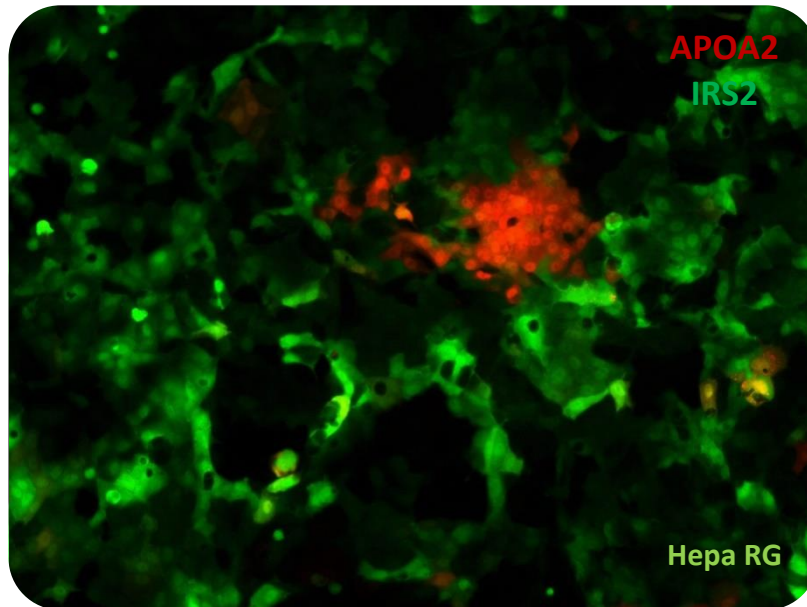


# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## *El papel del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) en hepatogénesis y hepatocarcinogénesis*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Anna Quirant Pellín

TUTOR: Luke Noon

TUTORA UPV: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

## TÍTULO DEL PROYECTO: *El papel del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) en hepatogénesis y hepatocarcinogénesis*

**RESUMEN:** El sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2), efector clave en la transducción de la señalización canónica de la insulina, se ha visto que está implicado en el desarrollo de resistencia a insulina, estado patológico que caracteriza a los enfermos de diabetes tipo II. Como consecuencia de la hiperinsulinemia éstos desarrollan un conjunto de complicaciones, siendo uno de los principales órganos diana afectados el hígado. Se piensa que IRS2 podría jugar un papel clave el proceso de transición de células progenitoras a células hepáticas maduras debido a que en su ausencia el hígado pierde su capacidad intrínseca de regeneración. El principal objetivo de este trabajo ha sido el diseño de un protocolo que ayudará en la caracterización espaciotemporal de IRS2 durante la hepatogénesis temprana de células HepaRG, mediante *time-lapse* de fluorescencia. Los resultados muestran que IRS2 juega un papel directo en la diferenciación de los hepatocitos en cultivos HepaRG, por tanto, concluimos que estrategias para promover la expresión de IRS2 potencialmente podrían favorecer los procesos regenerativos en el contexto de la lesión hepática crónica o hepatocarcinoma, en el que la diferenciación intratumoral se asocia con mejor pronóstico. Por lo tanto, en la parte final de este proyecto hemos comenzado a adaptar nuestro protocolo experimental para avanzar hacia un futuro cribado de alto rendimiento, de compuestos capaces de promover la expresión de IRS2 y ayudar a impulsar la hepatogénesis humana. Con este objetivo, hemos probado dos compuestos, que anteriormente han demostrado promover la diferenciación en cultivos de HepaRG y discutimos cómo futuras modificaciones de nuestro protocolo podrían servir para identificar nuevos compuestos que podrían ser usados en una "terapia de diferenciación".

**PALABRAS CLAVE:** *Sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2), diferenciación hepática, hepatocarcinogénesis, time-lapse con fluorescencia, cribado.*

**PROJECT'S TITLE:** *The role of insulin receptor substrate 2 (IRS2) in hepatogenesis and hepatocarcinogenesis*

**ABSTRACT:** Insulin receptor substrate 2 (IRS2), a key effector in the transduction of canonical insulin signaling, has been implicated in the development of insulin resistance, a pathological condition that characterizes patients with type II diabetes. As a consequence of hyperinsulinemia, these patients develop a set of complications, in target organs such as the liver. It is thought that IRS2 could play a key role in the transition from progenitor cells to mature liver cells because deletion of IRS2 reduces the liver's regenerative capacity. The central aim of this project was to characterize in detail the spatio-temporal patterning of IRS2 expression during early HepaRG hepatogenesis using fluorescence time-lapse microscopy. The data from this study suggest that IRS2 plays a direct role in HepaRG-hepatocyte differentiation, and hence we conclude that strategies to promote IRS2 expression could potentially favor regenerative processes in the context of chronic liver injury or hepatocarcinoma in which intratumoral differentiation is associated with better prognosis. Thus, in the final part of this project we have begun to adapt our experimental protocol to enable future high-throughput screening of compounds that can promote IRS2 expression and help to drive human hepatogenesis. Towards this goal, we tested two compounds, which had previously been shown to promote differentiation and we discuss how future modifications to our protocol may serve to identify novel compounds to be used in a possible "differentiation therapy".

**KEY WORDS:** Insulin receptor substrate 2 (IRS2), hepatic differentiation, hepatocarcinogenesis, fluorescence time-lapse, screening.

## Agraïments

*En primer lloc m'agradaria agrair-li a Luke haver-me obert les portes del seu laboratori i haver valorat el meu CV en forma de cromosoma. Sempre disposat a explicar-me qualsevol dubte, a ajudar-me en el que necessités (inclòs per telèfon des de UK) amb un somriure i sempre fent broma. Gràcies per haver-me ensenyat ciència de les millors de les maneres i per valorar el meu costat més creatiu.*

*"With the permission of the court, I proceed to dance the conclusions of the project".*

*Gràcies també a tot l' I-23( Carlos, Arantxa, Amparo, Deborah) per haver-me fent sentir tan a gust. Especialment Fátima i "Eme Jota" no sols per haver-me ensenyat tot el que sabeu, també per fer que no m'importés quedar-me fent experiment fins les tantes amb vosaltres i fer contraban de xocolata.*

*No m'oblidi de l'I-57! Gràcies a Juan Diego per haver tingut tanta paciència i ajudar-me a dissenyar els macros, a José Miguel (l'assassí de la pipeta) per les seues dades curioses i els seus comentaris "frikis", a Aratixi per la seua alegria, no més entrar per la porta.*

*Però també als no tant científics...Agrair al titi que sempre escolta les meues mogudes científiques amb una tassa d'infusions calenteta a Beni, allà on el món s'explica en diminutiu. Gràcies també a tu per furgar-me quan més ho necessite.*

*I per suposat als meus pares i el meu germà, per recolzar-me sempre encara que no tingueren ni idea de què era allò de ser biotecnòquè? Per haver-me ajudat amb els seus consells i amb les meues indecisions. Perquè voler ser investigadora no es gens fàcil però m'heu ajudat a aconseguir-ho.*

*Ah, no se m'obliden els meus amics d'Image J Forum! Quina xufa de macros m'haguera eixit sense els seus consells.*

*Sense ells, no hagués gaudit tan d'aquest projecte. Sou cienciacionals!*

***To me,  
the best thing about living like a lab rat is that sometimes, really rare times,  
you actually discover something.***

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS.....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 DIABETES TIPO II: BASES MOLECULARES .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Alteraciones fisiológicas: resistencia a insulina .....	8
1.1.2 Señalización de insulina/IGF1 a través de IRS2 .....	8
1.1.3 Implicación de IRS2 en el desarrollo de la resistencia a insulina.....	9
<b>1.2 HEPATOGÉNESIS Y HEPATOCARCINOGENÉESIS .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Implicación de IRS2 en hepatogénesis y regeneración hepática.....	10
1.2.2 Relación IRS2 y del desarrollo de CHC .....	11
1.2.3 Compuestos inductores de diferenciación .....	12
<b>1.3 MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE IRS2 .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Modelo <i>in vitro</i> : cultivos HepaRG .....	13
1.3.2 Modelo <i>in vivo</i> : ratones IRS2 y Knock-in IRS2 GFP .....	14
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Caracterización espaciotemporal IRS2 mediante time-lapse de fluorescencia .....	15
2.2.2 Diseño y puesta a punto del protocolo para la caracterización de IRS2 .....	16
2.2.3 Adaptación del protocolo para el cribado de compuestos promotores de IRS2 ....	16
2.2.4 Puesta a punto del modelo <i>in vivo</i> : ratones knock-in IRS2-GFP.....	16
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 MATERIALES .....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Líneas celulares.....	16
3.1.2 Ratones <i>knock-in</i> IRS2-GFP .....	16
3.1.3 Ratones control .....	17
3.1.4 Microscopio time-lapse de fluorescencia.....	17
3.1.5 Anticuerpos <i>Western Blot</i> y tinción inmunohistoquímica.....	17
<b>3.2 MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Cultivo celular .....	17
3.2.2 Análisis y cuantificación de las imágenes .....	17
3.2.3 <i>Western Blot</i> .....	17
3.2.3.1 Extracción de proteínas .....	17
3.2.3.2 Cuantificación de proteínas.....	18
3.2.3.3 Separación de las proteínas.....	18
3.2.3.4 Transferencia proteínas.....	18
3.2.3.5 Bloqueo e hibridación con anticuerpo primario.....	18
3.2.3.6 Detección y revelado .....	18

3.2.4 Análisis estadístico.....	18
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
4.1.1 Diseño del protocolo para la caracterización de IRS2 .....	19
4.1.1.1 Prueba de concepto.....	19
4.1.1.2 Optimización del protocolo .....	28
4.1.1.3 Resultados del experimento 1: condiciones control y sin insulina.....	29
4.1.1.4 Puesta a punto del ensayo de cribado: prueba con FGF7 y 3-MA. ....	33
4.1.1.5 Resultados de cribado de compuestos inductores de IRS2: FGF7 y 3-MA .....	34
4.1.1.6 Caracterización de los ratones <i>Knock-in</i> IRS2-GFP .....	39
<b>4.2 DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>44</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema señalización de la insulina.....	9
Figura 2. Islas de hepatocitos bajo el microscopio. ....	11
Figura 3. Esquema resumen: procesos en los que está implicado IRS2. ....	12
Figura 4. Modelo <i>in vitro</i> : células HepaRG pIRS2-GFP pAPOA2-RFP. ....	13
Figura 5. Hipótesis (1) IRS2 juega un papel directo en el proceso de diferenciación. ....	14
Figura 6. Hipótesis (2) IRS2 juega un papel indirecto en el proceso de diferenciación. ....	15
Figura 7. Condiciones del experimento 1 diseñado para la prueba de concepto. ....	19
Figura 8. Esquema del proceso de conversión de archivos para su análisis en ImageJ .....	20
Figura 9. Ajuste color e intensidad de las imágenes en Image J. ....	20
Figura 10. Esquema pasos seguidos para medida de intensidad de APOA2 dentro de las islas a lo largo del tiempo. t0= tiempo inicial. tf= tiempo final=t72 horas. ROI: region of interest.....	22
Figura 11. Esquema pasos seguidos para medida de intensidad de IRS2 dentro de las islas a lo largo del tiempo .....	22
Figura 12. Esquema pasos seguidos para medida de intensidad de APOA2 e IRS2 fuera de las islas a lo largo del tiempo. ....	23
Figura 13. Esquema pasos seguidos para medida del área de APOA2 a tiempo inicial y final.....	24
Figura 14. Esquema segundo experimento: condiciones control y sin insulina .....	28
Figura 15. Recopilación resultados Experimento 1: control.....	29
Figura 16. Evolución de la intensidad de APOA2.....	30
Figura 17. Incremento de la intensidad de APOA2 dentro y fuera de las islas en condiciones control y sin insulina: experimento 1 .....	30
Figura 18. Área de diferenciación Experimento 1: control, - insulina. ....	31
Figura 19. Índice de diferenciación hepatocítica: experimento 1. ....	32
Figura 19. Evolución de los niveles de IRS2: experimento 1. ....	32
Figura 21. Incremento de la expresión de IRS2: experimento 1. ....	33
Figura 22. Diseño experimento prueba de concepto: adaptación cribado. ....	33
Figura 23. Resultados prueba de concepto: adaptación cribado. ....	34
Figura 24. Diseño experimento cribado: FGF7 y 3MA. ....	35
Figura 25. Intensidades medias de APOA2 y IRS2 a lo largo del tiempo dentro y fuera de las islas: experimento4. ....	35
Figura 26. Evolución de las intensidades de APOA2 e IRS2 a lo largo del tiempo por pocillo.....	36
Figura 27. Intensidad APOA2: cribado con FGF7 y 3-MA. ....	36
Figura 28. Área de diferenciación Experimento 4: FGF7, 3-MA. ....	37

Figura 29. Índice de diferenciación hepatocítica experimento 4:FGF7 y 3-MA. ....	38
Figura 30. Evolución de los niveles de IRS2: experimento 4. ....	39
Figura 31. Incremento de la expresión de IRS2: experimento 4. ....	39
Figura 32. Caracterización del modelo <i>in vivo</i> : tinción inmunohistoquímica.....	41
Figura 33. Caracterización del modelo <i>in vivo</i> : Western Blot.....	41

## NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

**+INS:** medio suplementado con insulina  
**3-MA:** 3-Metiladenina  
**AFP:**  $\alpha$ -fetoproteína  
**AKT:** proteína quinasa B  
**APOA2:** apolipoproteína II  
**CHC:** carcinoma hepatocelular  
**CPDH:** células progenitoras derivadas del hígado  
**DDC:**3,5 - dietoxicarbonil -1,4 - dihidrocolidina  
**EHGNA:** enfermedad de hígado graso no alcohólico  
**EHNA:** esteatohepatitis no alcohólica  
**FGF7:** el factor de crecimiento fibroblástico  
**GFP:** proteína verde fluorescente  
**IGF-1:** Factor de crecimiento similar a insulina (*Insulin-like Growth factor*)  
**-INS:** medio sin insulina  
**IRS2<sup>-/-</sup>:** ratones *knock-out* para IRS2  
**IRS2:** sustrato 2 del receptor de insulina  
**M:** medio sin células  
**MAPK:** proteínas MAP quinasas.  
**mEs:** Células embrionarias de ratón (*mouse embryonic stem cells*)  
**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa  
**PM:** marcador peso molecular  
**R IGF-1:** receptor IGF-1  
**RFP:** proteína roja fluorescente  
**RI:** receptor insulina  
**ROI:** regiones de interés (*regions of interest*)  
**RPM:** revoluciones por minuto  
**S1,S2,S3:** subclases tumorales  
**SEM:** error estándar de la media  
**t<sub>f</sub>:** tiempo final  
**t<sub>f</sub>/t<sub>0</sub>:** tiempo inicial

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DIABETES TIPO II: BASES MOLECULARES

### 1.1.1 Alteraciones fisiológicas: resistencia a insulina

La diabetes mellitus o diabetes tipo II está entre los trastornos metabólicos más comunes en el mundo (Warramet al., 1995). Su desarrollo es de origen multifactorial. La procedencia étnica, factores genéticos, diabetes gestacional previa, se combinan con la edad avanzada, el sobrepeso y obesidad, dieta poco saludable, inactividad física y tabaquismo aumentando el riesgo a padecer la enfermedad. No obstante, el sobrepeso y la obesidad, junto con la inactividad física, están considerados los principales causantes de una gran proporción de diabéticos a nivel mundial: aproximadamente el 90% de los casos. En términos mundiales las cifras de personas con sobrepeso alcanzan la escandalosa cifra de 1,1 billones, siendo de estos 312 billones obesos, por lo que ya se hace referencia a la obesidad como una epidemia (World Health Organization, 2016). Como consecuencia la prevalencia de diabéticos tipo II ha aumentado en los últimos años significativamente convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud con aproximadamente 378 millones de afectados en todo el mundo para los que todavía no se ha encontrado cura (Hossain, Kavar, & El Nahas, 2007) (Atlas de la diabetes 2015, FID).

A nivel molecular, la resistencia a insulina es el primer efecto detectable en las personas con diabetes tipo II (Valverde et al., 2003). Es decir, la capacidad de la insulina para estimular la captación de glucosa por parte de las células se ve disminuida provocando una acumulación de azúcares en sangre. Esto ligado a una incapacidad por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas para compensar esta resistencia a insulina mediante un aumento de la secreción de la misma, conduce a un estado de hiperglicemia (Michael et al., 2000).

La señalización de la insulina regula la homeostasis de glucosa, lípidos y energía, predominantemente a través de la acción sobre el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. Los moduladores positivos y negativos que actúan en diferentes etapas de la vía de señalización garantizan una respuesta biológica adecuada y coordinada a la insulina en diferentes tejidos. Por el momento se desconocen muchos de los aspectos moleculares que conducen al desarrollo de esta patología. Es por ello que el estudio y comprensión de las vías de señalización en la ruta de transducción de la insulina es esencial con el fin de desarrollar futuras terapias para tratar la diabetes, el síndrome metabólico y sus complicaciones (Boucher, Kleinridders, & Kahn, 2014).

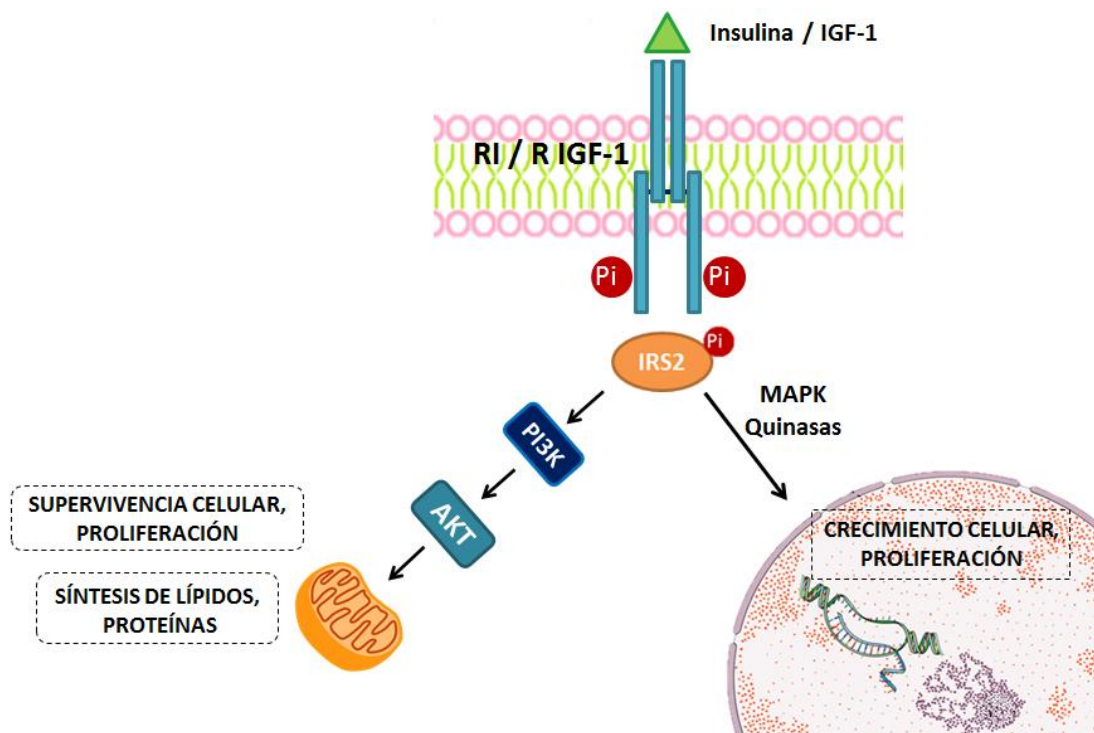
### 1.1.2 Señalización de insulina/IGF1 a través de IRS2

La insulina y IGF-1 (*Insulin-like Growth factor*) controlan una amplia variedad de procesos biológicos actuando sobre dos receptores de tirosina quinasa estrechamente relacionados: el receptor de insulina (RI) y el receptor para IGF-1 (R IGF-1) respectivamente. Aunque la insulina y el IGF-1 se unen preferentemente a sus propios receptores, ambos ligandos también pueden unirse al receptor alterno con afinidad reducida (Belfiore & Malaguarnera, 2011).

La activación de los receptores produce su autofosforilación gracias a su actividad tirosín-quinasa intrínseca, esto conduce al reclutamiento y activación de proteínas celulares transductoras de señal principalmente miembros de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS). Estas proteínas actúan como andamios organizando y mediando en los primeros pasos de señalización intracelular que finalmente terminan con la activación de enzimas que controlan muchos aspectos del metabolismo y promoción del crecimiento celular (Boucher et al., 2014). De la familia de proteínas IRS, se ha comprobado que IRS-2 es el principal efector de



las señales metabólicas desencadenadas por los receptores de insulina e IGF-1 en el hígado (**Figura 1**). Además, IRS-2 funciona como la principal molécula sensible a insulina durante el crecimiento del hígado fetal (Boissan et al., 2005).



