 (CEH) y FGFR2b (CPH) durante el daño hepático crónico.

(A) Modelo resumen de los defectos en la reepitelización derivados de la resistencia a la insulina. (B) Imágenes de inmunofluorescencia confocal en hígado de ratones WT (fenotipo salvaje) e *Irs2*^{-/-} (ratón deficiente del gen *Irs2*) tratados durante 21 días con la dieta DDC representativas de la inducción en Fgf7 y Fgfr2 alrededor de ductos (línea blanca punteada) donde se dispone el nicho de CPH (línea amarilla punteada). (C) Modelo resumen de la hipótesis a testar (n=4). (A) y (C) Autoría propia: "Created with BioRender.com".

Capítulo 3.

Materiales y métodos

3.1 Experimentación animal

3.1.1 Modelos

Los animales utilizados durante este proyecto son el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} que fue generado en la cepa C57BL/6 y presenta una delección en todo el organismo del gen que codifica para la proteína *Irs2* y los ratones de fenotipo salvaje (*Wild-Type* (WT)) empleados como controles. El modelo de ratón *Irs2*^{-/-} ha sido mantenido y caracterizado genotípicamente por Aránzazu Leal y Carlos Acosta mediante PCR siguiendo las indicaciones descritas en la bibliografía [44].

Los ratones *Wild-Type* (WT) e *Irs2*^{-/-} de la cepa C57BL/6, fueron estabulados en el animalario del CIPF reconocido como Centro de Cría, Usuario y Suministrador de animales de experimentación (número de registro; ES 46 250 0001 002) bajo la normativa española vigente (RD 53/2013). Se mantuvieron en instalaciones libres de patógenos (SPF) y separados en áreas de trabajo específicas para ratones inmunocompetentes (colonia WT e *Irs2*^{-/-}) y en condiciones controladas gracias al uso de microaisladores y *racks* ventilados, bajo ciclos de luz de 12 horas y a una temperatura de 23°C con acceso libre a comida y agua.

La experimentación animal fue realizada por personal acreditado siguiendo procedimientos previamente aprobados por el “Comité Ético de Experimentación Animal” (CEEA) del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y el Ministerio de agricultura, pesca, alimentación y agua de la Generalitat Valenciana.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1.2 Inducción de daño hepático crónico

Las hembras WT e *Irs2*^{-/-} C57BL/6 de 10 a 12 semanas (con niveles iniciales de glucosa en sangre en ayunas <100 mg/dL por un estado de hiperinsulinemia) recibieron la dieta *LabDiet*® (5015) modificada para contener 0.1% de 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina (DDC) (*TestDiet*®) durante 7 o 21 días. La exposición continuada al DDC promueve la acumulación de porfirina. La porfirina precipita al ser eliminada de los hepatocitos a través de los canalículos biliares formando cristales o tapones de porfirina que obstruyen su lumen impidiendo el drenaje de la bilis (colestasis) y provocando daño en los hepatocitos. Por inducir daño en los ductos biliares y en los hepatocitos, la respuesta reparativa en ratón tras la exposición a la dieta DDC 0.1% se manifiesta como una pronunciada reacción ductular en la zona periportal con elevada fibrosis periductal [269]. Esto convierte a la dieta DDC, a diferencia de otros modelos de daño hepático crónico que inducen específicamente fibrosis, en un modelo idóneo para el estudio de la interacción entre los diferentes elementos de la reacción ductular, una de las huellas patológicas característica de las enfermedades hepáticas en humanos [270].

3.1.3 Estimulación con Fgf7 recombinante de ratón (Fgf7rr)

La estimulación con Fgf7rr se llevó a cabo tras 21 días de dieta DDC mediante inyección intraperitoneal de 0.3 mg/kg de Fgf7rr (*Taper BioLegend*®, 752206) o del vehículo, tampón fosfato salino (PBS), en los 30 minutos previos al sacrificio. Los sacrificios se llevaron a cabo por dislocación cervical.

3.1.4 Recolección de muestras biológicas

Tras el sacrificio de los ratones se extrajo el lóbulo izquierdo del hígado. Para análisis proteico o de expresión génica, que fue dividido en pequeñas porciones de tejido y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Para el análisis de inmunofluorescencia (tras 7 días de DDC) el lóbulo izquierdo se incluyó completo en fresco en el compuesto de temperatura óptima de corte (OCT) (*Tissue-Teak*®, 4583) para ser congelado inmediatamente en hielo seco y almacenado a -80°C hasta su uso.

3.2 Cultivos celulares

El cultivo celular se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Los cultivos se mantuvieron en incubador (*Thermo Fisher Scientific*®) en condiciones controladas de temperatura (37°C), humedad (95%) y CO₂ (5%). La descongelación celular se realizó mediante incubación en un baño a 37°C. El medio fue reemplazado con una frecuencia de 3 veces por semana. El resto de las condiciones se establecieron siguiendo las especificaciones de cada uno de los cultivos empleados (**Figura 13**):

La línea celular **HepaRG** (cedida amablemente por la Dra. Anne Corlu y la Dra. Cristiane Guillouzo, Universidad de *Rennes*) es una línea celular humana de hepatoma derivada de un colangiocarcinoma. A baja densidad presentan un fenotipo desdiferenciado (positivo para marcadores de células progenitoras hepáticas) y proliferativo que a medida que aumenta la confluencia se transdiferencia de manera bipotente a ambos linajes, hepatocítico y biliar, formando colonias de hepatocitos (“islas de hepatocitos”) que presentan características únicas por expresar marcadores de hepatocitos maduros comparables con los detectados en cultivos primarios de hepatocitos. Se considera por tanto una línea de CPH bipotente y ha sido empleada extensamente como modelo de diferenciación [271]. La diferenciación completa de la línea HepaRG ocurre durante 30 días, observándose islas de hepatocitos a partir del día 9. Los experimentos de diferenciación temprana se recogieron entre día 9 y 15 y los de diferenciación tardía a día 25 de la diferenciación de la línea celular HepaRG.

La línea celular HepaRG se cultivó en medio Williams E Medium (*Fisher Scientific*®, 11580606) suplementado con 10% de suero Fetal Clone III (*Cytiva*®, SH30109.03), 50 µM de hidrocortisona hemisuccinato (*Sigma-Aldrich*®, H2270), 0,88 µM de insulina (*Roche*®, 11376497001), 2 mM de L-glutamina (*ThermoFisher Scientific*®, 25030024) y 1% penicilina-estreptomicina (*ThermoFisher Scientific*®, 10000 U/mL, 15140122) que será denominado a partir de ahora como “medio HepaRG”. El medio de cultivo se renovó cada 48h. En experimentos donde se requerían condiciones sin insulina, se cambió el medio de los cultivos 24 horas después de su siembra a un medio idéntico, pero sin insulina que será denominado como “medio HepaRG sin insulina”. El pase se realizó con una ratio de dilución 1:5 tras 15 días de cultivo/diferenciación celular. Para ello se empleó tripsina-EDTA 0.05% (*Gibco*®,

Capítulo 3. Materiales y métodos

25300054) durante 3 minutos. Siguiendo las especificaciones de diferenciación, a partir del día 15 de siembra se suplementó el medio de cultivo con un 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich-Merck*®, D4540). Para el proceso de descongelación se utilizó una centrifugación de 5 minutos a 1000 revoluciones por minuto (rpm). La línea HepaRG se congeló a una densidad 1:5 con medio HepaRG frío suplementado con 10% de DMSO (*Sigma-Aldrich-Merck*®, D4540).

La línea celular **LX-2** (cedida amablemente por el Dr. Scott Friedman, *Icahn School of Medicine en Mount Sinai*), es una línea de células estrelladas hepáticas (CEH) humanas aisladas de un hígado sano que se inmortalizaron de manera espontánea al cultivarlas en plástico y en medio con baja concentración de suero [272]. La línea LX-2 mantiene la expresión de marcadores característicos de células estrelladas primarias como GFAP y Vimentina y expresan también el marcador de CEH activadas α -sma [273]. La línea celular LX-2 fue mantenida en medio DMEM con alta concentración de glucosa y piruvato (*Gibco*® 41966029), suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS) (*Sigma-Aldrich*®, F7524) inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina (*ThermoFisher Scientific*®, 25030024) y 1% penicilina-estreptomina (*ThermoFisher Scientific*®, 10000 U/mL, 15140122). Para el proceso de descongelación se utilizó una centrifugación de 3 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron las células en medio LX-2 suplementado hasta un 10% de FBS (inactivado por calor). Tras 24h se cambió el medio a medio LX-2 (2% FBS) que será denominado en este trabajo como “medio LX-2”. A partir de este momento el medio de cultivo se renovó cada 48h. El pase se realizó con una ratio de dilución 1:3 antes de que el cultivo llegara a confluencia. Para ello se empleó tripsina-EDTA 0.25% (*Gibco*®, 25200056) y se centrifugó la resuspensión celular resultante durante 3 minutos a 1000 rpm. Las células utilizadas para tinciones se sembraron sobre cubreobjetos de cristal pretratados con gelatina (*Merck*®, G9391) disuelta al 0,1% en agua. La línea LX-2 se congeló con medio LX-2 suplementado hasta un 20% de FBS (inactivado por calor) y 10% DMSO.

La línea de células estrelladas hepáticas primarias, denominada **CEHp** en este trabajo, fue adquirida de *Innoprot*®, Derio, España. Se trata de una línea de CEHp aisladas de hígado sano. Las condiciones de cultivo de la línea CEHp fueron idénticas a las utilizadas con la línea LX-2, a diferencia de que el paso de

Capítulo 3. Materiales y métodos

centrifugación tras la descongelación fue omitido y de que la concentración de tripsina-EDTA fue del 0.05%. El medio de cultivo se renovó cada 48h. La siembra de estas células para su mantenimiento se realizó sobre placas pretratadas durante 10 minutos con polilisina (PLL) (*Sigma-Aldrich*®, P6282) a una concentración final de 12 µg/mL. Las células utilizadas para experimentación y no para mantenimiento, se sembraron sobre placas pretratadas con gelatina disuelta al 0,1% en agua.

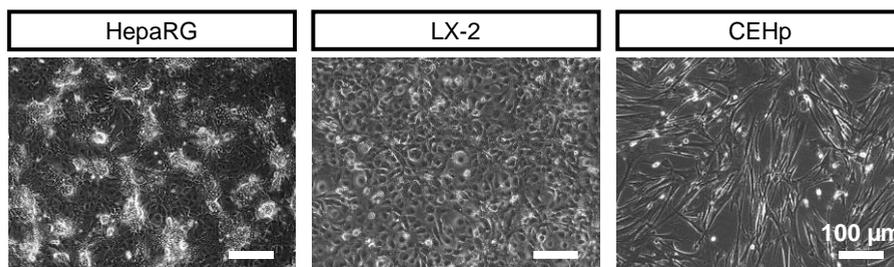


Figura 13. Líneas celulares empleadas.

HepaRG (línea de CPH); LX-2 línea de CEH; CEHp (denominación empleada en este trabajo para designar al cultivo de células estrelladas primarias humanas).

3.2.1 Tratamiento con FGF7 recombinante humano (rh) a largo plazo

El FGF7rh (*Cell Guidance System*®, GFH187) se agregó a 50 ng/mL en el medio de cultivo de la línea HepaRG a día 4 tras la siembra renovándose cada 48h por FGF7 fresco junto con el cambio de medio hasta día 15 de cultivo (11 días de tratamiento) en el que se recogieron las muestras para ser analizadas.

3.2.2 Tratamiento con FGF7rh a corto plazo

El FGF7rh (*Cell Guidance System*®, GFH187) se agregó a 50 ng/mL en el medio de cultivo de la línea HepaRG a día 12 tras la siembra recogiéndose las muestras para ser analizadas a tiempo 0,3,6,12,24,48 y 72h, es decir hasta día 15 tras la siembra. A día 14 se agregó FGF7 fresco junto con el cambio de medio en aquellas condiciones remanentes.

3.2.3 Inactivación de células estrelladas con mitomicina C

Una vez crecidas hasta el 75% de confluencia se trató a las células estrelladas (LX-2 y CEHp) durante 3 horas con MitoC (*Roche*®, M4287) diluida a una concentración

Capítulo 3. Materiales y métodos

final de 1 mg/mL en medio *advanced DMEM/F-12* (Gibco®, 12634028). Tras el tratamiento, se realizaron 5 lavados con PBS para eliminar cualquier resto del compuesto citotóxico, siguiendo las especificaciones de tratamiento de tales residuos y se tripsinizaron para sembrar experimentos en placas tratadas con gelatina.

3.2.4 Tratamiento de la línea HepaRG con medio condicionado de CEHp inactivadas

Tras inactivar y tripsinizar las CEHp, se sembraron 2×10^6 células en una placa de cultivo de 60 mm y se desechó el medio de las primeras 24h. El medio posterior se mantuvo durante 24h en el cultivo antes de ser recogido como medio condicionado que fue agregado directamente al cultivo de HepaRG a día 13 de diferenciación junto con el inhibidor competitivo de FGF7, la proteína recombinante humana quimera Fc de FGFR2b (FGFR2b Fc rh) (R&D systems®, 665-FR). El cultivo de HepaRG se mantuvo en medio condicionado \pm FGFR2b Fc rh hasta el día 15 en el que se recogieron las muestras para analizar.

3.2.5 Cocultivo de CEHp con HepaRG a corto plazo

Se sembraron 25,000 CEHp/CEHp inactivadas y resuspendidas en medio HepaRG sobre cada pocillo de placa de 24 pocillos con células HepaRG a día 13 de la diferenciación. El inhibidor competitivo de FGF7, la proteína recombinante humana quimera Fc de FGFR2b (FGFR2b Fc rh) (R&D systems®, 665-FR) se agregó a una concentración de 100 ng/mL en el medio HepaRG durante la siembra de las CEHp/CEHp inactivadas. Tras 48h de cocultivo, es decir, a día 15 de la diferenciación del cultivo de HepaRG, se recogieron las muestras para analizar.

3.2.6 Cocultivo de CEHp/células LX-2 con HepaRG a largo plazo

Se sembraron 12500 CEHp/CEHp inactivadas/células LX-2 sh-*luc* (control) / sh-*IRS2* (silenciamiento de *IRS2*) y resuspendidas en medio HepaRG sobre cada pocillo de placa de 24 pocillos pretratado con gelatina disuelta al 0,1% en agua. Tras 24h se sembró el cultivo de HepaRG (pase 1:5) sobre las CEHp/CEHp inactivadas/células LX-2. El medio HepaRG se renovó cada 48h. En el caso de las CEHp/CEHp inactivadas se agregó a partir del día 4 el inhibidor competitivo de

FGF7, la proteína recombinante humana quimera Fc de FGFR2b (FGFR2b Fc rh) (R&D systems®, 665-FR) a 50 ng/mL en los pocillos correspondientes, renovándose cada 48h junto con el medio hasta el día 14 de diferenciación de las células HepaRG en el que se recogieron las muestras para analizar o se fijaron con paraformaldehído (PFA) (ThermoFisher Scientific®, 28908) al 4% disuelto en PBS. En el caso de la línea LX-2 2 sh-*luc* (control) / sh-*IRS2* (silenciamiento de *IRS2*) se recogieron las muestras a día 2, 6, 10 y 14 de la diferenciación de las células HepaRG.

3.2.7 Infección lentiviral de líneas celulares

Se generaron diferentes líneas celulares estables mediante infección con vectores lentivirales (**Tabla 2**). Las infecciones lentivirales para modular o marcar la expresión de *IRS2* y de *APO2* en HepaRG fueron infectadas por el Dr. Luke Noon. La línea reportera para silenciar *IRS2* en LX-2 fue infectada por Aránzazu Leal. Las líneas de silenciamiento inducible de *P62* en HepaRG y LX-2 fueron generadas en este trabajo.

Tabla 2. Partículas lentivirales empleadas para generar líneas celulares estables.

Abreviación	Denominación	Casa comercial	MOI
sh- <i>luciferasa</i>	SMARTvector 2.0 Luciferase control	<i>Dharmacon</i>	1
sh- <i>scramble</i>	SMARTvector 2.0 non-targeting control	<i>Dharmacon</i>	1
sh- <i>IRS2</i>	SMARTvector 2.0 SH-003554-03-10	<i>Dharmacon</i>	1
GFP control	rLV-EF1-GFP	<i>Vectalys</i>	6
Lenti- <i>Irs2</i>	rLV-EF1-mIrs2	<i>Vectalys</i>	6
<i>pIRS2-GFP</i>	rLV-pIRS2-GFP	<i>Vectalys</i>	6
<i>pAPO2-GFP</i>	rLV-pAPOA2-GFP	<i>Vectalys</i>	6
Lenti-sh- <i>inducible- P62- GFP</i>	SMARTvector Human Inducible shRNA hEF1-TurboGFP	<i>Dharmacon</i> (V3IHSHEG_9771502)	0.5 HepaRG
			1.5 LX-2

MOI=factor de multiplicidad

Las células para infectar (utilizadas con el menor número de pases posibles) se sembraron en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas y habiendo alcanzado una confluencia de en torno al 60-70%, se tripsinizó uno de los pocillos para realizar un conteo celular. Sabiendo los valores de número de células, el factor de multiplicidad

Capítulo 3. Materiales y métodos

de infección (MOI) escogido y la titulación vírica (aportada por el proveedor), se calculó el volumen de virus a añadir en cada caso a partir de la siguiente fórmula:

$$MOI = \frac{n^{\circ} \text{ de virus}}{n^{\circ} \text{ de células}}$$

Seguidamente, se procedió a cambiar el medio de cultivo por medio fresco que contenía la suspensión vírica y polibreno a una concentración final de 1µg/mL (*Sigma-Aldrich*®, TR-1003). Las infecciones lentivirales para modular o marcar la expresión de *IRS2* en HepaRG y LX-2 se realizaron durante 24 horas en medio completo. Las líneas de silenciamiento inducible de *P62* en HepaRG y LX-2 se infectaron durante 4-6h empleando el medio correspondiente de la línea sin suplementar con suero. Tras el tiempo de infección se aspiró el medio que contenía los virus, se realizaron varios lavados con PBS y se añadió medio de mantenimiento fresco. Las líneas celulares infectadas con vectores lentivirales para silenciar la expresión de *IRS2* o *P62*, fueron tratadas con puromicina (1.5 µg/mL) (*Sigma-Aldrich*®, P8833). Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, siguiendo medidas de seguridad biológica y utilizando una cabina de seguridad biológica clase II.

Líneas de silenciamiento de *IRS2*: se utilizó un vector lentiviral que contenía un *short hairping RNA* (shRNA) complementario al transcrito humano de *IRS2* (sh-*IRS2*), capaz así de formar una doble hebra con este e inducir su degradación. Como control de infección, se utilizó, o bien un vector que contenía un shRNA complementario al gen de la luciferasa (sh-*luc*) no expresado por ninguna de las líneas infectadas, o bien vector shRNA-scramble (sh-*scram*), sin complementariedad. Estos vectores lentivirales contenían además un casete de resistencia a puromicina y la secuencia del gen reportero GFP, permitiendo seleccionar químicamente y distinguir visualmente las células infectadas, lo que posibilitó el realizar una infección con MOI bajo.

Líneas de sobreexpresión de *IRS2*: se infectó con el vector lentiviral que contenía la secuencia de ratón del gen que codifica para *Irs2* (EF1-m*Irs2*). Como control se infectó en paralelo con un vector lentiviral que contiene la secuencia del gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP). Estos vectores no contenían

ningún casete de selección, por lo que se utilizó un factor MOI alto para asegurar la superación del proceso en un amplio número de células.

Líneas reporteras de *IRS2* o de *APOA2*: se utilizó un vector lentiviral que contenía la secuencia del gen reportero de la proteína GFP controlada bajo el promotor humano o bien de *IRS2* (*pIRS2-GFP*) o bien de la apolipoproteína A-II (*APOA2*) (*pAPOA2-GFP*). Estas líneas permiten visualizar por medio de la expresión de GFP variaciones en la expresión de *IRS2* o de *APO2* respectivamente. La intensidad de GFP es dependiente del número de insertos víricos integrados en el genoma de cada célula, por lo que para poder visualizar cambios en la expresión de *IRS2* y no cambios de insertos víricos, se crearon líneas clonales a partir de una sola célula. Al no poseer casete de selección se utilizó un MOI alto.

Líneas de silenciamiento inducible de *P62*: se empleó un vector con un sistema de expresión bipartito modulado por el promotor TRE3G y el transactivador *Tet-On* 3G. En presencia de doxiciclina el promotor TRE3G se une a *Tet-On* 3G (expresado de manera constitutiva) para ser activado y promover (1) la expresión de un transcrito que contiene un “short hairpin RNA” (shRNA) complementario al transcrito humano de *P62* capaz de formar una doble hebra con este e inducir su degradación y (2) la expresión del transcrito del gen reportero GFP para evidenciar la inducción. Este vector *Lenti-sh-inducible- P62-GFP-P62* contiene también un casete de expresión constitutiva que otorga resistencia a puromicina y permite seleccionar las células infectadas, lo que posibilitó el realizar una infección con MOI bajo. Como control se empleó la misma línea celular sin tratar con doxiciclina.

3.2.8 Tratamiento con doxiciclina para silenciar *P62*

El tratamiento con doxiciclina (*Acros Organics*®, 446060050) disuelta en agua se llevó a cabo durante 48h a una concentración de 250 ng/ml en la línea HepaRG *sh-Inducible-P62-GFP* y de 500 ng/ml en la línea LX-2 *sh-Inducible-P62-GFP*.

3.2.9 Tratamiento con 3-MA para inducir reversión fibrogénica en la línea LX-2

El tratamiento con 3-MA se llevó a cabo en la línea LX-2 durante 24h a una concentración de 5, 10 y 15 mM. El 3-MA se preparó fresco cada día de tratamiento.

Capítulo 3. Materiales y métodos

Para ello se pesó en una balanza de precisión (ACCULAB®, ALC-110.4) y se diluyó en el medio cultivo de la línea celular a tratar durante 1h a 37°C y en agitación. Una vez diluido se pasó por un filtro de jeringa de 0.2 µM de poro (Corning-Cultek®, 15431229) y se realizaron diluciones seriadas a 5, 10 y 15 mM en medio de cultivo correspondiente.

3.2.10 Transformación bacteriana

Los plásmidos se amplificaron mediante transformación bacteriana realizando una inoculación de 0.5 µg de plásmido por choque de calor en 100 µL de la cepa de bacterias competentes DH5α (ThermoFisher Scientific®, 18265017) suplementados con 2% β-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®, M6250). Se llevó a cabo un primer paso de amplificación bacteriana en suspensión en medio Luria-Bertani (LB) (1% de triptona (Millipore®, T9410), 0.5% de extracto de levadura (Sigma-Aldrich®, Y1625) y 1% cloruro de sodio (PanReac AppliChem®, 131659) con el antibiótico de resistencia correspondiente (50 µg/mL) (Tabla 3) lo que permitió crecer únicamente aquellas bacterias que hubiesen incorporado el plásmido.

Tabla 3. Características de los plásmidos empleados para transfección plasmídica.

Abrev.	Nombre	Función	Res.	Cedido por
ARE- <i>luc2P</i>	pGL4.37[luc2P /ARE/Hygro]	Reportero luciferasa de la actividad de ARE.	Amp	-
<i>Renilla</i>	pRL-TK Vector	Expresión constitutiva de Renilla. Permite normalizar la medición de luciferasa a la eficiencia de transfección.	Amp	Lab. Dra. Espinós
pcDNA3	pcDNA3	Vector vacío control de pcDNA3- <i>Irs2</i> .	Amp	Lab. Dra. Farràs
pcDNA3- <i>Irs2</i>	Inserto introducido en pcDNA3.1 (-)	Expresión constitutiva de <i>Irs2</i> de ratón (eficaz en líneas humanas*).	Amp	Generación propia
<i>DsRed</i>	pDsRed-Monomer-N1	Expresión constitutiva de <i>DsRed</i> .	Kana	Lab. Dra. Orzáez
pcDNA- <i>EGFP</i>	pcDNA3-luc2AEGFP	Expresión constitutiva de <i>EGFP</i> .	Amp	Lab. Dr. Weonsang

Abrev = Abreviación; Res= Resistencia. Amp=ampicilina; Kana=kanamicina. *La transfección del plásmido pcDNA3-*Irs2* en líneas celulares humanas aumentó su sensibilidad a insulina e IGF-1 demostrando su eficacia.

Capítulo 3. Materiales y métodos

La suspensión bacteriana se sembró en estría sobre el medio LB descrito suplementado con 1.5 % de agar (BD®, 214220) con antibiótico para seleccionar una única colonia bacteriana que se amplificó de nuevo en una suspensión de medio LB con antibiótico. Tras este último paso de crecimiento se procedió a la extracción y purificación del plásmido que se llevó a cabo empleando un kit comercial para la extracción de plásmidos de tamaño mediano *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen®, 12143). La identidad del plásmido se confirmó linealizando y extrayendo el inserto del plásmido mediante restricción enzimática (en base a las especificaciones correspondientes de cada plásmido). La separación por tamaño de los diferentes fragmentos plásmidos originados por la restricción enzimática se realizó mediante gel de agarosa (*Sigma-Aldrich*®, A9539) a una concentración del 1 al 2% en función de tamaño de los fragmentos.

3.2.11 Transfección celular

3.2.11.1 Transfección plasmídica

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del reactivo de transfección plasmídica empleado, el *TransIT®-LT1* (Mirus®, MIR 2300), preparándose la mezcla de transfección tal y como se describe en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Mezcla para transfectar un pocillo de placa de 24 y un flask T75.

Reactivos	Pocillo p 24 (1.9 cm ²)	Flask T75 (75 cm ²)
Medio sin suero (<i>Opti-MEM</i>) (<i>Gibco-Thermo Fisher Scientific</i> ®, 31985062)	50 µL	1.9 mL
Mezcla de ADN plasmídico (0,5 ug/µL)	1 µL	38 µL
TransIT-L1 Reagent	1.5 µL	57 µL
Medio de cultivo	450 µL	19.7 mL

La concentración final de ADN plasmídico en el cultivo fue de 1 ng/µL. La mezcla de transfección se preparó de manera conjunta para las diferentes réplicas experimentales, se homogenizó con suavidad y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se renovó el medio de cultivo por medio fresco y se pipeteó gota a gota la mezcla de transfección correspondiente asegurando una buena distribución. Siguiendo las especificaciones del *TransIT®-LT1* (reactivo de transfección con baja toxicidad celular) la mezcla para transfectar

Capítulo 3. Materiales y métodos

se mantuvo en el medio de cultivo durante 24h, tras este tiempo se realizó un lavado con PBS y se recogieron las muestras para analizar. Cuando la transfección se realizó en paralelo al silenciamiento de *P62* (HepaRG/LX-2 sh-*Inducible P62-GFP*), la doxiciclina se agregó en medio fresco 24h antes de la transfección y se renovó el mismo día de la transfección siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 3.2.8. Cuando la transfección se realizó en paralelo al tratamiento con 3-MA, se incorporó el 3-MA al medio fresco añadido antes de transfectar. Ambos tratamientos se mantuvieron durante las 24h de transfección hasta que se recogieron las muestras para ser analizadas.

3.2.11.1.1 Sobreexpresión a corto plazo de *Irs2*

En la línea LX-2 la transfección se llevó a cabo 48h después de la siembra de 60000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos (al llegar aproximadamente al 90% de confluencia). En los cultivos de HepaRG (Control/Lenti-*Irs2*/sh-*inducible-P62-GFP*) se llevó a cabo de día 14 a día 15 de diferenciación.

3.2.11.1.1.1 Efecto en la actividad de ARE-luciferasa

La mezcla de ADN plasmídico (concentración final 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se preparó siguiendo las proporciones descritas en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Proporciones empleadas para los diferentes vectores cotransfectados por línea celular para analizar el efecto de la sobreexpresión de *Irs2* en la actividad de ARE.

Experimento		pcDNA3	pcDNA3- <i>Irs2</i>	ARE- <i>luc2P</i>	Renilla
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA					
1	HepaRG	-	-	0.25	0.25
	HepaRG Lenti- <i>Irs2</i>	-	-	0.25	0.25
2	HepaRG	0.3	-	0.1	0.1
	HepaRG	-	0.3	0.1	0.1
3	HepaRG sh- <i>Inducible P62-GFP</i>	0.3	-	0.1	0.1
	HepaRG sh- <i>Inducible P62-GFP</i>	-	0.3	0.1	0.1
4	LX-2	0.3	-	0.1	0.1
	LX-2	-	0.3	0.1	0.1
5	LX-2 sh- <i>Inducible-P62-GFP</i>	0.3	-	0.1	0.1
	LX-2 sh- <i>Inducible-P62-GFP</i>	-	0.3	0.1	0.1

Capítulo 3. Materiales y métodos

Se agregó 1 μL de la mezcla de ADN plasmídico (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a la mezcla de transfección siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 3.2.11.1. Las muestras fueron recogidas y directamente procesadas para la medición de luciferasa/renilla según se describe en el apartado 3.2.13.

3.2.11.1.2 Efecto en el análisis de expresión

La mezcla de ADN plasmídico (concentración final 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se preparó siguiendo las proporciones descritas en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Proporciones empleadas para los diferentes vectores cotransfectados por línea celular para analizar el efecto de la sobreexpresión de *Irs2* en el análisis de expresión.

Experimento		pcDNA3	pcDNA3- <i>Irs2</i>
		$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA	
1	LX-2	0.5	-
	LX-2	-	0.5
2	HepaRG	0.5	-
	HepaRG	-	0.5

Se agregó 1 μL de la mezcla de ADN plasmídico (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a la mezcla de transfección siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 3.2.11.1. Las muestras fueron recogidas y procesadas para el análisis de expresión génica según se describe en 3.5.

3.2.11.1.3 Efecto en la morfología de la línea LX-2

La transfección se llevó a cabo 48h después de la siembra de 60000 células/pocillo en placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos de cristal pretratados con gelatina disuelta al 0,1% en agua. Se cotransfectó con el plásmido pCDNA-*EGFP* para marcar las células positivas para la transfección y emplearlas posteriormente para el análisis morfológico descrito en el apartado 3.6.2.2). Se emplearon las siguientes proporciones (**Tabla 7**) para preparar la mezcla de ADN plasmídico (concentración final 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$):

Capítulo 3. Materiales y métodos

Tabla 7. Vectores cotransfectados para analizar el efecto de la sobreexpresión de *Irs2* en la morfología de la línea LX-2.

Experimento		pCDNA-EGFP	pcDNA3	pcDNA3- <i>Irs2</i>
		µg/µL de DNA		
1	LX-2	0.1	0.4	-
	LX-2	0.1	-	0.4

Se agregó 1 µL de la mezcla de ADN plasmídico (0.5 µg/µL) a la mezcla de transfección siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 3.2.11.1. Las muestras se fijaron con PFA al 4% disuelto en PBS para analizar con el software de imagen *IN Cell Analyser 2200* siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 3.6.2.

3.2.11.1.2 Efecto en la población negativa (no epitelial) y positiva (epitelial) para la expresión de pAPO2-GFP en la línea HepaRG pAPO2-GFP

La transfección se llevó a cabo a día 25 de la diferenciación de la línea HepaRG pAPO2-GFP. Se cotransfectó con el plásmido *DsRed* para marcar las células positivas para la transfección y seleccionarlas de manera previa a la separación de las poblaciones negativas y positivas para pAPO2-GFP descrita en el apartado 3.2.11.1.2. La transfección plasmídica se realizó en flask T75 para asegurar que se recuperaban suficientes células positivas para la transfección tras la separación. Se emplearon las proporciones descritas en la **Tabla 8** para preparar la mezcla de ADN plasmídico (concentración final 0.5 µg/µL):

Tabla 8. Vectores cotransfectados para analizar el efecto de la sobreexpresión de *Irs2* en las poblaciones pAPOA2-GFP (+/-) en la línea HepaRG.

Experimento		<i>DsRed</i>	pcDNA3	pcDNA3- <i>Irs2</i>
		µg/µL de DNA		
1	HepaRG pAPOA2-GFP	0.15	0.35	-
	HepaRG pAPOA2-GFP	0.15	-	0.35

Se agregó 1 µL de la mezcla de ADN plasmídico (0.5 µg/µL) a la mezcla de transfección siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 3.2.11.1. Las muestras se procesaron para su separación por citometría de flujo según se describe en el apartado 3.2.12.1.2.

3.2.11.2 Transfección con ARN pequeño de interferencia (siARN)

Para silenciar NRF2 se realizó una transfección con la secuencia de siARN complementaria al transcrito humano de *NRF2* (si*NRF2*), capaz así de causar su degradación e impedir su traducción. El si*NRF2* empleado (**Tabla 9**) fue diseñado y caracterizado en queratinocitos por el laboratorio de Sabine Werner (ETH, Suiza).

Tabla 9. Características del siARN para silenciar NRF2.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Casa comercial
si <i>NRF2</i>	GAGAAAGAAUUGCCUGUAA [dTdT]	<i>Microsynth</i> ®

Como control se empleó el siRNA *MISSION*® *Universal Negative Control* (*Sigma-Aldrich*®, SIC001) sin complementariedad, denominado en el trabajo como *siscram*. La transfección se llevó a cabo 24h y 48h después de la siembra de 60000 células/pocillo en placa de 24 pocillos. El procedimiento de transfección se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por el laboratorio de Sabine Werner (ETH, Suiza). La mezcla de transfección empleada fue la descrita en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Mezcla para transfectar siRNA en 1 pocillo de placa de 24.

Reactivos	Pocillo p24 (1.9 cm ²)
Medio sin suero (<i>Opti-MEM</i>) (<i>Gibco-Thermo Fisher Scientific</i> ®, 31985062)	100 µL
siRNA (40 µM)	0.2 µL
<i>Interferin</i> ® (<i>Polyplus</i> ®, 101000028)	1 µL
Medio de cultivo	400 µL

La mezcla de transfección se preparó de manera conjunta para las diferentes réplicas experimentales, se homogenizó con suavidad y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se renovó el medio de cultivo por medio fresco y se pipeteó gota a gota la mezcla de transfección correspondiente asegurando una buena distribución. El procedimiento de transfección se repitió tras 24h, al renovar el medio de cultivo por medio fresco. La mezcla de la segunda transfección se mantuvo en el cultivo durante 24h más. Tras las 48h descritas de transfección se recogieron las muestras con tampón de lisis para extracción de ARN (3.5.1). En aquellos experimentos en los que se cotransfectó el siARN correspondiente con ADN plasmídico, la transfección de ADN plasmídico se llevó a

Capítulo 3. Materiales y métodos

cabo el mismo día que la segunda transfección de siARN pero mediante procedimientos independientes.

3.2.12 Citometría de flujo

Las líneas celulares fueron crecidas en condiciones de cultivo estándar y tras tripsinizarse se diluyeron a una concentración de 5×10^6 células/ml en su medio correspondiente. Se pasó la resuspensión celular por un filtro para células de 30 μm que separa los agregados celulares generando una suspensión de células únicas (*Sysmex Partec*®, 04-004-2326). Se agregó yoduro de propidio (IP) a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ para descartar las células muertas. Las suspensiones celulares se hicieron pasar a través de un canal en forma de flujo laminar, que fue excitado con un láser ECD (532 nm de excitación) para la detección del IP y con un láser FITC para la detección de GFP (488 nm de excitación). La separación de poblaciones celulares fue llevada a cabo por el servicio de citometría del CIPF, empleando el equipo *CytoFLEX S* (*Beckman Coulter*®, Indianápolis, Indiana, USA) y el programa *CytExpert* para citometría de flujo o el equipo SH800S Cell Sorter (San Jose, California, USA) y el programa *SONY SH800S Cell Sorter Software* para la separación celular activada por fluorescencia (FACS).

3.2.12.1 Separación celular por fluorescencia activada (FACS)

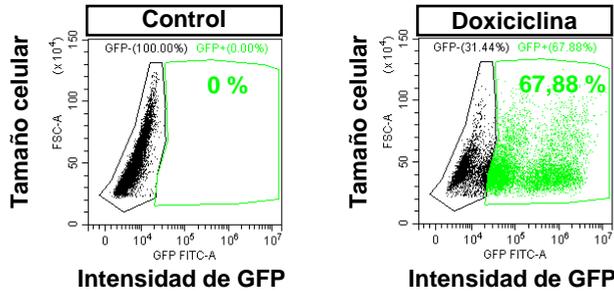
3.2.12.1.1 Enriquecimiento de líneas celulares estables

Este procedimiento se siguió para enriquecer tras la infección con vectores lentivirales las líneas HepaRG Lenti *sh-inducible-P62-GFP* y LX-2 Lenti *sh-inducible-P62-GFP*. En la línea HepaRG se llevó a cabo la separación celular el día del pase (día 15 de la diferenciación) y en LX-2 cuando el cultivo llegó al 90% de confluencia. Para establecer las condiciones de separación celular, se utilizó la línea control correspondiente, carente de GFP, con la que se estableció un umbral de detección negativa de intensidad de GFP característico de la población de células "GFP-". Aquellas células con una intensidad de detección superior se recogieron como enriquecidas en GFP y por tanto positivas para la infección. Tras el procedimiento de separación se centrifugaron las células para eliminar el tampón que emplea el separador celular y se sembraron siguiendo las condiciones normales de cultivo descritas en el apartado 3.2. La eficiencia del enriquecimiento (**Figura 14**)

se determinó posteriormente tras 48h de tratamiento con doxiciclina (3.2.8) por citometría de flujo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.12.

A.

HepaRG Lenti sh-inducible-GFP-P62



B.

LX-2 Lenti sh-inducible-GFP-P62

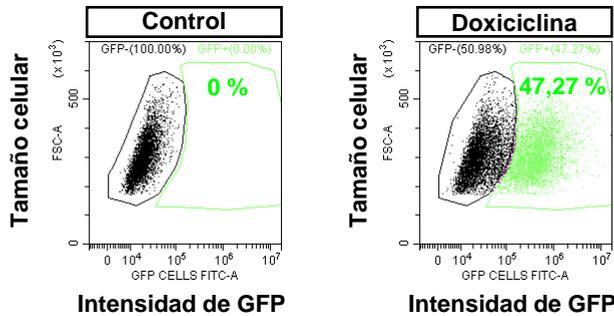


Figura 14. Eficacia del silenciamiento inducible de P62 (GFP reportero) en las líneas HepaRG y LX-2.

Análisis por citometría del porcentaje de células GFP+ (con silenciamiento de P62) en la población de células vivas (IP-) tras el tratamiento durante 48h con doxiciclina (250 ng/mL) en la línea celular HepaRG Lenti sh-inducible-GFP-P62 (A) y (500 ng/mL) en LX-2 Lenti sh-inducible-GFP-P62 (B).

