

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 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 HNF4α 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