**Figura 1. Esquema señalización de la insulina.** Adaptación del esquema de (Beyer et al., 2008). **IRS2:** sustrato 2 del receptor de insulina. **IGF-1:** *Insulin-like Growth factor 1*. **RI:** Receptor insulina. **R IGF-1:** Receptor IGF-1. **Pi:** fosfato inorgánico **PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa. **AKT:** proteína quinasa B. **MAPK:** proteínas MAP quinasas.

La señalización insulina / IGF-1 contiene muchos puntos diferentes de regulación o nodos críticos, controlados tanto positivamente como negativamente, para asegurar la duración e intensidad apropiadas de la señal. Las perturbaciones en estas vías de señalización pueden conducir a la resistencia a la insulina, alteraciones en el crecimiento, capacidad de proliferación y regeneración del hígado, así como al desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) (Boissan et al., 2005).

### 1.1.3 Implicación de IRS2 en el desarrollo de la resistencia a insulina

Diversos estudios ponen de manifiesto la implicación de IRS2 en el desarrollo de resistencia a insulina. Se ha visto que en ratones *knock-out* homocigotos que carecen de IRS2 (IRS2<sup>-/-</sup>), aunque presentan un tamaño y peso corporal normales al nacer, también presentan desde el nacimiento resistencia a insulina y una marcada intolerancia a la glucosa durante la prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal. Además estos animales desarrollan progresivamente hiperglucemia en ayunas como resultado de una insuficiente secreción compensatoria de insulina por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas debido a que los ratones IRS2<sup>-/-</sup> presentan una reducción del 83% de las células  $\beta$  en comparación con los animales silvestres. Esta reducción parece estar causada por un defecto en las células  $\beta$  debido a la incapacidad de IGF-I para promover su crecimiento a través de la señalización R IGF-1/ IRS-2 (Kubota et al., 2000) (Withers et al., 1998).

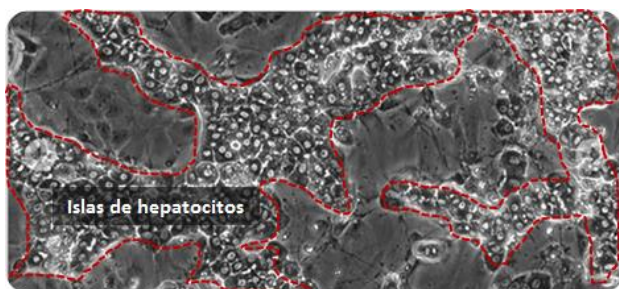
## 1.2 HEPATOGÉNESIS Y HEPATOCARCINOGENESIS

### 1.2.1 Implicación de IRS2 en hepatogénesis y regeneración hepática

El hígado es un órgano con una enorme capacidad de regeneración después de haber sufrido una lesión. Hasta el 75% de la masa hepática puede ser regenerada en una rata en una semana después de una hepatectomía parcial. Tras la pérdida del tejido hepático funcional, por ejemplo, mediante cirugía, necrosis inducida por toxinas o infecciones virales, bajo condiciones normales y en ausencia de lesión tóxica, los hepatocitos inactivos vuelven a entrar en el ciclo celular y proliferan para restaurar la masa hepática original. Esto es esencial para el cuerpo, ya que el hígado cumple funciones centrales en la homeostasis metabólica, desintoxicación de diversos compuestos y en la síntesis, almacenamiento y secreción de nutrientes (Beyer et al., 2008). No obstante, cuando las circunstancias no permiten la proliferación de los hepatocitos residentes como en la exposición previa del hígado a ciertas toxinas, productos químicos o daño crónico, se ha visto que se activa una población de células progenitoras. Se pensaba que estas células, normalmente denominadas células ovas, existen en pequeña cantidad en los conductos biliares terminales. Estudios más recientes han demostrado que estas células progenitoras derivan de la desdiferenciación de hepatocitos maduros, gracias a la plasticidad que estos poseen, denominándose células progenitoras derivadas del hígado (CPDH). Dichas CPDH, tienen la capacidad de reparar el hígado lesionado, dando lugar tanto a los hepatocitos funcionales como a los colangiocitos *in vivo* (Chen et al, 2008).

Los enfermos con diabetes tipo II sufren complicaciones hepáticas entre ellas la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en el que la resistencia a insulina puede jugar un papel patológico importante (Bugianesi, 2007). A largo plazo, éstos desarrollan como consecuencia del daño crónico cirrosis, que se traduce en inflamación y fibrosis del tejido hepático por deposición de colágeno (Garcia-Compean, 2009). ¿Cómo es esto posible si el hígado presenta una extraordinaria capacidad de regeneración? ¿Qué les sucede a estos enfermos?

Se piensa que los diabéticos tienen una mayor propensión a desarrollar daño hepático, ya que la resistencia a insulina puede afectar a la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células madre/progenitoras del hígado (**Figura 3**). Si bien, por el momento se desconocen qué mecanismos están implicados en esa pérdida de la capacidad regenerativa del hígado. Con el fin de profundizar más sobre los mecanismos que subyacen y dada la consideración de IRS2 como molécula clave en la ruta de señalización de insulina, el laboratorio ha realizado varios estudios sobre la implicación del IRS2 en el proceso de hepatogénesis, es decir, la transición de células progenitoras a hepatocitos. Para ello se sometió a ratones silvestres y ratones *knock-out* para IRS2 (IRS2<sup>-/-</sup>) a una dieta con 3,5 - dietoxicarbonil -1,4 - dihidrocolidina (DDC), xenobiótico que se ha demostrado que favorece el desarrollo de colangiopatías y fibrosis biliar (Fickert et al., 2007), en definitiva daño hepático, para observar como el silenciamiento del gen afectaba a la regeneración hepática. Los resultados (no publicados) muestran como a día 14 los ratones silvestres son capaces de recuperarse del daño hepático inducido con la dieta, mientras que los ratones IRS2<sup>-/-</sup> no alcanzan el mismo grado de recuperación. Por otra parte, empleando la línea celular HepaRG (explicada a continuación), han detectado que la señalización Insulina/IRS2 promueve la hepatogénesis en células progenitoras hepáticas humanas *in vitro* por un mecanismo molecular todavía desconocido. Dichas células progenitoras, las HepaRG, definen a medida que avanza su diferenciación un patrón de localización concreto formado por agrupaciones de células diferenciadas, o positivas para marcadores de diferenciación (como la apolipoproteína II, APOA2), a las que hemos denominado como *islas de diferenciación o islas de hepatocitos* (**Figura 2**).



**Figura 2. Islas de hepatocitos bajo el microscopio.** La línea roja discontinua delimita las islas de hepatocitos en el cultivo de células. Imagen de: HepaRG. <https://www.heparg.com/>

A la vista de los resultados se piensa que IRS2 podría jugar un papel clave en el proceso de transición de células progenitoras a células hepáticas debido a que en su ausencia el hígado pierde capacidad de regenerarse. Es por eso, que se cree en el potencial de inducir la expresión de IRS2 con el fin de promover la diferenciación y regeneración hepática y prevenir así el desarrollo de complicaciones hepáticas de la diabetes tipo II, mejorando en gran medida la calidad de vida de los pacientes.

Se ha comprobado que los niveles de expresión de IRS2 en las HepaRG son más intensos en etapas tempranas y disminuyen a medida que aumenta la expresión de marcadores de diferenciación, siendo la expresión espaciotemporal de IRS2 dinámica, variando en una misma célula a lo largo del proceso de diferenciación. No obstante no se conocen en detalle las características de la expresión espaciotemporal de IRS2, sobre las cuales se pretende profundizar en este proyecto, con el fin de definir mejor su implicación en el proceso de hepatogénesis.

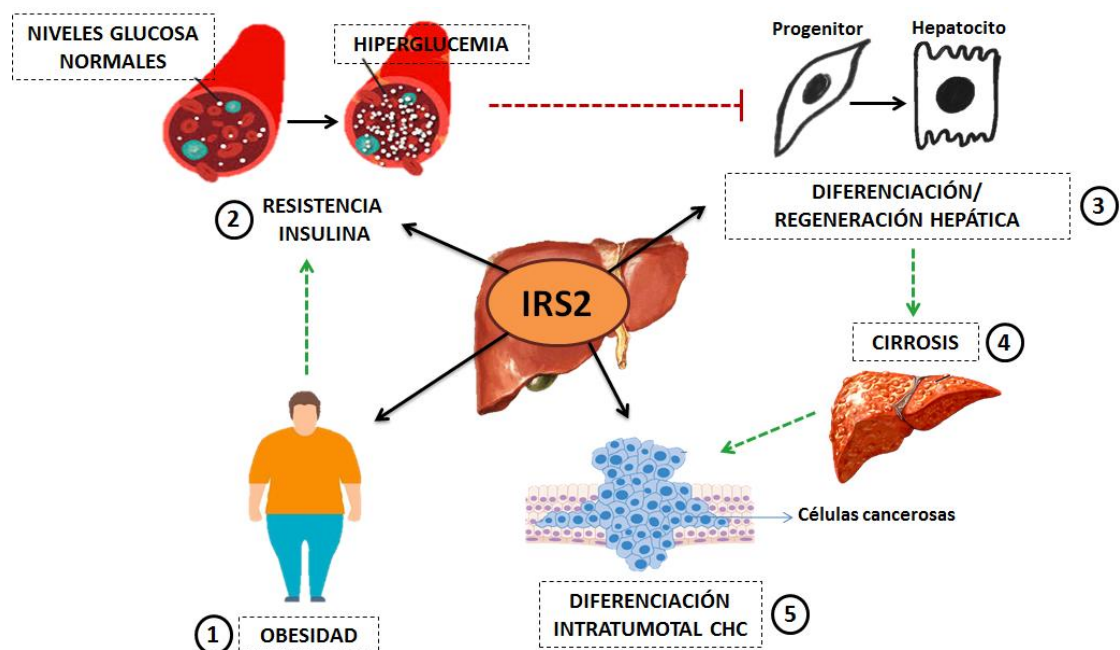
### **1.2.2 Relación IRS2 y del desarrollo de CHC**

Muchos de los pacientes diabéticos que desarrollan cirrosis, acaban desarrollando en las fases tardías de la enfermedad como consecuencia del daño crónico, carcinoma hepatocelular (CHC) que es mortal, altamente heterogéneo y resistente a la quimioterapia (**Figura 2**). Por el momento los abordajes terapéuticos de los que se dispone no son del todo exitosos, siendo estos paliativos y no curativos, por lo que la incidencia anual de CHC es similar a las muertes por año que genera, siendo la tercera causa de muerte por cáncer.

La comprensión de los mecanismos moleculares precisos que subyacen al desarrollo del tumor, pueden ofrecer un mejor enfoque terapéutico que nos ayude a abordar el CHC. En la era de las terapias moleculares dirigidas, la heterogeneidad intratumoral es un desafío al que hacer frente para conseguir el desarrollo de una terapia antitumoral exitosa. La variabilidad celular puede provocar la evasión de la terapia de ciertas subpoblaciones o el desarrollo de resistencia como fenómeno adaptativo a las terapias con una diana específica (Friemel et al., 2015). De acuerdo con Hoshida et al. hay 3 subclases principales de CHC (S1, S2 y S3) con características clínicas y perfiles pronósticos muy distintos (Hoshida et al., 2009). La "diferenciación" en el CHC se asocia con tumores pequeños, buena tasa de supervivencia y un perfil transcriptómico similar al de los hepatocitos (Subclase S3), mientras que los tumores que expresan altos niveles de marcadores fetales como  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) (S2) o con una firma molecular WNT característica de células progenitoras (S1) se asocian con grandes tumores, recidiva tardía y baja supervivencia del paciente.

El laboratorio dispone de estudios previos (todavía no publicados) que demuestran como la inducción de la expresión de IRS2 es suficiente para cambiar la firma transcriptómica de células HepaRG derivadas de tumores humanos, de S1 a S3, al tiempo que promueve la diferenciación y la inhibición de la proliferación. Estos datos también ponen de manifiesto que los tumores humanos con un perfil S3 presentan aumentada, de forma significativa, la expresión de IRS2, en

comparación con los tumores con un perfil S1. Esto sugiere que IRS2 puede desempeñar un papel importante en la transición entre un CHC más agresivo a uno más benigno. Estos resultados revelan (1) la implicación de IRS2 en la hepatocarcinogénesis y (2) su potencial como diana para impulsar la diferenciación dentro de un tumor y mejorar el pronóstico de los pacientes.



**Figura 3. Esquema resumen: procesos en los que está implicado IRS2.** Flechas rojas, inhibición. Flechas verdes promoción.

### 1.2.3 Compuestos inductores de diferenciación

El laboratorio posee estudios previos con dos compuestos que muestran tener un efecto promotor de la diferenciación hepática:

**3-Metiladenina (3-MA):** este compuesto inhibe la autofagia. La autofagia se regula de la siguiente forma: (1) En presencia de insulina, o cuando la señalización de insulina/IGF1 se activa, la célula interpreta que no es necesaria energía extra y se bloquea la autofagia. (2) En ausencia de insulina se activará la autofagia permitiendo a las células obtener energía degradando sus propios componentes para sobrevivir. Recientemente se ha definido al principal regulador de la autofagia, la 3-quinasa fosfatidilinositol de clase III (PI3K-III), molécula aguas debajo de IRS2 (**Figura 1**) (Nemazanyy et al., 2015). 3-MA fue descubierto mediante un cribado y se demostró que actúa bloqueando a PI3K-III. El efecto que se ha observado en datos preliminares tras el bloqueo de la autofagia con 3-MA, es un aumento en el grado de diferenciación de los hepatocitos incluso en condiciones sin insulina, llegando a rescatar la diferenciación en HepaRG en ausencia de la hormona. Estos datos muestran una sinergia entre insulina y el bloqueo de la autofagia en la regulación de la diferenciación. No obstante, no se conoce si 3-MA podría estar afectando a la expresión de IRS2.

**Factor de crecimiento fibroblástico (FGF7).** Como se ha mencionado anteriormente, en los hígados gravemente dañados donde la proliferación de hepatocitos se ve alterada, proliferan células progenitoras hepáticas (CPH) que contribuyen a la regeneración. Sin embargo, aunque el mecanismo subyacente de la activación de estas células progenitoras sigue siendo en gran parte desconocido, un estudio demostró que un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), FGF7, es un regulador crítico de las CPH. Ratones deficientes en FGF7 exhibieron una expresión significativamente reducida de CPH y una mayor mortalidad cuando se les indujo lesión hepática con una toxina. No obstante, la expresión transgénica de

FGF7 *in vivo* indujo la proliferación de células con características de las CPH, mejorando la disfunción hepática en los animales (Takase et al., 2013). Junto con estos resultados el laboratorio posee datos que demuestran el efecto promotor de FGF7 sobre células HepaRG, pudiendo ser este efecto mediado por la inducción de IRS2.

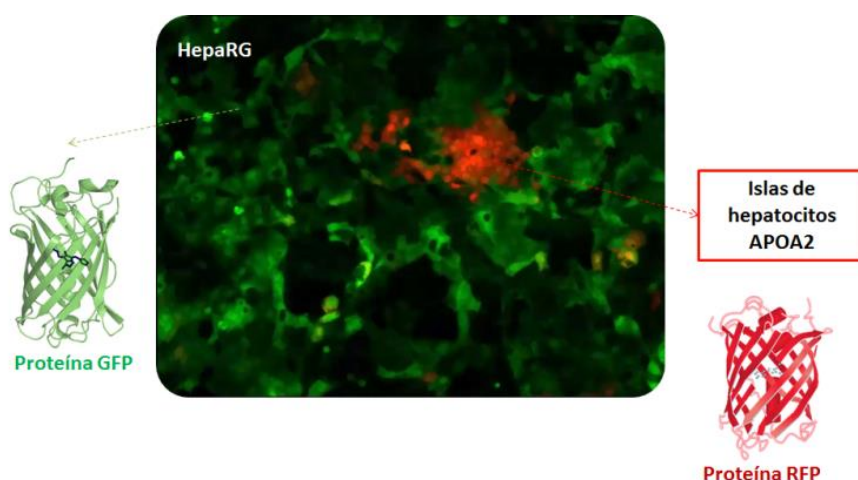
Ambos compuestos serán los candidatos a testar en el ensayo de cribado que se define a continuación.

### 1.3 MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE IRS2

#### 1.3.1 Modelo *in vitro*: cultivos HepaRG

Para el estudio de la implicación de IRS2 en hepatogénesis y hepatocarcinogénesis, el laboratorio de Neuroendocrinología molecular del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) ha desarrollado una herramienta novedosa que permite estudiar la expresión en directo de IRS2 a nivel celular en una línea que proviene de cáncer hepático humano. La línea HepaRG fue coinfectada de forma estable con vectores lentivirales de dos genes reporteros, uno contiene en posición 5' el promotor humano de IRS2 fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) y el otro contiene fusionado en el promotor del gen de la apolipoproteína II (APOA2) (marcador de diferenciación hepatocítica) el gen de la proteína roja fluorescente (RFP). Denominándose esta línea celular transformada HepaRG pIRS2-GFP pAPOA2-RFP (a las cuales me referiré de ahora en adelante como HepaRG IRS2/APOA2 para simplificar su nomenclatura). Así pues los niveles de fluorescencia de GFP serán proporcionales a los niveles de expresión de IRS2 y los de RFP serán proporcionales a los de ApoA2. Esto permite medir los niveles de expresión de ambos genes simultáneamente y en directo con el uso del microscopio de fluorescencia (**Figura 4**).

Cabe destacar que la línea celular humana HepaRG, establecida a partir de un tumor hepático, se caracteriza por presentar células progenitoras bipotenciales capaces de diferenciarse a hepatocitos maduros y células biliares, conservando a su vez una alta capacidad de auto-renovación. Las células progenitoras expresan numerosos marcadores de progenitores hepáticos o células ovaladas, mientras que los hepatocitos presentan marcadores característicos de células diferenciadas. Por lo que esta línea es muy útil para el estudio del proceso de diferenciación hepática y hepatogénesis (Dubois-Pot-Schneider et al., 2014).



**Figura 4. Modelo *in vitro*: células HepaRG pIRS2-GFP pAPOA2-RFP.** Permite la visualización bajo el microscopio de fluorescencia de la expresión simultánea de IRS2 y APOA2. **GFP:** proteína verde fluorescente. **RFP:** proteína roja fluorescente.