3.2.12.1.2 Separación de las subpoblaciones de HepaRG pAPOA2-GFP (no epitelial) y pAPOA2-GFP+ (epitelial)

Se realizaron dos separaciones celulares consecutivas de la resuspensión celular procedente de la transfección celular descrita en 3.2.11.1.2. La primera separación se realizó para seleccionar únicamente aquellas células positivas para DsRed y por consiguiente positivas para la transfección. Para establecer las condiciones de la primera separación celular, se utilizó la línea control HepaRG (sin transfectar), con

Capítulo 3. Materiales y métodos

la que se estableció un umbral de detección negativa de intensidad de DsRed característico de la población de células HepaRG “DsRed-”. Se descartaron todas las células con intensidad de detección menor o igual al establecido en HepaRG “DsRed-”. La segunda separación celular se realizó a partir de la población de células por encima del umbral de detección de DsRed-, es decir, a partir de la población “DsRed+”. Durante la segunda separación celular se analizó el espectro de intensidad de GFP reportero de la expresión del marcador hepatocítico *APOA2* del conjunto de células DsRed+ y se establecieron 3 poblaciones: baja intensidad de GFP “GFP-”, intensidad intermedia de GFP e intensidad alta de GFP “GFP+”. Se descartó la población de intensidad intermedia (**Figura 15**). Las poblaciones “DsRed+ GFP-” y “DsRed+ GFP+” se recogieron y tras centrifugarse para eliminar el tampón que emplea en el separador celular, se resuspendieron en tampón de lisis para la extracción de ARN (3.5.1). Se mantuvieron a -80°C hasta su posterior uso para el análisis de expresión génica descrito en el apartado 3.5.

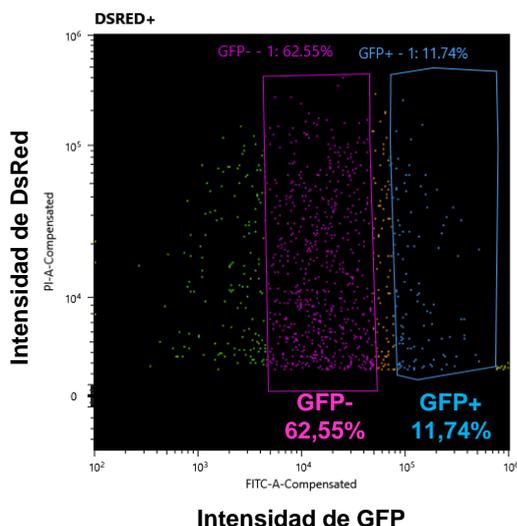


Figura 15. Gráfica representativa de la separación celular de la población HepaRG pAPOA2-GFP DsRed+ (transfectada) en las poblaciones pAPOA2-GFP- y pAPOA2-GFP+.

3.2.13 Ensayo de luciferasa-renilla

Se realizó siguiendo las especificaciones del kit de detección de luciferasa y renilla empleado, *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega®, E1910). Tras la transfección se hizo un lavado con PBS. Se incubaron las células (sembradas en placa de 24 pocillos) en 100 µL de tampón de lisis pasiva al 1X. Como pasos adicionales al protocolo, la resuspensión celular en el tampón de lisis 1X fue sonicada a baja potencia y en frío durante 10 segundos, se dejó reposar en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron en frío a 15000 rpm. La detección de la actividad de luciferasa y de renilla se realizó con el lector de microplacas VICTOR² (Multilabel HTS COUNTER 1420, Perkin Elmer®) empleando placas de 96 pocillos con fondo opaco (ThermoScientific®, 136101). Se emplearon 20 µL del sobrenadante de la centrifugación para medir la actividad de luciferasa con 100 µL del sustrato *LAR II®* incluido en el kit. Posteriormente se emplearon 100 µL del reactivo *Stop and Glo*, también incluido en el kit que, por un lado, inhibe la actividad de la luciferasa y por otro actúa de sustrato para medir la actividad de la renilla. Se detectó la luz emitida por pocillo durante 5 segundos empleando un retraso de 2 segundos entre la medición de un pocillo y del siguiente. Se midieron máximo 4 pocillos/muestras de manera consecutiva. Las unidades relativas (UR) procedentes de la medición de luciferasa se dividieron entre las UR de la medición de renilla del pocillo correspondiente para normalizar a la eficiencia de transfección.

3.2.14 Estimulación con insulina

La estimulación con insulina se llevó a cabo en la línea HepaRG control y HepaRG Lenti-*Irs2* a día 14 de diferenciación. Tras 3h de ayuno en medio Williams E Medium se agregó al medio insulina 5 nM y/o los inhibidores del lisosoma NH₄Cl (200µM) (*Sigma-Aldrich®*, A0171) y Leupeptina (100µM) (*Sigma-Aldrich®*, L2884) durante 1h. A las 4h desde el inicio del ayuno se recogieron las muestras para analizar por inmunodetección de proteínas según se describe en el apartado 3.4.

3.2.15 Actividad de SOD

La medición de la actividad de las enzimas superóxido dismutasas SOD1 (Cu/Zn SOD citosólica), SOD2 (Mn SOD mitocondrial) y SOD3 (Cu/Zn SOD extracelular) en

Capítulo 3. Materiales y métodos

HepaRG y HepaRG Lenti-*Irs2* a día 14 de la diferenciación fue llevada a cabo por el Dr. Carlos Acosta empleando el *kit Enzo Life Sciences®*, ADI-900-157.

3.3 Tinción por inmunofluorescencia

Se empleó el mismo procedimiento para tejidos y para cultivos, exceptuando los pasos previos correspondientes a la preparación de las muestras que se realizaron del siguiente modo:

3.3.1 Tejidos criopreservados

Los tejidos incluidos en bloques de OCT y preservados a -80°C se laminaron en cortes de $6\ \mu\text{m}$ de espesor en criostato (*Leica® CM1850 UV*) a una temperatura de -20°C . Cada corte de muestra fue adherido a un portaobjetos tratado con polisina (*VWR®*, 631-0107). Tras el corte los tejidos se fijaron con PFA al 4% disuelto en tampón PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se eliminaron los restos de PFA y de OCT realizando 3 lavados con PBS antes de empezar el procedimiento de tinción.

3.3.2 Cultivos celulares

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos que, en el caso de las líneas de CEHp y de LX-2 fueron pretratados con gelatina disuelta al 0.1% en agua. Una vez finalizado el experimento/tiempo de crecimiento se aspiró el medio de cultivo y se eliminaron los restos celulares realizando un lavado PBS. Seguidamente, las células se fijaron con PFA al 4% disuelto en PBS durante 10 minutos a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS antes de empezar el procedimiento de tinción.

3.3.3 Tinción

Tras la fijación, tanto de los cortes de tejidos como de las células en cubreobjetos, se permeabilizaron las membranas lipídicas con una disolución 0,5% Tritón 100X (*Sigma-Aldrich®*, 93443) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este paso se realizaron dos lavados de PBS y se procedió a bloquear las muestras con solución previamente filtrada de 1% albúmina de suero bovino (BSA) (*Sigma-Aldrich®*, A7906), 5% suero de caballo y 0,2% Tritón X100 en PBS, durante 1h a temperatura ambiente. Tras el paso de bloqueo se incubaron los anticuerpos

Capítulo 3. Materiales y métodos

primarios correspondientes en la misma disolución de bloqueo a la concentración indicada en la **Tabla 11**, durante 16 horas a 4°C y en condiciones húmedas. Tras la incubación del anticuerpo primario, se procedió a retirar el excedente realizando 6 lavados con PBS. Seguidamente, se incubó la muestra con el anticuerpo secundario correspondiente *Alexa Fluor*® (*Life Technologies*®) (dilución 1:500) junto con *Hoechst 33342* a una concentración final de 1 µg/mL y, en los casos correspondientes, junto con la sonda de faloidina *Alexa Fluor*® conjugada al fluoróforo 647 (*Invitrogen*®, A22287) a dilución 1:50 en una disolución 1% BSA; 0,2% Tritón 100X en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se eliminaron los excesos de anticuerpo secundario realizando 4 lavados de PBS y dos lavados de H₂O destilada preservando la muestra en un portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (*Dako*®, S302380-2), conservándola en oscuridad y a 4°C hasta su uso.

Tabla 11. Lista de anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Referencia	Huesped	Dilución
Anti-Albúmina	Sigma Aldrich® (A6684)	Ratón	1:500
Anti-Caspasa3 activa (Asp175)	Cell Signalling Technology® (9664)	Conejo	1:800
Anti-E-cadherina	BD Biosciences® (610182)	Ratón	1:100
Anti-FGF7	R&D systems® (MAB251-100)	Mouse	1:200
Anti-FGFR2	Sigma-Aldrich® (F0300)	Conejo	1:500
Anti-HNF4α (humano)	Santa Cruz Biotechnology® clone H-171 (sc-8987)	Ratón	1:50
Anti-P62/SQSTM1	MBL Internacional® (PM045)	Conejo	1:500
Anti-Vimentina (humana) NL493-Conjugated	R&D systems® (SC026)	Rata	1:300

Las imágenes mostradas son representativas de muestras de varias réplicas, y fueron adquiridas usando o bien un microscopio confocal *Leica TCS-SP6* (*Leica*, Wetzlar, Alemania) o bien un microscopio de fluorescencia invertido *Leica DM 6000B*. Las imágenes fueron procesadas usando el software *Leica Application Suite X* (*LAS X*, versión 3.4.2.18368, *Leica Microsystems CMS GmbH*).

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.4 Inmunodetección de proteínas por *western blot*

3.4.1 Extracción de proteínas

Las porciones de tejido (hígado) fueron introducidas en un tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (*Sigma-Aldrich-Merck*®, 252859) pH8, NaCl 150 mM (*Panreac AppliChem*®, 131659), Nonidet P-40 (NP-40) al 1% (*Sigma-Aldrich*®, 21-3277), deoxicolato de sodio 0,5% (*Sigma-Aldrich*®, D6750) y dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1% (*Sigma-Aldrich*®, L3771). En el momento de su uso, se suplementó con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa consistente en *complete*™ 1X (*Roche*®, 11697498001), β-Glicerol fosfato 50 mM (*Sigma-Aldrich*®, 50020), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 20 mM disuelto en etanol (*Roche*®, 10837091001) y ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) a 200 μM (*Sigma-Aldrich*®, S6508). Los tejidos fueron lisados con un homogeneizador *Polytron PT1600E* (*Kinematica*®, Suiza) aplicando tres ciclos de lisis de 10 segundos y 15 segundos de descanso en hielo. Para la extracción proteica de muestras de cultivos celulares, se realizaron tres lavados en frío con PBS de los cultivos en adherencia y se rascaron las células para ser recolectadas en un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, *tween-20* al 1% (*Sigma-Aldrich*®, P5927) y NP-40 0,2% (*Sigma-Aldrich*®, 21-3277), al que se le añadió la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa previamente descrito. La lisis se llevó a cabo usando un sonicador *Branson Sonifier 150* aplicando también tres ciclos de lisis de 10 segundos y 15 segundos de descanso en hielo.

Los homogeneizados resultantes de ambos tipos de muestras reposaron durante 40 minutos en hielo antes de ser centrifugados a 4°C durante 30 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante en el que se encontraban las proteínas purificadas fue almacenado a -80°C hasta su uso.

3.4.2 Cuantificación y preparación de proteínas

La concentración proteica fue calculada usando el kit de ensayo de proteínas BCA *Pierce*® (*Thermo Scientific*®, 10741395). Se utilizó un lector de placas *Multiskan FC Microplate Photometer* (*Thermo Scientific*®, Finland) para medir de forma colorimétrica a 562 nm la concentración proteica de las muestras, que se referenció

Capítulo 3. Materiales y métodos

a una curva patrón de BSA según las instrucciones del fabricante. Se preparó una dilución de 20 µg de cada una de las muestras proteicas junto con tampón de carga compuesto por Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, Glicerol 10% (*Sigma-Aldrich*®, 49781), SDS 1,6% (*Sigma-Aldrich-Merck*®, L3771). β-Mercaptoetanol 5% (*Sigma-Aldrich-Merck*®, M7522) y Azul de bromofenol 0,005% (*Panreac AppliChem*®, A2331) que fue desnaturalizada aplicando un choque de calor a 97°C durante 5 minutos, seguido de una centrifugación de 5 segundos a 13000 rpm.

3.4.3 Separación de proteínas por peso molecular y transferencia

Una vez desnaturalizadas las muestras proteicas se cargaron junto con un marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (*Biorad*®, 1610374) en un gel de poliacrilamida, variando su porcentaje según el peso molecular de las proteínas a resolver. Los geles empleados fueron bifásicos ya que contenían una fracción inferior de separación (**Tabla 12**) y una fracción superior de estancamiento proteico para alinear las diferentes muestras proteicas antes de separarlas por su tamaño (**Tabla 13**).

Tabla 12. Volúmenes empleados de los diferentes componentes de la fase de separación en función del % de acrilamida empleado.

Fase de resolución (Vf=10mL)	6%	7%	8%	10%	12,5%	15%
dH ₂ O (mL)	3,89	3,64	3.39	2,84	2.27	1,64
Tampón de resolución (Tris-HCl 1,5M, 0,4% SDS, pH 8,8) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Acrilamida 40% (<i>Bio-rad</i> ®, 161-0146) (mL)	1,5	1,75	2	2,5	3,125	3,75
Glicerol (mL) (<i>Bio-rad</i> ®)	2	2	2	2	2	2
APS 10% (<i>Bio-rad</i> ®, 161-0700) (µL)	100	100	100	100	100	100
TEMED (<i>Sigma-Aldrich</i> ®, T9281) (µL)	10	10	10	10	10	10

Tabla 13. Volúmenes empleados de los diferentes componentes de la fase de estancamiento (4.5% de acrilamida).

Fase de estancamiento (Vf=4mL)	4,5%
dH ₂ O (mL)	2,46
Tampón de estancamiento (Tris-HCl 0,5M; 0,4% SDS, pH 8,8) (mL)	1
Acrilamida (mL) 40%	0,5
APS 10%	40
TEMED	4

Capítulo 3. Materiales y métodos

El gel se introdujo en una cubeta junto con tampón de separación (Tris 25 mM, Glicina 200 mM (*Calbiochem*®, 3570-1), SDS 0,05%) usando el sistema *Mini-Protean*® de *Bio-rad*®. Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) aplicando una corriente constante de 70 V durante 15 minutos, hasta que las muestras alcanzaron la fase inferior del gel, momento en que se aplicó una corriente de 120 V hasta la completa resolución de la franja de peso molecular de las proteínas de interés.

Se transfirieron las proteínas resueltas a una membrana PVDF (*Bio-rad*®, 1620177) que fue previamente activada con metanol 100% (*Supelco*®, 1.06009) durante 5 minutos en agitación y manteniéndola en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 200 mM, metanol 10% disueltos en agua). Se realizó una transferencia húmeda aplicando un voltaje de 100 V durante 90 minutos en agitación y a 4°C. Tras lo cual, se procedió a bloquear la membrana para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario con tampón de bloqueo consistente en un 3% de BSA en TBST pH7,5 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, tween-20 al 0,05% disueltos en agua) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente

3.4.4 Detección de proteínas

Para la detección de la proteína de interés, la membrana fue incubada durante 16 horas en agitación a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en tampón de bloqueo según indica la **Tabla 14**.

Tabla 14. Lista de anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de proteínas por *western blot*.

Anticuerpo	Referencia	Huesped	Dilución
Anti-Erk1/2	Cell Signaling Technology® (4695)	Conejo	1:1000
Anti-NQO1 (A180)	Santa Cruz Biotechnology (sc-32793)	Ratón	1:1000
Anti-NRF2 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology (sc-722)	Conejo	1:1000
Anti-p62/SQSTM1	MBL Internacional® (PM045)	Conejo	1:1000
Anti-phospho-Erk1/2 (Tyr 204)	Santa Cruz Biotechnology® clone E-4 (sc-7383)	Ratón	1:1000
Anti-β-actina	Sigma-Aldrich® (A1978)	Ratón	1:10000

Tras la incubación del anticuerpo primario, se realizaron 6 lavados a la membrana con tampón TBST durante 5 minutos en agitación para eliminar exceso de anticuerpo. Seguidamente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario específico para el reconocimiento de la especie huésped (**Tabla 14**) conjugado a la enzima HRP (α -conejo 7074P2; α ratón 7076P2, *Cell Signaling Technology*®), diluido en tampón de bloqueo (1:5000), durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 6 lavados a la membrana con tampón TBST durante 5 minutos en agitación para eliminar exceso de anticuerpo y se detectó la señal lumínica con una solución de sustrato *ECL Pierce*™ (*Thermo Scientific*®, 32106) siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se introdujo en un casete (*Amersham*®) donde fue expuesta a películas *Medical X Ray Film 18*24cm* (*Carestream*®, 771 0783) en condiciones de oscuridad. Finalmente, las películas fueron reveladas usando una reveladora *AGFA Curix 60* y posteriormente escaneadas. La señal resultante fue cuantificada usando el software *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) y normalizada usando la señal de un control de carga (β -Actina).

3.5 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) para el análisis de expresión génica fueron llevados a cabo por la Dra. Amparo Galán.

3.5.1 Extracción y purificación de ARN

La extracción de ARN de muestras provenientes de cultivos celulares, se utilizó el kit *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*®, 74104) basado en un sistema de lisis, adhesión, lavado y elución por columnas con tratamiento *DNase* (*Qiagen*®, 79254) para la eliminación de DNA genómico. La calidad y concentración del ARN fue medida usando un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (v3.7, *Thermo Scientific*®, Wilmington, de EE. UU), conservándose a -80°C hasta su uso.

3.5.2 Retrotranscripción

Las muestras de ARNm (1-3 ug por muestra) fueron retrotranscritas a ADNc usando el kit *RNA to cDNA EcoDry Premix (Double Primed)* (*Takara*®, 639549) siguiendo

Capítulo 3. Materiales y métodos

las instrucciones del fabricante. Las preparaciones de ADNc fueron diluidas a la solución de trabajo adecuada con agua libre de ADNasa y ARNasa.

3.5.3 RT-qPCR

La reacción se llevó a cabo en placas de 384 pocillos (*Axygen*®, PCR-384-LC480-W-NF), que contenían por pocillo una mezcla de reacción consistente en: 0,1 uL de la pareja de cebadores correspondiente (0,05 µL del cebador *forward* y 0,05 µL del cebador *reverse*) con una concentración inicial 50 µM, 5 uL de muestra de ADNc (40-120 ng) y 4,9 µL de SYBR PreMix ExTaq (TB RNaseH Plus) (Takara®, RR420L). Los cebadores utilizados para el estudio de cada gen (**Tabla 15**) se diseñaron libres de intrones para aplicar la técnica de RT-qPCR. Seguidamente, las placas fueron cubiertas con un film termo-adhesivo (*Axygen*®, PCR-384-LC480-W-NF) sometiéndola a una centrifugación corta para asegurar la mezcla de todos los componentes de reacción. Finalmente, la placa se introdujo en un termociclador *LightCycler 480 II* (*Roche*®) en el que se programó: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 45 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, anillamiento a 54°C durante 20 segundos, y extensión a 72°C 30 segundos (con detección de fluorescencia) y 1 ciclo de fusión.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, incluyendo controles negativos (muestras sin ADNc) y controles positivos utilizados como calibradores intraexperimentales. La expresión relativa de ARNm fue calculada utilizando como control de expresión para líneas celulares humanas la proteína ribosomal L19 (RPL19). La expresión relativa de los genes referidos al gen de referencia se realizó mediante la aplicación del método del ΔCt .

Capítulo 3. Materiales y métodos

Tabla 15. Listado de secuencias de cebadores empleadas el análisis de expresión por RT-qPCR.

Gen	Esp	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
<i>ACTA2</i>	H	CAGTGGCCATCTCATTTTCA	CTGAGCGTGGCTATTCCCTTC
<i>ALB</i>	H	TGTTGATTGCCTTTGCTCAG	GCAGTCAGCCATTTACCCAT
<i>APOA2</i>	H	TCGCAGCAACTGTGCTACTC	TCTGGGCTCTTGACCTTCTC
<i>COL1A1</i>	H	TGGTGACAAGGGTGAGACAG	CTCCAGAGGGACCTTGTTCA
<i>COL3A1</i>	H	GGTGAGCCTGGTAAGAATGG	CTTGCCATCTTCGCCTTTAG
<i>E-CADH</i>	H	TGCCCCCAATACCCCAGCGT	TGCCCCCAATACCCCAGCGT
<i>FGF10</i>	H	CCATGAACAAGAAGGGGAAA	TGCTGCCAGTTAAATGATGC
<i>FGF22</i>	H	CACGGCCAGGACAGCATC	TAGAAGCCTGAGGACACTGC
<i>FGF7</i>	H	TGCAATGAACAAGGAAGGAA	CCGTTGTGTGTCCATTTAGC
<i>FGFR2-IIIb</i>	H	TGCTGGCTCTGTTCAATGTG	GGCGATTAAGAAGACCCCTA
<i>HSPA1b</i>	H	TCAGGCCCTACCATTGAGGA	GAGTCCCAACAGTCCACCTC
<i>IL6</i>	H	GCACTGGCAGAAAACAACCT	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT
<i>IRS2</i>	H	CCACCATCGTGAAAGAGTGA	CCACCATCGTGAAAGAGTGA
<i>Irs2</i>	R	GCCGCCCGAGCAAAGTGA	ACTACCGCTGGACGGACGCT
<i>KI67</i>	H	ACGGATTATACCTGGCCTTCC	GGAAGCTGGATACGGATGTCA
<i>NRF2</i>	H	ATTGAGCAAGTTTGGGAGGA	GTTTGGCTTCTGGACTTGGA
<i>P53</i>	H	CACATGACGGAGGTTGTGAG	ACACGCAAATTTCTTCCAC
<i>RPL19</i>	H	CGAATGCCAGAGAAGGTCAC	CCATGAGAATCCGCTTGTTT
<i>SERPINE1</i>	H	TGATGGCTCAGACCAACAAG	TAGGGCAGTTCAGGATGTC
<i>SPP1</i>	H	GCCGAGGTGATAGTGTGGTT	CCATGTGTGAGGTGATGTCC

Esp=especie; H=human; R=ratón.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.6 Análisis cuantitativo de imagen

3.6.1 Recuento de células caspasa 3 escindida-FGF7 (+/+)

Se realizó a partir de la tinción de cortes de tejido procesados siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 3.3.3. Empleando el microscopio de fluorescencia invertido *Leica DM 6000B* se cuantificaron visualmente los eventos por sección de tejido completa (33.99 mm² de media por sección) de células que siendo positivas para el marcaje de Caspasa 3 escindida también eran positivas para Fgf7 (Caspase 3 escindida-Fgf7+) en ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} en los primeros estadios del daño crónico (día 7 de dieta DDC 0.1%). Tras medir el área de cada sección, el número de eventos cuantificados por sección se dividió entre el área de sección correspondiente para determinar el número de células caspasa 3 escindida-Fgf7 (+/+) por mm². Se analizó una n=3 con duplicados de cada condición.

3.6.2 Análisis con *IN Cell Analyser 2200*

Se realizó a partir de tinciones de cultivos celulares procesados siguiendo las especificaciones descritas en el apartado 3.3.3. Las tinciones fueron analizadas empleando la plataforma de alto rendimiento *IN Cell Analyser 2200* (*GE Healthcare*®). Con la ayuda del servicio de citometría del CIPF, se diseñaron protocolos de adquisición y análisis adecuados con el programa *IN Cell Developer Toolbox* que permitieron evaluar los parámetros determinados de manera precisa y masiva a lo largo de la muestra. Los filtros de excitación/emisión empleados fueron los siguientes los descritos en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Filtros de excitación/emisión empleados en las adquisiciones con *IN cell Analyser 2200*.

	Longitud de onda de filtro de excitación	Longitud de onda de filtro de emisión
Hoechst	390/18 nm	432.5/48 nm
GFP	475/28 nm	511/23 nm
Cy5	632/22 nm	679/34 nm

3.6.2.1 Cuantificación de células positivas para HNF4 α en zonas con CEH (Vimentina+) o zonas sin CEH (Vimentina-) durante el cocultivo de HepaRG con CEHp inactivadas

Se analizó la tinción del factor nuclear 4 alfa de hepatocitos (HNF4 α +) y de Vimentina (descrita en el apartado 3.3) del cocultivo de HepaRG y CEHp fijado a día 14, realizada según las condiciones del apartado 3.2.6. La adquisición se llevó a cabo con el objetivo 10X para los canales GFP (Vimentina), Cy5 (HNF4 α) y Hoechst (núcleos). Se adquirieron 30 campos por muestra que cubrieron prácticamente toda la extensión del cultivo/pocillo. La adquisición se realizó evitando la saturación de exposición y asegurando un correcto enfoque. El protocolo de análisis establecido siguió los siguientes pasos:

- 1) Cada "partícula" por encima de un umbral de intensidad de Hoechst determinado de manera visual y que cumplía los requisitos de tamaño y forma específicos fue establecida como "núcleo".
- 2) Dado que HNF4 α es un marcador nuclear se realizó el análisis de la intensidad de Cy5 (HNF4 α) para cada "núcleo".
- 3) Se estableció un umbral de intensidad media de Cy5 (HNF4 α) que sirvió de guía para crear un árbol de decisión que agrupó a los diferentes "núcleos" como "HNF4 α +" o "HNF4 α -".
- 4) De manera visual se estableció un umbral mínimo de intensidad de GFP (Vimentina) para definir a las áreas "Vimentina+" o "Vimentina-".
- 5) Se analizó la colocalización de los "núcleos" "HNF4 α +" con las áreas "Vimentina+" o "Vimentina-".
- 6) Se determinó el porcentaje total de "núcleos" "HNF4 α +" en el área "Vimentina+" y en el área "Vimentina-".

Se analizó una n=3 con duplicados evaluando un total de 6.69x10⁵ células.

3.6.2.2 Análisis del efecto de la sobreexpresión de *Irs2* y el tratamiento con 3-MA en la morfología celular de la línea LX-2

Se analizaron las muestras del cultivo LX-2 tras la transfección descrita en el apartado 0. Se realizó la adquisición con el objetivo 20X para el canal de detección

Capítulo 3. Materiales y métodos

de la proteína verde fluorescente (GFP) (células positivas para la transfección con *Irs2*). Se adquirieron 30 campos por muestra de la zona central del cultivo. La adquisición se realizó con una exposición suficiente como para detectar las prolongaciones celulares más finas y asegurando un correcto enfoque. El protocolo de análisis establecido siguió los siguientes pasos:

- 1) Cada “partícula” por encima de un umbral de intensidad Hoechst determinado de manera visual y que cumplía los requisitos de tamaño y forma específicos fue establecida como “núcleo”.
- 2) Se estableció un umbral de intensidad de GFP y se seleccionó a aquellas partículas que estando por encima del umbral “GFP+” solapaban en un 100% con un “núcleo” pasando a denominarlas “células GFP+”. De este paso se obtuvo el dato de número de “células GFP+” por campo.
- 3) Se calculó la medida en μM de la línea recta entre los dos extremos más alejados de la extensión total de las “células GFP+” y se determinó la longitud media de las “células GFP+” por campo.

Se analizó una $n=4$ por condición evaluando una media de 600 “células GFP+” por condición y un total de 2400 células.

3.7 Análisis transcriptómico

Se empleó el *Microarray Illumina HumanHT 12 v4.0 Gene Expression BeadChip* para analizar una $n=3$ de muestras procedentes de la línea HepaRG (control) y de la línea HepaRG Lenti-*Irs2* (con sobreexpresión estable de *Irs2*) a día 9 de la diferenciación. Los datos crudos se obtuvieron del programa *Illumina's GenomeStudio* y fueron analizados empleando el *R/Bioconductor statistical computing environment* con el *lumi Bioconductor package* para corregir el fondo, transformar a \log_2 y normalizar los datos. Aquellas sondas detectadas con un p-valor (p) > 0.01 en al menos una muestra fueron excluidas del análisis posterior al considerar que representan a transcritos que no son expresados por las muestras. Un análisis de calidad de los datos normalizados realizado mediante *Hierarchical clustering* y *principal component analysis* verificó la agrupación de las diferentes muestras correspondientes en grupo HepaRG control (3 muestras) y grupo HepaRG Lenti-*Irs2* (3 muestras). Se empleó el paquete de análisis funcional *Bioconductor*

“GOstats” para analizar grupos de genes afectados. Aquellos genes con valor de enriquecimiento > 1.5 y un p-valor < 0.05 se consideraron expresados diferencialmente. Para analizar las categorías de los grupos de genes diferencialmente expresados se empleó un análisis de enriquecimiento de conjuntos genes (GSEA) comparando con la base de datos *The Molecular Signature Database*. La huella transcriptómica de NRF2 fue detectada al comparar con el conjunto de datos de factores de transcripción perteneciente a *The Molecular Signature Database* obteniéndose para la señalización de NRF2 un valor de enriquecimiento=11.90 y un p-valor= 2.39×10^{-10} .

3.8 Análisis estadístico

La representación de datos y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism versión 8.00* (La Jolla, CA, <http://www.graphpad.com>). El número de muestras independientes representado como “n” en el apartado de resultados, indica el número de animales utilizados en el caso de los experimentos *in vivo*, y el número de experimentos independientes llevados a cabo en el caso de los experimentos *in vitro*. Los ensayos analíticos utilizados fueron: t-test, para comparar una variable entre dos muestras, *one-way* ANOVA para la comparación de varias muestras con una sola variable y *two-way* ANOVA para comparar varias muestras en las que intervienen diferentes variables.

Capítulo 4.

Resultados

4.1 Bloque 1. El silenciamiento de *Irs2* *in vivo* reprime las señales de reparación de tejido a través de Fgf7 durante el daño hepático crónico

El primer paso fue confirmar que el defecto en la inducción de Fgfr2 detectado en los ratones *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático crónico generado con la dieta DDC 0.1% resultaba en una respuesta impedida a Fgf7. Para ello, se evaluó la activación de la señalización aguas abajo de su receptor Fgfr2 tras la inyección intraperitoneal de Fgf7 recombinante de ratón (Fgf7rr) en ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 21 días de dieta DDC. Después de 30' de estimulación con Fgf7rr los ratones *WT* experimentaron un aumento en la señalización de Fgf7/Fgfr2b evidenciado por el incremento significativo de la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (Erk 1/2) que se vio impedido en los hígados de ratones *Irs2*^{-/-} (**Figura 16**). El defecto en la sensibilidad a Fgf7rr observado en ratones *Irs2*^{-/-} tras el daño hepático crónico confirma que la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 es necesaria para la respuesta a Fgf7 a través de Fgfr2 en la población de CO.

Capítulo 4. Resultados

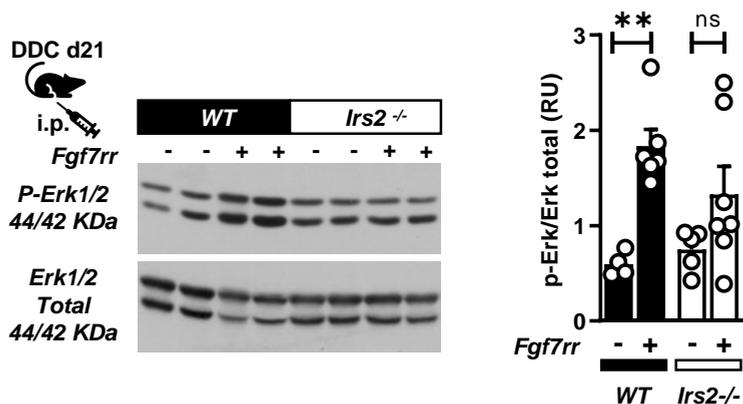


Figura 16. El silenciamiento de *Irs2* *in vivo* reprime la respuesta a Fgf7 a través de Fgfr2b.

Los hígados de los ratones *Irs2*^{-/-} son resistentes a la estimulación con Fgf7 exógeno tras el daño con la dieta DDC 0.1%. Análisis por *western blot* de los extractos de hígado completo de ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tratados durante 21 días con la dieta DDC 0.1% y estimulados 30 minutos (previos al sacrificio) con Fgf7 recombinante de ratón (Fgf7rr) (0.35 mg/kg) o el vehículo (PBS) mediante inyección intraperitoneal (i.p). Los niveles relativos de p-Erk1/2 respecto a Erk1/2 total detectados por *western Blot* en lisado proteico completo (parte izquierda) se cuantificaron (parte derecha) como indicador de la respuesta a Fgf7 (n=4-7). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples).

El segundo paso fue evaluar el origen del defecto en la inducción de Fgf7 observado en los ratones *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático crónico. Dado que *Irs2* ha sido extensamente descrito como inductor de la supervivencia [42][274], se evaluó el papel de la expresión de *Irs2 in vivo* en la supervivencia de las células Fgf7+. Para ello se cuantificaron los eventos de células doble positivas para el marcador de apoptosis caspasa 3 escindida y Fgf7 en ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} en los primeros estadios del daño crónico (día 7 de dieta DDC 0.1%). Para evitar que el defecto en la inducción de Fgf7 observado en los ratones *Irs2*^{-/-} tras la dieta DDC 0.1% afectara a la cuantificación de las células doble positivas (Caspasa 3 escindida-Fgf7+) se cuantificaron los eventos de células que siendo positivas para el marcaje de Caspasa 3 escindida también eran positivas para Fgf7. La cuantificación evidenció que los ratones *Irs2*^{-/-} experimentan el doble de eventos de apoptosis (células caspasa 3 escindida+) en las células Fgf7+ que los ratones *WT* (**Figura 17.**).

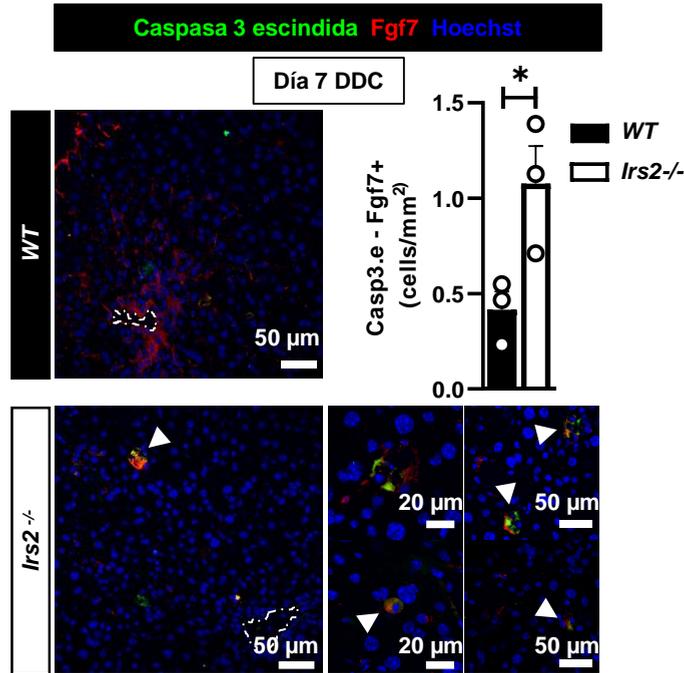


Figura 17. El silenciamiento de *Irs2* *in vivo* induce apoptosis en las células Fgf7+ durante el daño hepático crónico.

Imágenes de inmunofluorescencia confocal representativas y cuantificación del número de células doble positivas para caspasa 3 escindida y Fgf7 en criosecciones de hígados de ratones WT (fenotipo salvaje) e *Irs2*^{-/-} (ratón deficiente del gen *Irs2*) tratados durante 7 días con la dieta DDC (n=3, con duplicados experimentales de cada animal y una media de 33.99 mm² por sección de tejido). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis Test-t no pareado. Las líneas discontinuas delimitan la vena portal.

Una vez confirmado *in vivo* el papel de la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 en ambos compartimentos de la comunicación paracrina a través de Fgf7 se dedicarán los siguientes apartados a estudiar, *in vitro*, los mecanismos involucrados.

Capítulo 4. Resultados

4.2 Bloque 2. La señalización de insulina/IGF-1-IRS2 actúa en CPH para promover la respuesta a FGF7

4.2.1 La ausencia de insulina-IRS2 impide la epitelización mediada por FGF7

Una vez demostrado que el silenciamiento de *Irs2 in vivo* (ratón *Irs2*^{-/-}) impide la respuesta a *Fgf7* a través de *Fgfr2* durante el daño hepático crónico, se empleó la línea de CPH humanas HepaRG para evaluar la capacidad de IRS2 como modulador de la epitelización mediada por la respuesta a FGF7 a través de FGFR2b. Cultivadas en presencia de insulina, las células HepaRG se diferencian y emergen de la monocapa formando estructuras tridimensionales que son brillantes al ser observadas con contraste de fases y positivas para marcadores de hepatocitos como Albúmina, el factor nuclear 4 alfa de hepatocitos (HNF4 α), la apolipoproteína A-II (APOA2) o E-cadherina (E-cadh) (**Figura 18**). El tratamiento de las células HepaRG a largo plazo (de día 4 a día 15) con FGF7 recombinante humano (FGF7rh) indujo la diferenciación/epitelización del cultivo, evidenciada por el aumento de marcaje por inmunofluorescencia de marcadores de hepatocitos como la ALBÚMINA, HNF4 α , E-cadherina o por la actividad reportera GFP del promotor humano de APOA2 (*pAPOA2-GFP*) así como por el aumento en el análisis de expresión de dichos marcadores específicos de hepatocitos detectado en la línea celular HepaRG control (*sh-scram*) (**Figura 19**). El silenciamiento estable de *IRS2* (*sh-IRS2*) en la línea HepaRG o la eliminación de la insulina del medio suprimieron totalmente la habilidad del FGF7rh para inducir la expresión de los marcadores de hepatocitos *APOA2* y *ALBÚMINA* (**Figura 19**). El análisis del marcador de células progenitoras epiteliales la fosfoproteína secretada 1 (SPP1), que se encuentra desregulado en el ratón *Irs2*^{-/-} tras la dieta DDC [268], también se vio significativamente reducido por el silenciamiento de *IRS2* en la línea HepaRG (**Figura 19**), estableciendo la expresión de *SPP1* como dependiente de insulina-IRS2 y como un novedoso indicador de la respuesta a FGF7. Estos resultados demuestran que la señalización de insulina-IRS2 es indispensable para la respuesta biológica a FGF7 y para la inducción en la epitelización mediada por la respuesta a FGF7 en la línea HepaRG.

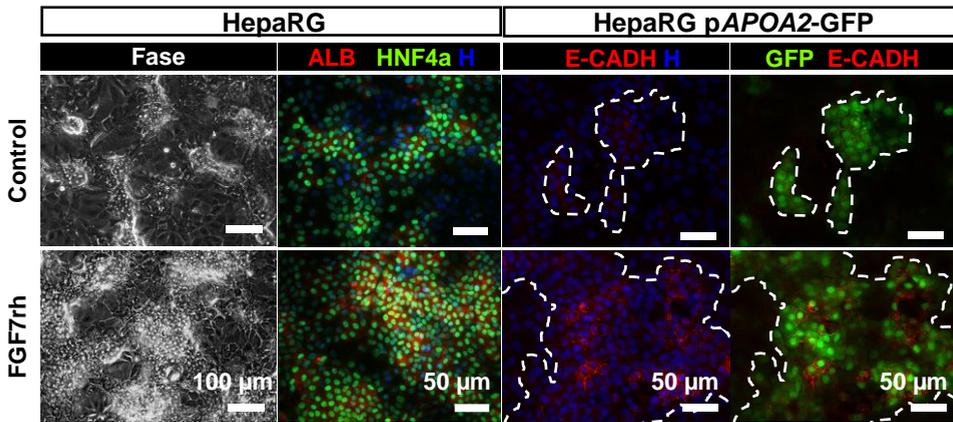


Figura 18. El tratamiento con FGF7rh induce la diferenciación de la línea HepaRG.