### 1.3.2 Modelo *in vivo*: ratones *IRS2* y *Knock-in IRS2 GFP*

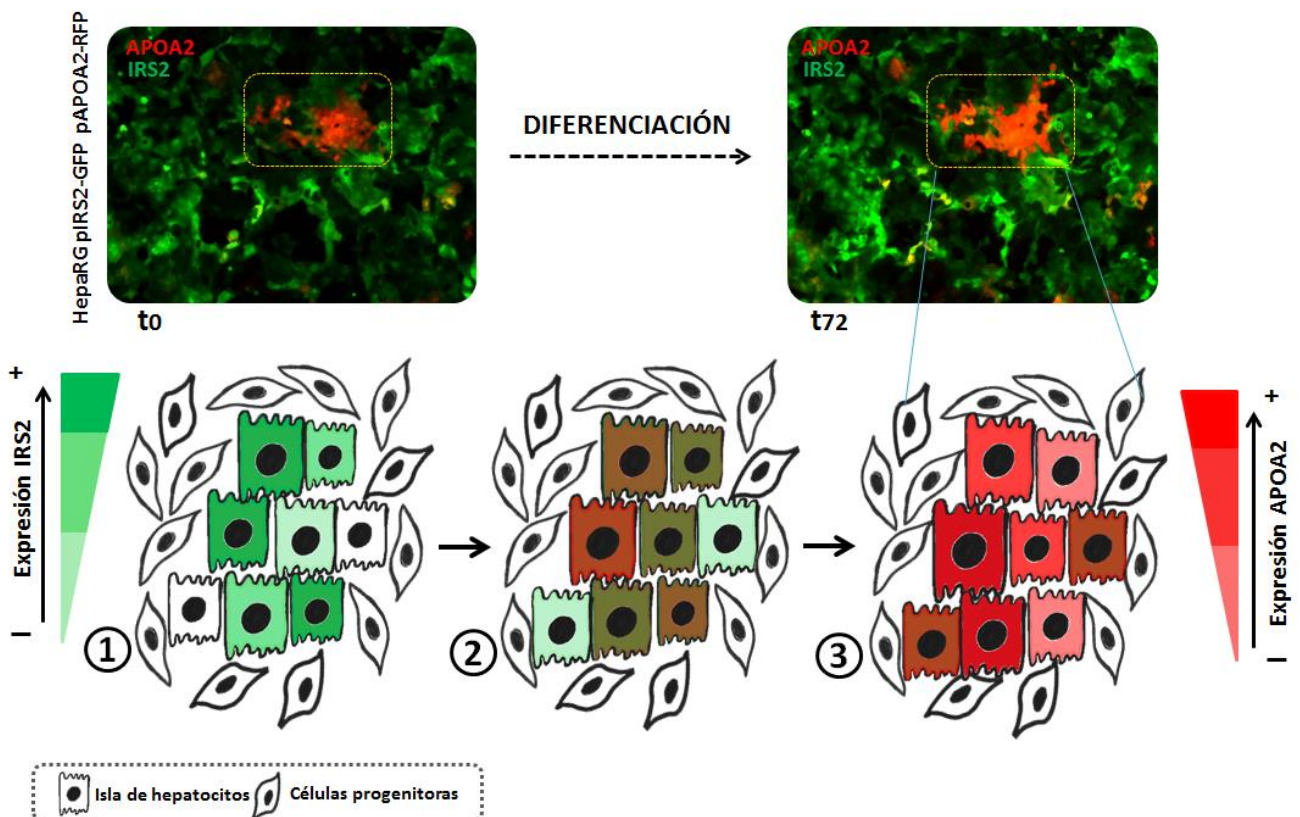
También se dispone en el laboratorio de modelos *in vivo* para el estudio de *IRS2*: (1) ratones *knock-out* para *IRS2* (*IRS2*<sup>-/-</sup>) en los que se ha estudiado cómo la ausencia de *IRS2* afecta a la resistencia a insulina y al proceso de regeneración hepática principalmente, y (2) ratones *Knock-in IRS2-GFP*. Estos últimos están siendo desarrollados y caracterizados para estudiar la expresión espacial de *IRS2* a partir de la fluorescencia verde.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

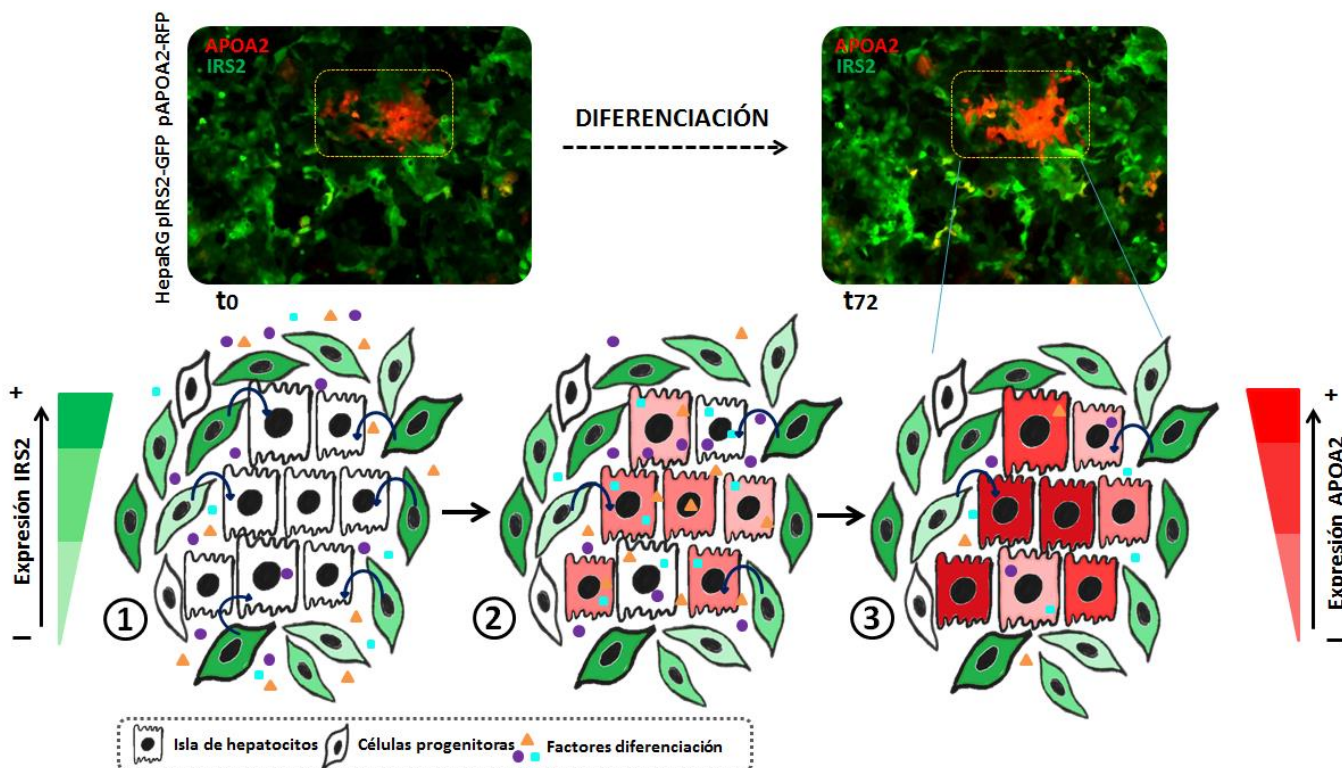
Nuestros resultados previos, nos llevan a pensar que *IRS2* juega un papel clave en la diferenciación de células progenitoras hepáticas hacia hepatocitos. No obstante, se desconoce por el momento si la implicación de *IRS2* en el proceso de diferenciación es directa o indirecta. Este proyecto se ha diseñado para la comprobación de las siguientes hipótesis planteadas:

(1) ***IRS2* juega un papel directo.** Es decir, un aumento de *IRS2* se produciría paralelamente a la vez o antes que un aumento del marcador de diferenciación *APOA2*. Esto ocurriría dentro de las islas de diferenciación y no fuera, implicando a *IRS2* como molécula conductora del proceso de diferenciación hepática dependiente de insulina (Figura 5).



**Figura 5. Hipótesis (1) *IRS2* juega un papel directo en el proceso de diferenciación.** 1) Aumento inicial de *IRS2* dentro de las islas de hepatocitos tempranas. 2) Co-expresión de *IRS2*-*APOA2* en el interior de las islas. *IRS2* se expresaría con mayor intensidad en el interior de las islas, donde se empezaría a expresar el marcador de diferenciación *APOA2*. 3) La expresión de *APOA2* aumentaría en el interior de las islas como resultado del proceso de diferenciación.

**(2) IRS2 juega un papel indirecto.** Primeramente tendría lugar un aumento de IRS2 en las células circundantes a las islas de hepatocitos. IRS2 induciría la secreción por parte de estas células periféricas, de factores inductores de diferenciación que serían captados por las islas de hepatocitos, induciendo en estas el proceso de diferenciación hepática, y por tanto, observándose un aumento de APOA2 (Figura 6).



**Figura 6. Hipótesis (2) IRS2 juega un papel indirecto en el proceso de diferenciación.** 1) La expresión de IRS2 se iniciaría en las células alrededor de la isla de hepatocitos temprana e induciría la secreción de factores de diferenciación por parte de éstas. 2) Las células en el interior de las islas de hepatocitos captarían los factores que inducirían su diferenciación. 3) Se observaría un aumento de la expresión de APOA2 indicando la diferenciación en el interior de las islas.

Cabe mencionar que se dispone de datos que sugieren que IRS2 juega un papel directo en el proceso de diferenciación, no obstante no son lo suficientemente contundentes como para desmentir la hipótesis alternativa.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Caracterización espaciotemporal IRS2 mediante time-lapse de fluorescencia

El principal objetivo de este proyecto es la caracterización espaciotemporal de IRS2 con el fin de comprobar si efectivamente juega un papel directo en el proceso de diferenciación de hepatocitos. Para ello se propone la utilización de la técnica de *time-lapse* de fluorescencia la cual permite el seguimiento a tiempo real de cultivos HepaRG IRS2/ APOA2 mediante la toma de fotografías en un periodo de 48-72h.

### **2.2.2 Diseño y puesta a punto del protocolo para la caracterización de IRS2**

Para conseguir nuestro objetivo se pretende diseñar y poner a punto un protocolo automatizado de análisis de imagen que permita la discriminación de las islas de hepatocitos en las imágenes de fluorescencia obtenidas y la cuantificación diferencial de la señal de fluorescencia de IRS2 y APOA2 tanto dentro como fuera de dichas islas.

### **2.2.3 Adaptación del protocolo para el cribado de compuestos promotores de IRS2**

Una vez optimizado el protocolo para la cuantificación de los genes reporteros IRS y APOA2 en condiciones control, nuestro siguiente objetivo es adaptar este protocolo experimental para avanzar hacia un futuro cribado de alto rendimiento de compuestos capaces de promover la expresión de IRS2. Nuestros resultados previos avalan que estrategias para promover la expresión de IRS2 podrían potencialmente (1) favorecer los procesos regenerativos en el contexto de la lesión hepática crónica y (2) mejorar la supervivencia de los pacientes con hepatocarcinoma, en el que la diferenciación intratumoral se asocia con menor agresividad y mejor pronóstico. Siendo nuestro objetivo final, avanzar hacia una posible “terapia de diferenciación”.

Debido a la complejidad del objetivo final que se pretende alcanzar, en este proyecto se quiere llevar a cabo un primer paso para la adaptación del protocolo a gran escala. Este consiste en la comprobación de la validez para el cribado del protocolo diseñado, testando dos compuestos de los cuales se tiene indicios sobre su capacidad promotora de diferenciación: 3-Metiladenina (3-MA) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF7).

### **2.2.4 Puesta a punto del modelo *in vivo*: ratones knock-in IRS2-GFP**

Uno de los objetivos de este proyecto ha sido la caracterización y genotipado de los animales control y con la inserción del gen de GFP (heterocigotos y homocigoto) mediante el uso de la técnica *Western Blot*.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 MATERIALES**

#### **3.1.1 Líneas celulares**

##### **HepaRG™ pIRS2-GFP pAPOA2-RFP.**

En el laboratorio se dispone de diversas líneas de HepaRG™ modificadas. En concreto este modelo lo han creado infectando de forma estable a las células con vectores lentivirales que contienen (1) el promotor IRS2 humano fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) y (2) APOA2 (marcador de diferenciación de hepatocitos) fusionado a la proteína fluorescente roja (RFP). Esto permite la visualización en tiempo real de una señal fluorescente verde o roja, que es proporcional a los niveles de expresión de IRS2 y APOA2 respectivamente.

#### **3.1.2 Ratones Knock-in IRS2-GFP**

El *Western Blot* se realizó utilizando muestras criopreservadas de hígado y cerebro de ratones heterocigotos y homocigotos para la inserción de GFP en IRS2.



### 3.1.3 Ratones control

Como control negativo en el *Western Blot* de los ratones *Knock-in* GFP se utilizaron muestras criopreservadas de hígado y cerebro de ratones silvestres.

### 3.1.4 Microscopio time-lapse de fluorescencia

Para la realización del experimento de *time-lapse* se utilizó el microscopio de fluorescencia invertido *Leica* DM6000B que posee un incubador donde las células se mantienen en las condiciones ideales de temperatura y CO<sub>2</sub>.

### 3.1.5 Anticuerpos Western Blot y tinción inmunohistoquímica

El anticuerpo primario utilizado es un anticuerpo anti-GFP casero producido en ratón. Se utilizó a una concentración 1:1000/ 1:2500/1:3000/1:5000. El anticuerpo secundario utilizado fue un anti-ratón IgG a una concentración 1:2000 (7074P2, Cell Signalling Technology).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Cultivo celular

Las células se mantuvieron en medio Williams E (*Gibco*<sup>®</sup> *Life Technologies*) que fue suplementado con 10% Fetal Clon III (SH30109.03, *Fisher Scientific*) 1% Penicilina/Estreptomina (15140-122, *Fisher Scientific*), 1% L-Glutamina (25030-024, *Fisher Scientific*), 0.1% Hidrocortisona 21-Hemisuccinato (H2270-100MG, *Sigma-Aldrich*) (medio completo sin insulina) y 0.05% insulina (RD11376497001, *Biotest* Diagnósticos) (medio completo) , a una temperatura de 37°C en atmósfera húmeda, 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Análisis y cuantificación de las imágenes

Para ello se empleó el protocolo diseñado haciendo uso del software de libre acceso Image J, como se detalla a continuación.

### 3.2.3 Western Blot

#### 3.2.3.1 Extracción de proteínas

##### Células:

La extracción de proteínas se realizó manteniendo la placa en todo momento en hielo. Se lavó dos veces con PBS y posteriormente se añadió la solución de lisis (Tris HCl 1M pH=7,5 NaCl 5M NP40 Lp Gul Tween20 20%) con inhibidores de proteasas ( $\beta$ -glicerol fosfato 1M PMSF 0.1M Complete 25x Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100mM). Con ayuda de una pequeña espátula estéril, se raspó toda la superficie de la placa para desprender las células. La suspensión obtenida se pasó a un eppendorf y se sonicó a potencial 3, repitiendo 3 veces: 10" sonicado – 15" descanso – 10" sonicado – 15" descanso – 10" sonicado.

##### Tejido:

Los cortes criopreservados en nitrógeno líquido se pasaron a unos tubos con 1mL de tampón RIPA (5M NaCl, 0.5 M EDTA, pH 8.0, 1M Tris pH 8.0, NP-40 1%, Deoxiclorato de sodio 10%, SDS 10%, dH<sub>2</sub>O) con inhibidores de proteasas ( $\beta$ -glicerol fosfato 1M PMSF 0.1M Complete 25x Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100mM). Posteriormente se pasaron por el Polytron para la disgregación de los tejidos.

Tras el proceso de disgregado de las células y tejidos las muestras se dejaron en reposo 45 minutos en hielo y más tarde se centrifugaron 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C. Finalmente se recogió el sobrenadante en eppendorfs y se almacenaron a -80°C.

### 3.2.3.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico, utilizando el *BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)*. Para la preparación de las diluciones estándar de BSA, se realizaron a partir del stock a 2mg/ml para obtener las siguientes concentraciones: 0,0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Posteriormente en una placa de 96 pocillos se introdujeron 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de la mezcla de 196 $\mu\text{L}$  solución A y 4  $\mu\text{L}$  solución B. En el caso de los pocillos de la recta patrón se añadieron 25 $\mu\text{L}$  de las diluciones estándar y para la cuantificación de las muestras 20 $\mu\text{L}$  de agua miliQ y 5 $\mu\text{L}$  de muestra. Se incubó la placa a 37°C 30 minutos y se midió la absorbancia a 560nm en un lector de placas (*Multiskan FC; Thermo Scientific*). La concentración proteica de las muestras se estableció por extrapolación de las absorbancias en la recta patrón representada.

### 3.2.3.3 Separación de las proteínas

Las proteínas presentes en las muestras preparadas se separaron en un gel de poliacrilamida (tampón *resolving* 15% : 37.5 % Acrilamida, 30% Tris-HCl 1.5 M pH=8.8 + SDS, 1% APS, 0.1% TEMED, 11.4% dH<sub>2</sub>O 20% Glicerol; tampón *stacking*: 12.5% Acrilamida, 25 % Tris-HCl 1.5 M pH=8.8 + SDS, 1% APS, 0.1% TEMED, 61.5% dH<sub>2</sub>O) mediante una electroforesis SDS-PAGE unidimensional, en una cubeta , con un voltaje de 70-80 V durante los primeros 30 minutos y posteriormente se aumentó a 120V. Durante el proceso, la cubeta se rellenó con tampón de *running* (3% Tris, 14.4% Glicina, 1% SDS, 81.6% dH<sub>2</sub>O).

### 3.2.3.4 Transferencia proteínas

Las proteínas embebidas en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) previamente activada con metanol durante 5 min y equilibrada en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 10% metanol, 0,1% SDS (v/v)). El gel y la membrana se prepararon a modo de “sándwich” cubiertos con 2 papeles *Whatmann* y una esponja, por ambas caras. La cubeta de transferencia se rellenó con el mismo tampón y las proteínas fueron electrotransferidas a 30V durante toda la noche en cámara fría a 4°C.

### 3.2.3.5 Bloqueo e hibridación con anticuerpo primario

Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó con solución de bloqueo BSA 3% con TBS-T 1X (Tris 20 mM ph 7.5, NaCl 0,15 mM, *Tween* 20 0,1%) durante 2 h aproximadamente a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario de conejo anti-GFP a diversas concentraciones 1:1000-1:5000, diluido en solución de bloqueo. A continuación se realizaron 6 lavados de las membranas con TBST 1X cada 5 min para el lavado de exceso de anticuerpo.

### 3.2.3.6 Detección y revelado

Tras los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), diluido también en solución de bloqueo. Se realizaron otra serie de lavados con TBST 1X (6 de 5 minutos). Posteriormente, se añadió a la membrana la solución de sustrato quimioluminiscente (*Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo Scientific*), dilución 1:1 (solución A y solución B) y se dejó reaccionar en oscuridad durante 1 min. Se utilizaron películas fotográficas para exponer la membrana y detectar. Las películas se revelaron utilizando soluciones de revelado en una cámara oscura.

## 3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el software Graphpad. Para el análisis de dos variables independientes se llevó a cabo el análisis *T-test* por pares, para el análisis de más de dos variables independientes se aplicó *one way* ANOVA, y para el análisis de variables agrupadas, *two way* ANOVA. Para todos los casos los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 RESULTADOS

#### 4.1.1 Diseño del protocolo para la caracterización de IRS2

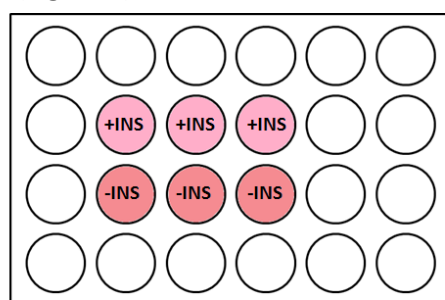
##### 4.1.1.1 Prueba de concepto

###### Diseño experimental:

Teniendo como objetivo el estudio no solo de la expresión de IRS2 si no también su localización, se decidió emplear para su estudio la técnica de *time-lapse*, la cual consiste en la toma seriada de fotografías del cultivo celular cada cierto intervalo de tiempo. Como se ha descrito anteriormente, nuestro modelo de estudio se basa en el seguimiento de la expresión de los genes IRS2 y APOA2 por fluorescencia por lo que para ello los experimentos de *time-lapse* se realizaron bajo el microscopio de fluorescencia. Este microscopio dispone de un incubador que mantiene a las células en las condiciones óptimas de temperatura y CO<sub>2</sub> durante el transcurso del experimento.

Como prueba de concepto para el inicio del diseño del protocolo se sembraron 6 pocillos de una placa de 24 pocillos con las células HepaRG IRS2/APOA2; tres pocillos en medio suplementado con insulina (control positivo) y tres pocillos en medio que contiene insulina pero a unos niveles insuficientes para promover la diferenciación, por lo que nos referiremos a él de ahora en adelante como medio “sin” insulina (-insulina, control negativo), para facilitar la nomenclatura. Se conoce, según datos de experimentos previos realizados en el laboratorio, que las células progenitoras HepaRG requieren un suplemento de insulina (877nM) para diferenciarse correctamente a hepatocitos en medio con suero, y que en condiciones sin insulina el porcentaje de diferenciación del cultivo (medido por formación de islas de hepatocitos y expresión de APOA2) es menor. Por lo que el primer paso fue diseñar un método de análisis de las imágenes resultantes de *time-lapse* que permitiese comprobar estas diferencias esperadas en cuanto a grado de diferenciación hepatocítica, y además permitiese el estudio simultáneo de IRS2. Con este experimento de partida utilizando los controles positivo y negativo podríamos verificar que el protocolo de análisis diseñado es válido para nuestro propósito.

Se introdujo la placa sembrada en el interior del incubador del microscopio, y se configuraron los parámetros del software de éste, de forma que las condiciones iniciales del experimento fueron las siguientes (**Figura 7**):



**Figura 7. Condiciones del experimento 1 diseñado para la prueba de concepto.**

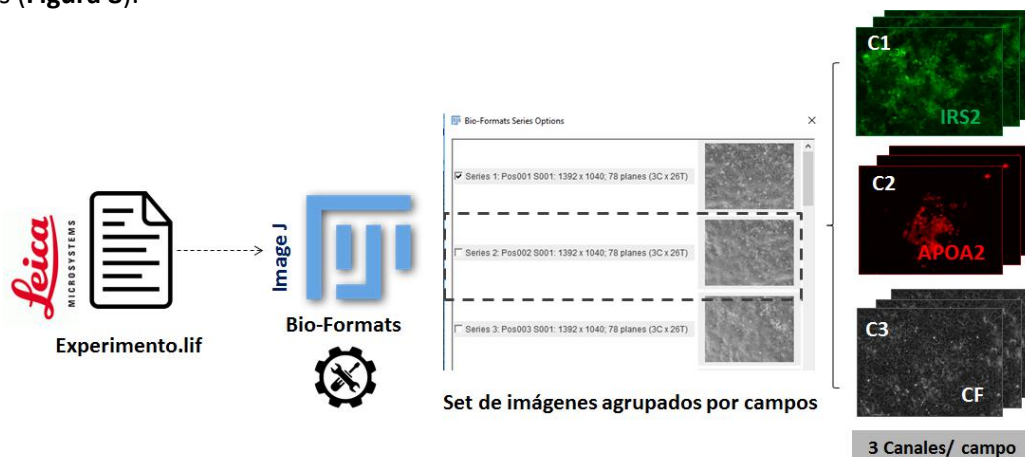
**C1,C2,C3:** Canales 1,2,3 respectivamente. **Fluo:** fluorescencia. **GFP:** Proteína verde fluorescente. **RFP:** proteína roja fluorescente. **Gb:** Gigabytes. **h:**horas. **Min:** minutos. **Placa de cultivo.** **+INS:** células en medio suplementado con insulina. **-INS:** células en medio considerado sin insulina.

Experimento 1			
Células	Día 11 en cultivo	Pase	6
Canales	C1=fluo-GFP	C2=fluo-RFP	C3=CF
Campos/pocillo	2	Selección campos	Campos con islas
Resolución	12 bits	Tiempo grabación	72h
Intervalo fotos	1foto/10min	Total fotos/canal	300
Total fotos/campo	900	Fotos totales	10.800
Carga total	42Gb		

En este primer experimento el criterio que se siguió para establecer los campos, fue la selección de aquellos en los que a tiempo 0 se observaban islas de hepatocitos rojas. Se establecieron estas condiciones porque nuestro objetivo es el estudio de los procesos que ocurren en y alrededor de las islas de hepatocitos. Como los cultivos de HepaRG IRS2/APOA2 son tan heterogéneos para la expresión de los marcadores y solo se pretendía tomar dos campos por pocillo, la elección al azar de los campos podría haber resultado en la elección de aquellos en los que no se observara la expresión de APOA2 a lo largo de los 3 días del experimento.

### Diseño del protocolo de análisis de los resultados: Image J

Para la creación del protocolo de análisis de imagen se decidió utilizar el software de libre acceso Image J, el cual permite la manipulación de imágenes con gran variedad de formatos. En este caso el formato de partida de los archivos obtenidos con el software de *Leica* son archivos .lif, los cuales no pueden ser abiertos por Image J con el pack de herramientas de análisis que tiene por defecto. Fue necesario descargar e instalar el *plugin Bio-Formats* disponible en la web del programa (<http://www.openmicroscopy.org/site/support/bio-formats5.3/>). Con este *plugin*, una vez el fichero cargado en el programa, éste permite abrir el conjunto de imágenes de cada campo por separado. Además da la opción de manipular por separado el set de imágenes correspondiente a cada uno de los tres canales C1 verde, C2 rojo C3 contraste de fases (Figura 8).



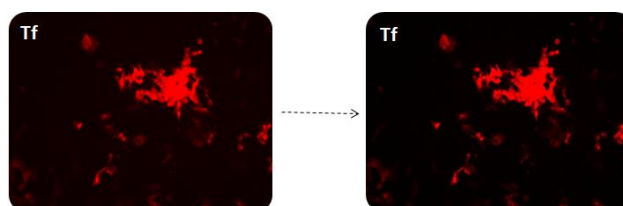
**Figura 8.** Esquema del proceso de conversión de archivos para su análisis en ImageJ, software usado para el diseño del protocolo de análisis de imagen.

El diseño del protocolo de análisis se ha basado en la utilización del marcador de diferenciación APOA2. Éste se empleó para determinar, según un umbral de intensidad de fluorescencia roja, qué regiones serían consideradas islas de hepatocitos. Una vez discriminadas qué zonas correspondían a las islas, se estudió la expresión de IRS2 en el interior y exterior de dichas islas.

### Descripción del protocolo

A continuación se detallan los pasos seguidos para la creación del protocolo de análisis de las imágenes:

1. **Ajuste de color e intensidad:** se realizó un ajuste de color en las imágenes con la finalidad de reducir el fondo (Figura9). Este ajuste se aplicó por igual en todas las imágenes.



**Figura 9.** Ajuste color e intensidad de las imágenes en Image J.

2. **Creación de vídeos:** a partir del conjunto de imágenes se crearon vídeos para el seguimiento de la evolución de los genes de forma visual. Se creó un vídeo para cada uno de los canales (verde, rojo, contraste de fases) y uno superponiendo los canales verde y rojo, para observar la evolución simultánea de APOA2 e IRS2.
3. **Definición de las islas de hepatocitos.**
  - 3.1 **Extracción de la última imagen tomada:** esta se guardó separada del set de imágenes y fue utilizada como plantilla para la definición de las islas de hepatocitos.
  - 3.2. **Establecimiento de un umbral de intensidad:** utilizando la opción *Threshold* se definió un umbral de intensidad por píxel, por encima del cual el programa consideraba que la intensidad de fluorescencia roja era suficiente como para considerar esa región una isla de hepatocitos. Este umbral se definió utilizando como imagen plantilla, la última tomada tras el experimento de *time-lapse*.
  - 3.3. **Creación de la máscara a partir del umbral establecido.** De esta forma el programa define las regiones correspondientes o no a las islas, según un sistema monocromático: negro corresponde a islas de hepatocitos, blanco corresponde a zonas externas a las islas.
  - 3.4. **Refinado de la máscara:** la máscara por defecto creada a partir del umbral no encajaba a la perfección con las zonas rojas que observamos a simple vista. Para eliminar esas zonas que no queríamos que se incluyeran en el análisis se modificaron los parámetros de ajuste en la opción *Analyse particles*, y se eligió el rango y circularidad de píxeles que se consideró adecuado para ajustar la máscara. Posteriormente con la opción *Fill holes* se rellenaron los posibles agujeros que pudieran quedar para la creación de una máscara más uniforme y precisa.
  - 3.5. **Creación de ROI (*regions of interest*):** a partir de las zonas negras de las máscaras, el programa crea lo que denomina regiones de interés o ROI que se corresponden con la silueta de estas zonas negras o islas de hepatocitos positivas para APOA2.
4. **Aplicación de las ROI:** el programa almacena las ROI creados y estos se pueden superponer encima del canal y conjunto de imágenes sobre el cual se quiera realizar el análisis. La opción *Set measurements* nos permitió elegir los parámetros que queríamos que el programa midiese. En este caso: la intensidad gris media en el interior de las ROI. Cabe mencionar que aunque las imágenes estén en color, el programa mide las intensidades de los píxeles en escala de grises.
5. **Medida de la intensidad de APOA2 dentro de las islas a lo largo del tiempo.** Las ROI creadas a partir de la imagen final se aplicaron sobre el set de imágenes totales. Como resultado final el programa proporciona los datos numéricos correspondientes a la intensidad media de fluorescencia de cada una de las islas detectadas. Posteriormente fueron exportados a Excel para ser analizados.

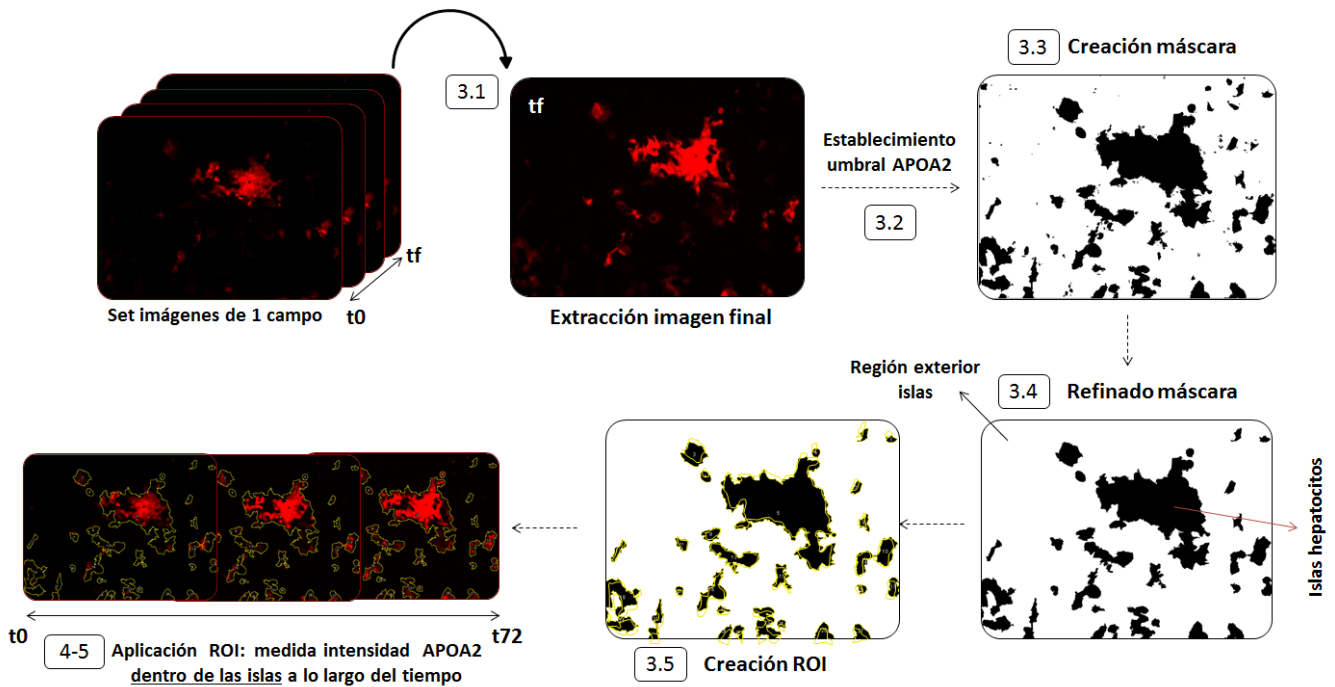


Figura 10. Esquema pasos seguidos para medida de intensidad de APOA2 dentro de las islas a lo largo del tiempo.  $t_0$ = tiempo inicial.  $t_f$ = tiempo final= $t_{72}$  horas. ROI: region of interest.

## 6. Medida de la intensidad de IRS2 dentro de las islas a lo largo del tiempo.

**6.1 Sincronización de ventanas:** mediante esta opción, las ROI que delimitaban las islas de hepatocitos, se superpusieron sobre la ventana correspondiente al set de imágenes verdes fluorescentes.

**6.2 Medida:** una vez las ROI que delimitan las islas superpuestas en el canal verde, se midió la intensidad media del interior de las islas, correspondiendo esta vez a la intensidad de IRS2.

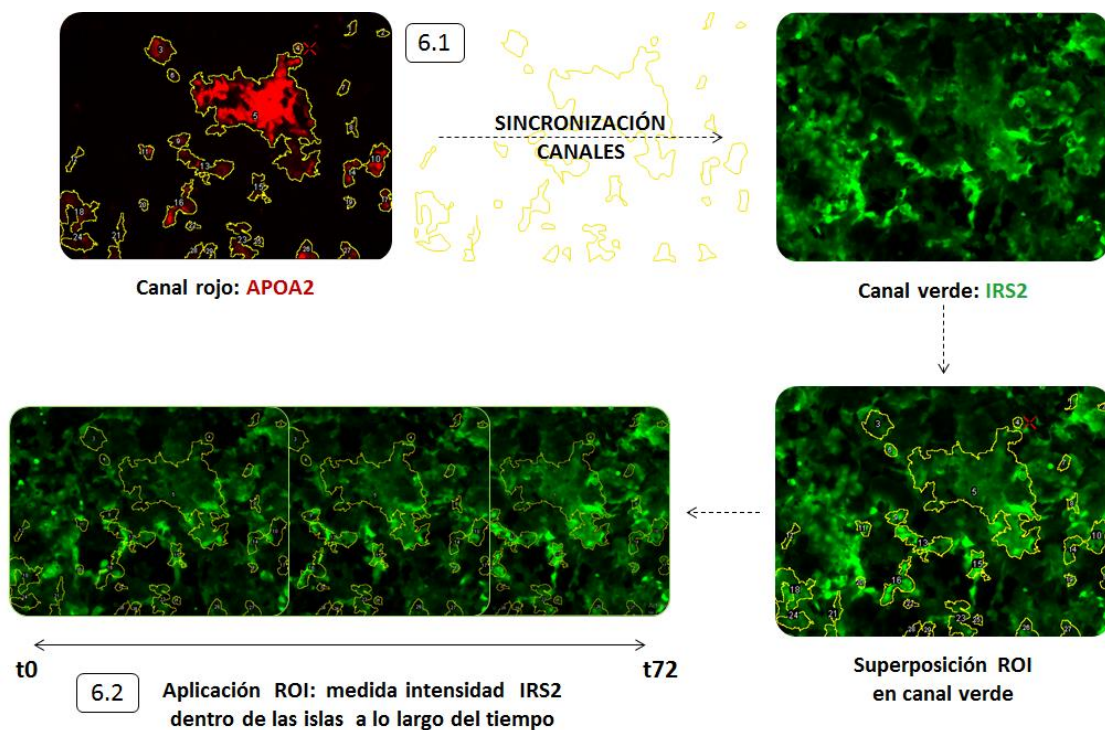


Figura 11. Esquema pasos seguidos para medida de intensidad de IRS2 dentro de las islas a lo largo del tiempo.  $t_0$ = tiempo inicial.  $t_f$ = tiempo final= $t_{72}$  horas. ROI: region of interest.

7. **Medida de intensidad de APOA2 fuera de las islas a lo largo del tiempo.** Para ello se siguió el mismo procedimiento detallado anteriormente, del paso 3.1 al 3.4. Una vez obtenida la máscara utilizando la opción *Invert* se obtienen unas ROI completamente inversas a las anteriores en el que en este caso la zona de interés seleccionada se corresponde con las áreas fuera de las islas. De la misma forma que se explica en los pasos 4-5, la máscara se aplicó en el conjunto de imágenes del canal rojo y se midieron los niveles de intensidad media en las regiones externas a las islas.
8. **Medida de intensidad de IRS2 fuera de las islas a lo largo del tiempo.** Para obtener la medida de intensidad de IRS2 fuera de las islas se aplicaron las ROI creadas en el paso 7 en el conjunto de imágenes del canal verde.

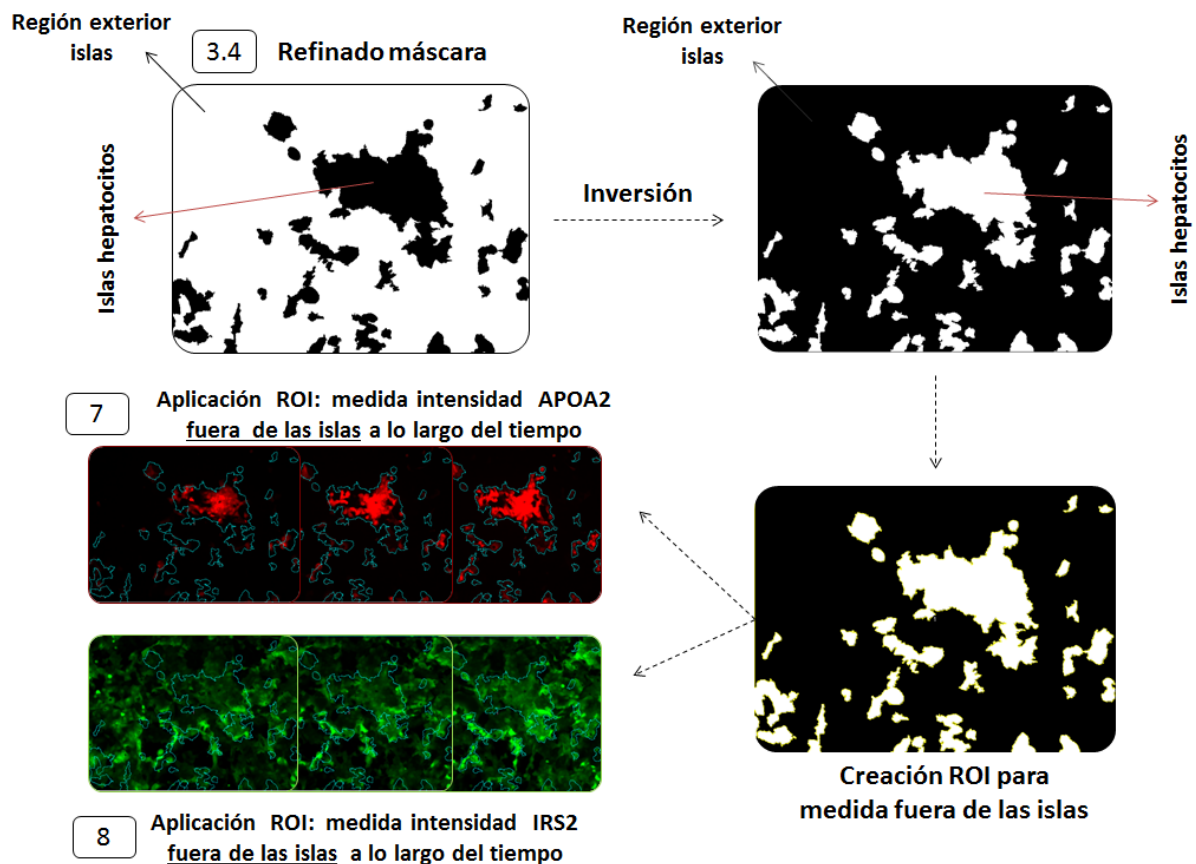
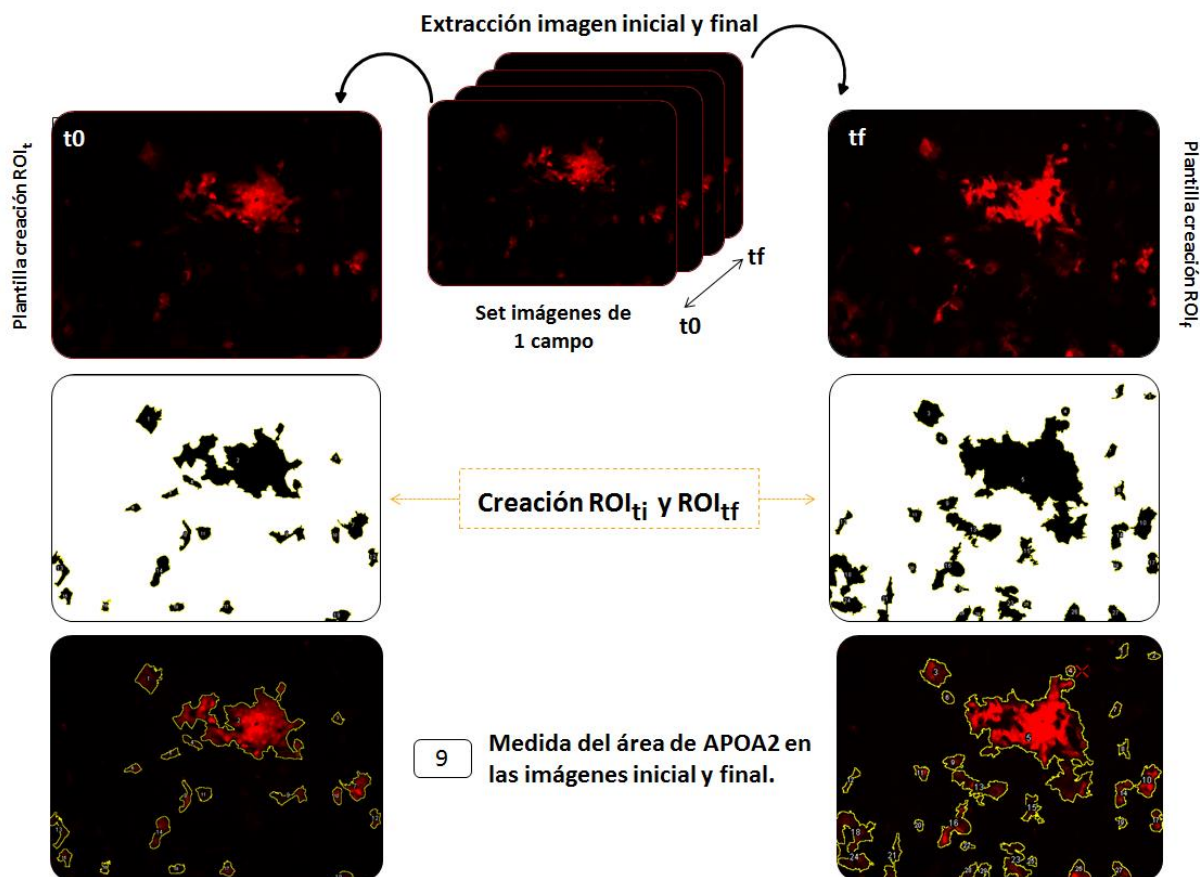


Figura 12. Esquema pasos seguidos para medida de intensidad de APOA2 e IRS2 fuera de las islas a lo largo del tiempo.  $t_0$ = tiempo inicial.  $t_f$ = tiempo final= $t_{72}$  horas. ROI: region of interest.

9. **Medida del área de APOA2 en las imágenes inicial y final.** Para la medida de la intensidad de APOA2 e IRS2 a lo largo del tiempo se utilizaron las ROI procedentes de la imagen final. Se consideró que a ese tiempo la cantidad de islas formadas sería mayor y la máscara obtenida y las consiguientes ROI creadas cubrirían las zonas consideradas como islas de todo el conjunto de imágenes. No obstante para disponer de una medida del área en el momento inicial y final no se podía seguir la misma aproximación. Se requirió extraer la primera y última imagen para ser utilizadas como plantilla para la creación de las  $ROI_{t_i}$  y  $ROI_{t_f}$  (donde  $t_i$ = tiempo inicial y  $t_f$ = tiempo final). Una vez obtenidas, fueron aplicadas sobre la imagen inicial y final, respectivamente y

se midió el área de cada una de las islas detectadas. Los datos obtenidos fueron exportados a un documento Excel para su posterior análisis.