Imágenes de contraste de fases y de inmunofluorescencia confocal de células HepaRG (día 15) cultivadas con FGF7 recombinante humano (FGF7rh) (50 ng/mL) durante 11 días (de día 4 a día 15) en las que se observa un aumento en el tamaño de las islas epiteliales marcadas por inmunofluorescencia con E-CADHERINA (E-CADH) / ALBÚMINA (ALB) / HNF4 α , así como con la expresión del promotor de *APOA2* (*pAPOA2*) visualizada con un sistema de infección estable en HepaRG con *pAPOA2-GFP* reportero. N=3 con duplicados experimentales. H=Hoechst.

Capítulo 4. Resultados

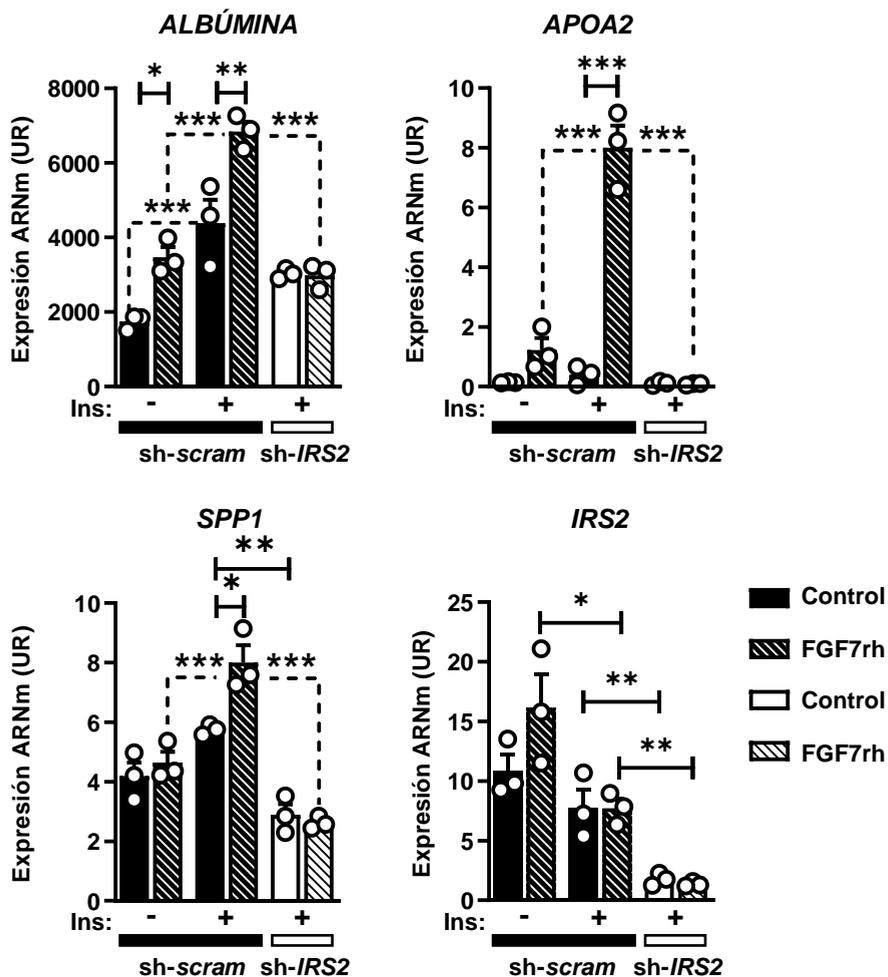


Figura 19. La señalización de insulina-IRS2 permite la epitelización mediada por FGF7 en HepaRG.

Análisis por RT-qPCR de los genes indicados tras el tratamiento a largo plazo (11 días) en las células HepaRG control (*sh-scram*) y con silenciamiento de IRS2 (*sh-IRS2*) con FGF7rh en presencia (+) y ausencia (-) de insulina (n=3 con duplicados experimentales). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples).

4.2.2 FGF7 induce su propia sensibilidad promoviendo la expresión de su receptor *FGFR2b* de manera dependiente a la señalización de insulina-IRS2

Estudios con la línea de CPH HepaRG con expresión estable del reportero GFP de la expresión de IRS2 (*pIRS2-GFP*) mostraron que, en presencia de insulina, IRS2 colocaliza con FGFR2 en las islas de epiteliales de pre-hepatocitos (Albúmina+) mientras que, en ausencia de insulina el marcaje de FGFR2 se ve reducido (**Figura 20**) sugiriendo que la señalización de insulina-IRS2 podría regular la sensibilidad a FGF7 en CPH actuando directamente sobre los niveles de su receptor FGFR2.

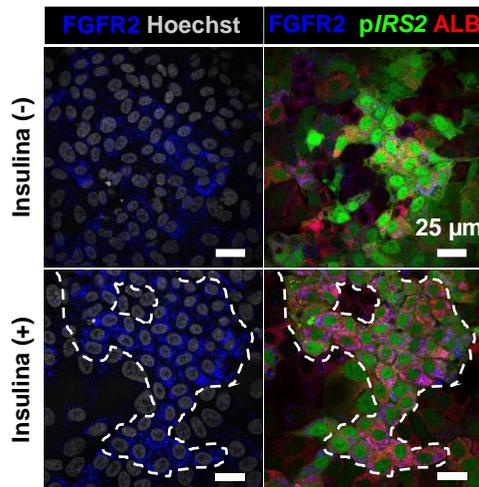


Figura 20. El patrón de expresión de *IRS2* colocaliza con *FGFR2* en las islas de hepatocitos.

Imágenes de inmunofluorescencia confocal que representan la colocalización de *FGFR2* con *IRS2* en presencia de insulina dentro de las islas de hepatocitos (Albúmina +) durante la diferenciación temprana de HepaRG (día 15). La expresión de *IRS2* se visualizó mediante la infección estable de HepaRG con un promotor *IRS2* GFP reportero (*pIRS2-GFP*). Las líneas discontinuas delimitan las islas de hepatocitos.

El análisis de expresión tras el tratamiento con FGF7rh reveló un nuevo mecanismo por el que FGF7 fomenta su propia sensibilidad induciendo a largo plazo la expresión de su receptor *FGFR2b* para fomentar la diferenciación/epitelización en la línea HepaRG. (**Figura 21A**).

Capítulo 4. Resultados

El silenciamiento estable de *IRS2* (sh-*IRS2*) en HepaRG o la eliminación de la insulina del medio reprimieron la habilidad de FGF7rh para activar el bucle de inducción positiva que aumenta la expresión de *FGFR2b* (Figura 20, Figura 21A) explicando la falta de respuesta a FGF7rh observada en dichas condiciones en la Figura 19. Estos datos descubren a la señalización de insulina-*IRS2* como moduladora de la respuesta a FGF7 en HepaRG y revelan un novedoso bucle de inducción mediante el que el ligando FGF7 a largo plazo y en presencia de insulina-*IRS2*, induce en la línea HepaRG la expresión de su receptor *FGFR2b* promoviendo su propia sensibilidad (Figura 21B).

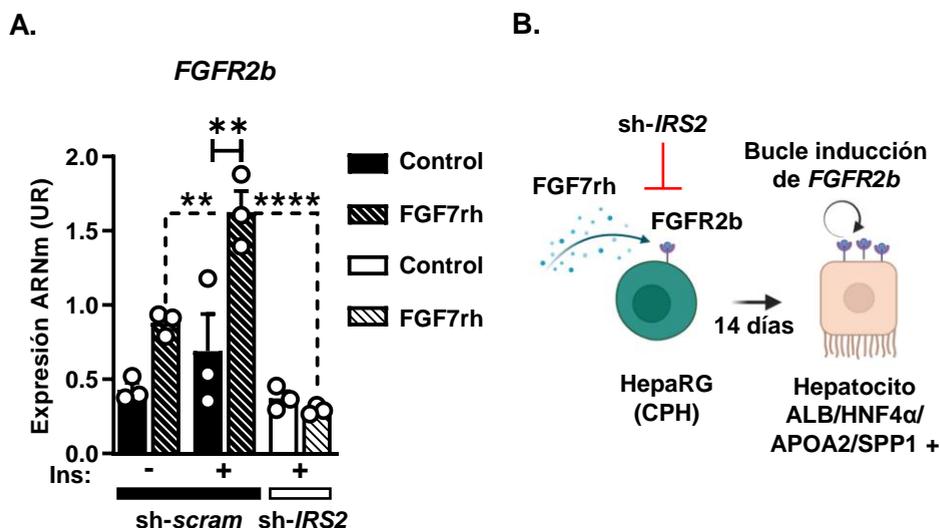


Figura 21. La señalización de insulina-*IRS2* media un bucle de inducción positiva por el que FGF7 induce la expresión de *FGFR2b*.

(A) Análisis por RT-qPCR de *FGFR2b* tras el tratamiento a largo plazo con FGF7rh (11 días) en las células HepaRG control (sh-*scram*) y con silenciamiento de *IRS2* (sh-*IRS2*) en presencia (+) y ausencia (-) de insulina (n=3) con duplicados experimentales. (B) Modelo resumen del efecto del silenciamiento de *IRS2* en HepaRG que impide la expresión de *FGFR2b* reprimiendo el bucle de inducción positiva ligando-receptor generado por la respuesta a FGF7rh y por tanto reduciendo la epitelización. Autoría propia, "Created with BioRender.com". Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples).

4.2.3 La inducción en la expresión de *FGFR2b* tras el tratamiento con FGF7rh no es directa y deriva del aumento en la epitelización

FGFR2b ha sido descrito como un marcador epitelial. Para discernir si el aumento en la expresión de *FGFR2b* observado en HepaRG es un efecto directo del tratamiento a largo plazo con FGF7rh o si se trata de un efecto indirecto derivado del aumento en la epitelización inducido por FGF7rh, se llevó a cabo un análisis de la expresión a lo largo del tiempo (0, 3, 6, 24, 48, 72 h) tras el tratamiento con FGF7rh en la línea celular HepaRG. La respuesta al tratamiento con FGF7rh (**Figura 22**) quedó evidenciada por el aumento de *SPP1* que fue significativo tras tan solo 6h de tratamiento y por una marcada inducción en el análisis de la expresión de *APOA2* que se vio aumentado 3 veces respecto al control en tan solo 48h de tratamiento con FGF7rh. Sin embargo, la expresión de *FGFR2b* disminuyó significativamente tras 24h de tratamiento con FGF7rh recuperando a las 72h los niveles del control y descartando el aumento en la expresión de *FGFR2b* como diana directa de la respuesta a FGF7. Estos resultados establecen la expresión de *APOA2* y *SPP1* como nuevos indicadores de la respuesta a FGF7 y demuestran que FGF7rh induce la expresión de *FGFR2b* de manera indirecta a través de la inducción en la epitelización de la línea HepaRG.

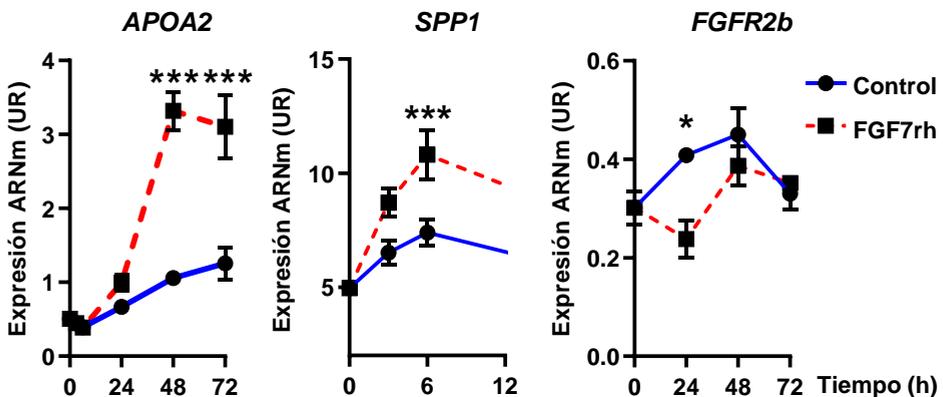


Figura 22. El tratamiento con FGF7rh a corto plazo induce la expresión de *APOA2* y *SPP1* y reduce la expresión de *FGFR2b* en HepaRG.

Análisis por RT-qPCR de los genes indicados en los tiempos más representativos del tratamiento con FGF7rh (50 ng/mL) de día 12 -15 de la diferenciación en HepaRG. Los datos

Capítulo 4. Resultados

Continuación de la **Figura 22**: representan la media (n=3 con duplicados experimentales) + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples).

4.3 Bloque 3. IRS2 actúa en las CEH del nicho de las CPH para inducir FGF7

4.3.1 Desarrollo del modelo de estudio de la comunicación paracrina FGF7 (CEH)-FGFR2b (HepaRG) *in vitro*

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la señalización de insulina-*Irs2* *in vivo* promueve la supervivencia de las células Fgf7+ durante el daño hepático crónico (**Figura 17**).

Resultados complementarios del laboratorio demostraron que el silenciamiento de *IRS2* *in vitro* en la línea humana de CEH en estado activado LX-2 (LX-2 sh-*IRS2*) no produce cambios en la viabilidad, ni tampoco en la migración o en la capacidad fibrótica de las células estrelladas humanas [268]. Sin embargo, tras inducir el arresto celular/inactivación con mitomicina C se detectó una mayor tasa de apoptosis (caspasa 3 escindida +) y una reducción de la viabilidad (por ensayo de MTT) en la línea LX-2 sh-*IRS2* respecto a los controles LX-2 sh-*luc* [268]. La inactivación con mitomicina C también generó un aumento en los niveles de expresión de *IRS2* y *FGF7*. Estos datos *in vitro* demostraron un papel de *IRS2* en la regulación de la supervivencia de LX-2 durante la reversión fibrogénica, en la que aumentaron los niveles de FGF7, corroborando los resultados obtenidos *in vivo*.

La supervivencia de las CEH inactivadas FGF7+ promovería, además, de manera dependiente de insulina-IRS2, el bucle de inducción mediante el que FGF7 promueve la expresión de *FGFR2b* en CPH potenciando la comunicación entre CEH y CPH a través de FGF7-FGFR2b y por tanto la epitelización. Para estudiar el mecanismo mediante el que la señalización de insulina-IRS2 regula la comunicación paracrina de FGF7 se generó un modelo *in vitro* que permitiese recrear la interacción que ocurre entre CPH y CEH durante el daño crónico.

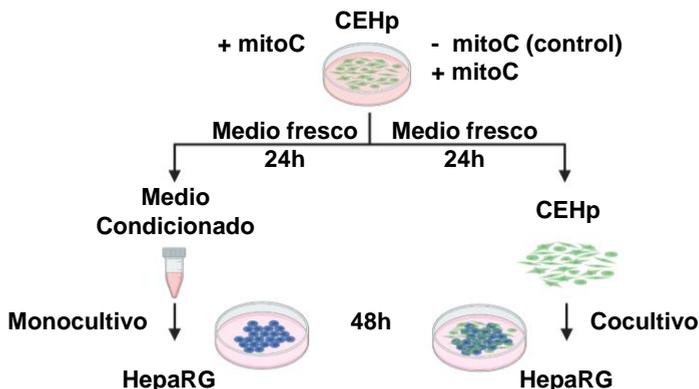
4.3.1.1 La comunicación entre CEH-CPH a través de FGF7-FGFR2b se activa durante el arresto celular de las CEH y requiere de contacto estrecho célula-célula entre ambas poblaciones

Resultados complementarios al proyecto sugieren que el arresto del ciclo celular con mitomicina C (inactivación/reversión fibrogénica de las CEH) induce la producción de FGF7 [275]. Dado que FGF7 es un factor paracrino, se testó la posibilidad de inducir la comunicación a través de FGF7 en HepaRG (monocultivo) cultivándolas con medio condicionado durante 24h por células estrelladas humanas primarias (CEHp) inactivadas previamente con mitomicina C (**Figura 23A**). Los resultados obtenidos en la **Figura 22** establecieron que 48h de tratamiento con FGF7 recombinante son suficientes para detectar una respuesta a FGF7 en HepaRG evidenciada por el aumento en la expresión de *APOA2*. En base a estos resultados se trató durante 48h a la línea HepaRG con medio condicionado recogido de las CEHp inactivadas y se analizó el incremento en la expresión de *APOA2* como indicador de la respuesta a FGF7 a través de FGFR2b. Para confirmar que el efecto observado estaba generado por FGF7 y no por otros factores paracrinos, se empleó en paralelo el inhibidor competitivo de FGF7 generado por una proteína de fusión Fc del dominio extracelular de FGFR2b recombinante humano (FGFR2b Fc rh). El tratamiento con FGF7 recombinante durante 48h fue suficiente para inducir un aumento significativo en el análisis de la expresión de *APOA2*. Sin embargo, no se detectó ningún incremento en la expresión de *APOA2* tras el tratamiento de la línea celular HepaRG con el medio condicionado de CEH previa inactivación con mitoC (**Figura 23B**). A pesar de que FGF7 es un factor paracrino, es una glicoproteína fácilmente secuestrada en ECM por los proteoglicanos heparan sulfatos (HSPG), de manera que para señalizar tienen que ser liberados de la matriz por heparinasas [155]. Es probable, por tanto, que FGF7 quede retenido en la ECM y no esté disponible en el medio condicionado. Para analizar esta hipótesis se llevó a cabo el mismo experimento, pero en lugar de emplear medio condicionado se co-cultivaron HepaRG con CEH primarias (CEHp) en estado activado e inactivado durante 48h (**Figura 23 A**). El cocultivo de HepaRG con CEHp inactivadas generó un incremento significativo en el análisis de expresión de *APOA2* que no se observó en el cocultivo de HepaRG con CEHp sin inactivar (**Figura 23C**). La adición en el medio de

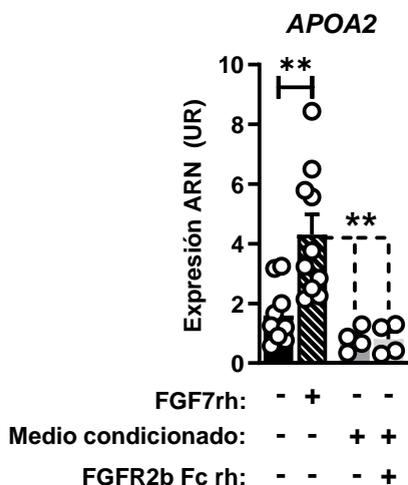
Capítulo 4. Resultados

FGFR2b Fc rh (inhibidor de FGF7) impidió la inducción de *APOA2* en el cocultivo de HepaRG-CEHp inactivadas confirmando que el aumento en expresión de *APOA2* deriva de un incremento en la respuesta a FGF7 a través de su receptor FGFR2b (**Figura 23C**). Estos datos demuestran, por primera vez, que la comunicación entre CEHp y HepaRG a través de FGF7-FGFR2b ocurre de manera local y requiere de contacto estrecho entre ambas poblaciones. También corroboran que la inactivación/reversión fibrogénica de las CEHp promueve la producción de FGF7.

A.



B.



C.

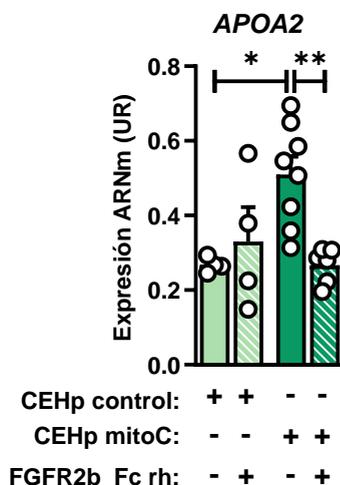


Figura 23. La comunicación entre CEH-CPH a través de FGF7-FGFR2b se activa durante el arresto celular de las CEH y requiere de contacto estrecho célula-célula entre ambas poblaciones.

Continuación Figura 23: A) Diagrama de los dos procedimientos evaluados para recrear la comunicación a través de FGF7 entre CEHp y HepaRG: a la izquierda, cultivo de CEHp tratadas previamente con mitomicinaC (mitoC) (3h) a las que les añade medio fresco durante 24h con el que se tratará durante 48h al cultivo de células HepaRG de día 13-15 de diferenciación (B), y a la derecha cultivo de CEHp control/inactivadas con mitoC (3h) sembradas sobre el cultivo de HepaRG durante 48h (de d13 a d15) (C). Autoría propia, "Created with BioRender.com. (B y C) Análisis por RT-qPCR de APOA2 como indicador de la respuesta a FGF7. FGF7rh se empleó como control positivo. La proteína de fusión Fc del dominio extracelular humano de FGFR2b (FGFR2b Fc rh) como inhibidor de la comunicación FGF-FGFR2b. Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples).

4.3.1.2 El cocultivo de CEHp inactivadas y HepaRG a largo plazo reproduce las interacciones heterotípicas necesarias para inducir la epitelización a través de FGF7

En el apartado anterior se establecieron las condiciones necesarias para recrear *in vitro* la comunicación entre CEHp-HepaRG a través de FGF7, resultando en la puesta a punto de un modelo de cocultivo. En el presente apartado se evaluó la funcionalidad del modelo de cocultivo y para ello su capacidad para sustentar a largo plazo la comunicación entre CEHp-HepaRG a través de FGF7 y promover la epitelización de HepaRG. Con tal fin, se co-cultivaron ambas poblaciones durante 14 días, el tiempo que necesita la línea celular HepaRG para diferenciarse hasta islas epiteliales de hepatocitos (**Figura 24A**). Como control se empleó el cocultivo con CEH sin inactivar (CEHp control), que en base a los resultados anteriores (**Figura 23C**) resulta insuficiente para activar la respuesta a FGF7. El cocultivo a largo plazo funcionó para inducir la diferenciación de manera dependiente a FGF7 ya que generó una inducción significativa respecto al cocultivo con las CEHp control en el análisis de expresión de APOA2 (**Figura 24B**), marcador hepatocítico e indicador de la respuesta a FGF7, que fue reprimida por el inhibidor de FGF7 (FGFR2b Fc rh). En concordancia con los resultados del apartado anterior (**Figura 23C**), también se observó que la diferenciación de los hepatocitos en la línea HepaRG (identificados por ser HNF4 α + por inmunofluorescencia), ocurría limitada a las zonas en las que existía contacto con las CEHp inactivadas (Vimentina+) (**Figura 24C**). En conjunto estos datos demuestran la eficacia del modelo desarrollado para estudiar la comunicación local a través de FGF7 entre CEH-HepaRG y, por consiguiente, el papel de IRS2 en la modulación de esta.

Capítulo 4. Resultados

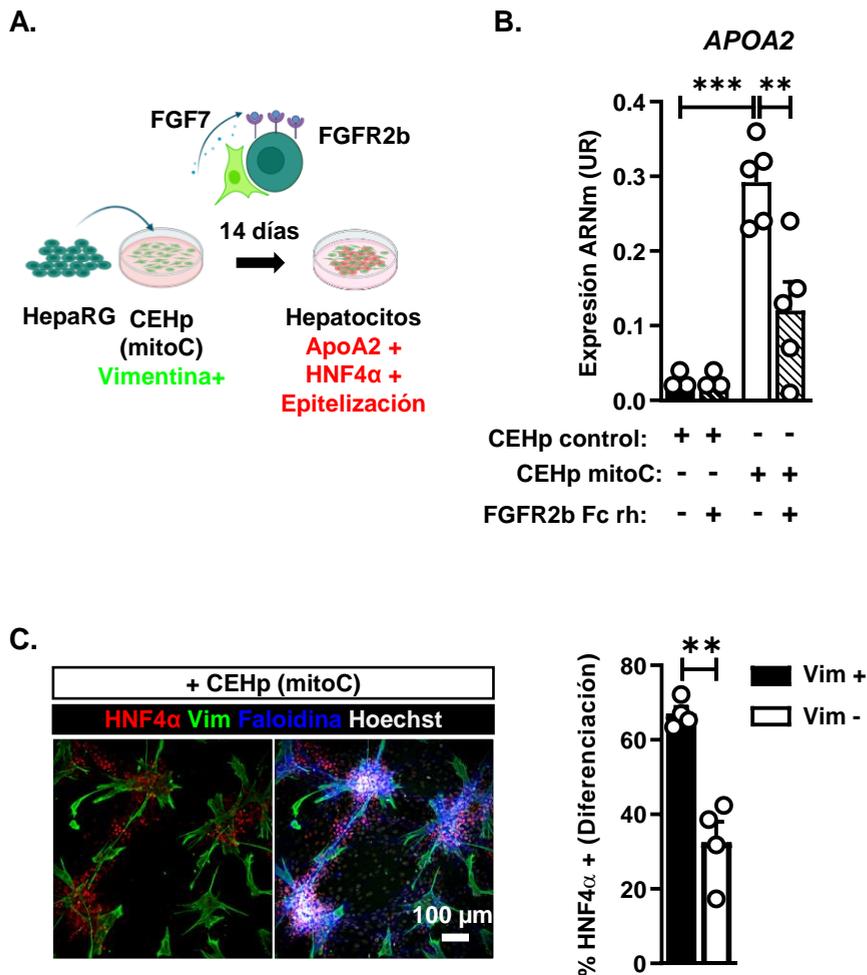


Figura 24. El cocultivo a largo plazo de HepaRG con CEHp recrea las interacciones heterotípicas entre CEH-CPH e induce la diferenciación/epitelización.

(A) Diagrama del procedimiento. Autoría propia, "Created with BioRender.com". (B) Análisis por RT-qPCR del gen *APOA2*. La proteína de fusión Fc del dominio extracelular de FGFR2b (FGFR2b Fc rh) (50 ng/mL) se empleó como inhibidor de la comunicación FGF-FGFR2b (n=3-5). (C) Imágenes de inmunofluorescencia confocal (proyección máxima) y cuantificación (IN cell analyser 2200) del % de células HepaRG HNF4α+ en zonas con CEH (Vim+) o sin CEH (Vim-) inactivados con mitomicina C (mitoC) tras el cocultivo durante 14 días (n=4 con duplicados experimentales). Se analizaron un total de 6.69×10^5 células. Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (B) y un análisis Test-t no pareado (C).

4.3.1.3 La comunicación heterotípica entre LX-2 (CEH) y HepaRG es dependiente de *IRS2*

Una vez validado, se empleó el modelo del cocultivo como herramienta para el estudio *in vitro* del papel de *IRS2* en la comunicación entre CEH y CPH a través de FGF7. Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que *IRS2* podría actuar en las CEH preservando a la población FGF7+ y fomentando por tanto el bucle de inducción positiva FGF7-FGFR2b. Para estudiar el papel de *IRS2* en la comunicación entre CEH-CPH a través de FGF7, se llevó a cabo el cocultivo a largo plazo de la línea celular de CEH, LX-2 sh-*luciferasa* (control)/LX-2 sh-*IRS2* (con silenciamiento de *IRS2*) con la línea celular HepaRG. Tras el cocultivo se evaluó el efecto del silenciamiento de *IRS2* en LX-2 a lo largo del tiempo (día 2,6,10 y 14) en la población de LX-2, mediante análisis de expresión de *FGF7*, *FGF10* y *FGF22* y también en la población de HepaRG mediante el análisis de la expresión de los marcadores de epitelización *FGFR2b* y de *APOA2* (**Figura 25A**). Mientras que el análisis de expresión de *FGF7* se mantuvo constante a lo largo de los 14 días de cocultivo de HepaRG con LX-2 sh-*luciferasa* (control), en el cocultivo de HepaRG con LX-2 sh-*IRS2* se observó una reducción exponencial de los niveles de expresión de *FGF7* siendo la diferencia entre ambos significativa a día 14 de cocultivo (**Figura 25B**). El análisis de expresión de *FGF10* experimentó una inducción de día 10 a día 14 en el cocultivo de HepaRG con LX-2 sh-*luciferasa* (control) que se vio reprimida por el silenciamiento de *IRS2* en LX-2 (**Figura 25B**). En el caso de FGF22, el silenciamiento de *IRS2* en LX-2 generó una reducción significativa del análisis de expresión en las etapas iniciales del cocultivo con HepaRG (día 2), que fue normalizándose respecto al control (LX-2 sh-*luciferasa*) a medida que avanzó el tiempo de cultivo (**Figura 25B**). Estos resultados demuestran que el silenciamiento de *IRS2* en LX-2 genera un defecto en la expresión de FGFs a lo largo del cocultivo con la línea HepaRG. La incapacidad de generar FGFs observada en la población LX-2 sh-*IRS2* durante el cocultivo, coincidió con un descenso significativo de los niveles de expresión de *FGFR2b* en la población de HepaRG de día 10 a día 15 respecto al cocultivo con LX-2 sh-*luciferasa* (control) (**Figura 25B**).

Capítulo 4. Resultados

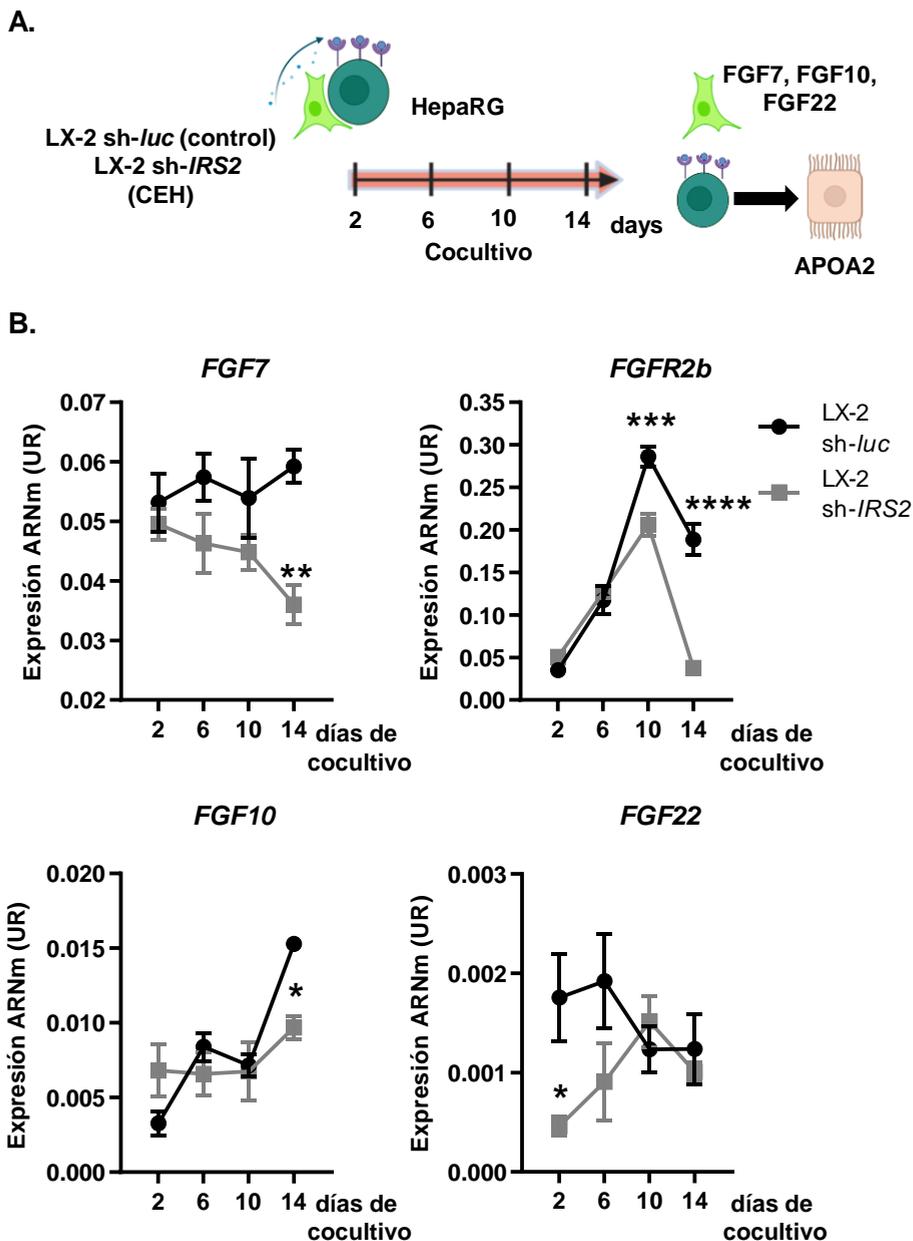


Figura 25. El silenciamiento de *IRS2* en LX-2 impide la comunicación heterotípica mediada por FGF7-FGFR2b en el cocultivo de LX-2 y HepaRG.

(A) Diagrama del procedimiento. Autoría propia, "Created with BioRender.com". (B) Análisis por RT-qPCR de la expresión de *FGF7*, *FGF10*, *FGF22* y *FGFR2b* a día 2, 6, 10 y 14 del cocultivo de HepaRG con LX-2 control sh-*luciferasa* (sh-*luc*) o con LX-2 con silenciamiento estable de *IRS2* (sh-*IRS2*) n=4 con duplicados experimentales. Los datos representan la

Continuación **Figura 25**: media + SEM *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Sidak's para comparaciones múltiples) (B).

El análisis de expresión de la evolución de *APOA2* de día 2 a 14 del cocultivo en presencia de insulina impidió el aumento en el análisis de expresión de *APOA2* a lo largo de la diferenciación, demostrando que el defecto en la expresión de *FGF7* del cocultivo con LX-2 sh-*IRS2* desencadena en un fallo de epitelización en la población de HepaRG (**Figura 26A**). La ausencia de insulina reprimió la inducción en *APOA2* en la línea HepaRG, incluso en el cocultivo con LX-2 sh-*luciferasa* (control) (**Figura 26A**). Esto podría deberse a que, tal y como se ha demostrado en la **Figura 21**, la respuesta de *FGFR2b* a *FGF7* en HepaRG es dependiente de insulina, por lo que, en ausencia de ésta, se corta el bucle de inducción *FGF7-FGFR2b* provocando un fallo en la epitelización. Por último, el marcaje por inmunofluorescencia del cocultivo a largo plazo situó a las islas HepaRG *FGFR2+* en contacto con células LX-2 (Faloidina+) productoras de *FGF7* (**Figura 26B**).

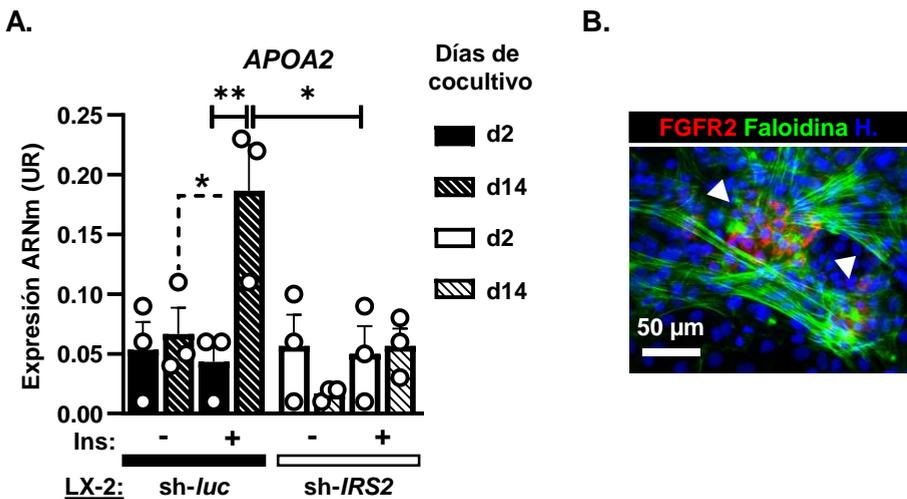


Figura 26. El silenciamiento de *IRS2* en LX-2 durante el cocultivo impide la epitelización en HepaRG mediada por la comunicación *FGF7-FGFR2b*.

(A) Análisis por RT-qPCR de la expresión de *APOA2* de día 2-14 del cocultivo de HepaRG con LX-2 control sh-*luciferasa* (sh-*luc*) o con LX-2 con silenciamiento estable de *IRS2* (sh-*IRS2*) como indicador de la respuesta a *FGF7* y de los niveles de epitelización en HepaRG (n=3 con duplicados experimentales). (B) Imagen de inmunofluorescencia obtenida tras 14 días de cocultivo en las mismas condiciones descritas en (A). Las islas *FGFR2+* en la línea HepaRG emergen en las zonas de contacto con LX-2 (Faloidina+). Los datos representan la

Capítulo 4. Resultados

Continuación de **Figura 26**: media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis Tukey's para comparaciones múltiples) (C).

Estos datos demuestran que la línea LX-2 expresa *FGF7* de manera dependiente a *IRS2* para promover el bucle de inducción positiva por el que *FGF7* induce la expresión de *FGFR2b* en la línea HepaRG y por consiguiente su epitelización, confirmando un novedoso papel de *IRS2* como regulador de la comunicación heterotípica a través de *FGF7*-*FGFR2b* (**Figura 27**).

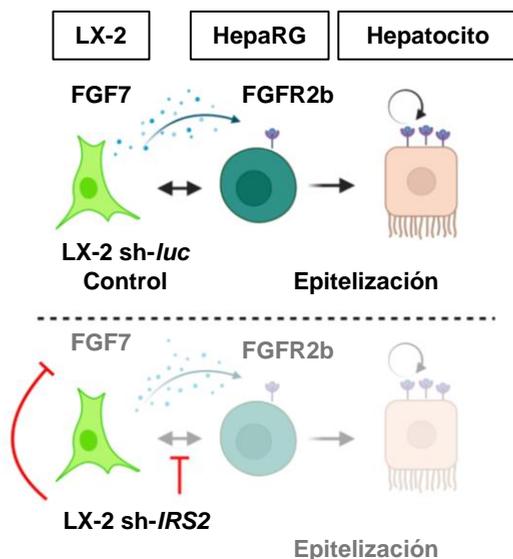


Figura 27. El silenciamiento de *IRS2* en CEH impide la producción de FGFs rompiendo el bucle de inducción de *FGFR2b* y generando un defecto en la epitelización.

Modelo resumen de los hallazgos generados hasta el momento en este trabajo sobre la comunicación entre CEH y CPH a través de *FGF7* y su papel en la epitelización (parte superior) y cómo se ve afectada por el silenciamiento de *IRS2* en CEH (parte inferior). Autoría propia, "Created with BioRender.com".