**Figura 13. Esquema pasos seguidos para medida del área de APOA2 a tiempo inicial y final.**  $t_0$ = tiempo inicial.  $t_f$ = tiempo final= $t_0$ +72 horas. ROI $_{t_0}$ : region of interest a tiempo inicial o 0h. ROI $_{t_f}$ : region of interest a tiempo final.

En primer lugar, la ejecución de los pasos en el programa se realizó de forma manual. No obstante, dada la complejidad y carga de trabajo, cuando se establecieron y definieron los pasos a seguir para el análisis completo de un campo, se pensó en la programación de un macro que permitiese el análisis del resto de campos de forma más automatizada y rápida.

#### Automatización del análisis: programación de macros

Para la automatización del proceso de análisis se diseñaron macros. Los macros consisten en un conjunto de instrucciones programadas que son ejecutadas por un programa, en este caso Image J, los cuales permiten la automatización de tareas repetitivas y reducen el tiempo y complejidad del análisis, ya que tan solo en el primer experimento se requerían analizar un total de 10.800 imágenes (900 imágenes/campo x 12 campos).

Para su creación se empleó la opción de *Record macro*, herramienta incluida en Image J que permite la grabación de las instrucciones en lenguaje de programación en una ventana, conforme se van clicando las acciones en el programa. Cabe destacar que aunque esta herramienta es muy útil e intuitiva para empezar a grabar macros sencillos, no fue suficiente para recoger todas las instrucciones que se habían diseñado para el análisis de las imágenes. Para ello se tuvo que modificar y completar el macro predeterminado obtenido inicialmente diseñándose un macro personalizarlo que ha permitido ejecutar de forma automática las siguientes tareas:



1. Ajuste automático del color e intensidad, personalizado para cada uno de los canales.

```
3 //EDICIÓN COLOR E INTENSIDAD
4 //con el comando name= getTitle; ordenamos al programa que tome como ventana activa
5 //sobre la que queremos que actúe la instrucción, la ventana con el conjunto de los 3 canales
6 name=getTitle;
7 Stack.setChannel(1);
8 setMinAndMax(22, 201);
9 Stack.setChannel(2);
10 setMinAndMax(12, 220);
11 Stack.setChannel(3);
12 setMinAndMax(15, 240);
```

2. Creación de vídeos a partir del set de imágenes y guardado de los vídeos con un nombre específico en una carpeta de destino elegida.

```
3 //EXTRACCIÓN CANALES
4 //Para guardar los distintos canales independientemente como .AVI
5 // Hubo un error con el experimento de time-lapse, se paró antes
6 //de tiempo y últimas imágenes eran negras
7 //El macro se adaptó, se extraen las 300 primeras imágenes--> frames=1-300
8
9 selectWindow(name); //Indica selección ventana con los 3 canales
10 //EXTRACCIÓN CANAL ROJO = C2
11 run("Make Substack...", "channels=2 frames=1-300");
12 // Una vez que se ha extraído el primer canal, se le asigna un nombre: name2
13 // Con el comando name2=getTitle; indicamos que el canal rojo será la ventana activa
14 //sobre la cual actuará el macro que se ejecute a continuación
15 //Asignaremos para el resto de canales name3 y 4 y así sucesivamente según cuántos canales queramos nombrar
16
17 name2=getTitle;
18 selectWindow(name); //Selección ventana 3 canales
19 //EXTRACCIÓN CANAL VERDE = C1
20 run("Make Substack...", "channels=1 frames=1-300");
21 name3=getTitle; //asignación nombre al canal verde
22 selectWindow(name); //selección ventana 3 canales
23 //EXTRACCIÓN CANAL CONTRASTE DE FASES
24 run("Make Substack...", "channels=3 frames=1-300");
25 name4=getTitle;
27 //GUARDADO DE SET DE IMÁGENES EN FORMATO .AVI
28
29 //(1) Creación de variables: permiten guardar los vídeos con nombres concretos
30 //(name2, --> indica canal al que hacemos referencia, en este caso hemos denominado "name2" al canal rojo
31 // 35,38: indicamos qué fracción de caracteres del nombre que por defecto tiene el fichero,
32 //queremos que se le asigne al nombre del vídeo guardado
33 //En este caso el nombre del canal rojo es Experiment DMSO 05122016.lif - Pos004_S001
34 //Los vídeos se guardarán como 004 (campo 4) seguidos del nombre que indiquemos posteriormente
35 //004 se corresponde con los caracteres comprendidos entre las posiciones 35-38
36
37 selectWindow(name2); tag2=substring(name2,35,38);
38 selectWindow(name3); tag3=substring(name3,35,38);
39 selectWindow(name4); tag4=substring(name4,35,38);
40
41
42 selectWindow(name2); //selección del canal rojo extraído
43
44 // (2) Guardado de los vídeos en una carpeta específica
45 // Con el comando "path" indicamos dónde se encuentra la localización y cuál es el nombre de la carpeta destino
46 //+tag2+ indica la parte común del nombre de los vídeos para el campo 4 --> 004
47 //Añadimos seguidamente entre comillas el nombre específico del vídeo, en este caso como es el canal rojo: APOA2
48 //Del mismo modo para los canales verde (name3) y contraste de fases (name4)
49 //APOA2
50 path = "F:\\\\timeLapse\\"+tag2+"APOA2.avi";
51 run("AVI... ", "frame=10 compression=JPEG save=&path");
```

```

53 //IRS2
54 selectWindow(name3);
55 path = "F:\\timelapse\\"+tag3+"IRS2.avi";
56 run("AVI... ", "frame=10 compression=JPEG save=&path");
57
58 //BRIGHTFIELD
59 selectWindow(name4);
60 path = "F:\\timelapse\\"+tag4+"BRIGHTFIELD.avi";
61 run("AVI... ", "frame=10 compression=JPEG save=&path");
62
63 //(3) Guardado de la superposición de Los canales verde y rojo que denominamos MERGE
64 // Indicamos entre símbolo +, qué ventanas queremos que tome el programa como C1 y C2 para superponerlos
65 // C1=canal rojo= name2= APOA2 ; C2= canal verde= name3= IRS2
66 run("Merge Channels...", "c1=["+name2+"] c2=["+name3+"] create");
67 // La nueva ventana creada se denomina "Merged", por lo que indicamos con el comando
68 //selectWindow que el macro actúe sobre esta ventana
69
70 selectWindow("Merged"); tag5=substring(name4,35,38);// creación de la variable para MERGE
71 selectWindow("Merged");//selección de la composición APOA2-IRS2
72 //MERGE
73 path = "F:\\timelapse\\"+tag5+"MERGE.avi";
74 run("AVI... ", "frame=10 compression=JPEG save=&path");

```

3. Establecimiento de un umbral de intensidad para APOA2 a partir de la imagen final del canal de fluorescencia rojo.
4. Creación de la máscara según el umbral y creación de las ROI a partir de esta. Se diseñaron dos macros, uno para la obtención de la máscara para el estudio del interior de las islas y otro para el estudio del exterior ( ROI<sub>isla</sub> ROI<sub>ext</sub> respectivamente).

```

2 //CONVERSIÓN DE LA IMAGEN A ESCALA DE GRISES
3 run("8-bit");
4
5 //SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA DEFINICIÓN DEL UMBRAL
6 setAutoThreshold("Huang dark");
7 setThreshold(5, 255);
8 setOption("BlackBackground", false);
9
10 //CREACIÓN DE LA MÁSCARA
11 run("Convert to Mask");
12
13 //REFINAMIENTO DE LA MÁSCARA
14 run("Dilate");
15 run("Fill Holes");
16
17 //CREACIÓN DE ROIS QUE POSTERIOMENRE SUPEPONDREMOS PARA MEDIR INTENSIDAD
18 run("Analyze Particles...", "size=1000-1000000 show=Masks clear add in_situ");

```

5. Aplicación de las ROI creadas al conjunto de imágenes y medida a lo largo del tiempo:
  - 5.1 ROI<sub>isla</sub>: intensidad media de IRS2 y APOA2 en el interior de las islas.

```

3 //MEDIDA INTENSIDAD APOA2 DENTRO DE LAS ISLAS
4 //Extracción del canal rojo
5 name=getTitle;
6 selectWindow(name);
7 run("Make Substack...", "channels=2 frames=1-300");
8 name2=getTitle;
^

```

```

10 //Selección del canal rojo: APOA2
11 selectWindow(name2);
12 //Superposición del ROI creado a partir de La máscara sobre el canal rojo
13 roiManager("Show None");
14 roiManager("Show All");
15 roiManager("Show All with labels");
16 //Medida de La intensidad media de fluorescencia de APOA2 de todo el set de imágenes (t0-tf)
17 roiManager("Multi Measure");
18
19 //MEDIDA INTENSIDAD IRS2 DENTRO DE LAS ISLAS
20 //Extracción del canal verde
21 name=getTitle;
22 selectWindow(name);
23 run("Make Substack...", "channels=1 frames=1-300");
24 name3=getTitle;
25 selectWindow(name3);
26 //Sincronización de Las ventanas
27 run("Synchronize Windows");
28 roiManager("Show All");
29 //Medida de La intensidad media de fluorescencia de IRS2 en todo el set de imágenes (t0-tf)
30 roiManager("Multi Measure");

```

### 5.1 ROI ext. intensidad media de IRS2 y APOA2 en el exterior de las islas.

```

2 //CONVERSIÓN DE LA IMAGEN A ESCALA DE GRISES
3 run("8-bit");
4
5 //SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA DEFINICIÓN DEL UMBRAL
6 setAutoThreshold("Huang dark");
7 setThreshold(5, 255);
8 setOption("BlackBackground", false);
9
10 //CREACIÓN DE LA MÁSCARA
11 run("Convert to Mask");
12
13 //REFINAMIENTO DE LA MÁSCARA
14 run("Dilate");
15 run("Fill Holes");
16
17 //CREACIÓN DE ROIS QUE POSTERIOMENRE SUPEPONDREMOS PARA MEDIR INTENSIDAD
18 run("Analyze Particles...", "size=1000-1000000 show=Masks clear add in_situ");
19
20 //INVERSIÓN DE LA MÁSCARA PARA CREACIÓN DE ROI FUERA DE LAS ISLAS
21 run("Invert");
22 //CREACIÓN ROI
23 run("Create Selection");
24 run("ROI Manager...");
25 roiManager("Add");

```

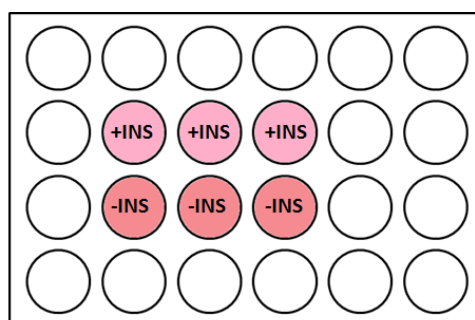
Tras la ejecución de este macro para la creación de las ROI fuera de la isla, se aplican los macros descritos en el apartado anterior, ya que la única diferencia para las medidas de intensidad dentro y fuera de las islas son las ROI iniciales. El resto del macro es idéntico.

6. Aplicación de las ROI creadas a partir de la imagen final e inicial y medida de las áreas correspondientes a las islas de hepatocitos a tiempo inicial y final. Los macros utilizados son los mismos que los descritos en los apartados 4 y 5.1, la única diferencia es el cambio de la imagen utilizada como plantilla para la realización de la máscara.

#### 4.1.1.2 Optimización del protocolo

Cabe mencionar que se tuvieron problemas a la hora de la puesta a punto del diseño experimental y la selección de las condiciones óptimas de monitorización por *time-lapse*. A continuación se detallan los diversos diseños experimentales, los cambios y modificaciones con respecto a los anteriores, así como los problemas surgidos.

- **Experimento prueba de concepto:** la grabación no llegó a finalizar a las 72h, se interrumpió aproximadamente a las 48h. El software de *Leica* presenta la siguiente limitación: almacena los datos de forma temporal, si el programa se interrumpe y no responde, al cerrarlo se pierden los datos tomados hasta el momento. Hasta que no finalice el experimento y no se guarden los datos en la memoria del ordenador, son temporales. Por suerte en este caso, pudieron ser recuperados por los informáticos del centro.
- **Experimento para el estudio del cultivo a momentos tempranos (Figura 14):** La grabación se detuvo a las 17h, aunque se detectó poco tiempo después de la interrupción y se reanudó 48h más:
  1. Los campos seleccionados ya no eran los mismos, se perdía continuidad.
  2. Los datos resultantes de las primeras 17h, no mostraban a penas islas ni evolución de las mismas.
  3. Los datos resultantes de las restantes horas eran demasiado pesados para ser analizados con Image J.



Experimento 2			
Células	Día 4 en cultivo	Pase	7
Canales	C1=fluo-GFP	C2=fluo-RFP	C3=CF
Campos/pocillo	2	Selección campos	Islas indetectables
Resolución	12 bits	Tiempo grabación	72h
Intervalo fotos	1foto/10min	Total fotos/canal	300
Total fotos/campo	900	Fotos totales	10.800
Carga total	42Gb		

**Figura 14. Esquema segundo experimento: condiciones control y sin insulina.** Se muestra el diseño del segundo experimento control con el fin de poder reproducirlo y tener un duplicado de los resultados. **C1,C2,C3:** Canales 1,2,3 respectivamente. **Fluo:** fluorescencia. **GFP:** Proteína verde fluorescente. **RFP:** proteína roja fluorescente. **Gb:** Gigabytes. **h:** horas. **Min:** minutos. Placa de cultivo. **+INS:** células en medio suplementado con insulina. **-INS:** células en medio sin insulina.

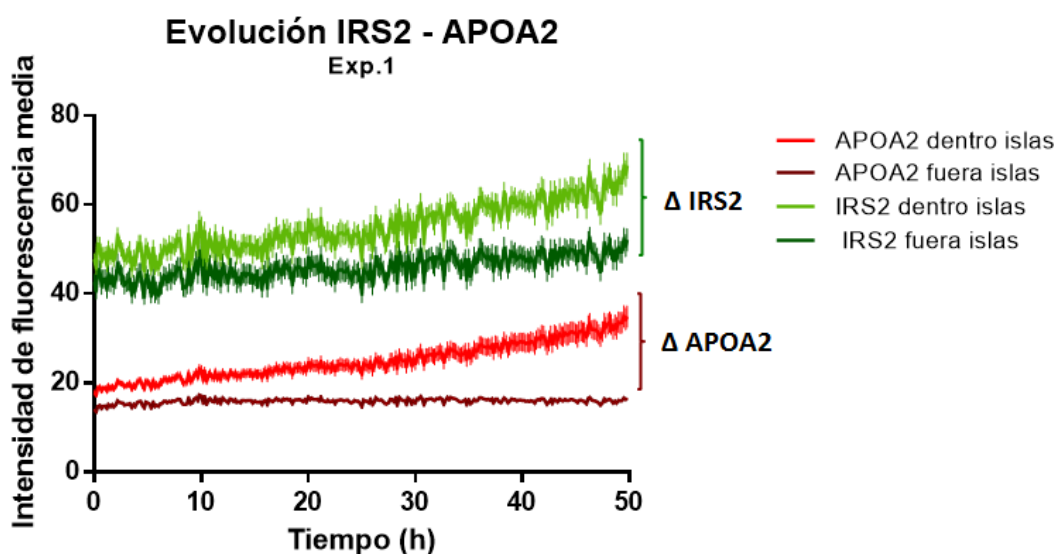
- **Reajuste del experimento:** Tras la interrupción de los dos primeros experimentos se pensó que el problema podría ser que la carga de trabajo que debía soportar el ordenador era demasiado elevada. Se reajustó el diseño del experimento y se redujo la frecuencia de toma de imágenes a 1 foto cada hora. No obstante se siguió teniendo problemas con los 3 siguientes experimentos que se diseñaron. Se interrumpía la grabación a los pocos minutos, hasta que se descubrió que sucedía porque el

ordenador se había configurado en modo suspensión automática, y al tiempo de no estar siendo utilizado se cerraba la sesión, interrumpiéndose así el curso del experimento.

Cabe destacar que la monitorización de los cultivos se quiso hacer a día 10, momento en el que las células ya han alcanzado un grado de diferenciación que permite observar diferencias en la evolución de los genes. Esto unido a que el pase de las células desde la placa de mantenimiento para sembrarlas de nuevo se realiza cada 14 días, alargó el tiempo empleado en la optimización del ensayo.

#### 4.1.1.3 Resultados del experimento 1: condiciones control y sin insulina

Una vez analizadas todas las imágenes los datos obtenidos fueron representados. En la siguiente gráfica se observa la tendencia que sigue la expresión de los dos marcadores fluorescentes dentro y fuera de las islas en condiciones control (**Figura 15**). El dato más destacable es que IRS2 aumenta más en el interior de las islas.



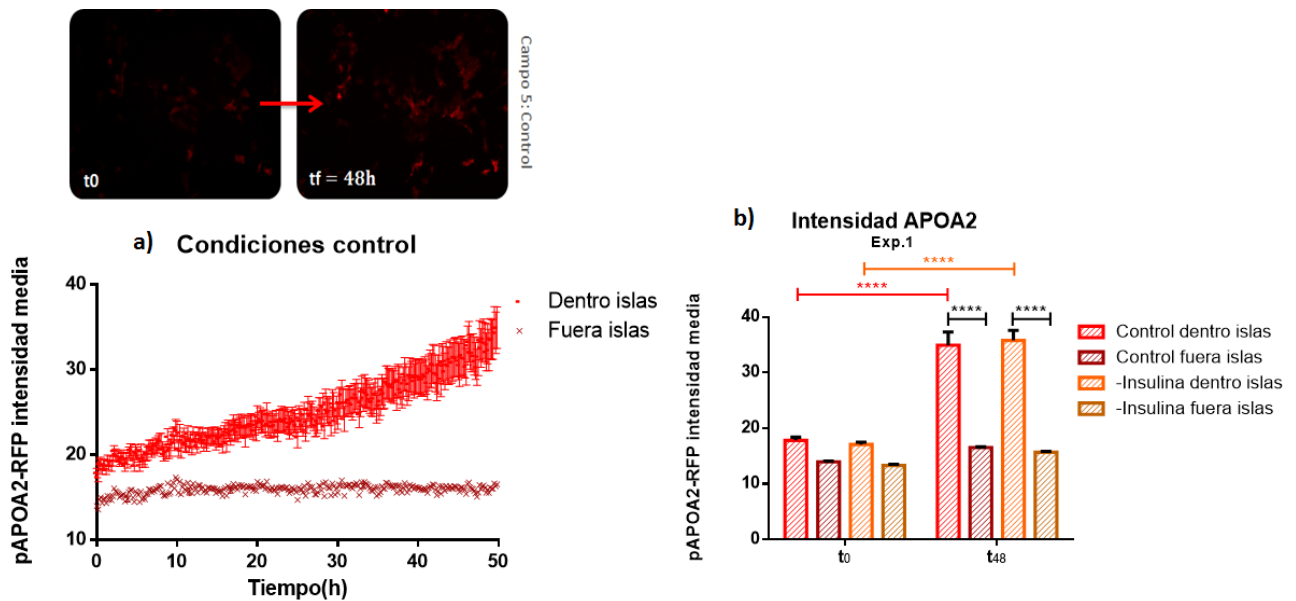
**Figura 15. Recopilación resultados Experimento 1: control.** Se compara la evolución con el tiempo de ambos genes (IRS2 y APOA2), dentro y fuera de las islas y en condiciones control.

A continuación se analizan los resultados obtenidos en detalle:

#### Evolución de la intensidad APOA2 con el tiempo: dentro y fuera de las islas

La representación de estos resultados nos ayudó a validar el protocolo de análisis de imágenes diseñado, ya que comprobamos lo que observábamos a simple vista en los vídeos: APOA2 aumenta con el tiempo mientras que en el exterior de las islas, donde no hay expresión de APOA2, se observa una línea basal inalterable con el tiempo (**Figura 16a**).

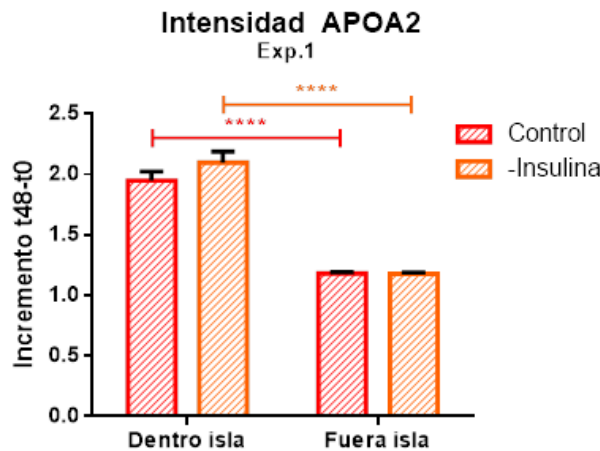
Cuando se comparan los niveles máximos de APOA2 alcanzados a tiempo final (t48) en los controles positivo y negativo dentro de las islas, no se observan diferencias significativas (**Figura 16b**). Sin embargo sí se observan diferencias significativas entre tiempo inicial (t0) y final (tf), lo que pone de manifiesto que un intervalo de 48h es suficiente para detectar cambios en el grado de diferenciación del cultivo.



**Figura 16. Evolución de la intensidad de APOA2.** a) Evolución de APOA2 dentro de las islas con el tiempo. Se observa lo esperado tras la visualización de los vídeos, la intensidad de fluorescencia roja aumenta dentro de las islas, mientras que fuera no se observan cambios. Se comprueba así que el protocolo diseñado es válido. b) Intensidad de APOA2 a t0 y t48h en condiciones control y –insulina. Se observa que el marcador de diferenciación aumenta con el tiempo en ambas condiciones pero no hay diferencias significativas entre éstas a tiempo final. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*p < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Incremento de la intensidad de APOA2: condiciones control y sin insulina

Al calcular el incremento de los valores de fluorescencia roja a tiempo inicial y final, en ambas condiciones, no se observan diferencias significativas (Figura 17). Es decir APOA2, aumenta proporcionalmente con el tiempo igual, tanto en presencia como en ausencia de insulina.



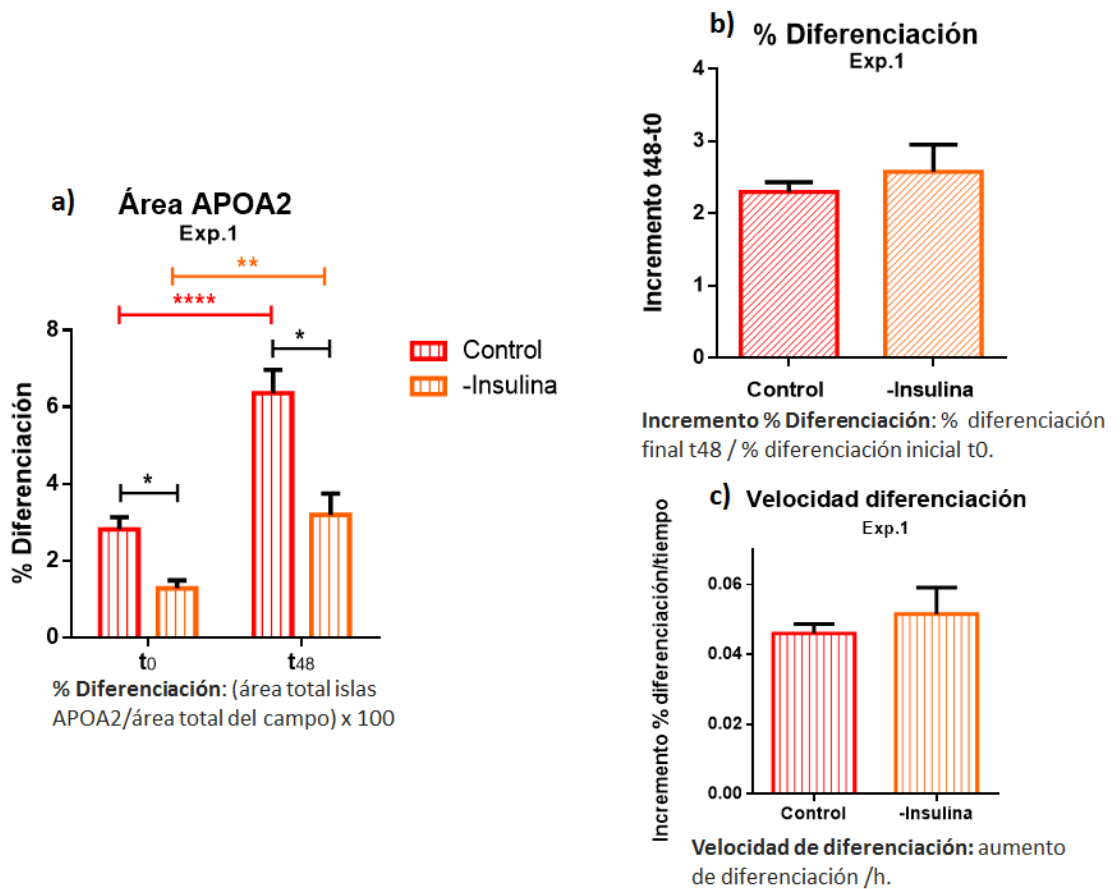
**Figura 17. Incremento de la intensidad de APOA2 dentro y fuera de las islas en condiciones control y sin insulina: experimento 1.** No se observan diferencias significativas entre las distintas condiciones. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*\*\*P < 0.001.

Grado de diferenciación

Para el cálculo del grado de diferenciación de hepatocitos en ambas condiciones, se tuvo en cuenta el área de las islas y la intensidad de fluorescencia del marcador de diferenciación APOA2. Teniendo en cuenta estos parámetros se calculó:

- **% Área de diferenciación y la velocidad de diferenciación.**

Aunque no haya diferencias en el incremento de diferenciación entre ambas condiciones (**Figura 18b**), es decir la velocidad de diferenciación es la misma (**Figura 18c**); tanto a tiempo inicial como final, el porcentaje de diferenciación en condiciones control es significativamente mayor que en condiciones sin insulina (**Figura 18a**). Estos datos apoyan la importancia de la insulina en la mediación el proceso de diferenciación celular.

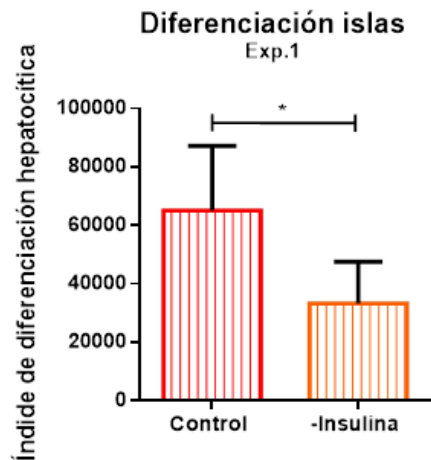


**Figura 18. Área de diferenciación Experimento 1: control, - insulina. a) % Diferenciación hepatocítica.** Porcentaje de diferenciación a tiempo inicial (t<sub>0</sub>) y tiempo final (t<sub>48</sub>). **b) Incremento diferenciación.** Comparación del incremento del % de diferenciación entre la condición control y sin insulina. **c) Velocidad diferenciación.** Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

- **Índice de diferenciación:** parámetro que integra tanto el tamaño de las islas como la intensidad de APOA2 media de éstas. Se calculó como:

$$\frac{(\text{área total islas} \times \text{intensidad media APOA2})}{\text{tiempo}}$$

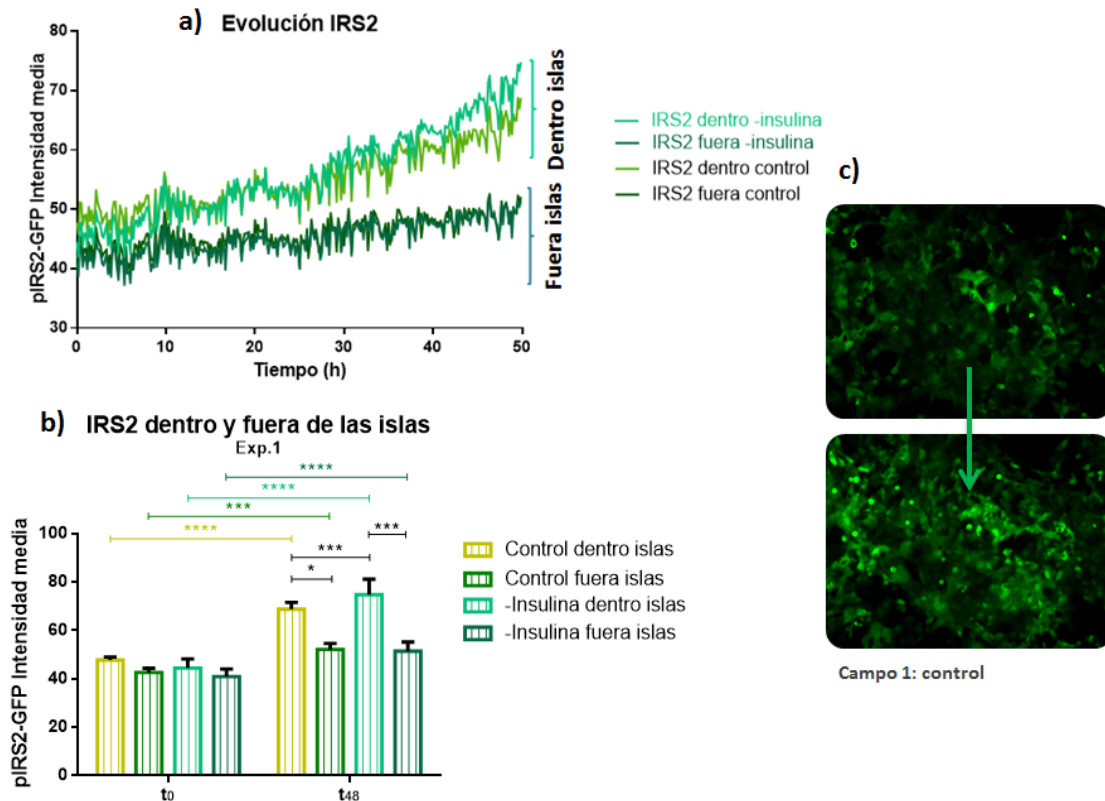
Los resultados muestran que considerando el proceso de diferenciación como un aumento no solo de la intensidad de APOA2 sino también de las áreas correspondientes a islas de hepatocitos: el grado de diferenciación total alcanzado en condiciones con insulina es significativamente mayor que en su ausencia (**Figura 19**).



**Figura 19. Índice de diferenciación hepatocítica: experimento 1.** Se observa que en el cultivo con medio suplementado con insulina el grado de diferenciación es significativamente mayor que en condiciones sin insulina. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05.

### Expresión de IRS2: dentro y fuera de las islas

Centrándonos en los resultados que muestran la evolución de los niveles de IRS2 a lo largo del tiempo, observamos que: (1) dentro de las islas los niveles de IRS2 son mayores que fuera (Figura 20a) y (2) a tiempo final los niveles alcanzados en ausencia de insulina son significativamente mayores que en medio con insulina (Figura 20b). Además, mientras que a t0 no hay diferencias significativas en cuanto a los niveles dentro y fuera de las islas, tras las 48h estas diferencias sí son significativas, indicando que IRS2 aumenta de forma específica dentro de las islas. Esto apoya nuestra primera hipótesis, sugiriendo que IRS2 estaría implicado de forma directa en el proceso de diferenciación, actuando desde el interior de las islas de hepatocitos.

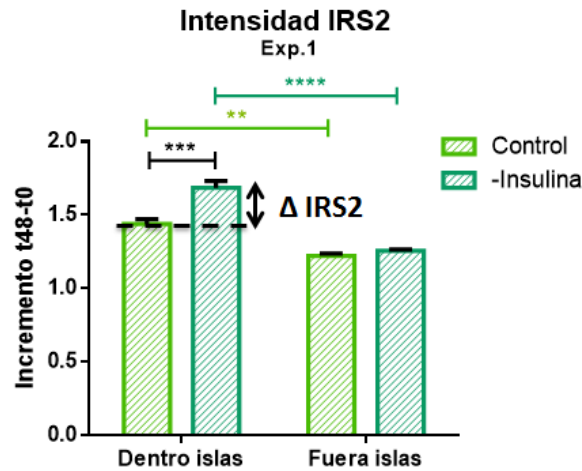


**Figura 19. Evolución de los niveles de IRS2: experimento 1.** a) Evolución de los niveles de IRS2 con el tiempo. Los niveles de IRS2 son más elevado en el interior que en el exterior de las islas. b) Niveles de IRS2 a tiempo inicial (t0) y final (t48). Los niveles en medio sin insulina en el interior de las islas son significativamente mayores que en condiciones control (+Insulina). c) Evolución visual de los niveles de IRS2 en el cultivo. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.



### Incremento de la expresión de IRS2: dentro y fuera de las islas

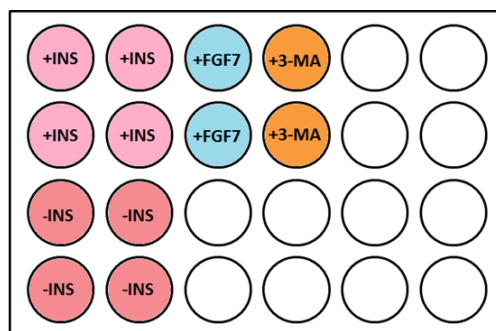
Tras calcular el incremento de intensidad de IRS2, se observa que sus niveles son significativamente más elevados en el interior de las islas que en el exterior. Es más, sin insulina, el incremento de expresión de IRS2 ( $\Delta$  IRS2) en el interior de las islas es significativamente mayor que en condiciones control (**Figura 21**).



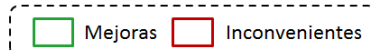
**Figura 21. Incremento de la expresión de IRS2: experimento 1.** Se calcula como intensidad IRS2 tf/ intensidad IRS2 t0. Se observa que dentro de las islas los niveles de IRS2 son significativamente más altos que fuera. Además, en el interior el incremento de la expresión de éste ( $\Delta$ IRS2) es significativamente mayor en ausencia de insulina. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

#### 4.1.1.4 Puesta a punto del ensayo de cribado: prueba con FGF7 y 3-MA.

Tras el análisis del primer experimento en condiciones control y sin insulina, se diseñó un nuevo experimento con el fin avanzar hacia el siguiente objetivo: adaptación del protocolo de análisis diseñado para el cribado de compuestos capaces inducir IRS2, y por tanto la diferenciación. Gracias a la experiencia fruto del fracaso de los anteriores experimentos, se modificaron las condiciones de monitorización, y se diseñó el siguiente experimento para el testado de los compuestos (**Figura 22**):



Experimento 3			
Células	Día 15 en cultivo	Pase	10
FGF7	25ng/ml0	3-MA	2,5mM
Canales	C1=fluo-GFP	C2=fluo-RFP	C3=CF
Campos/pocillo	2 (+ INS)/ 4 (FGF7-3MA)	Selección campos	al azar
Resolución	8 bits	Tiempo grabación	72h
Intervalo fotos	1foto/3h	Total fotos/canal	25
Total fotos/campo	75	Fotos totales	2.400
Carga total	3,7Gb		

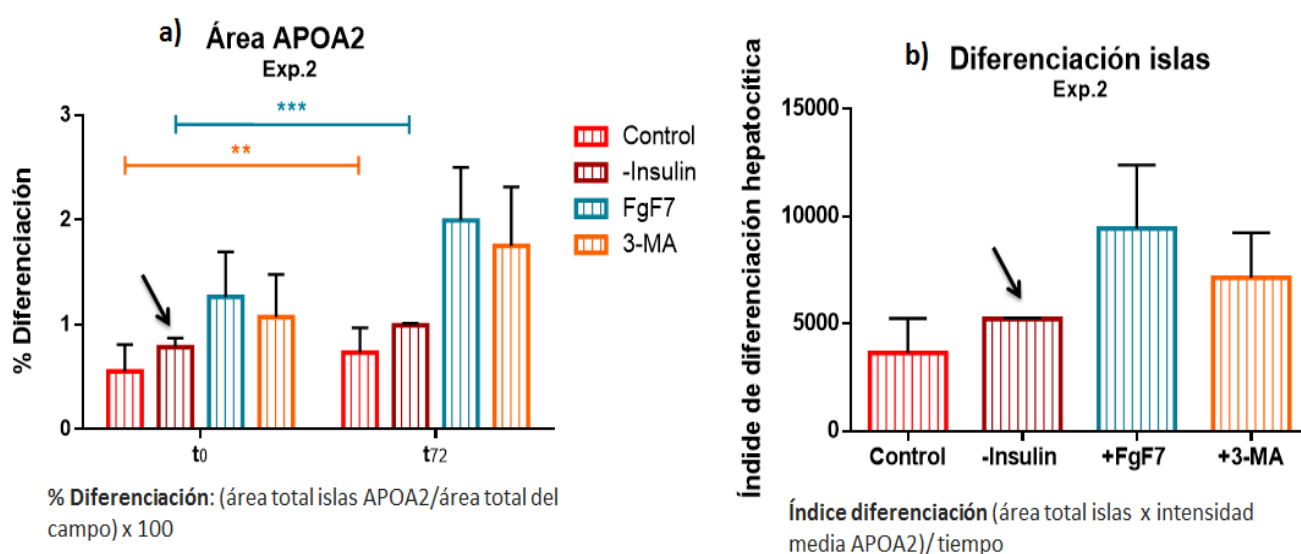


**Figura 22. Diseño experimento prueba de concepto: adaptación cribado.** Se muestra el diseño del primer experimento para el cribado de dos compuestos positivos, según datos previos; para la promoción de la diferenciación. **C1,C2,C3:** Canales 1,2,3 respectivamente. **Fluo:** fluorescencia. **GFP:** Proteína verde fluorescente. **RFP:** proteína roja fluorescente. **Gb:** Gigabytes. **h:** horas. **Min:** minutos. Placa de cultivo. **+INS:** células en medio suplementado con insulina. **-INS:** células en medio sin insulina. **+FGF7:** media con insulina y FGF7 a una concentración 25 ng/ml. **+3-MA:** medio con insulina más 3-Metiladenina 2.5mM.

No obstante aunque algunas de las condiciones modificadas supusieron una mejora, como el aumento de campos por pocillo para tener un mayor número de réplicas, y la reducción del intervalo de toma de fotos, así como la resolución, que redujo significativamente la carga de trabajo total, las condiciones de cultivo no era óptimas.

#### Resultados de la puesta a punto del cribado con FGF7 y 3-MA

A la vista de los siguientes resultados se concluyó que las condiciones de cultivo no eran las adecuadas ya que los controles positivo (+insulina) y negativo (-insulina) no eran los esperados. Pese a que se hizo el análisis completo de los resultados, solo se muestran las siguientes gráficas ya que se decidió repetir el experimento y no considerar relevantes los datos obtenidos. Como indica la flecha (**Figura 23 a y b**), en condiciones sin insulina (control negativo) se observa que el grado así como el índice de diferenciación son ligeramente mayores que en condiciones con insulina, cuando se espera observar lo contrario como bien respaldan los resultados del experimento 1.

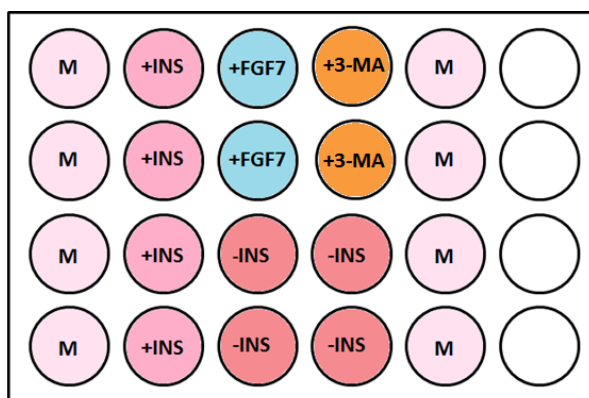


**Figura 23. Resultados prueba de concepto: adaptación cribado.** a) % de diferenciación. b) índice de diferenciación. Como indica la flecha, en ambos casos en condiciones sin insulina se observa una tendencia hacia un mayor grado de diferenciación en comparación con las condiciones control, al contrario de lo esperado. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

#### 4.1.1.5 Resultados de cribado de compuestos inductores de IRS2: FGF7 y 3-MA

##### Diseño del experimento

A la vista de que los resultados más robustos fueron con las condiciones del Experimento 1 se decidió mantener las condiciones de cultivo de dicho experimento (**Figura 24**). Otra de las adaptaciones destacables en este experimento, a parte de la reducción del intervalo de toma de fotos con respecto al primero, es el aumento de la concentración de FGF7 testada. Se decidió aumentar ya que resultados de ensayos paralelos llevados a cabo en el laboratorio mostraron que se observaba un mayor efecto a dicha concentración.