4.3.1.4 Las células LX-2 experimentan una reversión fibrogénica espontánea y dependiente de la expresión de *IRS2* durante el cocultivo con las células HepaRG

Resultados de este trabajo demuestran que la comunicación paracrina mediada por FGF7 se ve favorecida por el arresto celular en las CEHp con mitomicina C que simula su proceso de transdiferenciación durante la reversión fibrogénica. En base a esto, la represión en el análisis de expresión de *FGF7* en el cocultivo de HepaRG con LX-2 sh-*IRS2* podría deberse a un defecto en la reversión fibrogénica originado por el silenciamiento de *IRS2*. La reversión de las CEH conlleva una reducción de los genes fibróticos que constituyen la ECM [126] por lo que para evaluar esta hipótesis, se analizó la expresión de marcadores de fibrosis del cocultivo de HepaRG con LX-2 sh-luciferasa (control)/LX-2 sh-*IRS2*. La población de LX-2 sh-luciferasa (control) experimentó una reducción drástica del número de células (positivas para GFP) de día 6 a día 14 de cocultivo (**Figura 28**) a la vez que una reducción en los niveles de expresión de los marcadores de fibrosis colágeno alfa-1 tipo 1 (*COL1A1*) y de la actina α de músculo liso (*ACTA2*) (**Figura 29**). El silenciamiento de *IRS2* durante el cocultivo (LX-2 sh-*IRS2*) indujo una expansión de las células LX-2 sh-*IRS2* (positivas para GFP) (**Figura 28**) e impidió la reducción de *COL1A1* y de *ACTA2* a largo del tiempo (**Figura 29**) generando en contraposición un gran incremento en la expresión del marcador de fibrosis colágeno alfa-1 tipo 3 (*COL3A1*) (**Figura 29**) lo que evidencia una respuesta fibrogénica activada. Estos resultados demuestran que *IRS2* favorece la reversión fibrogénica de las células LX-2. Por otra parte, la ausencia de insulina no alteró la evolución de ninguno de los marcadores de fibrosis descritos, demostrando que *IRS2* actúa de manera independiente a la insulina en la regulación de la reversión fibrogénica de la línea LX-2, que podría estar modulada, en su lugar, por su homólogo IGF-1. Estos datos resaltan el potencial del modelo de cocultivo generado, que modela la reversión fibrogénica y nos permite estudiar los mecanismos involucrados en la regulación de esta. Por otra parte, estos datos también confirman que *IRS2* permite la expresión de *FGF7* (**Figura 25B**) durante la reversión fibrogénica (**Figura 30**) y generan la incógnita de si la expresión de *IRS2* sostiene la expresión de *FGF7* de manera directa o si ocurre de manera indirecta como consecuencia del efecto de la

Capítulo 4. Resultados

expresión de *IRS2* en la supervivencia de las CEH durante la reversión fibrogénica de la línea LX-2.

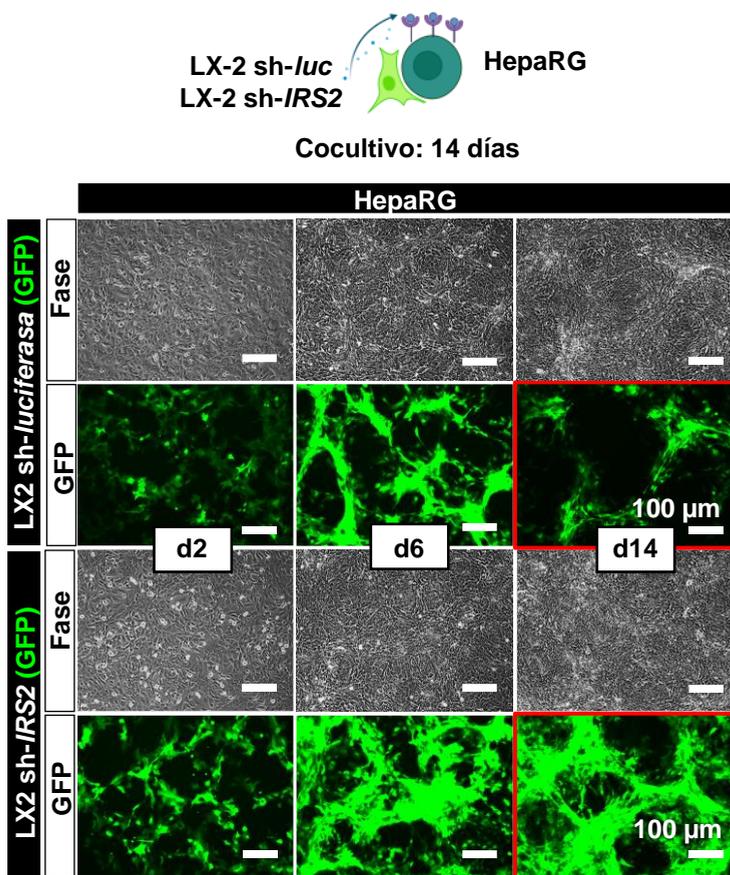


Figura 28. El silenciamiento de *IRS2* en LX-2 promueve su expansión durante el cocultivo con HepaRG.

Imágenes de campo claro y fluorescencia representativas de la evolución en la población de LX-2 control sh-*luciferasa* (sh-*luc*) y LX-2 sh-*IRS2* (silenciamiento de *IRS2*), ambas marcadas por el reportero GFP, a lo largo del cocultivo con la línea HepaRG (día 2,6,14). El recuadro rojo marca las imágenes del tiempo final en las que la diferencia entre el cocultivo con LX-2 sh-*luciferasa* y con LX-2 sh-*IRS2* se observa más pronunciada. Autoría propia, "Created with BioRender.com".

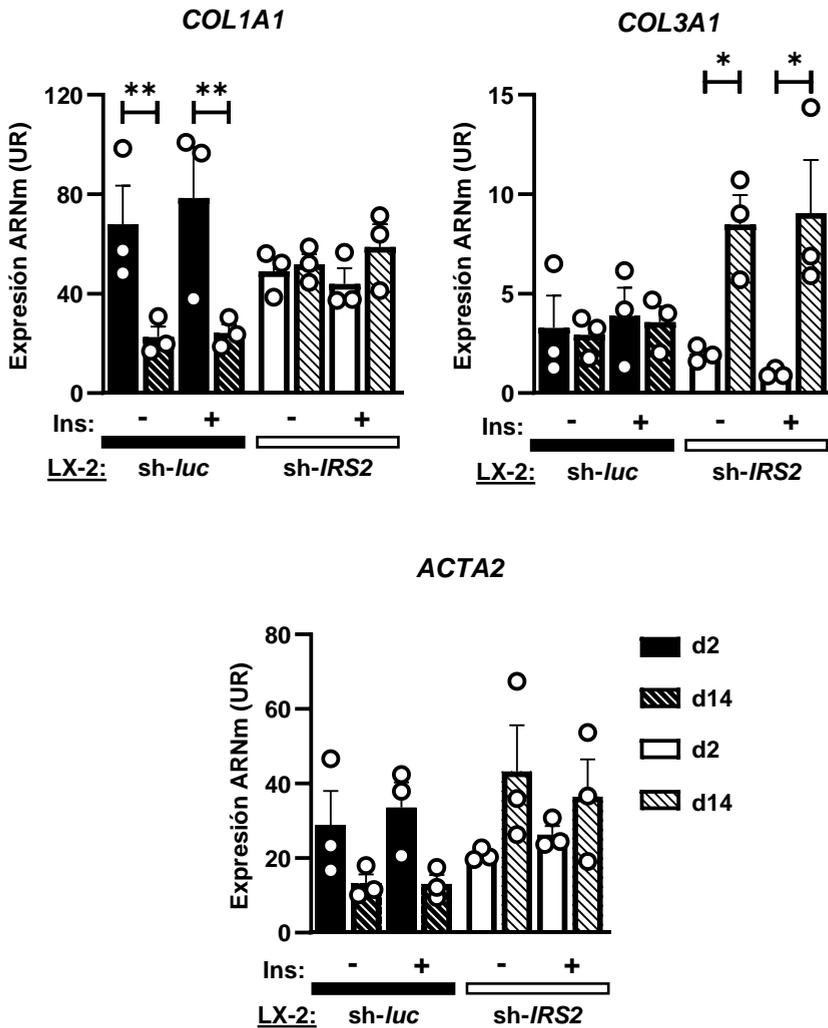


Figura 29. El silenciamiento de *IRS2* en LX2 impide su reversión durante el cocultivo con HepaRG.

Análisis por RT-qPCR de la evolución en la expresión de los marcadores de fibrosis *COL1A1*, *ACTA2*, *COL3A1* desde el inicio (día 2) al final (día 14) del cocultivo de LX-2 control *sh-luciferasa* (*sh-luc*)/*sh-IRS2* (silenciamiento de *IRS2*) con HepaRG (n=3 con duplicados experimentales). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples).

Capítulo 4. Resultados

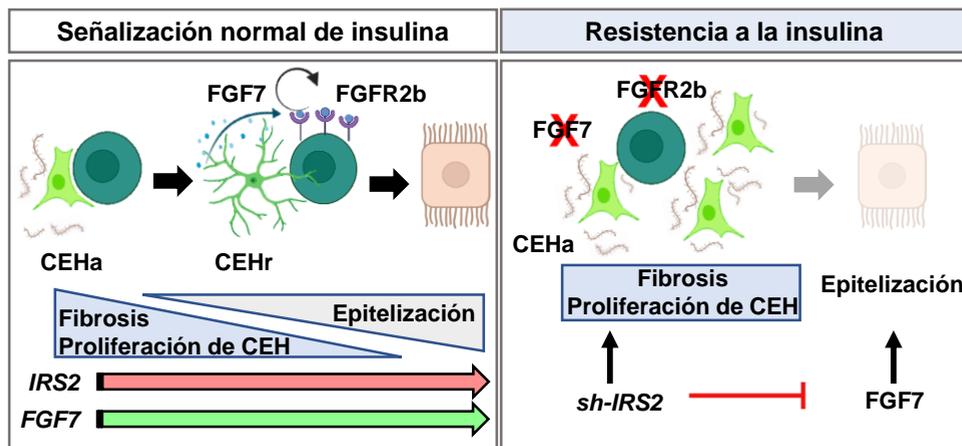


Figura 30. Modelo representativo del papel de *IRS2* en el nicho de CEH durante el cocultivo con HepaRG.

Una señalización de insulina/IGF-1 defectuosa (resistencia a la insulina) en el nicho de las CPH (silenciamiento de *IRS2* en CEH) impide la reversión fibrogénica de las CEH generando una fibrosis sostenida que reprime la producción de FGF7 y por tanto la epitelización mediada por FGF7 en la población de CPH. Autoría propia. "Created with BioRender.com".

4.3.2 La línea HepaRG como modelo de estudio de la comunicación paracrina a través de FGF7

Resultados previos del laboratorio demuestran que la diferenciación de la línea HepaRG hasta hepatocitos es dependiente de insulina e *IRS2* [268]. A medida que avanza la diferenciación, la expresión de *IRS2* (*pIRS2-GFP*) queda limitada espacialmente a las zonas no epiteliales (E-CADHERINA-) que se encuentran estableciendo contacto estrecho con las zonas epiteliales (hepatocitos (E-CADHERINA+) (**Figura 31A**) de manera similar a la disposición que se ha descrito en este trabajo que adquiere el nicho de CEH (FGF7+) durante el cocultivo (**Figura 24C**) sugiriendo la existencia de una subpoblación *IRS2*+ en línea HepaRG que podría constituir un microambiente para las islas de hepatocitos.

4.3.2.1 La expresión de *IRS2* en HepaRG correlaciona con la de *FGF7* y promueve la epitelización

Para evaluar la función de las células *IRS2*⁺ en la regulación de la comunicación paracrina a través de *FGF7* se empleó la línea HepaRG con expresión de *GFP* tras el promotor de *IRS2* (*pIRS2-GFP*) en etapas tardías de la diferenciación (a día 25) para separar mediante FACS las células con elevada expresión de *IRS2* (*GFP*⁺) y con baja expresión de *IRS2* (*GFP*⁻) y se evaluó la expresión de *FGF7* y de *FGFR2b* en ambas poblaciones. El análisis de la expresión de *FGF7* y *FGFR2b* mostró que la expresión endógena de *IRS2* es directamente proporcional a la de *FGF7*, pero inversamente proporcional a la expresión de *FGFR2b* (**Figura 31A**) demostrando que el patrón de expresión de *IRS2* marca a la población *FGF7*⁺ en la línea HepaRG. La sobreexpresión estable y a largo plazo de *Irs2* (secuencia de ADN murino con eficacia comprobada en líneas humanas **Tabla 3**) en HepaRG (HepaRG Lenti-*Irs2*) generó, no solo un aumento significativo en la expresión de *FGF7*, sino también en la expresión de *FGFR2b*, e incrementó la epitelización con respecto a la línea HepaRG control aumentando el tamaño de las islas de hepatocitos y el marcaje por inmunofluorescencia de los marcadores de hepatocitos HNF4 α y ALBÚMINA (**Figura 31B**). Estos datos sugieren que la sobreexpresión estable y a largo plazo de *Irs2* en HepaRG (HepaRG Lenti-*Irs2*) es capaz de fomentar el bucle de inducción positiva *FGF7*-*FGFR2b* promoviendo la epitelización, evidenciando la existencia de una comunicación paracrina mediada por *FGF7* endógeno en la línea de células progenitoras HepaRG. Por otro lado, también demuestran la existencia de una subpoblación *IRS2*⁺ no epitelial, es decir, *FGFR2b*⁻, y productora de *FGF7* en la línea HepaRG y establecen cierto paralelismo entre dicha subpoblación no epitelial que rodea a las islas de HepaRG (*IRS2*⁺ y *FGF7*⁺) y el nicho constituido por las CEH en modelo de cocultivo estudiado hasta el momento, demostrando que en ambos la expresión de *IRS2* resulta esencial para la población productora de *FGF7*. El papel del nicho *IRS2*-*FGF7*^{+/+} en la epitelización del cultivo HepaRG se evaluará en el siguiente apartado.

Capítulo 4. Resultados

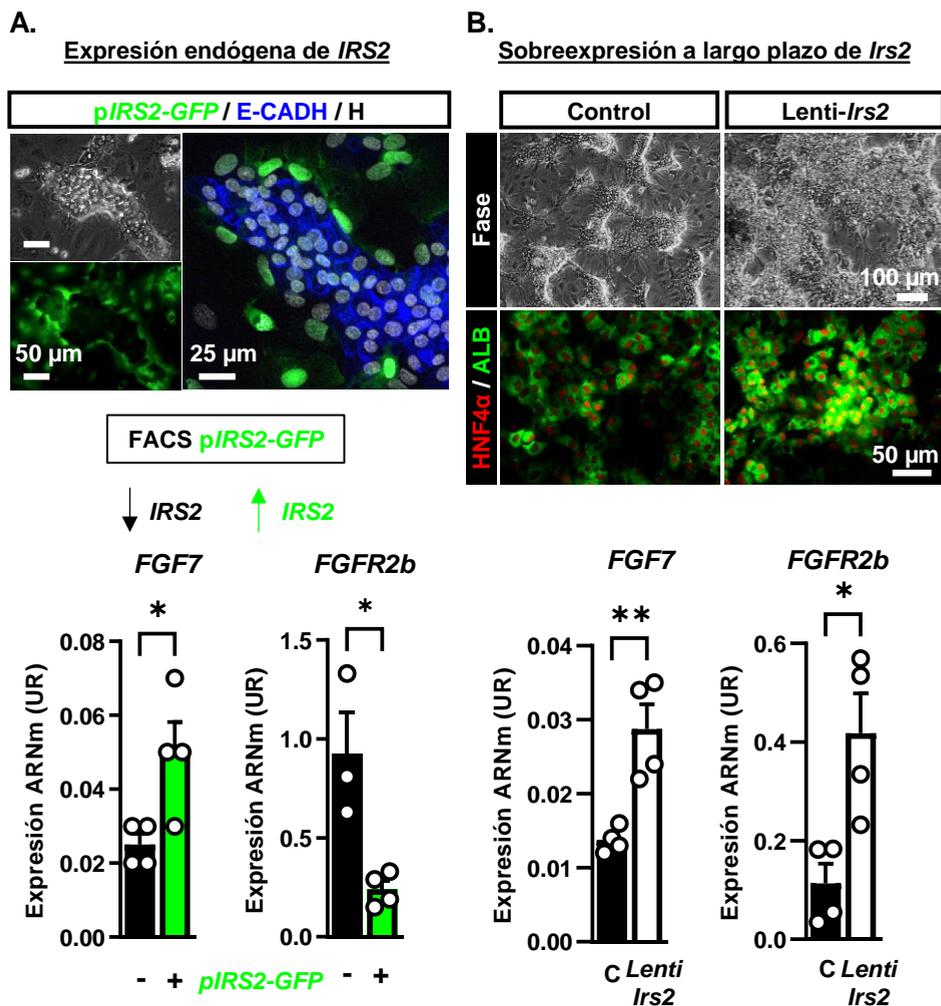


Figura 31. La expresión de *IRS2* en HepaRG correlaciona con la de *FGF7* y promueve la diferenciación.

(A) Imágenes de contraste de fases y de inmunofluorescencia confocal que representan la localización de *IRS2* endógeno (GFP+) en el cultivo de HepaRG rodeando a las islas epiteliales marcadas con E-CADHERINA (E-CADH) a día 25 de la diferenciación. H=Hoechst. Análisis por RT-qPCR de la expresión de *FGF7* y *FGFR2b* a día 15 de la diferenciación en las poblaciones de HepaRG *pIRS2-GFP*^{+/-} (altos niveles de *IRS2*/bajos niveles de *IRS2*) (n=4). (B) Imágenes de contraste de fases y de inmunofluorescencia confocal (proyección máxima) representativas del aumento en el tamaño de las islas de hepatocitos (marcadas con HNF4 α y Albúmina (ALB)) tras la sobreexpresión estable de *Irs2* (Lenti-*Irs2*) respecto a las células HepaRG control a d15 de diferenciación. Análisis RT-QPCR de la expresión de *FGF7* y *FGFR2b* en HepaRG control y Lenti-*Irs2* a d15 de diferenciación (n=4). Los datos representan la media + SEM. *p-valor<0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis Test-t no pareado.

4.3.2.2 La sobreexpresión de *Irs2* actúa de específicamente sobre la subpoblación no epitelial (APOA2-) en la línea HepaRG para promover su epitelización y la expresión de FGF7

Los resultados del apartado anterior evidencian la existencia una subpoblación IRS2+ en la línea HepaRG que es capaz de producir FGF7 y recrear la comunicación paracrina fomentando el bucle de inducción FGF7-FGFR2b descrito en este trabajo. Así pues, la línea HepaRG se convierte en etapas tardías de la diferenciación en un modelo mixto de hepatocitos (epiteliales) con una subpoblación (no epitelial) que puede llevar a cabo de manera endógena la transición mesenquimal-epitelial (MET) y con ello la diferenciación hacia islas epiteliales de hepatocitos. Aunque es posible que el aumento en la epitelización observado en la línea HepaRG Lenti-*Irs2* derive de un incremento en la comunicación paracrina a través de FGF7, no se puede descartar que se deba a un efecto directo de *Irs2* en la MET o a efectos autónomos de célula de la sobreexpresión de *Irs2* en la población de hepatocitos. Para estudiar el mecanismo mediante el que la sobreexpresión de *Irs2* induce la epitelización del cultivo de HepaRG se empleó la línea reportera con expresión de GFP tras el promotor del marcador hepatocítico APOA2 (HepaRG *pAPOA2-GFP*) a día 25 de diferenciación (tardía) para separar por FACS, en base a sus niveles de GFP, las dos subpoblaciones del cultivo: no epitelial (baja expresión de *APOA2-GFP*) y epitelial (alta expresión de *APOA2-GFP*) y se evaluó el efecto de la sobreexpresión de *Irs2* en cada población por separado (**Figura 32A**). La sobreexpresión de *Irs2* generó un aumento significativo en el análisis de expresión de *FGF7* en la población no epitelial que no se observó en la población de epitelial (**Figura 32B**), demostrando por primera vez que *Irs2* induce la expresión de *FGF7* y reforzando los resultados obtenidos en el modelo de cocultivo en los que el silenciamiento de *IRS2* en el nicho (CEH) impidió la expresión de *FGF7*. El análisis de expresión también corroboró la existencia de dos poblaciones a nivel de epitelización en la línea HepaRG detectándose a nivel basal en la subpoblación no epitelial una menor expresión de los marcadores epiteliales *HNF4 α* , *E-CADH* y *ALBÚMINA* (**Figura 33**). Más importante, el estudio reveló un papel de *Irs2* como inductor de la MET en la población no epitelial que experimentó un incremento en la expresión de *HNF4 α* , *E-CADH* y *ALBÚMINA* tras la sobreexpresión de *Irs2*,

Capítulo 4. Resultados

alcanzando niveles de epitelización similares a los detectados en la población epitelial que se mantuvo invariable tras la sobreexpresión de *Irs2* (Figura 33).

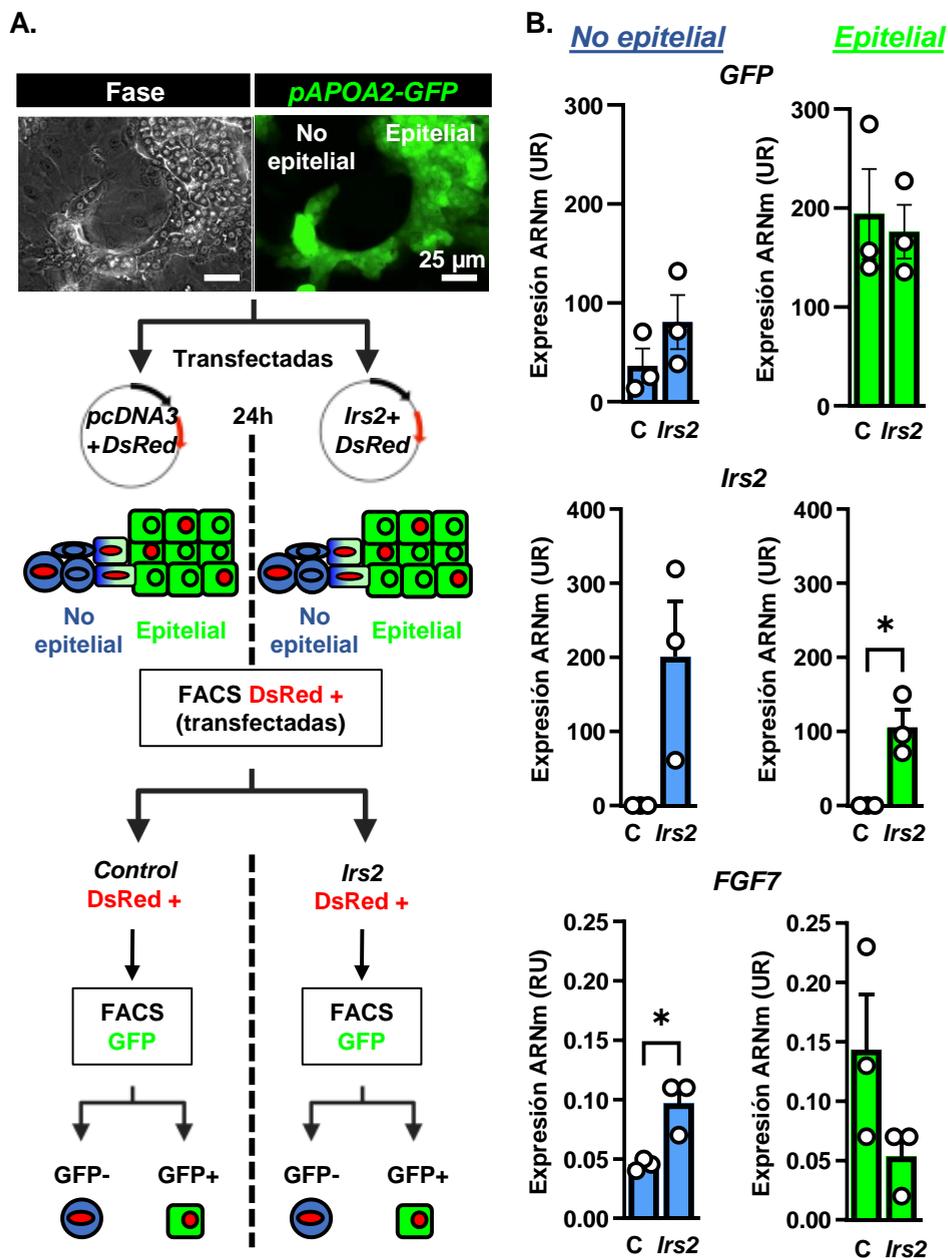


Figura 32. La sobreexpresión de *Irs2* actúa en la subpoblación no epitelial (APOA2-) de la línea HepaRG pAPOA2-GFP para inducir la expresión de *FGF7*.

Continuación **Figura 32**: (A) Diagrama del procedimiento experimental. A día 24 de la diferenciación la línea HepaRG pAPOA2-GFP se cotransfectó el cultivo con el vector plasmídico *DsRed* y el vector plasmídico pcDNA3 (control) o pcDNA3-*Irs2* (sobreexpresión de *Irs2*). Las células se recogieron a día 25 (tras 24h de transfección) para seleccionar por FACS las células transfectadas (*DsRed*+) y separarlas posteriormente por FACS de nuevo en dos poblaciones: bajos niveles de *APOA2-GFP* (no epitelial) y altos niveles de pAPOA2-GFP+ (epitelial/hepatocitos). Autoría propia. (B) Análisis RT-qPCR de *GFP* e *Irs2* (para comprobar la eficacia del procedimiento) y de *FGF7* (n=3). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis Test-t no pareado (B).

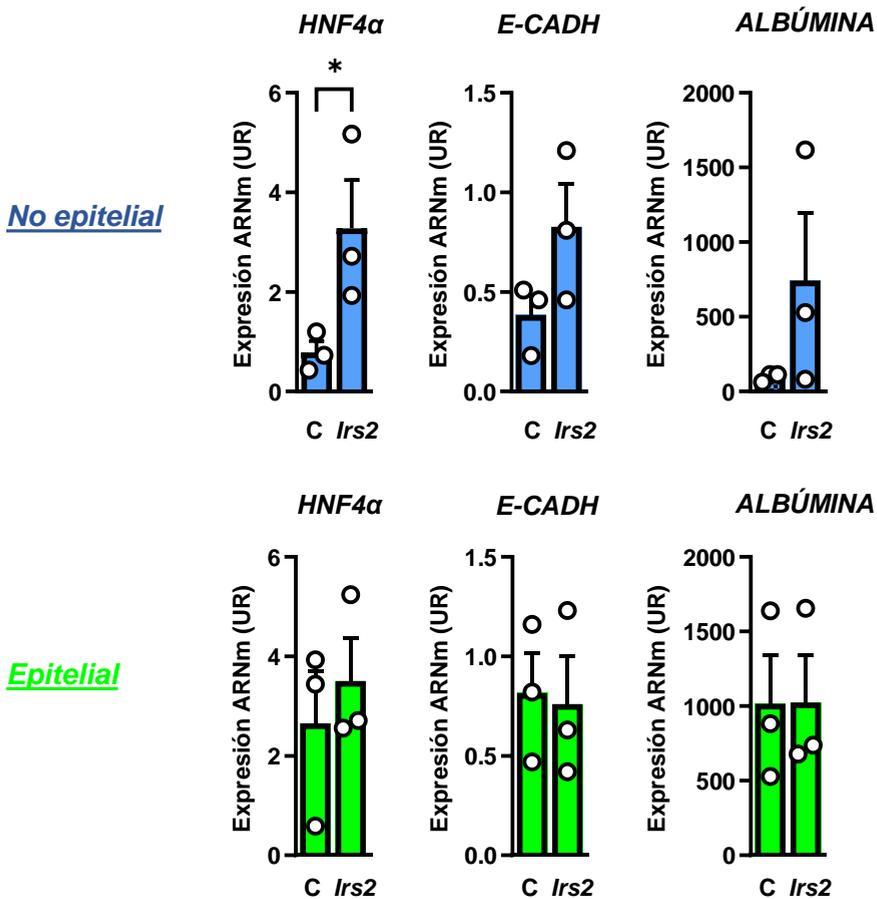


Figura 33. La sobreexpresión de *Irs2* actúa de manera específica en la subpoblación no epitelial (*APOA2*-) de la línea HepaRG pAPOA2-GFP para inducir la expresión de marcadores hepatocíticos.

Análisis RT-qPCR de los marcadores hepatocíticos *HNF4α*, *E-CADHERINA* (*E-CADH*) y *ALBÚMINA* en las muestras generadas según el protocolo descrito en la Figura 32 (n=3). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis Test-t no pareado.

Capítulo 4. Resultados

Estos datos confirman que la expresión de *Irs2* induce la epitelización de las células HepaRG actuando específicamente sobre la subpoblación no epitelial para (1) inducir la expresión de *FGF7* y (2) promover la MET pudiendo este segundo mecanismo ser dependiente o independiente de la inducción en *FGF7* (**Figura 34**).

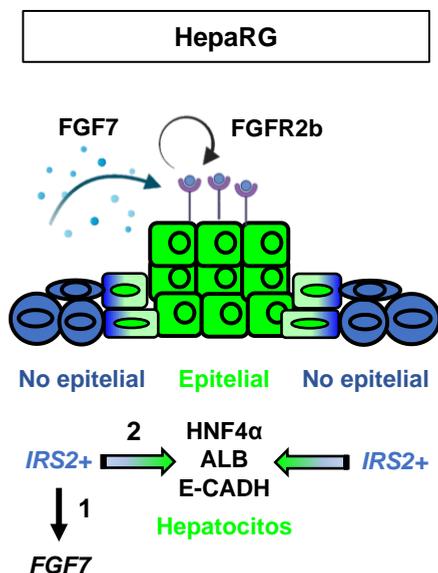


Figura 34. Modelo representativo del papel de IRS2 en la línea celular HepaRG.

(1) IRS2 induce la expresión de *FGF7* en la subpoblación no epitelial de la línea HepaRG (APOA2-) y el bucle de inducción positiva de *FGFR2b* (evidenciado en HepaRG Lenti-*Irs2*) promoviendo la epitelización del cultivo. (2) IRS2 induce la expresión de marcadores epiteliales (*HNF4α*, *ALB*, *E-CADH*) en la subpoblación no epitelial de la línea HepaRG (APOA2-) actuando como inductor de la MET mediante un mecanismo que podría ser dependiente o independiente de la inducción en *FGF7*.

4.4 Bloque 4. Mecanismo molecular del eje IRS2-FGF7 en CEH

Los resultados descritos hasta el momento desvelan el engranaje de procesos mediante los que la expresión de *IRS2* modula la comunicación entre CEH y CPH a través de FGF7 para promover la epitelización de las CPH. Entre ellos, el descubrimiento de que *IRS2* es indispensable en las CEH para la expresión de *FGF7* es uno de los mecanismos cruciales ya que inicia el bucle de inducción de la expresión de *FGFR2b* en CPH que sostiene la comunicación entre ambas poblaciones para promover la epitelización. Por ello, se dedicó el presente apartado a estudiar los mecanismos moleculares mediante los que la expresión de *IRS2* regula la expresión de *FGF7* en CEH.

4.4.1 La sobreexpresión de *Irs2* en la línea HepaRG genera una inducción en la señalización de NRF2 como huella de transcripción más marcada

La sobreexpresión de *Irs2* en LX-2 mediante un sistema estable de infección con lentivirus (Lenti-*Irs2*) resultó ineficiente, perdiéndose a lo largo de los pases celulares [276]. Debido a la imposibilidad de sobreexpresar *Irs2* en LX-2 y una vez descubierta la especificidad de acción de *IRS2* sobre la subpoblación no epitelial y productora de FGF7 en línea HepaRG, se empleó la línea HepaRG Lenti-*Irs2* para evaluar posibles mecanismos moleculares aguas abajo de *IRS2* en la regulación de FGF7. Un análisis transcriptómico de enriquecimiento funcional GSEA para comparar los datos de expresión diferencial obtenidos por *microarray* en las líneas celulares HepaRG y HepaRG Lenti-*Irs2* (sobreexpresión estable de *Irs2*) con el conjunto de datos de factores de transcripción de la base de datos *The Molecular Signal Database*, reveló a la cascada de respuesta a estrés oxidativo dirigida por el factor de transcripción NRF2 (**Figura 35**) como la huella transcriptómica más marcada al sobreexpresar de *Irs2* en HepaRG. NRF2 es extensamente conocido por promover la supervivencia celular y además ha sido ya establecido como inductor de la expresión de miembros de la subfamilia de FGF7 en fibroblastos de piel [244], lo que le convierte en una potencial diana para mediar el papel de *IRS2* en la supervivencia de la población FGF7.

Capítulo 4. Resultados

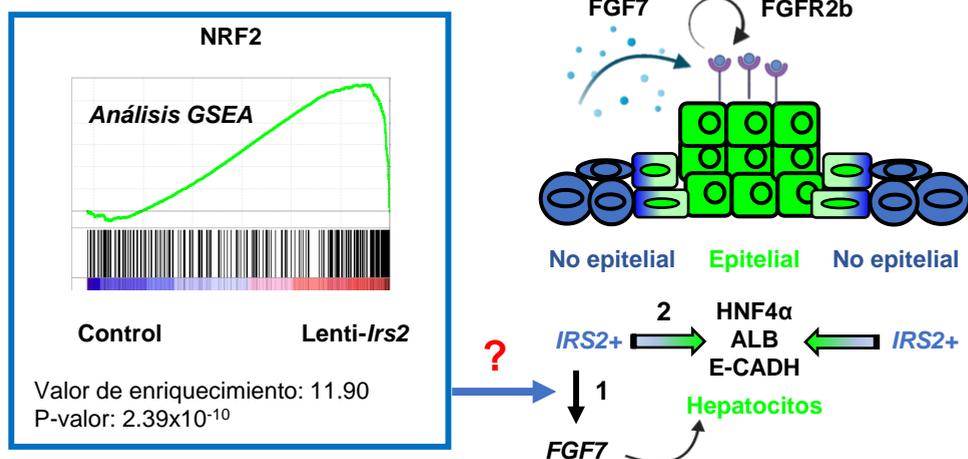


Figura 35. La activación de la señalización de NRF2 es la huella transcriptómica más marcada tras la sobreexpresión de *Irs2* en HepaRG.

Modelo resumen de la hipótesis a testar. Se evaluará a NRF2 como mediador de la expresión de FGF7 aguas abajo de IRS2 en células no epiteliales. Contiene el diagrama de enriquecimiento GSEA de la señalización de NRF2 al comparar HepaRG (control) con HepaRG Lenti-*Irs2* a día 9 de la diferenciación (n=3) (datos previos generados por el Dr. Luke Noon).

4.4.2 La sobreexpresión de *Irs2* induce la actividad de NRF2, reduce el estrés oxidativo y promueve la acumulación de P62 en HepaRG

Los datos del apartado anterior señalan a NRF2 como un posible mediador del papel de *IRS2* como regulador de FGF7. NRF2 es el factor de transcripción encargado de inducir la expresión de numerosas enzimas detoxificantes que actúan como defensa frente al estrés oxidativo, aumentando de este modo la supervivencia celular [277][278]. Se conocen dos mecanismos de regulación de NRF2 en hígado, la ruta canónica y la ruta no canónica [279] (**Figura 36B**). La finalidad de este apartado será evaluar la capacidad de *IRS2* para regular la activación de NRF2. El factor de transcripción NRF2 actúa uniéndose a una secuencia del genoma conocida como Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE). Para determinar si la sobreexpresión de *Irs2* promueve la actividad de NRF2 se transfectaron las líneas celulares HepaRG control y Lenti-*Irs2* con un vector plasmídico con expresión de *luciferasa* tras el promotor ARE (ARE-*luc2P*) de modo que la señal de luz generada por

luciferasa es proporcional a la actividad de NRF2. Las medidas de luciferasa se normalizaron a la eficiencia de transfección con las medidas obtenidas al co-transfectar con un vector plasmídico con expresión constitutiva de *renilla luciferasa* obteniendo la medida denominada como ARE-Luciferasa. La sobreexpresión estable de *Irs2* duplicó la actividad de NRF2 en HepaRG (**Figura 36A**) a pesar de reducir significativamente los niveles de estrés oxidativo cuantificados en base a la actividad total de las enzimas SOD1/2/3 (**Figura 36C**), sugiriendo que la activación de NRF2 no ocurre a través de la ruta canónica (**Figura 36B**). Se evaluó la capacidad de la insulina-*Irs2* para modular la actividad de NRF2 a través de la ruta no canónica mediada por P62 (**Figura 36B**). Aunque todavía no existen estudios que demuestren que P62 regula la actividad de NRF2 en las CPH o en su nicho, la acumulación de P62 resulta esencial para la diferenciación de CPH hasta hepatocitos [280] e inhibe la activación fibrótica de las CEH [281], ambos fenotipos observados aguas abajo de IRS2 en este trabajo y caracterizados como esenciales para la correcta epitelización dirigida por el nicho de las CPH. La señalización de insulina-IRS2 es una de las principales vías de inhibición del flujo autofágico [282] [283]. Para testar si la señalización de insulina-*Irs2* promueve la acumulación de P62 a través de un bloqueo en la autofagia, se analizaron los niveles proteicos de P62 en HepaRG control y Lenti-*Irs2* tras 4h de estimulación con insulina. La inhibición del flujo autofágico generada por el tratamiento con NH₄Cl y Leupeptina se empleó como control positivo de la acumulación de P62 generada por un bloqueo en la autofagia en HepaRG. La estimulación con insulina en HepaRG control indujo un aumento significativo en los niveles proteicos de P62, que alcanzaron un valor muy similar al obtenido tras silenciar farmacológicamente la autofagia (**Figura 36D.1 y D.2**). La sobreexpresión estable de *Irs2* en HepaRG (Lenti-*Irs2*) generó una acumulación constitutiva de P62 incluso en ausencia de insulina, que se mantuvo invariable aun tras el tratamiento con inhibidores de la autofagia, indicando que la sobreexpresión de *Irs2* es capaz de generar un bloqueo total de la autofagia en HepaRG (**Figura 36D.1 y D.2**). Se observó también colocalización de P62 y *pIRS2-GFP* en el cultivo de HepaRG (**Figura 36E**). Estos datos demuestran que *Irs2* es capaz de promover la actividad de NRF2 en HepaRG y señalan a la ruta no canónica de activación de NRF2 dirigida por P62 como mediadora del eje IRS2-NRF2 en HepaRG.