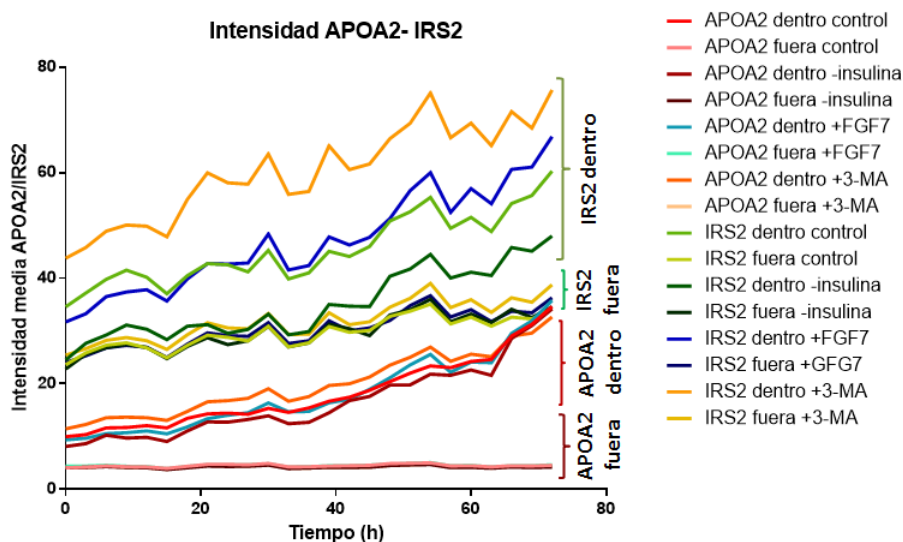
Experimento 4			
Células	Día 10 en cultivo	Pase	8
FGF7	50 ng/ml0	3-MA	2,5mM
Canales	C1=fluo-GFP	C2=fluo-RFP	C3=CF
Campos/pocillo	2 (+-INS)/4 (FGF7-3MA)	Selección campos	al azar
Resolución	8 bits	Tiempo grabación	72h
Intervalo fotos	1foto/3h	Total fotos/canal	25
Total fotos/campo	75	Fotos totales	2.400
Carga total	3,7Gb		

Mejoras
Inconvenientes

**Figura 24. Diseño experimento cribado: FGF7 y 3MA. C1,C2,C3:** Canales 1,2,3 respectivamente. **Fluo:** fluorescencia. **GFP:** Proteína verde fluorescente. **RFP:** proteína roja fluorescente. **Gb:** Gigabytes. **h:** horas. **Min:** minutos. Placa de cultivo. **+INS:** células en medio suplementado con insulina. **-INS:** células en medio sin insulina. **+FGF7:** media con insulina y FGF7 a una concentración 25 ng/ml. **+3-MA:** medio con insulina más 3-Metiladenina 2.5mM. **M:** pocillos sin células sembradas pero con medio para favorecer las condiciones de humedad.

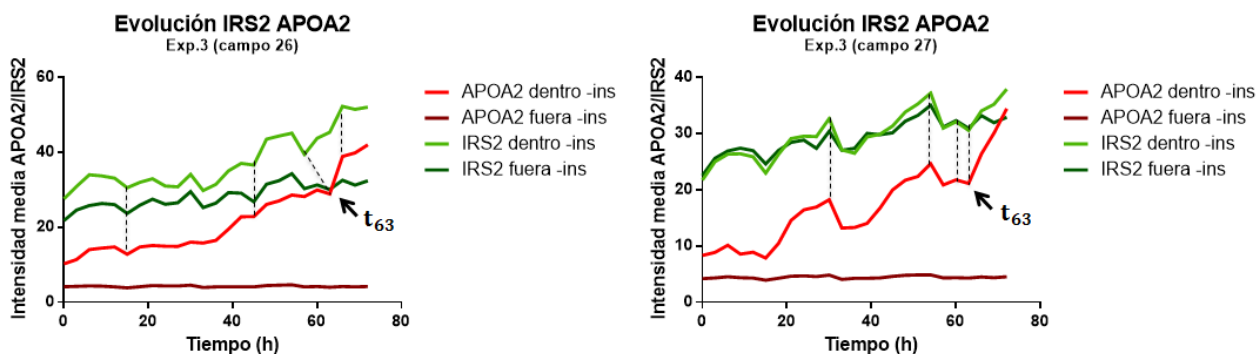
### Resultados

Los resultados obtenidos se resumen en el siguiente gráfico (**Figura 25**), donde se observa que en el caso de IRS2 fuera de las islas y APOA2 dentro y fuera de las islas siguen la misma tendencia a lo largo del tiempo en las cuatro condiciones. La diferencia más apreciable que se observa es en la evolución de IRS2 dentro de las islas, siendo los niveles más altos observados con el tratamiento de 3-MA.



**Figura 25. Intensidades medias de APOA2 y IRS2 a lo largo del tiempo dentro y fuera de las islas: experimento4.**

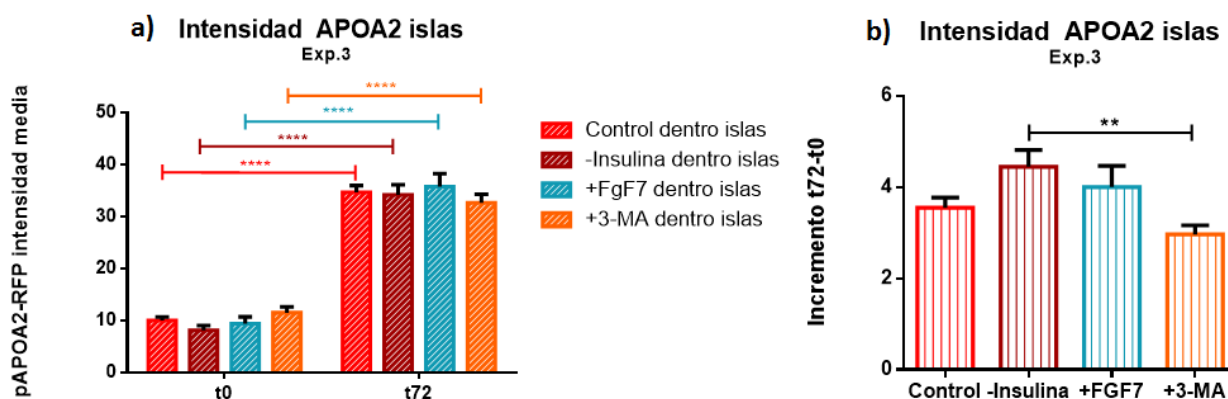
La representación individual de los resultados por pocillo nos permite apreciar como la evolución de la intensidad de APOA2 e IRS2 dentro de las islas siguen tendencias similares, compartiendo altibajos comunes, como indican las líneas discontinuas. Otro detalle que se aprecia es como la evolución de IRS2 fuera de las islas sigue una tendencia parecida a la de IRS2 dentro de las islas, pero a las 63h se produce una desvinculación (punto indicado con la flecha). IRS2 en el interior de las islas sigue aumentando a la vez que APOA2 en las islas, mientras que IRS2 fuera de las islas deja de aumentar (**Figura 26**). Estos datos refuerzan nuestra primera hipótesis: IRS2 ejerce un rol directo en el proceso de diferenciación hepatocítica.



**Figura 26.** Evolución de las intensidades de APOA2 e IRS2 a lo largo del tiempo por pocillo.

### Incremento de la intensidad de APOA2

Como se observa en la **Figura 27a** no hay ninguna diferencia significativa en los niveles de APOA2 entre los controles y los pocillos con tratamientos a tiempo final (t72h). Tampoco se observa un mayor incremento del marcador de diferenciación con FGF7 ni 3-MA con respecto al control (**Figura 27b**). La única diferencia significativa que se observa es entre los niveles de APOA2 en condiciones sin insulina y con 3-MA, considerándose esta diferencia no relevante.



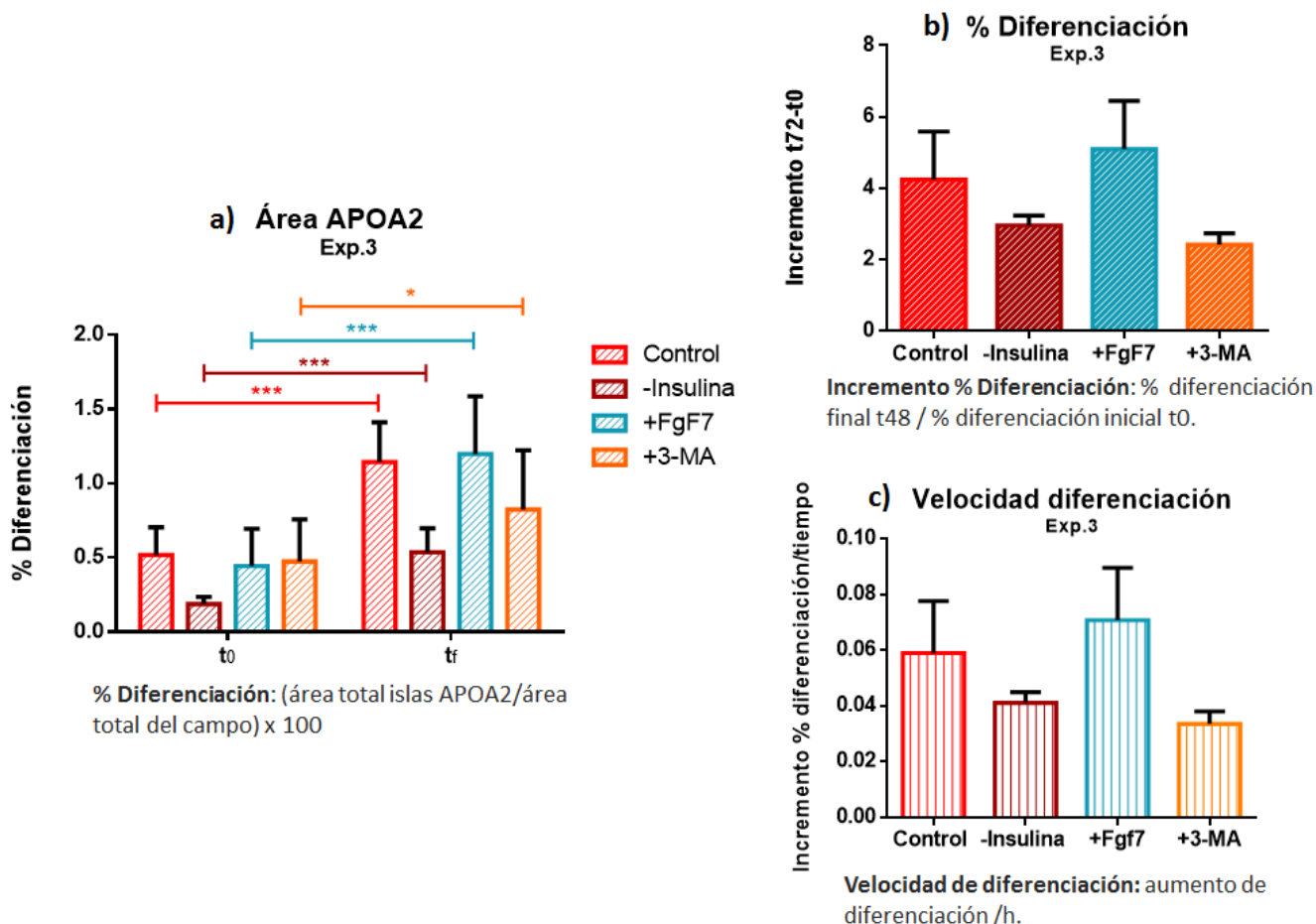
**Figura 27.** Intensidad APOA2: cribado con FGF7 y 3-MA. a) Intensidad de APOA2 dentro de las islas a tiempo inicial y final. b) Incremento de la intensidad de APOA2 en las islas. No se observan diferencias significativas en los niveles de APOA2 a las 72h. b) Se observan diferencias significativas en el incremento de APOA2 en condiciones sin insulina y en medio con 3MA. +FGF7: 50ng/ml. +3-MA: 2.5mM. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

### Grado de diferenciación

- **% Área y velocidad de diferenciación.**

El análisis de los resultados de este experimento muestra esta vez como los controles positivo (+insulina) y negativo (-insulina) son los esperados, existiendo un mayor grado de diferenciación, aunque no significativo, en las condiciones control (**Figura 28 a y b**).

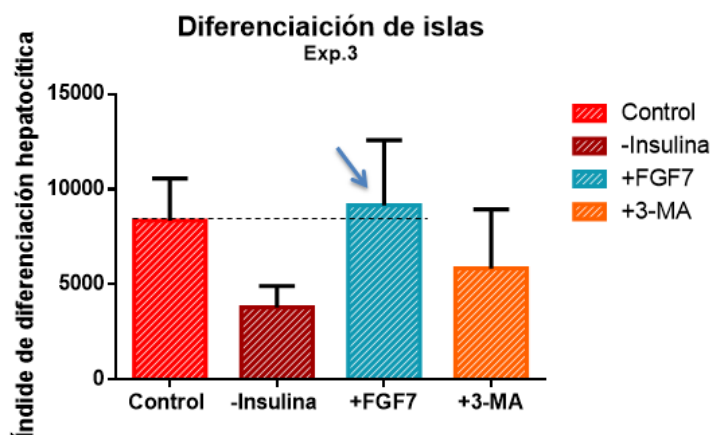
En cuanto a los compuestos candidatos a promover la diferenciación, se observa que las células tratadas con FGF7 (50ng/ml), tienden a aumentar el grado y velocidad de diferenciación, con respecto a las condiciones control (**Figuras 28b y c respectivamente**). No obstante, esta diferencia no es significativa. En cuanto al tratamiento con 3-MA pese a que resultados previos indican que cultivos tratados con el compuesto aumentan el grado de diferenciación, en este experimento no se observa efecto con respecto a las condiciones control (**Figura 28a y b**).



**Figura 28. Área de diferenciación Experimento 4: FGF7, 3-MA.** a) % Diferenciación hepatocítica. Porcentaje de diferenciación a tiempo inicial (t0) y tiempo final (t48). b) **Incremento diferenciación.** Comparación del incremento del % de diferenciación entre las condiciones. c) **Velocidad diferenciación.** +**FGF7:** 50ng/ml. +**3-MA:** 2.5Mm. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

- **Índice de diferenciación:**

Observamos que existe una tendencia a aumentar el grado de diferenciación cuando se trata a las células con FGF7 (flecha azul). Sin embargo esta diferencia no es significativa con respecto al grupo control. Con respecto a 3-MA no se observa ninguna diferencia (**Figura 29**).



**Figura 29. Índice de diferenciación hepatocítica experimento 4:FGF7 y 3-MA.** Se observa que en el cultivo tratado con FGF7 (50 ng/ml), hay un ligero aumento del grado de diferenciación, siendo dicho aumento no significativo con respecto a las condiciones control. En el caso de 3-MA no se observa un efecto potenciador de la diferenciación. +FGF7: 50ng/ml. +3-MA: 2.5Mm. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05.

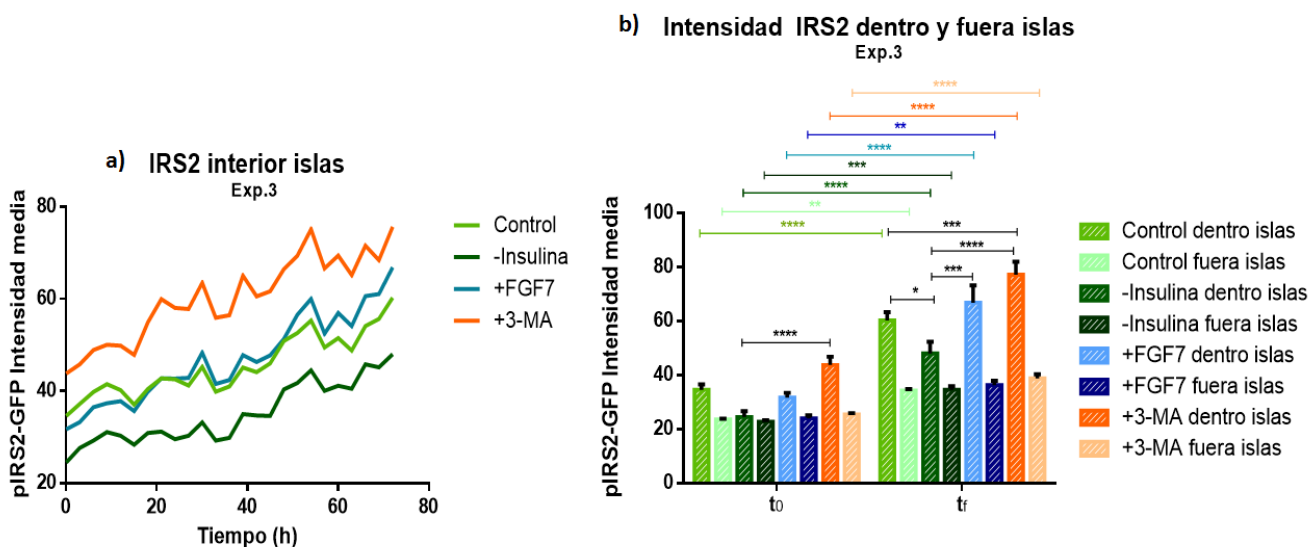
### Expresión de IRS2

- **Evolución de la expresión de IRS2 dentro de las islas con el tiempo:**

Como se observa en los resultados (**Figura 30a**) la evolución de la intensidad de IRS2 con el tiempo sigue la misma dinámica en el caso de las 4 condiciones. A tiempo inicial (t<sub>0</sub>), no se observan diferencias significativas entre las distintas condiciones tanto dentro como fuera de las islas, únicamente cuando se comparan los valores de fluorescencia del medio con 3-MA y sin insulina dentro de las islas, considerado no relevante.

Cabe destacar que los mayores niveles de IRS2 tras 72h se alcanzan tras el tratamiento con 3-MA (2.5mM), siendo la diferencia con respecto al control y condiciones sin insulina, significativa (**Figura 30b**). No obstante, a tiempo cero los niveles también son más elevados que en el resto de condiciones. Esto podría estar debido a la selección de campos iniciales no representativos.

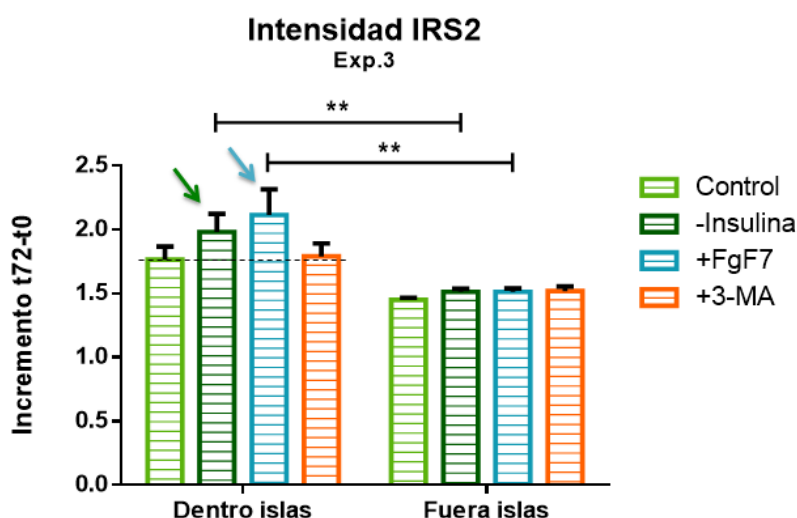
En cuanto al tratamiento con FGF7 se observa un ligero aumento con respecto a las condiciones control a tiempo final (t<sub>f</sub>), aunque no es significativo. Dicho incremento es más pronunciado en comparación con el tratamiento sin insulina, dónde en este caso la diferencia sí es significativa (**Figura 30b**).



**Figura 30. Evolución de los niveles de IRS2: experimento 4.** a) Evolución de los niveles de IRS2 con el tiempo. b) Niveles de IRS2 a tiempo inicial (t0) y final (t48): dentro y fuera de las islas. Se observa que a t48 los niveles de IRS2 son significativamente mayores en presencia de 3-MA con respecto a los controles positivo y negativo (-Insulina). Los niveles de IRS2 con el tratamiento de FGF7 son significativamente mayores que en medio sin insulina. . +FGF7: 50ng/ml. +3-MA: 2.5Mm. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

- **Incremento de la expresión de IRS2 dentro y fuera de las islas:**

Se observa como hay una tendencia hacia un aumento de los niveles del gen en las condiciones sin insulina y tras el tratamiento con FGF, con respecto al control (como indican las flechas verde y azul respectivamente). No obstante dichas diferencias no son significativas (**Figura 31**).