Capítulo 4. Resultados

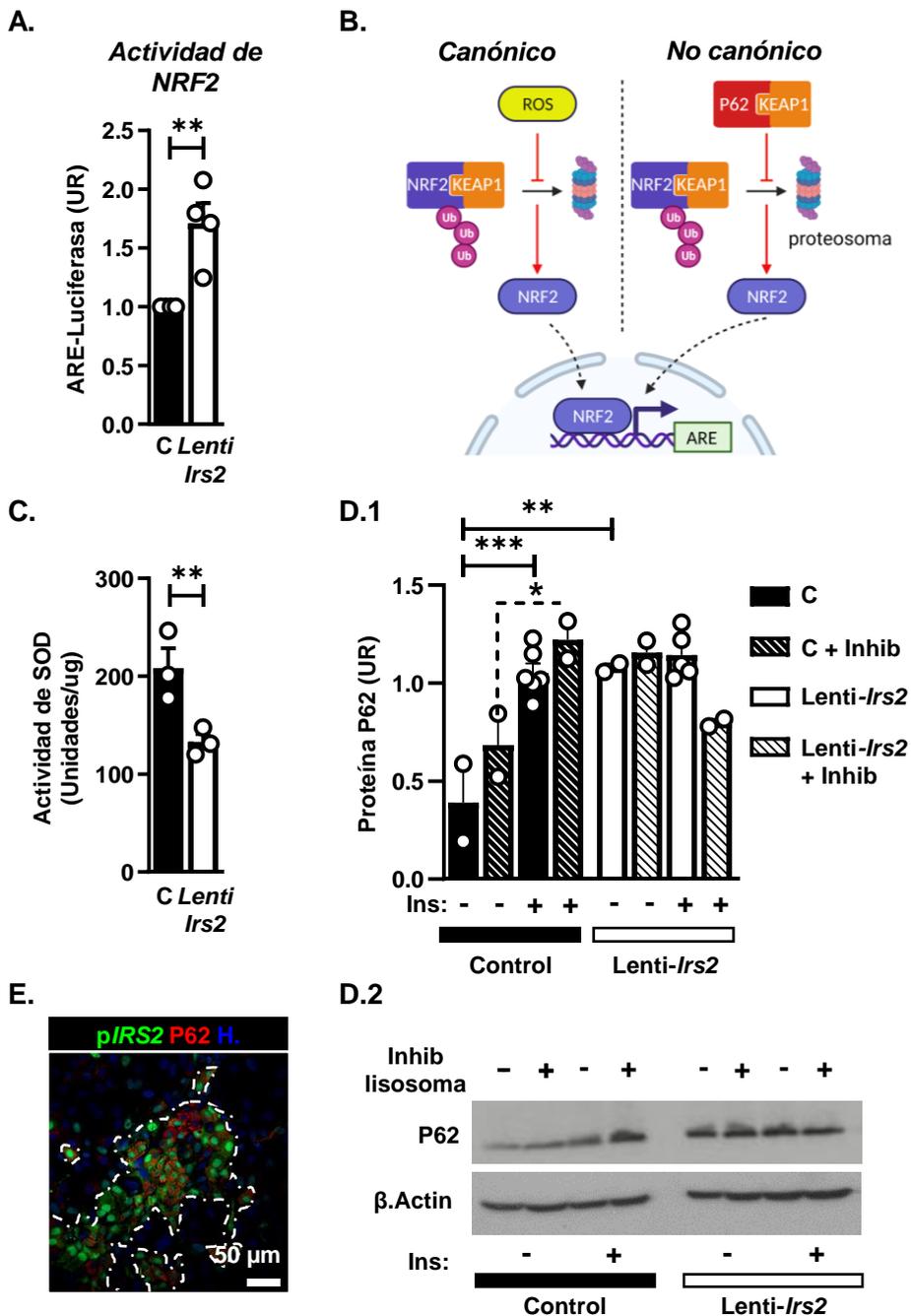


Figura 36. La sobreexpresión de *Irs2* a largo plazo (Lenti-*Irs2*) en HepaRG induce la actividad de NRF2 reduce los niveles de estrés oxidativo (SOD) y promueve una acumulación constitutiva de P62.

Continuación Figura 36: (A) Gráfica representativa de la señal de luz emitida por luciferasa, reportera del Elemento de Respuesta al Estrés oxidativo (ARE) al que se une NRF2 para activar la expresión de sus genes diana, una vez normalizada a la señal de luz emitida por renilla. Se midió 24h después de la cotransfección con los vectores *Renilla* y el vector *ARE-luc2P* en HepaRG control y Lenti-*Irs2* (n=4 con duplicados experimentales). (B) Diagrama representativo de las dos rutas conocidas de activación de NRF2 en hígado. Autoría propia, "Created with BioRender.com". (C) Actividad de SOD total (SOD extracelular, SOD Cu/Zn, SOD Mn) en HepaRG control y Lenti-*Irs2* a día 14 de la diferenciación (n=3 con duplicados experimentales). (D) Análisis por *western blot* (D.2) y cuantificación (D.1) de la acumulación de P62 en extracto celular total tras la estimulación con insulina (5 nM) durante 1h (tras 3h de ayuno) y la sobreexpresión de *Irs2* (Lenti-*Irs2*) en la línea celular HepaRG a día 14 de la diferenciación. Como control positivo del bloqueo en la autofagia se empleó el tratamiento conjunto con los inhibidores del lisosoma NH₄Cl (200μM) y Leupeptina (100μM) en paralelo a la estimulación con insulina durante 1h (+ Inhib) (n=2-6). (E) Imágenes de inmunofluorescencia confocal que representan la colocalización de P62 con pIRS2-GFP en HepaRG (día 14 de diferenciación). Las líneas discontinuas marcan la colocalización. Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis Test-t no pareado (A) y (C) y un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (D).

4.4.3 P62 regula la actividad de NRF2 y participa en la supervivencia celular en HepaRG

Los resultados del apartado anterior sugieren que la expresión de *Irs2* podría estar regulando la actividad de NRF2 en CPH a través de P62. Sin embargo, el papel de P62 como regulador de la actividad de NRF2 todavía no ha sido evaluado en CPH, sino únicamente en hepatocitos [225]. Con el fin de demostrar la existencia de la ruta no canónica de regulación de NRF2 en CPH se generó una línea celular estable de HepaRG con silenciamiento inducible de *P62* reportero de GFP (HepaRG sh-*inducible-GFP-P62*). La inducción del silenciamiento con doxiciclina fue efectiva en tan solo 48h de tratamiento, quedando esto evidenciado por la expresión reportera de GFP que fue detectada en un 67.88% de células vivas por citometría (**Figura 37A**) (**Figura 14A**) y por una reducción casi total de los niveles de la proteína P62 detectada por *western blot* en comparación con los controles de células HepaRG Lenti-sh-*inducible P62* sin tratar con doxiciclina (**Figura 37B.1 y B.2**). La reducción de los niveles de P62 generó una disminución significativa de los niveles de proteína de NRF2 total (**Figura 37B.1 y B.2**) que en ausencia de P62 quedaría unida a KEAP1 y sería degradada en el proteasoma. Los niveles proteicos de NQO1, una de las principales dianas de transcripción de NRF2, también se redujeron

Capítulo 4. Resultados

significativamente, reflejando que el silenciamiento de *P62* disrumpe la actividad de NRF2 (Figura 37B.1 y B.2)

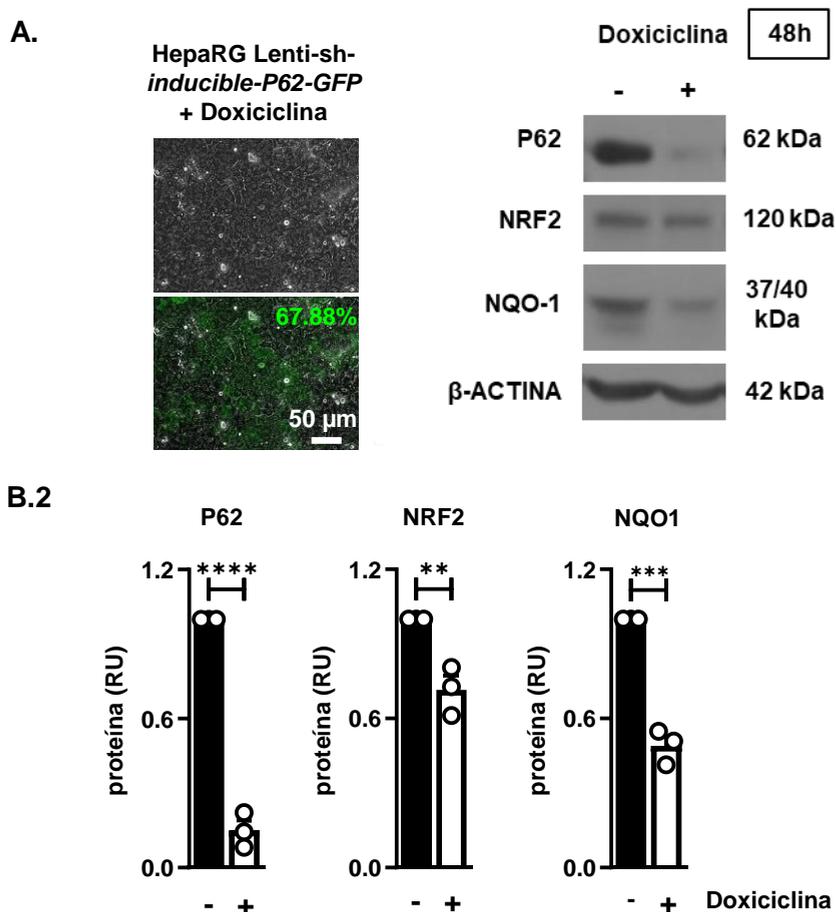


Figura 37. El silenciamiento de *P62* (48h) en HepaRG reduce la actividad de NRF2.

(A) Imágenes de contraste de fases y de la inducción en la fluorescencia de GFP (reportera del silenciamiento en *P62*) que se genera tras el tratamiento con doxiciclina (250 ng/mL) durante 48h, de día 13-15 de la diferenciación en las células HepaRG Lenti-sh-inducible-*P62-GFP*. (B) Análisis por *western blot* (B.1) y cuantificación (B.2) de las proteínas indicadas a partir de extractos celulares totales generados con las condiciones descritas en (A) y sus controles sin tratamiento con doxiciclina. (B.1) Cuantificación de la abundancia proteica en B (n=3).

Un análisis por citometría de los niveles de GFP, reportero del silenciamiento de *P62*, demostró que el silenciamiento a largo plazo de *P62* induce muerte celular durante la diferenciación de la línea celular HepaRG Lenti-sh-*inducible-P62-GFP*, viéndose el porcentaje de células GFP+ reducido desde un 46% a día 4 del silenciamiento de *P62* y de la diferenciación, a un 38,28% a día 8 y quedando únicamente un 19% de células GFP+ vivas a día 11 del silenciamiento de *P62* y de la diferenciación (**Figura 38A**). No se observaron diferencias en el marcaje con yoduro de propidio (células muertas) entre la condición control y la tratada con doxiciclina en los diferentes tiempos, descartando un posible efecto tóxico del tratamiento con doxiciclina a largo plazo (**Figura 38B**). Estos datos demuestran por primera vez la existencia de una regulación no canónica de NRF2 mediada por P62 en el modelo de CPH HepaRG y sugieren que P62 podría ser esencial para la supervivencia de la línea HepaRG durante su diferenciación. Dado que datos anteriores de este trabajo demuestran que la señalización de insulina-*IRS2* es capaz de promover la acumulación de P62 (**Figura 36D.1 y D.2**) en la línea HepaRG, estos resultados sugieren que el eje P62-NRF2 podría actuar aguas abajo de *IRS2* en la regulación de la supervivencia de las células FGF7+.

Capítulo 4. Resultados

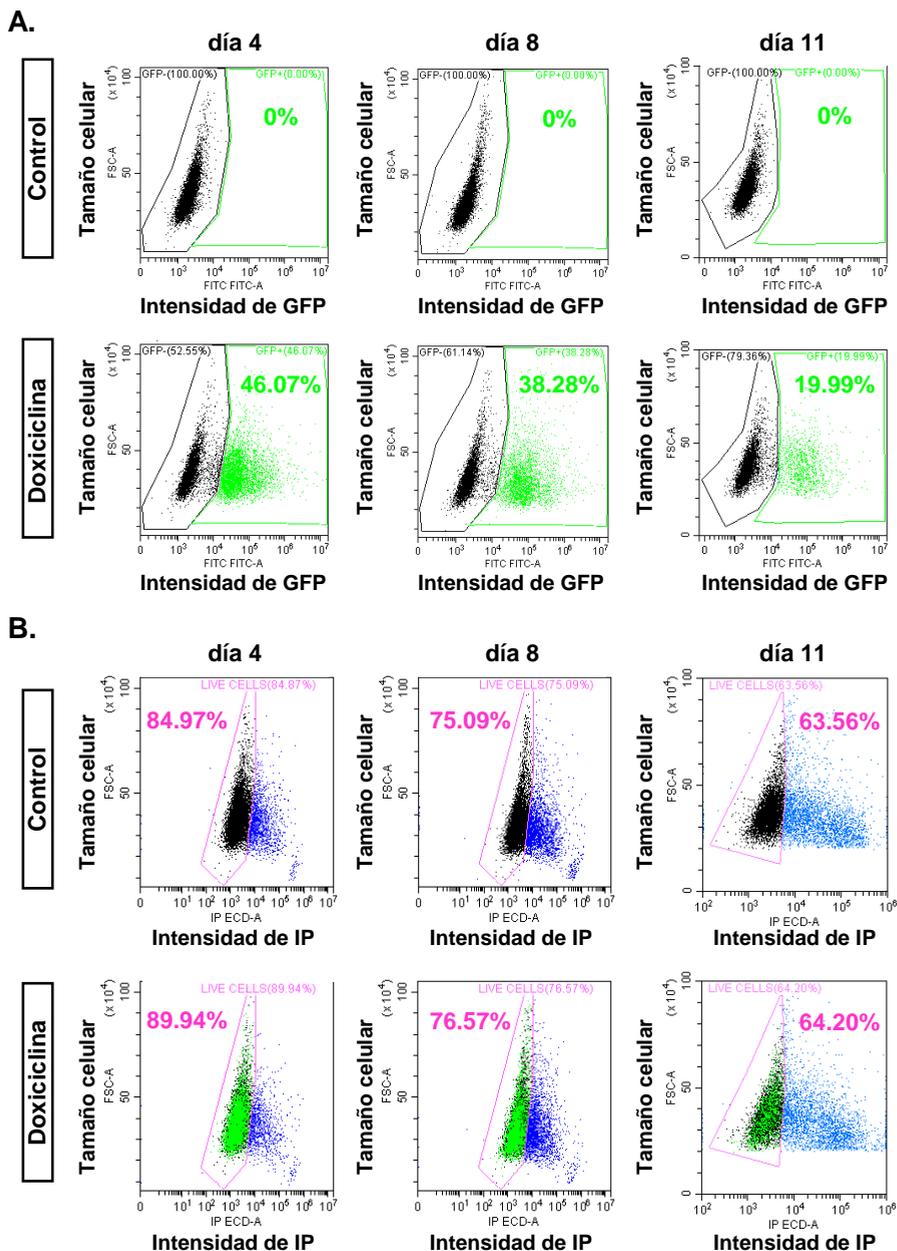


Figura 38. El silenciamiento de *P62* a lo largo de la diferenciación (día 4-11) reduce la viabilidad celular en la línea HepaRG.

Análisis por citometría de (A) el porcentaje de células GFP+ (con silenciamiento de *P62*) y (B) el porcentaje de células vivas (negativas para yoduro de propidio (IP)) durante el tratamiento a largo plazo con doxiciclina (500 ng/mL) a lo largo de la diferenciación de HepaRG sh-*inducible-GFP-P62* (días 4-8-11).

4.4.4 Una sobreexpresión a corto plazo de *Irs2* (24h) es suficiente para inducir la actividad de NRF2 y la expresión de *FGF7* en HepaRG

Para confirmar que NRF2 es una diana directa de la sobreexpresión de *Irs2* en HepaRG y que su inducción no deriva de efectos indirectos generados por la sobreexpresión de *Irs2* a largo plazo (como el aumento en la epitelización) se transfectó simultáneamente el sistema ARE-*luc2P* con el vector control vacío (pcDNA3) o bien con el vector para la sobreexpresión de *Irs2* (pcDNA3-*Irs2*) (**Figura 39A**). La sobreexpresión de *Irs2* durante 24h cuatriplicó la actividad de ARE-Luciferasa respecto al control (pcDNA3) (**Figura 39B**) revelando a NRF2 como nueva diana de *Irs2* en HepaRG. La inducción en NRF2 ocurrió en paralelo con un aumento significativo en el análisis de expresión de *FGF7* (**Figura 39C**) sugiriendo un papel del eje IRS2-NRF2 en la subpoblación no epitelial y productora de FGF7 descubierta en la línea HepaRG. Estos datos establecen también un nuevo modelo de estudio a corto plazo (24h) del eje IRS2-NRF2 y de sus mecanismos de regulación.

Capítulo 4. Resultados

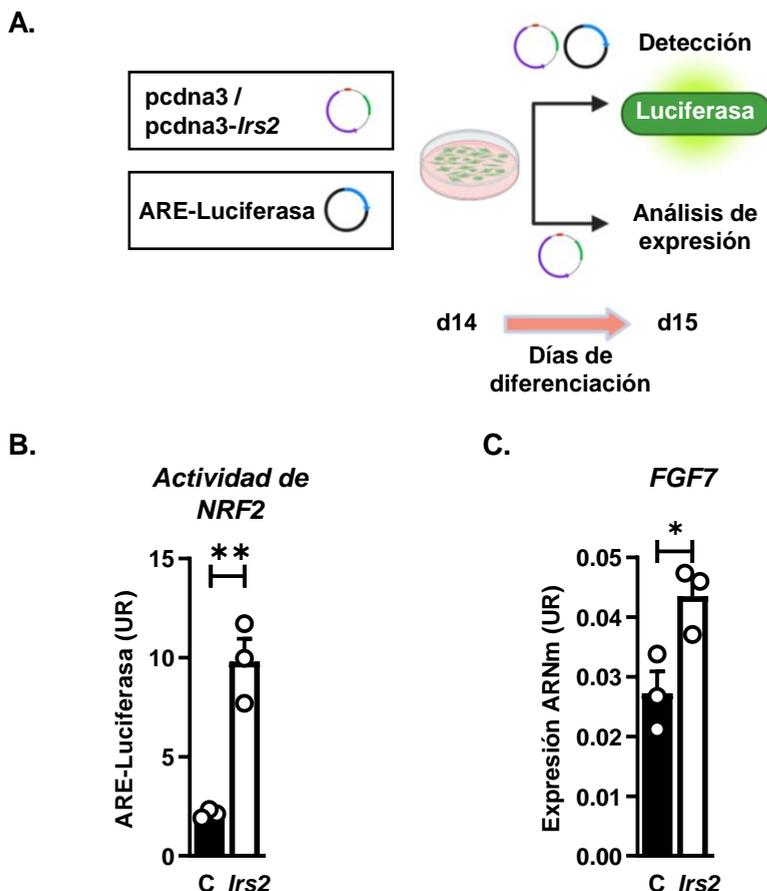


Figura 39. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) induce la actividad de NRF2 en HepaRG y promueve la expresión de FGF7.

(A) Diagrama representativo del procedimiento seguido al transfectar células HepaRG de día 14 a día 15 de la diferenciación de la línea HepaRG para generar los datos de (B) y (C). Autoría propia, "Created with BioRender.com". (B) Gráfica representativa de la señal de luz emitida por luciferasa una vez normalizada a la señal de luz emitida por renilla tras 24h cotransfección del vector pcDNA3 vacío (control (C)) o el vector de sobreexpresión de *Irs2* (pcDNA3-*Irs2*) con el vector *Renilla* y el vector *ARE-luc2P* reportero del Elemento de Respuesta al Estrés oxidativo (ARE). (C) Análisis por RT-qPCR de la expresión de *FGF7* tras 24h de transfección del vector pcDNA3 vacío (control (C)) o el vector de sobreexpresión de *Irs2* (pcDNA3-*Irs2*) en HepaRG. Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05 (B) y (C) n=3 con duplicados experimentales. Para comparar medias se utilizó un análisis Test-t no pareado.

4.4.5 La sobreexpresión de *Irs2* no actúa a través de *P62* para inducir la actividad de NRF2 en HepaRG

Una vez demostrado que la sobreexpresión de *Irs2* promueve la acumulación de *P62*, y que *P62* es capaz de regular a NRF2 en HepaRG, el siguiente paso fue evaluar si *P62* media la inducción en NRF2 generada por la sobreexpresión de *Irs2*. Para ello, y una vez demostrada su efectividad, se empleó el modelo de sobreexpresión a corto plazo de *Irs2*, puesto a punto en apartado anterior, en la línea celular HepaRG sh-*inducible-GFP-P62*. La sobreexpresión de *Irs2* se comenzó tras 24h de inducción del silenciamiento de *P62* con el tratamiento con doxiciclina (250 ng/mL) que se mantuvo durante las 24h posteriores de sobreexpresión de *Irs2* hasta que se recogió la muestra (**Figura 40A**). El silenciamiento de *P62* se mantuvo, por tanto, durante 48h en total manteniendo las condiciones descritas en la **Figura 37**, que fueron suficientes para eliminar prácticamente la totalidad de la proteína *P62*. El silenciamiento de *P62* redujo en todas las réplicas, aunque no de forma significativa, la actividad basal de NRF2, confirmando que *P62* es capaz de regular a NRF2 en HepaRG, pero sugiriendo que la ruta no canónica no es el principal mecanismo de inducción de NRF2 en HepaRG (**Figura 40B**). Curiosamente, el silenciamiento de *P62* no impidió el aumento en la actividad de NRF2 generado por la sobreexpresión de *Irs2*, sino que, todo lo contrario, aumentó la capacidad de la sobreexpresión de *Irs2* para promover la actividad de NRF2 (**Figura 40B**). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de *Irs2* en HepaRG no actúa a través de *P62* para promover la actividad de NRF2, sino que, la activación de la ruta no canónica de NRF2 podría incluso interferir de manera negativa en el eje IRS2-NRF2. Es posible, por tanto, que la sobreexpresión de *Irs2* induzca a NRF2 a través de la ruta canónica, mediada por el estrés oxidativo, y que la reducción en los niveles de actividad de SOD detectada en HepaRG Lenti-*Irs2* (**Figura 36C**) sea simplemente un indicativo de la eficiencia del eje IRS2-NRF2 para contrarrestar el aumento en el estrés oxidativo.

Capítulo 4. Resultados

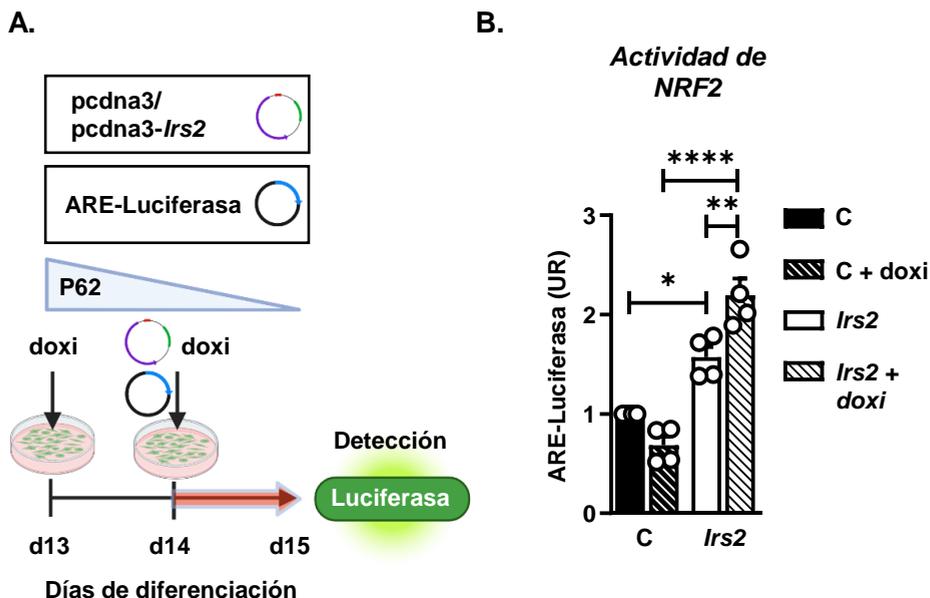


Figura 40. El silenciamiento de *P62* (48h) en HepaRG no impide la inducción en NRF2 que genera la sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h).

(A) Diagrama del procedimiento seguido al inducir el silenciamiento de *P62* con doxi (doxiciclina) 24h antes (día 13 de la diferenciación de la línea HepaRG) y durante la transfección de línea HepaRG de día 14 a día 15 para generar los datos de (B). Autoría propia, "Created with BioRender.com". (B) Gráfica representativa de la señal de luz emitida por luciferasa una vez normalizada a la señal de luz emitida por *Renilla* tras 48h de tratamiento con doxiciclina (250 ng/mL) y 24h de cotransfección del vector pcDNA3 vacío (control (C)) o el vector de sobreexpresión de *Irs2* (pcDNA3-*Irs2*) con el vector *Renilla* y el vector ARE-*luc2P* reportero del Elemento de Respuesta al Estrés oxidativo (ARE) (n=4 con duplicados experimentales). Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (B).

4.4.6 La sobreexpresión de *Irs2* no actúa a través de *P62* para inducir la actividad de NRF2 en LX-2

Ante la imposibilidad de sobreexpresar de manera estable *IRS2* en CEH, se empleó, en apartados anteriores, la línea celular HepaRG Lenti-*Irs2* como herramienta alternativa para testar posibles rutas de señalización por las que *IRS2* pudiese estar regulando la expresión de *FGF7* y la supervivencia de las células *FGF7*⁺. El estudio transcriptómico reveló a NRF2 como una potencial diana aguas abajo de *IRS2*. Una vez confirmado el vínculo *IRS2*-NRF2 en HepaRG, descartado a *P62* como elemento regulador del eje y determinado que actúa en paralelo con una inducción

en la expresión de *FGF7*, se continuó con el estudio en la línea celular LX-2. En primer lugar, se comprobó la existencia del eje IRS2-NRF2 descrito en HepaRG y se evaluó el posible papel de P62 en el mismo. Para ello, se generó una línea estable con silenciamiento inducible de *P62* en LX-2. El tratamiento durante 48h con doxiciclina indujo el silenciamiento de *P62* en el 47.27% de las células vivas en base a la señal del GFP reportero detectada por citometría (**Figura 14B**) y generó una reducción del 60% en los niveles proteicos de P62 detectados por *western blot* (**Figura 41A**). Replicando el procedimiento llevado a cabo con HepaRG sh-*inducible-GFP-P62* (**Figura 40A**), la sobreexpresión de *Irs2* en LX-2 incrementó 10 veces la actividad de NRF2 (detección de ARE-Luciferasa) respecto al control (**Figura 41B**). En concordancia con los datos obtenidos en HepaRG sh-*inducible-GFP-P62*, el silenciamiento de *P62* no impidió la inducción en NRF2 provocada por la sobreexpresión de *Irs2* (**Figura 41B**) descartando definitivamente a P62 como mediador del novedoso vínculo entre *Irs2* y NRF2. Estos datos confirman que la sobreexpresión de *Irs2* induce la actividad de NRF2 en el CEH (población productora de FGF7) y demuestran que lo hace de manera independiente a la ruta no canónica mediada por P62 sugiriendo que IRS2 induce la actividad de NRF2 a través de la ruta canónica mediada por un aumento en estrés oxidativo.

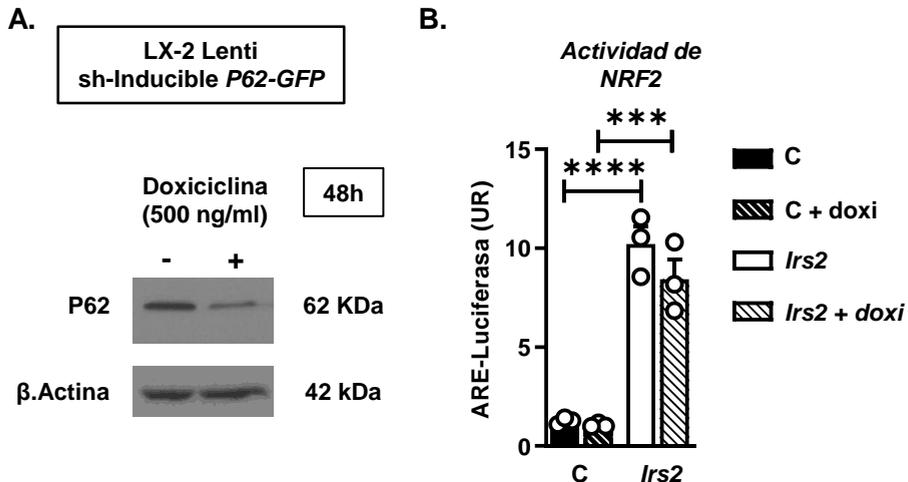


Figura 41. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) induce la actividad de NRF2 en LX-2 de manera independiente a *P62*.

Capítulo 4. Resultados

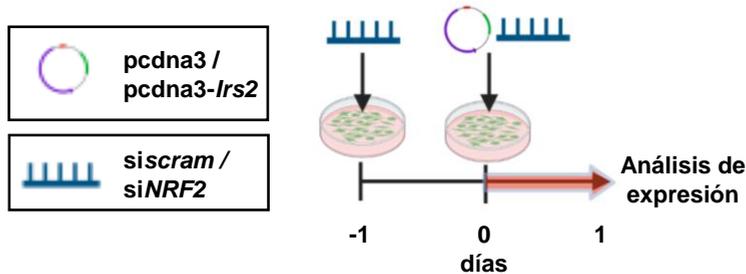
Continuación **Figura 41**: (A) Análisis por *western blot* de las proteínas indicadas a partir de extractos proteicos totales procedentes de células control LX-2 Lenti-inducible sh-*P62-GFP* (-doxiciclina) y tratadas durante 48h con doxiciclina (+doxiciclina) 500 ng/mL. (B) Gráfica representativa de la señal de luz emitida por luciferasa una vez normalizada a la señal de luz emitida por renilla 24h después de la cotransfección del vector pcDNA3 vacío (control (C)) o el vector de sobreexpresión de *Irs2* (pcDNA3-*Irs2*) con el vector *Renilla* y el vector *ARE-luc2P* reportero del Elemento de Respuesta al Estrés oxidativo (ARE) en LX-2 Lenti-Inducible sh-*P62-GFP* (n=3 con duplicados experimentales). Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (B).

4.4.7 El eje *Irs2-NRF2* promueve en LX-2 la expresión de los genes asociados con la remodelación de la ECM *FGF7* y *SERPINE1*

En piel, la activación de NRF2 en fibroblastos induce la expresión de diferentes genes remodeladores de la matriz extracelular, como *SERPINE1*, resultando en una ECM alterada. La remodelación en la ECM de la que forma parte *SERPINE1* es interpretada como una señal de reprogramación celular por las células vecinas resultando en una reducción los niveles de colágenos y en la inducción de un fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP) que promueve la expresión de citoquinas involucradas en la reparación de herida como *FGF7* e *interleucina 6* (*IL6*). El papel de *SERPINE1* aguas abajo de NRF2 en fibroblastos resulta crucial para activar el programa de senescencia [244]. El mecanismo descrito en fibroblastos de piel muestra una gran similitud con el proceso de reversión fibrogénica de las CEH que reduce también la expresión de colágenos, induce la expresión de *FGF7* y la reparación epitelial, y culmina, entre otros, con la activación de un programa de senescencia [284][285]. El objetivo del presente apartado fue testar la capacidad del eje *IRS2-NRF2* para regular al elemento a *SERPINE1* y la remodelación de la ECM por su potencial como mecanismo regulador de la inactivación/reversión fibrogénica y de la expresión de *FGF7* en las CEH. Para evaluar si el eje *IRS2-NRF2* induce la remodelación de la ECM en CEH se cotransfectó a la línea celular LX-2 durante 24h con los vectores plasmídicos pcDNA3 (control)/pcDNA3-*Irs2* (sobreexpresión de *Irs2*) y con el vector ARN pequeño de interferencia control (*siscram*) o silenciador de NRF2 (*siNRF2*). El silenciamiento de *NRF2* se realizó durante las 24h previas a la transfección con pcDNA3 (control)/pcDNA3-*Irs2* (sobreexpresión de *Irs2*) y se mantuvo durante las 24h siguientes hasta la recogida (**Figura 42A, Figura 43A**) observándose no solo una reducción significativa en el análisis de expresión de *NRF2* sino también una

represión en su actividad evidenciada por una disminución en el análisis de expresión de *NQO1*, una de sus principales dianas (**Figura 42B**).

A.



B.

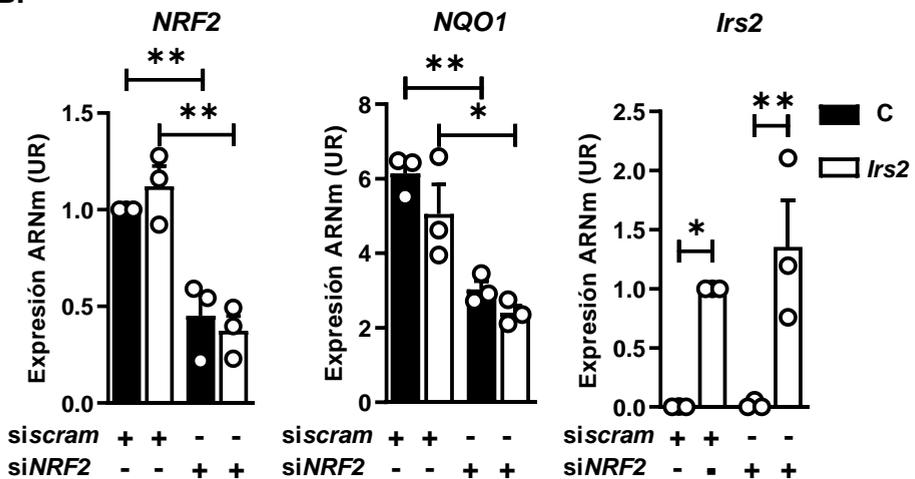


Figura 42. Eficiencia del silenciamiento de *NRF2* (48h) y de la sobreexpresión de *Irs2* (24h) a corto plazo en LX2.

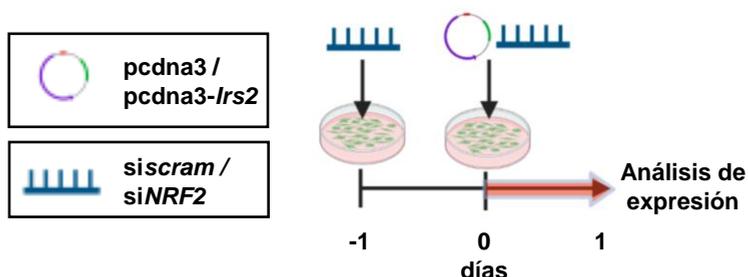
(A) Diagrama del procedimiento seguido al transfectar LX-2 para generar los datos de (B). Autoría propia, "Created with BioRender.com". (B) Análisis por RT-qPCR de la expresión de los genes indicados tras co-transfectar el vector control (C), pcDNA3, o el de sobreexpresión de *Irs2*, pcDNA3-*Irs2* (*Irs2*), junto con el vector ARN pequeño de interferencia contra *NRF2* (*siNRF2*) para inducir el silenciamiento de *NRF2* o con el vector ARN pequeño de interferencia control (*sisgram*) ($n=3$ con duplicados experimentales). Los datos representan la media + SEM. * p -valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (B).

La sobreexpresión durante 24h de *Irs2* generó una inducción significativa en el análisis de la expresión tanto de *SERPINE1* como de *FGF7* (**Figura 43B**) que, en ambos casos, quedó reprimida por el silenciamiento de *NRF2* (**Figura 43B**). El

Capítulo 4. Resultados

análisis de expresión de *IL6* también mostró una fuerte inducción tras la sobreexpresión de *Irs2* que no se vio afectado por el silenciamiento de *NRF2* (Figura 43B). Estos datos demuestran que *Irs2* actúa aguas arriba de *NRF2* en LX-2 para promover cambios en la ECM sugiriendo un nuevo mecanismo de acción por el que la sobreexpresión de *Irs2* podría regular la reversión fibrogénica-FGF7 en LX-2 a través de la reprogramación celular dirigida por la ECM aguas abajo de *NRF2*-SERPINE1. Este mecanismo, a pesar de presentar una gran similitud con el descrito en fibroblastos presentaría características específicas de tejido como la regulación de *IL6* que, en CEH, a pesar de estar inducida por *Irs2*, es independiente de *NRF2*.

A.



B.

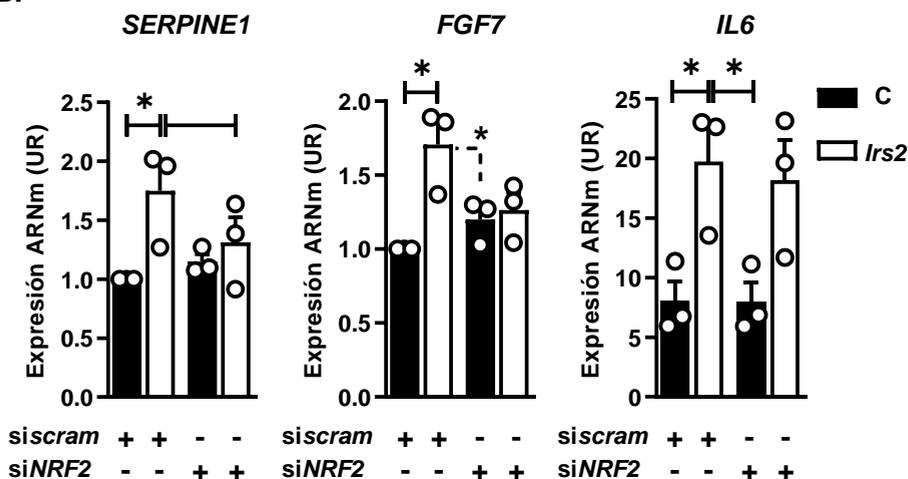


Figura 43. La sobreexpresión de *Irs2* (24h) a corto plazo actúa a través de *NRF2* en LX-2 para promover la expresión de los genes asociados con la remodelación de la ECM *SERPINE1* y *FGF7* y de manera independiente a *NRF2* para inducir la expresión en *IL6*.

Continuación Figura 43: (A) Diagrama del procedimiento seguido al transfectar LX-2 para generar los datos de (B). Autoría propia, “Created with BioRender.com”. (B) Análisis por RT-qPCR de expresión de los genes indicados tras co-transfectar el vector control (C), pcDNA3, o el de sobreexpresión de *Irs2*, pcDNA3-*Irs2* (*Irs2*), junto con el vector ARN pequeño de interferencia contra NRF2 (siNRF2) para inducir el silenciamiento de NRF2 o con el vector ARN pequeño de interferencia control (siscram) (n=3 con duplicados experimentales). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey’s para comparaciones múltiples) (B).

4.4.8 La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) es insuficiente para provocar la reversión fibrogénica en la línea LX-2

La finalidad del presente apartado fue evaluar la capacidad del eje *Irs2*-NRF2 - *SERPINE1* para inducir la reversión de LX-2. El proceso de reversión es muy complejo y resulta en una gran multitud de cambios que se ven reflejados a nivel morfológico y de expresión génica. Dado que la sobreexpresión durante 24h fue suficiente para inducir *FGF7* y *SERPINE1*, se comparó el fenotipo morfológico y de expresión génica generado por la sobreexpresión de *Irs2* durante 24h con el generado por la inhibición de la activación que experimentan las CEH tras la inhibición farmacológica de la autofagia con 3-MA. Para ello empleó la línea LX-2.

4.4.8.1 La activación del eje *Irs2*-NRF2 en CEH a corto plazo (24h) es insuficiente para inducir la morfología característica que provoca la reversión fibrogénica

En su estado quiescente las CEH presentan morfología elongada, con forma de “estrella” y con un citoplasma retraído que se extiende en forma de ramificaciones dendríticas hasta rodear a las células vecinas [286][121]. En presencia de daño hepático, las CEH quiescentes se activan experimentando un cambio dramático en su morfología que se convierte en plana y poligonal otorgándoles la capacidad de contraerse y proliferar [121][287][288]. Cuando finaliza el daño, las CEH activadas experimentan una reversión del fenotipo activado y adquieren una morfología muy similar a la quiescente original “estrellada” [289][126][290]. Curiosamente, la interacción de las CEH con los componentes de la ECM ha sido descrita como crucial para definir su morfología [291][287][292]. Dado que la línea LX-2 en estado basal se encuentra activada, se empleó el análisis de la morfología de las CEH tras la sobreexpresión de *Irs2* y el tratamiento con 3-MA (de manera independiente y

Capítulo 4. Resultados

conjunta) como indicador del efecto en la reversión de las CEH desde su estado activado a estado “quiescente”. Para sobreexpresar *Irs2* se empleó el sistema de transfección durante 24h descrito en el apartado anterior. Para evaluar únicamente la morfología de las células positivas para la transfección y, por tanto, para la sobreexpresión de *Irs2*, se co-transfectaron el vector pcDNA3 (control) o el vector de sobreexpresión de *Irs2* (pcDNA3-*Irs2*) con un vector reportero-GFP (pcdna-EGFP) y se evaluó únicamente la morfología de las células EGFP+. El bloqueo farmacológico de la autofagia con 3-MA durante 24h fue suficiente para revertir la morfología de LX-2 hacia una morfología “quiescente” observándose tanto en las imágenes de contraste de fases como en las imágenes de fluorescencia, la transición desde una morfología poligonal y aplanada, observada en el control, a una morfología con largas prolongaciones del citoplasma en forma de estrella tras el tratamiento con 3-MA (**Figura 44A**) que duplicó la longitud de las células analizadas con respecto al control (**Figura 44B**). La sobreexpresión de *Irs2* no afectó a la longitud de las células LX-2 (**Figura 44B**) pero aumentó el número de células EGFP+ por campo (**Figura 44C**) sugiriendo que la sobreexpresión de *Irs2* promueve o bien la proliferación o bien la supervivencia de la línea LX-2. La sobreexpresión de *Irs2* durante el tratamiento con 3-MA no alteró la transdiferenciación hasta la morfología quiescente promovida por 3-MA (**Figura 44B**). Sin embargo, el tratamiento con 3-MA fue suficiente para reprimir el aumento en el número de células EGFP+ por campo generado por la sobreexpresión de *Irs2* (**Figura 44C**) sugiriendo que la capacidad de la sobreexpresión *Irs2* para promover la supervivencia/proliferación de LX-2 desaparece una vez se completa su reversión fibrogénica. Estos resultados demostraron por primera vez que la reversión fibrogénica de la línea LX-2 generada por el tratamiento con 3-MA (10 mM) durante 24h queda reflejada en la morfología de las células LX-2 estableciendo un parámetro visual de comparación entre células activadas y revertidas. En base a este parámetro concluimos que la sobreexpresión de *Irs2* no induce a corto plazo (24h) una morfología característica de las etapas finales del proceso de reversión a estado quiescente en la línea celular LX-2.

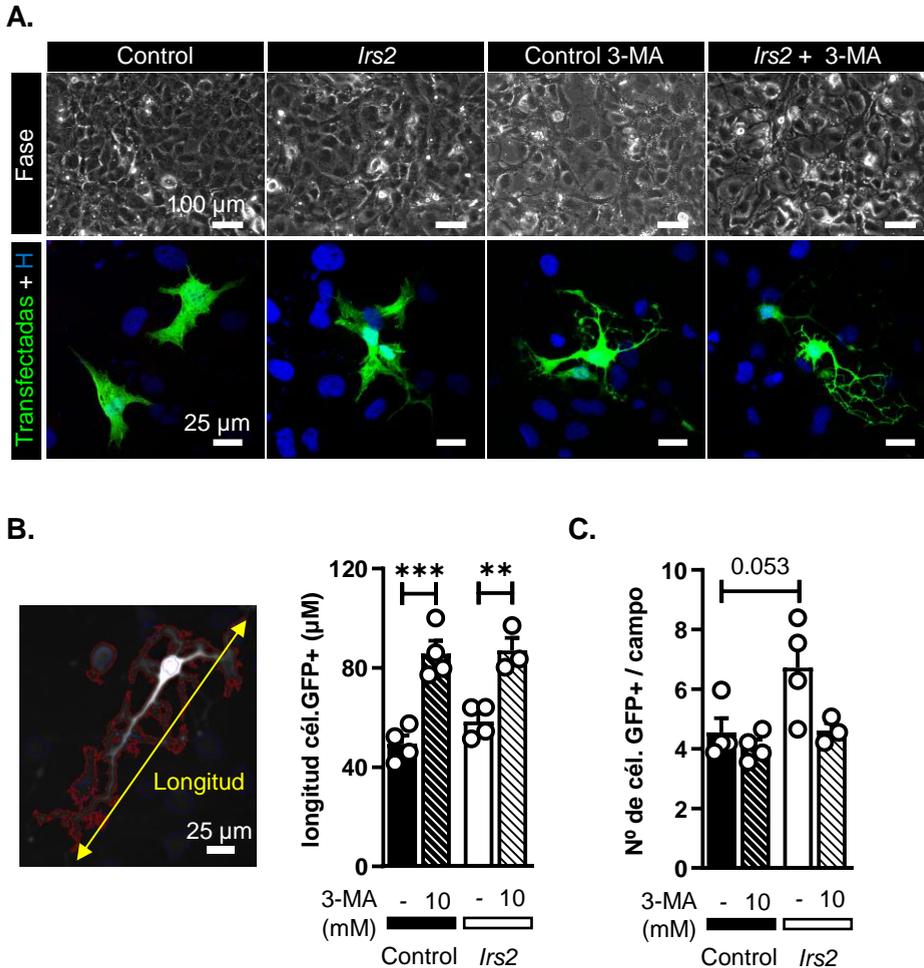


Figura 44. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) en LX-2 no genera una morfología característica de CEH quiescentes/revertidas, pero aumenta el número de células/campo.

(A) Imágenes representativas de contraste de fases y fluorescencia confocal (proyección máxima) del efecto generado en la morfología de las CEH activadas por la sobreexpresión de *Irs2* y el tratamiento con 3-MA, de manera independiente y conjunta durante 24h. Para identificar las células que incorporaron los plásmidos pcDNA3 (control) o pcDNA3-*Irs2* (sobreexpresión de *Irs2*) se cotransfectó con un vector reportero pcDNA-EGFP (control) (transfectadas). (B y C) Cuantificación de la longitud y del número de cél. (células) /campo “transfectadas” (EGFP+) en las condiciones descritas en (A) con el software *IN cell analyser 2200* tomando longitud como la medida en μm de la línea recta entre los dos extremos más alejados de la extensión total de la célula (n=4, con un total de 120 imágenes (20X) analizadas por condición). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey’s para comparaciones múltiples) (B).

Capítulo 4. Resultados

4.4.8.2 La huella de expresión generada por la sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) difiere de la generada por la reversión fibrogénica inducida por el tratamiento con 3-MA en la línea LX-2

El bloqueo farmacológico de la autofagia con 3-MA durante 24h generó un aumento dependiente de dosis (5, 10,15 mM) del marcador de senescencia *P53*, y de la proteína anti-apoptótica de choque térmico *HSPA1b*, previamente identificada como marcador de inactivación y que participa en la supervivencia de las CEH [126], a la vez que disminuyó también de manera dependiente de dosis los niveles de expresión del marcador de fibrosis *COL1A1* evidenciando una correcta reversión fibrogénica por el tratamiento con 3-MA (**Figura 45**). La sobreexpresión de *Irs2* impidió el aumento en *P53* generado por el bloqueo en la autofagia y aumentó a nivel basal los niveles de expresión del marcador de supervivencia *HSPA1b* (**Figura 45**) sustentando el papel de IRS2 como inductor de la supervivencia en LX-2 en estado de reversión.

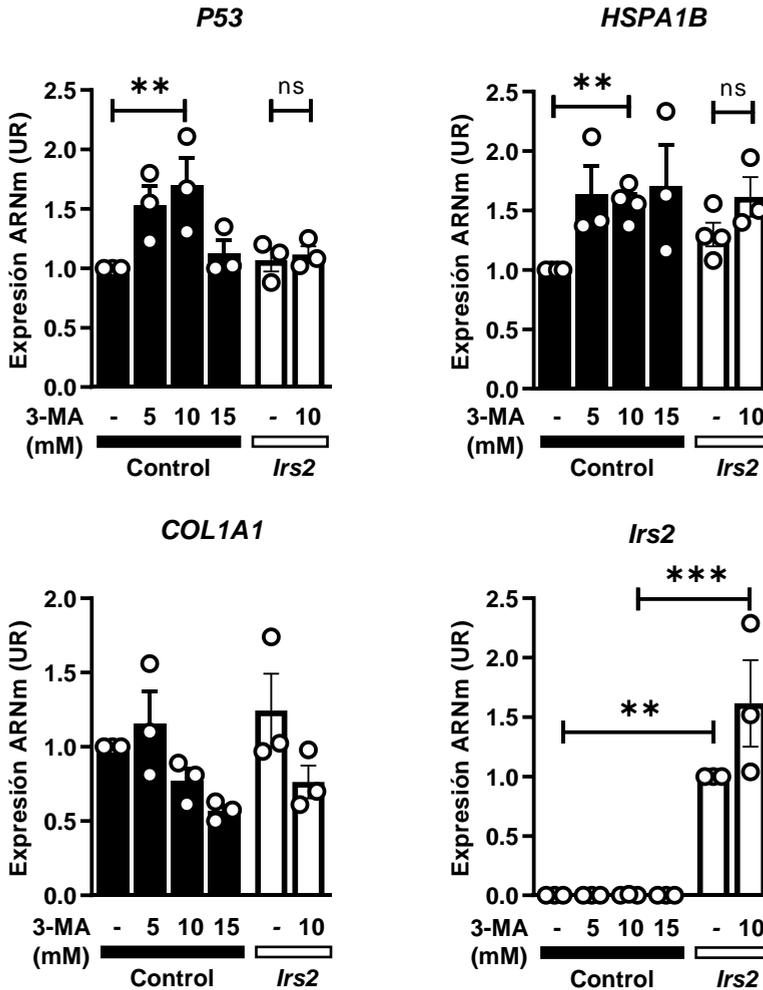


Figura 45. La sobreexpresión de *Irs2* a corto plazo (24h) reprime la inducción en *P53* generada por la reversión fibrogénica de la línea celular LX-2 con 3-MA.

Análisis por RT-qPCR del efecto generado en la expresión de los genes indicados por la transfección con el vector pcDNA3 (control) o pcDNA3-*Irs2* (sobreexpresión de *Irs2*) y por el tratamiento con 3-MA, de manera independiente y conjunta durante 24h (n=3 con duplicados experimentales). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. En el análisis estadístico no se consideraron las condiciones 5 mM y 15 mM de 3-MA por no disponer de su equivalente con sobreexpresión de *Irs2*. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (A) y (B).

La sobreexpresión de *Irs2* y el tratamiento con 3-MA generaron, por separado, un incremento en el análisis de expresión de *FGF7* (Figura 46A.1). La sobreexpresión de *Irs2* durante el tratamiento con 3-MA dio lugar a una sinergia que incremento 2.6

Capítulo 4. Resultados

veces la expresión de *FGF7* respecto a la inducción generada en ambos tratamientos individuales demostrando un efecto complementario entre la sobreexpresión de *Irs2* y el bloqueo de la autofagia en el aumento de los niveles de expresión de *FGF7* (**Figura 46A.1**) posiblemente debido, en parte, al aumento de la supervivencia de las CEH FGF7+ por la sobreexpresión de *Irs2* durante la reversión fibrogénica generada por el 3-MA. El bloqueo en la autofagia con 3-MA generó una represión en la inducción del análisis de expresión de *SERPINE1* producido por la sobreexpresión de *Irs2* (**Figura 46A.2**) sugiriendo que, o bien es necesario un flujo autofágico activado aguas abajo del eje IRS2-NRF2 para inducir la expresión de *SERPINE1* o bien la expresión de *SERPINE1* se ve reducida en las etapas avanzadas del proceso de reversión a estado quiescente a las que se transdiferencia la línea LX-2 tras 24h de tratamiento con 3-MA. La sobreexpresión de *Irs2* incrementó 7 veces los niveles de expresión de *IL6* y no mostró sinergia con el tratamiento de 3-MA que, por su parte, también generó un incremento modesto en la inducción de *IL6*, sugiriendo que ambos mecanismos actúan de manera conjunta para regular a *IL6* (**Figura 46A.3**). La inhibición de la autofagia no alteró la actividad de NRF2 en ninguna de las dosis estudiadas, ni tampoco intervino en la inducción en la actividad de NRF2 que genera la sobreexpresión de *Irs2*, demostrando que la inducción en *FGF7* generada por 3-MA es independiente del eje IRS2-NRF2 (**Figura 46B**). Estos datos involucran a los genes asociados con la remodelación de la ECM, *FGF7* y *SERPINE1*, dianas del eje IRS2-NRF2, así como a *IL6*, en el proceso de reversión fibrogénica de LX-2 y en conjunto con el análisis morfológico, demuestran que el eje IRS2-NRF2 no induce a corto plazo la reversión fibrogénica de LX-2 pero si actúa durante la misma (en sinergia con 3-MA) para favorecer la expresión de *FGF7* posiblemente, en parte, mediante su papel como inductor de la supervivencia en células FGF7+.

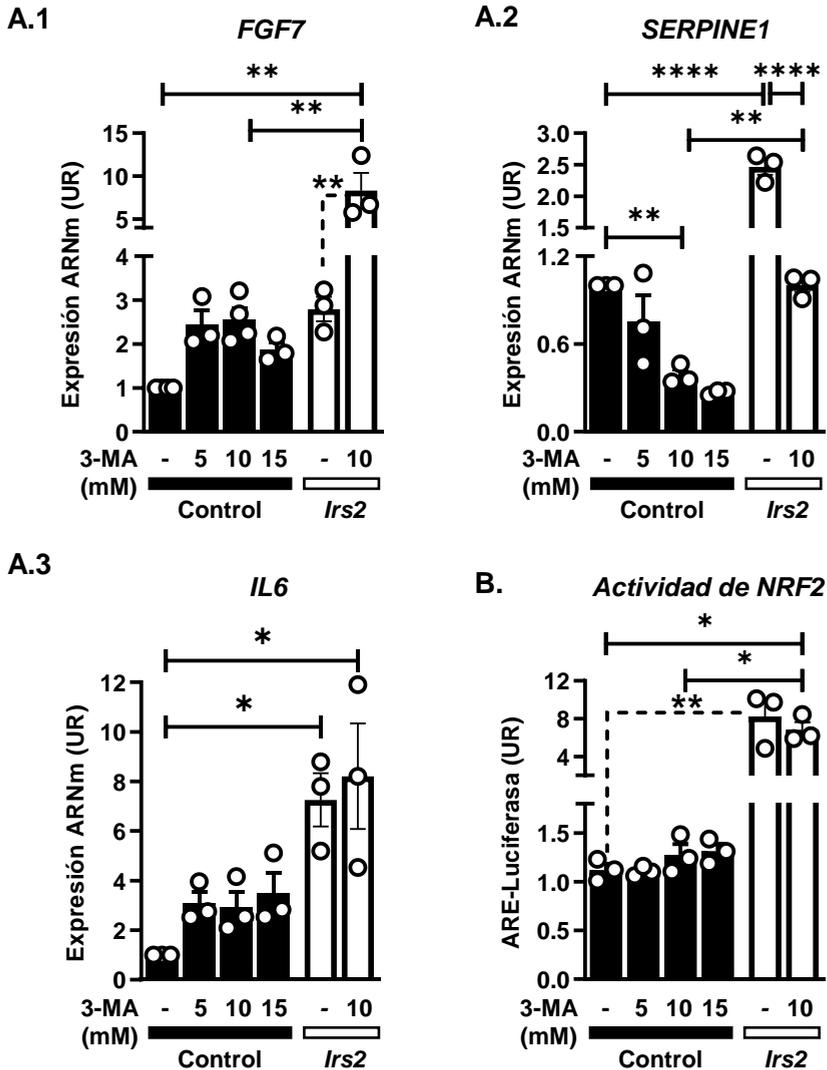


Figura 46. La reversión fibrogénica de LX-2 generada por el tratamiento con 3-MA modula la expresión de *FGF7*, *SERPINE1* e *IL6* de manera complementaria al eje *Irs2-NRF2*.

(A1,2,3) Análisis por RT-qPCR de la expresión de *FGF7*, *SERPINE1* e *IL6* tras la transfección con el plásmido pcDNA3 (control) o pcDNA3-*Irs2* (sobrexpresión de *Irs2*) y el tratamiento con 3-MA, de manera independiente y conjunta, durante 24h (n=3 con duplicados experimentales). (B) Gráfica representativa de la señal de luz emitida por luciferasa una vez normalizada a la señal de luz emitida por renilla tras la cotransfección (24h) del vector pcDNA3 o pcDNA3-*Irs2* con el vector *Renilla* y el vector *ARE-luc2P* reportero del Elemento de Respuesta al Estrés oxidativo (ARE) (n=3 con duplicados experimentales). Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. En el análisis estadístico no se consideraron las condiciones 5 mM y 15 mM de 3-MA por no disponer de su equivalente con

Capítulo 4. Resultados

Continuación **Figura 46**: sobreexpresión de *Irs2*. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples) (A) y (B).

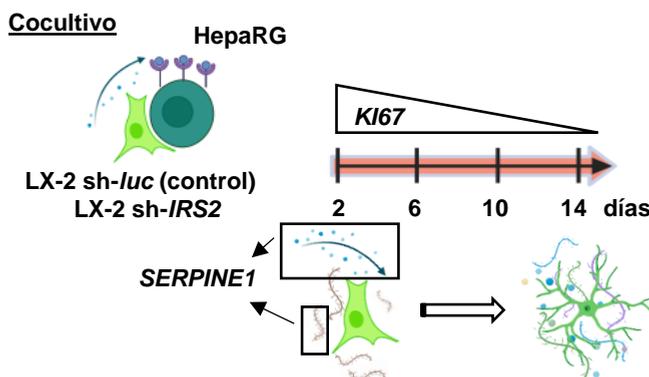
4.4.9 El eje *Irs2*-NRF2-*SERPINE1* actúa en los primeros estadios de la reversión fibrogénica de LX-2

En base a los resultados del apartado anterior, el aumento en la expresión de *SERPINE1* es distintivo del fenotipo promovido por la sobreexpresión de *Irs2* en LX-2, marcando un patrón opuesto al adquirido en LX-2 por la inhibición de su activación con 3-MA, al igual que ocurre con la morfología. Estos resultados podrían sugerir que el eje *Irs2*-NRF2-*SERPINE1* induce un proceso opuesto a la reversión fibrogénica en línea celular LX-2. Sin embargo, resultados previos de este trabajo demuestran que la expresión de *IRS2* resulta esencial a largo plazo para la reversión fibrogénica de LX-2 durante el cocultivo con HepaRG. Esta contraposición podría explicarse por el hecho de que la reversión fibrogénica de las CEH es un proceso dinámico. El tratamiento con 3-MA inhibe de manera farmacológica e inmediata la activación de las CEH por lo que refleja, en tan solo 24h de tratamiento, el patrón de expresión característico de las etapas finales de la reversión fibrogénica. En el modelo de cocultivo, sin embargo, las células LX-2 experimentan una reversión fibrogénica progresiva, de manera que el aumento en FGF7 detectado en tan solo 24h tras el tratamiento con 3-MA, aparece tras 14 días de cocultivo. Por ello se volvió al modelo del cocultivo de HepaRG con LX-2 sh-luc (control)/sh-*IRS2* (silenciamiento de *IRS2*) para evaluar la evolución de la expresión de *SERPINE1* aguas abajo de *IRS2* a lo largo de la reversión fibrogénica de LX-2 (**Figura 47A**). También se evaluó la expresión del marcador de proliferación *KI67*. El análisis de la expresión mostró una gran inducción de *SERPINE1* en las etapas más tempranas de la reversión de LX-2 control (sh-*luciferasa*) que se vio totalmente reprimida en el cocultivo con silenciamiento de *IRS2* en LX-2 (LX-2 sh-*IRS2*) (**Figura 47B**). El avance de la reversión fibrogénica en LX-2 sh-*luciferasa* coincidió con una reducción significativa de los niveles de proliferación evidenciada por la reducción en la expresión de *KI67* que se mantuvo reducida a lo largo de las etapas posteriores del cocultivo (**Figura 47B**). Por el contrario, el silenciamiento de *IRS2* durante el cocultivo impidió la represión mantenida del marcador de proliferación *KI67*, que, aunque se redujo a día 2 aumentó de manera progresiva hasta rescatar los niveles originales a día 14 evidenciando el defecto en la reversión fibrogénica que

experimentan LX-2 sh-*IRS2* durante el cocultivo con HepaRG (**Figura 47B**). En coherencia con el patrón observado tras el tratamiento durante 24h con 3-MA (**Figura 46**), el avance de la reversión fibrogénica también redujo significativamente la inducción en el análisis de expresión de *SERPINE1* mediada por *IRS2* en el cocultivo con LX-2 sh-*Luciferasa*, que en días posteriores (día 6,10 y 14) no presentó diferencias significativas con los valores detectados en el cocultivo con LX-2 sh-*IRS2* (**Figura 47B**). Estos datos confirman que el eje *Irs2-NRF2-SERPINE1* actúa en etapas iniciales de la reversión fibrogénica y que se inactiva a medida que la línea celular LX-2 completa su reversión explicando el fenotipo opuesto al generado por el tratamiento con 3-MA (**Figura 44, Figura 45, Figura 46**) que, en contra, recrea las etapas finales de la reversión. El defecto en la inducción temprana de *SERPINE1* en el cocultivo con LX-2 sh-*IRS2* impediría la reprogramación celular dirigida por la ECM, pudiendo explicar, junto con el fallo en la supervivencia, la reversión fibrogénica impedida en el cocultivo con LX-2 sh-*IRS2*.

Capítulo 4. Resultados

A.



B.

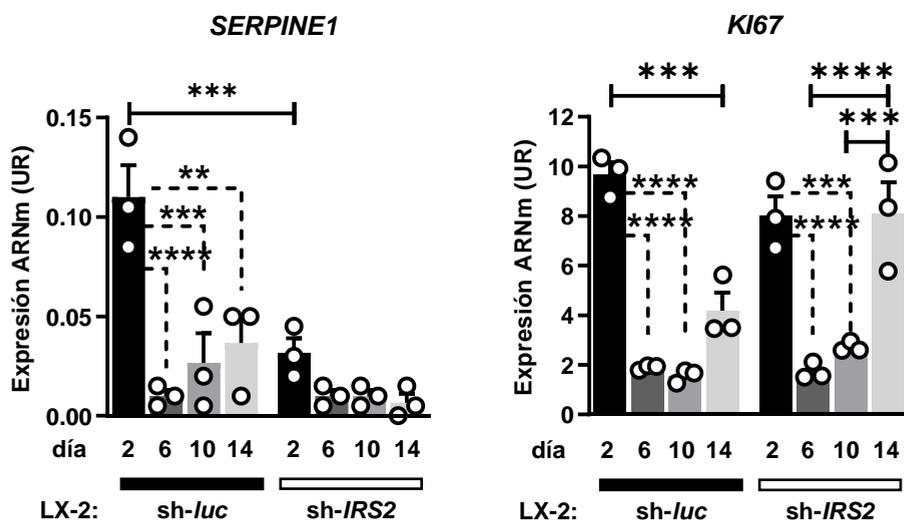


Figura 47. La expresión de *IRS2* en LX-2 en cocultivo con HepaRG es esencial para la inducción de *SERPINE1* en las primeras etapas de la reversión fibrogénica y para frenar la proliferación (expresión de *KI67*) en las etapas posteriores.

(A) Modelo representativo del procedimiento empleado en B para evaluar el efecto del silenciamiento de *IRS2* en LX-2 (LX-2 sh-*IRS2*) en la expresión del integrante y modulador de la ECM *SERPINE1* y el marcador de proliferación *KI67* durante el cocultivo con HepaRG. Autoría propia, "Created with BioRender.com". (B) Análisis por RT-qPCR de la expresión de *SERPINE1* y *KI67* a lo largo del tiempo (día 2,6,10 y 14) del cocultivo de HepaRG con LX-2 control (LX-2 sh-*luc*) y con silenciamiento de *IRS2* (LX-2 sh-*IRS2*) n=3 con duplicados experimentales. Los datos representan la media + SEM. *p-valor < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis two way ANOVA (Tukey's para comparaciones múltiples)

Los resultados del bloque 3 y 4 demuestran que la expresión de *IRS2*, aunque no induce a corto plazo (24h) la reversión fibrogénica de las CEH, participa en el proceso, desempeñando un papel preliminar que implica una inducción en la actividad de NRF2, independiente de P62, y posiblemente mediado por un incremento en las ROS. La expresión de *IRS2* favorece a la población de LX-2 FGF7+ por varias vías que podrían estar interconectadas: (1) evitando la apoptosis (reducción de caspasa 3 escindida) de la población FGF7+ y (2) alterando a través de NRF2 diferentes elementos asociados a la ECM como SERPINE1 o FGF7. Vinculando estos datos con los obtenidos en los bloques 1 y 2, al permitir la producción de *FGF7* por parte de la población de CEH, *IRS2* potencia el bucle de inducción positiva por el que *FGF7* promueve la expresión de *FGFR2b* en la población de CPH y con ello su propia sensibilidad que resulta necesaria para la epitelización (**Figura 48**).

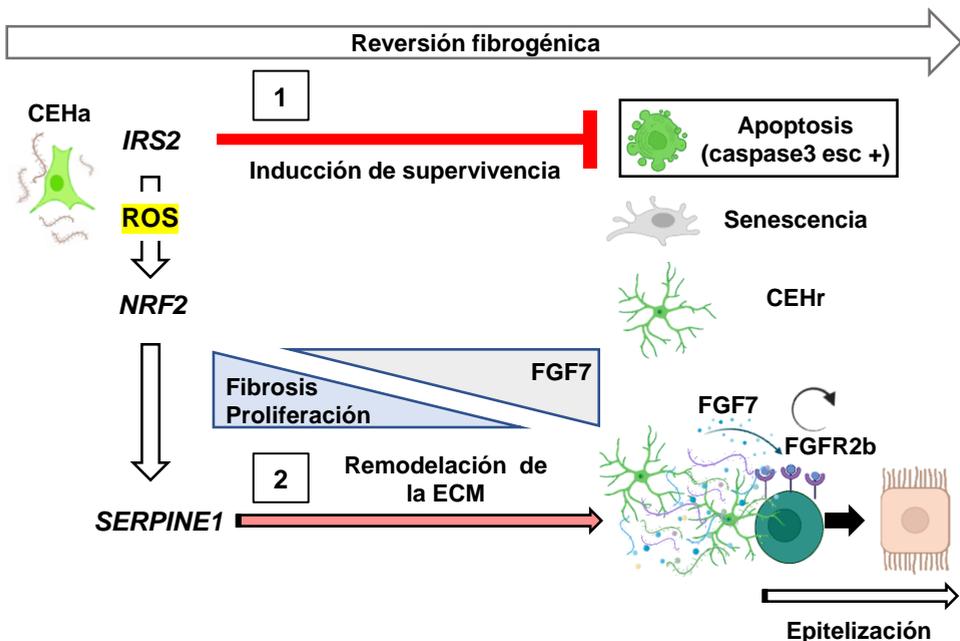


Figura 48. Modelo esquemático del papel de *IRS2* en el nicho de CPH.

La expresión de *IRS2* favorece la producción de FGF7 en el nicho (1) promoviendo la supervivencia de las CEH durante su reversión, en la que aumentan los niveles de FGF7 y (2) induciendo a través de NRF2-SERPINE1 el remodelaje de la ECM durante la reversión fibrogénica de las CEH. Al permitir la inducción de *FGF7*, *IRS2* favorece el bucle de inducción mediante el que FGF7 induce la expresión de *FGFR2b* y sostiene la epitelización de las CPH. Esc=escindida. Autoría propia, "Created with BioRender.com".

Capítulo 5.

Discusión

La expresión de *Fgfr2b*, el único receptor diana de Fgf7 en hígado [293], se ha visto fuertemente inducida durante el daño crónico en la región periportal, en concreto en células positivas para marcadores como A6, el antígeno común de células ovales y biliares, o HNF4 α , característicos de CPH epiteliales [201]. La señalización de Fgf7 a través de Fgfr2b es crucial para la regeneración tras el daño hepático [197] [294]. La estimulación *in vivo* durante el daño crónico con Fgf7rr mostró una respuesta impedida en ratones *Irs2*^{-/-}, sugiriendo que éstos padecen un defecto en la inducción de Fgfr2b en CO que posteriormente se confirmó *in vitro*. Empleando el modelo humano de células progenitoras HepaRG con silenciamiento estable de *IRS2* se demostró que la insulina y FGF7 cooperan a través de IRS2 para promover la expresión de osteopontina/SPP1 y la diferenciación mediada por la respuesta a *FGFR2b* en CPH. El mecanismo mediante el que IRS2 regula la respuesta de FGFR2b a FGF7 sigue siendo desconocido. Estudios previos establecen un vínculo entre los ligandos de Fgfr2b y la ruta Pi3k-Akt, una de los principales efectores de insulina-Igf-1 reclutados por *Irs2*. La inhibición de Pi3k-Akt impide la inducción de la expansión en células progenitoras epiteliales A6+ mediada por Fgf10 [201] y reprime la morfogénesis de las glándulas salivares mediada por Fgf7 [295] sugiriendo que la señalización *Irs2*-Pi3k-Akt podría actuar aguas abajo de Fgfr2b para mediar la respuesta a sus ligandos en CPH.

Mediante la inducción de la respuesta a FGF7 en HepaRG con dos sistemas diferentes, el tratamiento con FGF7rh y el cocultivo con LX-2, este trabajo revela un novedoso bucle de inducción por el que el ligando FGF7 promueve de manera dependiente a la señalización de insulina-IRS2 la expresión de su receptor *FGFR2b* a través del aumento que genera en la epitelización. La existencia de un bucle de inducción positiva entre Fgf10 y Fgfr2b ha sido descrita anteriormente en el contexto

Capítulo 5. Discusión

de morfogénesis, en concreto durante la proliferación epitelial de las glándulas submandibulares [295] y en tumores malignos en los que la expresión de *Fgfr2b* mediada por *Fgf7* parece actuar como supresora de tumores por promover la diferenciación epitelial [155][296], pero no ha sido reportada anteriormente en contexto de regeneración. El modelo murino *Irs2*^{-/-} presenta, durante el daño hepático crónico, un defecto en la inducción tanto de *Fgfr2b* como de *Fgf7*. El descubrimiento del bucle de inducción positiva *Fgf7*-*Fgfr2b* podría señalar a la falta de inducción en *Fgf7* como causante del fallo del defecto en *Fgfr2b* observado tras el silenciamiento de *Irs2* tanto *in vitro* como *in vivo*. Reforzando esta hipótesis, nuestros datos demuestran que el patrón de expresión de *IRS2* en la línea HepaRG coincide con el de *FGF7* y es opuesto al de *FGFR2b*, demostrando que la señalización de insulina-*IRS2* potencia de manera indirecta la expresión de *FGFR2b* en CPH por promover la expresión de *FGF7* en el nicho que activa el bucle de inducción positiva de *FGFR2b*. En contraposición, el tratamiento con FGF7rh no rescató el defecto en la respuesta a FGF7 a través de *FGFR2b* en HepaRG sh-*IRS2* por lo que no se puede descartar que parte del defecto en la respuesta de *FGFR2b* a FGF7 durante el silenciamiento de *IRS2* derive de la intervención de *IRS2* en la cascada de señalización aguas abajo de *FGFR2b* o de un defecto “crónico” en la epitelización de los cultivos de HepaRG sh-*IRS2* que reprime la expresión de *FGFR2b* impidiendo el bucle de inducción positiva *FGF7*-*FGFR2b* y agravando la falta de respuesta a FGF7.

Nuestros datos evidencian por tanto que la señalización de insulina-*Irs2* es crucial para la sensibilidad de las CPH no solo a FGF7, sino también a otros ligandos de *FGFR2b* como FGF22 o FGF10 [201], explicando, por otro lado, por qué la línea HepaRG, extensamente empleada como modelo de diferenciación *in vitro* [297] [298], requiere de insulina-*IRS2* para la formación de islas de hepatocitos que se generan a través de un proceso de diferenciación y epitelización desde CPH hasta hepatocitos [268] que en este trabajo describimos como dependiente de FGFs.

La SPP1/OPN es una proteína secretada de carácter multifuncional que ha sido establecida en hígado como un regulador crítico de procesos celulares implicados en condiciones patológicas como la migración celular, proliferación, metástasis o fibrosis [299]. En concreto, durante la regeneración celular, SPP1 ha emergido como

biomarcador de células progenitoras hepáticas y al igual que FGF7 ha sido descrita como imprescindible para el proceso de reacción ductular [300][301][302]. El silenciamiento de SPP1 *in vivo* reprime la expansión de CO durante el daño crónico generado con tioacetamida [303] y modifica el “secretoma de CPH” impidiendo que éstas activen la respuesta fibrótica de las CEH [302]. Resultados previos del laboratorio demuestran que el silenciamiento de *Irs2* reduce la expansión de células Spp1+ *in vivo* e impide la expresión de SPP1 en la línea HepaRG *in vitro* [275]. En este trabajo se establece a SPP1 como una potencial diana de la respuesta a FGF7 en CPH sugiriendo que el defecto en Spp1 durante el silenciamiento de *IRS2* podría estar generado por la falta de respuesta a FGF7 e incluso que el fallo de inducción en SPP1 podría estar involucrado en el defecto en la epitelización observado en ausencia de FGF7. El vínculo entre FGFs y SPP1 ha sido reportado anteriormente en fibras de músculo liso en las que la activación de FGFR1 en respuesta a FGF1 genera un incremento en la expresión de SPP1 que posteriormente activa la vía Src/MEK/MAP [304]. Nuestros datos, son los primeros en demostrar un papel de FGF7 en la regulación de SPP1 en hígado, y más importante, en establecer que ocurre de manera dependiente a la señalización de insulina-*IRS2*. Cabe mencionar que nuestros datos preliminares indican que el tratamiento con SPP1r no rescata la diferenciación en HepaRG sh-*IRS2*, ni tampoco induce activación en las CEH (datos no incluidos). Sin embargo, por ser la SPP1 una molécula que consta de isoformas intracelulares y extracelulares/solubles [305], ya se han reportado casos en los que el tratamiento con SPP1r (extracelular) no deriva en el mismo fenotipo que el aumento en la expresión intracelular de SPP1 [306]. Futuros experimentos dirigidos, por tanto, a reprimir o a sobreexpresar SPP1 en HepaRG intracelular serán necesarios para determinar el papel de SPP1 aguas abajo de la respuesta a FGF7 dependiente de *IRS2* en CPH.

Desentrañar y replicar la comunicación heterotípica que dirige la regeneración de órganos es uno de los grandes retos biológicos actuales. En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo al desarrollo de modelos *in vitro* de hígado como cultivos 2D, organoides o agregados 3D con capacidad para reproducir la arquitectura del tejido y las interacciones/comunicación entre los diferentes tipos de células [307]. Durante este trabajo se ha puesto a punto un modelo 2D humano de cocultivo de

Capítulo 5. Discusión

CPH (HepaRG) y CEH (LX-2 y CEHp) con el que se ha conseguido recrear en tan solo 48h la comunicación heterotípica entre ambas poblaciones a través de FGF7. Uno de los aspectos destacables de este sistema de cocultivo es la necesidad de contacto directo entre ambas poblaciones. La ineficiencia del medio condicionado por CEH para mediar la comunicación paracrina a través de FGF7 podría deberse al efecto de los proteoglicanos heparán sulfato que retienen a la glicoproteína FGF7 secuestrada en la ECM e impiden su liberación al medio condicionado [308]. A su vez, un estudio reciente ha demostrado que durante el daño hepático crónico existe una subpoblación de células mesenquimales (SCA1+), integrada por CEH, FP y células vasculares de músculo liso, que expresan una huella proregenerativa de factores de crecimiento como FGF7. Esta subpoblación mesenquimal SCA1+ se dispone adyacente a las CPH para promover o arrestar la proliferación de las CPH de manera dependiente al contacto celular [309] demostrando que la localización celular y el contacto entre CPH y CEH importa, al igual que indican nuestros datos.

Una de las posibles limitaciones del sistema de cocultivo desarrollado es que recrea las interacciones entre HepaRG y CEH en un sistema 2D que pierde parte de la arquitectura del tejido con respecto a los modelos 3D. Sin embargo, el cocultivo directo y a largo plazo (14 días) de HepaRG y CEH ha sido ya llevado a cabo en esferoides 3D y resultó precisamente en el mismo fenotipo que se ha descrito en este trabajo empleando el modelo 2D a largo plazo, es decir, en una reversión espontánea de las CEH hacia un fenotipo quiescente y en un aumento en la diferenciación de HepaRG evidenciado por el incremento en la expresión de marcadores hepatocíticos [310]. La capacidad del modelo 2-D desarrollado para modelar la fibrosis hepática y obtener los mismos resultados que con un modelo 3-D, de mayor complejidad, le otorga robustez tanto a las conclusiones obtenidas como al modelo generado que, por otra parte, presenta un protocolo más accesible por no requerir de procedimientos complejos como el cultivo en agitación.

Durante la reversión fibrogénica las CEH activadas experimentan una salida del ciclo celular adquiriendo un fenotipo inactivado en el que se asemejan de nuevo a CEH quiescentes y que, en gran parte de las CEH, concluye en apoptosis o senescencia [128][126] permitiendo así la regresión fibrogénica y la reparación del tejido epitelial funcional. En humanos y roedores, las CEH son la principal fuente de

FGF7 [199]. Hasta el momento se consideraba que la inducción en la producción de FGF7 por parte de las CEH ocurría en paralelo con la activación fibrogénica que experimentan las CEH en presencia de un daño [199]. No obstante, nuestros datos evidencian una correlación entre FGF7 y la muerte celular *in vivo*, así como un aumento *in vitro* en la producción de FGF7 por parte de las CEH tras el arresto celular (generado por el tratamiento con mitocina C) o la inhibición de su activación (generada por el tratamiento con 3-MA), tres procesos que se asemejan mucho más a la reversión fibrogénica de las CEH, que a su estado de activación. Dado que la regulación de la expresión de FGF7 por parte de las CEH es, en gran parte, todavía desconocida, este trabajo plantea la hipótesis de que es la reversión fibrogénica, en lugar de la activación de las CEH, la que promueve la expresión de FGF7 siendo IRS2 crítico para supervivencia de las CEH durante la reversión fibrogénica y por tanto para la expresión de FGF7. En concordancia con esta hipótesis, los resultados de esta investigación demuestran que el silenciamiento de *IRS2* reduce la supervivencia de la sub-población de CEH FGF7+ *in vivo* e *in vitro*, a la vez que impide la reversión fibrogénica *in vitro* durante el cocultivo de HepaRG-LX2. Asimismo, la sobreexpresión de *Irs2* durante la reversión fibrogénica que experimenta la línea LX-2 por el tratamiento con 3-MA, aumenta de manera aberrante la expresión de FGF7 y del marcador de supervivencia *HSPA1b* y previene la inducción en la expresión del marcador de senescencia *P53* que ocurre durante el arresto del ciclo celular y que acelera la eliminación de las CEH por el sistema inmune [284] [311]. Los resultados del presente trabajo revelan un nuevo mecanismo por el que IRS2 actuaría para sustentar la supervivencia de las CEH durante su reversión, permitiendo de este modo la reversión fibrogénica y potenciando/prolongando la inducción en la producción de FGF7 que ocurre durante la misma, favoreciendo al bucle de inducción positiva de FGFR2b que promueve la comunicación heterotípica entre CEH y CPH y que media la respuesta epitelial a FGF7.