**Figura 31. Incremento de la expresión de IRS2: experimento 4.** Se calcula como intensidad IRS2 t72/intensidad IRS2 t0. Se observa que dentro de las islas los niveles de IRS2 son significativamente más altos que fuera. En condiciones sin insulina y FGF7 son ligeramente superiores que en las condiciones control, como indican las flechas verde y azul, respectivamente. . +FGF7: 50ng/ml. +3-MA: 2.5Mm. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

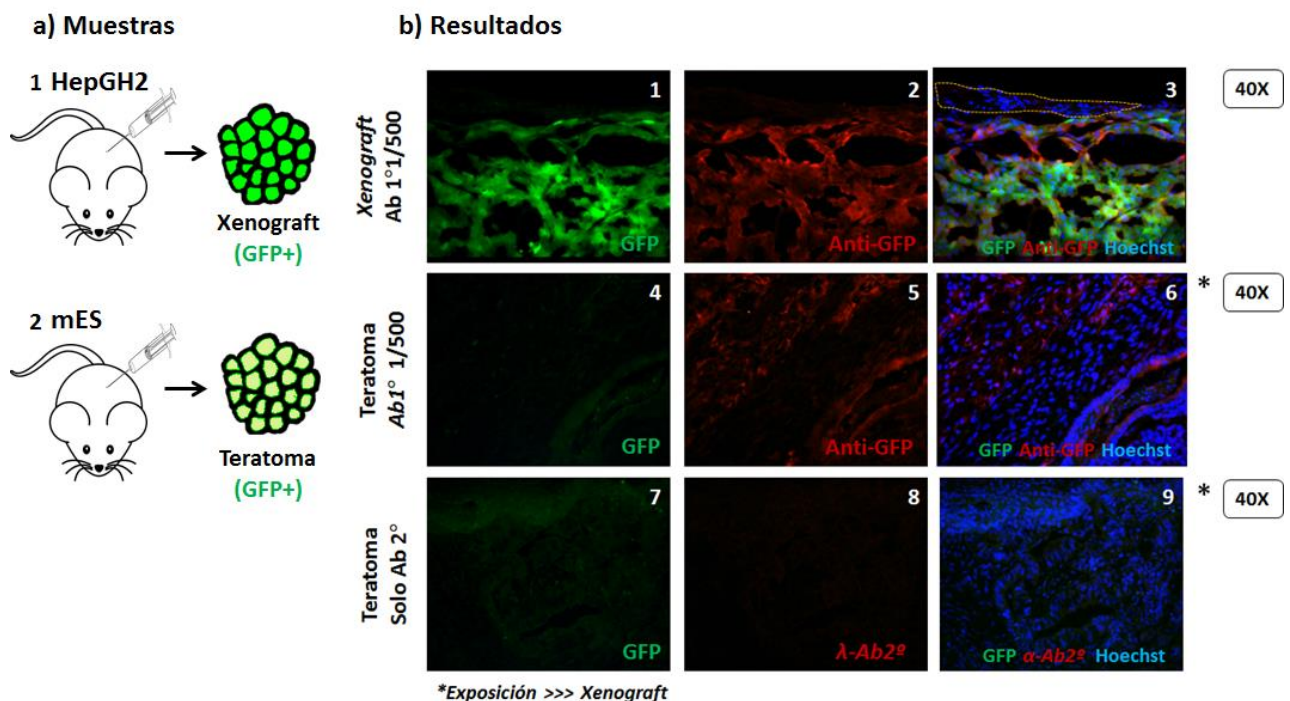
#### 4.1.1.6 Caracterización de los ratones *Knock-in* IRS2-GFP

Parte del proyecto fue la caracterización del novedoso modelo que ha creado el laboratorio para el estudio espacial de IRS2 *in vivo*. Estos animales presentan insertado el gen de GFP al final del gen de IRS2, de tal forma que la expresión de IRS2 no se ve afectada y es directamente proporcional a los niveles de expresión de GFP. Este ratón permitiría completar la caracterización espaciotemporal de IRS2, ya que es una herramienta en el cual testar y validar los compuestos positivos resultantes del cribado, observando si realmente *in vivo* se produce una inducción de IRS2.

La caracterización del modelo *in vivo*, se realizó mediante el empleo de las técnicas: (1) tinción inmunohistoquímica y (2) *Western Blot*:

(1) *Inmunohistoquímica*. Antes de disponer de los animales *Knock-in* IRS2-GFP, se quiso realizar una tinción inmunohistoquímica sobre teratomas formados por la inyección subcutánea en ratones de las células embrionarias de ratón (mEs) (Figura 31 a2) que fueron utilizadas para la creación de los ratones *Knock-in*. Como control positivo se utilizaron cortes de muestras de un tumor *xenograft* (Figura 31 a1) de células HepG2 humanas las cuales expresan GFP mediante un promotor constitutivo. Como control negativo se utilizaron cortes de muestras de teratoma incubadas sólo con el anticuerpo secundario. Es de esperar que en estas muestras no se observe tinción. Toda posible fluorescencia observada será debido a uniones inespecíficas o ruido de fondo por auto fluorescencia del propio tejido.

Los resultados muestran como en el control positivo las células tumorales expresan GFP (Figura 31 b1) y comprobamos que el anticuerpo utilizado se une específicamente a la proteína ya que se observa una tinción roja que colocaliza con la tinción verde (Figura 31 b2). Esta tinción no es inespecífica porque cuando superponemos la imagen de los núcleos teñidos con Hoechst (Figura 31 b3), observamos que las células del ratón huésped que envuelven al tumor y no expresan GFP, no presentan ninguna de las tinciones anteriores (zona delimitada por la línea amarilla). En cuanto a los teratomas, éstos muestran que al parecer las células sí expresan la construcción IRS2-GFP ya que se observa tanto una tinción verde (Figura 31 b4) como una tinción roja (Figura 31 b5), tinción que apenas se observa cuando se utiliza sólo el anticuerpo secundario (Figura 31 b8), considerándose ruido de fondo dada la alta exposición. No obstante, en el caso de las muestras de los teratomas tanto la detección de fluorescencia de GFP endógena como amplificada con el anticuerpo fueron demasiado tenues, por lo que los resultados no se consideran lo suficientemente robustos. Quizá las mEs expresen niveles de GFP muy bajos que junto con una posible degradación de la proteína durante el procesamiento de las muestras, dificulte tanto su observación sin amplificar (tinción verde, Figura 31 b4) como la amplificada con el anticuerpo (tinción roja, Figura 31 b5). Se concluyó que se necesitaban otras aproximaciones experimentales como *Western Blot* para proseguir con la caracterización del modelo *in vivo*.

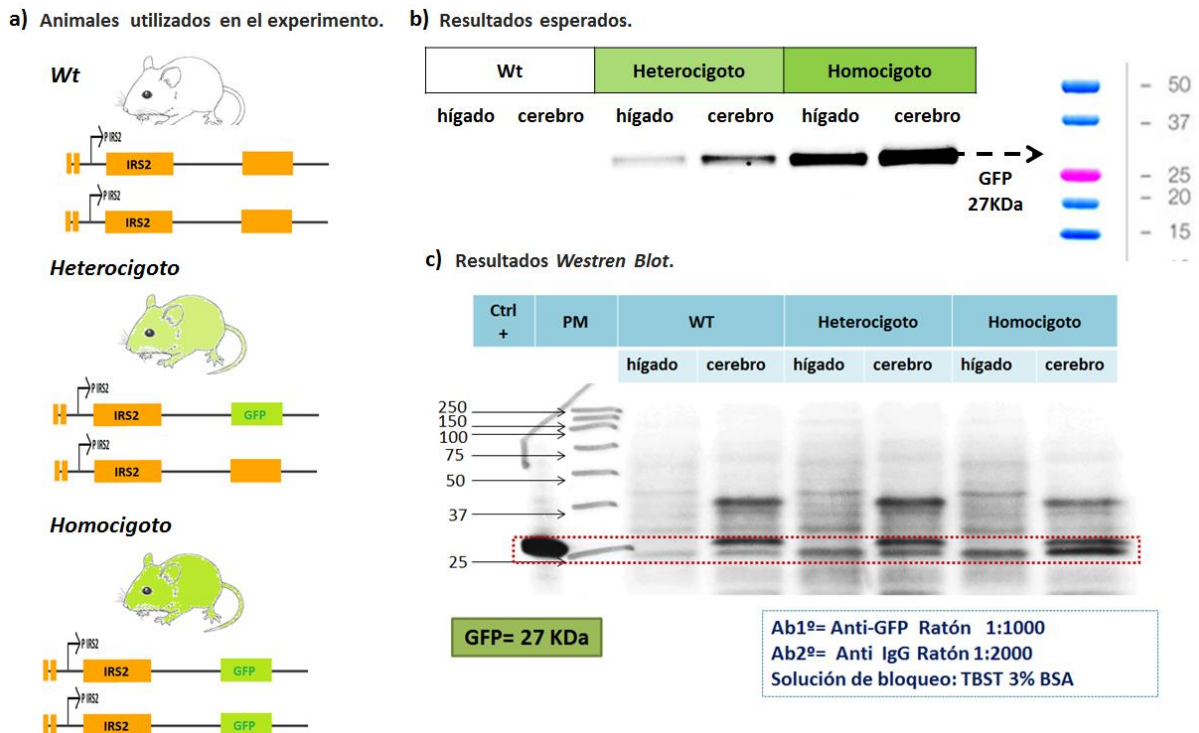




**Figura 32. Caracterización del modelo in vivo: tinción inmunohistoquímica.** a) Muestras: 1 cortes de xenograft y 2 teratoma. b) Resultados. control positivo (1-3); teratoma (4-6); control negativo(7-9). **GFP:** proteína verde fluorescente. **Anti-GFP:** anticuerpo contra GFP. **λ-Ab 2°:** exposición rojo cercano, longitud onda 568 nm. **Hoechst:** tinción específica de núcleo celular. \*Exposición más elevada que en las muestras del control positivo. **HepG2:** línea tumoral humana. **mEs:** células embrionarias de ratón.

(2) **Western Blot.** Como control negativo se utilizaron muestras de un animal silvestre y como control positivo se utilizó la extracción de proteínas de la línea HepaRG IRS2/APOA2 la cual expresa GFP. Se emplearon además muestras tanto de hígado como de cerebro de los ratones *Knock-in* IRS2-GFP (**Figura 33a**).

Aunque los resultados de las muestras de ratones IRS2-GFP homocigotos y heterocigotos sí concuerdan con los esperados (**Figura 33b**), siendo más intensas las bandas del homocigoto, así como las bandas de las muestras de cerebro en ambos casos (se conoce que expresa más que en el hígado), se observan bandas inespecíficas para las muestras control (**Figura 33c**). La aparición de estas bandas inespecíficas se piensa que puede ser por el uso de un anticuerpo anti-GFP casero obtenido en el propio laboratorio. El experimento fue repetido con otro anticuerpo anti-GFP comercial, a distintas concentraciones. No obstante, no se obtuvieron resultados suficientemente robustos para concluir la caracterización de los animales, siendo necesaria la repetición del experimento en un futuro.



**Figura 33. Caracterización del modelo in vivo: Western Blot.** a) Animales utilizados en el experimento. b) Resultados esperados. c) Resultados del experimento de Western Blot. P: promotor. KDa: Kilo Daltons (unidades de peso molecular proteico). Ctrl: control positivo. Ab: anticuerpo. TBST: tampón tris salino con Tween 20. BSA: albúmina de suero bovino. Wt: animal silvestre (*Wild type*). GFP: proteína verde fluorescente. IRS2: sustrato 2 del receptor de insulina. PM: Marcador peso molecular.

## 4.2 DISCUSIÓN

IRS2 es una molécula que ha sido la protagonista de diversas líneas de estudio llevadas a cabo en el laboratorio por su implicación en el desarrollo de resistencia a insulina (Withers et al., 1998), la pérdida de capacidad regeneradora del hígado ante daño hepático crónico, el desarrollo de CHC y patologías neuronales derivadas (Grote, Morris, Ryals, Geiger, & Wright, 2011). No obstante, hasta el momento el estudio de la implicación de IRS2 en el proceso de hepatogénesis se había realizado mediante experimentos en los que la cuantificación de la expresión tanto de IRS2 como de APOA2 se hizo en momentos iniciales y finales, tras mantener las células en cultivo diversos intervalos de tiempo. No se había estudiado con detalle la evolución de su expresión en directo en un mismo cultivo celular. El nuevo enfoque de monitorización de los cultivos por *time-lapse* en el que se ha basado el desarrollo del proyecto ha permitido seguir más de cerca la evolución espacial y temporal de IRS2 (a través del seguimiento de la fluorescencia verde), obteniendo detalles que no habían podido ser apreciados en los anteriores experimentos de “*endpoint*” realizados hasta el momento.

Los resultados obtenidos en el experimento 1 (condiciones control y –insulina) en sintonía con los anteriormente obtenidos en el laboratorio ponen de manifiesto: (1) la validez del protocolo de análisis diseñado ya que es capaz de cuantificar cambios significativos en la expresión de los genes reporteros así como medir el grado de diferenciación hepatocítica en un periodo relativamente corto (48h) (**Figura 15**); (2) la importancia de la insulina en la mediación del proceso de diferenciación hepática ya que en su ausencia el grado de diferenciación de los cultivos HepaRG es menor (**Figuras 18, 19**); (3) la implicación directa de IRS2 en el proceso de diferenciación como reflejan unos niveles significativamente más altos de su expresión en el interior de las islas (**Figura 20**); (4) la relevancia de considerar a IRS2 como diana potencial para inducir un aumento de la hepatogénesis con compuestos que estimulen su expresión.

Uno de los resultados que nos ha llamado la atención de este primer experimento ha sido descubrir que en ausencia de insulina los niveles de IRS2 dentro de las islas son significativamente mayores que en presencia de insulina. Estos datos sugieren que la expresión de IRS2 podría estar aumentada con el objetivo de intentar compensar la falta de señalización por insulina para poder alcanzarse un grado de diferenciación similar al alcanzado en presencia de la hormona. No obstante, aunque los niveles de APOA2 adquiridos a tiempo final son similares tanto en presencia como en ausencia de insulina, la sobreexpresión de IRS2 no consigue compensar la falta de insulina.

Los datos del experimento 4 con FGF7 (50ng/ml) y 3-MA (2.5mM), compuestos de los se tiene datos que avalan su potencial como inductores del grado de diferenciación hepática revelan que el protocolo diseñado puede ser utilizado para la evaluación del efecto de dichos compuestos sobre la expresión de IRS2 (**Figuras 30 y 31**). Sin embargo, el protocolo debe ser optimizado ya que con la selección al azar de 8 campos por condición las barras de error obtenidas tras el análisis estadístico indican un alto grado de variabilidad en las medidas. En algunos casos a tiempo 0 no se ha detectado ninguna isla. Se ha considerado eliminar dichos campos del análisis, reduciendo el número de réplicas en el caso de las condiciones control y FGF7 (control (n=7); -insulina (n=8); +FGF7(n=5); +3-MA (n=8). Por tanto, algunas de las aproximaciones que se proponen para su optimización son (1) analizar un mayor número de campos al azar (>8 por condición) para que la muestreo sea representativo; (2) selección de aquellos campos que a momento inicial tengan islas, siendo estas aproximadamente del mismo tamaño. Este criterio seguido en el primer experimento nos ha proporcionado datos más robustos y significativos.

También se requiere ajustar mejor el periodo de monitorización de los cultivos para el experimento de cribado. En el caso de FGF7 se observa un ligero aumento tanto del grado de

diferenciación (**Figura 29**) como de IRS2 (**Figura 31**) con respecto a control. Posiblemente sean necesarios más días de monitorización o células en un estado de diferenciación más avanzado (> 10 días en cultivo) para observar un efecto positivo tanto de FGF7 como de 3-MA. También es necesario trabajar en la caracterización de los animales *Knock-in* IRS2-GFP ya que serían el modelo animal donde estudiar los compuestos positivos obtenidos del futuro ensayo de cribado.

En resumen, la realización de este proyecto ha permitido diseñar y poner a punto un protocolo de análisis de imagen automatizado que ha posibilitado profundizar en la caracterización espaciotemporal de IRS2, molécula que se piensa que es clave en el desarrollo de resistencia a insulina y diversas complicaciones hepáticas derivadas de la misma. En base a los resultados positivos obtenidos del primer experimento hemos podido comprobar nuestra hipótesis: IRS2 juega un papel directo en el proceso de diferenciación. Pese a la necesidad de optimización del protocolo, éste constituye una herramienta útil para el estudio de IRS2 dentro de las islas de hepatocitos y es un primer paso hacia el desarrollo de un cribado de alto rendimiento de compuestos que promovieran su expresión. Creemos en el potencial de la sobreexpresión de IRS2 para avanzar hacia (1) una terapia que favorezca la regeneración hepática en pacientes diabéticos que sufren daño hepático crónico y hacia (2) una “terapia de diferenciación” intratumoral que cambie el perfil de las células cancerígenas hacia uno menos agresivo y diferenciado, mejorando así la supervivencia y pronóstico de los pacientes con CHC.

## 5. CONCLUSIONES

Como resultado del proyecto realizado se concluye:

- (1) El protocolo de análisis de imagen diseñado es válido para la discriminación de islas de hepatocitos a partir del marcador de diferenciación APOA2 y el estudio de IRS2 dentro y fuera de dichas islas.
- (2) El cálculo del índice de diferenciación, parámetro que integra tanto el área como la intensidad de APOA2 en las islas de hepatocitos, es una buena aproximación para medir el grado de diferenciación de los campos fotografiados.
- (3) IRS2 juega un papel directo en el proceso de diferenciación hepatocítica: sus niveles de expresión son significativamente más altos en el interior de las islas de hepatocitos. Se define a IRS2 como molécula conductora del proceso de diferenciación hepática dependiente de insulina.
- (4) IRS2 constituye una diana potencial, cuya inducción podría favorecer el proceso de diferenciación de células progenitoras hacia células hepáticas maduras.
- (5) La utilidad del protocolo de análisis de imagen diseñado para su adaptación al cribado de compuestos con capacidad inductora de IRS2.
- (6) La necesidad de la optimización del protocolo diseñado para ser adaptado a un cribado de compuestos promotores de IRS2 de alto rendimiento, así como la optimización del modelo *in vivo* dónde testar los futuros compuestos positivos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Belfiore, A., & Malaguarnera, R. (2011). Insulin receptor and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 18(4), 125–147. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0074>
- Beyer, T. A., Xu, W., Teupser, D., auf dem Keller, U., Bugnon, P., Hildt, E., ... Werner, S. (2008). Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *The EMBO Journal*, 27(1), 212–223. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601950>
- Boissan, M., Beurel, E., Wendum, D., Rey, C., Lécluse, Y., Housset, C., ... Desbois-Mouthon, C. (2005). Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 167(3), 869–77. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62058-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62058-5)
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Bugianesi, E. (2007). Non-alcoholic Steatohepatitis and Cancer. *Clinics in Liver Disease*, 11(1), 191–207. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.02.006>
- Dubois-Pot-Schneider, H., Fekir, K., Coulouarn, C., Glaise, D., Aninat, C., Jarnouen, K., ... Corlu, A. (2014). Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology*, 60(6), 2077–2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27353>
- Fickert, P., Stöger, U., Fuchsbichler, A., Moustafa, T., Marschall, H.-U., Weiglein, A. H., ... Trauner, M. (2007). A New Xenobiotic-Induced Mouse Model of Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 525–536. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061133>
- Friemel, J., Rechsteiner, M., Frick, L., Böhm, F., Struckmann, K., Egger, M., ... Weber, A. (2015). Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 21(8), 1951–1961. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0122>
- Garcia-Compean, D. (2009). Liver cirrhosis and diabetes: Risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World Journal of Gastroenterology*, 15(3), 280. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.280>
- Grote, C. W., Morris, J. K., Ryals, J. M., Geiger, P. C., & Wright, D. E. (2011). Insulin receptor substrate 2 expression and involvement in neuronal insulin resistance in diabetic neuropathy. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 21–28. <https://doi.org/10.1155/2011/212571>
- Hoshida, Y., Nijman, S. M., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J. P., Chiang, D. Y., ... Golub, T. R. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 69(18), 7385–7392. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>
- Hossain, P., Kavar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *New England Journal of Medicine*, 356(3), 213–215. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>
- Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., ... Kadowaki, T. (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory  $\beta$ -cell hyperplasia. *Diabetes*, 49(11), 1880–1889. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1880>
- Manuscript, A., & Nanostructures, S. P. C. (2008). NIH Public Access. *Nano*, 6(9), 2166–2171. <https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>
- Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A., & Kahn, C. R. (2000). Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Molecular Cell*, 6(1), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00015-8)
- Nemazanyy, I., Montagnac, G., Russell, R. C., Morzyglod, L., Burnol, A.-F., Guan, K.-L., ... Panasyuk, G. (2015). Class III PI3K regulates organismal glucose homeostasis by providing negative feedback on hepatic insulin signalling. *Nature Communications*, 6, 8283. <https://doi.org/10.1038/ncomms9283>
- Takase, H. M., Itoh, T., Ino, S., Wang, T., Koji, T., Akira, S., ... Miyajima, A. (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development*, 27(2), 169–181. <https://doi.org/10.1101/gad.204776.112>
- Valverde, A. M., Burks, D. J., Fabregat, I., Fisher, T. L., Carretero, J., White, M. F., & Benito, M. (2003). Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes*, 52(9), 2239–2248. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2239>
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D.

J., Ren, J. M., Previs, S., ... White, M. F. (1998).  
Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.  
*Nature*, 391(6670), 900–4.  
<https://doi.org/10.1038/36116>

World Health Organization. (2016). Global Report  
on Diabetes. *Isbn*, 978, 88. [https://doi.org/ISBN  
978 92 4 156525 7](https://doi.org/ISBN9789241565257)

**Webgrafía:**

- *American diabetes association: complications.*  
<http://www.diabetes.org/living-withdiabetes/complications/?referrer=https://www.google.es/>
- *OMMBID: Insulin Action, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes Mellitus*  
<http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971&sectionid=62671543&jumpsectionID=62671552>
- *International Diabetes Federation*  
<https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>