Respecto al estímulo que induce la reversión fibrogénica espontánea de la línea LX-2 sh-*Luciferasa* (control) durante el cocultivo con la línea HepaRG, ya se ha demostrado que las señales de IGF-1 producidas, entre otros, por las células hepatocíticas, actúan sobre las CEH para inducir su senescencia (uno de los

Capítulo 5. Discusión

procesos característicos de la inactivación) de manera paracrina [312]. Dado que IGF-1, homólogo de insulina, señala a través de IRS2, es posible que el silenciamiento de *IRS2* impida la respuesta a IGF-1 y con ello la reversión fibrogénica de la línea LX-2 sh-*IRS2* en el cocultivo con HepaRG. El hecho de que el IGF-1, y no la insulina, module el papel de IRS2 en la reversión fibrogénica de las CEH explicaría, por otro lado, la ausencia de efecto en la expresión de marcadores de fibrosis tras remover la insulina del medio durante el cocultivo de LX-2 – HepaRG. El modelo de ratón deficiente de *Igf-1* en hígado desarrolla, al igual que el modelo *Irs2*^{-/-}, resistencia a la insulina [80] y presenta niveles alterados de genes fibróticos [313]. En pacientes, la deficiencia de IGF-1 es una característica común en enfermedades como EHGNA/EHNA [314] y cirrosis [315] [316], patologías originadas por un exceso de fibrosis. Para confirmar esta hipótesis será necesario comparar el efecto del tratamiento con IGF-1 recombinante en la reversión fibrogénica de las líneas celulares LX-2 sh-*luciferasa*/sh-*IRS2*. También es posible que el estímulo de reversión sea independiente a la señalización mediada por IRS2 y que el defecto en la reversión fibrogénica observado en la el cocultivo con la línea LX-2 sh-*IRS2* derive de la reducción en la supervivencia que experimentan las LX-2 sh-*IRS2* en estado de reversión con respecto a los controles LX-2 sh-*luciferasa*.

Dado que la expresión de *Fgf10* y *Fgf22*, ambos dianas de FGFR2b, también se ha visto aumentadas tras el daño hepático crónico generado por la dieta DDC [201], se evaluó el efecto del silenciamiento de *IRS2* en LX-2 durante el cocultivo con HepaRG en la regulación de la expresión de ambos. La expresión de *FGF10* y de *FGF22* se vio reprimida por el silenciamiento de *IRS2* en LX-2. En el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} la expresión de *FGF22* no se vio alterada durante el daño hepático crónico, pero sí que se detectó una reducción significativa de los niveles de *FGF10* [275]. Al igual que *FGF7*, *FGF10* ha sido descrito como inductor de la expansión de CPH durante el daño hepático crónico [118] [201]. Es posible, por tanto, que IRS2 actúe también a través de *FGF10* y/o *FGF22* para mediar la comunicación heterotípica con las CPH.

Los datos discutidos hasta el momento, que en conjunto demuestran que un defecto en la sensibilidad a insulina impide la comunicación heterotípica entre CPH y CEH

a través de FGF7-FGFR2b reprimiendo la epitelización y con ello la regeneración hepática durante el daño crónico, ya han sido publicados [268].

Los resultados de este trabajo revelan la existencia de una subpoblación no epitelial y FGF7+ en la línea celular HepaRG. La sobreexpresión de *Irs2* en la línea HepaRG actúa directamente sobre esta subpoblación no epitelial para promover la expresión de FGF7 y la epitelización, confirmando, en otro modelo, los datos obtenidos con el modelo de cocultivo HepaRG-LX2. Por otra parte, el descubrimiento de una subpoblación FGF7+ en la línea de CPH HepaRG, remarca la dependencia a FGF7 que presentan las CPH, y apoya la emergente teoría de que las CPH son capaces de llevar a cabo transiciones EMT/MET en función de sus necesidades presentando por tanto un fenotipo mixto epitelial/mesenquimal [317]. Nuestros datos indican un papel de IRS2 como regulador de estas transiciones por su capacidad para promover la epitelización hacia hepatocitos de la subpoblación no epitelial en HepaRG. Si IRS2 induce o no la epitelización de la subpoblación no epitelial de la línea HepaRG a través de su inducción en FGF7 necesitará evaluarse en futuros trabajos. Esta hipótesis explicaría que la inducción en la epitelización generada por la sobreexpresión de *Irs2* en la línea HepaRG quede restringida a las células de la subpoblación no epitelial, que se encuentran en estrecho contacto con las células FGF7+. El aumento en la expresión HNF4 α es uno de los efectos más notables detectados tras la sobreexpresión de *Irs2* en la subpoblación no epitelial de HepaRG. Curiosamente, la expresión de Hnf4 α en hepatocitos ha sido ya establecida como inductora de (1) la epitelización de los hepatocitos y (2) de la secreción de la paraoxonasa 1, una molécula diana de Hnf4 α y secretada por los hepatocitos que actúa atenuando la fibrosis generada por CEH y macrófagos [318]. HNF4 α podría ser, por tanto, un potencial mediador del papel de IRS2 como promotor de la epitelización en la línea HepaRG y/o de la inducción en la expresión de FGF7, que ocurriría, de acuerdo con los datos de este trabajo, en paralelo a una atenuación de la fibrosis.

El NT-157, un inhibidor alostérico de IRS1/2, ha sido recientemente descrito como represor de la metástasis de cáncer colorrectal a hígado por su habilidad para reducir el apoyo trófico recibido por miofibroblastos y CEH [319]. En concordancia, *Irs2* también se ha visto recientemente implicado en un bucle de inducción positiva

Capítulo 5. Discusión

que dirige la progresión de la enfermedad hepática y la hepatocarcinogénesis en modelos de ratón con EHGNA [261]. Curiosamente, este estudio identificó a Irs2 como diana aguas abajo de Yap y Taz, dos efectores oncogénicos de la ruta de señalización de Hippo que controlan el destino hepatocelular [260], la activación de las CPH [320] y la regeneración [321]. El HCC representa el 90% de los cánceres de hígado. Aunque todavía existe controversia sobre el origen del HCC, diversos estudios señalan a que podría originarse a partir de la transformación maligna de las CPH [322][323][324]. La comunicación entre CPH y CEH activadas promueve la progresión del HCC siendo para ello determinante el microambiente generado por la población de CEH activadas de la zona peritumoral [325][326] de manera que existen numerosas evidencias de que la señalización FGF/FGFR contribuye al desarrollo del HCC [327]. Por otra parte, la activación de NRF2 en fibroblastos de piel no solo induce re-epitelización sino también tumorigénesis [244] y previene la finalización de la EMT estabilizando un fenotipo “híbrido epitelial-mesenquimal” que presenta un elevado potencial iniciador de tumores y que facilita la metástasis derivando en una mayor agresividad del tumor y peor pronóstico [328]. Es posible, por tanto, que parte de los aspectos identificados en este estudio sobre el papel de IRS2 en la comunicación de las CPH-CEH sean aplicables, cuando ocurren de manera incontrolada, al contexto de hepatocarcinogénesis. En este caso, el descubrimiento de un microambiente endógeno no epitelial y IRS2/FGF7+/+ que rodea a las islas epiteliales en la línea de hepatoma humano HepaRG, la convierte en un modelo de estudio idóneo para evaluar los efectos del eje IRS2-microambiente en el desarrollo del tumor.

Este trabajo ha sido pionero en establecer los mecanismos que regulan el vínculo entre la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 y NRF2 durante el daño hepático crónico al revelar a NRF2, el principal regulador transcripcional de la respuesta frente al estrés oxidativo, como diana aguas abajo de IRS2 en HepaRG y LX-2. En hígado de ratón, la activación de Nrf2 durante el daño hepático es esencial para la regeneración hepática [238][236] y suficiente para revertir la resistencia a la insulina, suprimir la esteatosis y atenuar significativamente la fibrosis hepática generadas por la administración crónica de una dieta grasa [329]. En hepatocitos, la activación de NRF2 durante el daño crónico depende de la novedosa ruta no canónica de activación de NRF2 mediada por el sustrato de la autofagia P62 [225] y resulta en

una proliferación descontrolada de CPH, hepatomegalia y finalmente HCC [330]. Por el contrario, en CEH, tanto P62 como NRF2 reprimen la activación de las CEH y atenúan la fibrosis, aunque se desconoce si actúan de manera conjunta para ello [281][331]. En este trabajo demostramos, por primera vez, que P62 es capaz de regular la actividad de NRF2 no solo en hepatocitos, sino también en CPH. No obstante, los resultados de este trabajo descartan a P62 como mediador de la inducción en NRF2 generada por IRS2, señalando a la ruta canónica dirigida por el estrés oxidativo como mecanismo intermedio entre IRS2 y la activación en NRF2. De hecho, el aumento en el estrés oxidativo ha sido recientemente establecido como uno de los precursores de la activación de las CPH [332]. Curiosamente, el silenciamiento de *P62* en la línea HepaRG no solo no reprimió, sino que potenció la capacidad de *Irs2* para inducir la actividad de NRF2 sugiriendo cierta competitividad entre ambos mecanismos reguladores de la actividad de NRF2 en la línea HepaRG. En músculo esquelético ya se ha demostrado que P62 interacciona directamente con IRS-1 para modular la señalización de insulina [333]. Dado que la señalización de insulina-IRS2 es uno de los principales mecanismos inhibidores de la autofagia por ser una señal de presencia de nutrientes [282] y que nuestros datos demuestran que la sobreexpresión a largo plazo de IRS2 genera una acumulación constitutiva de P62 en la línea HepaRG, resulta probable que exista cierto grado de coordinación entre el eje IRS2-NRF2 y el eje P62-NRF2.

A pesar de que en hígado tanto NRF1 como NRF2 inducen la expresión de sus genes dianas a través del ARE, son múltiples las evidencias de que la activación de la transcripción mediada por el ARE aguas abajo de la sobreexpresión de *Irs2* está dirigida por NRF2: (1) La sobreexpresión estable de *Irs2* en HepaRG genera una fuerte huella transcriptómica de NRF2, (2) NRF2 ha sido extensamente establecido como la principal proteína inductora de la transcripción dirigida por ARE [206] y (3) ya existen estudios que demuestran que NRF2 actúa en la línea hepática HepG2 de manera significativamente más eficiente que NRF1 para activar la expresión de genes a través de ARE [204] [207]. No obstante, no se puede descartar totalmente que parte de la activación en ARE-Luciferasa detectada en este estudio dependa de NRF1. De hecho, aunque los estudios sobre la función de *Nrf1* en hígado son

Capítulo 5. Discusión

muy limitados, un estudio ya ha asociado la falta de *Nrf1* con el desarrollo de EHNA [334].

Nuestros datos revelan que la sobreexpresión de *Irs2* opera a través de NRF2 en LX-2 para inducir la expresión de *SERPINE1* y *FGF7*, dos integrantes de la ECM que ya han sido descritos como dianas de NRF2 en fibroblastos de piel [244]. En hígado, *SERPINE1* se incluye en la lista de elementos integrantes de la ECM cuya función consiste en regular la propia ECM [79]. Las CEH son una fuente muy importante de *SERPINE1* [80]. El mecanismo de inducción de *SERPINE1* y *FGF7* aguas abajo de NRF2 descrito en fibroblastos de piel presenta una elevada similitud con el proceso de reversión fibrogénica que experimentan las CEH y en el que *IRS2* desempeña un papel principal, estando ambos caracterizados por un arresto en el ciclo celular y una inducción de la senescencia que genera en un aumento en *FGF7* y en la epitelización [244]. En concordancia, NRF2 ya ha sido descrito como capaz de limitar la activación de las CEH y promover la reversión fibrogénica [331]. Los resultados de este proyecto involucran a *SERPINE1* y *FGF7* en el proceso de reversión fibrogénica que experimentan LX-2 durante el tratamiento con 3-MA. Además, el defecto en la reversión fibrogénica generado por el silenciamiento de *IRS2* en la línea LX-2 durante el cocultivo con HepaRG correlaciona con una inducción impedida de *SERPINE1* en estadios tempranos de la reversión fibrógena que coincide con la represión del marcador de proliferación *Ki67*, sugiriendo un novedoso mecanismo mediante el que *IRS2* resultaría crítico para la epitelización durante la regeneración hepática por sustentar la supervivencia de las CEH durante las primeras etapas de la reversión fibrogénica a través del conocido inductor de la supervivencia NRF2 y de la expresión aguas abajo de *SERPINE1/FGF7*. El defecto en el eje *IRS2-NRF2-SERPINE1/FGF7* en pacientes con resistencia a la insulina impediría la regresión fibrótica y la epitelización, desencadenando en fibrosis, EHGNA o HCC. Estos resultados que descubren el mecanismo biológico y molecular mediante el que la señalización de insulina/IGF-1-*IRS2* actúa en CEH para inducir *FGF7* y promover la epitelización mediada por la comunicación heterotípica entre CPH y CEH, están recogidos en un manuscrito pendiente de ser publicado.

El estudio en fibroblastos de piel sugiere que NRF2 regula de manera indirecta la expresión de *FGF7* de manera que la alteración de la ECM generada por el eje NRF2-SERPINE1 es interpretada por los fibroblastos vecinos como una señal de la reprogramación celular hacia un fenotipo de secreción asociado a senescencia (SAPS) que induce, entre otros, la expresión de *FGF7*. Sin embargo, otro estudio en fibroblastos embrionarios de ratón, estableció a *Fgf7*, *Serpine1* y también, a *Igf-1*, como genes diana de Nrf2 por haber sido detectados en paralelo en un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación de las zonas de unión de Nrf2 y en un análisis de comparación por micromatriz de genes reprimidos en fibroblastos embrionarios *Nrf2*^{-/-} respecto a la condición control [335]. No podemos por tanto rechazar la hipótesis de que NRF2 actúe aguas abajo de IRS2 para modular de manera directa, como factor de transcripción, la expresión de *FGF7* y *SERPINE1*. Del mismo modo, tampoco podemos descartar que eje IRS2-NRF2-SERPINE1 module de manera indirecta la expresión de *FGF7* en CEH mediante la activación del SASP. Futuros estudios de inmunoprecipitación de cromatina en LX-2 y/o HepaRG serán necesarios para confirmar o rechazar la interacción directa entre NRF2 y las zonas de unión del promotor de *FGF7* en nuestros modelos.

Resulta llamativo, sin embargo, que a pesar de que el eje IRS2-NRF2-SERPINE1 ha sido asociado en fibroblastos con un aumento de la senescencia, nuestros datos evidencian que la sobreexpresión de *Irs2* reprime el aumento en la expresión del marcador de senescencia *P53* durante la reversión fibrogénica inducido con el tratamiento de 3-MA en LX-2. En fibroblastos, *P53* no ha sido involucrado en la inducción de la senescencia mediada por NRF2. La existencia de una fuerte correlación positiva entre los niveles de daño-senescencia/SASP y la reprogramación celular de las células vecinas ha sido confirmada en diversos tejidos *in vivo* en los últimos años [336]. Estos estudios han demostrado que mientras el marcador de senescencia *p16* resulta crítico para promover la actividad secretora en células senescentes, *p53* limita la reprogramación celular de manera que su silenciamiento *in vivo* resulta en una producción acentuada de citoquinas y en una elevada reprogramación celular mediante un mecanismo todavía desconocido y dependiente de *IL6* [336] [337]. Curiosamente, nuestros datos muestran que la sobreexpresión de *Irs2* provoca una gran inducción en la expresión de *IL6* mediante

Capítulo 5. Discusión

un mecanismo independiente a NRF2. Si la sobreexpresión de *Irs2* induce la senescencia de las CEH para promover la reprogramación celular mediada por NRF2 al igual que ocurre en fibroblastos, y, si lo hace a través de IL6 y/o la represión en P53 necesitará ser evaluado más adelante.

La IL6 es una citoquina pleiotrópica que resulta esencial para la regeneración hepática y para el correcto funcionamiento del metabolismo [338]. El modelo de ratón deficiente en *IL6* desarrolla resistencia a la insulina acompañada de EHGNA tras el tratamiento con dieta grasa [339] y es más susceptible a desarrollar fibrosis durante el daño hepático crónico generado con CCl₄ [340]. Por un lado, en fibroblastos, la reprogramación celular inducida por el efecto de NRF2 en la ECM induce, además de la expresión de *FGF7*, la expresión de *IL6*. Por otro lado, en CEH, se ha demostrado una correlación entre el aumento en *IL6* y la inducción de la reversión fibrogénica [341]. Así pues, en consonancia con nuestros datos, varios estudios vinculan a IL6 con una reducción de la fibrosis y la correlacionan con la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 durante el daño hepático crónico. No obstante, existen también investigaciones que apuntan a un papel profibrótico de IL6, demostrando que su administración en hígado aumenta la expresión de Col1a1 y de α -sma en CEH [342] [343] por lo que sigue existiendo controversia sobre su papel durante la fibrosis hepática. Lo mismo ocurre con SERPINE1. Existe una gran controversia sobre la contribución de SERPINE1 en la regulación de la ECM y su impacto en la regeneración hepática, de manera que existen estudios que señalan a SERPINE1 como inductora de fibrosis [82] [83] y otros como anti-fibrótica [84]. Recientemente, un estudio llevado a cabo por Villar-Lorenzo et al., 2019 en el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} ha detectado que el defecto en la señalización de insulina/Igf-1-Irs2 impide la inducción de *Serpine1* y de *IL6* durante el daño hepático crónico *in vivo* por alterar la transdiferenciación *in vitro* de LX-2 [344]. Estos resultados de Villar-Lorenzo et al., 2019 podrían ser perfectamente consistentes con los obtenidos durante este trabajo. Sin embargo, por considerar a *Serpine1* e *IL6* como marcadores profibróticos y por detectar elevados niveles de proliferación y marcadores de fibrosis tras el tratamiento con IGF-1 recombinante concluyen que el silenciamiento de *Irs2* reprime la activación de la línea LX-2 mediada por IGF-1. Por un lado, los resultados de nuestro trabajo demuestran que la sobreexpresión de *Irs2* genera un aumento en la expresión de *SERPINE1* y de *IL6* que coincide con

una reducción en la expresión de marcadores fibróticos y de proliferación, descartando a *SERPINE1* e *IL6* como marcadores/inductores de la fibrosis e identificándolos, en contraposición, como marcadores de la reversión fibrótica en CEH. Respecto a la respuesta de las CEH a IGF-1 existe controversia. Durante años, diversos estudios demostraron que el tratamiento con IGF-1 induce la proliferación de las CEH *in vitro* [21][345]. Sin embargo, las CEH quiescentes están expuestas continuamente a altas concentraciones de IGF-1 en hígado sano y, a pesar de esto y de expresar niveles elevados de su receptor IGFR-1, no proliferan. En los últimos años, y en discrepancia con el estudio de Villar-Lorenzo et al., 2019, se ha demostrado que el tratamiento con IGF-1 promueve la senescencia de las CEH limitando su actividad y atenuando la fibrosis [312]. Asimismo, la sobreexpresión dirigida de IGF-1 en CEH activadas *in vivo* restringe su activación, atenúa la fibrosis y acelera la regeneración hepática [346].

El nacimiento de avanzadas técnicas moleculares como el análisis de expresión génica en célula única ha evidenciado en los últimos años la gran variabilidad que existe célula-a-célula, suponiendo un cambio de paradigma en la forma de interpretar los resultados. En el caso de las CEH, diversos análisis de expresión génica en célula única han identificado diferentes agrupaciones fenotípicas de CEH durante el daño hepático demostrando que actúan de manera heterogénea y dinámica [347][348]. En concreto, durante el daño hepático agudo y crónico *in vivo* co-existen CEH en cuatro estados diferentes entre los que se observa transiciones dinámicas: “quiescentes”, “proregenerativas”, “antiregenerativas” (fibróticas) y “mixtas” siendo la respuesta a hormonas una de las agrupaciones de genes por función discriminante entre los diferentes estados [348]. Es poco probable, por tanto, que la sensibilidad a IGF-1 sea homogénea en todo el cultivo a menos que se emplee algún tratamiento que permita sincronizarlo (como el tratamiento con 3-MA o mitoC). Es posible que en aquellos estudios que evidenciaban que la señalización de IGF-1-IRS2 aumenta la proliferación y la expresión de marcadores fibróticos de las CEH, el efecto del tratamiento con IGF-1 se viese enmascarado por la población de CEH que, por no ser sensible a IGF-1, no entra en senescencia y sigue dividiéndose, ya que ésta sería la población más abundante del cultivo.

Capítulo 5. Discusión

Cabe remarcar que el recién descubierto estado “proregenerativo” en CEH en hígado de ratón y durante el daño hepático, se caracteriza por presentar niveles elevados de factores de crecimiento (como FGFs), bajos niveles de colágenos y niveles distintivamente elevados, entre otros, de *Serpine1*, *Igf-1* y de genes de respuesta a *IL6* (*Stat3*, *Socs* y *Tnfr1*), respecto a los otros estados [348], coincidiendo en gran medida con el fenotipo detectado aguas abajo de IRS2 en este trabajo. El estado quiescente también estaría caracterizado por una reducción de marcadores fibrogénicos, pero, a diferencia del proregenerativo, presentaría también bajos niveles de factores de crecimiento. La novedosa distinción entre estado proregenerativo y quiescente podría explicar las discrepancias de expresión génica, morfología y activación de NRF2 detectadas entre el efecto de la sobreexpresión de *Irs2* (dependiente de NRF2) y la inhibición de la activación de las CEH con 3-MA (independiente de NRF2) durante la reversión fibrogénica pudiendo cada uno favorecer a un estado antifibrótico distinto (proregenerativo/quiescente).

En base a los resultados obtenidos proponemos un modelo (**Figura 49**) en el que IRS2 participa en el dinamismo de las CEH durante el daño hepático crónico, favoreciendo su supervivencia a través del eje NRF2-SERPINE1 durante su transición a un estado “proregenerativo” caracterizado por la reversión fibrogénica y la producción de FGFs (FGF7) que promueve la epitelización de la población de CPH. En CPH, la señalización de insulina/IGF-1-IRS2 permite la respuesta a FGF7 y con ello el bucle de inducción FGF7-FGFR2b, que potencia la sensibilidad a FGF7, ya descrita como crítica para la epitelización/regeneración hepática. La resistencia a la insulina desencadenaría en un fallo en los mecanismos descritos anteriormente, lo que reprimiría la inducción en FGF7 y FGFR2b durante el daño hepático crónico, explicando la falta de sensibilidad a *Fgf7rr* observada en este trabajo en el modelo de ratón *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático crónico con la dieta DDC y su defecto en la regeneración. Así pues, a pesar de que sería conveniente confirmar nuestros resultados en modelos animales específicos de resistencia a insulina-EHGNA, así como en muestras humanas de pacientes en diferentes estadios de la progresión de diferentes enfermedades hepáticas, nuestro estudio establece un nuevo vínculo entre la resistencia a la insulina y el defecto en la epitelización hepática ofreciendo nuevos conocimientos sobre la contribución de la resistencia a la insulina en la

patogénesis de la enfermedad hepática crónica, así como nuevas dianas moleculares para el desarrollo de posibles terapias.

En los últimos años ha aumentado el interés por las FGFs por su inesperado papel en la enfermedad metabólica, así como por su emergente habilidad para restaurar la sensibilidad a insulina y con ello tratar desordenes metabólicos. FGF1, FGF19 y FGF21 presentan un potente, aunque aún bastante desconocido, efecto en el metabolismo y en la señalización de insulina, ocurriendo gran parte de sus acciones en el tejido adiposo y en hígado [349][350]. El defecto en la epitelización de herida en ratones diabéticos *db/db* ha sido previamente atribuido a un déficit en la expresión de *Fgf7* [246] y se ha demostrado que la activación constitutiva de *Nrf2* en ratones diabéticos (*db/db*) resulta en una inducción en plasma de *Fgf21* [351]. Nuestros datos por tanto plantean la posibilidad de que los hígados de los ratones *Irs2*^{-/-} presenten un déficit de activación de *Nrf2* que reprima la inducción en FGF7 y como consecuencia la comunicación paracrina entre CEH y CPH que coordina la respuesta frente al daño hepático crónico. Este mecanismo podría ser extrapolado a la reparación cutánea en la que todavía no ha sido evaluado cómo la diabetes resulta en un defecto en *Fgf7* ni el posible papel del eje *Nrf2*-*Serpine1* durante el proceso.

Futuras estrategias para potenciar en hígado la actividad de NRF2 y la señalización de FGF7 podrían servir para mejorar el pronóstico de los pacientes con resistencia a la insulina, diabetes o enfermedad metabólica por promover la reparación epitelial en hígado y reducir por tanto su riesgo de desarrollar enfermedades con elevados índices de mortalidad como la EHGNA, la EHNA o el HCC.

Capítulo 5. Discusión

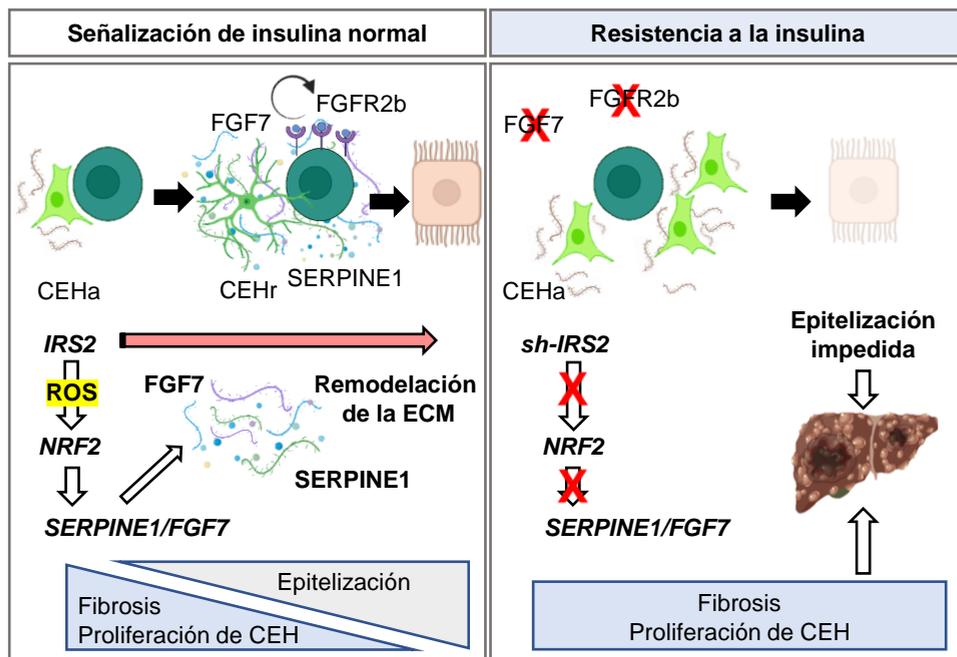


Figura 49. Modelo esquemático del impacto del papel de IRS2 en la regulación de la comunicación a través de FGFs en el nicho de las CPH, en la asociación entre la resistencia a la insulina y las patologías hepáticas.

La señalización de insulina/IGF-1-IRS2 actuaría en CEH activadas (CEHa) a través de la ruta canónica, modulada por un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), para activar a NRF2. La activación en NRF2 resultaría en una alteración de la ECM por promover, entre otros, la expresión de SERPINE1. La alteración en la ECM mediada por NRF2-SERPINE1 promovería la reversión de las CEH reduciendo su proliferación y con ello la fibrosis. La reversión fibrogénica promovería la expresión de FGF7 activando el bucle de inducción positiva de *FGFR2b* en la población de CPH y favoreciendo su epitilización. Un defecto en la señalización de insulina (resistencia a la insulina/silenciamiento de *IRS2* (*sh-IRS2*)), impediría este proceso resultando en una activación continuada de las CEH y en fibrosis que reprimiría la epitilización y la regeneración hepática. Autoría propia, "Created with BioRender.com".

Capítulo 6.

Conclusiones

1. El silenciamiento de *IRS2* impide la respuesta biológica a FGF7 a través de FGFR2b en CPH *in vivo* e *in vitro* por reprimir un novedoso bucle de inducción positiva mediante el que FGF7 promueve la expresión de su receptor, *FGFR2b*, potenciando su propia sensibilidad y sosteniendo la reepitelización.
2. La comunicación entre CEH y CPH a través de FGF7-FGFR2b ocurre de manera local y requiere de contacto estrecho entre ambas poblaciones. El sistema de cocultivo (CPH-CEH) desarrollado recrea la comunicación local a través de FGF7 entre CEH-CPH y modela la reversión fibrogénica de la línea celular LX-2 *in vitro*.
3. La línea celular HepaRG contiene una subpoblación no epitelial y productora de FGF7. En las etapas tardías de la diferenciación de la línea HepaRG el patrón de expresión de *IRS2* coincide con el de la subpoblación productora de FGF7 que rodea a las islas de hepatocitos.
4. La sobreexpresión de *Irs2* *in vitro* en CEH y en la subpoblación no epitelial de HepaRG promueve la expresión de *FGF7* e induce la epitelización de la subpoblación no epitelial en HepaRG.
5. La inducción en la expresión de FGF7 ocurre durante la reversión fibrogénica de las CEH, en lugar de durante la activación de las CEH como se había planteado anteriormente.
6. El silenciamiento de *Irs2* *in vivo* reduce la supervivencia del estroma Fgf7+.
7. El silenciamiento de *IRS2* impide la supervivencia de las CEH durante la reversión fibrogénica *in vitro*, reprimiendo la producción de FGFs y con ello la

Capítulo 6. Conclusiones

comunicación heterotípica entre CEH y CPH a través de FGF7-FGFR2b que promueve la epitelización.

8. La sobreexpresión de *Irs2 in vitro* induce la actividad de NRF2 en CPH y en CEH de manera independiente a la ruta no canónica mediada por P62.
9. P62 regula la actividad de NRF2 en CPH *in vitro* tal y como se ha descrito anteriormente en hepatocitos.
10. El mecanismo mediante el que la expresión de *IRS2* promueve la expresión de *FGF7* en CEH ocurre a través de la remodelación en la ECM mediada por el eje NRF2-SERPINE1 en las etapas tempranas de la reversión fibrogénica *in vitro*.
11. La sobreexpresión de *Irs2 in vitro* induce la expresión de *IL6* en CEH de manera independiente a la activación en NRF2.

Chapter 7.

Conclusions

1. *IRS2* silencing impairs the biological response to FGF7 through FGFR2b in LPC *in vivo* and *in vitro* by repressing a novel positive feed-forward loop in which FGF7 sustains *FGFR2b* expression and its own sensitivity to promote epithelialization.
2. Crosstalk between HSC and LPC occurs locally and requires close contact between both populations. The co-culture system developed in this work (LPC-HSC) can be used not only to recreate the heterotypic crosstalk through FGF7-FGFR2b between LPC and HSC, but also to model the fibrogenic reversion of HSC *in vitro*.
3. HepaRG cell line possesses a non-epithelial and FGF7-expressing subpopulation. During late HepaRG differentiation, *IRS2* expression pattern overlaps with the *FGF7*-expressing subpopulation that surrounds hepatocyte islands.
4. *Irs2* overexpression *in vitro* in HSC and in the non-epithelial subpopulation of HepaRG promotes *FGF7* expression and induces epithelialization of non-epithelial cells in HepaRG.
5. The expression of *FGF7* is driven by fibrogenic reversion rather than by HSC activation as it has been previously suggested.
6. *Irs2* silencing *in vivo* leads to reduced survival of Fgf7+ stroma.
7. *IRS2* silencing impairs HSC survival during fibrogenic reversion *in vitro*, thus, repressing FGFs production and the heterotypic crosstalk between HSC and LPC through FGF7-FGFR2b that drives epithelialization.

Chapter 7. Conclusions

8. *Irs2* overexpression *in vitro* induces NRF2 activity in LPC and HSC in an independent manner to the non-canonical pathway mediated by P62.
9. P62 induces NRF2 activity in LPC *in vitro* as previously described in hepatocytes.
10. *IRS2* expression promotes *FGF7* expression in HSC through a NRF2-SERPINE1-mediated ECM remodeling that occurs in the early stages of the HSC fibrogenic reversion *in vitro*.
11. *Irs2* overexpression *in vitro* in HSC induces *IL6* expression independently of the induction in NRF2 activity.

Capítulo 8.

Bibliografía

1. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships [Internet]. Endotext. 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905258>
2. HILL DJ, Milner RDG. Insulin as a growth factor. *Pediatr Res*. 1985;19:879–86.
3. Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J Am Med Assoc*. 1935;105:270–4.
4. Csajbók ÉA, Tamás G. Cerebral cortex: a target and source of insulin? *Diabetologia*. 2016. p. 1609–15.
5. Farmer TD, Jenkins EC, O'Brien TP, McCoy GA, Havlik AE, Nass ER, et al. Comparison of the physiological relevance of systemic vs. Portal insulin delivery to evaluate whole body glucose flux during an insulin clamp. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2015;308:E206–22.
6. Eaton RP, Allen RC, Schade DS. Hepatic removal of insulin in normal man: Dose response to endogenous insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;56:1294–300.
7. Polonsky KS, Rubenstein AH. C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes*. 1984. p. 486–94.
8. Draznin B. Mitogenic action of insulin: Friend, foe or “frenemy”? *Diabetologia*. 2010. p. 229–33.
9. Goalstone ML, Leitner JW, Wall K, Dolgonos L, Rother KI, Accili D, et al. Effect of insulin on farnesyltransferase. Specificity of insulin action and potentiation of nuclear effects of insulin-like growth factor-1, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273:23892–6.
10. Draznin B. Mechanism of the mitogenic influence of hyperinsulinemia. *Diabetol. Metab. Syndr*. 2011.
11. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*. 1978;253:2769–76.
12. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993;75:73–82.

Capítulo 8. Bibliografía

13. Soares MB, Ishu DN, Efstratiadis A. Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor II mRNA. *Nucleic Acids Res.* 1985;13:1119–34.
14. Bentov I, Werner H. IGF, IGF receptor and overgrowth syndromes. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2004. p. 352–60.
15. Wolf E, Hoefflich A, Lahm H. What is the function of IGF-II in postnatal life? Answers from transgenic mouse models. *Growth Horm. IGF Res.* 1998. p. 185–93.
16. Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: Dependence on growth hormone status. *Endocrinology.* 1983;113:297–305.
17. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily*. *Endocr Rev.* 1999;20:761–87.
18. Lewitt MS. Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats. *Endocrinology.* 1994;134:2404–9.
19. Feigerlova E, Hwa V, Derr MA, Rosenfeld RG. Current issues on molecular diagnosis of gh signaling defects. *Endocr Dev.* 2013;24:118–27.
20. Yakar S, Pennisi P, Kim CH, Zhao H, Toyoshima Y, Gavrilova O, et al. Studies involving the GH-IGF axis: Lessons from IGF-I and IGF-I receptor gene targeting mouse models. *J. Endocrinol. Invest.* 2005. p. 19–22.
21. Scharf JG, Knittel T, Dombrowski F, Müller L, Saile B, Bräulke T, et al. Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1998;27:1275–84.
22. Zimmermann EM, Li L, Hoyt EC, Pucilowska JB, Lichtman S, Lund PK. Cell-specific localization of insulin-like growth factor binding protein mRNAs in rat liver. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278.
23. Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 1995;16:143–63.
24. Ayatollahi M, Soleimani M, Geramizadeh B, Imanieh MH. Insulin-like growth factor 1 (IGF-I) improves hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2011;35:1169–76.
25. Breuhahn K, Schirmacher P. Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2008. p. 1690–8.
26. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, et al. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J.* 2006;20:773–5.
27. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:935–9.

28. Puche JE, Castilla-Cortázar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J. Transl. Med.* 2012.
29. Serrano Cardona L, Muñoz Mata E. Parainfo Digital. *Early Hum Dev* [Internet]. 2013;83:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.003><http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.01.002>[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(12\)70006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(12)70006-3)<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341287914000763><http://dx.doi.org/10.1016/>
30. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures, receptors, and signalling pathways. *Arch. Physiol. Biochem.* 2008. p. 17–22.
31. Czech MP. The nature and regulation of the insulin receptor: Structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* 1985. p. 357–81.
32. Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, et al. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem.* 1988;263:11486–92.
33. Denley A, Carroll JM, Brierley G V., Cosgrove L, Wallace J, Forbes B, et al. Differential Activation of Insulin Receptor Substrates 1 and 2 by Insulin-Like Growth Factor-Activated Insulin Receptors. *Mol Cell Biol.* 2007;27:3569–77.
34. Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, et al. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol.* 2004;18:2502–12.
35. Moxham CP, Duronio V, Jacobs S. Insulin-like growth factor I receptor β -subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *J Biol Chem.* 1989;264:13238–44.
36. Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2011;10:1750–6.
37. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem.* 2003;278:25323–30.
38. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 2002.
39. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993;75:59–72.
40. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* 1996;12:106–9.
41. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci.* 2003;23:7084–92.
42. Yi X, Schubert M, Peachey NS, Suzuma K, Burks DJ, Kushner JA, et al. Insulin

Capítulo 8. Bibliografía

receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells. *J Neurosci.* 2005;25:1240–8.

43. Burks DJ, De Mora JF, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, et al. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature.* 2000;407:377–82.

44. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 1998;391:900–4.

45. Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated β -cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet.* 1999;23:32–40.

46. Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P, Accili D. Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:17491–7.

47. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest.* 2000;105:199–205.

48. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem.* 2000;275:38990–4.

49. Björnholm M, He AR, Attersand A, Lake S, Liu SCH, Lienhard GE, et al. Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia.* 2002;45:1697–702.

50. Sciacchitano S, Taylor SI. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology.* 1997;138:4931–40.

51. Liu SCH, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem.* 1999;274:18093–9.

52. Escribano O, Fernández-Moreno MD, Zueco JA, Menor C, Fueyo J, Ropero RM, et al. Insulin receptor substrate-4 signaling in quiescent rat hepatocytes and in regenerating rat liver. *Hepatology.* 2003;37:1461–9.

53. Guijarro LG, Sanmartin-Salinas P, Pérez-Cuevas E, Toledo-Lobo MV, Monserrat J, Zoullas S, et al. Possible role of irs-4 in the origin of multifocal hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021;13.

54. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2000;278.

55. Fritsche L, Weigert C, Haring H-U, Lehmann R. How Insulin Receptor Substrate Proteins Regulate the Metabolic Capacity of the Liver - Implications for Health and Disease. *Curr Med Chem.* 2008;15:1316–29.

56. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: Supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 2011.

57. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4.
58. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011. p. 1978–86.
59. Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv. Biol. Regul.* 2017. p. 5–15.
60. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. p. 193–205.
61. Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. *J. Hepatol.* 2007. p. 142–56.
62. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006. p. 860–7.
63. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem.* 2002;277:42394–8.
64. Friedrich N, Thuesen B, Jørgensen T, Juul A, Spielhagen C, Wallaschofski H, et al. The association between IGF-I and insulin resistance: A general population study in Danish adults. *Diabetes Care.* 2012;35:768–73.
65. Do HD, Lohsoonthorn V, Jiamjarasrangi W, Lertmaharit S, Williams MA. Prevalence of insulin resistance and its relationship with cardiovascular disease risk factors among Thai adults over 35 years old. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;89:303–8.
66. Fahed M, Abou Jaoudeh MG, Merhi S, Mosleh JMB, Ghadieh R, Ghadieh R, et al. Evaluation of risk factors for insulin resistance: A cross sectional study among employees at a private university in Lebanon. *BMC Endocr Disord.* 2020;20.
67. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: An adipokine-mediated process? *Diabetes.* 2002;51:2951–8.
68. Racette SB, Evans EM, Weiss EP, Hagberg JM, Holloszy JO. Abdominal adiposity is a stronger predictor of insulin resistance than fitness among 50-95 year olds. *Diabetes Care.* 2006;29:673–8.
69. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med.* 2009;6:60–75.
70. Balkau B, Mhamdi L, Oppert JM, Nolan J, Golay A, Porcellati F, et al. Physical activity and insulin sensitivity the RISC study. *Diabetes.* 2008;57:2613–8.
71. McAuley K, Mann J. Nutritional determinants of insulin resistance. *J Lipid Res.* 2006;47:1668–76.
72. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: A meta-analysis. *Epidemiol. Rev.* 2007. p. 115–28.

Capítulo 8. Bibliografía

73. Lim SM, Choi DP, Rhee Y, Kim HC. Association between obesity indices and insulin resistance among healthy Korean adolescents: The JS High School study. *PLoS One*. 2015;10.
74. Barbarroja N, Lopez-Pedraza C, Garrido-Sanchez L, Mayas MD, Oliva-Olivera W, Bernal-Lopez MR, et al. Progression from High Insulin Resistance to Type 2 Diabetes Does Not Entail Additional Visceral Adipose Tissue Inflammation. *PLoS One*. 2012;7.
75. Prentki M, Nolan CJ. Islet β cell failure in type 2 diabetes. [10.1172/JCI29103](https://doi.org/10.1172/JCI29103). *J Clin Invest* [Internet]. 2006;116:1802–12. Available from: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/116/7/1802%5Cnhttp://pubmedcentralcanada.ca/picrender.cgi?accid=PMC1483155&blobtype=pdf>
76. Taylor R. Pathogenesis of type 2 diabetes: Tracing the reverse route from cure to cause. *Diabetologia*. 2008. p. 1781–9.
77. Rajkumar K, Krsek M, Dheen ST, Murphy LJ. Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996;98:1818–25.
78. Sandhu MS, Heald AH, Gibson JM, Cruickshank JK, Dunger DB, Wareham NJ. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: A prospective observational study. *Lancet*. 2002;359:1740–5.
79. Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, et al. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes*. 2001;50:1110–8.
80. Haluzik M, Yakar S, Gavrilova O, Setser J, Boisclair Y, LeRoith D. Insulin resistance in the liver-specific IGF-1 gene-deleted mouse is abrogated by deletion of the acid-labile subunit of the IGF-binding protein-3 complex: Relative roles of growth hormone and IGF-1 in insulin resistance. *Diabetes*. 2003;52:2483–9.
81. Moses AC, Young SCJ, Morrow LA, O'Brien M, Clemmons DR. Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes*. 1996;45:91–100.
82. Aguirre GA, Ita JR, Garza RG, Castilla-Cortazar I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *J Transl Med*. 2016;14.
83. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*. 2000;6:87–97.
84. Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*. 1998;2:559–69.
85. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell*. 2002;3:25–38.
86. Kubota N, Kubota T, Kajiwara E, Iwamura T, Kumagai H, Watanabe T, et al. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat Commun*. 2016;7.

87. Honma M, Sawada S, Ueno Y, Murakami K, Yamada T, Gao J, et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *Int J Obes.* 2018;42:1544–55.
88. Kumar S, Duan Q, Wu R, Harris EN, Su Q. Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021.
89. Zhou T, Kundu D, Robles-linares J, Meadows V, Sato K, Baiocchi L, et al. Feedback signaling between cholangiopathies, ductular reaction, and non-alcoholic fatty liver disease. *Cells.* 2021.
90. Rametta R, Mozzi E, Dongiovanni P, Motta BM, Milano M, Roviario G, et al. Increased insulin receptor substrate 2 expression is associated with steatohepatitis and altered lipid metabolism in obese subjects. *Int J Obes.* 2013;37:986–92.
91. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology.* 2005. p. 987–1000.
92. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2020;158:1999-2014.e1.
93. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2007;46:1081–90.
94. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology.* 1998. p. 842–5.
95. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2003;125:437–43.
96. Angulo P, Machado MV, Diehl AM. Fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and clinical implications. *Semin Liver Dis.* 2015;35:132–45.
97. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64:73–84.
98. Jäger S, Jacobs S, Kröger J, Stefan N, Fritsche A, Weikert C, et al. Association between the fatty liver index and risk of type 2 diabetes in the EPIC-Potsdam study. *PLoS One.* 2015;10.
99. Nouredin M, Vipani A, Bresee C, Todo T, Kim IK, Alkhoury N, et al. NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender Variances. *Am J Gastroenterol.* 2018;113:1649–59.
100. Gruben N, Shiri-Sverdlov R, Koonen DPY, Hofker MH. Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochim. Acta - Mol. Basis Dis.* 2014. p. 2329–43.
101. Ampuero J, Aller R, Gallego-Durán R, Crespo J, Calleja JL, García-Monzón C, et al. Significant fibrosis predicts new-onset diabetes mellitus and arterial hypertension in patients with NASH. *J Hepatol.* 2020;73:17–25.

Capítulo 8. Bibliografía

102. Kawaguchi T, Sata M. Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance: Therapeutic strategies for insulin sensitization. *World J. Gastroenterol.* 2010. p. 1943–52.
103. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol.* 2004;165:1499–508.
104. Kralj D, Jukić LV, Stojšavljević S, Duvnjak M, Smolić M, Čurčić IB. Hepatitis C virus, insulin resistance, and steatosis. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2016. p. 66–75.
105. Tazawa J, Maeda M, Nakagawa M, Ohbayashi H, Kusano F, Yamane M, et al. Diabetes mellitus may be associated with hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.* 2002;47:710–5.
106. Malato Y, Naqvi S, Schürmann N, Ng R, Wang B, Zape J, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest.* 2011;121:4850–60.
107. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, et al. Progressive Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: Association With Altered Regeneration and a Ductular Reaction. *Gastroenterology.* 2007;133:80–90.
108. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7:393–5.
109. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* 2016. p. 10–24.
110. Arteel GE, Naba A. The liver matrisome – looking beyond collagens. *JHEP Reports.* 2020.
111. Hynes RO. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science (80-.).* 2009. p. 1216–9.
112. Ortega N, Werb Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* 2002. p. 4201–14.
113. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev. Biol.* 2010. p. 126–40.
114. Wickström SA, Radovanac K, Fässler R. Genetic analyses of integrin signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. p. 1–22.
115. Katoonizadeh A, Poustchi H. Adult Hepatic Progenitor Cell Niche: How it affects the Progenitor Cell Fate. *Middle East J Dig Dis [Internet].* 2014;6:57–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872864> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4034666>
116. Lukacs-Kornek V, Lammert F. The progenitor cell dilemma: Cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury. *J. Hepatol.* 2017. p. 619–30.

117. Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ, et al. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell*. 2014;15:605–18.
118. Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev*. 2013;27:169–81.
119. Blaner WS, O’Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D’Ambrosio DM, Jiang H, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2009. p. 467–73.
120. Wake K. Perisinusoidal Stellate Cells (Fat-Storing Cells, Interstitial Cells, Lipocytes), Their Related Structure in and around the Liver Sinusoids, and Vitamin A-Storing Cells in Extrahepatic Organs. *Int Rev Cytol*. 1980;66:303–53.
121. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3:1473–92.
122. Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: Current evidence and expectations. *Korean J. Intern. Med*. 2017. p. 213–28.
123. Xu J, Liu X, Koyama Y, Wang P, Lan T, Kim IG, et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Front. Pharmacol*. 2014.
124. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DYR. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J. Clin. Invest*. 2013. p. 1902–10.
125. Barry AE, Baldeosingh R, Lamm R, Patel K, Zhang K, Dominguez DA, et al. Hepatic Stellate Cells and Hepatocarcinogenesis. *Front. Cell Dev. Biol*. 2020.
126. Kisseleva T, Cong M, Paik YH, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:9448–53.
127. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology*. 2012;143.
128. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2017. p. 397–411.
129. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2018. p. 349–64.
130. Hernandezgea V, Ghiassinejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*. 2012;142:938–46.
131. Wang B, Yang H, Fan Y, Yang Y, Cao W, Jia Y, et al. 3-Methyladenine ameliorates liver fibrosis through autophagy regulated by the NF- κ B signaling pathways on hepatic stellate cell. *Oncotarget*. 2017;8:107603–11.
132. Benyon RC, Arthur MJP. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis*. 2001. p. 373–84.

Capítulo 8. Bibliografía

133. Flevaris P, Vaughan D. The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Fibrosis. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43:169–77.
134. Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, et al. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: Role of stellate cells. *J Hepatol.* 1999;31:703–11.
135. Kooistra T, Bosma PJ, Tons HAM, Van Den Berg AP, Meyer P, Princen HMG. Plasminogen activator inhibitor 1: Biosynthesis and mRNA level are increased by insulin in cultured human hepatocytes. *Thromb Haemost.* 1989;62:723–8.
136. Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316:592–600.
137. Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Lett.* 2007;581:3098–104.
138. Yang AT, Hu DD, Wang P, Cong M, Liu TH, Zhang D, et al. TGF- β 1 induces the dual regulation of hepatic progenitor cells with both anti- and pro-liver fibrosis. *Stem Cells Int.* 2016;2016.
139. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* 2008. p. 370–9.
140. Moylan CA, Pang H, Dellinger A, Suzuki A, Garrett ME, Guy CD, et al. Hepatic gene expression profiles differentiate presymptomatic patients with mild versus severe nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;59:471–82.
141. Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;59:1393–405.
142. Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: Histological and ultrastructural study. *Histopathology.* 2006;48:546–55.
143. Burgess JL, Wyant WA, Abujamra BA, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic wound-healing science. *Med.* 2021.
144. Gæde P, Valentine WJ, Palmer AJ, Tucker DMD, Lammert M, Parving HH, et al. Cost-effectiveness of intensified versus conventional multifactorial intervention in type 2 diabetes: Results and projections from the steno-2 study. *Diabetes Care.* 2008;31:1510–5.
145. Wolosowicz M, Lukaszuk B, Chabowski A. The causes of insulin resistance in type 1 diabetes mellitus: Is there a place for quaternary prevention? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020. p. 1–13.
146. Otranto M, Nascimento AP Do, Monte-Alto-Costa A. Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. *Wound Repair Regen.* 2013;21:464–72.
147. Yu T, Gao M, Yang P, Pei Q, Liu D, Wang D, et al. Topical insulin accelerates cutaneous wound healing in insulin-resistant diabetic rats. *Am J Transl Res.* 2017;9:4682–93.

148. Peng C, Chen B, Kao HK, Murphy G, Orgill DP, Guo L. Lack of FGF-7 further delays cutaneous wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128.
149. Liu Y, Liu Y, Deng J, Li W, Nie X. Fibroblast Growth Factor in Diabetic Foot Ulcer: Progress and Therapeutic Prospects. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2021.
150. Kotsis T, Nastos C, Stamatis K, Chondroudaki I, Pafiti A, Frangou M, et al. Insulin Metabolism and Assessment of Hepatic Insulin Extraction During Liver Regeneration. A Study in a Rat Model. *J Investig Surg*. 2020;33:69–76.
151. Mori K, Ozawa K, Kiuchi T, Takada Y, Yamaguchi T, Sadamoto T, et al. Insulinopenia as a risk factor in hepatectomy and its resolution by intraportal insulin administration. *Am J Surg*. 1991;162:43–9.
152. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, Quiroga J, Perez R, Santidrian S, et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997;113:1682–91.
153. Alejandro Fernández-Rojo M, Restall C, Ferguson C, Martel N, Martin S, Bosch M, et al. Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and lipid-dependent energy metabolism: Implications for liver regeneration. *Hepatology*. 2012;55:1574–84.
154. Valdecantos MP, Pardo V, Ruiz L, Castro-Sánchez L, Lanzón B, Fernández-Millán E, et al. A novel glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonist improves steatohepatitis and liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2017;65:950–68.
155. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2010. p. 116–29.
156. Wiedemann M, Trueb B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics*. 2000;69:275–9.
157. Harmer NJ, Ilag LL, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson C V., Blundell TL. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. *J Mol Biol*. 2004;339:821–34.
158. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:107–37.
159. Klagsbrun M. The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 1990;2:857–63.
160. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the fgf receptor multigene family. *Adv Cancer Res*. 1992;60:1–41.
161. Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, et al. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol*. 1993;158:475–86.
162. Wu D, Kan M, Sato GH, Okamoto T, Sato JD. Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. *J Biol Chem*. 1991;266:16778–85.

Capítulo 8. Bibliografía

163. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J Biol Chem.* 2006;281:6120–3.
164. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:139–49.
165. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene.* 2005. p. 7455–64.
166. Basilico C, Moscatelli D. The fgf family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 1992;59:115–65.
167. Werner S. Keratinocyte growth factor: A unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9:153–65.
168. Dorey K, Amaya E. FGF signalling: Diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development.* 2010. p. 3731–42.
169. Xu J, Liu Z, Ornitz DM. Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development.* 2000;127:1833–43.
170. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001.
171. Su N, Jin M, Chen L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: Learning from mouse models. *Bone Res.* 2014.
172. Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: Key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. p. 533–7.
173. Schreuder TCMA, Marsman HA, Lenicek M, Van Werven JR, Nederveen AJ, Jansen PLM, et al. The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298.
174. Murata Y, Konishi M, Itoh N. FGF21 as an endocrine regulator in lipid metabolism: From molecular evolution to physiology and pathophysiology. *J. Nutr. Metab.* 2011.
175. Ocker M. Fibroblast growth factor signaling in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Paving the way to hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2020. p. 279–90.
176. Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, et al. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2003;163:1653–62.
177. Gauglhofer C, Sagmeister S, Schrottmaier W, Fischer C, Rodgarkia-Dara C, Mohr T, et al. Up-regulation of the fibroblast growth factor 8 subfamily in human hepatocellular carcinoma for cell survival and neoangiogenesis. *Hepatology.* 2011;53:854–64.

Capítulo 8. Bibliografía

178. Mason IJ, Fuller-Pace F, Smith R, Dickson C. FGF-7 (keratinocyte growth factor) expression during mouse development suggests roles in myogenesis, forebrain regionalisation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev.* 1994;45:15–30.
179. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem.* 2006;281:15694–700.
180. Zinkle A, Mohammadi M. Structural biology of the FGF7 subfamily. *Front. Genet.* 2019.
181. Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:5082–7.
182. De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest JM, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development.* 2000;127:483–92.
183. Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, et al. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;277:643–9.
184. Guo L, Degenstein L, Fuchs E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev.* 1996;10:165–75.
185. Qiao J, Uzzo R, Obara-Ishihara T, Degenstein L, Fuchs E, Herzlinger D. FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney. *Development.* 1999;126:547–54.
186. Mansour SL, Goddard JM, Capecchi MR. Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development.* 1993;117:13–28.
187. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) Does Not Account for the Mild Phenotypic Defects Observed in FGF2 Null Mice. *Mol Cell Biol.* 2000;20:2260–8.
188. Wojtowicz AM, Oliveira S, Carlson MW, Zawadzka A, Rousseau CF, Baksh D. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22:246–55.
189. Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:6896–900.
190. Beer HD, Florence C, Dammeier J, McGuire L, Werner S, Duan DR. Mouse fibroblast growth factor 10: cDNA cloning, protein characterization, and regulation of mRNA expression. *Oncogene.* 1997;15:2211–8.
191. Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE. Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol.* 1993;122:417–29.

Capítulo 8. Bibliografía

192. Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R, et al. A role for skin $\gamma\delta$ T cells in wound repair. *Science* (80-). 2002;296:747–9.
193. Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AML, et al. Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: Two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:246–50.
194. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* (80-). 1994;266:819–22.
195. Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, et al. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev*. 1998;12:3156–61.
196. Beyer TA, Werner S, Dickson C, Grose R. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Exp Cell Res*. 2003;287:228–36.
197. Steiling H, Wüstefeld T, Bugnon P, Brauchle M, Fässler R, Teupser D, et al. Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration. *Oncogene*. 2003;22:4380–8.
198. Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat. *Cell Growth Differ*. 1995;6:1019–25.
199. Stelling H, Mühlbauer M, Bataille F, Schölmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol*. 2004;165:1233–41.
200. Katsumata LW, Miyajima A, Itoh T. Portal fibroblasts marked by the surface antigen Thy1 contribute to fibrosis in mouse models of cholestatic liver injury. *Hepatol Commun*. 2017;1:198–214.
201. Utley S, James D, Mavila N, Nguyen M V., Vendryes C, Salisbury SM, et al. Fibroblast growth factor signaling regulates the expansion of A6-expressing hepatocytes in association with AKT-dependent β -catenin activation. *J Hepatol*. 2014;60:1002–9.
202. Xu D, Xu M, Jeong S, Qian Y, Wu H, Xia Q, et al. The role of Nrf2 in liver disease: Novel molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Front. Pharmacol*. 2019.
203. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, Von Knethen A. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *Int. J. Mol. Sci*. 2017.
204. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med*. 2004. p. 1199–207.
205. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal*. 2010.
206. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated by the Antioxidant Response Element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2003. p. 233–60.

207. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14960–5.
208. Derjuga A, Gourley TS, Holm TM, Heng HHQ, Shivdasani RA, Ahmed R, et al. Complexity of CNC Transcription Factors As Revealed by Gene Targeting of the Nrf3 Locus. *Mol Cell Biol*. 2004;24:3286–94.
209. Chen L, Kwong M, Lu R, Ginzinger D, Lee C, Leung L, et al. Nrf1 Is Critical for Redox Balance and Survival of Liver Cells during Development. *Mol Cell Biol*. 2003;23:4673–86.
210. Chan JY, Kwong M, Lu R, Chang J, Wang B, Yen TSB, et al. Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J*. 1998;17:1779–87.
211. Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13943–8.
212. Chan K, Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12731–6.
213. Hubbs AF, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP, Battelli L, Schwegler-Berry D, et al. Vacuolar leukoencephalopathy with widespread astrogliosis in mice lacking transcription factor Nrf2. *Am J Pathol*. 2007;170:2068–76.
214. Li J, Stein TD, Johnson JA. Genetic dissection of systemic autoimmune disease in Nrf2-deficient mice. *Physiol Genomics*. 2004;18:261–72.
215. auf dem Keller U, Huber M, Beyer TA, Kümmin A, Siemes C, Braun S, et al. Nrf Transcription Factors in Keratinocytes Are Essential for Skin Tumor Prevention but Not for Wound Healing. *Mol Cell Biol*. 2006;26:3773–84.
216. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3410–5.
217. Shen G, Xu C, Hu R, Jain MR, Gopalkrishnan A, Nair S, et al. Modulation of nuclear factor E2-related factor 2-mediated gene expression in mice liver and small intestine by cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:39–51.
218. Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res*. 2006;66:8293–6.
219. Yates MS, Kwak MK, Egner PA, Groopman JD, Bodreddigari S, Sutter TR, et al. Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole. *Cancer Res*. 2006;66:2488–94.

Capítulo 8. Bibliografía

220. Sporn MB, Liby KT. Cancer chemoprevention: Scientific promise, clinical uncertainty. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2005. p. 518–25.
221. Lo SC, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.* 2006;25:3605–17.
222. Padmanabhan B, Tong KI, Kobayashi A, Yamamoto M, Yokoyama S. Structural insights into the similar modes of Nrf2 transcription factor recognition by the cytoplasmic repressor Keap1. *J Synchrotron Radiat.* 2008;15:273–6.
223. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2016.
224. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 2009. p. 181–97.
225. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 2010;12:213–23.
226. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr. Opin. Toxicol.* 2016. p. 54–61.
227. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxidants Redox Signal.* 2005. p. 1021–31.
228. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, et al. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H₂O₂ and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Mol Cell Biol.* 2004;24:1844–54.
229. Mohs A, Otto T, Schneider KM, Peltzer M, Boekschoten M, Holland CH, et al. Hepatocyte-specific NRF2 activation controls fibrogenesis and carcinogenesis in steatohepatitis. *J Hepatol.* 2021;74:638–48.
230. Hardwick RN, Fisher CD, Canet MJ, Lake AD, Cherrington NJ. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:2293–301.
231. Chambel SS, Santos-Gonçalves A, Duarte TL. The dual role of Nrf2 in nonalcoholic fatty liver disease: Regulation of antioxidant defenses and hepatic lipid metabolism. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
232. Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, Gyamfi MA, Esterly N, Guo GL, et al. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325:655–64.
233. Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, Wakabayashi N, Dolan PM, Aja S, et al. Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide. *Eur J Pharmacol.* 2009;620:138–44.

234. Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh S V., Tsujita T, et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:357–71.
235. Solano-Urrusquieta A, Morales-González JA, Castro-Narro GE, Cerda-Reyes E, Flores-Rangel PD, Fierros-Oceguera R. NRF-2 and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* 2020. p. 458–65.
236. Beyer TA, Xu W, Teupser D, Auf Dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: Role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J.* 2008;27:212–23.
237. Xu W, Hellerbrand C, Köhler UA, Bugnon P, Kan YW, Werner S, et al. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Investig.* 2008;88:1068–78.
238. Fragoulis A, Schenkel J, Herzog M, Schellenberg T, Jahr H, Pufe T, et al. Nrf2 ameliorates DDC-induced sclerosing cholangitis and biliary fibrosis and improves the regenerative capacity of the liver. *Toxicol Sci.* 2019;169:485–98.
239. Khambu B, Huda N, Chen X, Antoine DJ, Li Y, Dai G, et al. HMGB1 promotes ductular reaction and tumorigenesis in autophagy-deficient livers. *J Clin Invest.* 2018;128:2419–35.
240. Ni HM, Woolbright BL, Williams J, Copple B, Cui W, Luyendyk JP, et al. Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy. *J Hepatol.* 2014;61:617–25.
241. Soares MA, Cohen OD, Low YC, Sartor RA, Ellison T, Anil U, et al. Restoration of Nrf2 signaling normalizes the regenerative niche. *Diabetes.* 2016;65:633–46.
242. Long M, De La Vega MR, Wen Q, Bharara M, Jiang T, Zhang R, et al. An essential role of NRF2 in diabetic wound healing. *Diabetes.* 2016;65:780–93.
243. Rabbani PS, Zhou A, Borab ZM, Frezzo JA, Srivastava N, More HT, et al. Novel lipoproteoplex delivers Keap1 siRNA based gene therapy to accelerate diabetic wound healing. *Biomaterials.* 2017;132:1–15.
244. Hiebert P, Wietecha MS, Cangkrama M, Haertel E, Mavrogonatou E, Stumpe M, et al. Nrf2-Mediated Fibroblast Reprogramming Drives Cellular Senescence by Targeting the Matrisome. *Dev Cell.* 2018;46:145-161.e10.
245. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol.* 2006;8:878–84.
246. Werner S, Breeden M, Hübner G, Greenhalgh DG, Longaker MT. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol.* 1994;103:469–73.
247. Wan R, Weissman JP, Grundman K, Lang L, Grybowski DJ, Galiano RD. Diabetic wound healing: The impact of diabetes on myofibroblast activity and its potential therapeutic treatments. *Wound Repair Regen.* 2021;29:573–81.
248. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. p. 34–44.

Capítulo 8. Bibliografía

249. Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a Central Regulator of High Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One*. 2013;8.
250. Jaskiewicz K, Rzepko R, Sledzinski Z. Fibrogenesis in fatty liver associated with obesity and diabetes mellitus type 2. *Dig Dis Sci*. 2008;53:785–8.
251. Jensen VS, Fledelius C, Zachodnik C, Damgaard J, Nygaard H, Tornqvist KS, et al. Insulin treatment improves liver histopathology and decreases expression of inflammatory and fibrogenic genes in a hyperglycemic, dyslipidemic hamster model of NAFLD. *J Transl Med*. 2021;19.
252. Francavilla A, Starzl TE, Porter K, Foglieni CS, Michalopoulos GK, Carrieri G, et al. Screening for candidate hepatic growth factors by selective portal infusion after canine Eck's fistula. *Hepatology*. 1991;14:665–70.
253. Xu MQ, Yan LN, Li B, Wen TF, Zeng Y, Zhao JC, et al. Initial Clinical Effect of Intraportal Insulin Administration on Liver Graft Regeneration in Adult Patients Underwent Living Donor Right Lobe Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:1698–702.
254. Xu MQ, Yan LN, Li B, Zeng Y, Wen TF, Zhao JC, et al. Augmented hepatic regeneration of living donor liver graft by intraportal insulin administration. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2009;47:821–4.
255. Okita K, Matsuda S, Hanta T, Yasunaga M, Sanuki K, Takemoto T. Clinical evaluation of glucagon and insulin in therapy of fulminant hepatitis. *Gastroenterol Jpn*. 1987;22:607–13.
256. Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lécluse Y, Housset C, et al. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 2005;167:869–77.
257. Svegliati-Baroni G, Faraci G, Fabris L, Saccomanno S, Cadamuro M, Pierantonelli I, et al. Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C. *Gut*. 2011;60:108–15.
258. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*. 2004;113:1774–83.
259. He L, Hou X, Kanel G, Zeng N, Galicia V, Wang Y, et al. The critical role of AKT2 in hepatic steatosis induced by PTEN loss. *Am J Pathol*. 2010;176:2302–8.
260. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*. 2014;157:1324–38.
261. Jeong SH, Kim HB, Kim MC, Lee JM, Lee JH, Kim JH, et al. Hippo-mediated suppression of IRS2/AKT signaling prevents hepatic steatosis and liver cancer. *J Clin Invest*. 2018;128:1010–25.
262. Cheetham SW, Brand AH. Insulin finds its niche. *Science (80-.)*. 2013. p. 817–8.

263. Chell JM, Brand AH. Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell*. 2010;
264. Huang Y-H, Chin C-C, Ho H-N, Chou C-K, Shen C-N, Kuo H-C, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J*. 2009;23:2076–87.
265. Ye P, Popken GJ, Kemper A, McCarthy K, Popko B, D'Ercole AJ. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-I promotes brain overgrowth and glial fibrillary acidic protein expression. *J Neurosci Res*. 2004;78:472–84.
266. Åberg MAI, Åberg ND, Hedbäck H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20:2896–903.
267. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. *Diabetes*. 2000;49:1880–9.
268. Manzano-Núñez F, Arámbul-Anthony MJ, Galán Albiñana A, Leal Tassias A, Acosta Umazor C, Borreda Gascó I, et al. Insulin resistance disrupts epithelial repair and niche-progenitor Fgf signaling during chronic liver injury. *PLoS Biol*. 2019;17.
269. Fickert P, Stöger U, Fuchsbichler A, Moustafa T, Marschall HU, Weiglein AH, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol*. 2007;171:525–36.
270. Correction to: Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances: Liver Injury and Regeneration (*Hepatology*, (2019), 69, 1, (420-430), 10.1002/hep.30150). *Hepatology*. 2019. p. 1089.
271. Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma hepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology*. 2007;45:957–67.
272. Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and kupffer cells from normal human liver: Morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*. 1992;15:234–43.
273. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005;54:142–51.
274. Jhala US, Canetti G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, et al. cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*. 2003;17:1575–80.
275. Manzano-Nuñez F, Noon LA. Papel de IRS2 en la reparación del daño hepático y cáncer. 2019;
276. Folgado PB, Noon LA. Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2): a role in Hepatic Stellate Cells. Final degree work. 2018;2.
277. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants Redox Signal*. 2018. p. 1727–45.

Capítulo 8. Bibliografía

278. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2009. p. 13291–5.
279. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol. Res.* 2018. p. 92–9.
280. Sugiyama M, Yoshizumi T, Yoshida Y, Bekki Y, Matsumoto Y, Yoshiya S, et al. p62 Promotes Amino Acid Sensitivity of mTOR Pathway and Hepatic Differentiation in Adult Liver Stem/Progenitor Cells. *J Cell Physiol.* 2017;232:2112–24.
281. Duran A, Hernandez ED, Reina-Campos M, Castilla EA, Subramaniam S, Raghunandan S, et al. p62/SQSTM1 by Binding to Vitamin D Receptor Inhibits Hepatic Stellate Cell Activity, Fibrosis, and Liver Cancer. *Cancer Cell.* 2016;30:595–609.
282. Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia. Inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem.* 2009;284:31484–92.
283. Riehle C, Wende AR, Sena S, Pires KM, Pereira RO, Zhu Y, et al. Insulin receptor substrate signaling suppresses neonatal autophagy in the heart. *J Clin Invest.* 2013;123:5319–33.
284. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell.* 2008;134:657–67.
285. Guo Q, Chen M, Chen Q, Xiao G, Chen Z, Wang X, et al. Silencing p53 inhibits interleukin 10-induced activated hepatic stellate cell senescence and fibrotic degradation in vivo. *Exp Biol Med.* 2021;246:447–58.
286. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med.* 2006;10:76–99.
287. Friedman SL. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 2008. p. 125–72.
288. Gupta G, Khadem F, Uzonna JE. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. *Cytokine.* 2019;124.
289. Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Chatterjee VKK, Tsukamoto H. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Induces a Phenotypic Switch from Activated to Quiescent Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem.* 2004;279:11392–401.
290. Lakner AM, Moore CC, Gullledge AA, Schrum LW. Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation. *World J Gastroenterol.* 2010;16:5047–56.
291. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct. Funct.* 2003. p. 105–12.
292. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Investig.* 1984;51:57–74.

293. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 1996;271:15292–7.
294. Böhm F, Speicher T, Hellerbrand C, Dickson C, Partanen JM, Ornitz DM, et al. FGF receptors 1 and 2 control chemically induced injury and compound detoxification in regenerating livers of mice. *Gastroenterology.* 2010;139.
295. Steinberg Z, Myers C, Heim VM, Lathrop CA, Rebutini IT, Stewart JS, et al. FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development.* 2005;132:1223–34.
296. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeehan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4513–22.
297. Marion MJ, Hantz O, Durantel D. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol.* 2010;640:261–72.
298. Malinen MM, Kanninen LK, Corlu A, Isoniemi HM, Lou YR, Yliperttula ML, et al. Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. *Biomaterials.* 2014;35:5110–21.
299. Wen Y, Jeong S, Xia Q, Kong X. Role of osteopontin in liver diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2016. p. 1121–8.
300. Liu Y, Cao L, Chen R, Zhou X, Fan X, Liang Y, et al. Osteopontin Promotes Hepatic Progenitor Cell Expansion and Tumorigenicity via Activation of β -Catenin in Mice. *Stem Cells.* 2015;33:3569–80.
301. Lancha A, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Sáinz N, Ramírez B, et al. Osteopontin deletion prevents the development of obesity and hepatic steatosis via impaired adipose tissue matrix remodeling and reduced inflammation and fibrosis in adipose tissue and liver in mice. *PLoS One.* 2014;9.
302. Coombes JD, Swiderska-Syn M, Dollé L, Reid D, Eksteen B, Claridge L, et al. Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice. *Gut.* 2015;64:1120–31.
303. Wang X, Lopategi A, Ge X, Lu Y, Kitamura N, Urtasun R, et al. Osteopontin induces ductular reaction contributing to liver fibrosis. *Gut.* 2014;63:1805–18.
304. Li G, Oparil S, Kelpke SS, Chen YF, Thompson JA. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation.* 2002;106:854–9.
305. Gimba ER, Tilli TM. Human osteopontin splicing isoforms: Known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Lett.* 2013. p. 11–7.
306. Shinohara ML, Kim HJ, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7235–9.

Capítulo 8. Bibliografía

307. Harrison SP, Baumgarten SF, Verma R, Lunov O, Dejneka A, Sullivan GJ. Liver Organoids: Recent Developments, Limitations and Potential. *Front. Med.* 2021.
308. Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: Structures, functions and challenges. *Front. Biosci.* 2008. p. 4309–38.
309. Cordero-Espinoza L, Dowbaj AM, Kohler TN, Strauss B, Sarlidou O, Belenguer G, et al. Dynamic cell contacts between periportal mesenchyme and ductal epithelium act as a rheostat for liver cell proliferation. *Cell Stem Cell.* 2021;28:1907-1921.e8.
310. Coll M, Perea L, Boon R, Leite SB, Vallverdú J, Mannaerts I, et al. Generation of Hepatic Stellate Cells from Human Pluripotent Stem Cells Enables In Vitro Modeling of Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell.* 2018;23:101-113.e7.
311. Jin H, Lian N, Zhang F, Chen L, Chen Q, Lu C, et al. Activation of PPAR γ /p53 signaling is required for curcumin to induce hepatic stellate cell senescence. *Cell Death Dis.* 2016;7.
312. Nishizawa H, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Suda K, Bando H, et al. IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. *Sci Rep.* 2016;6.
313. Lara-Diaz V, Castilla-Cortazar I, Martín-Estal I, García-Magariño M, Aguirre G, Puche J, et al. IGF-1 modulates gene expression of proteins involved in inflammation, cytoskeleton, and liver architecture. *J Physiol Biochem.* 2017;73:245–58.
314. Arturi F, Succurro E, Procopio C, Pedace E, Mannino GC, Lugarà M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96.
315. Caufriez A, Reding P, Urbain D, Golstein J, Copinschi G. Insulin-like growth factor I: a good indicator of functional hepatocellular capacity in alcoholic liver cirrhosis. *J Endocrinol Invest.* 1991;14:317–21.
316. Assy N, Hochberg Z, Amit T, Shen-Orr Z, Enat R, Baruch Y. Growth hormone-stimulated insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein-3 in liver cirrhosis. *J Hepatol.* 1997;27:796–802.
317. Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology.* 2008;47:636–47.
318. Yang T, Poenisch M, Khanal R, Hu Q, Dai Z, Li R, et al. Therapeutic HNF4A mRNA attenuates liver fibrosis in a preclinical model. *J Hepatol.* 2021;75:1420–33.
319. Sanchez-Lopez E, Flashner-Abramson E, Shalapour S, Zhong Z, Taniguchi K, Levitzki A, et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling. *Oncogene.* 2016;35:2634–44.
320. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell.* 2009;16:425–38.

321. Lu L, Finegold MJ, Johnson RL. Hippo pathway coactivators yap and taz are required to coordinate mammalian liver regeneration. *Exp Mol Med*. 2018;50.
322. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology*. 2009;136.
323. Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: Correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol*. 2000;33:76–84.
324. Lee KP, Lee JH, Kim TS, Kim TH, Park HD, Byun JS, et al. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8248–53.
325. Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, Guénon I, Thorgeirsson SS, Clément B. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2012;72:2533–42.
326. Ji J, Eggert T, Budhu A, Forgues M, Takai A, Dang H, et al. Hepatic stellate cell and monocyte interaction contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2015;62:481–95.
327. Wang H, Yang J, Zhang K, Liu J, Li Y, Su W, et al. Advances of Fibroblast Growth Factor/Receptor Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma and its Pharmacotherapeutic Targets. *Front. Pharmacol*. 2021.
328. Bocci F, Tripathi SC, Vilchez Mercedes SA, George JT, Casabar JP, Wong PK, et al. NRF2 activates a partial epithelial-mesenchymal transition and is maximally present in a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Integr Biol (Camb)*. 2019;11:251–63.
329. Sharma RS, Harrison DJ, Kisielewski D, Cassidy DM, McNeilly AD, Gallagher JR, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). *Cmgh*. 2018;5:367–98.
330. Ramadori P, Drescher H, Erschfeld S, Schumacher F, Berger C, Fragoulis A, et al. Hepatocyte-specific Keap1 deletion reduces liver steatosis but not inflammation during non-alcoholic steatohepatitis development. *Free Radic Biol Med*. 2016;91:114–26.
331. Prestigiacomo V, Suter-Dick L. Nrf2 protects stellate cells from Smad-dependent cell activation. *PLoS One*. 2018;13.
332. Bellanti F, di Bello G, Iannelli G, Pannone G, Pedicillo MC, Boulter L, et al. Inhibition of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 promotes hepatic progenitor cell activation and differentiation. *npj Regen Med*. 2021;6.
333. Geetha T, Zheng C, Vishwaprakash N, Broderick TL, Babu JR. Sequestosome 1/p62, a scaffolding protein, is a newly identified partner of IRS-1 protein. *J Biol Chem*. 2012;287:29672–8.
334. Xu Z, Chen L, Leung L, Yen TSB, Lee C, Chan JY. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic

Capítulo 8. Bibliografía

neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:4120–5.

335. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:5718–34.

336. Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marión RM, Chondronasiou D, Rovira M, et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science (80-).* 2016;354.

337. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6.

338. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 2016. p. 1403–15.

339. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MHS, Henstridge DC, Watson N, et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia.* 2010;53:2431–41.

340. Kovalovich K, Deangelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6- deficient mice. *Hepatology.* 2000;31:149–59.

341. Kim Y, Fiel MI, Albanis E, Chou HI, Zhang W, Khitrov G, et al. Anti-fibrotic activity and enhanced interleukin-6 production by hepatic stellate cells in response to imatinib mesylate. *Liver Int.* 2012;32:1008–17.

342. Nieto N. Oxidative-stress and IL6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology.* 2006;44:1487–501.

343. Liu Y, Brymora J, Zhang H, Smith B, Ramezani-Moghadam M, George J, et al. Leptin and Acetaldehyde Synergistically Promotes α SMA Expression in Hepatic Stellate Cells by an Interleukin 6-Dependent Mechanism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35:921–8.

344. Villar-Lorenzo A, Rada P, Rey E, Marañón P, Arroba AI, Santamaría B, et al. Insulin receptor substrate 2 (IRS2) deficiency delays liver fibrosis associated with cholestatic injury. *DMM Dis Model Mech.* 2019;12.

345. Gressner AM, Lahme B, Brenzel A. Molecular dissection of the mitogenic effect of hepatocytes on cultured hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1995;

346. Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodríguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, et al. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut.* 2005;54:134–41.

347. Rosenthal SB, Liu X, Ganguly S, Dhar D, Pasillas MP, Ricciardelli E, et al. Heterogeneity of HSCs in a Mouse Model of NASH. *Hepatology.* 2021;74:667–85.

348. Cook D, Achanta S, Hoek JB, Ogunnaike BA, Vadigepalli R. Cellular network modeling and single cell gene expression analysis reveals novel hepatic stellate cell phenotypes controlling liver regeneration dynamics. *BMC Syst Biol.* 2018;12.

Capítulo 8. Bibliografía

349. Itoh N, Nakayama Y, Konishi M. Roles of FGFs as paracrine or endocrine signals in liver development, health, and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016.
350. Nies VJM, Sancar G, Liu W, Van Zutphen T, Struik D, Yu RT, et al. Fibroblast growth factor signaling in metabolic regulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2016.
351. Furusawa Y, Uruno A, Yagishita Y, Higashi C, Yamamoto M. Nrf2 induces fibroblast growth factor 21 in diabetic mice. *Genes to Cells*. 2014;19:864–78.